

金雀花组织培养与快繁

陈家龙, 朱建军, 吴秀水, 余宏傲

(温州科技职业学院 园林系, 浙江 温州 325006)

摘要: 以金雀花 *Caragana sinica* 茎段为材料, 通过不同植物生长调节物质种类和质量浓度进行单因素设计, 建立金雀花的组织培养再生体系, 为金雀花的组织快繁提供技术指导。结果表明: 用 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化汞 (HgCl_2) 浸泡灭菌 10 min 为宜; 初代培养宜选用培养基 MS(Murashige and Skoog)+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-苄基腺嘌呤 (6-BA)+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 莓乙酸 (NAA); 最佳增殖培养基为 MS 中添加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯基噻二唑基脲 (TDZ), 诱导形成 5~6 个丛生芽, 将嫩茎接种在添加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基中, 生根率为 86.7%。图 1 表 3 参 11

关键词: 园艺学; 金雀花; 组织培养; 快繁

中图分类号: S604

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2013)-04-0611-04

Tissue culture and rapid propagation of *Caragana sinica*

CHEN Jialong, ZHU Jianjun, WU Xiushui, YU Hong'ao

(Faculty of Landscape Architecture, Wenzhou Vocational College of Science & Technology, Wenzhou 325006, Zhejiang, China)

Abstract: *Caragana sinica* is a edible flower, having good market demand. This aim is to establish a efficient tissue culture system for its commercial propagation. The stem was taken as the explants, this experiment adopted the single factor experimental design, the effects of different plant growth regulator treatments on various processes of tissue culture were studied. Results were as follows: the optimal sterilization method for the explant was dipping in $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ HgCl_2 for about 10 min. The contamination rate (36.7%) and browning rate (16.7%) were better than other treatments. The Murashige and Skoog (MS) culture media containing $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-benzyladenine (BA) + $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ α -naphthalene acetic acid (NAA) was suitable for the initial culture, the induction rate was 60.0% ($P<0.05$) . For proliferation, the optimal medium was MS supplemented with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ thidiazuron (TDZ) with 5~6 clustered buds being induced, the multiplication rate could reach 4.5 ($P<0.05$). When shoots were inoculated with MS supplemented with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, the rooting rate was up to 86.7%. The results could provide technical guidance for large-scale micropropagation of *Caragana sinica*. [Ch, 1 fig. 3 tab. 11 ref.]

Key words: horticulture; *Caragana sinica*; tissue culture; rapid propagation

金雀花 *Caragana sinica* 属豆科 Leguminosae 锦鸡儿属 *Caragana*, 茎直立或多数丛生, 小叶 2 对, 羽状排列或似簇生, 托叶三角形, 硬化成针刺状, 花单生叶腋^[1], 花冠黄色带红晕, 如飞鸟状, 甚是有趣, 花期 3~5 月; 根补血、活血、祛风; 花滋阴活血、健脾、祛风止咳。云南、江西、安徽、浙江等山区居民采食其花作为特色山珍。是一种兼具保健、食用和观赏功能的乡土花卉。由于近年来绿色食品和食花文化的兴起, 对金雀花及其种苗需求与日俱增, 而金雀花因人为采摘花朵及环境影响等导致其结实率低, 且分株和扦插繁殖系数也低, 无法满足市场需求。目前, 对金雀花的研究主要集中食用价值、药物成分和栽培管理报道^[2~5], 但对于金雀花及其同属植物组织培养的报道^[6~8]相对较少, 且繁殖系数低和

收稿日期: 2012-05-28; 修回日期: 2013-01-07

基金项目: 温州市农业科技资助项目(N20120012)

作者简介: 陈家龙, 讲师, 从事花卉生产与应用研究。E-mail: tianyoucj@163.com

速度慢。因此,本研究通过苯基噻二唑基脲(thidazuron, TDZ)诱导丛生芽,建立金雀花的组织培养再生体系,以期实现种苗快速繁育,满足地方特色食用花卉产业种苗需求。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料来自温州科技职业学院试验基地2年生的金雀花。于2010年5月,金雀花花后剪取半木质化枝条。

1.2 试验方法

1.2.1 材料灭菌 剪取金雀花生长健壮的枝条,除去叶片和虫病斑,流水冲洗30 min,然后在超净工作台上用体积分数为75%乙醇处理10 s,再用体积分数为0.1%氯化汞灭菌,灭菌时间分5 min,10 min,15 min 3个处理,无菌水冲洗3次。将材料切成带腋芽的长1.0 cm茎段接种到诱导培养基。外植体10个·处理⁻¹,重复3次,30 d时统计污染率。

1.2.2 初代培养 试验采用单因素设计,研究基本培养基对初代培养的影响,基本培养基为MS (Murashige and Skoog)和WPM (woody plant medium),分别添加1.0 mg·L⁻¹的6-苄基腺嘌呤(6-BA)和0.2 mg·L⁻¹萘乙酸(NAA);根据基本培养基对初代培养影响的结果,在基本培养基MS中分别添加0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg·L⁻¹的6-BA,并均添加0.2 mg·L⁻¹NAA,研究不同质量浓度的6-BA对诱导萌发的影响。外植体10个·处理⁻¹,重复3次,30 d时统计萌发率。

1.2.3 增殖培养 ①基本培养基为MS,在培养基中分别添加0.5, 1.0, 1.5 mg·L⁻¹6-BA,并均添加0.1 mg·L⁻¹NAA,研究不同质量浓度的6-BA对增殖的影响。②分别添加0.5 mg·L⁻¹不同细胞分裂素6-BA,玉米素(ZT),苯基噻二唑基脲(TDZ),并均添加0.1 mg·L⁻¹NAA,研究不同种类细胞分裂素对增殖的影响。外植体10个·处理⁻¹,重复3次,30 d时统计增殖系数。增殖系数=增殖后的总芽数/接种芽数。

1.2.4 生根培养 在MS培养基中分别添加0.2, 0.5, 1.0 mg·L⁻¹NAA,研究不同质量浓度的NAA对生根的影响。外植体10个·处理⁻¹,重复3次,30 d时统计生根率。生根率=(生根芽数/接种芽数)×100%。培养条件:培养容器为240.0 mL组培玻璃瓶,分装培养基35 mL·瓶⁻¹,除生根培养基添加25.0 g·L⁻¹蔗糖,其余添加30.0 g·L⁻¹蔗糖。均加6.0 g·L⁻¹琼脂,pH 5.8。培养温度为(25±2)℃,光照时间为12 h·d⁻¹,光照强度为2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对污染率的影响

用体积分数为0.1%氯化汞溶液灭菌5 min,污染率达80.0%,灭菌时间延长,污染率减少,但褐化率增加,当灭菌时间达到15 min时,接种茎段容易受到伤害而褐化死亡,可能是外植体茎段受到汞离子的毒害而死亡,因此适宜灭菌时间为10 min。

2.2 不同基本培养基对茎段腋芽萌发诱导影响

用体积分数为0.1%氯化汞灭菌10 min,将材料切成带腋芽的长1.0 cm的茎段接种到不同的诱导培养基上,10 d后就可以萌发,30 d后统计萌发率,在MS和WPM上的萌发效果基本相同,平均萌发率分别为46.7%和40.0%,差异不显著。但在WPM上发现小叶有黄化脱落现象,而在MS培养基上生长的芽粗壮,因此,选用MS为诱导培养的基本培养基。

2.3 不同质量浓度6-BA对茎段腋芽萌发诱导影响

在不同质量浓度6-BA下,初代培养均能萌发(表1),在0.1 mg·L⁻¹时,萌发率为33.3%,随着6-BA质量浓度的增加,萌发率逐渐升高,在2.0 mg·L⁻¹时,萌发率为60.0%,且芽长势好(图1-a)。

2.4 不同质量浓度6-BA对无菌苗增殖的影响

将诱导的腋芽新梢切下,转接到增殖培养基上(表1)。无菌苗随着6-BA质量浓度的增加,增殖系数呈上升趋势,当6-BA质量浓度达到2.0 mg·L⁻¹时,增殖系数为2.9;在高质量浓度下的生长势比低质量浓度下好,但基部愈合组织增多。总体来说,腋芽伸长缓慢,通过切取腋芽增殖,增殖系数不高。

2.5 不同细胞分裂素对无菌苗增殖的影响

试验结果(表2)表明: 在相同质量浓度 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 情况下, 6-BA对金雀花无菌苗增殖效果最低, ZT的增殖系数比6-BA高, 但两者差异不显著, 并且两者都没有产生丛生芽, TDZ能够促使丛生芽产生, 形成3~6个芽(图1-b), 平均增殖系数为4.5, 且芽粗壮。

2.6 不同质量浓度NAA对无菌苗生根的影响

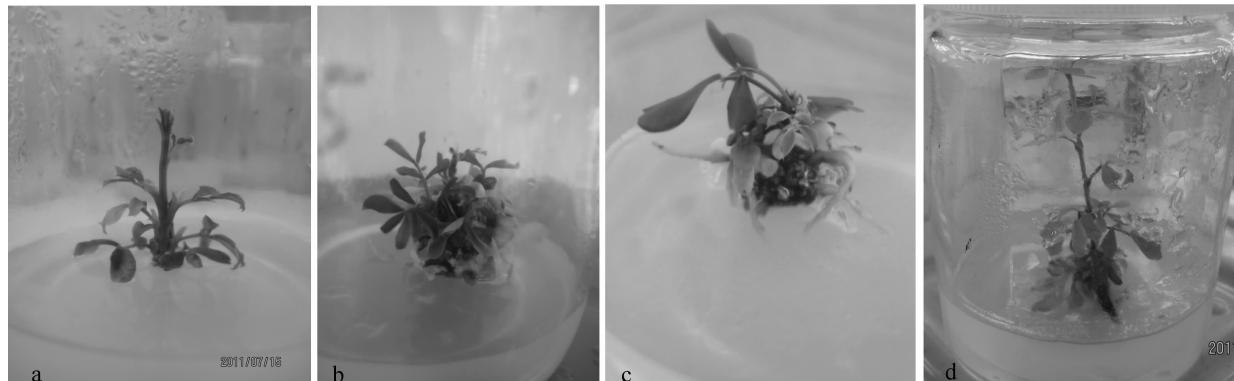
试验结果(表3)表明: 在NAA质量浓度为 $0.2\sim1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 随着质量浓度升高, 生根率上升, 在 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 诱导根系粗壮, 平均根数为3.4条(图1-c)。当NAA为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 也可生根, 但基部形成大量愈合组织, 不利后期生长。

表2 不同细胞分裂素对无菌苗增殖的影响

Table 2 Effects of different kinds of cytokinin on proliferation

细胞分裂素	质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	增殖系数	生长状况
6-BA	0.5	$1.9\pm0.2\text{ b}$	腋芽伸长慢, 无丛生芽
ZT	0.5	$2.6\pm0.1\text{ b}$	长势良好, 无丛生芽
TDZ	0.5	$4.5\pm0.6\text{ a}$	长势良好, 形成丛生芽

说明: 同列不同小写字母代表在0.05水平差异显著。



a. $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA下茎段腋芽萌发诱导情况, b. $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ诱导丛生芽, c. $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA下无菌苗生根情况, d. 苗

图1 金雀花组培苗

Figure 1 Tissue culture seedling of *Caragana sinica*

3 结论与讨论

金雀花的组培快繁过程中, 用体积分数为0.1%氯化汞灭菌10 min达到最佳效果。选择合适的基本培养基是组培快繁成功的关键之一, 在WPM上小叶黄化脱落, 可能是无机盐和氮元素等浓度低引起, 本试验表明以MS为基本培养基有利于外植体生长。

本试验表明: 初代培养以MS+ $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA培养基为宜, 可以获得较好的萌发率, 与张军云等^[7]的研究结论一致。在增殖培养过程中, 6-BA的质量浓度在一定范围内增加, 有利于增殖, 与杨成丽等^[8]的研究结果相似; 与张军云等^[7]认为在 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA条件下, 可以获得较高繁殖系数的结论有差异, 可能与不同取材时间等因素有关。因腋芽伸长缓慢, 故以分割腋芽的方式, 增殖系数不高, 可能与金雀花抽枝率低、生长慢的习性有关; 在相同质量浓度 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下, ZT的增殖系数高于6-BA, TDZ增殖效果最强; 据目前仅有的2篇关于金雀花组织培养文献^[7-8]报道, 都是以分切腋芽

表1 不同质量浓度6-BA对茎段腋芽萌发诱导和增殖的影响

Table 1 Effects of different concentrations of 6-BA on propagation

6-BA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	接种数/个	萌发率/%	增殖系数
0.1	10	$33.3\pm0.06\text{ b}$	
0.5	10	$36.7\pm0.06\text{ b}$	$1.9\pm0.17\text{ b}$
1.0	10	$46.7\pm0.12\text{ ab}$	$2.6\pm0.26\text{ a}$
2.0	10	$60.0\pm0.10\text{ a}$	$2.9\pm0.17\text{ a}$

说明: 同列不同小写字母代表在0.05水平差异显著。

表3 不同质量浓度的NAA对生根的影响

Table 3 Effects of different concentrations of NAA on rooting

NAA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	生根率/%	平均根数/条
0.2	$0.07\pm0.05\text{ b}$	1.5
0.5	$80.0\pm0.17\text{ a}$	3.4
1.0	$86.7\pm0.15\text{ a}$	2.7

说明: 同列不同小写字母代表在0.05水平差异显著。

的方式,没有形成从生芽,繁殖系数低,速度慢,增殖系数是影响快速繁殖的关键指标之一。本试验通过TDZ成功诱导了丛生芽,通过丛生芽发生途径进行增殖,增殖系数可达4.5。证实了TDZ在组织培养中有利于打破顶端优势,形成丛生芽并增殖的结论^[9-11],但质量浓度过高反而抑制芽的再生,导致芽苗质量差等现象^[10]。生根以MS基本培养基中添加0.5 mg·L⁻¹NAA生根效果最好,也表明了多数豆科植物使用NAA具有较好的生根效果。在试验过程中,添加赤霉素(GA₃)对腋芽伸长效果不明显;转接时间相隔不能太久,否则易老化,不利生长。

参考文献:

- [1] 韦直,何业祺.浙江植物志:第3卷[M].杭州:浙江科学技术出版社,1993: 317.
- [2] 张小玲,薛庆中,金川.金雀花营养成分分析[J].园艺学报,2004,31(4): 504.
ZHANG Xiaoling, XUE Qingzhong, JIN Chuan. Nutrition ingredient analysis of *Caragana sinica* [J]. *Acta Hortic Sin*, 2004, 31(4): 504.
- [3] 樊建,赵天瑞,李永生,等.野生金雀花营养成分研究[J].昆明理工大学报:理工版,2006,31(2): 97-99.
FAN Jian, ZHAO Tianrui, LI Yongsheng, 等. Study on the nutritional components of wild *Caragana chinensis* [J]. *J Kunming Univ Sci Technol*, 2006, 31(2): 97-99.
- [4] 张小玲.温州食用花卉资源的开发利用[D].杭州:浙江大学,2004: 18.
ZHANG Xiaoling. *Utilizate of Edible Flower Resources in Wenzhou* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004: 18.
- [5] MA Dayou, LUO Hongfeng, HU Changqi. Three stilbene tetramers from the roots of *Caragana sinica* [J]. *Chin J Chem*, 2004, 22(2): 207-211.
- [6] 宋俊双,王贊,孙桂芝.柠条锦鸡儿的组织培养[J].草地学报,2007,15(1): 66-70.
SONG Junshuang, WANG Zan, SUN Guizhi. Study on the tissue culture of *Horqin peashrub* [J]. *Acta Agrestia Sin*, 2007, 15(1): 66-70.
- [7] 张军云,王文智,李恒.金雀花的茎段培养及繁殖试验初报[J].云南农业科技,2008(1): 33-34.
ZHANG Junyun, WANG Wenzhi, LI Heng. Preliminary exoloration tissue culture and rapid propagation of *Caragana sinica* [J]. *Yunnan Agric Sci Technol*, 2008(1): 33-34.
- [8] 杨成丽,范晓鹃,杨军方,等.金雀花的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2007,43(5): 1130.
YANG Chengli, FAN Xiaojuan, YANG Junfang, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Caragana sinica* [J]. *Plant Physiol Commun*, 2007, 43(5): 1130.
- [9] 杨海芸,桂仁意,汤定钦,等.菲白竹组织培养技术[J].浙江林学院学报,2008,25(2): 255-258.
YANG Haiyun, GUI Renyi, TANG Dingqin, et al. Micropropagation of *Sasa fortunei* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2008, 25(2): 255-258.
- [10] 徐涌,孙骏威,陈珍.不同植物生长调节物质处理对吴茱萸组织培养的影响[J].浙江农林大学学报,2011,28(3): 500-504.
XU Yong, SUN Junwei, et al. Plant growth regulator treatments for a tissue culture of *Euodia rutaecarpa* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2011, 28(3): 500-504.
- [11] 徐晓峰,黄学林.TDZ:1种有效的植物生长调节剂[J].植物学通报,2003,20(2): 227-237.
XU Xiaofeng, HUANG Xuelin. TDZ: the efficacious plant growth regulator [J]. *Chin Bull Bot*, 2003, 20(2): 227-237.