

特色观赏植物江南牡丹草组培快繁体系初探

王钰垚^{1#}, 孔思梦^{2,3#}, 刘欢^{2,3}, 来水方¹, 陈丹维¹, 夏国华^{2,3}, 金玉婷¹, 钟泰林^{1*}

¹浙江树人学院城建学院 浙江绍兴

²浙江农林大学林业与生物技术学院 浙江杭州

³浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室 浙江杭州

【摘要】为了加快扩大特色观赏植物江南牡丹草 *Gymnospermium kiangnanense* 繁殖速度, 增加资源数量, 更好发挥其药用和园艺观赏应用价值。以江南牡丹草种胚为外植体, 采用植物组织培养的方式培育江南牡丹草, 探究种胚的无菌萌发和生根壮苗, 建立无菌育苗体系, 实现快速、高效地繁育出质量稳定的种苗。1.5% NaClO 消毒 15 min 为江南牡丹草种子最佳消毒时间; MS + 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg · L⁻¹ KT 为江南牡丹草种胚最佳启动培养基; 活性炭可促进江南牡丹草胚根生长, 提高种胚成苗率。本研究建立的江南牡丹草种胚组培快繁体系, 对江南牡丹草野生资源保护和开发利用具有重要意义。

【关键词】江南牡丹草; 特色观赏植物; 无菌萌发; 组织培养

【基金项目】浙江省基础公益研究计划项目(LGN21C160015); 浙江树人学院预研基金项目(2020R004)

【收稿日期】2023 年 7 月 12 日 **【出刊日期】**2023 年 8 月 24 日 **【DOI】**10.12208/j.jafs.20230019

Rapid propagation of a characteristic ornamental plant *Gymnospermium kiangnanense* by tissue culture

Yuyao Wang^{1#}, Simong Kong^{2,3#}, Huan Liu^{2,3}, Shuifang Lai¹, Danwei Chen¹, Guohua Xia^{2,3}, Yuting Jin¹, Tailin Zhong^{1*}

¹School of Urban Construction, Zhejiang Shuren University, Shaoxing, Zhejiang

²School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Hangzhou, Zhejiang

³State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang

【Abstract】 In order to accelerate the characteristic ornamental plant *Gymnospermium kiangnanense* reproduction speed, increase the number of resources, and better exert its medicinal and ornamental application value. The seed embryo of *G. kiangnanense* was used as the explant, and the tissue culture method was used to cultivate the *G. kiangnanense*. The sterile germination and rooting of the embryo were investigated, and the sterile seedling system was established to realize the rapid and efficient breeding of stable quality seedlings. The results showed that the best sterilization treatments of *G. kiangnanense* seeds were 1.5% NaClO disinfectant for 15 min; The best starting medium for the embryos of *G. kiangnanense* was MS basal medium supplemental with 1.0 mg/L 6-BA、0.5 mg/L KT; Activated carbon could promoted the radicle growth of *G. kiangnanense* and improve the seedling rate of seed embryos. This study has initially established a plant tissue culture and rapid propagation system of *G. kiangnanense* seed embryos, which provides great significance to the protection and rapid development of *G. kiangnanense* wild resources.

【Keywords】 *Gymnospermium kiangnanense*; Characteristic ornamental plant; Aseptic germination; Tissue culture

江南牡丹草 *Gymnospermium kiangnanense* (P. L. Chiu) Lecomte 是小檗科 Berberidaceae 牡丹草属

Gymnospermium 的一种早春开花的特色观赏植物, 别名江南玄胡, 其块茎可入药, 有清热解毒、活血化

第一作者简介: 王钰垚, 从事风景园林植物应用研究;

*同等贡献作者: 王钰垚, 孔思梦;

*通讯作者: 钟泰林, 469191328@qq.com, 主要从事特色观赏植物资源品质评价与利用。

瘵功效, 用于治疗许多病症, 有较高药用价值^[1,2]。该植物花朵色彩明亮, 开花集中且花期较长, 具有极高的观赏价值^[3]。江南牡丹草仅在少部分地区可见, 主要分布在浙江西北部、安徽皖南山区及江苏西南部^[2,4]。因具有药用价值易被破坏性挖掘, 野生资源非常珍贵, 被列入浙江省重点保护植物目录^[5]。国内外江南牡丹草的研究集中为临床研究以及化学成分的提取分析等^[6-9], 而对其离体快繁方面报道稀少。组织培养技术具有繁殖速度快、保持品种的优良特性以及获得脱毒苗等优点^[10,11], 因此需要加强对江南牡丹草离体快繁技术的研究, 为该植物的繁殖和保护利用提供资料。本研究以江南牡丹草种胚作为外植体, 探索江南牡丹草有效的繁殖方式, 以期江南牡丹草种胚的组织培养快繁方式提供一定的参考价值, 并为今后药用开发、园艺观赏应用提供更多基础性研究资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料均取自浙江省杭州市临安区浙江农林大学药用植物园 (30.26°N, 119.73°E), 选择成熟饱满的江南牡丹草种子, 种子的胚, 见图 1 所示。

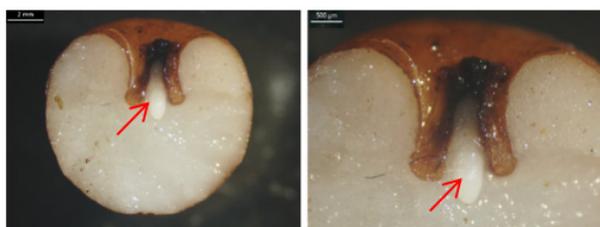


图 1 江南牡丹草种子纵切图

注: 红色箭头处为健康的种胚

1.2 实验仪器及药品

Murashige & Skoog 培养基 (MS) 粉末 M519 (Phyto Technology Laboratories) 使用浓度 $4.43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 4°C 储存。6-苄氨基嘌呤 (6-Benzylaminopurine 6-BA, sigma): 母液浓度 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每 100 mg 6-BA 粉末使用 1 mL 1 M KOH 助溶后用 AOA 水定容, 母液 4°C 保存。激动素 (kinetin KT, sigma): 母液浓度 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每 100 mg 6-BA 粉末使用 1 mL 1 M KOH 助溶后用 AOA 水定容, 母液 4°C 保存。活性炭 (Activated carbon, sigma): 培养基调节 pH 后加入。

体式荧光显微镜 (Stereo D13covery V12, 德国)。

1.3 试验方法

(1) 外植体消毒

江南牡丹草种子用自来水洗净, 洗衣粉浸洗 20 min, 流水冲洗 2 h, 于超净工作台中 75% 酒精浸泡 30 s, 1.5% 次氯酸钠对江南牡丹草种子进行不同时间的浸泡消毒, 消毒时间设 10、15、20 min 3 个处理, 之后用无菌水清洗 5—6 遍, 于显微镜下取出种胚, 置于 MS 培养基中无菌培养。试验共 3 个处理, 每个处理 30 粒种胚, 3 次重复, 统计污染数和成苗数。

(2) 江南牡丹草种胚萌发的启动培养

以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA (6-benzyl aminopurine) 和 KT (Kinetin) 进行启动培养, 探究细胞分裂素对江南牡丹草种胚的萌发和成苗的影响。6-BA 和 KT 的浓度设计见表 1, 共 6 个处理, 每个处理 30 粒种胚, 重复 3 次, 统计萌发数和成苗数。

表 1 不同浓度 6-BA 和 KT 培养基组合

编号	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	KT ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	0.5	0.5
2	1.0	0.5
3	2.0	0.5
4	0.5	1.0
5	1.0	1.0
6	2.0	1.0

(3) 江南牡丹草壮根及移栽

以 MS 为基本培养基, 进行添加及未添加 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭 (activated carbon, AC) 2 个处理 (注: 未添加植物生长调节剂, 以排除其对江南牡丹草胚根或成苗生长干扰), 探究 AC 对江南牡丹草成苗以及根生长的影响。每个处理 30 粒种胚, 重复 3 次, 统计成苗数和根生长状态。

选择根数多、根系健壮的江南牡丹草试管苗, 打开培养瓶封口在室内放置 7 d 后, 将其从培养瓶中取出, 用清水将根系上附着的培养基冲洗干净, 移栽到装有适宜湿度基质的穴盘中; 移栽选用珍珠岩和泥炭土等比例混合的基质, 基质在移栽前应高温高压灭菌; 移栽后置于驯化室内进行管理。

(4) 数据处理与分析

采用 Excel 2016 和 SPSS 24.0 软件对所得数据进行统计、作图及方差分析和多重比较分析 (Duncan's 法)。萌发率、污染率、成苗率及生根率公式计算如下: 种胚萌发率=(种胚萌发数/种胚总数)×100%; 种胚污染率=(种胚萌发污染的个数/种胚总数)×100%; 种胚成苗率=(种胚成苗数)/种胚总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时长对江南牡丹草种胚污染率及成苗率的影响

见图 2 可知, 江南牡丹草种胚污染率随次氯酸钠消毒时间延长, 呈下降趋势, 成苗率呈先升高后下降趋势。当次氯酸钠消毒时间为 10 min 时, 种胚污染现象最严重, 基本无法正常成苗, 污染率高达 81.7%, 成苗率仅为 11.7%。随着消毒时间延长, 种胚污染率显著降低, 消毒时间为 15 min 时, 污染率为 13.3%, 成苗率显著高于其他 2 组, 为 71.7%。当次氯酸钠消毒时间为 20 min 时, 污染率最低, 为 3.3%, 成苗率显著低于消毒时间为 15 min 处理, 为 13.3%。综合考虑污染率及成苗率, 本试验最合适的消毒时间为 1.5%次氯酸钠消毒 15 min。

2.2 不同浓度 6-BA 和 KT 对江南牡丹草种胚萌发的影响

由表 2 可知, 不同浓度 6-BA 和 KT 对江南牡丹草种胚萌发和成苗具有显著影响。添加 0.5 mg/LKT 的培养基萌发率及成苗率显著高于 1.0 mg/LKT, KT 浓度为 1.0 mg/L 时, 随着培养基中 6-BA 浓度的升高, 江南牡丹草种胚萌发率整体呈先上升后下降的趋势, 表现出并非浓度越高种胚萌发率就越高的现象。在相同 6-BA 质量浓度水平下, 随着 KT 质量浓度的升高, 种胚萌发率表现出下降趋势。试验发现种胚萌发率均在 71.5%以上, 最高达 96.3%, 且在 0.5 mg/L 6-BA 与 1.0 mg/L KT 启动培养基中的种胚萌发率呈显著性差异。本试验得出江南牡丹草种胚的最佳启动培养基为: MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT, 此组合的成苗率最高, 达 89.3%, 与其他实验组合均差异显著。

2.3 活性炭对江南牡丹草成苗的影响

见表 3 可知, 以 MS 为基本培养基, 添加和未添加 2.0 g/L AC 2 个处理, 江南牡丹草种胚均能正常成苗, 成苗率为 65~79%。未添加 AC 时, 成苗率较低, 约为 65%, 根细长, 根的数量少且长度较短, 并且幼苗出现了发黄和干枯的现象; 添加 AC 时, 成苗率升高, 约为 79%, 根的数量多且长度较长, 并且幼苗生长状态良好。因此添加 2.0 g·L⁻¹ AC, 可以提高成苗率, 此时根数多, 根系发达, 幼苗长势较好, 这更有利于后续江南牡丹草试管苗的驯化移栽。

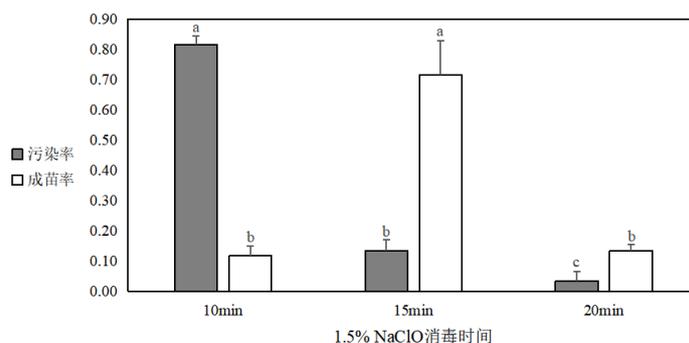


图 2 1.5% NaClO 不同消毒时间对江南牡丹草种胚污染率及成苗率的影响

表 2 不同浓度 6-BA 和 KT 对江南牡丹草种胚萌发的影响

编号	6-BA (mg·L ⁻¹)	KT (mg·L ⁻¹)	萌发率 (%)	成苗率 (%)
1	0.5	0.5	82.2±5.9a	50.0±5.6 b
2	1	0.5	96.3±6.4 a	89.3±0.6 a
3	2	0.5	96.3±6.4 a	55.2±5.0 b
4	0.5	1.0	71.5±5.7 b	17.8±5.9 d
5	1	1.0	75.9±7.6 b	31.9±9.0 c
6	2	1.0	74.3±3.9 b	26.1±6.7 c

注: 数据为平均数±标准差, 表中同列数据无相同小写字母表示差异显著 (*P<0.05)

表 3 2.0 g/L AC 对江南牡丹草成苗的影响

编号	活性炭 ($2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)	成苗率 (%)	生长状况
1	有	79.0±1.6	根多, 长
2	无	65.0±2.9	根少, 短

2.4 江南牡丹草的驯化移栽

选择根系健壮的试管苗, 如图 3 所示, 将其移栽至珍珠岩和泥炭土等比例混合基质的盆钵中, 经过 15 d 的栽培管理, 试管苗移栽成活率达 96.36%, 植株生长状态良好, 如图 4 所示。



图 3 根系健壮的试管苗



图 4 移栽炼苗

3 讨论

在组织培养过程中, 外植体消毒试验是常见的环节, 研究中常用的消毒剂有 NaClO 、 H_2O_2 、 HgCl_2 等。如党参 (*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.)、掌叶大黄 (*Rheum palmatum* Linn.) 种子经 75% 酒精预处理 20 s, 2% NaClO 浸种 20 min, 可以有效地降低种子带菌率^[12, 13]。本试验采用 75% 酒精预处理江南牡丹草种子 30 s, 以 1.5% NaClO 处理时间为变量, 得出江南牡丹草种子最佳的消毒时间为 1.5%

NaClO 消毒 15 min。本试验筛选的消毒时间能有效地控制污染, 保持江南牡丹草种胚的活力, 获得大量的无菌苗。

已研究表明, 低浓度的细胞分裂素 (6-BA 或 KT) 对独蒜兰 (*Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe) 种子萌发有良好的促进作用^[14], 付丽在以甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 带芽茎段诱导丛生芽研究中, 适宜的 6-BA 浓度可显著促进丛生芽的形成, 高浓度的 6-BA 对芽生长有抑制作用, 在 6-BA 和 KT 组合中发现, 随着 KT 浓度的逐渐升高, 丛生芽增殖倍数有下降趋势^[15]。在不同浓度 6-BA 和 KT 对江南牡丹草种胚萌发的研究中, 与付丽有相似的结果。本试验仅初步探究了细胞分裂素 6-BA 和 KT 对江南牡丹草种胚萌发率和成苗率的影响, 得出江南牡丹草种胚的最佳启动培养基为: $\text{MS} + 1.0 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg/L } \text{KT}$, 此组合能有效的提高萌发率及成苗率。但是启动培养基为: $\text{MS} + 0.5 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 1.0 \text{ mg/L } \text{KT}$ 时, KT 的浓度高于 6-BA, 萌发率和成苗率显著下降, 可见只有添加适量配比的细胞分裂素才有利于江南牡丹草种胚的萌发及成苗。

目前对组培技术的研究不仅局限于植物生长调节剂, 愈多的研究员开始探究添加物对组织培养的作用。活性炭 (activated carbon, AC) 是组织培养过程常用的物质之一, 它具有较好的吸附能力, AC 在组织培养中对苗的促进作用最早是在 1974 年烟草的花药培养中发现的^[16], 后来活性炭的其他作用陆续被报道, 如为植物提供生根的暗环境, 同时吸附有害物质与植物生长调节物质, 保护培养基中的生长调节物质^[17], 促进根系的生长^[18], 促进试管苗生根^[19-21], 提高成苗率^[22]等。本研究结果表明添加 AC 可以提高江南牡丹草种胚成苗率以及生根状态, 为江南牡丹草的组织培养技术提供参考。

4 结论

1.5% NaClO 的消毒时间和 6-BA、KT 的浓度配比是影响江南牡丹草种胚无菌萌发的关键因素, 活性炭对江南牡丹草种胚的成苗和生根有重要作用。

本试验结果表明江南牡丹草种子最佳的消毒时间为 1.5% NaClO 浸泡 15 min; 江南牡丹草种胚的最佳启动培养基为: MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT; 活性炭可以提高江南牡丹草种胚成苗率以及生根状态。

5 致谢

本研究实施和论文撰写等过程中得到林新春, 林佳凝, 虞钦岚, 叶喜阳, 陈雨非, 陈钊, 黄慧芸, 张瑞萍, 闻丽娜, 徐雯雯、陈怡乐、韦扬华、宋子钊等老师和同学的帮助, 谨表谢意。

参考文献

- [1] 卢振华, 彭丽, 钱军, 等. 江南牡丹草苦参碱抗炎作用实验研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2019, 21(5): 36-38.
- [2] 王景祥. 浙江植物志 (第二卷) [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1992: 316-317.
- [3] 虞钦岚, 刘守赞, 徐韧析, 等. 珍稀濒危植物江南牡丹草种群结构和繁育系统研究[J]. 园艺学报, 2021, 48(3): 539-552.
- [4] 王德群. 民间药物花生三七发现史话[J]. 皖西学院学报, 2018, 34(6): 108-110.
- [5] 浙江省人民政府关于公布省重点保护野生植物名录 (第一批) 的通知 (浙政发[2012]30 号). 2012.4: 3.
- [6] 李保泉, 丁锷, 曹日隆, 等. 江南牡丹草治疗软组织损伤 152 例临床研究[J]. 中国中医骨伤科, 1993, (2): 18-20.
- [7] 廖矛川, 王有为, 肖培根. 江南牡丹草的化学成分研究[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(6): 513-516.
- [8] 刘中本, 芮正祥, 邓先瑜. 江南牡丹草治疗急性软组织损伤的临床研究[J]. 中国中药杂志, 1994, (4): 251-252.
- [9] Song SQ, Zubov D, Comes HP, et al. Plastid Phylogenomics and Plastome Evolution of Nandinoideae (Berberidaceae)[J]. *Frontiers in plant science*, 2022, 13: 1-10.
- [10] 那倩, 韩琳. 浅谈植物组织培养技术及应用[J]. 广东蚕

业, 2021, 55(5): 23-24.

- [11] 叶雯, 袁超群, 秦伟, 等. 火焰南天竹茎段离体培养再生体系的优化[J]. 浙江农林大学学报, 2020, 37(2): 391-396.
- [12] 黑小斌, 李依民, 李欢, 等. 掌叶大黄种子特性研究及无菌培养体系的构建[J]. 中草药, 2019, 50(18): 4430-4437.
- [13] 薛雯心, 魏铁锁, 袁金月, 等. 党参无菌苗培养前种子消毒技术研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(12): 130-131, 135.
- [14] 张燕, 李思锋, 黎斌. 独蒜兰种子无菌萌发过程观察和萌发培养基筛选[J]. 西北农业学报. 2010, 19(01): 136-139.
- [15] 付丽, 张东向, 刘安奇, 等. 不同激素对甘草带芽茎段诱导丛生芽的影响[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(13): 138-142.
- [16] Anagnostakis S. L. Haploid plants from anthers of tobacco - Enhancement with charcoal[J]. *Planta*, 1974, 115(3): 281-283.
- [17] 牛玲, 李杰勤, 刘言龙, 等. SbWus 和 SbBbm 基因与活性炭对高粱转化效率的影响[J]. 安徽科技学院学报, 2021, 35(2): 25-29.
- [18] 王胤, 姚瑞玲. 马尾松优良种源高效组培育苗技术体系构建[J]. 北京林业大学学报, 2020, 42(6): 43-51.
- [19] 丁长春, 王元忠, 黄衡宇, 等. 风兰丛芽高效诱导及植株再生研究[J]. 核农学报, 2020, 34(10): 2209-2218.
- [20] 黄晶, 叶庆生. 金钗石斛原球茎及幼苗快速繁殖体系的构建[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(5): 105-109.
- [21] 陶兴魁, 刘志林, 高贵珍, 等. 蓝莓试管苗组培生根技术研究[J]. 淮北师范大学学报(自然科学版), 2019, 40(1): 68-72.
- [22] 刘桂珍, 梁国平, 王兰岚, 陈正华. 巴西木的组织培养和快速繁殖研究[J]. 园艺学报, 1997, 24(03): 303-304.

版权声明: ©2023 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS