

紫花补血草叶片诱导植株再生与快速繁殖

解卫海¹, 曲晓杰², 柏新富¹

(1. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025; 2. 烟台市第十中学, 山东 烟台 264000)

摘 要:以紫花补血草叶片为试验材料, 采用不同的外植体消毒方法、不同激素配比的初代、继代和增殖培养基以及生根培养基, 研究紫花补血草叶片的植株再生和快速繁殖方法。结果表明: 紫花补血草的叶片外植体消毒以 75% 的酒精消毒 10 s 加 0.1% 氯化汞浸泡 8 min 为宜; 叶组织脱分化成芽(初代培养)的适宜培养基为 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L; 而芽的增殖和生根分别以 MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.1~0.5 mg/L 和 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 20 g/L 较优。通过叶片植株再生, 建立了紫花补血草的组培快繁体系。

关键词:紫花补血草; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)04-0155-05

补血草属白花丹科(蓝雪科)补血草属(*Limonium*)多年生草本或亚灌木植物, 生于干旱草原和内陆或海滨盐碱沙滩上, 全国有 18 种, 分布于东北、华北、西北及西藏和沿海地区, 开发应用价值较大的有补血草(*L. sinense*)、二色补血草(*L. bicolor*)和紫花补血草(*L. franchetii*)^[1]。补血草属植物是传统的药用植物, 据中医药学记载和现在研究显示, 补血草具有活血止血、温中健脾、滋补强壮之功效^[2]; 还具有抑菌、抗病毒、抗肿瘤、益脾健胃等多种功效^[3-4]。同时, 由于补血草花繁色艳、花期长、保鲜时间久, 又是理想的切花材料, 且其具有不凋谢的干膜质花萼, 也是极好的干花材料^[1]。因此具备良好的开发利用价值。

补血草属植物多为种子繁殖, 但其具有大量的不孕枝, 同时又有同型杂交不孕的特性, 种子结实少^[5], 限制了生产的发展。近年用组织培养方法繁殖种苗, 并在黄花补血草(*L. aureum*)、二色补血草(*L. bicolor*)、小花补血草(*L. beltaard*)、大叶补血草(*L. gmelinii*)等植物中获得成功^[6-11]。紫花补血草, 又称烟台补血草, 为我国特有种和稀有濒危植物^[12], 主要分布于辽宁(大连)、山东半岛至江苏北部, 生于海滨至近海地区的山坡或砂地上, 模式标本采于山东烟台芝罘岛^[13]。其叶基生, 莲座状, 匙形或倒卵形, 长 5~10 cm, 宽 1.0~1.8 cm, 聚伞花序圆锥状, 花萼宿存、淡紫色, 花冠紫红色, 花果期 5—8 月^[1]。紫花补血草有重要的观赏价值和药用价值, 但由于其结实

率低^[14]、生境恶劣, 自然分布的越来越少。现以紫花补血草叶片为试材, 对其组织培养进行初步探索, 以期为其种质资源保护和进一步的研究、开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为紫花补血草(*Limonium franchetii* O. Kuntze)叶片。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 取紫花补血草的叶片, 流水冲洗 15~20 min, 将叶片的基部(A)、中部(B)和尖端(C)分别放在不同的消毒瓶中, 用 75% 的酒精消毒 10 s, 无菌水冲洗 1 次, 再分别用 0.1% 氯化汞浸泡 5、8、10 min, 然后用无菌水洗 5 次。

1.2.2 初代培养 将消毒后的外植体, 在灭菌后的培养皿中, 用消过毒的刀片切成 1 cm² 的小块, 接种基本培养基为 MS 培养基, 激素配比分别为 1) BA_{0.5} + NAA_{0.5}; 2) BA_{0.5} + NAA_{1.0}; 3) BA_{1.0} + NAA_{0.5}; 4) BA_{1.0} + NAA_{1.0} (激素单位: mg/L, 下同), 转接后注意查看污染情况, 30 d 后观察结果。

1.2.3 继代与增殖培养 把叶片分化出的不定芽作为材料, 接种在基本培养基为 MS, 附加不同激素配比的培养基中, 以筛选对不定芽增殖适宜的激素配比, 30 d 后观察、测量结果。

1.2.4 生根培养 选取大小相似、生长健壮的试管苗, 分成单株接种于附加不同浓度植物生长物质的各种生根培养基中, 每处理接种 40 个芽苗, 置温度 20~28℃、光照强度 2 000 lx、每天光照 14 h 培养室培养, 7 d 后每天观察、记录, 比较生根情况。

第一作者简介:解卫海(1973-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为植物生物技术。E-mail:xiweihai1973@126.com.

基金项目:山东省科技发展计划资助项目(2013YD19003)。

收稿日期:2015-10-13

1.2.5 移栽 将生根苗分别移栽到蛭石、草炭土混合基质中,观察试管苗的成活率及生长状况。前期注意保湿,5 d后逐渐降低湿度使其适应自然环境。

2 结果与分析

2.1 氯化汞不同消毒时间外植体污染与存活情况分析

由表 1 可知,将经过消毒的外植体接种到 1~4 号

表 1 HgCl₂消毒时间对外植体的影响

Table 1 Effect of different sterilization time with HgCl₂ on explants of *L. franchetii*

消毒时间 Sterilization time/min	接种外植体数 No. of explant/个	污染数 No. of polluted explant/个	死亡数 No. of dead explant/个	存活数 No. of surviving explant/个	污染率 Pollution rate/%	死亡率 Death rate/%	存活率 Survival rate/%
5	120	73	5	42	60.8	4.2	35.0
8	120	32	12	76	26.7	10.0	63.3
10	120	23	67	30	19.2	55.8	25.0

2.2 材料种类与激素配对外植体分化的影响

由图 1 可知,把紫花补血草的叶块转接于 1~4 号 MS 培养基中,30 d 后发现在叶缘开始分化丛生芽。由表 2 可知,叶片中部(B)作为外植体的分化率都达到了 100%,故叶片中部为较合适的组培材料。激素配比以 4 号培养基中(BA_{1.0} + NAA_{1.0})所有存活材料分化率都达到了 100%,且长势较好,可以认为是叶片分化较为合适的激素配比;1~3 号 MS 培养基中叶基部材料(A)的分化启动较慢,分化率低。

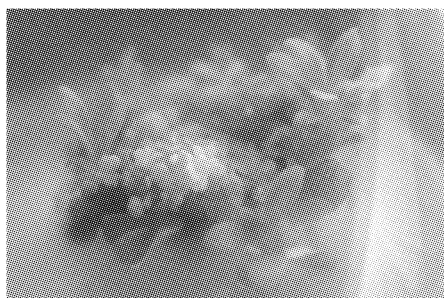


图 1 紫花补血草叶片外植体的不定芽分化情况

Fig. 1 Differentiation of clump buds from the explant of *L. franchetii*



的培养基中,4 d 左右发现了污染现象,经过 14 d 左右的观察,发现氯化汞消毒 5 min 的外植体污染率较高,8 min 次之,10 min 最低。但经过 10 min 消毒的外植体死亡率较高,而 8 min 消毒的污染率和死亡率介于其它 2 个处理之间,存活率最高,因此,紫花补血草叶片外植体消毒以 75%酒精消毒 10 s 加 0.1% HgCl₂ 浸泡 8 min 为宜。

表 2 材料种类与激素配对外植体分化的影响

Table 2 Effect of hormones combination and explant kinds on the differentiation of explant

激素配比 Hormones combination /(mg · L ⁻¹)	材料种类 Kind of explant	存活数 No. of surviving explant/个	分化数 No. of differentiation /个	分化率 Differentiation rate /%	分化芽长势 Growth potential of differentiated buds
BA _{0.5} + NAA _{0.5}	A	12	6	50.0	+
	B	12	12	100.0	+++
	C	11	11	100.0	++
BA _{0.5} + NAA _{1.0}	A	15	10	66.7	+++
	B	14	14	100.0	+++
	C	10	8	80.0	+
BA _{1.0} + NAA _{0.5}	A	12	6	50.0	+
	B	11	11	100.0	++++
	C	12	9	75.0	+
BA _{1.0} + NAA _{1.0}	A	12	12	100.0	+
	B	14	14	100.0	++++
	C	13	13	100.0	++

2.3 继代培养与增殖

由图 2-a 可知,取初代培养产生的无根芽苗转接在含 BA 0.5~1.5 mg/L 的培养基中,结果产生大量细小的丛生芽,多为无效芽苗,推测可能是 BA 浓度过高所

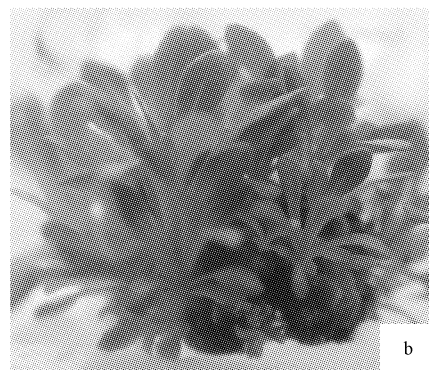


图 2 紫花补血草幼芽分化形成的大量芽苗(a)和健壮芽苗(b)

Fig. 2 The small buds (a) and strong buds (b) from subculture of *L. franchetii*

致。为了获得健壮芽苗,把紫花补血草的幼芽接种在激素配比为 $BA_{0.25} + NAA_{0.5}$ 的培养基中进行恢复培养,30 d后得到健壮的芽苗(图 2-b)。将健壮的紫花补血草芽苗转接于 5~13 号不同激素配比的培养基中。由表 3 可知,11~13 号培养基中分化出的芽苗植株较矮,增殖系数较大;5~7 号中增殖系数为零;8~10 号的分化芽数少于 11~13 号。

表 3 激素对比对芽增殖的影响

Table 3 Effect of BA and NAA combination on inducing clump shoots

培养基号	BA	NAA	外植体数	分化芽数	增殖系数	芽苗高	生长势
Serial number of medium	/(mg · L ⁻¹)	/(mg · L ⁻¹)	No. of explants/个	No. of differentiated buds/个	Propagation coefficient	Height of shoot/cm	Growth potential
5	0	0.5	25	0	0	3.3	+++
6	0	0.1	23	0	0	3.2	+++
7	0	0	27	0	0	3.0	+
8	0.10	0.5	27	477	16.6	2.0	++++
9	0.10	0.1	30	440	14.7	2.3	+++
10	0.10	0	23	308	13.4	2.1	++
11	0.25	0.5	30	770	25.7	1.5	++++
12	0.25	0.1	30	700	23.3	1.3	+++
13	0.25	0	27	462	17.1	1.3	++

表 4 正交分析

Table 4 Orthogonal analysis

项目 Item	BA/(mg · L ⁻¹)				NAA/(mg · L ⁻¹)				
	0	0.1	0.25	极差	0.5	0.1	0	极差	
	各水平平均值 Mean				Range	各水平平均值 Mean			
增殖系数 Multiplication coefficient	0	14.9	22.0	22.0	14.1	12.7	10.2	3.9	
芽苗高 Height of shoot	3.17	2.13	1.37	1.80	2.27	2.27	2.13	0.14	

2.4 生根培养

2.4.1 生长激素对试管苗生根的影响 以 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度生长激素(NAA、IAA、IBA)以诱导生根。由表 5 可知,NAA、IAA、IBA 均能促进生根,但生根情况有所不同。NAA、IAA 在低浓度(0.1 mg/L)即可明显促进根的生长和分化;而 IBA 在较高浓度才可

由表 3、4 可知,就增殖系数而言,BA 以第 3 水平最适宜,NAA 以第 1 水平最适宜,即 $BA_{0.25} + NAA_{0.5}$ 的激素配比最适宜芽增殖;同时,BA 各水平间的极差较大,即 BA 浓度对增殖系数影响较大,缺乏 BA,紫花补血草不能分化。而芽苗高则以 BA 水平 1 和 NAA 水平 1 或 2 最为适宜,因此,考虑芽的增殖和生长,应以 $BA_{0.1} + NAA_{0.1 \sim 0.5}$ 配比较好。

促进根的发生。同时,NAA 诱导的试管苗平均根数最多,平均根长则不及 IAA 和 IBA 处理。另外,IAA 处理生根快,但生根率不及 NAA。在 3 种激素生根特点上也有明显区别:NAA 所诱导的根粗短,数量多;IAA 所诱导的根细长且侧根多;IBA 所诱导的根细长但侧根少(图 3)。

表 5 3 种激素(NAA、IAA、IBA)对试管苗生根的影响

Table 5 Effect of NAA, IAA and IBA on root inducing of *L. franchetii*

培养基	生根率				平均根数	平均根长
Medium	Rooting rate/%				No. of roots per plantlet	Mean of root
/(mg · L ⁻¹)	9 d	12 d	17 d	25 d	/(条 · 株 ⁻¹)	length/cm
1/2MS+NAA _{0.1}	9.1	50.0	65.4	88.5	8.3±2.1	1.4±0.4
1/2MS+NAA _{0.5}	17.9	40.0	48.4	67.7	16.2±3.4	1.1±0.4
1/2MS+NAA _{1.0}	0.0	11.8	41.2	59.3	14.3±3.7	1.2±0.3
1/2MS+IAA _{0.1}	40.6	54.0	66.7	86.1	4.0±1.2	2.2±0.7
1/2MS+IAA _{0.5}	46.9	56.3	62.5	62.5	6.0±1.9	2.0±0.4
1/2MS+IAA _{1.0}	32.5	50.0	53.5	56.8	5.4±1.6	1.9±0.3
1/2MS+IBA _{0.1}	5.6	34.4	34.4	34.4	3.3±1.1	2.3±0.7
1/2MS+IBA _{0.5}	7.5	45.9	62.5	75.0	6.1±2.0	1.8±0.5
1/2MS+IBA _{1.0}	30.0	65.7	71.4	82.9	7.9±1.8	1.6±0.6
1/2MS	18.6	28.0	37.7	41.5	5.2±1.5	2.4±0.5

2.4.2 基本培养基、蔗糖和 NAA 对试管苗生根的影响 将大小相近的无根苗分别接种于 9 种不同生根培养基上,25 d 后统计、观察,并分析其生根情况(表 6)。由

表 6、7 可知,影响生根率和平均根数的主要是基本培养基种类和 NAA 浓度,影响根长的则主要是 NAA 浓度,而蔗糖用量对根发生的 3 个指标均不是主要影响因子。

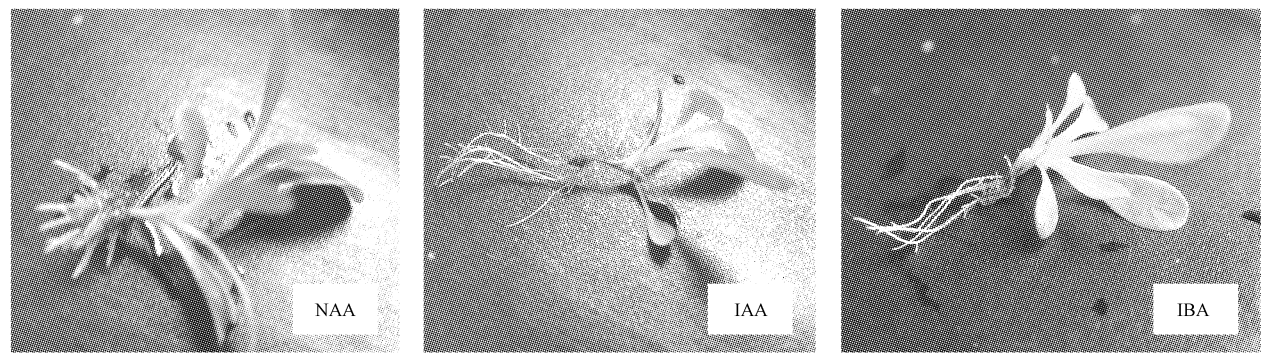


图3 生长素类物质诱导的紫花补血草试管苗生根情况
Fig. 3 Rooting seedlings induced by NAA, IAA and IBA

表6 基本培养基、蔗糖、NAA 对紫花补血草试管苗生根的影响

Table 6 Effect of basic media, sugar and NAA on root inducing of *L. franchetii*

试验号 No. of treatment	基本培养基 Medium	NAA /(mg · L ⁻¹)	蔗糖 Sucrose/(g · L ⁻¹)	生根率 Rooting rate/%	平均根数 No. of mean roots/(条 · 株 ⁻¹)	平均根长 Mean of root length/cm
1	MS	0.1	30	55.6	4.2±1.2	1.78±0.22
2	MS	0.3	20	57.1	3.7±0.7	0.80±0.10
3	MS	0.5	15	54.5	4.0±1.5	0.40±0.06
4	1/2MS	0.1	20	93.3	3.2±0.8	1.64±0.23
5	1/2MS	0.3	30	72.2	8.3±2.1	1.86±0.36
6	1/2MS	0.5	15	57.1	5.0±1.4	0.40±0.07
7	1/3MS	0.1	30	68.4	6.8±1.7	0.98±0.18
8	1/3MS	0.3	15	85.7	9.5±1.9	1.13±0.25
9	1/3MS	0.5	20	53.8	10.5±2.3	0.55±0.19

因此,诱导紫花补血草试管苗生根应选择适宜的基本培养基并将 NAA 控制在适宜的水平上,对于蔗糖用量则应在能满足需要的情况下注意节约。综合上述结果,该试验中诱导紫花补血草试管苗生根的适宜培养基应为 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 20 g/L。

2.5 试管苗移栽

选择生根的试管苗,用清水洗净培养基,分成单株,移栽到蛭石、草炭土及其混合基质中。结果表明,在各种基质中幼苗成活率均达 100%,且叶片翠绿、生长健壮(图 4),说明紫花补血草试管苗较易移栽成活。

表7 正交分析

Table 7 Orthogonal analysis

项目 Item	平均生根率 Rooting rate/%	平均根数 No. of mean roots/(条 · 株 ⁻¹)	平均根长 Mean of root length/cm
培养基 Medium			
MS	55.7	4.0	0.99
1/2MS	74.2	5.5	1.30
1/3MS	69.3	8.9	0.89
极差 Range	18.5	4.9	0.41
蔗糖 Sucrose /(g · L ⁻¹)			
30	65.4	6.4	1.54
20	68.1	5.8	1.00
15	65.8	6.2	0.64
极差 Range	2.7	0.6	0.90
NAA/(mg · L ⁻¹)			
0.1	72.4	4.7	1.47
0.3	71.7	4.2	1.26
0.5	55.1	7.8	0.45
极差 Range	17.3	3.1	1.42

3 结论

补血草花朵干后花色、花形变化不大,无需特殊保鲜处理,可以进行长期保存,是干花制作的优良花材。但补血草结实率低,特别是紫花补血草又因其生长环境恶劣,野生植株越来越少,有濒临灭绝的危险,因而利用

组培技术进行快速繁殖,保护其种质资源并为国内市场提供优良种苗尤为重要。该试验对紫花补血草的组织培养进行了初步探索,为其无性繁殖奠定了基础。

该试验结果显示,以紫花补血草的叶片为外植体,在适宜的培养条件下,很容易得到再生植株,在 MS+

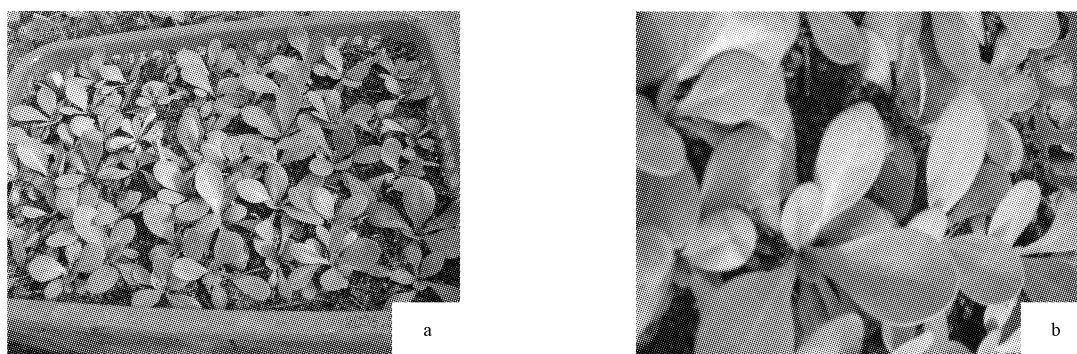


图4 紫花补血草试管苗移栽后7 d(a)和14 d(b)的生长状况

Fig. 4 Growth states of the plantlets at the seventh day(a) and fourteenth day(b) after transplanting

BA_{0.25} + NAA_{0.5} 的培养基中其芽苗月增殖系数可达到25.7,而在MS+BA_{0.1} + NAA_{0.1~0.5}的培养基中其芽苗月增殖系数虽然只有15.0左右,但芽苗健壮,容易生根,在1/2MS+NAA 0.1 mg/L+蔗糖20 g/L的培养基上其生根率达到90%以上;同时,再生植株在各种基质中的移栽成活率均为100%。另外,该试验还发现,紫花补血草叶片的中段最易脱分化,且很容易由叶盘边缘直接分化成芽,因而可能成为遗传转化的良好材料。

参考文献

- [1] 黄勇,张秀省,孟宪磊. 野生花卉补血草属及其开发利用[J]. 中国种业,2002(8):42.
- [2] 樊守金,胡译绪. 崂山植物志(下卷)[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [3] 张玲,李岩,田文睿,等. 河北环渤海地区补血草不同部位黄酮类化合物的研究[J]. 中国食品学报,2014,14(4):57-63.
- [4] 丁鸽,张代臻,张蓓蓓,等. 补血草属植物野生资源多样性及药理学研究进展[J]. 时珍国医国药,2012,23(12):3113-3114.
- [5] 高丽霞,邢柏芝,陈立波. 补血草组织培养快繁试验[J]. 北方园艺,

1999(2):3.

- [6] 李凤琴. 黄花补血草的组织培养技术[J]. 中国沙漠,1995,15(2):198-200.
- [7] 董玲,陈静娴,廖华俊,等. 小花补血草组织培养与植株再生[J]. 安徽农学通报,2002,8(3):57.
- [8] 陈银凤,陈嵩. 二色补血草试管苗生根及移栽基质研究[J]. 亚热带植物科学,2001,30(3):37-39.
- [9] 张小苹,马双马,那淑芝,等. 二色补血草叶片组织培养及无性系的建立[J]. 沈阳农业大学学报,1998,29(1):96-97.
- [10] 陈佳瀛,杜秀达. 补血草的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2002,38(6):594.
- [11] 范小峰,杨颖丽,刘灵霞. 大叶补血草的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2008,44(3):509.
- [12] 辛莎莎,谭玲玲,初庆刚. 烟台补血草盐腺结构及发育过程观察[J]. 植物资源与环境学报,2012,21(3):87-92.
- [13] 彭泽洋,庄璇,李树刚. 中国植物志(第60卷,第1分册)[M]. 北京:科学出版社,1987:32-33.
- [14] 孔冬瑞,王仲礼,刘林德,等. 紫花补血草的大小孢子发生及雌雄配子体发育[J]. 电子显微学报,2008,27(3):223-228.

Rapid Propagation of *Limonium franchetii* Through Plant Regeneration of Leaves

XIE Weihai¹, QU Xiaojie², BAI Xinfu¹

(1. College of Life Science, Ludong University, Yantai, Shandong 264025; 2. The Tenth Middle School of Yantai City, Yantai, Shandong 264000)

Abstract: The leaves of *Limonium franchetii* were used as the explants and cultured in MS media with different portions of hormone to induce plant regeneration. The results showed that the explants sterilizing with 75% alcohol for 10 seconds and 0.1% HgCl₂ for 8 minutes yielded good results. The optimal medium for leaf dedifferentiation and clump bud induction was MS+BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L, while the preferable medium for the plantlets rapid propagation was MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.1-0.5 mg/L, and the most favourable medium for adventitious root induction was 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+sucrose 20 g/L. Based on the above optimized mediums, a micropropagation system of *Limonium franchetii* was successfully developed.

Keywords: *Limonium franchetii*; tissue culture; rapid propagation