

## 目 录

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 摘 要 .....                  | I   |
| ABSTRACT .....             | III |
| 缩略词表 .....                 | V   |
| 绪 论 .....                  | VII |
| 第一章 文献综述 .....             | 1   |
| 1 植物组织培养研究进展 .....         | 1   |
| 1.1 植物组织培养的基本概念及理论基础 ..... | 1   |
| 1.2 植物组织培养的形态发生途径 .....    | 1   |
| 1.3 植物组织培养的发展 .....        | 1   |
| 2 绣球属植物组培快繁研究进展 .....      | 2   |
| 2.1 外植体的选择 .....           | 2   |
| 2.2 外植体的表面灭菌 .....         | 3   |
| 2.3 基本培养基的选择 .....         | 4   |
| 2.4 植物生长调节剂的影响 .....       | 4   |
| 2.5 炼苗移栽 .....             | 6   |
| 2.6 培养条件 .....             | 7   |
| 3 植物原生质体研究进展 .....         | 7   |
| 3.1 植物原生质体分离的方法 .....      | 7   |
| 3.2 影响植物原生质体产量和活力的因素 ..... | 8   |
| 3.3 植物原生质体的活力检测 .....      | 9   |
| 3.4 植物原生质体的培养 .....        | 10  |
| 4 本试验研究内容、目的与意义 .....      | 10  |
| 4.1 研究内容 .....             | 10  |
| 4.2 目的与意义 .....            | 11  |
| 第二章 大花绣球组培快繁技术研究 .....     | 13  |
| 1 材料与方法 .....              | 13  |
| 1.1 材料 .....               | 13  |

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| 1.2 试剂与器材 .....                  | 14        |
| 1.3 方法 .....                     | 14        |
| 2 结果与分析 .....                    | 17        |
| 2.1 不同处理对外植体表面灭菌效果的影响 .....      | 17        |
| 2.2 不同处理对启动培养的影响 .....           | 19        |
| 2.3 不同处理对增殖培养的影响 .....           | 20        |
| 2.4 不同处理对生根培养的影响 .....           | 22        |
| 2.5 不同基质对组培苗移栽的影响 .....          | 24        |
| 3 讨论与结论 .....                    | 26        |
| 3.1 外植体的表面灭菌 .....               | 26        |
| 3.2 基本培养基的选择 .....               | 27        |
| 3.3 植物生长调节剂对各培养过程的影响 .....       | 27        |
| 3.4 炼苗移栽 .....                   | 28        |
| <b>第三章 圆锥绣球组培快繁技术研究 .....</b>    | <b>31</b> |
| 1 材料与方法 .....                    | 31        |
| 1.1 材料 .....                     | 31        |
| 1.2 试剂与器材 .....                  | 32        |
| 1.3 试验方法 .....                   | 32        |
| 2 结果与分析 .....                    | 35        |
| 2.1 不同处理对外植体表面灭菌效果的影响 .....      | 35        |
| 2.2 不同处理对启动培养的影响 .....           | 36        |
| 2.3 不同处理对增殖培养的影响 .....           | 38        |
| 2.4 不同处理对生根培养的影响 .....           | 40        |
| 2.5 不同基质对组培苗移栽的影响 .....          | 42        |
| 3 讨论与结论 .....                    | 44        |
| 3.1 外植体表面灭菌 .....                | 44        |
| 3.2 基本培养基的选择 .....               | 45        |
| 3.3 植物生长调节剂对各培养过程的影响 .....       | 45        |
| 3.4 炼苗移栽 .....                   | 45        |
| <b>第四章 绣球叶肉细胞原生质体分离与培养 .....</b> | <b>47</b> |
| 1 材料与方法 .....                    | 47        |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 1.1 材料 .....                     | 47 |
| 1.2 方法 .....                     | 48 |
| 2 结果与分析 .....                    | 51 |
| 2.1 不同酶解液组合对绣球原生质体产量及活力的影响 ..... | 51 |
| 2.2 酶解时间对绣球原生质体产量及活力的影响 .....    | 52 |
| 2.3 原生质体的培养 .....                | 53 |
| 3 讨论与结论 .....                    | 55 |
| 3.1 原生质体的分离 .....                | 55 |
| 3.2 原生质体的培养 .....                | 55 |
| 全文结论 .....                       | 57 |
| 创新点 .....                        | 59 |
| 参考文献 .....                       | 61 |
| 攻读学位期间取得的学术成果 .....              | 67 |
| 致 谢 .....                        | 69 |

# 绣球新优品种离体培养与快速繁殖技术研究

## 摘 要

绣球 (*Hydrangea* spp.) 属于虎耳草科绣球属, 在园林绿化和家庭园艺中有重要的作用, 具有较高的观赏、生态、经济价值, 开发应用前景十分广阔。开展绣球属植物的繁育技术研究对其资源开发、保护与应用具有重要意义。与传统的扦插、压条、分株等无性繁殖育苗技术相比, 组织培养技术不仅能够满足种苗周年、批量生产的要求, 还可以为分子植物育种、基因工程等领域奠定基础, 有力地促进绣球属植物的产业化开发与利用。

本研究以大花绣球‘艾薇塔’和圆锥绣球‘花园蕾丝’的带芽茎段为试验材料, 从外植体表面灭菌、启动培养、增殖培养、生根培养、炼苗移栽等多个环节进行试验, 以期建立‘艾薇塔’和‘花园蕾丝’的组培快繁技术; 以大花绣球‘无尽夏’的无菌苗为研究对象, 开展了原生质体分离和培养技术研究, 以期通过原生质体途径实现新品种的快速繁殖, 为绣球属植物规模化、工厂化育苗生产和遗传转化等研究提供技术支持。结果表明:

(1) 大花绣球‘艾薇塔’茎段离体培养时, 外植体最佳表面灭菌方法为 75%乙醇处理 30 s 后, 无菌水冲洗 3~4 次并用有效氯浓度为 2% 的次氯酸钠溶液处理 10 min, 再用无菌水冲洗 4~6 次后用无菌滤纸吸干水分后接种, 污染率可降至 36.7%, 存活率为 53.3%; 最佳启动培养基为  $1/2B5 + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ , 萌芽率最高为 76.7%; 最佳增殖培养基为  $B5 + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ , 增殖系数最大为 6.1; 最佳生根培养基为  $1/2B5 + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ , 培养 20 天时生根率为 100%、平均生根数为 10.17 条/株; 炼苗移栽的最佳基质配比为珍珠岩:泥炭土=1:1 (V:V), 移栽成活率为 100%, 移栽后 30 天幼苗平均株高为 3.70 cm, 平均株幅为 11.92 cm。

(2) 圆锥绣球‘花园蕾丝’茎段离体培养时, 外植体最佳表面灭菌方法为 75%乙醇处理 30 s 后, 无菌水冲洗 3~4 次并用有效氯浓度为 2% 的次氯酸钠溶液处理 8~10 min, 然后再用无菌水冲洗 4~6 次, 无菌滤纸吸干水分后接种, 污染率可降至 43.3%, 存活率为 40%; 最佳启动培养基为  $1/2\text{WPM} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ , 萌芽率为 93.3%; 最佳增殖培养基为  $\text{WPM} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ , 增殖系数达 4.0; 最佳生根培养基为  $1/2\text{WPM} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ , 培养 20 天时生根率为 100%、平均生根数为 8.33 条/株; 炼苗移栽的最佳基质配比为珍珠岩:蛭石:泥炭土=1:1:1 (V:V:V), 移栽成活率均为 100%, 移栽后 30 天幼苗平均株高分别为 3.43 cm, 平均株幅分别为 6.98 cm。

(3) 大花绣球‘无尽夏’原生质体分离培养时, 最佳酶解液组合为 5 mM MES (pH 5.7)、0.8 M 甘露醇、1.5% 纤维素酶 R-10、0.8% 离析酶 R-10、50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

和 0.1% 牛血清蛋白, 产量为  $60 \times 10^6$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 活力为 93%; 最佳酶解时间为 12 h~15 h; 在‘无尽夏’原生质体培养试验中, 尚未获得能够使其再生的培养基, 但在 MS +  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ASA +  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  MES +  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  D-甘露醇 +  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  山梨醇 +  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA +  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖或 MS +  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ASA +  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  MES +  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  D-甘露醇 +  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  山梨醇 +  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA +  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA 的培养基中, 原生质体均能够保持较好的活性。

本研究初步建立了绣球属大花绣球和圆锥绣球 2 个优良新品种的离体培养与快繁技术体系以及 1 个大花绣球品种的原生质体分离与培养技术。研究结果为绣球属植物种苗繁育、工厂化生产、良种选育及遗传转化等奠定了基础。

**关键词:** 绣球; 茎段; 离体培养; 快速繁殖; 原生质体

# STUDY ON IN VITRO CULTURE AND RAPID PROPAGATION OF NEW AND EXCELLENT HYDRANGEA VARIETIE

## ABSTRACT

*Hydrangea* (*Hydrangea* L.) belongs to the Saxifragaceae Juss. Family, and is an important ornamental plant genus in both landscaping and home gardening. *Hydrangea* has high ornamental, ecological and economic values and broad prospects for development and application. It is of great significance for the development, protection and application of *Hydrangea* resources to carry out research on their propagation technology. Compared with the traditional propagation technologies such as cutting, layering and dividing, tissue culture can meet the needs of annual and mass production of seedlings. The development of tissue culture could powerfully promote the industrialization of *Hydrangea* plants.

In this experiment, *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. 'Ivetta' with bud stems, *Hydrangea paniculata* Sieb. 'Garden lace' with buds and sterile seedlings of *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. 'Endless Summer' as test materials, the technical research on rapid propagation and regeneration of hydrangea stems, protoplast isolation of hydrangea leaves were carried out. The results provide technical support for the large-scale, industrial seedling production and genetic transformation of *Hydrangea* plants.

The results show that the best disinfection method for *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. 'Ivetta': The explants were sterilized with 75% alcohol for 30 s, rinsed with sterile water for 3~4 times, and then disinfected with sodium hypochlorite solution with an available chlorine concentration of 2% for 10 min. After inoculating with sterile filter paper, the contamination rate can be reduced to 36.7% and the survival rate of *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. 'Ivetta' is 53.3%. The optimal medium for the start-up culture is  $1/2B5 + 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$ , and the germination rate was 76.7%; The optimal medium for the proliferation culture:  $B5 + 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$ , the proliferation coefficient is 6.1; The best medium for rooting culture:  $1/2B5 + 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ IBA}$ , the rooting rate was 100%, and the average number of roots was 10.17; The optimal substrate ratio for transplanting seedlings: perlite: peat soil = 1:1 (V:V), the survival rate is 100%, the average height of plant is 3.70 cm, and the average width is 11.92 cm. The best disinfection method for *Hydrangea*

*paniculata* Sieb. ‘Garden lace’: The explants were sterilized with 75% alcohol for 30 s, rinsed with sterile water for 3~4 times, and then disinfect with sodium hypochlorite solution with an effective chlorine concentration of 2% for 8~10 min. After inoculating with sterile filter paper, the contamination rate is 43.3% and the survival rate is 40%; The optimal medium for the start-up culture: 1/2WPM + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, with a germination rate of 93.3%; The optimal medium for proliferation culture: WPM + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA, and the proliferation coefficient reached 4.0; The best medium for rooting culture: 1/2WPM + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA, the rooting rate was 100%, and the average rooting number was 8.33; The best substrate ratio for transplanting: perlite: vermiculite: peat soil = 1:1:1 (V:V), the survival rate is 100%, the average plant height is 3.43 cm, the average plant width is 6.98 cm. The best combination of enzymatic hydrolysis solution for protoplast isolation: 5 mM MES (pH 5.7), 0.8 M mannitol, 1.5% Cellulase R-10, 0.8% Macerozyme R-10, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.1% bovine serum albumin, the yield was 60×10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup>, and the activity was 93%; The optimal enzymatic hydrolysis time: 12 h~15 h; In the protoplast culture, no medium that can regenerate *Hydrangea* protoplasts has been found, but it can remain active in the medium of MS + 100 mg·L<sup>-1</sup> ASA + 1000 mg·L<sup>-1</sup> MES + 100 g·L<sup>-1</sup> D-Mannitol + 100 g·L<sup>-1</sup> sorbitol + 2 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose or MS + 200 mg·L<sup>-1</sup> ASA + 500 mg·L<sup>-1</sup> MES + 50 g·L<sup>-1</sup> D-Mannitol + 100 g·L<sup>-1</sup> sorbitol + 2 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA.

In conclusion, this study preliminarily established a technical system for in vitro culture and rapid propagation of two excellent new cultivars of *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. and *Hydrangea paniculata* Sieb. This study also established the culture technology and protoplast isolation of *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. The results laid a foundation for seedling breeding, industrialized production, improved variety breeding and genetic transformation of *Hydrangea*.

**KEY WORDS:** *Hydrangea*; Stem segment; *In vitro* culture; Rapid propagation; Protoplast

## 缩略词表

### Abbreviations

| 缩写<br>Abbreviations | 英文名称<br>English names          | 中文名称<br>Chinese names |
|---------------------|--------------------------------|-----------------------|
| MS                  | Murashige and Skoog medium     | MS 培养基                |
| B5                  | Gamborg's B-5 Medium           | B5 培养基                |
| WPM                 | Woody Plant medium             | 木本植物培养基               |
| 1/2MS               | 1/2 Murashige and Skoog medium | 1/2 MS 培养基            |
| 1/2B5               | 1/2 Gamborg's B-5 Medium       | 1/2 B5 培养基            |
| 1/2WPM              | 1/2 Woody Plant medium         | 1/2 木本植物培养基           |
| 6-BA                | 6-Benzylaminopurine            | 6-苄氨基腺嘌呤              |
| NAA                 | $\alpha$ -naphthylacetic acid  | $\alpha$ -萘乙酸         |
| IBA                 | Indole-3-butyric acid          | 吲哚丁酸                  |
| FDA                 | Fluorescein diacetate          | 荧光素二乙酸                |
| MES                 | MES monohydrate                | 吗啉乙磺酸                 |
| ASA                 | Ascorbic acid                  | 抗坏血酸                  |

## 绪 论

绣球属 (*Hydrangea* L.) 又名八仙花属, 为虎耳草科植物<sup>[1]</sup>。中国具有丰富的绣球属植物种质资源, 共有 46 种 10 变种<sup>[2]</sup>。绣球属植物适应性强, 具有耐阴、耐寒和病虫害少等优点, 所以种植范围较广<sup>[3]</sup>; 不仅如此, 绣球属植物花期较长、花型多样、花色丰富, 广泛应用于园林绿化和鲜切花等领域<sup>[4]</sup>; 绣球属植物萼片富含常山酚、绣球酚等物质, 故可作为抗疟疾、降血糖、治疗心悸烦躁的入药良材<sup>[5]</sup>。此外, 绣球的花色能随土壤酸碱度的变化而变化, 当土壤 pH = 4~6 时, 绣球花色呈蓝色, 而当土壤 pH 在 7.5 以上时, 绣球花色为红色, 因此, 绣球花也有植物中的“变色龙”之称, 可以当做土壤酸碱度的指示植物<sup>[6]</sup>。总之, 绣球属植物具有较高的观赏、经济、药用及生态价值。

但是绣球属植物的花大多是不孕花, 不易获得种子。因此, 绣球有性繁殖的难度较大。目前, 绣球属植物的传统繁殖方式主要为无性繁殖<sup>[7]</sup>, 虽然生产上不乏扦插繁殖的应用, 但扦插繁殖存在繁殖系数低、速度慢的问题, 且部分品种扦插不易生根, 扦插成活率较低, 另外, 扦插繁殖受季节影响, 不能周年进行。本课题选用的植物组织培养技术不仅能够保持母本的优良性状、快速繁殖获得大量组培苗, 而且环境条件可控, 能够周年开展生产, 可较好地满足企业对大量种苗的需求。

目前已有学者进行了绣球部分品种的组培快繁研究, 如 Liu 等对 ‘Hyd1’ 的启动培养、增殖培养、生根培养和炼苗移栽进行研究发现, 在 B5 培养基上添加  $2.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 6-BA 和  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IBA, 萌芽率 100%<sup>[8]</sup>; 殷丽青等以 ‘Preziosa’ 的茎段为外植体, 在 MS + 6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基上增殖系数较高, 达 6.1, 且生长良好<sup>[9]</sup>; 绣球品种 ‘Acuminata’ 在 MS + 6-BA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  上培养有利于芽萌发和生根, 在 MS + 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  上有利于芽增殖<sup>[10]</sup>; ‘无尽夏’ 在 MS + 6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IBA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  上生长良好<sup>[11]</sup>; ‘Adria’ ‘北极熊’ 等品种都已进行了高效组培快繁技术的研究<sup>[12, 13]</sup>。此外, Ute Kästner 等对绣球品种 ‘Schneeball’ 和 ‘Nachtigall’ 的体细胞杂交进行了研究并成功通过原生质体途径再生<sup>[14]</sup>。从前人的研究成果来看, 绣球属植物组织培养技术处在不断完善中, 但仍存在污染率高、繁殖系数低等问题。而且不同绣球品种生长特性差异较大, 已有研究并不适用于所有绣球品种, 因此需要针对不同品种研究其特定的组培快繁技术。

本研究从离体培养入手, 通过对启动培养、增殖培养、生根培养、炼苗移栽以及原生质体分离培养等进行研究, 以期建立绣球属植物离体培养和快速繁殖技术体系, 一方面可以使绣球新优品种得以离体保存, 能够在短期内提供大量优质种苗, 解决规模化生产种苗不足的问题; 另外, 还可以为绣球属植物遗传转化、基因功能分析、优异种质创新等相关研究提供技术支撑, 以此促进绣球产业发展。

# 第一章 文献综述

## 1 植物组织培养研究进展

### 1.1 植物组织培养的基本概念及理论基础

植物组织培养的原始意义是指愈伤组织培养，但随着技术的发展和进步，其范围已经扩大到包括植物和它的离体器官、组织、细胞、原生质体等。植物组织培养是指在无菌条件下，经过人工培养使其增殖、分化而形成新的植株的繁殖方法<sup>[15]</sup>。

植物组织培养主要依靠植物细胞的全能性而进行。所有植物都由细胞构成，在细胞学的基础上产生了植物细胞全能性学说，即指植物的幼龄体细胞含有全套的遗传基因，具有行成完整植株的能力<sup>[16]</sup>。但由细胞变成完整植株，需要在适宜的生长条件下进行培养。因此，需要在含有植物生长所必须的矿质营养、维生素、氨基酸等成分的培养基上，附加一定浓度的植物生长调节剂，并在适宜的温度、湿度、光照等条件下，促进植物细胞进行分裂、分化、形成器官直至完整的植株。这就是植物细胞的全能性在植物组织培养中的具体表现。

### 1.2 植物组织培养的形态发生途径

植物组织培养的形态发生主要通过两个途径，一是器官发生途径，二是体细胞胚发生途径。

#### 1.2.1 器官发生途径

器官发生途径是指在培养条件下的细胞或组织分化形成不定芽或不定根等器官的过程，器官发生途径又包括直接再生途径和间接再生途径，直接途径是指不经愈伤组织阶段直接生长器官的方式，间接途径即先脱分化形成愈伤组织再分化形成器官的方式<sup>[17]</sup>。

#### 1.2.2 体细胞胚发生途径

体细胞胚又称胚状体，是指离体培养条件下没有经过受精过程，但经过了胚胎发育过程所形成的胚的类似物的统称<sup>[18]</sup>。

### 1.3 植物组织培养的发展

20 世纪初，德国的植物生理学家 Haberlandt 在细胞学说的基础上首次进行了离体细胞培养的试验，在此之后的 30 年间，植物组织培养的进展十分缓慢，直至 1934 年，White 以番茄的根为材料，建立了第一个活性较高的无性系，这使得根离体培养

的实验首次获得了真正意义上的成功<sup>[19]</sup>。同一时期，Gautheret 发现在山毛柳的组织培养中，只有加入 B 族维生素和 IAA 后，山毛柳形成层组织的生长才能显著增加<sup>[20, 21]</sup>。1939 年，White 利用烟草种间杂种的瘤组织、Nobecourt 利用胡萝卜，均建立了能够持续生长的组织培养物<sup>[22]</sup>。因此，Gautheret、White 和 Nobecourt 3 人被称为植物组织培养领域的奠基人<sup>[19]</sup>。在 20 世纪 40 年代以及 50 年代初期，在植物组织培养领域里较为活跃的研究者则以 Skoog 为代表。Skoog 等发现了腺嘌呤和生长素的比例对根和芽的形成有着重要的影响，这也导致了激动素的发现及其在组织培养当中的广泛使用<sup>[23]</sup>。20 世纪 50 年代之后，关于植物组织培养的研究日趋繁荣。1952 年，Morel 及 Martin 首次获得大丽花的无毒植株；1954 年，Muir 初步在单细胞培养中获得成功；1955 年，Miller 等首次分离出细胞分裂素；1957 年，Skoog 和 Miller 提出植物激素能够影响植物器官形成的概念<sup>[24, 25]</sup>。至此，学者们通过对培养基成分和培养条件，尤其是对生长素和细胞分裂素在组织培养中的大量研究，初步实现了对离体组织和细胞生长发育及分化的控制。到了 20 世纪 60 年代之后，植物组织培养已经在全世界范围内引起了广泛的关注和更多研究<sup>[19]</sup>。

## 2 绣球属植物组培快繁研究进展

绣球属是虎耳草科植物，又名八仙花属<sup>[1]</sup>。绣球属分为 6 个组，分别为藤绣球组、冠盖组、星毛组、挂苦子组、绣球组和离瓣组，共 73 种，分布在亚洲、北美洲、中美洲和南美洲等地<sup>[2, 26, 27]</sup>。绣球属植物多为常绿或落叶灌木、小乔木，少数绣球属植物（如藤绣球）为藤本或藤状灌木，花期在 4~9 月，花径为 18~22 cm。绣球属植物花大而色艳，花序密集，其花形若绣球且与八仙传说相关，故而通常被叫做绣球花或八仙花<sup>[28]</sup>。

绣球属植物的花多为不孕花，而且其雄蕊高度瓣化，不易收获种子；即便获得种子，萌发率也较低。因此，绣球属植物有性繁殖的难度较大，其繁殖方式多采用无性繁殖，即利用植物的叶片或枝条等，用扦插、压条、嫁接、分株、组织培养等手段进行繁殖。其中，最常采用的是扦插和组织培养。据报道绣球花扦插成活率最高可达 100%<sup>[29, 30]</sup>。目前，关于绣球组培技术的报道也逐渐增多，关于绣球属植物外植体的选择、激素选择、诱导分化、生根培育等方面均有研究，并在不断完善中<sup>[31]</sup>。

### 2.1 外植体的选择

外植体的选择是植物组织培养的第一步，也是非常重要的一步，不同的外植体类型对植物组织培养的影响差异甚大。绣球属植物组织培养中常用的外植体有茎尖、茎段、叶片等。有学者用八仙花叶片、茎段和茎尖为外植体探究组织培养中的污染

率和死亡率,发现利用叶片污染率较低,但是难以形成愈伤组织,而利用茎尖污染率和死亡率都较低,分别为21.4%和18.5%<sup>[32, 33]</sup>。王红梅等<sup>[13]</sup>比较了上部侧芽、基部侧芽、顶芽和带顶芽的侧芽后,发现基部侧芽的萌发率最高。同时,以叶柄为外植体的研究发现,中部叶柄愈伤组织诱导率比上部叶柄高<sup>[34]</sup>。此外,也有很多学者以叶片作为外植体,通过愈伤组织诱导建立高效的再生体系<sup>[12, 35, 36]</sup>。因此,不同部位和不同形态的外植体的培养效果是不同的。研究还发现,由于生理状态和年龄的不同,即使同一植株上的同一种器官,其诱导分化情况也不同,通常外植体越幼嫩、分生能力越强<sup>[37]</sup>。虽然绣球属植物结实率低,但也有以种子和花粉为外植体进行组织培养的研究。如陈爽等<sup>[38]</sup>以种子为外植体获得了无菌苗,但仅限于‘蜡莲绣球’‘莼兰绣球’等较易获得种子的品种;周静伟<sup>[39]</sup>以花药(花粉发育处于单核靠边期)为外植体,其愈伤组织诱导率仅有36.7%。由此可见,绣球属植物组织培养宜以叶片、茎尖和带腋芽茎段等作为外植体,污染率低、诱导率高。

## 2.2 外植体的表面灭菌

外植体表面灭菌常用试剂有75%乙醇、 $\text{HgCl}_2$ 和 $\text{NaClO}$ 溶液等。乙醇因其穿透力强,可以使菌体蛋白变性,还可以排除外植体表面的空气有利于其他表面灭菌剂的进入,被广泛用于外植体表面灭菌的第一步<sup>[40]</sup>。但乙醇处理时间长易导致外植体死亡、时间短又不能彻底灭菌,常要结合其他表面灭菌剂共同处理外植体。研究表明,不同类型的表面灭菌剂处理不同的时间,外植体的污染率及存活率也不同。

对于茎尖、茎段的表面灭菌,冯润东等<sup>[32]</sup>和邢合龙等<sup>[33]</sup>的研究中利用70%乙醇浸泡30~45 s,再用0.1%氯化汞( $\text{HgCl}_2$ )处理7 min,外植体污染率最低。也有学者在70%乙醇处理30 s后用0.1%的 $\text{HgCl}_2$ 溶液灭菌8 min或10 min,同样可以达到较好的灭菌效果<sup>[11, 41]</sup>。因此,利用70%乙醇和0.1%  $\text{HgCl}_2$ 溶液结合使用时, $\text{HgCl}_2$ 灭菌时间一般可控制在7~10 min。 $\text{HgCl}_2$ 处理易引起外植体的褐化,如王红梅等<sup>[13]</sup>对圆锥绣球‘北极熊’的茎段用 $\text{HgCl}_2$ 处理4 min,外植体褐化率较低,但由于外植体表面密被表皮毛,会因灭菌不彻底导致外植体的污染率比较高;而用 $\text{HgCl}_2$ 不间断处理8 min,虽污染率降低,但褐化率会增加;故选择采用(4+4) min的 $\text{HgCl}_2$ 二次灭菌法,即用 $\text{HgCl}_2$ 分两次进行处理,首次处理4 min后,无菌水冲洗并用滤纸吸干外植体表面的水分后,再进行第二次处理4 min。

对于绣球属植物花药和种子,利用 $\text{HgCl}_2$ 溶液可以得到较好的灭菌效果。但由于 $\text{HgCl}_2$ 溶液毒性较大,使用不当会对外植体造成损伤。因此,也有研究采用多种表面灭菌试剂结合的方法进行灭菌。如对‘Preziosa’的茎段利用0.1%  $\text{HgCl}_2$ 灭菌7 min后,再用饱和漂白粉上清液处理8 min<sup>[9]</sup>;以及对‘红宝石’的茎段利用0.1%

HgCl<sub>2</sub> 灭菌 3 min 后, 再利用 2% 次氯酸钠 (NaClO) 灭菌 6 min<sup>[42]</sup>, 都可以获得污染率较低的无菌外植体。Barbara Raffoni 等<sup>[43]</sup>利用 2.5% NaClO 溶液和 0.2~0.4% HgCl<sub>2</sub> 溶液对 ‘Snow Queen’ 的茎段处理可以达到 100% 灭菌率, 但考虑到 HgCl<sub>2</sub> 废液不环保, 认为选用 5% NaClO 溶液浸泡 15 min 进行表面灭菌是最佳方案。Liu 等<sup>[8]</sup>也认为应避免使用 HgCl<sub>2</sub> 溶液, 用活性氯浓度为 1% 的次氯酸钠并添加 Tween 20 润湿剂浸泡 ‘Hyd1’ 茎段可以取得较好的灭菌效果。Tween 20 是一种非离子型表面活性剂, 在表面灭菌剂中添加 Tween 20 可以增强表面灭菌效果<sup>[44]</sup>。这些研究表明, 除 HgCl<sub>2</sub> 溶液外, 次氯酸钠溶液是使用最广泛的表面灭菌剂。总之, 对绣球属植物外植体的表面灭菌, 要结合不同类型的外植体选择合适的表面灭菌试剂和处理时间以达到理想的表面灭菌效果。

### 2.3 基本培养基的选择

对于植物组织培养来说, 培养基的成分对外植体的生长发育具有直接的影响。近年来, 国内大部分研究者都采用 MS 培养基 (Murashige and Skoog medium) 作为绣球属植物的基本培养基<sup>[9, 11, 45]</sup>。MS 培养基最初被用于烟草的愈伤组织培养, 后来逐渐被广泛地用于其他植物的组织培养<sup>[46]</sup>。但并不是所有植物都适用于 MS 培养基。王海娥<sup>[45]</sup>比较了 MS、1/2MS、1/4MS 基本培养基在启动培养和增殖培养阶段的培养效果, 发现对于朗姆系绣球不同品种最适宜的基本培养基并不一样: ‘绣球’ 以 1/2MS 为宜, ‘柏林’ 和 ‘蝴蝶戏珠’ 以 1/4MS 为宜, 而 ‘蓝星’ 则以 MS 为宜。陈爽<sup>[38]</sup>比较了 MS 培养基和 WPM 培养基 (woody plant medium) 对 ‘蕤兰绣球’ 和 ‘蜡莲绣球’ 增殖的影响, 发现 MS 培养基更适合这两个品种绣球的增殖, 分析认为可能是由于 MS 培养基中丰富的无机盐和氮源对促进生长有利。李杨丽<sup>[47]</sup>研究发现, MS 培养基并不适合其研究的绣球品种 ‘Hyd1’, 而 B5 (Gamborg’s B-5 medium) 和 WPM 作为基础培养基, 可促进增殖芽的伸长; 采用 B5 培养基时, 外植体生根率较高。进一步研究发现, 与 MS 和 WPM 相比, B5 培养基的铵盐浓度较低, 可促进 ‘Hyd1’ 叶片外植体不定芽的形成<sup>[8, 48]</sup>。但在蒋梦烟<sup>[49]</sup>的研究中, 1/2MS、MS、B5 这 3 种基本培养基对绣球品种 ‘蓝尼康’ 的愈伤组织诱导并无明显差异。比较 MS、B5、WPM 培养基的成分, 可以发现它们中的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 的含量有明显差异, MS 培养基和 B5 培养基中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量较高, 而 WPM 培养基中 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 含量较高<sup>[50]</sup>。因此, 基本培养基的选择不仅受外植体的基因型影响, 不同培养基中大量元素的差异也是需要考虑的重要因素。

### 2.4 植物生长调节剂的影响

除了基本培养基成分外，培养基中添加的植物生长调节剂种类、浓度和配比对于外植体各阶段生长发育也具有不同的影响<sup>[51]</sup>。

绣球属植启动培养多以 6-BA（6-苄氨基嘌呤）和 NAA（ $\alpha$ -萘乙酸）或 IBA（3-吲哚丁酸）为外源植物生长调节剂。在 Liu<sup>[8]</sup>的研究中，当 6-BA:IBA 的比例从 1.0:0.05 提高到 3.5:0.05 时，不定芽再生频率相应增加；而在 2.25:0、2.25:0.05、2.25:0.1 和 2.25:0.2 范围内变化时，器官发生频率呈抛物线型变化。殷丽青<sup>[9]</sup>在改良 MS 培养基 [MS + 556 mg·L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] 中添加不同比例 6-BA 和 NAA 处理绣球 ‘Preziosa’ 发现，过高的 6-BA 会抑制芽的发生，而过高的 NAA 会出现芽细弱、基部产生愈伤组织等现象。这些结果表明，细胞分裂素:生长素的比值与不定芽再生频率密切相关。但也有学者认为生长调节剂的有无、种类、浓度及配比对器官发生影响不显著，但对新稍伸长影响较大<sup>[42]</sup>。此外，培养基中添加赤霉素 GA<sub>3</sub> 也可以提高芽的诱导率、促进芽的伸长<sup>[41]</sup>。

增殖培养又叫继代培养，是组织培养中实现快速繁殖的重要步骤。细胞分裂素和生长素是增殖培养中常用的生长调节剂组合。雷亚灵等<sup>[42]</sup>认为，适合芽增殖的培养基为 MS + 3.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> IBA，增殖系数为 9.2。有的研究在增殖培养基中添加赤霉素，如王海娥<sup>[45]</sup>发现以 1/4 MS + 3.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 为增殖培养基时，增殖系数可达 14.32。李杨丽等<sup>[47]</sup>以 B5 + 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.6 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 为增殖培养基时，增殖系数最高，但只有 3.7。除 6-BA 外，细胞分裂素 KT 也被用于增殖培养，如用 MS + 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA 培养 ‘都山绣球’ 时，增殖率可达 2.85 倍<sup>[36]</sup>。也有研究发现，增殖培养基（MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.04 mg·L<sup>-1</sup> NAA）中添加腺嘌呤可促进增殖，提高增殖系数<sup>[41]</sup>。虽然增殖培养基以细胞分裂素和生长素组合作为外源激素的研究居多，但也有报道<sup>[8, 44]</sup>认为增殖培养基中添加任意浓度的 6-BA 都可以得到较高的不定芽增殖率和鲜重，而且不定芽长度与细胞分裂素浓度无关。根据以上研究可见，绣球属植物增殖培养使用的植物生长调节剂种类较多，但常用的只有 6-BA、NAA、IBA 等。

绣球属植物生根相对容易，组织培养中较常用的方法是瓶内生根。生根培养一般选择大量元素减半的培养基，这是因为在生根的过程中，植物对大量元素的需求已明显降低<sup>[52]</sup>。不同类型不同浓度的植物生长调节剂对生根诱导的效果存在差异。龚伟等<sup>[53]</sup>在 1/2MS 培养基上添加 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 的 NAA，绣球生根率达 82.5%。添加 0.2 或 0.3 mg·L<sup>-1</sup> IBA 时，生根率也较高<sup>[33, 54]</sup>。也有研究表明，NAA 和 IBA 配合使用比单独使用效果好，如利用 1/2MS + 0.25 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.25 mg·L<sup>-1</sup> IBA 为生根培养基时，圆锥绣球生根率可达 95%，且生根快、根数多<sup>[34]</sup>。赵盈盈<sup>[12]</sup>认为最适宜绣球品种 ‘Adria’ 的生根培养基为 1/2MS+蛭石:珍珠岩（1:1），即使不添加激素，生根率

也可达 100%，且根系发达、生长健壮。Liu 等<sup>[8]</sup>在含有珍珠岩的 1/2B5 培养基上添加  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA，‘Hyd1’ 的生根数达每株 7.1 条，远高于在琼脂中培养的生根数。分析认为，不仅是因为珍珠岩基质相对于琼脂更透气，而且琼脂中的不定芽只在培养基以外的茎段处生细小的根，这些根不接触培养基，无法吸收营养，导致不定芽生长缓慢<sup>[55]</sup>。也有文献报道在生根培养基中添加  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  活性炭可以促进生根，生根率达 100%<sup>[41]</sup>。活性炭可为组培苗提供生根暗环境，吸附植物生长调节剂等有利于生根的物质<sup>[56]</sup>，但活性炭的浓度不宜过高，否则将会抑制生根<sup>[57]</sup>。除了瓶内生根法，还有瓶外生根法。如龚伟等<sup>[53]</sup>将组培苗转移到经过福尔马林消毒的基质（珍珠岩:蛭石=1:1）中，在湿度大于 85% 的条件下培养，生根率亦可达 100%。

## 2.5 炼苗移栽

组培苗叶绿素含量少，光合自养能力弱，根毛细软，适应能力较差，需要经过逐渐改变生长条件驯化炼苗以提高其对外界环境的适应能力<sup>[58]</sup>。影响绣球属植物组培苗移栽成活率的重要因素有组培苗的质量、空气湿度、移栽基质等<sup>[42]</sup>。在移栽之前，需将诱导获得的生根苗在室温散射光下培养 3 d，再打开封口膜于温室大棚炼苗 3 d，并于移栽时洗去根部培养基<sup>[10]</sup>。气温低时，炼苗时间可适当延长；气温高时因培养基易污染，需缩短炼苗时间<sup>[59]</sup>。另外，绣球属植物组培苗通常在高湿、恒温、弱光条件下培养，若移出培养基后水分不足，将直接导致幼苗失水死亡。所以，除了每天向植株叶面喷雾以补充水分外，移栽初期还应用薄膜覆盖保湿一段时间<sup>[42]</sup>。

移栽时，应选择根系发达、茎干粗壮、叶片深绿和木质化程度较高的组培苗<sup>[36]</sup>。研究表明，绣球‘蓝尼康’已生根的健壮苗移栽成活率可达到 92%，且根系生长快、根数量多，而无根苗的移栽成活率仅为 14%，很难成活<sup>[49]</sup>。绣球属植物组培苗移栽的基质通常用泥炭土、珍珠岩、蛭石、腐殖土等，移栽所用基质应先高温灭菌再使用。Thomas 等<sup>[60]</sup>为了使栎叶绣球离体生根的植物适应温室条件，将栎叶绣球组培苗移栽到泥炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1 的基质中，然后覆盖塑料薄膜，放回培养室 4 周后，再转移到温室中。也有研究表明，将绣球组培苗移栽到珍珠岩:蛭石=1:1 的基质中，成活率为 89.6%<sup>[53]</sup>；移栽到蛭石:腐殖土=1:2 的基质中，成活率达 92%<sup>[36]</sup>；栽入珍珠岩:腐殖土=1:2 的培养钵中，成活率达 90%以上<sup>[10]</sup>。但 John E. Preece 等<sup>[61]</sup>认为组培苗的移栽成活率与移栽基质比例无关，只要移栽到泥炭+蛭石+珍珠岩的培养基质中，其适应能力都很好且生长旺盛。此外，炉灰渣也是一种优良移栽基质，有学者比较用于移栽绣球的炉灰渣和珍珠岩:蛭石=1:1 的基质，发现炉灰渣的移栽成活率达 97.5%，且组培苗长势良好<sup>[62]</sup>。炉灰渣取材方便，透气性好，不仅是组培苗移栽的优良基质，也是其他育苗方式的优良基质<sup>[63]</sup>。

## 2.6 培养条件

除了上述因素外，组织培养所处的温度、湿度、光照等培养条件也是保证整个培养过程顺利进行的重要因素。组培瓶内的湿度一般能达饱和状态，通常不予考虑<sup>[64]</sup>。在已有的绣球组织培养研究中，培养温度基本保持在  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ <sup>[12, 39, 65]</sup>。光照条件对于绣球属植物的不定芽诱导、愈伤组织的诱导和分化等都有着显著的影响。Liu 等<sup>[8]</sup>将 ‘Hyd1’ 外植体经暗培养之后，再置于 14/10 h（光/暗）的光周期下孵育，冷白光照射，光照强度为 3300 lx，芽诱导率高达 100%。周静伟等<sup>[39]</sup>将 ‘玫红妈妈’ 的花药接种到培养基后，先在弱光条件下培养 30 d，待诱导出愈伤组织后转入光照 1800~2500 lx 条件下培养，每天光照培养 12 h，愈伤诱导率为 37.6%。还有学者将 ‘Hyd1’ 叶片置于红光和蓝光下，发现不定芽被提前诱导产生，且不定芽较白光下生长更健壮<sup>[66]</sup>。由此可见，绣球属植物组织培养中光照强度、光/暗周期培养时间及光质等都有重要影响。因此，在绣球组织培养过程中，应研究并优化培养所需的温度、光照等培养条件。

## 3 植物原生质体研究进展

原生质体是脂质双层膜包围着原生质的活细胞，常指植物细胞工程中脱去了细胞壁的植物细胞，是仅由质膜包裹仍可维持其活性的基本生命单位。由此可进行原生质体培养或细胞融合，再生成植株或得到杂种植株。

植物原生质体由于缺少细胞壁的保护，在操作过程中极易破碎，但也正是如此，原生质体更容易吸收外界遗传物质，这一特性使得原生质体被广泛应用于植物生理生化、遗传、分子生物学、基因组学、蛋白质组学、代谢组学的研究中<sup>[67]</sup>。然而对于不同种类植物原生质体的分离方法存在很大差异，并且其中也不存在绝对固定的规律，至今为止仍有很多植物没有获得稳定分离原生质体的体系。而关于绣球属植物原生质体分离与培养的研究鲜有报道。因此，本研究对大花绣球 ‘无尽夏’ 无菌苗叶肉细胞进行了原生质体分离与培养的初步研究，以期绣球属植物通过原生质体再生途径进行快繁提供技术指导。

### 3.1 植物原生质体分离的方法

原生质体的分离有机械分离法和酶解分离法两种方法。

#### 3.1.1 机械分离法

关于植物原生质体最早的研究是 Klerokers 在 1892 年进行的，当时主要使用机械分离法，即把植物细胞放在一种质壁分离的介质中，后用利刃切割。在此过程中，

细胞壁被切除，便释放出了完整的原生质体<sup>[68]</sup>。但是这种方法具有明显的缺点，其产量低且限制大，并且不能由分生细胞和其他液泡化程度不高的细胞中分离原生质体。因此机械分离法已很少使用。

### 3.1.2 酶解分离法

1960 年科肯（C. Cocking）首次用酶学方法获得大量原生质体，酶解法简单高效，克服了机械法分离原生质体产量低、活力差等缺点<sup>[69]</sup>。此后，人们开始用酶解法从各种植物的各个部位分离出大量的原生质体用来进行各方面的研究试验。1970 年，Nagata 和 Takebe 利用烟草（*Nicotiana tabacum* L.）叶肉细胞分离出的原生质体培养出再生植株，标志着原生质体分离培养技术迅速发展。迄今为止，至少已经有 40 多个科、100 多个属、400 多个种的植物成功分离了原生质体并得到再生植株<sup>[70, 71]</sup>。原生质体的研究和应用发展迅速，不仅在基础研究上利用，而且已成为生物工程的一项重要开发内容<sup>[68]</sup>。

## 3.2 影响植物原生质体产量和活力的因素

### 3.2.1 材料来源

通常，用于植物原生质体分离的材料有叶片、愈伤组织、悬浮细胞系培养物等<sup>[72]</sup>。但植物原生质体分离最方便和最普遍的材料来源是植物叶片，因为植物叶片来源广泛、取材方便，植物不会受到致命伤害；不仅如此，叶肉细胞排列疏松，酶的作用很容易到达细胞壁，可以分离出大量、均匀一致的原生质体。除此之外，叶肉细胞中有叶绿体可以作为标记<sup>[73]</sup>。但是，禾本科、豆科等物种的叶肉细胞分离原生质体却比较困难。因此。在这些植物中，一直使用悬浮系培养细胞作为供体材料<sup>[74]</sup>。而也有的研究以愈伤组织或悬浮细胞系为材料分离原生质体，培养细胞处于无菌状态，且处于分生旺盛的阶段，对于原生质体再生十分有利。此外，利用愈伤组织和悬浮细胞系为材料酶解时产生的碎片也较少<sup>[75]</sup>。

### 3.2.2 预处理

原生质体分离之前，为了保证酶解能充分进行，使酶解液渗入叶片的叶肉细胞间隙中去，并减少原生质体损伤，提高产量，可以对叶片进行预处理<sup>[76]</sup>。原生质体预处理的方法主要包括质壁分离处理、低温处理、渗透压稳定剂浸泡处理等<sup>[77]</sup>。

### 3.2.3 酶的种类与浓度

酶解法分离原生质体在很大程度上是依靠所用的酶种类和浓度。通常，高等植物的细胞壁主要由纤维素、半纤维素、果胶类物质组成，故原生质体分离常用的酶

主要有纤维素酶 Onozuka R-10、离析酶 Pectolyase Y-23、果胶酶 Macerozyme R-10、半纤维素酶 Hemicellulase、解旋酶 Helicase、蜗牛酶等，其中纤维素酶和果胶酶是最必要的酶类，前者是消化细胞壁中的纤维素，后者主要是降解中胶层<sup>[78]</sup>。例如，大花蕙兰在纤维素酶+果胶酶+离析酶+崩溃酶中能够得到较高产量的原生质体<sup>[79]</sup>；陆地棉在纤维素酶+果胶酶+半纤维素酶酶解液中分离效果较好<sup>[80]</sup>；纤维素酶+果胶酶的酶解液组合是茛苳原生质体分离的最适酶解液<sup>[81]</sup>。因此，对于不同的植物和不同的材料，要根据其具体情况选择合适的酶种类<sup>[82]</sup>。

酶的活性与酶解液的 pH 值和温度有关，纤维素酶和离析酶的最适 pH 分别在 5~6 和 4~5，酶解液的 pH 常调整到 4.7~6.0 之间。酶保持活性的最适温度为 40~50℃，但是对于原生质体来说，40~50℃ 的温度太高，故而分离原生质体时的温度通常在 25~30℃。酶浓度更需根据不同植物种类和材料来源而变动。因此，在原生质体分离试验中，主要是探究合适酶浓度，以获得高产量的原生质体。有实验证明在原生质体分离的混合酶液中加入一定量的  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  具有保护膜的作用<sup>[83]</sup>。

### 3.2.4 渗透调节剂

离体的原生质体失去了细胞壁保护而易渗透破碎，因而需要在酶解液中加入合适的渗透压稳定剂，在渗透压合适的溶液中，分离出来的原生质体不仅不易破碎，且观察为球形。常用的渗透压稳定剂有甘露醇、山梨醇、蔗糖等<sup>[81]</sup>。Uchimiya 和 Murashige 发现，在烟草悬浮培养物分离原生质体时，葡萄糖、果糖、半乳糖、山梨醇和甘露醇等都是有效的，山梨醇和甘露醇适宜的浓度范围在 450~800  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[84]</sup>。杨茹在大蒜原生质体分离的研究中发现，甘露醇浓度为 550  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时，原生质体产量和活性较高<sup>[73]</sup>；王琪研究发现，甘露醇浓度为 700  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时，三七原生质体分离产量最高<sup>[85]</sup>。

### 3.2.5 酶解时间

除了酶解液的种类和浓度之外，酶解时间也是影响原生质体分离产量和活力的一个重要因素。在一定范围内，酶解时间越长，原生质体产量越高，但原生质体的活力会下降；但如果酶解时间过短，则原生质体分离不完全，产量低，不利于后续的原生质体培养<sup>[86, 87]</sup>。故在原生质体的分离试验中，应当根据材料和酶解液的组合选择适宜的酶解时间，既能获得较高产量的原生质体，又能降低酶解液对原生质体的毒害作用。例如，拟南芥适宜的分离时间为 5 h，烟草叶肉原生质体分离的酶解时间则可达 10 h<sup>[88]</sup>。

## 3.3 植物原生质体的活力检测

对于新分离出来的植物原生质体，有不同的原生质体活力测定方法，包括目测法（即用原生质体形态来判断其活力）、氧电极测定法、染色法等<sup>[89]</sup>。染色法中有荧光素二乙酸（Fluorescein diacetate, FDA）染色法、台盼蓝染色法、荧光增白剂（CFW）染色法、伊文思蓝（Evans）染料染色法<sup>[90]</sup>。其中，最常用的检测方式是 FDA 染色法，即通过 FDA 自由进入生活细胞的质膜后在酯酶作用下被分解成荧光素并积累在细胞内，在荧光倒置显微镜下观察，发绿色荧光的均是有活力的原生质体，无荧光或荧光很微弱的则为死亡细胞<sup>[91]</sup>。

### 3.4 植物原生质体的培养

植物原生质体的培养主要受培养基成分、培养方法和培养条件等因素的影响。不同的培养基成分会造成不同的原生质体培养效果。培养基成分主要包括基本培养基、渗透压调节剂、碳源、植物生长调节剂，有的培养基中还添加了抗坏血酸、柠檬酸、PVP 等抑菌和防止褐化的成分<sup>[74, 77, 92]</sup>。较为常用的基本培养基有：MS、B5、KM8P、NT、WPM 等<sup>[93-95]</sup>。在培养初期，由于原生质体没有细胞壁的保护，容易破碎，因此通常需要添加渗透压调节剂，常用的有甘露醇、山梨醇、蔗糖、葡萄糖和盐类物质等。同时，不同植物原生质体培养对激素的种类和浓度的要求也不同，需要在培养前期添加较高水平的植物生长调节剂才能使细胞分裂<sup>[96]</sup>。不同植物的原生质体在培养时，需要加入的激素种类与浓度都不同，具体加入激素的种类可以参照植物自身分化所需激素种类进行添加筛选。培养方法主要有液体培养法、固体培养法、固液结合培养法和看护培养法等。最为简单方便的就是液体培养法，在液体培养基中原生质体不易受到伤害，但液体培养通常会导致原生质体代谢产物难以排除等问题<sup>[96]</sup>。

此外，原生质体的培养还受到许多外界条件的影响，如温度和光照。植物原生质体的最适培养温度在 19~30℃之间，而光照强度仍存在较大的争议，大部分植物在初期培养时是在弱光或者黑暗条件下进行的；但也有学者认为原生质体的培养需要在一定的光照强度下进行<sup>[74]</sup>。原生质体培养还需要注意原生质体的培养密度，原生质体通常在密度达到一定程度时才会进行分裂；但是，密度过高又会导致有害物质的积累而影响活性。一般情况，原生质体培养的最适密度在  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  个·mL<sup>-1</sup><sup>[77]</sup>。

## 4 本试验研究内容、目的与意义

### 4.1 研究内容

- （1）外植体的选择和表面灭菌
- （2）启动培养基及生长调节剂的筛选

- (3) 增殖培养基及生长调节剂的筛选
- (4) 生根培养基及生长调节剂的筛选
- (5) 炼苗、移栽基质的筛选
- (6) 原生质体的分离与培养

## 4.2 目的与意义

绣球属植物是园林和家庭园艺中重要的观赏植物，在中国栽培历史悠久。其具有较高的生态和经济价值，开发应用前景广阔。但是绣球属植物大多不能通过有性繁殖的方式进行繁殖，而扦插等传统无性繁殖具有不易生根、繁殖系数低等局限性。

‘艾维塔’‘无尽夏’是大花绣球优良品种，花球大、花期长、且易调色，市场需求量大；‘花园蕾丝’属圆锥绣球，花大而美、花期长、非常适合做干花，但传统扦插较难生根且相关组织培养的研究也未见报道。因此，绣球属植物的组织培养技术亟待发展。

本研究从离体培养入手，通过对启动培养、增殖培养、生根培养、炼苗移栽以及原生质体分离培养等进行研究，以期建立绣球属植物离体培养和快速繁殖技术体系，一方面可以使绣球新优品种得以离体保存，能够在短期内提供大量优质种苗，解决规模化生产种苗不足的问题；另外，还可为绣球属植物遗传转化、基因功能分析、优异种质创新等相关研究提供技术支撑，从而促进绣球产业发展。

## 第二章 大花绣球组培快繁技术研究

大花绣球又叫八仙花、紫阳花，是绣球属植物中应用最为广泛的种。大花绣球花型多样、花色丰富，广泛应用于园林景观、盆花及鲜切花等产业<sup>[3,4]</sup>。大花绣球的萼片因富含常山酚、绣球酚等物质，还可作为抗疟疾、降血糖、治疗心悸烦躁的入药良材<sup>[5]</sup>。此外，大花绣球中部分绣球品种的花色可随土壤酸碱度的变化而变化，当土壤 pH 在 4~6 时，绣球花色呈蓝色，而当土壤 pH 在 7.5 以上时，绣球花色为红色，因此，大花绣球还可以作为土壤酸碱度的指示植物<sup>[6]</sup>。

大花绣球的花多为不孕花，较难获得种子，故有性繁殖难度较大。目前，大花绣球的传统繁殖方式主要是无性繁殖<sup>[7]</sup>，包括扦插、分株、压条等，而这些无性繁殖方式因其繁殖系数低、速度慢、周期长而不能够大规模生产，制约了产业发展；植物组织培养技术不仅能够保持母本优良性状、快速繁殖获得大量优质种苗，而且环境条件可控，在植物基因工程、分子育种等领域具有重要作用。Feng Liu 等对大花绣球 ‘Hyd1’ 的启动培养、增殖培养、生根培养、炼苗移栽进行研究得出，在 B5 培养基上添加  $2.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 6-BA 和  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IBA，萌芽率 100%<sup>[8]</sup>；殷丽青等以大花绣球 ‘Preziosa’ 的茎段为外植体，在  $\text{MS} + 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA 的培养基上增殖系数较高，达 6.1，且生长良好<sup>[9]</sup>；大花绣球品种 ‘Acuminata’ 在  $\text{MS} + 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 上培养有利于芽萌发和生根，在  $\text{MS} + 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 上有利于芽增殖<sup>[10]</sup>；此外，关于 ‘Adria’ ‘无尽夏’ ‘雪花’ 等大花绣球品种的组培快繁技术也有研究<sup>[11, 12, 54]</sup>。但目前尚无关于大花绣球 ‘艾薇塔’ 快繁技术的研究。本研究通过对大花绣球 ‘艾薇塔’ 茎段的离体培养各阶段进行试验，以期形成其组培快繁技术，为工厂化育苗、规模化生产等提供技术支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

试验材料为大花绣球 ‘艾薇塔’ [*H. macrophylla* (Thunb.) Ser. ‘Ivetta’]，又名 ‘阿多拉’，保存于江苏省农业科学院休闲农业研究所绣球花种质资源圃。‘艾薇塔’的花球饱满圆润，枝条紧凑直立，新、老枝都可开花，且其花色可调，花色有蓝色、粉色、紫色或混合色等，是深受市场欢迎的优良品种。



图 2-1 大花绣球‘艾薇塔’取材母株

Figure 2-1 Mother plant of *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. 'Ivetta' experimental materials

## 1.2 试剂与器材

试验所用试剂主要有：MS 培养基、1/2MS 培养基、B5 培养基、1/2B5 培养基、6-BA、NAA、IBA，分别购自南京寿德生物有限公司和北京索莱宝科技有限公司。

试验所用器材主要有：电子天平、pH 计、电磁炉、组培瓶、立式高压灭菌锅、超净工作台、镊子、手术剪、手术刀、酒精灯等。

## 1.3 方法

### 1.3.1 外植体的选择与表面灭菌

于 4~5 月晴朗的上午剪取生长良好、无病虫害的大花绣球‘艾薇塔’带芽茎段，去除叶片，用浸湿的纸巾包裹后，带回实验室并置于 4℃冰箱备用。将茎段去叶，用洗洁精水浸泡 5 min，洗净浮尘后经自来水冲洗 60~90 min 取出；在超净工作台上，先用 70%乙醇处理 30 s，再用无菌水冲洗 3~4 次；之后用有效氯浓度为 1%、2%、3%的次氯酸钠（NaClO）溶液分别处理 6 min、8 min、10 min，最后用无菌水冲洗 4~6 次，置于无菌滤纸上吸干。将茎段切割至 1~2 cm，并使每个茎段含 1~2 个芽，正向垂直接种于不添加任何植物生长调节剂的 MS 培养基中，做好标记在培养室内培养，2 周后统计污染率和存活率。

### 1.3.2 启动培养方法

试验设计为不同基本培养基（MS、1/2MS、B5、1/2B5）、不同浓度细胞分裂素 6-BA（0.5 mg·L<sup>-1</sup>、1.0 mg·L<sup>-1</sup>、1.5 mg·L<sup>-1</sup>、2.0 mg·L<sup>-1</sup>）和生长素 NAA（0.0 mg·L<sup>-1</sup>、0.1 mg·L<sup>-1</sup>、0.2 mg·L<sup>-1</sup>、0.3 mg·L<sup>-1</sup>）的 3 因素 4 水平正交试验，共 16 个处理（见表 2-1）。将外植体培养获得的无菌苗分别接种于不同处理的培养基中，置于组培室内培

养（温度： $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ；光照时间：16 h/d）。每个处理接种 30 个外植体作为重复，培养 25~30 d 后，统计腋芽萌发率。

表 2-1 启动培养正交设计表  
Table 2-1 Orthogonal design of start-up culture

| 处理<br>Treatment | 基本培养基<br>Basal medium | 6-BA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | NAA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |
|-----------------|-----------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|
| 1               | MS                    | 0.5                                    | 0                                     |
| 2               | MS                    | 1.0                                    | 0.1                                   |
| 3               | MS                    | 1.5                                    | 0.2                                   |
| 4               | MS                    | 2.0                                    | 0.3                                   |
| 5               | 1/2MS                 | 0.5                                    | 0.1                                   |
| 6               | 1/2MS                 | 1.0                                    | 0                                     |
| 7               | 1/2MS                 | 1.5                                    | 0.3                                   |
| 8               | 1/2MS                 | 2.0                                    | 0.2                                   |
| 9               | B5                    | 0.5                                    | 0.2                                   |
| 10              | B5                    | 1.0                                    | 0.3                                   |
| 11              | B5                    | 1.5                                    | 0                                     |
| 12              | B5                    | 2.0                                    | 0.1                                   |
| 13              | 1/2B5                 | 0.5                                    | 0.3                                   |
| 14              | 1/2B5                 | 1.0                                    | 0.2                                   |
| 15              | 1/2B5                 | 1.5                                    | 0.1                                   |
| 16              | 1/2B5                 | 2.0                                    | 0                                     |

### 1.3.3 增殖培养方法

试验设计为不同基本培养基（MS、1/2MS、B5、1/2B5）、不同浓度细胞分裂素 6-BA（ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ）和生长素 IBA（ $0.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ）的 3 因素 4 水平正交试验，共 16 个处理（见表 2-2）。将启动培养获得的腋芽切割成带有 1~2 节间的茎段接种于不同处理的增殖培养基中，接种后置于组培室内培养，培养条件与启动培养相同。每个处理接种 30 个外植体作为重复。25~30 d 后，统计增殖系数并观察各处理生长状态。

表 2-2 增殖培养正交设计表  
Table 2-2 Orthogonal design of proliferation culture

| 处理<br>Treatment | 基本培养基<br>Basal medium | 6-BA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | IBA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |
|-----------------|-----------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|
| 1               | MS                    | 1.0                                    | 0.0                                   |
| 2               | MS                    | 1.5                                    | 0.1                                   |
| 3               | MS                    | 2.0                                    | 0.2                                   |
| 4               | MS                    | 2.5                                    | 0.3                                   |
| 5               | 1/2MS                 | 1.0                                    | 0.1                                   |
| 6               | 1/2MS                 | 1.5                                    | 0.0                                   |
| 7               | 1/2MS                 | 2.0                                    | 0.3                                   |
| 8               | 1/2MS                 | 2.5                                    | 0.2                                   |
| 9               | B5                    | 1.0                                    | 0.2                                   |
| 10              | B5                    | 1.5                                    | 0.3                                   |
| 11              | B5                    | 2.0                                    | 0.0                                   |
| 12              | B5                    | 2.5                                    | 0.1                                   |
| 13              | 1/2B5                 | 1.0                                    | 0.3                                   |
| 14              | 1/2B5                 | 1.5                                    | 0.2                                   |
| 15              | 1/2B5                 | 2.0                                    | 0.1                                   |
| 16              | 1/2B5                 | 2.5                                    | 0.0                                   |

### 1.3.4 生根培养方法

选取生长健壮的无菌苗，以 1/2MS 和 1/2B5 作为基本培养基，分别添加 0.1、0.3、0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA（表 2-3），每种培养基接种 30 个外植体作为重复，20 d 后统计生根株数和每株生根数，计算生根率和平均生根数，筛选最适生根培养基。

表 2-3 生根培养处理  
Table 2-3 Treatment of rooting culture

| 处理<br>Treatment | 基本培养基<br>Basal medium | IBA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |
|-----------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 1               | 1/2MS                 | 0.1                                   |
| 2               | 1/2MS                 | 0.3                                   |
| 3               | 1/2MS                 | 0.5                                   |
| 4               | 1/2B5                 | 0.1                                   |
| 5               | 1/2B5                 | 0.3                                   |
| 6               | 1/2B5                 | 0.5                                   |

### 1.3.5 炼苗移栽

在移栽之前，需将生根苗在室温散射光下培养 3 d，再打开封口膜于温室大棚预炼苗 3 d。然后将组培苗移栽至已灭菌的不同配比基质中（珍珠岩:蛭石:泥炭土=1:1:1、珍珠岩:蛭石=1:1、珍珠岩:泥炭土=1:1、蛭石:珍珠岩=1:1），移栽时洗去根部培养基，移栽 7 d 后统计移栽成活率，移栽 30 d 后统计移栽苗的株高和株幅。

### 1.3.6 数据统计与处理方法

所得数据用 Excel 2016 进行统计整理，用 SPSS 26.0 软件对结果进行方差分析。

各指标的计算公式如下：

萌芽率=萌发茎段数/接种茎段数×100%；

污染率=污染茎段数/接种茎段数×100%；

存活率=存活茎段数/接种茎段数×100%；

增殖系数=增殖后芽数/接种时芽数；

生根率=生根的组培苗数/接种的组培苗数×100%；

移栽成活率=成活株数/移栽株数×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对外植体表面灭菌效果的影响

不同浓度的表面灭菌剂进行不同时间的处理时，外植体的灭菌效果是不同的（图 2-2，图 2-3）。当使用有效氯浓度为 1%的次氯酸钠处理时，处理 6 min 和 8 min，外植体的污染率均为 100%、存活率为 0%，而处理时间为 10 min 时，污染情况稍有改善，但存活率仅为 6.7%；当使用有效氯浓度为 2%的次氯酸钠处理时，随着处理时间的增加，外植体的污染率下降，存活率上升；处理 10 min 时，污染率只有 36.7%，存活率达 53.3%；当使用有效氯浓度为 3%的次氯酸钠处理时，虽然外植体的污染率也随着处理时间的增加而降低，但存活率却未增加。因此，大花绣球‘艾薇塔’的最佳表面灭菌方法为：75%乙醇处理 30 s 后，无菌水冲洗 3~4 次，再用有效氯浓度为 2%的次氯酸钠溶液处理 10 min，无菌水冲洗 4~6 次，无菌滤纸吸干水分后接种。

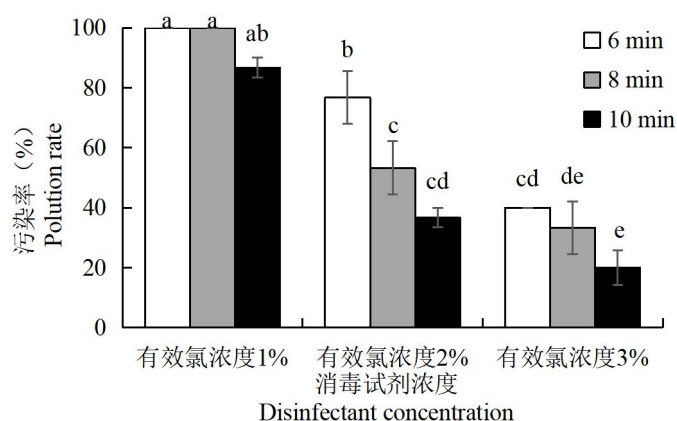


图 2-2 不同浓度有效氯处理不同时间对外植体污染的影响

Figure 2-2 Effects of different effective chlorine concentrations and disinfection times on the pollution of explants

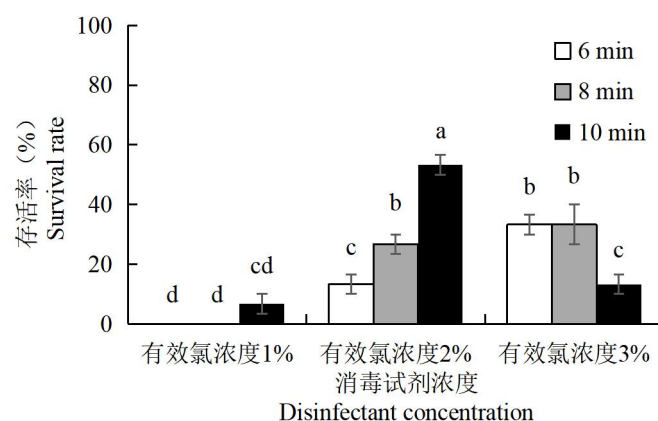


图 2-3 不同浓度有效氯处理不同时间对外植体存活的影响

Figure 2-3 Effects of different effective chlorine concentrations and disinfection times on the survive of explants

方差分析结果表明：次氯酸钠浓度对大花绣球‘艾薇塔’的污染率和存活率均有显著影响，但是处理时间仅对‘艾薇塔’的污染率有显著影响，对存活率无显著影响（表 2-4）。

表 2-4 外植体表面灭菌效果的主体间效应检验

Table 2-4 Inter subject effect test of disinfection effect of explants

| 变量<br>Factors | 因变量<br>Dependent variable | III 类平方和<br>Type III sum of squares | 自由度<br>degree of freedom | 均方<br>Mean Square | F      | 显著性<br>Significance |
|---------------|---------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------|--------|---------------------|
| 次氯酸钠有<br>效氯浓度 | 污染率                       | 1.905                               | 2                        | .953              | 86.785 | .000                |
|               | 存活率                       | .436                                | 2                        | .218              | 12.988 | .000                |
| 处理时间          | 污染率                       | .272                                | 2                        | .136              | 12.383 | .000                |
|               | 存活率                       | .036                                | 2                        | .018              | 1.060  | .363                |

## 2.2 不同处理对启动培养的影响

启动培养结果表明：不同基本培养基和不同激素组合均能使大花绣球‘艾薇塔’休眠芽萌发，但对休眠芽的萌芽率影响不同（表 2-5）。萌芽率较低的处理有 1、5、9、10、13、14，均为低浓度 6-BA（ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ）的处理；其中，处理 9（B5 +  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA）的萌芽率最低，为 29.0%。萌芽率较高的处理，均添加了高浓度的 6-BA（ $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ），如处理 3、4、11、16，且在高浓度 6-BA 的处理下，不添加 NAA 时萌芽率更高。在启动培养过程中，萌发的休眠芽状态良好，可用于后续的增殖培养和生根培养。因此，大花绣球‘艾薇塔’启动培养的最佳培养基为  $1/2\text{B5} + 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA。

表 2-5 不同基本培养基及不同浓度生长调节剂对大花绣球‘艾薇塔’启动培养的影响  
Table 2-5 Effects of different basal media and different concentrations of growth regulators on start-up culture of ‘Ivetta’

| 处理<br>Treatment | 基本培养基<br>Basal medium | 6-BA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | NAA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 萌芽率 (%)<br>Germination rate |
|-----------------|-----------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 1               | MS                    | 0.5                                    | 0                                     | $47.0\pm 2.1^{\text{d}}$    |
| 2               | MS                    | 1.0                                    | 0.1                                   | $57.0\pm 1.5^{\text{c}}$    |
| 3               | MS                    | 1.5                                    | 0.2                                   | $66.0\pm 1.6^{\text{b}}$    |
| 4               | MS                    | 2.0                                    | 0.3                                   | $57.0\pm 1.5^{\text{c}}$    |
| 5               | 1/2MS                 | 0.5                                    | 0.1                                   | $44.0\pm 2.2^{\text{d}}$    |
| 6               | 1/2MS                 | 1.0                                    | 0                                     | $55.0\pm 1.7^{\text{c}}$    |
| 7               | 1/2MS                 | 1.5                                    | 0.3                                   | $58.0\pm 2.0^{\text{c}}$    |
| 8               | 1/2MS                 | 2.0                                    | 0.2                                   | $66.0\pm 1.6^{\text{b}}$    |
| 9               | B5                    | 0.5                                    | 0.2                                   | $29.0\pm 1.0^{\text{e}}$    |
| 10              | B5                    | 1.0                                    | 0.3                                   | $32.0\pm 1.3^{\text{e}}$    |
| 11              | B5                    | 1.5                                    | 0                                     | $70.0\pm 2.1^{\text{ab}}$   |
| 12              | B5                    | 2.0                                    | 0.1                                   | $66.0\pm 1.6^{\text{b}}$    |
| 13              | 1/2B5                 | 0.5                                    | 0.3                                   | $47.0\pm 2.1^{\text{d}}$    |
| 14              | 1/2B5                 | 1.0                                    | 0.2                                   | $33.0\pm 2.1^{\text{e}}$    |
| 15              | 1/2B5                 | 1.5                                    | 0.1                                   | $59.0\pm 1.8^{\text{c}}$    |
| 16              | 1/2B5                 | 2.0                                    | 0                                     | $74.0\pm 2.2^{\text{a}}$    |

注：表中数据为平均值 ± 标准误，不同的小写字母表示不同处理间差异显著（ $p < 0.05$ ），下同。

Notes: The data in the Table are the mean ± standard error, and different lowercase letters indicate significant differences between different treatments ( $p < 0.05$ ), the same below.

方差分析结果表明：基本培养基、植物生长调节剂（6-BA、NAA）对大花绣球‘艾薇塔’萌芽率均有显著影响（表 2-6）。

表 2-6 启动培养试验结果的主体间效应检验  
Table 2-6 Inter subject effect test of start-up culture

| 变量<br>Factors | III 类平方和<br>Type III sum<br>of squares | 自由度<br>degree of<br>freedom | 均方<br>Mean Square | F       | 显著性<br>Significance |
|---------------|----------------------------------------|-----------------------------|-------------------|---------|---------------------|
| 基本培养基         | 13.400                                 | 3                           | 4.467             | 7.648   | .000                |
| 6-BA          | 187.400                                | 3                           | 62.467            | 106.963 | .000                |
| NAA           | 49.100                                 | 3                           | 16.367            | 28.025  | .000                |

### 2.3 不同处理对增殖培养的影响

由表 2-7 和图 2-4 可知，各处理均能使大花绣球‘艾薇塔’腋芽增殖，但不同的基本培养基和激素组合对腋芽增殖的影响不同，增殖系数在 1.2 至 6.1 之间；以 MS 为基本培养基的 4 个处理植株较矮小，其中处理 1、2、3 叶片发黄（图 2-5 a）；以 1/2MS 为基本培养基的处理中，处理 5 增殖系数低、植株矮小、叶色发黄、基部有愈伤、生长状态最差（图 2-5 b），处理 6 增殖系数虽高，但其底部有愈伤组织；在以 B5 为基本培养基时，处理 10 增殖系数低、叶片发黄、基部有愈伤组织、生长状态差，处理 11 的增殖系数显著高于其他处理，达 6.1（图 2-5 c）；在以 1/2B5 为基本培养基时，处理 16 的增殖系数最高为 5.3，且植株生长状态良好（图 2-5 d）。从植株生长状态看，以 MS 和 1/2MS 为基本培养基的处理中，大部分处理均存在植株矮小、叶色发黄的不良状态，但以 B5 和 1/2B5 为基本培养基的处理中，大部分处理植株生长和叶色正常。因此，大花绣球‘艾薇塔’最佳的增殖培养基为 B5 + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA。

表 2-7 不同处理下增殖培养植株的生长状态

Table 2-7 Plant state of proliferation culture under different treatments

| 处理<br>Treatment | 基本培养基<br>Basal medium | 6-BA<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | NAA<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | 植株生长状态<br>Plant growth state |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1               | MS                    | 1                             | 0                            | 植株矮小，叶片发黄，无愈伤                |
| 2               | MS                    | 1.5                           | 0.1                          | 植株矮小，叶片发黄，无愈伤                |
| 3               | MS                    | 2                             | 0.2                          | 植株矮小，叶片发黄，无愈伤                |
| 4               | MS                    | 2.5                           | 0.3                          | 植株矮小，叶色正常，无愈伤                |
| 5               | 1/2MS                 | 1                             | 0.1                          | 植株矮小，叶片发黄，有愈伤                |
| 6               | 1/2MS                 | 1.5                           | 0                            | 植株正常，叶色正常，有愈伤                |
| 7               | 1/2MS                 | 2                             | 0.3                          | 植株矮小，叶片发黄，无愈伤                |
| 8               | 1/2MS                 | 2.5                           | 0.2                          | 植株正常，叶色正常，有愈伤                |
| 9               | B5                    | 1                             | 0.2                          | 植株矮小，叶色正常，无愈伤                |
| 10              | B5                    | 1.5                           | 0.3                          | 植株正常，叶色发黄，有愈伤                |
| 11              | B5                    | 2                             | 0                            | 植株正常，叶色正常，少量愈伤               |
| 12              | B5                    | 2.5                           | 0.1                          | 植株矮小，叶色正常，有愈伤                |
| 13              | 1/2B5                 | 1                             | 0.3                          | 植株正常，叶色正常，有愈伤                |
| 14              | 1/2B5                 | 1.5                           | 0.2                          | 植株正常，叶色正常，有愈伤                |
| 15              | 1/2B5                 | 2                             | 0.1                          | 植株正常，叶色正常，有愈伤                |
| 16              | 1/2B5                 | 2.5                           | 0                            | 植株健壮，叶色正常，无愈伤                |

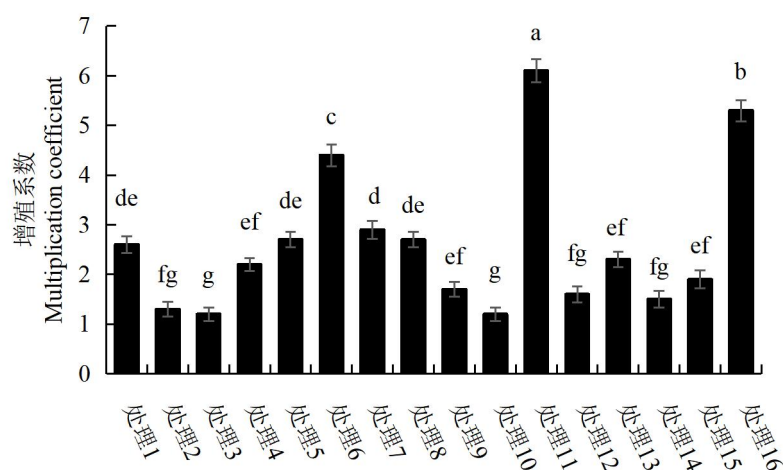


图 2-4 不同处理对增殖系数的影响

Figure 2-4 Effect of different treatments on the multiplication coefficient

方差分析结果表明：基本培养基、植物生长调节剂（6-BA 和 IBA）均对大花绣球‘艾薇塔’的增殖系数均具有显著影响（表 2-8）。

表 2-8 增殖培养试验结果的主体间效应检验  
Table 2-8 Inter subject effect test of proliferation culture

| 变量<br>Factors | III 类平方和<br>Type III sum<br>of squares | 自由度<br>degree of<br>freedom | 均方<br>Mean Square | F       | 显著性<br>Significance |
|---------------|----------------------------------------|-----------------------------|-------------------|---------|---------------------|
| 基本培养基         | 38.250                                 | 3                           | 12.750            | 22.593  | .000                |
| 6-BA          | 25.150                                 | 3                           | 8.383             | 14.855  | .000                |
| IBA           | 216.350                                | 3                           | 72.117            | 127.791 | .000                |

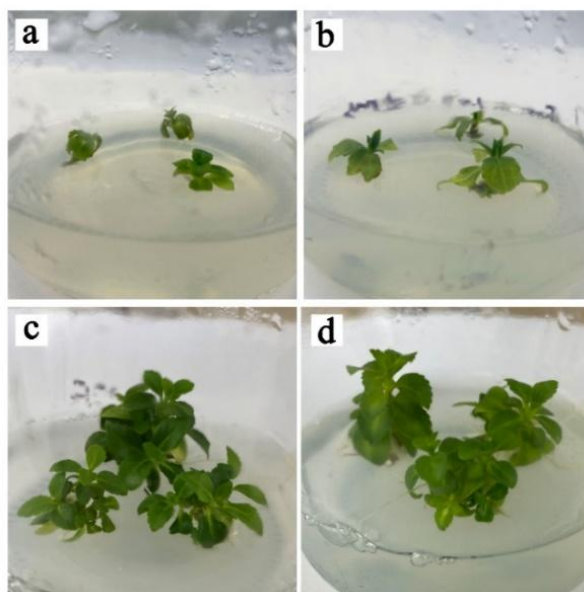


图 2-5 大花绣球‘艾薇塔’增殖培养 30 d 时的植株  
Figure 2-5 Plants of proliferation culture for 30 d of *H. macrophylla* ‘Ivetta’  
a, 处理 3; b, 处理 5; c, 处理 11; d, 处理 16  
a, Treatment 3; b, Treatment 5; c, Treatment 11, Treatment 16

## 2.4 不同处理对生根培养的影响

由图 2-6 和图 2-7 可知，以 1/2MS 为基本培养基时，生根率与平均生根数随 IBA 浓度的上升而升高，且每个处理对大花绣球‘艾薇塔’生根率和平均生根数的影响差异显著。处理 1 未生根、植株矮小，处理 3 生根率最高，达到 92.6%，平均生根数为 7.33 条/株。在以 1/2 B5 为基本培养基时，各处理的生根率均为 100%，且平均生根数随 IBA 浓度的上升而升高；其中处理 6 平均生根数最多，达 10.17 条/株。因此，大花绣球‘艾薇塔’生根培养的最佳培养基为 1/2B5 + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA。

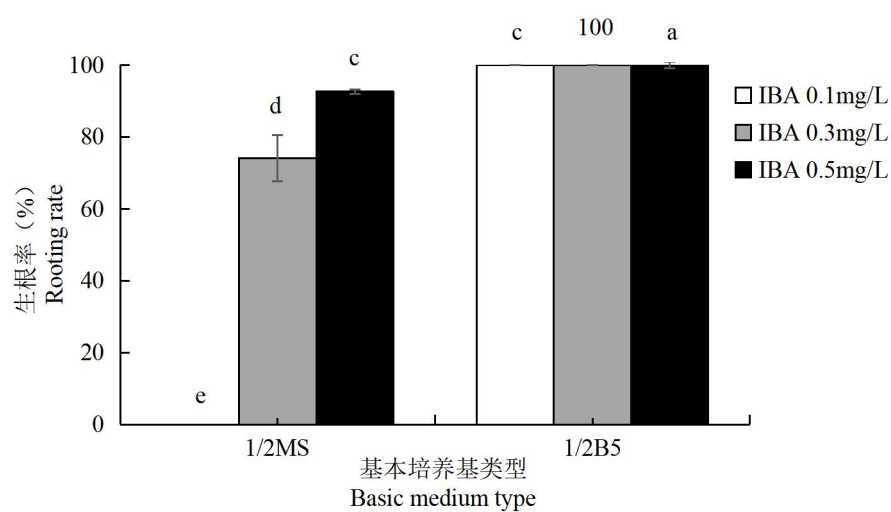


图 2-6 基本培养基及 IBA 浓度对大花绣球 ‘艾薇塔’ 组培苗生根率的影响

Figure 2-6 Effects of basal medium and IBA concentrations on the rooting rates of *H. macrophylla* ‘Ivetta’ culture seedlings

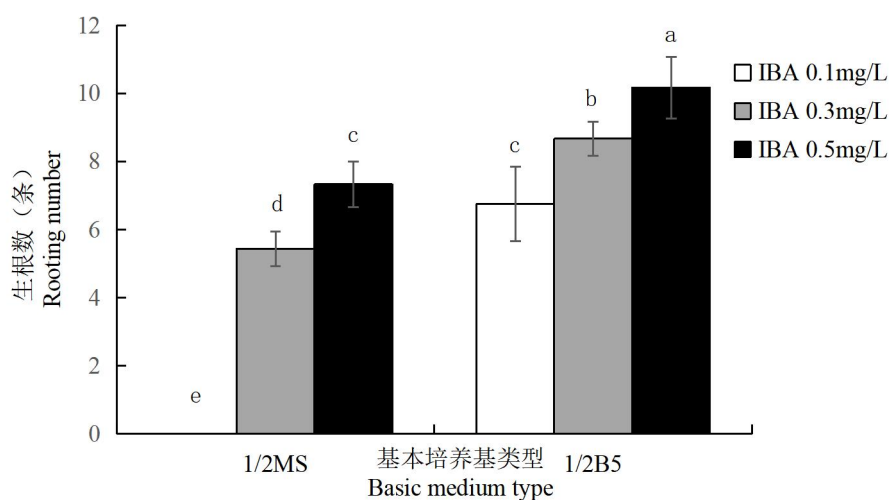


图 2-7 基本培养基及 IBA 浓度对大花绣球 ‘艾薇塔’ 组培苗生根数的影响

Figure 2-7 Effects of basal medium and IBA concentrations on the number of rooting in *H. macrophylla* ‘Ivetta’ culture seedling

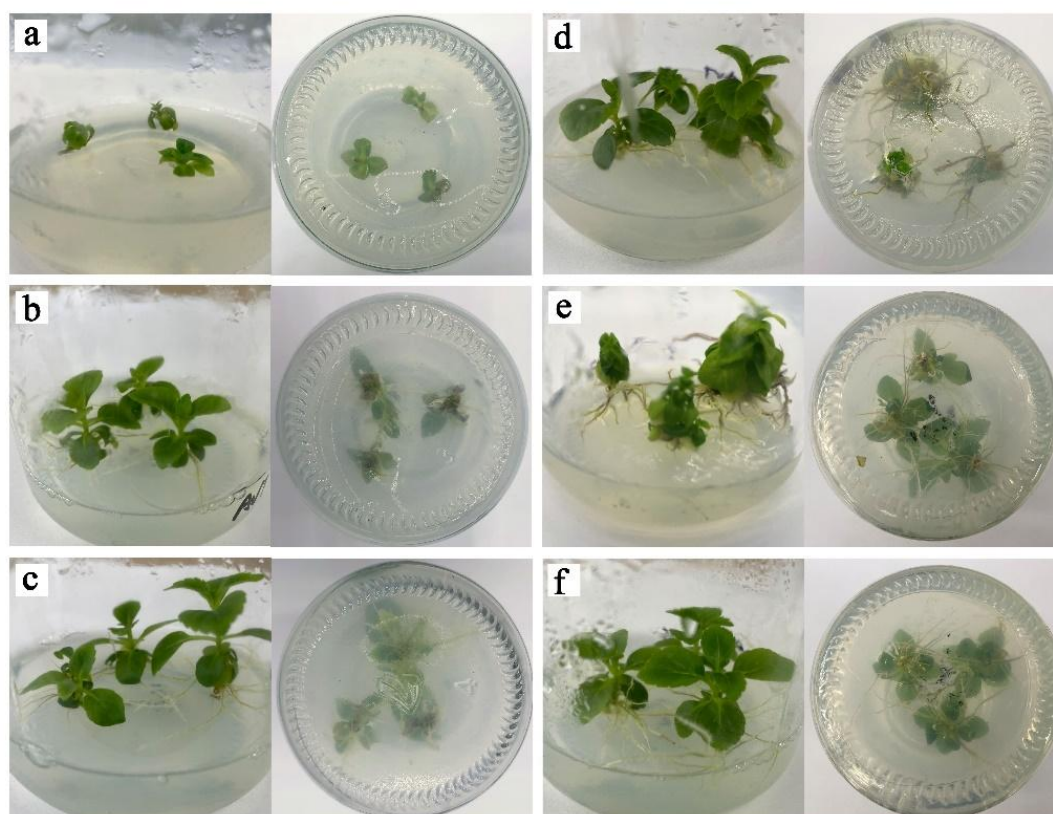


图 2-8 大花绣球 ‘艾薇塔’ 组培苗生根培养 20 d 时的生根情况

Figure 2-8 Roots of *H. macrophylla* ‘Iveta’ seedlings culture for 20 d

a, 处理 1; b, 处理 2; c, 处理 3; d, 处理 4; e, 处理 5; f, 处理 6

a, Treatment 1; b, Treatment 2; c, Treatment 3; d, Treatment 4; e, Treatment 5; f, Treatment 6

## 2.5 不同基质对组培苗移栽的影响

由表 2-9 可以看出, 4 个处理的移栽成活率均为 100%。

表 2-9 不同基质对 ‘艾薇塔’ 移栽成活率的影响

Table 2-9 Effects of different substrates on transplanting survival rate of ‘Iveta’

| 处理<br>Treatment | 基质配比<br>Substrate ratio | 成活率 (%)<br>Survival rate |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| 1               | 珍珠岩:蛭石:泥炭土=1:1:1        | 100.0                    |
| 2               | 蛭石:珍珠岩=1:1              | 100.0                    |
| 3               | 蛭石:泥炭土=1:1:1            | 100.0                    |
| 4               | 珍珠岩:泥炭土=1:1             | 100.0                    |

由图 2-9 和图 2-10 得出, 处理 1 和处理 4 的株高无显著差异, 分别为 3.57 cm 和 3.70 cm, 处理 2 和处理 3 的株高无显著差异, 分别为 2.83 cm 和 2.74 cm, 但处理 1

和处理 4 的株高显著高于处理 2 和处理 3；4 个处理的株幅差异显著，处理 2 的株幅最小，为 5.04 cm，处理 4 的株幅最大，为 11.92 cm。因此，大花绣球‘艾薇塔’的最佳移栽基质为处理 4，即珍珠岩:泥炭土=1:1（V:V）。

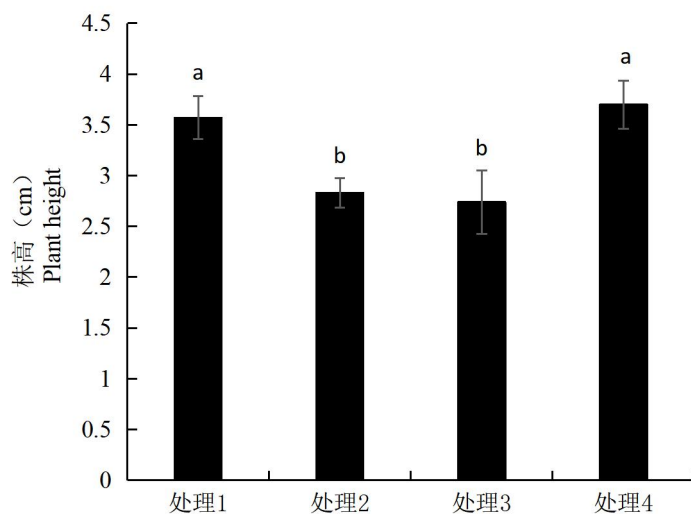


图 2-9 ‘艾薇塔’组培苗移栽于不同基质 30 天时的株高

Figure 2-9 Plant height of tissue culture seedlings transplanted in different substrates for 30 d

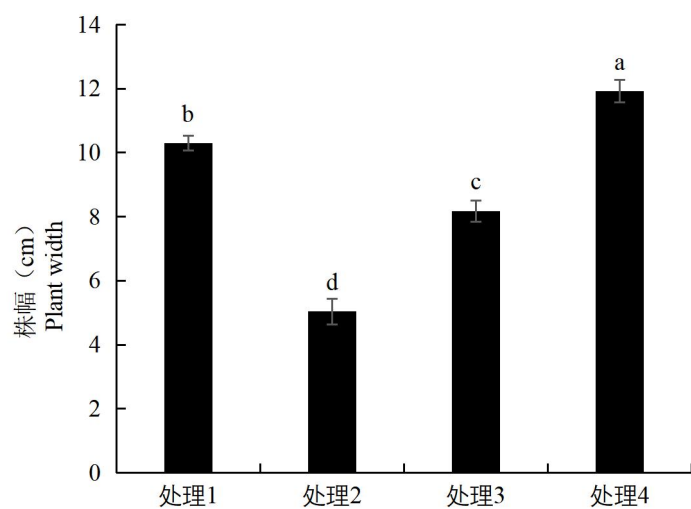


图 2-10 ‘艾薇塔’组培苗移栽于不同基质中 30 天时的株幅

Figure 2-10 Plant width of tissue culture seedlings transplanted in different substrates for 30 d

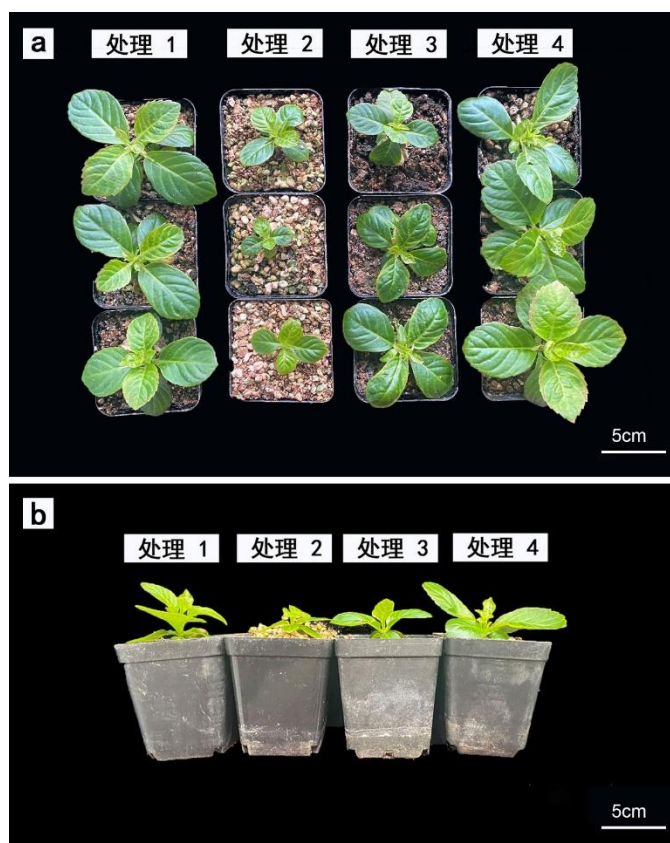


图 2-11 ‘艾薇塔’组培苗移栽在不同基质中 30 d 后的植株生长状况

Figure 2-11 Plant status of ‘Ivetta’ culture seedlings transplanted in different substrates for 30 d

a, 俯视图; b, 移栽苗正视图

a, Top view; b, Front view

### 3 讨论与结论

#### 3.1 外植体的表面灭菌

在植物组织培养中，降低污染率、提高存活率是建立无菌体系的第一步，也是关键一步。从盆栽或露天栽培的植株上采集的外植体表面常携带着各种病菌，甚至有些外植体还携带着内生菌。这些菌类是造成外植体污染的主要原因。外植体污染不仅会造成培养基的污染，病菌还会与外植体争夺培养基内的营养，同时这些菌类会在培养基上释放大量的代谢产物，从而抑制外植体的正常生长发育甚至死亡<sup>[97]</sup>。组织培养常采取化学灭菌的方法对外植体进行表面灭菌。常用的外植体表面灭菌剂有  $\text{HgCl}_2$  溶液、70%乙醇、次氯酸钠溶液等。乙醇因其穿透力强，可以使菌体蛋白变性，还可以排除外植体表面的空气有利于其他表面灭菌剂的进入，被广泛用于外植体表面灭菌的第一步<sup>[40]</sup>。但乙醇处理时间长易导致外植体死亡、时间短不能彻底灭菌，因此要结合其他表面灭菌剂共同处理外植体。不同的表面灭菌剂处理不同的时间，外植体的污染率及存活率也不同。本试验中不选用  $\text{HgCl}_2$  溶液，而选用次氯酸

钠溶液，是因为  $\text{HgCl}_2$  溶液毒性较大，不仅会对外植体造成损伤，而且不环保。本试验所采用的外植体材料是大花绣球‘艾薇塔’带芽茎段，表面灭菌剂选择 75%乙醇和次氯酸钠溶液。其中，次氯酸钠溶液用无菌水分别稀释成有效氯浓度为 1%、2%、3%的溶液，设置 6 min、8 min、10 min 的时间梯度。发现随着有效氯浓度的上升和处理时间的延长，外植体污染率均降低了，但是存活率却未能提高（图 2-2，图 2-3）。这是因为表面灭菌剂浓度越高，处理时间越长，越容易对外植体造成损伤，导致外植体褐化或死亡，因此在进行外植体表面灭菌时，选择合适的表面灭菌剂浓度，适当的处理时间才能建立高效的无菌体系。因此本试验中对外植体表面灭菌时先用 70%乙醇浸泡 30 s，利用乙醇的强穿透力使菌体蛋白变性，再用 2%有效氯浓度的次氯酸钠溶液浸泡 10 min，可取得理想的灭菌效果。此外，植物无菌体系的建立也受季节和天气的影响，因此建立更加完善的无菌体系还需进一步的试验和探索。

### 3.2 基本培养基的选择

在离体条件下，基本培养基的成分对外植体的生长发育具有直接的影响，是植物组织培养成功的另一个关键所在。但是不同的植物种类、不同品种来源的外植体、甚至不同的取样部位对基本培养基的营养需求都不同，相同的外植体在不同的生长阶段对基本培养基的适应性也不同。大花绣球‘艾薇塔’为小灌木，茎秆的木质化程度较低，因此选用了适宜草本植物生长的 MS、1/2MS、B5 和 1/2B5 为基本培养基。比较 MS、B5 培养基的成分，可以发现培养基中的  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$  的含量有明显差异，MS 培养基中的  $\text{NH}_4^+$  含量较高，而 B5 培养基中的  $\text{NO}_3^-$  含量较高<sup>[50]</sup>。因此，基本培养基的选择不仅受外植体的基因型影响，不同培养基中大量元素的差异也是需要考虑的重要因素。

启动培养试验结果表明，MS、1/2MS、1/2B5 的萌芽率无显著差异，只有 B5 培养基的萌芽率显著低于以上 3 种培养基（表 2-5），这与蒋梦烟<sup>[49]</sup>的研究结果相似。这些结果表明大花绣球‘艾薇塔’在休眠芽萌发阶段对大量元素无特定需求或需求均较少。在增殖培养中，接种于 MS 培养基的外植体增殖系数显著低于其他 3 种培养基（表 2-8）。生根培养中，选用了大量元素减半的 1/2MS 和 1/2B5 培养基。根据前人研究得出，生根的过程中，植物对大量元素的需求已明显降低，因此大量元素减半的培养基更适合生根培养<sup>[64]</sup>。本试验的生根培养得出，以 1/2B5 为基本培养基的处理较以 1/2MS 为基本培养基的处理生根效果好。李杨丽研究也表明 B5 培养基比 MS 更适宜其研究的绣球品种的生长发育，1/2B5 培养基更适合生根培养<sup>[47]</sup>。

### 3.3 植物生长调节剂对各培养过程的影响

除了基本培养基的营养物质外,为促进外植体器官组织的生长,通常还要添加植物生长调节剂,如细胞分裂素、生长素、赤霉素等。但不同的外植体在不同的生长阶段对植物生长调节剂的需求也不同,这是因为外植体内源激素的水平在不断地变化<sup>[51]</sup>。在组织培养中,生长素通常被用于诱导细胞分裂和根的分化,常用的生长素有 IAA、IBA、NAA、2,4-D 等;而细胞分裂素影响细胞分裂、顶端优势、茎的分化等,因此可用于细胞增殖,常用的细胞分裂素有 6-BA、BAP、KT 等。

本试验采用不同浓度的 6-BA、NAA、IBA 3 种生长调节剂进行试验。试验结果表明,在启动培养中,不同浓度 6-BA 诱导腋芽萌发的效果不同。外植体接种于添加有  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA、不添加 NAA 的培养基时萌芽率较高(表 2-5)。这是因为在组织培养中,适宜浓度的 6-BA 能够有效增强外植体的代谢能力,更好促进腋芽的萌发和生长,也有研究表明,高浓度的 6-BA 对芽的萌发表现为抑制作用<sup>[51, 98]</sup>。在增殖培养中,6-BA 的浓度变化对增殖系数的影响差异不显著,这与 Liu 等人研究结果相似,认为增殖培养的过程中添加任意浓度的 6-BA 都可以得到较高的不定芽增殖率,而且不定芽长度与细胞分裂素浓度无关<sup>[8, 44]</sup>。同时,本试验还发现,外植体接种于不添加生长素 IBA 的培养基中增殖系数较高,而随着生长素浓度的增大,增殖系数降低。这是因为在高浓度 IBA 情况下,抑制外植体增殖,可见大花绣球‘艾薇塔’的增殖培养对生长素的浓度具有选择性。在生根培养中,随着培养基中添加的 IBA 浓度的升高,大花绣球‘艾薇塔’生根率也成上升趋势,且生根数也上升,这说明在一定浓度范围内,IBA 具有促进生根的作用(图 2-6,图 2-7)。

### 3.4 炼苗移栽

组培苗的移栽是从异养转变到自养的过程,温度、湿度、光照等一系列条件的改变就需要幼苗逐步适应外界环境,因此,移栽前需要先对组培苗进行炼苗<sup>[99]</sup>。本试验中将已生根的组培苗经炼苗后移栽到不同基质中,发现 4 种配比的基质成活率均为 100%,这说明大花绣球‘艾薇塔’只要完成生根,就可以成活;但进一步测量和观察发现,移栽苗的株高、株幅不尽相同(图 2-9,图 2-10)。研究发现,珍珠岩:蛭石:泥炭土=1:1:1 (V:V:V) 和珍珠岩:泥炭土=1:1 (V:V) 的基质株高较高、株幅较大,但两个处理间无显著差异。而蛭石:珍珠岩=1:1 (V:V) 和蛭石:泥炭土=1:1 (V:V) 的株高较低、株幅较小。这可能是因为泥炭土能为幼苗提供其所需的基本营养,所以含有泥炭土的两个处理中的移栽苗长势较好,但是泥炭土透气性和透水性都较差,而蛭石可以增加透气性和透水性,珍珠岩的作用是保水、保温和透气<sup>[100]</sup>。因此,大花绣球‘艾薇塔’最佳移栽基质为珍珠岩:泥炭土=1:1 (V:V)。

通过以上试验,本研究得出大花绣球‘艾薇塔’外植体经 75%乙醇处理 30 s 后,

无菌水冲洗 3~4 次再用有效氯浓度为 2% 的次氯酸钠溶液处理 10 min，无菌水冲洗 4~6 次，无菌滤纸吸干水分后接种表面灭菌效果最好，污染率为 36.7%，存活率为 53.3%；较为适宜的启动培养基是  $1/2B5 + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ ，萌芽率为 74.0%；较为适宜的增殖培养基为  $B5 + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ ，增殖系数为 6.1；较为适宜的生根培养基为  $1/2B5 + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ ，生根率为 100%，平均生根数为 10.17 条/株；炼苗移栽最佳基质配比是珍珠岩：泥炭土=1:1（V:V），移栽成活率为 100%，平均株高为 3.70 cm，平均株幅为 11.92 cm，从而初步建立了其离体培养和快繁技术体系。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/318122141127007023>