

白藜优良单株的选择及离体快繁技术研究

宁 静, 赵 和 祥, 董 然, 赵 春 莉, 陈 立 飞, 顾 德 峰

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以野生白藜地下幼芽为外植体,进行优良单株的选择和组织培养研究,以期建立其快繁体系。结果表明:丛生芽诱导的最佳培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L,诱导率为 90%;最佳增殖培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L,增殖系数为 4.6;最佳生根培养基为 1/2MS+NAA 2.0 mg/L,生根率为 70%。为提高试管苗的增殖率,其最佳继代周期为 30 d。

关键词:白藜;单株选择;离体快繁

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0131-03

白藜(*Dictamnus dasycarpus* Turcz.)属芸香科白藜属多年生草本植物,别名八股牛。白藜主要分布在亚欧大陆,约有 5 种,我国主产于东北三省、内蒙、河北、江西、贵州、河南等省区^[1-2],长白山散生于海拔 900 m 以下的山坡、林缘、灌木丛或山路旁。白藜是一种新开发的观赏植物,除观赏外,其全株芳香,是一种待开发的蜜源植物;根皮入药,具有解毒、祛热、利尿、除湿和杀虫等功效^[3-4];其皮亦可作为天然防腐剂的原料,故白藜是一种极具开发潜力的野生花卉。但目前应用的白藜大多是长白山的野生资源,近些年的采挖破坏,使得现存的白藜野生资源急剧减少,因此,研究一种快速繁殖的技术显得尤为重要。

目前对白藜的研究还主要集中在药用方面^[5],对其选种工作以及在园林绿化中的应用和利用组织培养建立优良单株无性系的研究还鲜见报道。该研究旨在选择出具有观赏价值的优良单株并利用离体快繁手段建立优良的无性繁殖系,为长白山这一珍贵野生资源的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2009 年 5 月于长白山西坡,选取生长状态良好开花艳丽的白藜植株移栽于吉林农业大学苗圃基地。

1.2 试验方法

1.2.1 白藜优良单株的选择

第一作者简介:宁静(1986-),女,在读硕士,现主要从事植物组织培养研究工作。

责任作者:顾德峰(1956-),男,硕士,教授,现主要从事植物组织培养研究等工作。E-mail:gu.df@163.com。

收稿日期:2012-12-19

白藜进行观察记录,进行复选,选取长势较好的 20 株,对其抗性、花期、花色、株高进行比较,2011 年再次进行复选,选择后续试验需要的优良单株。

1.2.2 外植体的选择及灭菌 5~7 月选取优良单株的地下幼芽为外植体,将地下芽置于流水下冲洗 1~2 h,置于超净工作台上用 75%酒精浸泡 20 s,无菌水冲洗 2 遍,然后以 0.1%升汞灭菌 10~11 min,无菌水冲洗 6 次,滤纸吸干表面水分,备用。

1.2.3 丛生芽的诱导 试验所用培养基均添加蔗糖 30 g/L,琼脂 10 g/L,pH 5.8,培养温度为 25℃,光照强度为 2 000~3 000 lx,光照时间为 12~14 h/d。将灭菌后的幼芽接种至添加不同浓度 6-BA(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)和 NAA(0.1、1.0、1.5 mg/L),2,4-D(0.1、0.2 mg/L)的 MS 培养基上进行丛生芽诱导,每处理接种 10 个外植,3 次重复,定期观察,4 周后统计结果。

1.2.4 幼芽的继代增殖 将无菌苗切成带有 2~3 片叶片的茎段接种至分别添加 6-BA(0.5、1.0、1.5 mg/L)和 NAA(0.1、0.5、1.0 mg/L)的 MS 基本培养基中进行增殖培养,每瓶接种 15 个芽,每处理接种 9 瓶,分别于 20、30、40 d 后统计增殖率,3 次重复。

1.2.5 生根培养 选取继代增殖中长势好的,植株健壮的白藜茎段切至 3~4 cm,接种于添加 NAA(0.04、0.1、1.0、2.0 mg/L)的 1/2MS 培养基以及添加 NAA(0.1、1.0、2.0 mg/L)的 MS 培养基中,定期观察,于 60 d 后统计生根结果,3 次重复。

2 结果与分析

2.1 白藜优良单株的选择

对调查的 20 株单株进行编号、性状分析,选择出 5 个(02、04、07、11、15 号)抗性强、花期长、花色艳丽、株型

表 1 白藓待选单株性状调查

Table 1 Characteristics research on candidate *Dictamnus dasycarpus* Turcz.

| 编号 | 开花时株高/cm | 花期/d | 花色 | 抗性 |
|----|----------|------|-----------|------|
| 01 | 60 | 27 | 淡紫红色 | +++ |
| 02 | 66 | 33 | 紫红色 | ++++ |
| 03 | 41 | 25 | 紫红色 | +++ |
| 04 | 65 | 30 | 淡紫红色 | ++++ |
| 05 | 40 | 25 | 紫红色 | ++ |
| 06 | 37 | 25 | 紫红色 | +++ |
| 07 | 69 | 30 | 紫红色 | ++++ |
| 08 | 50 | 25 | 淡紫红色,边缘发白 | ++ |
| 09 | 65 | 27 | 淡紫红色 | +++ |
| 10 | 30 | 25 | 淡紫红色 | + |
| 11 | 70 | 34 | 深紫红色 | ++++ |
| 12 | 41 | 30 | 紫红色 | +++ |
| 13 | 60 | 31 | 紫红色 | +++ |
| 14 | 59 | 25 | 紫红色 | +++ |
| 15 | 67 | 33 | 紫红色 | ++++ |
| 16 | 55 | 27 | 紫红色 | +++ |
| 17 | 60 | 20 | 淡紫红色 | ++ |
| 18 | 55 | 25 | 淡紫红色,边缘发白 | +++ |
| 19 | 61 | 27 | 紫红色 | +++ |
| 20 | 47 | 20 | 紫红色 | +++ |

注: + 抗性差, 出现病虫害及倒伏; ++ 抗性较差, 出现病虫害或倒伏; +++ 抗性较强, 无病虫害及倒伏, 植株长势良好; ++++ 抗性强, 无病虫害及倒伏, 植株长势旺盛。

较好的优良单株。

2.2 不同激素浓度对丛生芽诱导的影响

将选择出的优良单株的地下幼芽接种至诱导培养基中(图 1A), 在加有 NAA 的培养基中培养约 15 d 后开始萌动, 茎伸长, 有新叶长出, 而在加有 2,4-D 的培养基

表 3 不同植物生长调节剂与继代周期对增殖系数的影响

Table 3 Effect of different plant regulating substance combinations and proliferation periods on plantlets proliferation

| 培养基 | 每组接种芽数 | 20 d 增殖系数 | 30 d 增殖系数 | 40 d 增殖系数 |
|-------------------------------|--------|-----------|-----------|-----------|
| MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L | 45 | 1.81±0.26 | 3.32±0.23 | 2.87±0.32 |
| MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L | 45 | 1.25±0.15 | 2.03±0.26 | 1.65±0.20 |
| MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L | 45 | 2.57±0.29 | 4.61±0.21 | 3.83±0.25 |
| MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L | 45 | 2.15±0.25 | 3.71±0.29 | 3.09±0.43 |
| MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L | 45 | 1.75±0.23 | 3.05±0.23 | 2.77±0.31 |
| MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L | 45 | 1.28±0.15 | 1.82±0.12 | 1.53±0.17 |

2.4 不同浓度 NAA 对白藓试管苗生根的影响

选取继代培养中长达 3~4 cm 的健壮幼苗转接至生根培养基中进行培养。由表 4 可知, 萘乙酸(NAA)对试管苗的生根有促进作用。在添加 NAA 大于 1.0 mg/L 的培养基中试管苗开始生根的时间明显较早, 为 10~15 d, 而低于此值的培养基中, 开始生根的时间为 1 个月以后。由培养 60 d 时统计的生根情况(图 1C)可知, MS 培养基中的生根率明显低于 1/2MS 培养基, 在 1/2MS 培养基中, 当添加 NAA 浓度为 0.04~2.0 mg/L 时, 生根率随 NAA 浓度的增加而增加, 当 NAA 为 2.0 mg/L 时, 生根率达到最高, 当 NAA 浓度为 3.0 mg/L 时, 无菌苗基部形成大量愈伤, 生根率明显下降。因此, 1/2MS+NAA 2.0 mg/L 为最佳生根培养基。

中, 芽基部 1 周后开始有愈伤产生, 几乎停止生长, 未出现分化现象。5 个单株在相同培养基中表现基本一致, 无明显不同。由表 2 可知, 当 6-BA 为 0.5 mg/L、NAA 为 1.0 mg/L 时植株生长健壮且诱导率最高, 因此, 白藓地下芽的最佳诱导培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L。

表 2 不同植物生长调节剂对白藓丛生芽诱导的影响

Table 2 Effect of different plant regulating substance combinations on adventitious buds induction

| 培养基 | 接种芽数/个 | 萌发芽数/个 | 萌发率/% |
|------------------------------|--------|--------|-------|
| 0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA | 10 | 9 | 90 |
| 1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA | 10 | 7 | 70 |
| 1.5 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA | 10 | 5 | 50 |
| 1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA | 10 | 5 | 50 |
| 1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D | 10 | 0 | 0 |
| 2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D | 10 | 0 | 0 |

2.3 不同生长调节剂与继代周期对无菌苗增殖的影响

由表 3 可知, 将诱导培养基中诱导出的丛生芽分切后接种至增殖培养基中继续培养, 6-BA 对丛生芽诱导有促进作用, 但其不宜过高, 否则会抑制丛生芽诱导。当 6-BA 为 0.5 mg/L、NAA 为 0.5 mg/L 时, 繁殖率最高, 当继代至 30 d 时, 植株生长最为旺盛(图 1B), 随后出现萎蔫死亡, 因此白藓的最佳增殖培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 30 d 为最佳继代周期。

表 4 不同浓度 NAA 对试管苗生根的影响

Table 4 Effect of different NAA concentration on rooting of plantlet

| 处理 | NAA/mg · L ⁻¹ | 接种株数/株 | 生根株数/株 | 生根率/% |
|-------|--------------------------|--------|--------|-------|
| 1/2MS | 0.04 | 50 | 9 | 18 |
| | 0.1 | 50 | 13 | 26 |
| | 1.0 | 50 | 25 | 50 |
| | 2.0 | 50 | 35 | 70 |
| MS | 0.1 | 50 | 2 | 4 |
| | 1.0 | 50 | 3 | 6 |
| | 2.0 | 50 | 2 | 4 |

2.5 试管苗的练苗与移栽

试管苗于生根培养基中培养 60 d 后, 于室内正常光照下练苗 2 d, 将已生根的幼苗从瓶中取出, 置于流水下洗净根部培养基, 栽植于园土: 草炭=1:1 的基质中,

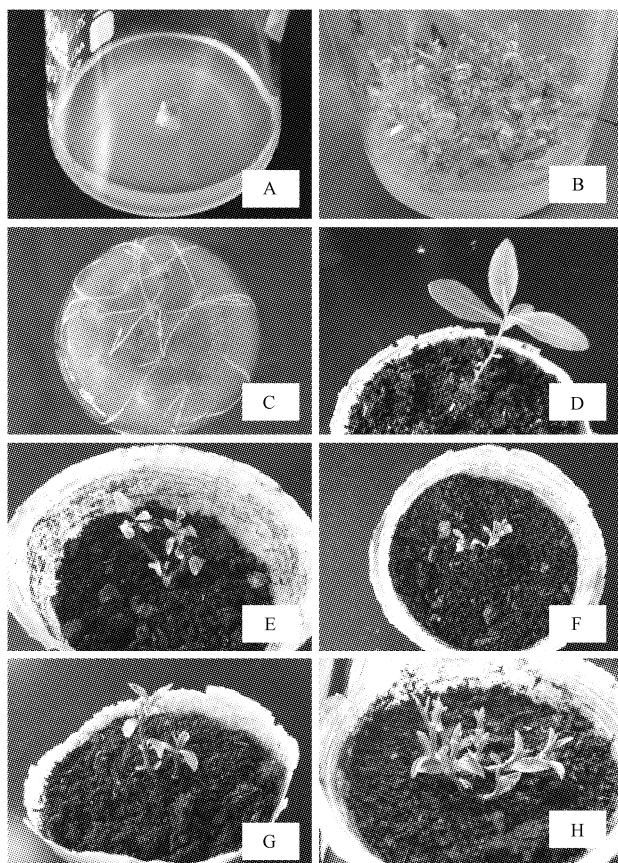


图1 白藜组织培养过程

注:A:外植体接种时的状态;B:继代30 d试管苗生长状态;C:试管苗生根情况;D:单株2瓶外移栽状况;E:单株4瓶外移栽状况;F:单株7瓶外移栽状况;G:单株11瓶外移栽状况;H:单株15瓶外移栽状况。

遮阴处理,成活率在90%以上(图1D~H)。

3 结论与讨论

该试验对野外移植的优良白藜植株进行复选,选取性状较好的单株作为后续试验材料,组培阶段采用其地下幼芽为外植体,成功实现了离体快繁。在培养中发

现,不同生长调节剂的种类与浓度对白藜无菌苗的诱导与增殖有显著的差异。该试验发现,在6-BA浓度一定的前提下,NAA浓度超过1.0 mg/L,会有大量愈伤产生,丛生芽诱导率急剧下降;当NAA为1.0 mg/L时,6-BA浓度超过0.5 mg/L,苗较细弱,易发生玻璃化,因此,MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L为最佳诱导培养基。在增殖中,可适当降低生长素浓度,在MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L中,30 d增殖系数达到最高,为4.61;1/2MS+NAA 2.0 mg/L为最佳生根培养基,生根率为70%。后期练苗移栽后成活率在90%以上。翌年幼苗开花后可与母株进行性状比较,观察是否保留了母株的优良性状。鉴于试验初期可供选择的外植体有限,于2010年7~8月采集白藜种子,利用种子^[6-7]为外植体进行组培预试验,继而利用试管中的无菌苗进行离体再生体系的初期研究,得到初期数据,以此数据为参考,在一定程度上提高了该试验中启动培养阶段的成功率。

参考文献

- [1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 43卷. 2分册. 北京:科学出版社,1997:167.
- [2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴[M]. 2册. 北京:科学出版社,1980:551.
- [3] 李书心. 辽宁植物志(上册)[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1991:1045.
- [4] 江苏新医学院. 中草药大辞典(上册)[M]. 上海:上海人民出版社,1977:737.
- [5] 崔凯峰, 金哲军. 优良药用野生花卉白藜[J]. 中国花卉盆景,2005(9):3.
- [6] Sun Z H, Tzitzikas M, Raemakers K, et al. Effect of TDZ on plant regeneration from mature seeds in pea (*Pisum sativum*) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2009, 45(6):776-782.
- [7] Colgencen H, Buyukkartal H N, Tokar M C. In vitro germination and structure of hard seed testa of natural tetraploid *Trifolium pratense* L. [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2008, 7(10):1473-1478.

Study on Selection and Propagation of Superior Individuals of *Dictamnus dasycarpus* Turcz.

NING Jing, ZHAO He-xiang, DONG Ran, ZHAO Chun-li, CHEN Li-fei, GU De-feng
(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking the plumule of *Dictamnus dasycarpus* Turcz. underground as explants, the excellent individual plants were selected and the tissue culture of *Dictamnus dasycarpus* Turcz. were established, in order to establish the propagation system. The results showed that the optimum medium for shoot induction was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L, germination rate was 90%; the optimal proliferation medium was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L, the multiplication coefficient was 4.6; the rooting medium was 1/2MS+NAA 2.0 mg/L, and its growth was the best and the rooting rate was 70%. In order to enhance the proliferation rate of test-tube plantlets, the best subculture period should be controlled in 30 d.

Key words: *Dictamnus dasycarpus* Turcz.; individuals selection; propagation