

文章编号:1001-7380(2018)04-0029-04

6-BA 与 ZT 对芫花茎段外植体组织培养的影响

张 虎,巫建新,许建民,宋 微

(江苏农林职业技术学院,江苏 句容 212400)

摘要:采用芫花茎段为外植体,研究其在不同消毒方法处理下的存活情况,以及施加不同植物生长调节剂组合下芽的诱导率和生长情况。结果表明:芫花茎段外植体采用 75%乙醇消毒 30 s 后,用 0.1%氯化汞加吐温 80 混合液消毒 12 min 的处理最佳,其污染率为 57.8%,死亡率为 13.3%,存活率为 28.9%;ZT 对芫花茎段外植体上腋芽萌发的促进效果显著优于 6-BA,培养基以 MS+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L ZT 处理最佳,其萌发率为 92.2%,玻璃化率为 22.3%,萌芽均高为 2.13 cm。

关键词:芫花;组织培养;ZT;6-BA;植物生长调节剂

中图分类号:Q943.1;S793.9

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2018.04.007

Effects of 6-BA and ZT on the tissue culture of *Daphne genkwa* segment explant

Zhang Hu, Wu Jianxin, XU Jianmin, Song Wei

(Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Jurong 212400, China)

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effects of different disinfection treatments on the survival of *Daphne genkwa* nodal segment explants and the effects of different plant growth regulator combinations on shoot induction rate and growth. The results showed that the best disinfection treatment was 75% ethanol disinfection for 30 s, plus 0.1% mercuric chloride and Tween 80 mixed solution for 12 min. Under this treatment, the pollution rate reached 57.8%, the mortality rate was 13.3%, and the survival rate was 28.9%. The promoting effect of ZT on the germination of the *D. genkwa* segments was significantly better than that of 6-BA. The best medium was MS+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L ZT as the germination rate was 92.2%, the vitrification rate was 22.3%, and the average shoot height was 2.13 cm.

Key words: *Daphne genkwa*; Tissue culture; ZT; 6-BA; Plant growth regulator

芫花(*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.)为瑞香科瑞香属落叶灌木,主要分布在中国黄河流域以南地区。芫花花期在春季,花常3至7朵簇生于短花轴上,先于叶开放,其花朵锦簇,花色艳丽,具有较高的观赏价值,为我国优良野生花卉资源^[1-3]。芫花性寒,有毒,全株可入药,是我国重要的中药材和生物农药^[4-6]。

从20世纪60年代开始,尤其是90年代以后,芫花的生境遭到严重破坏,种群分布范围缩小,居群数量及个体数量急剧下降,其野生可利用资源逐

渐减少^[7]。研究芫花的繁殖技术成为保护和利用该植物资源的迫切要求。采用组织培养方法繁殖芫花,可保持母本优良性状,为优良单株的快速扩大繁殖提供有效途径。

国内外对芫花的药理学研究表明,芫花含有黄酮苷元等多种药用成分,其不同器官中所含药物成分及其含量不尽相同,通过不同加工与炮制方法,可有效提高其药用成分含量,其药用成分具有抗早孕、抗炎、抗肿瘤活性等作用^[8-14]。对芫花生物农药的研究表明,芫花具有 β -谷甾醇、雪松醇等杀虫活

收稿日期:2018-06-04;修回日期:2018-07-16

基金项目:江苏省重点研发(现代农业)计划“沿江地区花木产业主导产业链关键技术集成创新与示范”(BE2016332);江苏高校“青蓝工程”

作者简介:张 虎(1974-),男,江苏句容人,副教授,硕士。主要从事园林植物开发研究工作。

性成分,其提取物对抑制、杀死天牛和尺蠖等害虫具有活性^[15-17]。对芫花抑菌效果的研究表明,芫花提取物具有多种抑菌成分,对辣椒疫霉病、番茄灰霉病等植物病原菌具有抑菌活性^[18-19]。但对芫花作为观赏植物的研究相对较少,董春玲等对芫花开发成新花卉作物的前景进行了分析,初步探讨了其在园林应用的主要形式^[20]。目前关于芫花繁殖与栽培技术的相关研究不多,其茎段外植体组织培养快速繁殖技术在国内外尚未见报道。

本研究以芫花茎段为外植体,研究其初代组织培养技术,以建立可以快速繁殖的芫花组织培养技术体系,为芫花种质资源保存、工厂化育苗等研究提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

芫花母本植株选自江苏省句容市,江苏农林职业技术学院林木种质资源圃。芫花茎段外植体采自野生芫花优株播种繁殖的2年生苗。芫花组织培养试验于2016年10月在江苏农林职业技术学院园艺工程中心植物组织培养室内进行。

1.2 方法

采集生长健壮,腋芽饱满,无病虫害的芫花当年生枝条,去除叶片,剪截成10 cm左右带腋芽茎段,用洗衣粉液浸泡,清洗20 min,接着用流水冲洗12 h。

在超净工作台上,把外植体剪为3—4 cm茎段,用无菌水冲洗3遍。采用75%乙醇消毒茎段30 s,放入0.1%的升汞加3—5滴吐温80的混合液浸泡消毒,处理时间分别为8,10,12,14 min;用无菌水冲洗后,剪截成2 cm左右具节茎段,接入MS固体培养基;每处理茎段30个,重复3次。

用消毒获得的无菌带芽茎段进行初代培养试验。采用MS+0.2 mg/L NAA+(0.5,2.0,5.0) mg/L 6-BA和MS+0.1 mg/L NAA+(1.0,1.5,2.0) mg/L ZT,共6个处理进行试验。每处理30个茎段,重复3次。

1.3 培养基与培养条件

将接种外植体置于培养室进行培养,室内温度(24±1)℃,相对湿度75%,光照强度2 500 lx,光周期L14:D10,培养25 d。MS固体培养基加入蔗糖30 g/L及琼脂7 g/L,按配方质量浓度加入植物生长调节剂及调整酸碱度至pH为5.8。

1.4 数据处理

观测污染率、死亡率、存活率、萌发率、玻璃化率、萌芽均高等指标,数据统计均在培养25 d时进行,数据采用SPSS软件进行方差分析和多重比较。相关指标计算如下:

污染率(%)=(外植体污染数/接种外植体总数)×100;

死亡率(%)=(外植体死亡数/接种外植体总数)×100;

存活率(%)=100-污染率(%) -死亡率(%);

萌发率(%)=(腋芽萌发的外植体数/接种外植体总数)×100;

玻璃化率(%)=(玻璃化外植体数/接种外植体总数)×100;

萌芽均高(cm)=萌发新梢长度之和/接种外植体总数。

2 结果与分析

2.1 消毒方式对外植体灭菌效果的影响

2.1.1 预处理无流水冲洗环节的消毒方法对芫花茎段外植体灭菌效果的影响 预处理采用洗衣粉液浸泡芫花茎段外植体20 min,消毒采用75%乙醇30 s+0.1%升汞8—14 min进行灭菌处理,并调查污染率,将污染率数据进行方差分析,试验结果见表1。

表1 预处理无流水冲洗环节的消毒方法对芫花茎段外植体灭菌效果的影响

处理	污染率/%
75%乙醇30 s+0.1%升汞8 min	100.0 a
75%乙醇30 s+0.1%升汞10 min	92.2 a
75%乙醇30 s+0.1%升汞12 min	93.3 a
75%乙醇30 s+0.1%升汞14 min	87.8 a
同列数据后相同小写字母表示差异不显著(P>0.05)	

预处理无流水冲洗环节的消毒方法对芫花茎段外植体消毒处理的污染率为87.8%—100.0%,各处理无显著差异。由此可知,预处理过程中无流水冲洗环节的消毒方法,污染率高,外植体消毒效果不理想。

2.1.2 预处理加流水冲洗环节的消毒方法对芫花茎段外植体灭菌效果的影响 预处理采用洗衣粉液浸泡芫花茎段外植体20 min,接着用流水冲洗12 h;然后采用75%乙醇30 s+0.1%升汞加3—5滴吐

温 80 混合液 8—14 min 进行灭菌处理,结果见表 2。

表 2 预处理加流水冲洗的消毒方法对芫花茎段外植体灭菌效果的影响				
处理	污染率/ %	死亡率/ %	存活率/ %	
75%乙醇 30 s+升汞吐温混合液 8 min	91.1 a	3.3 b	5.6 c	
75%乙醇 30 s+升汞吐温混合液 10 min	70.0 b	8.9 b	21.1 b	
75%乙醇 30 s+升汞吐温混合液 12 min	57.8 bc	13.3 b	28.9 a	
75%乙醇 30 s+升汞吐温混合液 14 min	44.4 c	35.6 a	20.0 b	
同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)				

预处理加流水冲洗环节的消毒方法其污染率随消毒时间的延长逐渐下降。消毒 8 min 处理的污染率为 91.1%,显著高于其他各处理;消毒 14 min 污染率最低,为 44.4%,显著低于 8,10 min 处理;消毒 12,14 min 处理污染率差异不显著。

预处理加流水冲洗环节的消毒方法茎段外植体死亡率随消毒时间的延长逐渐上升。消毒 14 min 死亡率为 35.6%,显著高于其他各处理;消毒 8,10,12 min 的处理,其死亡率均在 13.3%以下,各处理间差异不显著。

预处理加流水冲洗环节的消毒方法茎段外植体的存活率数据分析表明,消毒 8min 处理的存活率为 5.6%,效果最差,显著低于其他处理;消毒 10 min 和 14 min 存活率为 21.1%和 20.0%;消毒 12 min 效果最好,存活率达 28.9%,显著高于其他处理。

综合分析污染率、死亡率与生存率的试验结果可知,芫花茎段外植体的最佳消毒方法为预处理采用洗衣粉液浸泡芫花茎段外植体 20 min,接着用流水冲洗 12 h;消毒采用 75%乙醇 30 s+0.1%升汞吐温 80 混合溶液 12 min 处理,其污染率为 57.8%,死亡率为 13.3%,存活率为 28.9%。

2.2 6-BA 与 ZT 质量浓度对初代培养的影响

采用 6-BA 与 ZT 不同质量浓度的植物生长调节剂配方处理对芫花茎段外植体萌发与生长情况的影响见表 3。

6-BA 与 ZT 不同质量浓度处理芫花茎段外植体,对萌芽率的影响结果表明,6-BA 各质量浓度处理其萌芽率在 34.4%以下,ZT 各质量浓度处理其萌芽率在 74.4%以上,6-BA 处理萌芽率显著低于 ZT 处理。由此可知,对芫花的外植体的初代培养细胞分裂素采用 ZT,对芫花茎段外植体芽萌发的促进效

果显著优于 6-BA。在不同生长调节剂配方处理中,MS+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L ZT 处理对芫花茎段外植体芽萌发效果显著优于其他处理,萌发率达到 92.2%。

表 3 6-BA 与 ZT 质量浓度对芫花茎段初代培养的影响			
处理	萌发率/ %	玻璃化率/ %	萌芽均高/ cm
MS+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA	34.4 c	52.2 bc	0.66 bc
MS+0.2 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA	22.2 d	68.9 b	0.27 c
MS+0.2 mg/L NAA+5.0 mg/L 6-BA	16.7 d	90.0 a	0.20 c
MS+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L ZT	82.2 b	17.8 d	1.67 a
MS+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L ZT	92.2 a	22.3 d	2.13 a
MS+0.1 mg/L NAA+2.0 mg/L ZT	74.4 b	42.2 c	1.06 b
同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)			

6-BA 与 ZT 不同质量浓度处理芫花茎段外植体,对玻璃化率的影响结果表明,随着细胞分裂素 6-BA 与 ZT 质量浓度升高,芫花茎段外植体初代培养玻璃化现象逐渐加剧。6-BA 处理玻璃化率在 52.2%以上,ZT 处理玻璃化率在 42.2%以下,6-BA 处理玻璃化率显著高于 ZT 处理。在不同生长调节剂配方处理中,MS+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L ZT 处理与 MS+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L ZT 处理,对芫花茎段外植体初代培养中减少玻璃化现象显著优于其他处理,玻璃化率小于 22.3%。

6-BA 与 ZT 不同质量浓度处理芫花茎段外植体,对萌芽平均高度的影响结果表明,6-BA 处理萌芽均高在 0.66 cm 以下,ZT 处理萌芽均高在 1.06 cm 以上,6-BA 处理萌芽均高显著低于 ZT 处理。在不同生长调节剂配方处理中,MS+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L ZT 处理与 MS+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L ZT 处理,对芫花茎段外植体初代培养中萌芽平均高度显著优于其他处理,萌芽均高分别为 1.67 cm 和 2.13 cm。

综合分析萌发率、玻璃化率与萌芽均高的试验结果可知,芫花茎段外植体初代培养诱导丛生芽的最佳配方为 MS+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L ZT,其萌发率为 92.2%,玻璃化率为 22.3%,萌芽均高为 2.13 cm。

芫花茎段外植体诱导丛生芽,不同历时的生长

情况见图 1。

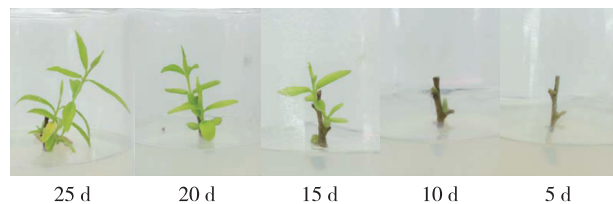


图 1 芫花茎段外植体初代培养生长情况

3 结论与讨论

综上所述,芫花茎段外植体的最佳消毒方法,为预处理采用洗衣粉液浸泡 20 min,用流水冲洗 12 h;消毒采用 75%乙醇 30 s+0.1%升汞吐温 80 混合溶液 12 min 处理,其污染率为 57.8%,死亡率为 13.3%,存活率为 28.9%。芫花茎段外植体初代培养诱导丛生芽的最佳配方为 MS+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L ZT,其萌发率为 92.2%,玻璃化率为 22.3%,萌芽均高为 2.13 cm。

植物组织培养过程中,外植体带菌是最主要的污染来源^[21]。外植体体表被毛或表面粗糙则消毒困难,采用乙醇、升汞等杀菌剂消毒,消毒时间短则污染率高,延长消毒时间则会导致外植体中毒致死加剧^[22]。消毒预处理过程中,外植体采用流水冲洗有助于去除附着在体表组织的污物,在消毒溶液中添加表面活性剂吐温,有助于杀菌剂浸润外植体表面,进而提高杀菌效果^[23]。芫花茎段外植体消毒效果试验表明,预处理增加流水冲洗环节,升汞消毒添加吐温 80,是提高其外植体消毒效果的有效途径。这与芫花新梢表面密被茸毛、污染物不易清洁的特性相关。

植物体细胞具有全能性,实践中愈伤组织能否表达其全能性,进而产生丛生芽具有不确定性。本试验采用芫花茎段外植体,诱导丛生芽的初代组织培养方法,较张恒基等采用腋芽外植体脱分化形成愈伤组织^[24],进一步诱导丛生芽的培养方法更为便捷。2 种方法研究思路不同,可互为补充。

植株生长发育过程与植株的内源和外源激素种类、含量及配比等有密切关系^[25]。植物对于不同外源激素的响应成因复杂。本试验芫花茎段外植体的初代培养中,细胞分裂素 ZT 对芫花茎段芽萌发与生长的促进效果明显优于 6-BA,这一结论与张恒基等对芫花愈伤组织分化成芽和不定芽增殖试

验研究结论相似^[24]。这一结果表明,芫花茎段外植体组织培养时,在芽的分化、萌发、长成阶段,ZT 作为外源激素具有重要促进作用,6-BA 不可替代其作用。

植物组织培养过程的玻璃化苗发生百分率和细胞分裂素成正相关,其中 6-BA 的影响大于 ZT 和 KT^[26]。本试验中,6-BA 较 ZT 更容易导致芫花试管苗的玻璃化现象,这一结论与陈兵先等结论相一致^[26]。本试验中,ZT 的质量浓度为 1.0—1.5 mg/L,其玻璃化率维持在 17.8%—22.3%之间;ZT 的质量浓度达到 2.0 mg/L 时,玻璃化率升高至 42.2%,显著高于 ZT 其他处理。从本试验结果看,芫花茎段外植体组织培养中,ZT 质量浓度应限制在 2.0 mg/L 以下。

张慧君等研究认为,植物的外源激素须通过对内源激素的调节,来控制器官的生长发育,各种植物生长物质的水平,都通过影响植物外植体的基因表达而引起器官分化^[27]。芫花组织培养休眠芽的萌发、愈伤组织分化成芽、成枝的过程中,外源激素如何影响内源激素,进而完成形态构成的机理,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1999,52(1):336.
- [2] 江苏省植物研究所.江苏植物志[M].南京:江苏科学技术出版社,1982.
- [3] 田朝阳,胡颖,郭二辉,等.河南野生木本紫花观赏植物资源调查分析[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(2):134-142.
- [4] 国家药典委员会.中国药典(一部)[S].北京:化学工业出版社,2010:148.
- [5] 韩伟,徐子芳,宋小妹,等.芫花药材物质基础研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):46-49.
- [6] 万少侠,雷超群.野生芫花植物调查与防治林木蛀干害虫技术研究[C]//河南省第四届青年学术年会论文集(下册).2004:1240-1243.
- [7] 刘芳.芫花居群遗传多样性分析及保护策略[D].南京:南京林业大学,2011.
- [8] 李玲芝,宋少江,高品一.芫花的化学成分及药理作用研究进展[J].沈阳药科大学学报,2007,24(9):587-592.
- [9] 孙倩,武洁,李菲菲,等.芫花化学成分的分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2014,32(2):94.
- [10] 王彩芳,胡晓娟,谢松海.芫花叶的黄酮类化学成分分析[J].郑州大学学报(医学版),2003,38(1):107-108.

(下转第 53 页)

- [5] 王 勇,刘蓉蓉,龙安燕,等.黔东南州引种油用牡丹栽培研究初报[J].种子, 2015, 34(2):105-106.
- [6] 王仲伟,王欢利,张文献,等.江苏油用牡丹的发展思考[J].江苏林业科技, 2016, 43(6):53-55.
- [7] 冯汉宇,江 颖,张立全,等.油用牡丹‘凤丹’在北京引种栽培研究初报[J].中国农学通报, 2018, 34(4):65-70.
- [8] 杲承荣,窦 霄,卢 洁,等.油用牡丹结实状况调查[J].河北林业科技, 2016(1):53-54.
- [9] 李晓储,陈厚照,薄壳山核桃资源在华东地区开发利用的调查研究[J].江苏林业科技, 2013, 40(1):1-6.
- [10] 王晓静,马慧丽,郭丽丽,等.种植密度对油用牡丹‘凤丹’形态性状和产量的影响[J].北方园艺, 2018(3):101-108.
- [11] 张忠河.菏泽牡丹的品种优选和培育技术研究[D].南京:南京林业大学, 2007.
- [12] 崔虎亮,黄弄璋,闫海川,等.油用牡丹单株产量和主要表型性状的相关性[J].华南农业大学学报, 2017, 38(2):86-91.
- [13] 朱恒星,唐佳佳,戴前莉,等.油用牡丹良种‘凤丹’引种栽培观察[J].南方农业, 2016, 10(1):10-12.
- [14] 杨楠楠.菏泽油用牡丹产业发展综合效益评价研究[D].北京:北京林业大学, 2015.

(上接第32页)

- [11] 章丹丹,凌 霜,张洪平.芫花总黄酮的抗炎机制研究[J].上海中医药杂志, 2010, 44(8):58-62.
- [12] 魏志文,高晓雯,郑维发.芫花根总黄酮抗肿瘤活性研究[J].解放军药科学报, 2008, 24(2):116-120.
- [13] PARK B Y, OH S R, AHN K S, et al. (-)-Syringaresinol inhibits proliferation of human promyelocytic HL-60 leukemia cells via G1 arrest and apoptosis [J]. International Immunopharmacology, 2008, 8(7): 967-973.
- [14] PARK B Y, MIN B S, AHN K S, et al. Daphnane diterpene esters isolated from flower buds of *Daphne genkwa* induce apoptosis in human myelocytic HL-60 cells and suppress tumor growth in Lewis lung carcinoma (LLC)-inoculated mouse model[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 111(3):496-503.
- [15] 万少侠,张立峰.应用野生芫花防治林木蛀干害虫技术[J].中国森林病虫, 2005, 24(2):29.
- [16] 邓天福,莫建初,王问学.芫花活性物质对鳞翅目幼虫取食的影响[J].江苏农业科学, 2004(6):70-71.
- [17] 莫建初,刘志茹,王 海,等.芫花杀虫活性成分的结构鉴定[J].中南林学院学报, 2001, 21(4):5-10.
- [18] 吴铁青.使用天然抗菌化合物保护作物[J].农药译丛, 1996, 18(3):9-12.
- [19] 朱红霞,胡林峰,郑海瑛,等.芫花乙醇提取物抑菌活性初步研究[J].广东农业科学, 2011(6):84-85.
- [20] 董春玲,高政平.新花卉作物芫花的开发利用初探[J].北方园艺, 2010(17):83-85.
- [21] 周俊辉,李宏彬,杨耀强,等.植物组织培养中污染的鉴定与防止初步研究[J].微生物学杂志, 2002, 22(2):53-55.
- [22] 胡 凯,张立军,白雪梅,等.植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒[J].安徽农业科学, 2007, 35(3):680-681.
- [23] 华晓琴,刘高亮,张庆辉,等.大巴山粉葛组织培养技术[J].浙江农业学报, 2016, 28(7):1108-1114.
- [24] 张恒基,柏新富,刘林德.芫花愈伤组织的分化与植株再生[J].林业科技, 2009, 34(4):78-81.
- [25] CENTENO M L, RODRIGUEZ A, FEITO I, et al. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures[J]. Plant Cell Reports, 1996, 16(1/2): 58-62.
- [26] 陈兵先,黄宝灵,吕成群,等.植物组织培养试管苗玻璃化现象研究进展[J].林业科技开发, 2011, 25(1):1-5.
- [27] 张慧君,陈劲枫.植物组织培养生理机制的研究进展[J].江苏农业科学, 2015, 43(3):33-35.