

# 兴安白头翁组织培养与快繁技术研究

王玉娇<sup>1</sup>, 杨 忠<sup>2</sup>, 赵春莉<sup>1</sup>, 董 然<sup>1</sup>, 赵和祥<sup>1</sup>, 顾德峰<sup>1</sup>

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 德惠市农业科技宣传教育中心, 吉林 德惠 130399)

**摘 要:**以兴安白头翁种子无菌苗幼芽为外植体,进行了组织培养与快繁技术研究。结果表明:兴安白头翁种子以 0.1% 氯化汞灭菌的最佳时间为 4 min;种子萌发的最佳培养基为 MS+IAA 0.1 mg/L;兴安白头翁愈伤组织最佳诱导培养基为 MS+2,4-D 0.15 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;培养基 MS+IAA 1.0 mg/L+ZT 0.2 mg/L 最适合兴安白头翁愈伤组织不定芽的诱导;1/2MS+NAA 2.0 mg/L 为兴安白头翁的最佳生根培养基;草炭、园土及其等比混合基质对兴安白头翁移栽成活率影响不大,均达 90% 以上。

**关键词:**兴安白头翁;无菌苗;植物生长激素;组织培养

**中图分类号:**S 567 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)10-0084-04

白头翁(*Anemone chinensis*)属毛茛科多年生草本植物,别名白头草、老姑草等,在吉林、辽宁、河北、黑龙江等省均有分布。白头翁本属植物共有 43 个种,主要分布在欧洲,我国有 11 个种和 1 个变种<sup>[1]</sup>。东北地区有 8 种,吉林省分布有白头翁(*Pulsatilla chinensis*)、朝鲜白头翁(*P. cernua*)和兴安白头翁(*P. dahurica*)3 种<sup>[2]</sup>。

白头翁的药用价值很高,全草含三萜皂苷,具有清热解毒、凉血止痢等功效<sup>[3-4]</sup>。现代医学研究证明,白头翁的乙醇提取物有镇静和抑制肿瘤细胞的作用<sup>[5-6]</sup>。白头翁全株有芳香气味,株形美观,淡紫色花序,叶奇形

美,花色绮丽,是一种极具开发潜力的野生花卉,可作为小区绿化的重点花卉品种,与草坪搭配更是锦上添花。

白头翁集药用和观赏双重功效,具有很好的开发前景。但是白头翁生态分布极具局限性,植物资源有限,远远不能满足当今市场的需求量。同时关于白头翁的研究主要集中在药用成分分析及药理两方面,对于白头翁栽培繁殖的研究较少。目前,白头翁仍处于野生状态,人工播种栽培量极少。为了保护白头翁野生资源和满足市场需求,加大对白头翁资源的利用,该试验通过对白头翁的组织培养研究,建立最佳的繁殖体系,以期白头翁进一步开发利用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试外植体均为采自 2013 年 5~6 月长白山兴安白头翁成熟种子萌发的无菌苗幼芽。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 试验材料的灭菌处理 用不同浓度的 GA 对种

**第一作者简介:**王玉娇(1987-),女,山东临沂人,硕士研究生,研究方向为园林植物资源与种质创新。E-mail:shuyi79@163.com.

**责任作者:**顾德峰(1956-),男,博士,教授,现主要从事园林植物资源与种质创新等的教学与科研工作。E-mail:gu\_df@163.com.

**基金项目:**农业部“948”资助项目(2012(Z32));吉林省科技厅资助项目(20100254)。

**收稿日期:**2014-01-16

**Abstract:** In order to establish a rapid reproduction system of *Fritillaria przewalskii* Maxim, using bulb of *Fritillaria przewalskii* as material, the sterilization methods were optimized, combination of different plant hormones on the induced proliferation of bulbs from *F. przewalskii* were studied. The results showed that the procedure of optimal sterilization method were that, the materials should be immersed in 70% alcohol for 15 s, immersed in 0.1% mercuric chloride for 10 min, rinsed with sterile water 5 times, place in 4°C for overnight; besides, the procedure should be repeated on the second day. Following above-mentioned steps, contamination rate of the materials was only 16.7%. The optimal culture medium that could induce bulbs of *F. przewalskii* to adventitious buds was MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, and the induction rate had reached to 87.5%. The best subculture medium was MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L, and the multiplication coefficient was 9. The best rooting medium was 1/2MS+NAA 0.5 mg/L, and the rooting rate was about 90%. The paper had established regeneration system of *F. przewalskii*, which could provide the basic research reference for high-performance seedling methods of *F. przewalskii*.

**Key words:** *Fritillaria przewalskii* Maxim; tissue culture; bulb; proliferation

子处理 15 d 后,用纱布把饱满的种子包裹好,用流动的清水冲洗 30~60 min 后滤净水分;在超净工作台上用 0.1% 的氯化汞在针管中进行灭菌,灭菌时间为 2、3、4、5、6 min。最后用无菌水冲洗 6~8 次,把消毒后的种子放在灭菌后的滤纸上吸干水分,放在灭菌后的培养皿上备用。

1.2.2 种子萌发培养基的筛选 将在无菌条件处理过的种子分别接种到 MS、1/2MS 培养基上(图 1),以及添加了不同浓度的植物生长调节剂 IAA(0.05、0.10、0.15、0.20 mg/L)的培养基中。置于温度(25±2)℃,光照时间 12 h,光照强度为 1 500~2 000 lx 的条件下培养,每个处理接种 30 瓶,3 次重复,接种 30 d 后,观察统计兴安白头翁种子的萌发情况,及在不同培养基上兴安白头翁种子的萌发天数。

1.2.3 愈伤组织的诱导 在无菌条件下将兴安白头翁嫩芽切成 1~2 cm 的小块,分别接种于添加不同浓度的 2,4-D(0.10、0.15、0.20 mg/L)和 6-BA(0.5、1.0、1.5 mg/L)培养基中,置于适宜的条件下培养,每瓶 1 个外植体,每个处理 30 瓶,3 次重复。培养 20 d 后观察记录形成的愈伤组织的大小、质地、色泽等性状情况。

1.2.4 不定芽的诱导 将愈伤组织切成 2.5 cm 的小块接种至添加不同浓度 IAA(0.1、1.0、1.5 mg/L),ZT(0.1、0.2 mg/L)的 MS 培养基上进行丛生芽诱导,每种培养基中加入蔗糖 30 g/L,琼脂 10 g/L,pH 5.8,每处理接种 40 个外植体,3 次重复。温度一般在 25℃ 左右为宜,上下可浮动 1~2℃,光照强度为 1 500~2 000 lx,光照时间为 12 h/d。

1.2.5 生根培养 选取继代增殖中长势好、生长一致且苗高>3 cm 的植株健壮的兴安白头翁无菌苗,接种于添加 NAA(0.0、0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L)的 1/2MS 培养基中诱导生根,定期观察,于 40 d 后统计生根情况。

1.2.6 试管苗的练苗与移栽 将生根试管苗先经过练苗使其适应外界变温变光环境才能移栽到基质中,提高成活率。在变光变温下练苗 3 d,然后打开瓶盖,将生根的健壮试管苗用镊子取出,用流水将根部的培养基洗干净,然后移栽到不同的基质中,开始先遮光,后慢慢增加光照,观察不同基质移栽成活率。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2003 以及 SPSS 17.0 软件进行统计分析。各数据指标如下:污染率(%)=(污染外植体数/接种外植体总数)×100%;成活率(%)=(成活外植体数/接种外植体总数)×100%;诱导率(%)=(诱导出丛生芽成活外植体数/成活的外植体总数)×100%;增殖系数=诱导丛生芽总数/带芽外植体总数;平均出芽数=诱导出成活丛生芽总数/接种成活外植体总数;生根率(%)=(生根组育苗数/接种组育苗总数)×100%;平均生根数(条)=生根总数/生根组育苗总数;平

均根长(cm)=生根单苗根长总长/生根单苗根总数;移栽成活率(%)=(移栽组育苗成活数/移栽组育苗总数)×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒时间对兴安白头翁种子萌发的影响

在组织培养的过程中,最为首要的任务就是获得无菌的材料。从表 1 可以看出,用 0.1% 氯化汞对兴安白头翁的种子进行消毒处理时,最适的灭菌时间为 4 min,此时灭菌效果最佳,种子的萌发率最高。随着灭菌时间的延长,虽然白头翁种子的污染率逐渐下降,但是种子的萌发率却急剧下降。表明灭菌时间过长会对兴安白头翁的长势造成一定影响。

表 1 不同消毒时间对兴安白头翁种子萌发的影响

Table 1 Effect of different sterilizing time on seed germination of *Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng

灭菌时间 Sterilization time/min	污染率 Contamination rate/%	死亡率 Mortality rate/%	萌发率 Germination rate/%
2	65.67	26.67	36.67
3	59.67	31.67	41.00
4	43.33	37.67	48.67
5	37.33	48.33	32.00
6	26.67	59.67	16.67

### 2.2 不同培养基对兴安白头翁种子萌发的影响

选出最佳灭菌时间后,将兴安白头翁的种子接种到不同培养基中。从表 2 可以看出,兴安白头翁在添加了不同浓度的植物生长素的培养基和没有添加植物生长素的培养基中均可萌发。但是在添加有 0.10 mg/L IAA 的 MS 培养基中,兴安白头翁种子的萌发时间相对较短,且萌发率最高,达 80.00%。因此兴安白头翁种子萌发的最佳培养基为 MS+IAA 0.1 mg/L。

表 2 不同培养基对兴安白头翁种子萌发的影响

Table 2 Effect of different culture media on seed germination of *Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng

培养基 Medium /mg·L <sup>-1</sup>	每组接种数 Each set species/个	萌发天数 The days of germination/d	萌发种子数 Germination of seeds/个	萌发率 Germination rate/%
MS	35	26	15	42.86
1/2MS	35	15	20	57.14
MS+IAA 0.05	35	20	23	65.71
MS+IAA 0.10	35	15	28	80.00
MS+IAA 0.15	35	17	12	34.27
MS+IAA 0.20	35	12	10	28.57

### 2.3 不同浓度的植物生长素对兴安白头翁愈伤组织诱导的影响

从表 3 可以看出,在 2,4-D 浓度分别为 0.10、0.15、0.20 mg/L 时,愈伤组织诱导率随着 6-BA 浓度升高均呈先上升后下降的趋势。当 2,4-D 为 0.15 mg/L,6-BA 为 1.0 mg/L 时,愈伤组织诱导最好,诱导率可达 96.67%,颜



图 1 不同培养基中的种子

Fig. 1 Seeds in different culture media

色浓绿致密(图 2)。因此兴安白头翁愈伤组织最佳诱导培养基为 MS+2,4-D 0.15 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。

表 3 不同浓度植物生长素对  
兴安白头翁愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of different concentration auxin concentration on  
callus induction of *Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng

2,4-D 浓度 Concentration of 2,4-D /mg · L <sup>-1</sup>	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA /mg · L <sup>-1</sup>	诱导率 Induction rate /%	愈伤组织诱导状况 Callus induction situation 数量 Quantity 颜色及状态 Color and the growth status
0.10	0.5	20.00	少 褐色、松散
0.10	1.0	63.33	多 褐色、致密
0.10	1.5	56.67	少 绿色、松散
0.15	0.5	70.00	多 绿色、致密
0.15	1.0	96.67	多 绿色、致密
0.15	1.5	63.33	多 绿色、松散
0.20	0.5	23.33	少 褐色、致密
0.20	1.0	76.67	多 绿色、松散
0.20	1.5	36.67	少 褐色、致密



图 2 愈伤组织诱导

Fig. 2 Callus induction

#### 2.4 不同浓度的植物生长素对兴安白头翁不定芽诱导的影响

从表 4 可以看出,当 IAA 浓度为 1.0 mg/L,ZT 浓度为 0.2 mg/L 时,兴安白头翁愈伤组织不定芽的诱导率最高,为 62.50%,并且此时诱导出的不定芽植株生长健壮,叶色深绿。因此培养基 MS+IAA 1.0 mg/L+ZT 0.2 mg/L 最适宜于兴安白头翁愈伤组织不定芽的诱导(图 3)。

表 4 不同浓度的植物生长素对  
兴安白头翁不定芽诱导的影响

Table 4 Effect of different concentration auxin on  
adventitious bud induction of *Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng

IAA 浓度 Concentration of IAA/mg · L <sup>-1</sup>	ZT 浓度 Concentration of ZT/mg · L <sup>-1</sup>	外植体数 The number of budding explant/瓶	出芽块数 Budding blocks/个	芽诱导率 Induction rate/%
0.1	0.1	40	15	37.50
0.1	0.2	40	17	42.50
1.0	0.1	40	10	25.00
1.0	0.2	40	25	62.50
1.5	0.1	40	20	50.00
1.5	0.2	40	11	27.50



图 3 不定芽诱导

Fig. 3 Adventitious bud induction

#### 2.5 不同浓度 NAA 对兴安白头翁试管苗生根的影响

由表 5 可知,不同浓度 NAA 对试管苗生根效果不同。在不添加任何生长素的生根培养基中,兴安白头翁的生根率最低;随 NAA 浓度的增加,生根率呈现先上升后下降的趋势。当 NAA 浓度为 2.0 时,其生根率最高,为 80.00%。因此 1/2MS+NAA 2.0 mg/L 为兴安白头翁的最佳生根培养基(图 4)。

表 5 不同浓度 NAA 对兴安白头翁  
试管苗生根的影响

Table 5 Effect of different concentration NAA on  
rooting of *Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng

NAA 浓度 Concentration of NAA /mg · L <sup>-1</sup>	接种株数 Number of inoculation plants	生根株数 Number of rooting	生根率 Rooting rate /%
0.0	30	7	23.33
0.5	30	11	36.67
1.0	30	20	66.67
2.0	30	24	80.00
3.0	30	13	43.33

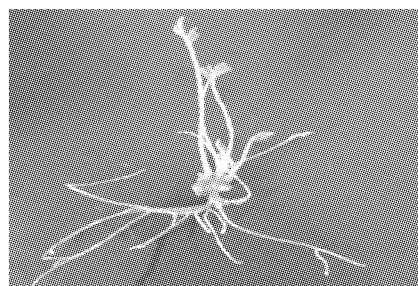


图 4 培养基中的生根苗

Fig. 4 The rooting seedlings on medium

## 2.6 试管苗的练苗与移栽

将生根试管苗先经过练苗使其适应外界变温变光环境才能移栽到基质中,提高成活率。从表 6 可以看出,在不同的基质中,兴安白头翁试管苗的成活率均大于 90.00%(图 5)。

表 6 不同的基质对移栽成活率的影响

Table 6 Effect of different media on rooting rate of

*Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng

移栽基质	成活率
Transplanting matrices	Survive rate/%
草炭 Grass ashes	95.00
园土 Garden soil	90.00
草炭:园土=1:1	97.50
Grass ashes: garden soil=1:1	



图 5 移栽后的幼苗

Fig. 5 The transplant seedlings

## 3 结论与讨论

该试验结果表明,在培养基中,不同生长调节剂的种类与浓度对兴安白头翁的诱导与增殖有显著的差异;兴安白头翁种子在不添加生长素的培养基中也可发芽,但是在添加有 0.1 mg/L IAA 的 MS 培养基中,其发芽率最高,表明 IAA 在一定的浓度下可以促进种子的萌发;在 0.15 mg/L 2,4-D 和 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基诱导出的愈伤组织最好;当 IAA 浓度为 1.0 mg/L, ZT 浓度为 0.2 mg/L 时,兴安白头翁愈伤组织不定芽的

诱导率最高;不同浓度 NAA 对试管苗生根效果不同,1/2MS+NAA 2.0 mg/L 为兴安白头翁的最佳生根培养基;不同的基质对移栽成活率的影响并不是特别大,在对 3 种不同基质的对比中,兴安白头翁试管苗的成活率均达到了 90.00%以上。



图 6 增殖后的幼苗

Fig. 6 Proliferation of seedlings

在试验中发现,兴安白头翁在不定芽的诱导和增殖的转接过程中,应保留叶片,不可将叶片切去只保留叶柄。切去叶片在转接的试管苗中,大部分叶柄不久将枯黄,并且影响了兴安白头翁芽的增殖与生长。但是如果保留叶片,不久后叶片也会发黄,但是对兴安白头翁的增殖和生长影响较小(图 6)。

## 参考文献

- [1] 付立国,陈潭清,郎楷永. 中国高等植物[M]. 13 卷. 青岛:青岛出版社,2001:11.
- [2] 傅沛云. 东北植物检索表[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1995.
- [3] 黄泰康,尤启冬,史美瑶,等. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1994:743.
- [4] 宋立人,胡烈,章国镇,等. 中华本草[M]. 7 卷. 上海:上海科学技术出版社,1999:239.
- [5] Ye W C, Zhao S X, Cai H, et al. Studies on the chemical constituents of *Pulsatilla chinensis*[J]. Chinese Chemical Letters, 1991, 2(5): 375.
- [6] 钟长斌,李祥. 白头翁的化学成分及药理作用研究述要[J]. 中医药学刊, 2003, 21(8): 138-139.

## Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng

WANG Yu-jiao<sup>1</sup>, YANG Zhong<sup>2</sup>, ZHAO Chun-li<sup>1</sup>, DONG Ran<sup>1</sup>, ZHAO He-xiang<sup>1</sup>, GU De-feng<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Dehui Agricultural Science and Technology Education Center, Dehui, Jilin 130399)

**Abstract:** Using aseptic shoots from seed of *Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng as explants, tissue culture and rapid propagation of *Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng were established and studied. The results showed that the seed of *Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng optimum sterilization time was 4 min by 0.1% HgCl<sub>2</sub>; the best combination of culture medium was MS+IAA 0.1 mg/L; optimum induced medium was MS+2,4-D 0.15 mg/L+6-BA 1.0 mg/L; optimal proliferation medium was MS+IAA 1.0 mg/L+ZT 0.2 mg/L; the rooting medium was 1/2MS+NAA 2.0 mg/L, the growth was the best; different medium (grass ashes, garden soil, and its equal ratio) had little influence on survival rate of transplanting, all above 90%.

**Key words:** *Pulsatilla dahurica* (Fisch.) Spreng; aseptic seedlings; plant growth hormone; tissue culture