

网络出版时间:2013-05-02 10:55

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130502.1055.021.html>

白鹃梅的离体培养及植株再生试验

戢小梅^{1,2}, 许 林¹, 谢焰锋¹, 董艳芳¹, 陈卫东¹, 舒常庆²

(1 武汉市林业果树科学研究所, 湖北 武汉 430075; 2 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

【摘 要】 【目的】探讨不同植物生长调节剂对白鹃梅芽苗再生和生根的影响, 为白鹃梅的开发利用、工厂化育苗及遗传育种研究奠定基础。**【方法】**以白鹃梅的嫩茎段为外植体, 接种前用 1 g/L 的 HgCl_2 溶液对材料进行不同时间(6, 8, 10, 12 min)的消毒处理, 筛选适宜的消毒时间; 采用均匀设计法, 将无菌外植体接种在附加有不同质量浓度植物生长调节剂(0, 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 mg/L 6-BA, 0, 0.1, 0.3, 0.5 和 0.7 mg/L NAA)的 MS 培养基中, 筛选诱导直接再生芽苗的适宜培养基; 将直接再生芽苗接种在附加有不同种类和质量浓度植物生长调节剂(0.1, 0.3, 0.5 和 0.7 mg/L 6-BA, 0.1, 0.3, 0.5 和 0.7 mg/L IBA)的 1/2MS 培养基中, 筛选诱导生根的适宜培养基。**【结果】**1 g/L HgCl_2 溶液对白鹃梅嫩茎段的最适宜消毒时间为 8 min, 在该条件下外植体的成活率为 95.2%; 白鹃梅直接再生芽苗的最适宜诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L, 在该培养基上直接再生芽苗的诱导率可达 85.7%; 生根培养基以 1/2MS+0.3 mg/L NAA 的生根效果最好, 生根率达到 70.45%。**【结论】**获得了白鹃梅嫩茎段适宜的消毒时间及适宜的再生芽苗和生根培养基配方。

【关键词】 白鹃梅; 离体培养; 植株再生; 均匀设计法

【中图分类号】 S685.124⁺.3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)05-0160-05

In vitro culture and plantlet regeneration of *Exochorda racemosa* (Lindl.) Rehd

JI Xiao-mei^{1,2}, XU Lin¹, XIE Yan-feng¹, DONG Yan-fang¹,
CHEN Wei-dong¹, SHU Chang-qing²

(1 Wuhan Science Research Institute of Forestry&Fruit-tree, Wuhan, Hubei 430075, China;

2 College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: 【Objective】The research of the effects of different kinds of plant growth regulator combination on bud differentiation and the influence on rooting effect were studied to set up a stable regeneration system and to lay a foundation and method for exploitation and application, Industrial Seedling, and the study of inheritance and breeding of *Exochorda racemosa* (Lindl.) Rehd. **【Method】**The tender stems of *Exochorda racemosa* (Lindl.) Rehd were used explants in the experiment. Explants were disinfected at various time(6, 8, 10, 12 min) of using 1 g/L Hg solution before inoculated, and selected the best time for disinfection of explants; The explants disinfected were cultured in MS medium supplemented with different concentration of hormones(0~2.0 mg/L 6-BA, 0~0.7 mg/L NAA) was filtrated and optimized by using uniform design; The shoots regeneration cultured in 1/2MS medium supplemented with different hormones and concentrations(0.1~0.7mg/L 6-BA, 0.1~0.7 mg/L IBA) was filtrated and optimized. **【Conclusion】**

【收稿日期】 2012-08-15

【基金项目】 武汉市农科院攻关项目(Y201009)

【作者简介】 戢小梅(1983—), 女, 湖北十堰人, 工程师, 硕士, 主要从事园林植物种质资源收集及林业生态工程研究。
E-mail: meihua2010@yahoo.com.cn

【通信作者】 舒常庆(1966—), 男, 湖北武汉人, 副教授, 主要从事园林植物遗传育种研究。E-mail: 472933102@qq.com

The best time of disinfection in 1g/L Hg solution was 8 min, and the survival rate of explants was 95.2%; the best medium for shoots regeneration was MS+1.0 mg/L 6-BA, the rate of induction was 85.7%; the best medium for rooting was 1/2MS+0.3 mg/L NAA, the rate of rooting was 70.45%. 【Result】 It was obtained the tender stems of *Exochorda racemosa* needed a suitable time for sterilization, induction of the shoots regeneration by the tender stems and rooting of the shoots regeneration needed suitable concentration of formula of medium.

Key words: *Exochorda racemosa* (Lindl.) Rehd; *in vitro* culture; plantlet regeneration; uniform design

白鹃梅(*Exochorda racemosa* (Lindl.) Rehd)又名茧子花、珍珠菜,系蔷薇科(Rosaceae)白鹃梅属(*Exochorda*)植物,为既可观花又能赏果的有待研究开发的优良野生园林植物,属落叶灌木,多数呈小乔木状,其花蕾及嫩梢的营养价值较高,是一种优良的木本蔬菜,具有较高的开发利用价值^[1]。另外,白鹃梅属于野生资源,是白鹃梅属植物育种的重要种质资源。白鹃梅利用常规扦插繁殖很难生根^[1],多采用播种繁殖,但种子不易采集,使其开发利用受到极大限制。目前,关于白鹃梅的研究多集中在食用^[2-4]、繁殖^[1]及应用前景分析方面^[5],而离体快繁技术研究尚鲜见报道^[6]。为此,本研究采用组织培养法进行白鹃梅的快速繁殖,建立了从嫩茎段到丛生芽的无性繁殖体系,所使用的消毒处理和激素组合与已有报道不同,有利于快速提供大量种苗且不受季节限制,旨在为白鹃梅的开发利用、工厂化育苗及遗传育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

白鹃梅枝条采自武汉市林业果树科学研究所野生植物资源圃,该圃位于武汉市东部近郊,海拔 67 m,地理坐标为 N 30°30'60", E 114°27'05";土壤为黄棕壤,土层深厚;年平均气温 16.2~16.7℃,年降雨量 1 140~1 265 mm,年均无霜期为 237~271 d。本试验以白鹃梅带腋芽的嫩茎段为外植体。

1.2 HgCl₂ 消毒时间的确定

将带腋芽的嫩枝剪下,在自来水龙头下流水冲洗 20 min。在超净工作台上用 1 g/L 的 HgCl₂ 溶液分别浸泡 6, 8, 10 和 12 min,浸泡过程中连续振荡,取出后分别用无菌水反复清洗 6 次,用无菌纸吸干水分,切成 1.5~2.0 cm 的茎段,接种于无菌的培养基中,2 周后统计污染率。每 30 个茎段为 1 个处理,每个处理 3 次重复。

1.3 直接再生芽苗诱导培养基的筛选

以 MS 为基本培养基,将消毒好的白鹃梅嫩枝

切成一叶一段,长度约 1 cm,接入无菌的诱导直接再生芽苗培养基中培养。培养基配方为:MS 培养基中附加不同质量浓度的 6-BA(由预试验确定为 0, 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 mg/L)、萘乙酸(NAA,由预试验确定为 0, 0.1, 0.3, 0.5 和 0.7 mg/L)、30 g/L 蔗糖和 5.4 g/L 琼脂(为日本 BIOSHARP 产品),pH 为 5.6。培养温度为(25±1)℃,光照周期为 12 h/d,光照强度 2 200 lx。采用均匀设计法^[7] U₅(5²)均匀设计表,每个处理接种白鹃梅嫩茎段 30 个培养,重复 3 次,嫩茎段培养 45 d 后,统计污染数、褐化数和萌发茎段数,计算诱导率(诱导率=萌发茎段数/接种茎段数×100%),并计算平均值,以筛选出适宜的诱导直接再生芽苗的 6-BA 和 NAA 质量浓度配比。

1.4 白鹃梅生根培养基的筛选

将消毒好的白鹃梅嫩枝在芽诱导培养基中培养 22~24 d,使基部再生出丛芽,将长度超过 2.5 cm 的嫩枝从芽丛上分离,接入生根培养基。生根培养基配方为:1/2MS 培养基中单独添加不同质量浓度的 NAA(0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg/L)或者吲哚丁酸(Indole-3-Butyric acid, IBA, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg/L),以及 30 g/L 蔗糖和 5.4 g/L 琼脂,pH 为 5.6。生根培养温度为(25±1)℃,光照周期为 12 h/d,光照强度 2 200 lx。每处理接种白鹃梅丛芽 30 个,重复 3 次。再生丛芽培养 40 d 后统计生根数、根长,计算生根率、平均生根条数和平均根长(生根率=生根数/接种数×100%),结果取 3 次重复的平均值,以筛选诱导生根较适宜的 NAA、IBA 质量浓度配比。

1.5 数据处理

白鹃梅的芽增殖诱导试验采用均匀设计法进行设计,试验数据采用 Excel 2003 进行处理;生根培养的试验数据采用 SPSS19.0 进行方差分析,采用 Duncan's 检验进行多重比较。试验结果用平均值或“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 HgCl₂ 溶液消毒时间的确定

由表 1 可以看出,HgCl₂ 溶液处理 6 min 消毒效果不好,污染率高达 86.7%;处理 8 min 消毒效果较好,既能保证外植体较高的成活率,又能将污染率控制在较低的范围内;处理 10 min 虽然污染率较低,但成活率也降低到 82.6%,整体效果不及 8 min 处理;处理 12 min 污染数最低,但大多数外植体丧失了再生能力,其成活率仅为 20.8%。因此,对白鹃梅外植体较适宜的消毒处理方法为:在流水下冲洗 20 min,放入超净工作台后,用 1 g/L HgCl₂ 溶液消毒 8 min,取出后用无菌水反复冲洗。

表 1 HgCl₂ 对白鹃梅嫩茎段消毒不同时间污染率的比较
Table 1 Comparison of the tender stems of *E. racemosa*'s contamination rate in different sterilize time by Hg solution

消毒时间/min Disinfectiontime	污染数 Number of polluted	污染率/% Contamination rate	成活数 Number of survived	成活率/% Survival rate
6	26	86.7	4	100.0
8	9	30.0	20	95.2
10	7	23.3	19	82.6
12	6	20.0	5	20.8

2.2 白鹃梅直接再生芽苗诱导培养基的筛选

由均匀设计试验结果(表 2)分析可得回归方程为 $Y=0.776+0.557X_1-1.249X_2$,其中 Y 代表诱导率, X_1 代表 6-BA 质量浓度, X_2 代表 NAA 质量

浓度,样本容量 $n=5$,显著性水平 $\alpha=0.05$ 。通过计算,复相关系数 $R^2=0.993$,检验值 $F_t=69.879$,临界值 $F_{(0.05,2,2)}=19.00$,可见 $F_t>F_{(0.05,2,2)}$,表明试验结果差异显著。根据数据处理结果检验各项的显著性,结果表明 6-BA、NAA 均对诱导率影响显著,本试验二者较佳的质量浓度分别为 1.0 和 0 mg/L,即白鹃梅直接再生芽苗诱导培养基无需添加 NAA,只需添加 1.0 mg/L 6-BA,再生芽苗诱导率即可达 85.7%。

表 2 白鹃梅直接再生芽苗诱导培养基的 U₅(5²) 均匀设计试验结果

Table 2 U₅(5²) uniform design test of media for bud seedling regeneration of *E. racemosa*

编号 Treatment number	6-BA(X ₁)/ (mg·L ⁻¹)	NAA(X ₂)/ (mg·L ⁻¹)	诱导率(Y)/% Induction rate
1	0.0	0.1	10.0
2	0.5	0.5	17.7
3	1.0	0.0	85.7
4	1.5	0.3	44.3
5	2.0	0.7	3.3

2.3 白鹃梅再生丛芽生根培养基的筛选

对生长情况一致、健壮白鹃梅组培苗进行生根培养,接种 35 d 左右可形成完整的白鹃梅小植株。组培苗接种后 18 d 开始生根,接种后 45 d 对组培苗生根外植体数、根数和根长等指标进行统计,计算生根率、平均根数和平均根长,结果见表 3。

表 3 1/2MS 培养基中植物生长调节剂对白鹃梅生根的影响
Table 3 Influence on rooting effect of different kinds of plant growth regulator combination in 1/2MS culture medium

处理编号 Treatment number	调节剂 Regulator	质量浓度/ (mg·L ⁻¹) Concentration	生根率/% Rooting rate	平均生根数 Average rooted number	根长/cm Root length	根生长状态 Root growth situation
1	NAA	0.1	39.15±3.40 c	0.83±0.15 c	2.75±0.08 d	根数量少,细弱 Amount small and gracility
2	NAA	0.3	70.45±3.21 c	3.80±0.21 e	5.57±0.07 f	根数量较多,主根明显,根粗长 Number of root was more,main roots were significant,the length and diameter of roots was long
3	NAA	0.5	49.71±3.86 d	1.50±0.27 d	3.36±0.04 e	根较粗长,生长较慢,数量少 The length and diameter of roots was long,and had slow growth,amount small
4	NAA	0.7	33.81±3.88 bc	0.70±0.12 bc	2.16±0.08 c	根粗短,数量较少,生长较慢 The roots were short and thick,amount small,and had slow growth
5	IBA	0.1	0 a	0 a	0 a	未见生根 No rooting
6	IBA	0.3	6.45±6.45 a	0.07±0.07 a	1.94±0.50 c	生根极少,根细弱 Rooting rarely,root was thin
7	IBA	0.5	15.00±7.86 ab	0.20±0.12 b	1.65±0.03 b	根数量极少,根细弱,生长缓慢 Rooting rarely,root was thin,nd had slow growth
8	IBA	0.7	12.60±6.31 a	0.10±0.05 a	2.08±0.06 c	根数量极少,根细弱,生长缓慢 Rooting rarely,root was thin,nd had slow growth
9	CK	—	0 a	0 a	0 a	未见生根 No rooting

注:同列数据后标不同小写字母表示经 Duncan's 法检验差异极显著($P<0.01$)。
Note:Date with different lowercase letters in the same column represent the significante of difference in the $P=1\%$ level by Duncan examine.

由表3可知,未添加植物生长调节剂的处理9和附加有0.1 mg/L IBA的处理5的生根率均为0;处理5~8均附加了不同质量浓度的IBA,生根率均低于15%,可见IBA对白鹃梅丛生芽不定根的诱导作用很小,基本上可以忽略不计。附加了0.3 mg/L NAA的处理2生根率最高,可达70.45%,附加了不同质量浓度NAA的处理1,3和4对白鹃梅丛生芽不定根也有一定的诱导作用,其中处理3的生根率达49.71%,处理1和4的生根率均小于40%,可见质量浓度0.3 mg/L NAA对白鹃梅丛生芽不定根的生长具有明显的诱导作用,并且NAA对白鹃梅丛生芽不定根的诱导作用明显优于IBA。从各处理的生根状态来看,附加了NAA的试管苗,先在基部产生愈伤组织然后再生根,而附加了IBA的试管苗,仅有极少量植株生根,且都是直接从基部生根;在试验过程中还发现,组培苗生根以后的生长状态明显优于未生根植株,生根的组培苗植株叶片舒展、叶色嫩绿、植株健壮,而未生根植株表现为叶片边缘发黄甚至卷曲,植株低矮。

3 结论与讨论

在植物组织培养过程中,建立无菌外植体、获得无菌培养材料是试验成功的第一步,外植体消毒时间的把握则是组培顺利进行的关键一环^[8],消毒时间过短达不到消毒效果,会造成试验材料大量污染,降低试验效率;消毒时间过长又会伤害植物细胞,甚至导致试验失败。本试验采用1 g/L的 HgCl_2 溶液对白鹃梅嫩茎段进行不同时间消毒处理,结果表明,白鹃梅嫩茎段在 HgCl_2 溶液中消毒8 min的灭菌效果最佳。

植物组织在离体培养过程中,往往不能自行合成生长素等内源激素,但其在组织分化与形态建成等过程中又需要相应激素的调节作用,单纯的培养基只能维持培养物的最低生理需求^[9]。不同植物在组织培养过程中,对生长调节剂的种类、质量浓度的需求存在很大差别。有报道指出,植物生长调节物质互相组合对植物组织分化和器官形成所产生的促进作用远大于组合中任一种单一的植物生长调节剂^[10]。对于黄连木来说,使用一定质量浓度的NAA和IBA组合,可有效促进腋芽的诱导萌发率^[9]。本试验采用不同质量浓度的6-BA和NAA组合对白鹃梅的嫩茎段进行再生芽苗的诱导,发现当6-BA的质量浓度达到1.0 mg/L、NAA质量浓度为0时,能够更好地诱导白鹃梅外植体丛生芽的

再生;当6-BA和NAA组合使用时,再生芽苗的生根率均低于45%,只有当NAA的质量浓度极低或为0时才能使白鹃梅再生芽苗达到显著的生根效果,表明NAA不利于白鹃梅再生芽苗的生长与分化。这说明植物组织或器官的发生对植物生长调节物质的种类和质量浓度具有差异性选择^[11]。这可能与植物自身的基因型有关,即不同的基因型决定了植物在组织分化和器官形成过程中所需要的植物生长调节物质的种类和质量浓度^[12]。

培养基中营养成分和糖含量的适当减少可以有效刺激丛生芽生根,这可能是由于较高质量浓度的营养元素容易使试管苗产生依赖性而不能生根或使生根迟缓^[13]。本研究在预试验中曾使用MS作为基本培养基,发现很难诱导生根,丛生芽出现玻璃化现象;采用1/2MS作为基本培养基,生根率可达80%,再生芽苗长势良好。试验中选择IBA和NAA 2种生长调节物质分别进行生根试验,结果表明,IBA和NAA均能在一定程度上促进组培苗的生根,但需要适宜的质量浓度。用IBA诱导生根,生根率极低且根细弱;使用NAA诱导生根,外植体会先在基部产生愈伤组织,然后再生根;NAA为0.3 mg/L时生根率高达70.45%,根粗壮,且整个植株生长健壮。而有关药用植物白术组织培养生根的报道表明,IBA和NAA都能诱导生根,IBA的诱导作用明显优于NAA,但质量浓度不宜过高,否则容易产生畸形根^[14]。这说明不同植物组织培养生根对植物生长调节剂的需求也不同,这一方面可能与植物在前期培养过程中所用的外源激素不同而导致内源激素出现差异有关,另一方面也可能是由于外源生长调节物质超过了培养物本身的适应极限,进而影响到根的形成与分化^[15]。

白鹃梅的组培苗生根能力不强,在没有生长素诱导的情况下不能生根,并且试验的重复操作性很差。本试验中,白鹃梅组培苗移栽后成活率极低,相关研究正在进一步深入开展。

目前,白鹃梅属植物基本上还处于野生状态,人工繁殖并开发利用的极少。白鹃梅在食用和园林观赏方面都具有重要的价值,是一种难得的野生植物资源,至今未见推广应用。本研究结果为白鹃梅的开发利用和工厂化育苗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 戴小梅,陈法志,董艳芳,等.野生白鹃梅繁育技术研究[J].湖北农业科学,2011,50(20):4225-4227.

Ji X M,Chen F Z,Dong Y F,et al. Breeding research of wild *Exochorda racemosa* [J] . Hubei Agricultural Sciences,2011, 50(20):4225-4227. (in Chinese)

[2] 裴红宾,杜新民. 山野菜白鹃梅营养成分分析 [J]. 中国野生植物资源,2003,22(1):49-50.

Pei H B,Du X M. Analysis on the nutrients of mountainous edible Wild Herb *Exochorda racemosa* [J] . Chinese Wild Plant Resources,2003,22(1):49-50. (in Chinese)

[3] 张家佳,方成武,谢 地,等. 白鹃梅嫩叶及花序中重金属和农药残留检测 [J]. 安徽中医学院学报,2011,30(2):65-66.

Zhang J J,Fang C W,Xie D,et al . Determination of heavy metals and pesticide residues of tender leaves and inflorescences from *Exochorda racemosa* (Lind l.) Rehd [J]. Journal of Anhui TCM College.2011,30(2):65-66. (in Chinese)

[4] 戴小梅,陈法志,董艳芳,等. 白鹃梅可食部分营养成分分析 [J]. 园艺与种苗,2011(4):89-90,107.

Ji X M,Chen F Z,Dong Y F,et al. Nutrient analysis of the edible part in *Exochorda racemosa* [J], Horticulture&Seed,2011 (4):89-90,107. (in Chinese)

[5] 赵国建,董周永,杨公明. 白鹃梅的开发利用 [J]. 资源开发与市场,2004,20(6):456-457.

Zhao G J,Dong Z Y,Yang G M. Utilization and development of *Exochorda acemesa* [J]. Resource Development & Market, 2004,20(6):456-457. (in Chinese)

[6] 周丽艳,秦子禹,张兴霞. 白鹃梅离体快繁技术的研究 [J]. 安徽农业科学,2008,36(19):8014-8016.

Zhou L Y,Qing Z Y,Zhang X X. Study on rapid propagation technique of *Exochora racemosa in vitro* [J]. Anhui Agricultural Sciences,2008,36(19):8014-8016. (in Chinese)

[7] 顾地周,陆 爽,把春影,等. 烈香杜鹃的离体培养和高效植株再生 [J]. 植物生理学报,2012,48(4):381-385.

Gu D Z,Lu S,Ba C Y,et al. *In vitro* culture and efficient plant-let regeneration of *Rhododendron anthopogonoides* Maxim [J]. Plant Physiology Journal,2012,48(4):381-385. (in Chinese)

[8] 沈海龙. 植物组织培养 [M]. 北京:中国林业出版社,2005.

Shen H L. Plant tissue culture [M]. Beijing: Beijing Forestry Press,2005. (in Chinese)

[9] 何敬房,苏淑钗,冷平生,等. 黄连木组培快繁育苗研究 [J]. 北京农学院学报,2011,26(3):44-47.

He J F,Su S C,Leng P S,et al. On rapid propagation for tissue culture seedlings of *Pistacia chinensis* [J]. Journal of Beijing University of Agriculture,2011,26(3):44-47. (in Chinese)

[10] 高新一,王玉英. 植物无性繁殖实用技术 [M]. 北京:金盾出版社,2003.

Gao X Y,Wang Y Y. Practical plant asexual reproduction techniques [M]. Beijing: Jindun Publishing House,2003. (in Chinese)

[11] 顾地周,从小力,姜云天,等. 色木槭的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯,2008,44(2):314.

Gu D Z,Cong X L,Jiang Y T,et al. Tissue culture and rapid propagation of *Acer mono* Maxim [J]. Plant Physiology Journal,2008,44(2):314. (in Chinese)

[12] 梁钻姬,潘超美,赖珍珍,等. 药用植物华泽兰组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学报,2012,48(1):85-89.

Liang Z J,Pan C M,Lai Z Z,et al. Tissue culture and rapid propagation of medicinal plant *Eupatorium chinense* L. [J]. Plant Physiology Journal,2012,48(1):85-89. (in Chinese)

[13] 汤桂均,张建安,蒋建平,等. 高山杜鹃的组织培养快速繁殖技术研究 [J]. 上海农业学报,2004,20(3):15-18.

Tang J J,Zhang J A,Jiang J P,et al. Study on rapid propagation of *Rhododendron lapponicum* [J]. Acta Agriculturae Shanghai,2004,20(3):15-18. (in Chinese)

[14] 珠玉球,夏国华,方慧刚,等. 白术组培快繁技术 [J]. 中药材,2006,29(3):212-213.

Zhu Y Q,Xia G H,Fang H G,et al. Study on tissue culture and rapid propagation of *Atractylodes macrocephala* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2006, 29 (3): 212-213. (in Chinese)

[15] 龙 华,胡雪峰,黄衡宇. 獐牙菜的组织培养 [J]. 中草药,2009,40(3):462-466.

Long H,Hu X F,Huang H Y. Tissue culture of mussoitii [J]. Chinese Traditonal Drug,2009,40(3):462-466. (in Chinese)