

长白山大花剪秋萝组织培养及保存技术

冯 敏, 顾德峰, 王 阳, 刘美彤, 董 然

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以长白山大花剪秋萝茎节为外植体,对其丛生芽诱导、增殖、生根及保存的最佳培养基进行了筛选。结果表明:最佳茎节诱导培养基为 MS+0.8 mg/L 6-BA+0.08 mg/L NAA,萌发率为 90.24%;幼芽最佳增殖培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.03 mg/L NAA,最佳继代时间为 25 d,平均增殖率为 94.1%;最佳生根培养基为 1/2MS+1.0 mg/L NAA,生根率为 87.03%;适合该物种保存的培养基为 1/10MS(大量元素)+1/3MS(微量元素)+1/2MS(Fe 盐)+1/4MS(有机物),恢复率 86.97%,无明显变异,生长良好。

关键词:大花剪秋萝;茎节培养;物种保存

中图分类号:Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)10-0092-05

大花剪秋萝(*Lychnis fulgens* Fisch.)属石竹科剪秋萝属多年生草本植物。原产中国^[1],主要分布于俄罗斯、西伯利亚、朝鲜北部、日本及中国的长白山地区;曾被选为北京奥运会园林绿化成果展示花卉^[2];在此区域还有同属的浅裂剪秋萝(*Lychnis cognate* Maxim.)、丝瓣剪秋萝(*Lychnis wilfordii* (Regel) Maxim.)^[3];散生于长白山海拔 400~2 000 m 的林下、草甸、林缘及山坡林下阴湿地^[3-4]。

大花剪秋萝花红色,鲜艳夺目,用于花坛、花境自然配置及盆栽等。其根部含三萜皂甙用于治疗头痛,地上部分显香豆素反应^[5]。全草入药,具有清热解毒、活血消肿功效^[6]。大花剪秋萝是难得的聚集观赏价值和药用价值于一身的新型花卉作物。长白山大花剪秋萝优良单株具有茎节直立、植株矮小、抗倒伏、花大色艳、方便管理、观赏价值高等优良性状,因此更具有广泛的应用前景和观赏价值。

随着城乡园林绿化品味的提升及对野生花卉需求的加大,大花剪秋萝的野生种群和生存条件受到威胁,且其种子繁殖率低下,已影响到该物种的生存和繁衍^[7]。目前,国内外只对同科植物瞿麦^[8]、中国石竹^[9]、宽叶石竹^[10]等相继开展组培技术等方面研究,仅肖宁^[2]对其组培技术进行了简单的研究,而有关野生直立矮化

大花剪秋萝优良单株的研究尚鲜见报道。因此现以具有较高观赏价值的大花剪秋萝为试材,利用离体快繁技术手段进行繁殖,以期为繁殖和保护长白山大花剪秋萝资源提供有效的途径,为其种质资源的创新和优良单株的选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2011 年长白山西坡山门附近的野外调查发现,直立矮化大花剪秋萝优良单株丛,其花期株高不超过 35 cm,茎节直立,花大色艳,经 3 a 的观察其为大花剪秋萝优良单株丛。为保存其稳定的优良性状,采用茎节为外植体,作为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 5~6 月取大花剪秋萝茎节,将其放置流水下,冲洗 2~3 h,置超净工作台上用 70%酒精浸泡 5~8 s,用无菌水冲洗 4~6 次后用 0.1%升汞灭菌 10~12 min,为提高灭菌效果加入少量吐温 80,再用无菌水冲洗 6~8 次,用滤纸吸干表面水分,然后将其接种于不同培养基进行诱导。

1.2.2 丛生芽诱导培养 将灭菌后的茎节接种至添加不同浓度的 6-BA(0.5、0.8、1.0 mg/L),NAA(0.06、0.08、0.10 mg/L)和 2,4-D(0.1、0.2 mg/L)的 MS 基本培养基中,将其进行丛生芽诱导培养,筛选出最适丛生芽诱导的培养基。

1.2.3 幼芽的继代增殖培养 将生长旺盛的无菌苗切成 2~3 个幼芽,分别接种于添加不同激素配比的 MS 培养基中进行幼芽继代增殖培养,筛选出最适幼芽增殖的激素质量浓度配比。

1.2.4 生根培养 选取继代增殖中长势良好且健壮的

第一作者简介:冯敏(1989-),女,吉林通化人,硕士研究生,研究方向为野生植物引种驯化。E-mail:529648666@qq.com.

责任作者:董然(1966-),女,吉林长春人,博士,教授,现主要从事野生植物引种驯化等教学与科研工作。E-mail:dongr999@163.com.

基金项目:吉林省科技厅科技支撑计划资助项目(20100259)。

收稿日期:2014-01-04

丛生芽进行生根试验,以 MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS 作基本培养基,附加不同质量浓度的 NAA(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L),筛选出最适生根培养基。

1.2.5 种质资源保存培养 将丛生芽接种在不同培养基上进行种质资源保存,筛选最适种质资源保存的培养基。

1.2.6 试验培养条件 添加蔗糖 35 g/L,琼脂 10 g/L, pH 5.80,温度 25℃,光照强度 2 000~3 000 lx,光照周期 12~14 h/d。每个处理 3 次重复,每重复设 10 瓶,每瓶接种 3 个材料。每 15、20、25、30、35 d 进行观察和数据统计。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂对大花剪秋萝丛生芽诱导的影响

将选取的优良大花剪秋萝茎节接种于不同培养基中。在加入 0.8 mg/L 6-BA 和 0.08 mg/L NAA 的培养基中约 10 d 后,外植体开始萌动(图 1),并伴随着新叶长出,植株生长健壮且萌发率最高为 90.24%,与其它质量浓度配比存在极显著差异($P<0.01$)(表 1);而加有 2,4-D 的培养基中,10 d 后开始出现致密、颗粒状愈伤组织,初时愈伤组织为绿色,随着时间的加长,其逐渐变为褐色或黑色,几乎停止生长,未出现分化现象。因此诱导大花剪秋萝茎节的最佳培养基为 MS+0.8 mg/L 6-BA+0.08 mg/L NAA,平均诱导率为 90.24%。

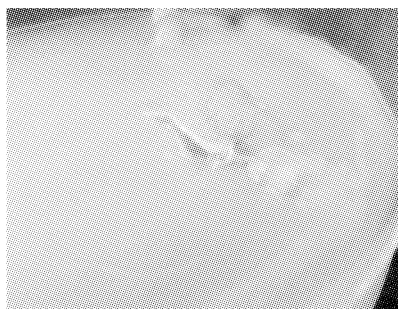


图 1 外植体(茎尖)接种时的生长状态

Fig. 1 The growth state of inoculation of explants(shoot apex)

2.2 不同质量浓度的激素比对大花剪秋萝幼芽继代增殖的影响

将诱导培养基中培养出的健壮无菌苗分切后,接于增殖培养基中继续试验。从表 2、3 和图 2~4 可以看出,6-BA 浓度在 2.0 mg/L 时,分别与浓度为 0.02 mg/L 的 NAA、IAA、IBA 激素配比的幼芽继代增殖中,均存在极显著差异($P<0.01$),6-BA 与 NAA 配比中增殖率最高,为 69.3%,且植株生长健壮;在不同浓度的 6-BA 和 NAA 配比中,当 6-BA 浓度低于 3.0 mg/L、NAA 浓度低于

0.03 mg/L 时,幼芽继代增殖呈上升趋势;当 6-BA 浓度高于 3.0 mg/L、NAA 浓度高于 0.03 mg/L 时幼芽继代增殖呈下降趋势。综上,大花剪秋萝幼芽继代增殖的最佳培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.03 mg/L NAA,平均增殖率为 92.6%。

表 1 不同植物生长调节剂对大花剪秋萝丛生芽诱导的影响

Table 1 Influence of different growth regulators on induction of adventitious bud of *Lychnis fulgens* Fisch.

序号 No.	6-BA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	2,4-D /mg · L ⁻¹	接种数 No. of inoculated plantlets/株	诱导数 No. of induction/个	平均诱导率 Rate of induction/%
A1	0.5	0.06	0.0	30	10	32.13H
A2	0.5	0.06	0.1	30	0	0I
A3	0.5	0.06	0.2	30	0	0I
A4	0.5	0.08	0.0	30	15	49.89E
A5	0.5	0.08	0.1	30	0	0I
A6	0.5	0.08	0.2	30	0	0I
A7	0.5	0.10	0.0	30	12	40.31G
A8	0.5	0.10	0.1	30	0	0I
A9	0.5	0.10	0.2	30	0	0I
A10	0.8	0.06	0.0	30	20	66.92C
A11	0.8	0.06	0.1	30	0	0I
A12	0.8	0.06	0.2	30	0	0I
A13	0.8	0.08	0.0	30	27	90.24A
A14	0.8	0.08	0.1	30	0	0I
A15	0.8	0.08	0.2	30	0	0I
A16	0.8	0.10	0.0	30	21	70.47B
A17	0.8	0.10	0.1	30	0	0I
A18	0.8	0.10	0.2	30	0	0I
A19	1.0	0.06	0.0	30	14	45.97F
A20	1.0	0.06	0.1	30	0	0I
A21	1.0	0.06	0.2	30	0	0I
A22	1.0	0.08	0.0	30	18	59.90D
A23	1.0	0.08	0.1	30	0	0I
A24	1.0	0.08	0.2	30	0	0I
A25	1.0	0.10	0.0	30	13	44.02F
A26	1.0	0.10	0.1	30	0	0I
A27	1.0	0.10	0.2	30	0	0I

注:表中同列不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note: The different capital letters in the column mean significantly difference ($P<0.01$). The same below.

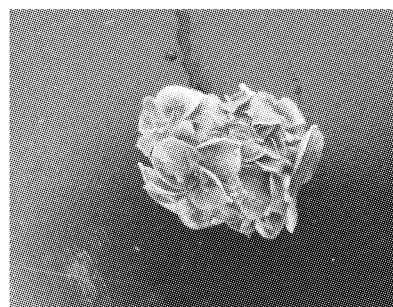


图 2 添加激素 NAA 试管苗生长状态

Fig. 2 Plantlets growing state with adding hormones NAA

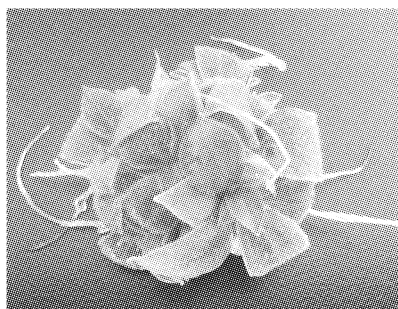


图3 添加 IBA 试管苗生长状态

Fig. 3 Plantlets growing state with adding hormones IBA

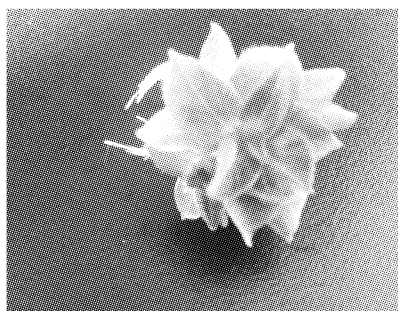


图4 添加 IAA 试管苗生长状态

Fig. 4 Plantlets growing state with adding hormones IAA

表2 相同质量浓度的 6-BA 和不同浓度 NAA、IBA、IAA 配比对大花剪秋萝幼芽继代增殖的影响

Table 2 Influence of the same concentrations of 6-BA matching with NAA, IBA and IAA on the proliferation of budlet of *Lychnis fulgens* Fisch.

序号 No.	6-BA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	IAA /mg · L ⁻¹	IBA /mg · L ⁻¹	接种数 No. of inoculated plantlets/个	平均增殖率 Rate of the average growth/ %
B1	2.0	0.02	—	—	30	69.3±0.14A
C1	2.0	—	0.2	—	30	50.6±0.11B
D1	2.0	—	—	2.0	30	45.4±0.12C

注:表中平均增殖率数据为平均值±标准差。下同。

Note: The datas of the average growth in the table are equal to the mean ± standard deviation. Following the same.

表3 不同质量浓度的 6-BA 和 NAA 对大花剪秋萝幼芽继代增殖的影响

Table 3 Influence of different concentrations of 6-BA and NAA on the proliferation of budlet of *Lychnis fulgens* Fisch.

序号 No.	6-BA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	接种数 No. of inoculated plantlets/个	平均增殖率 Rate of the average growth/ %
B1	2.0	0.02	30	69.3±0.14E
B2	2.0	0.03	30	72.5±0.17D
B3	2.0	0.04	30	68.3±0.20EF
B4	3.0	0.02	30	84.1±0.14B
B5	3.0	0.03	30	92.6±0.17A
B6	3.0	0.04	30	80.4±0.16C
B7	4.0	0.02	30	63.4±0.14G
B8	4.0	0.03	30	67.8±0.12F
B9	4.0	0.04	30	61.2±0.14H
B10(CK)	0.0	0.00	30	0.00±0.00I

2.3 不同继代时间对大花剪秋萝幼芽继代增殖的影响

以最适合大花剪秋萝幼芽继代增殖培养基 3.0 mg/L 6-BA 与 0.03 mg/L NAA 进行不同继代时间对增殖率影响的试验。从表 4 可以看出,继代 25 d 与其它继代时间存在极显著差异($P<0.01$),且此时幼苗生长最旺盛,随着继代时间的增加,增殖率显著下降,植株出现萎蔫、死亡等现象。因此继代 25 d 是大花剪秋萝最佳继代时间,平均增殖率为 94.1%。

表4 不同继代时间对大花剪秋萝幼芽继代增殖的影响

Table 4 Influence of different time on the proliferation of budlet of *Lychnis fulgens* Fisch.

基本培养基 Basal media	接种芽数 No. of inoculated plantlets/个	继代时间 The subculture time/d	平均增殖率 Rate of the average growth/ %
MS+3.0 mg/L 6-BA+ 0.03 mg/L NAA	30	15	84.3±0.35C
	30	20	90.2±0.26B
	30	25	94.1±0.41A
	30	30	76.5±0.19D
	30	35	60.4±0.20E

2.4 不同培养基对大花剪秋萝组培苗生根的影响

在一定范围内,降低无机盐浓度利于无菌苗的生根培养^[1]。根据表 5 可以看出,最适合大花剪秋萝生根的基本培养基为 1/2MS, NAA 质量浓度在 1.0 mg/L 时,对大花剪秋萝生根有促进作用,生根率高达 87.03%。NAA 浓度高于 1.0 mg/L 时,对大花剪秋萝生根起到抑制作用,当 NAA 质量浓度为 2.0 mg/L 时,生根率显著下降,故在不同生根的培养基中幼芽生根的快慢及根系质量存在极显著差异($P<0.01$)。研究表明,1/2 MS+

表5 不同培养基对大花剪秋萝组培苗生根的影响

Table 5 Influences of different media on the rooting of *Lychnis fulgens* Fisch.

基本培养基 Basal media	NAA 质量浓度 NAA concentration /mg · L ⁻¹	接种数 No. of inoculated plantlets/株	生根数 No. of rooting/个	生根率 Rooting rate/ %
MS	0.5	30	4	13.12N
MS	1.0	30	7	23.14I
MS	1.5	30	5	16.63K
MS	2.0	30	2	6.52P
1/2MS	0.5	30	11	35.90F
1/2MS	1.0	30	26	87.03A
1/2MS	1.5	30	15	50.16C
1/2MS	2.0	30	5	15.99L
1/3MS	0.5	30	11	36.79E
1/3MS	1.0	30	16	54.13B
1/3MS	1.5	30	9	31.33H
1/3MS	2.0	30	4	14.06M
1/4MS	0.5	30	10	33.14G
1/4MS	1.0	30	14	46.59D
1/4MS	1.5	30	6	21.00J
1/4MS	2.0	30	3	9.98O

1.0 mg/L NAA 为最佳大花剪秋萝的生根培养基,平均生根率为 87.03%(图 5)。

2.5 不同培养基对大花剪秋萝种质资源保存的影响

由表 6 可知,随着基本培养基营养成分的减少,丛生芽增殖率逐渐变慢,铁盐的含量过低,会影响叶绿素的合成,使愈伤组织及芽苗失绿。用这种营养饥饿的方法长期保存种质,可在室温下进行,不需要冷冻,可降低

成本^[11]。该试验 6 个月后进行恢复生长试验,结果显示 1/10MS(大量元素)+1/3MS(微量元素)+1/2MS(Fe 盐)+1/4MS(有机物质)的培养基的无菌苗恢复生长后恢复率最高为 86.97%,与其它培养基存在极显著差异 ($P<0.01$),无变异情况,且恢复生长后其增殖率无明显变化,助于大花剪秋萝种质资源的保存和离体快繁技术的研究。

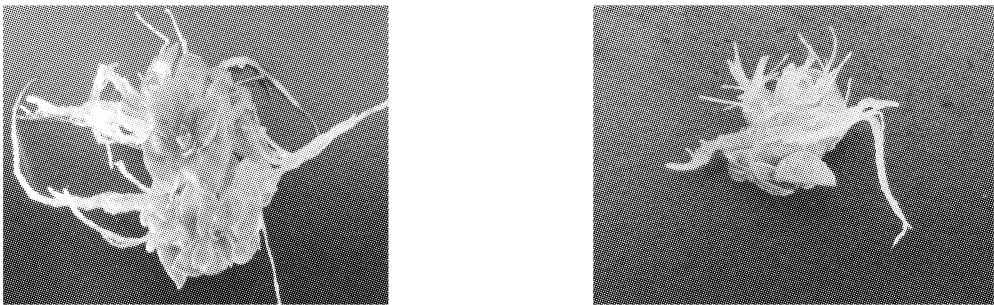


图 5 试管苗生根状态

Fig. 5 Rooting state of plantlets

表 6 不同培养基对大花剪秋萝种质资源保存的影响

Table 6 Influence of different media on germplasm preservation of *Lychnis fulgens* Fisch.

培养基 Media	恢复率 Rate of recovery/ %	变异情况 Variation	丛生芽生长情况 Shoot growth
1/10MS(大量元素)+MS(微量元素)+1/2MS(Fe 盐)+1/2MS(有机物质)	58.13C	无	1 个月后,丛生芽增殖率为 10%,前期增殖和生长速度较快,后期逐渐减慢,恢复生长后增殖率无明显变化
1/10MS(大量元素)+1/2MS(微量元素)+1/2MS(Fe 盐)+1/3MS(有机物质)	60.56B	无	3 个月后,丛生芽增殖率和生长速度显著提高,恢复生长后增殖率无明显变化
1/10MS(大量元素)+1/3MS(微量元素)+1/3MS(Fe 盐)+1/4MS(有机物质)	23.89D	较明显	6 个月后,丛生芽开始缓慢生长,但芽开始出现失绿的现象,恢复生长后增殖率明显下降
1/10MS(大量元素)+1/3MS(微量元素)+1/2MS(Fe 盐)+1/4MS(有机物质)	86.97A	无	丛生芽几乎停止增殖和生长,且苗生长良好,叶片圆润、平展、浓绿,恢复生长后增殖率无明显变化

3 结论与讨论

采取茎节直接再生方式,遗传稳定性好,速度快,分化率高^[12]。该试验结果表明,以大花剪秋萝茎节为外植体,利用细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 配比可诱导出不定芽,但在添加激素 2,4-D 的培养基中,均未诱导出不定芽。当 6-BA 为 0.8 mg/L, NAA 为 0.08 mg/L 时,对丛生芽诱导效果最好,其诱导率为 90.24%;随着 6-BA 和 NAA 浓度的增加,丛生芽诱导率逐渐下降,说明高浓度 NAA 对丛生芽诱导起抑制作用。谷文英等^[13]认为,培养基中细胞分裂素与生长素的质量比为 10:1 时腋芽萌发率最高,这与该研究 0.8 mg/L 6-BA+0.08 mg/L NAA 的培养基中芽萌发率最高的结论相近,即高细胞分裂素与低生长素的组合,有利于芽的萌发和伸长。

植物激素是绝大多数植物组织培养中必不可少的添加物,其作用效果除了与激素种类和添加质量浓度有关外,还与植物的基因型有关。所以,相同激素在不同的试验研究中得到的结果存在差异^[14]。有关植物生长调节剂对植物组织培养特性的研究已有大量报道^[15-17]。

该研究设置了相同质量浓度 6-BA 与 NAA、IBA、IAA 配比的试验,体现了不同类型生长素的活性的差异。研究表明,不同的植物生长调节剂配比及其它诱导因子对野生大花剪秋萝的组培有很大影响,添加 NAA 的培养基和添加 IBA、IAA 的培养基对野生直立矮化大花剪秋萝幼芽的增殖培养存在极显著差异。因此野生大花剪秋萝幼芽的增殖培养的最佳诱导培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.03 mg/L NAA,最佳继代周期为 25 d,增殖率高达 94.1%。

植物激素中,生长素对生根的形成有重要作用^[18]。在一定范围内,试管苗的生根率与生长素在培养基中的含量呈正相关;过量时,则会形成大量的愈伤组织团块而导致输导组织不畅,影响组培苗生长和移栽成活^[19]。研究表明最适合野生大花剪秋萝生根的培养基为 1/2MS+1.0 mg/L NAA,生根率为 87.03%。

长白山为一座休眠火山,是国家级自然保护区。近些年,长白山地区观赏植物资源遭到了严重的破坏,许多自然资源量急剧下降,同时许多植物种群濒临灭绝^[20]。为保存和繁育长白山大花剪秋萝的优良性状和

建立其无性快繁体系,要对长白山野生大花剪秋萝进行种质资源保护。目前,国内外已有很多关于植物种质保存方面的报道,大多采取低温处理、玻璃化、包埋、低温结合弱光照等方法^[21]。用营养饥饿的方法来保存野生大花剪秋萝种质是一种较好的方法。该研究结果表明,保存其资源的较适宜的培养基为 1/10MS(大量元素)+1/3MS(微量元素)+1/2MS(Fe 盐)+1/4MS(有机物质),其丛生芽几乎停止增殖和生长,且苗生长良好,叶片圆润、平展、浓绿,恢复率高达 86.97%,当保存苗恢复生长后增殖率无明显变化。该试验只是初步探讨了种质资源的保存,有关深入研究还需进一步探讨。

参考文献

- [1] 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1993.
- [2] 肖宁. 大花剪秋萝多倍体诱导技术研究[D]. 北京:北京林业大学,2012.
- [3] 严仲铠,李万林. 中国长白山药用植物彩色图志[M]. 北京:人民卫生出版社,1997:152-153.
- [4] 柏光新,崔成万,王永明. 中国长白山野生花卉[M]. 北京:中国林业出版社,2003.
- [5] 周繇. 长白山植物药志[M]. 北京:中国林业出版社,1982:337.
- [6] 孙秀殿. 大花剪秋萝的栽培技术[J]. 特种经济动植物,2000(6):31-32.
- [7] 陈丽萍,王艳菊. 剪秋萝组织培养及多倍体诱导的初步研究[D]. 杭州:浙江大学,2006.
- [8] 李莹,赵春丽,顾德峰. 瞿麦组织培养和快速繁殖[J]. 北方园艺,2011(12):107-110.
- [9] 李欣,张彦妮. 须苞石竹组织培养和快速繁殖[J]. 东北林业大学学报,2009,37(3):12-13.
- [10] 张春晓. 宽叶石竹的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2004,40(2):198-200.
- [11] 朱俊义. 东北刺人参组培快繁及种质保存技术[J]. 东北林业大学学报,2007,11(35):14-16.
- [12] 顾地周,邓志刚. 苞叶杜鹃离体培养及种质试管保存体系的建立[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2009,33(3):20-25.
- [13] 谷文英,裴德清. 杜仲茎段培养的初步研究[J]. 莱阳农学院学报,1999,16(1):6-9.
- [14] 付增光,陈越. 甘薯脱毒苗的离体快繁研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,1(32):37-39.
- [15] Li X, Krasayansk S F. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa [J]. Journal of Plant Physiology, 2002,159(3):313-319.
- [16] 叶贻勋,黄青峰. 月季的离体快速繁殖技术[J]. 福建农业大学学报,2000,29(2):172-175.
- [17] 崔德才,徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [18] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社,1985:34-49.
- [19] 陶延珍,李枫,李毅. 箭杆杨组织培养再生体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(3):203-207.
- [20] 周繇. 长白山国家级自然保护区观赏植物资源及其多样性[J]. 东北农业大学学报,2004,32(6):45-50.
- [21] 钱剑林,朱旭东. 东方百合“Sorbonne”试管成球和低温处理的初步探讨[J]. 园艺学报,2004,31(6):828.

Study on Preservation and Tissue Culture of *Lychnis fulgens* Fisch. From Changbai Mountain

FENG Min, GU De-feng, WANG Yang, LIU Mei-tong, DONG Ran
(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking the internodes of Changbai *Lychnis fulgens* Fisch. as explants to screen the best medium of their profusion bud induction, proliferation, rooting and preservation. The results showed that the best medium for superior individual internodes induction of the dwarf *Lychnis fulgens* Fisch. was MS+0.8 mg/L 6-BA+0.08 mg/L NAA, germination rate was 90.24%; the best medium for germ proliferation was MS+3.0 mg/L 6-BA+0.03 mg/L NAA, propagation coefficient rate was 92.6%; the best period was 25 day, for rooting was 1/2 MS+1.0 mg/L NAA, rooting rate was 87.03%; suitable culture medium for the species to save was 1/10MS(major element)+1/3MS(trace element)+1/2MS(ferric compound)+1/4MS(organic substance), recovery rate was 86.97%, no obvious variation and well-grown.

Key words: *Lychnis fulgens* Fisch.; stem section culture; species preservation