

花叶玉簪试管苗限制生长保存研究

李 洋^{1,2}, 张金梅², 严俊鑫¹, 陈晓玲², 辛 霞², 卢新雄², 尹广鹏², 何娟娟²

(¹东北林业大学园林学院, 哈尔滨 150040; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 玉簪属植物在园林景观及药理学方面具有很高的应用价值。野生玉簪属极易遭受自然灾害、病毒及病虫害等侵袭, 组织培养继代也面临着维护成本高、容易污染等挑战。针对新品种培育及品种遗传稳定等需求, 建立高安全、低维护、低消耗的保存技术具有重要意义。本研究以花叶玉簪无菌苗为材料, 采用限制生长保存技术, 运用正交设计, 研究不同浓度的蔗糖、甘露醇、脱落酸、矮壮素对花叶玉簪限制生长试管苗的存活影响及生理生化响应。结果表明: 在 20~25 °C 条件下, 玉簪试管苗在培养基中添加蔗糖 50 g/L+ 甘露醇 20 g/L+ 脱落酸 (ABA, abscisic acid) 1 mg/L+ 矮壮素 (CCC, chlormequat chloride) 20 mg/L, 保存 6 个月后存活率仍为 100%, 无继代保存期可达对照 2 倍以上且维持性状稳定; 保存后材料的超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase)、过氧化物酶 (POD, peroxidase)、过氧化氢酶 (CAT, catalase) 酶活性均高于对照组, 丙二醛 (MDA, malondialdehyde) 含量均低于对照组, 保存材料的抗氧化酶活性增强, 细胞膜脂氧化程度降低, 延缓衰老进程, 延长保存继代周期。

关键词: 花叶玉簪; 限制生长保存; 抗氧化酶活性; 稳定性

Study on *in vitro* Preservation of *Hosta plantaginea* by Slow Growth

LI Yang^{1,2}, ZHANG Jin-mei², YAN Jun-xin¹, CHEN Xiao-ling²,
XIN Xia², LU Xin-xiong², YIN Guang-kun², HE Juan-juan²

(¹College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040;

²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: *Hosta* Tratt. plants have high value in landscape and pharmacology. *Hosta* Tratt. plants in the wild are vulnerable to natural disasters, viruses, diseases and insect pests, and the normal tissue culture is faced with high maintenance costs, and chances of pollution. Considering the need for breeding new varieties and maintaining the genetic stability, it is of great significance to establish a preservation technique with safety, low maintenance and low consumption. This research was conducted to obtain the optimal *in vitro* preservation protocol for *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch. by using the orthogonal design and to study the effects of different concentrations of sucrose, mannitol, abscisic acid and CCC (chlormequat chloride) in the culture medium on the survival percentages and stability during the slow growth of *in vitro* plantlets of *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch.. The results showed that 100% survival of *in vitro* *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch. plantlets was obtained after six-month storage at 20-25 °C, which were cultured in the MS medium supplemented with 50 g/L sucrose, 20 g/L mannitol, 1 mg/L ABA, 20 mg/L CCC and 0.7% agar (pH 5.8), and the storage life without subculture was twice

收稿日期: 2021-04-07 修回日期: 2021-06-08 网络出版日期: 2021-07-27

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210407004>

第一作者研究方向为种质资源保存, E-mail: 41228245@qq.com, 张金梅为共同第一作者

通信作者: 严俊鑫, 研究方向为植物病虫害, E-mail: yanjunxin@163.com

陈晓玲, 研究方向为种质资源保存, E-mail: chenxiaoling@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFE0105100); 国家中央高校基本科研业务费专项基金 (2572016CA11); 国家自然科学基金 (31800546)

Foundation projects: National Key Research and Development Program of China (2017YFE0105100), National Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (2572016CA11), National Natural Science Foundation of China (31800546)

as much as that of the control of 3 months on normal medium. The activities of SOD, POD and CAT in preserved *in vitro* plantlets were higher than those of the control group, and the content of MDA was lower than that of the control group, which indicated that the activity of antioxidant enzymes increased, the degree of lipid oxidation decreased, the senescence process was delayed, and the storage life was prolonged.

Key words: *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch.; slow growth preservation; activity of antioxidant enzymes; stability

玉簪属 (*Hosta* Tratt.) 是百合科多年生草本植物^[1], 具有花色素雅、叶色多变、品种多、应用广等特点, 在园林景观、药理学等方面具有很高的应用价值^[2-3]。为了保持玉簪亲本的优良性状并加快增殖速度, 一般不采用种子或分株繁殖方式^[4], 而是采用组织培养方式, 既可以减少田间土地资源占用、减少人力物力消耗, 也可以避免病虫害侵袭^[5-7]。组织培养体系的建立, 使试管苗可以成为玉簪属种质资源的离体保存载体, 但常规的组织培养技术需对试管苗频繁继代以维持其活力, 人力维护成本较高, 也会面临材料因多次操作污染损失的风险。因此, 需要研发试管苗限制生长保存技术, 目前尚未有关于玉簪试管苗限制生长保存技术的报道。

限制生长保存, 即确保培养物维持存活和再生潜能的同时, 通过显著减缓植物的生理代谢过程, 降低组织培养继代频率, 延长保存时间^[8-9], 降低维护成本和操作污染的风险。限制生长保存主要通过改变外界环境条件, 抑制植物生长, 减少继代次数以延迟植物衰老, 一般通过以下几种方式: 调节培养基组分^[10-11]、添加渗透性化合物调节培养基的渗透压^[12-13]、添加生长抑制剂或生长延缓剂^[14-15]、降低培养环境的氧气浓度^[16]、调节光照等^[17], 这些方式的效果会受到基因型、温度和培养条件等方面的影响^[18], 实际上往往会结合两种或两种以上的方法来保存。

离体培养条件下, 糖类具有双重作用, 糖类物质是细胞生长、分裂的主要碳源, Schnapp 等^[19]研究发现降低培养基的蔗糖浓度可以减缓番茄的茎和根伸长; 除此之外还维持一定的渗透压, 当使用较高浓度的蔗糖时, 可调节渗透压使植物减少对水和矿物质的吸收, 延缓生长速度^[20-21], 延长保存时间^[22], 如南天竹可以延长保存至 6 个月^[23]。常用的渗透性化合物除蔗糖外, 还包括甘露醇、山梨醇等, 如在马铃薯^[12]和埃塞俄比亚蕉^[13]的培养基中添加甘露醇可显著提高存活率, 在芦笋培养基中添加甘露醇或山梨醇可将继代周期从 4 周延长至 6 个月^[24]。

生长抑制剂主要是阻碍顶端分生组织细胞蛋

白质、核酸的生物合成并抑制其伸长、分化, 从而使细胞分裂减慢, 植株变矮, 脱落酸^[25]可以降低 RNA 聚合酶活性, 抑制 RNA 合成, 从而抑制外植体的生长活动, 如在番茄培养基中添加 ABA, 保存 12 周后试管苗的生根数和叶片数显著低于对照^[15]。矮壮素等生长延缓剂主要通过抑制赤霉素的生物合成^[26-27], 控制细胞和节间伸长, 使植株变矮, 同时有利于消除体内活性氧伤害, 提高活力, 如在纪伊潮菊的培养基中加入矮壮素能够使试管苗保存 12 个月且存活率能达到 92% 以上^[28]。

随着保存时间的延长, 不同保存方案可能会对植物造成胁迫而发生不同程度的生理生化变化。在保存过程中, 面对衰老和胁迫, 往往会导致植物细胞内活性氧代谢失调, 自由基过度积累, 导致膜脂过氧化, 破坏膜结构。正常情况下, 作为保护酶系统的重要组成部分, 抗氧化酶类物质如 SOD 等能维持体内活性氧产生和清除的动态平衡, 抑制膜脂过氧化, 维持膜的稳定性。MDA 是膜脂受活性氧伤害而发生氧化的产物, 其含量可反映细胞膜脂过氧化水平及植物遭受逆境伤害的程度。

本研究以花叶玉簪 (*Hosta plantaginea* (Lam.) Asch.) 试管苗为试验材料, 在常温条件下, 在培养基中添加不同浓度的蔗糖、甘露醇、脱落酸和矮壮素, 统计存活率、观察生理生化变化、恢复培养后表型差异对比分析, 筛选较佳的限制保存技术体系。本研究旨在确立适合花叶玉簪中期离体保存技术方案, 为玉簪属植物种质资源保存提供指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

花叶玉簪的健康无菌试管苗由中国农业科学院作物科学研究所国家作物种质库提供。将试管苗在 MS 培养基 (MS+3% 蔗糖+0.7% 琼脂, pH 5.8) 中培养, 获得生长健壮, 具有 4 片小叶、1 片心叶, 高度为 5 ± 0.5 cm 的试管苗为试验材料。

1.2 限制生长保存方案筛选及存活率统计

限制生长保存方案采用正交设计 $L_{16}(4^5)$, 限制保存培养基组成共设置 16 个组合试验, 即在

MS+0.7% 琼脂 (pH 5.8) 基本培养基的基础上添加不同浓度的蔗糖、甘露醇、脱落酸和矮壮素,具体浓度详见表 1。试验中每瓶添加培养基 150 mL。

限制保存材料是将无菌苗分别置于限制生长保存培养基中进行保存,对照材料是将无菌苗直接置于 MS 培养基中保存。保存条件均为 20~25 °C、光照强度 2000~3000 lx、光照时间 12~14 h/d。基生叶保持绿色,可进行营养生长,计为存活,每隔 30 d 统计存活率。

表 1 限制生长保存方案正交设计

Table 1 The orthogonal design of the slow growth tests

方案 Test	渗透性化合物种类及浓度 Kinds and concentrations of osmotic compounds		生长抑制剂种类及浓度 Kinds and concentrations of growth inhibitors	
	蔗糖 (g/L) Sucrose	甘露醇 (g/L) Mannitol	脱落酸 (mg/L) Abscisic acid	矮壮素 (mg/L) Chlormequat chloride
	1	50	10	0.5
2	50	20	1	20
3	50	30	2	30
4	50	40	3	40
5	70	20	0.5	30
6	70	10	1	40
7	70	40	2	10
8	70	30	3	20
9	90	30	0.5	40
10	90	40	1	30
11	90	10	2	20
12	90	20	3	10
13	110	40	0.5	20
14	110	30	1	10
15	110	20	2	40
16	110	10	3	30

1.3 生理生化测定

对保存材料进行 SOD、POD、CAT 活性以及 MDA 含量的测定,测定方法参照李合生^[29]植物生理生化实验方法。每个处理选取 15 株苗,剪取每株苗外层长势良好、健康的 3~4 个叶片,混样后在研钵内倒入液氮研磨成冻干粉后分装,每份 0.25 g,3 次重复。

1.4 表型测定

将连续 2 次 6 个月限制保存的试管苗,接入

MS 培养基中恢复培养 60 d。以 MS 培养基中培养 60 d 的植株为对照,对比不同保存方案中恢复培养后的表型差异。测定的表型指标包括株高、紧密度、开展度、圆度、冠层色素分布等,其中株高采用游标卡尺测量,紧密度、开展度、圆度、冠层色素分布等利用 Scanalyzer 3D 设备(德国 Lemnatec)测定。

1.5 数据处理与分析

存活率、超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性、过氧化氢酶活性、丙二醛含量、株高,利用 Excel 2013 软件进行数据记录 and 统计;紧密度、开展度、圆度、冠层色素分布等数据通过 LemnaGrid 软件建立分析流程,再通过 LemnaMiner 软件进行像素与实际长度转换,利用 Excel 2013 软件进行计算统计。利用 SPSS 22.0 软件采用方差分析法(ANOVA)进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 花叶玉簪无菌苗对照材料和限制保存材料的生长和存活情况

对照组材料在保存 3 个月后植株已长至近瓶口(图 1A~C),且培养基量不足,需要进行继代。

限制保存材料在方案 11、12、13 中保存的,在保存 1 个月时存活率为 100%,个别样品开始出现叶片黄化或叶缘黄化的现象(图 1D)。保存 2 个月开始发生不同程度的叶片卷缩,且相比于对照组试管苗株高已矮化(图 1E),从第 2 个月存活率开始下降,保存 3 个月后叶片黄化程度加深(图 1F)。第 3~6 个月其存活率分别为:方案 11 为 53.3%、3%、0 和 0,方案 12 为 49.2%、13.3%、3.3% 和 0,方案 13 为 72%、60%、26.7% 和 0。

方案 14、15、16 保存材料,在保存 1~2 个月期间存活率均为 100%,其中保存 1 个月时,保存材料的个别样品开始出现叶片黄化或叶缘黄化的现象;保存 2 个月开始发生不同程度的叶片卷缩,且相比于对照组试管苗株高已矮化。从第 3 个月存活率开始下降,保存 4 个月后材料黄化明显。第 3~6 个月其存活率分别为:方案 14 为 82%、50%、0 和 0,方案 15 为 39.4%、6%、0 和 0,方案 16 为 43%、36.6%、10% 和 0。

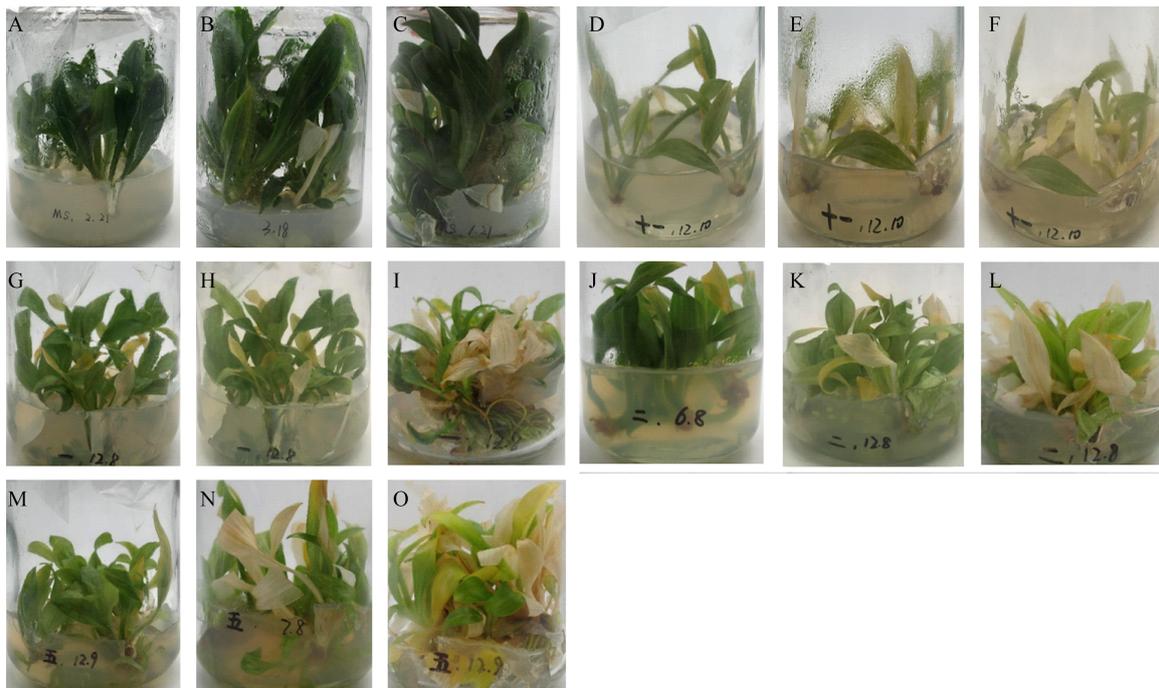
方案 3、7、8 保存材料,在保存 1~3 个月期间存活率均为 100%,其中保存 1 个月时,除方案 8 外,保存材料的个别样品开始出现叶片黄化或叶缘黄化的现象;保存 2 个月开始发生不同程度的叶片卷缩,且相比于对照组试管苗株高已矮化;从保存 3

个月后叶片黄化程度加深、植株叶色变浅且卷缩,矮化程度增强。保存至第4个月时,方案3、7、8保存材料的存活率分别下降为96%、96%、96%。保存至第5个月时,方案3、7、8保存材料的存活率分别下降为76%、26.7%、20%,方案3黄化程度更高。保存至第6个月时,方案3保存材料的存活率仍然为76%,叶片黄化、叶心部位略见绿色,方案7、8保存材料均死亡。

方案6、9、10保存材料,在保存1~4个月期间存活率均为100%,其中保存1个月时,除方案9外,保存材料的个别样品开始出现叶片黄化或叶缘黄化的现象;保存2个月后开始发生不同程度的叶片卷缩,且相比于对照组试管苗株高已矮化;从保存3个月后叶片黄化程度加深、植株叶色变浅且卷

缩,矮化程度增强。保存至第5个月时,方案6、9、10保存材料的存活率分别下降为96.7%、70%和96.7%,且黄化程度更高。保存至第6个月时,方案6保存材料的存活率下降为53.3%,叶片黄化、叶心部位略见绿色,方案9和10保存材料均死亡。

方案1、2、5保存材料,在保存1~6个月期间存活率均为100%(图1G~O)。保存2个月后个别样品叶片黄化,且相比于对照组试管苗株高已矮化(图1G、J、M);保存4个月后个别样品叶色变浅、卷缩,矮化程度增强(图1H、K、N);至保存6个月时,材料虽外层为黄叶包被,但是绿叶仍占多数(图1I、L、O)。将方案1、2、5中保存6个月的材料经过1次继代后,再保存6个月后存活率均为100%。



A 为对照保存 1 个月; B 为对照保存 2 个月; C 为对照保存 3 个月; D 为方案 11 保存 1 个月; E 为方案 11 保存 2 个月; F 为方案 11 保存 3 个月; G 为方案 1 保存 2 个月; H 为方案 1 保存 4 个月; I 为方案 1 保存 6 个月; J 为方案 2 保存 2 个月; K 为方案 2 保存 4 个月; L 为方案 2 保存 6 个月; M 为方案 5 保存 2 个月; N 为方案 5 保存 4 个月; O 为方案 5 保存 6 个月

A is *in vitro* plantlets were preserved for 1 month under the control condition, B is *in vitro* plantlets were preserved for 2 months under the control condition, C is *in vitro* plantlets preserved for 3 months under the control condition, D is *in vitro* plantlets preserved for 1 months under Test 11, E is *in vitro* plantlets preserved for 2 months under Test 11, F is *in vitro* plantlets preserved for 3 months under Test 11, G is *in vitro* plantlets preserved for 2 months under Test 1, H is *in vitro* plantlets preserved for 4 months under Test 1, I is *in vitro* plantlets preserved for 6 months under Test 1, J is *in vitro* plantlets preserved for 2 months under Test 2, K is *in vitro* plantlets preserved for 4 months under Test 2, L is *in vitro* plantlets preserved for 6 months under Test 2, M is *in vitro* plantlets preserved for 2 months under Test 5, N is *in vitro* plantlets preserved for 4 months under Test 5, O is *in vitro* plantlets preserved for 6 months under Test 5

图 1 对照和限制生长保存的花叶玉簪生长情况

Fig.1 Growth of *in vitro* *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch. plantlets of control group and slow growth preservation group

2.2 生理生化检测

2.2.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性变化 结果表明(表2),方案1和方案2保存材料的SOD酶活性在保存1~3个月期间,均显著高于对照组,方案5中材料与对照组的差异不显著。方案1保存材料

的SOD酶活性显著高于方案5,且在保存1~3个月差异达极显著。方案2与方案1相比,保存材料的SOD酶活在第1个月差异显著,第2~6个月差异不显著。方案2与方案5保存材料的SOD酶活相比,仅在第3个月差异显著,其他时间的差异均不显著。

表2 花叶玉簪无菌苗保存过程中SOD活性变化

Table 2 Changes of SOD activity during the preservation of *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch. (U/g·min)

方案 Test	第0月 Initial	第1月 1st month	第2月 2nd month	第3月 3rd month	第4月 4th month	第5月 5th month	第6月 6th month
CK	61.10 ± 7.85A	80.37 ± 5.24C	95.67 ± 6.14C	103.53 ± 6.99B	—	—	—
1	61.10 ± 7.85A	104.10 ± 4.53A	141.09 ± 7.33A	143.83 ± 6.91A	115.36 ± 9.34A	109.43 ± 2.34A	105.93 ± 5.16A
2	61.10 ± 7.85A	92.63 ± 3.84B	124.82 ± 7.05AB	136.83 ± 7.58A	107.76 ± 2.59AB	98.60 ± 6.63AB	96.79 ± 6.83AB
5	61.10 ± 7.85A	88.20 ± 2.14BC	112.30 ± 10.27BC	114.97 ± 9.58B	97.10 ± 7.16B	91.00 ± 6.15B	87.66 ± 8.94B

表中数据均为平均值 ± 标准差;不同字母表示同列比较差异显著($P < 0.05$);对照组保存3个月需继代,无4~6月数据,下同

The data in the table are mean value ± standard deviation, different letters indicate significant difference between the same columns ($P < 0.05$), the control group could only be preserved for 3 months and then needed to be subcultured, so there is no data from the fourth to the sixth month, the same as below

2.2.2 过氧化物酶(POD)活性变化 结果表明(表3),方案1、2中材料的POD酶活性在保存第3个月时,显著高于对照组。在保存1~4个月期间,方案1、2、5保存材料的POD酶活无显著差异;保

存至第5个月时,方案1保存材料的POD酶活性显著高于方案2和5的材料,方案1与方案5差异极显著($P < 0.01$);保存至第6个月时,方案1保存材料的POD酶活性仍显著高于方案5。

表3 花叶玉簪无菌苗保存过程中POD活性变化

Table 3 Changes of POD activity during the preservation of *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch. (U/g·min)

方案 Test	第0月 Initial	第1月 1st month	第2月 2nd month	第3月 3rd month	第4月 4th month	第5月 5th month	第6月 6th month
CK	2.30 ± 0.47A	4.67 ± 0.47A	5.00 ± 0.82A	5.33 ± 0.47B	—	—	—
1	2.30 ± 0.47A	5.67 ± 0.47A	6.33 ± 0.47A	6.67 ± 0.47A	7.00 ± 1.63A	8.00 ± 0.82A	9.33 ± 2.06A
2	2.30 ± 0.47A	5.33 ± 0.47A	5.67 ± 0.47A	6.33 ± 0.47A	5.00 ± 0.82A	5.67 ± 0.47B	6.67 ± 1.25AB
5	2.30 ± 0.47A	5.00 ± 0.82A	5.33 ± 0.47A	5.67 ± 0.47AB	3.67 ± 0.47A	4.00 ± 0.82B	5.67 ± 1.70B

2.2.3 过氧化氢酶(CAT)活性变化 结果表明(表4),在保存1~3个月期间,方案1、2保存材料的CAT酶活性显著高于对照组。在保存4~6个月期

间,方案1保存材料CAT酶活性显著高于方案2。方案5保存材料在保存2个月开始CAT酶活性显著低于方案1,与方案2差异不显著。

表4 花叶玉簪无菌苗保存过程中CAT活性变化

Table 4 Changes of CAT activity during the preservation of *Hosta plantaginea* (Larn.) Asch. (U/g·min)

方案 Test	第0月 Initial	第1月 1st month	第2月 2nd month	第3月 3rd month	第4月 4th month	第5月 5th month	第6月 6th month
CK	2.79 ± 0.35A	4.33 ± 0.47B	4.67 ± 0.47C	5.67 ± 0.47C	—	—	—
1	2.79 ± 0.35A	5.67 ± 0.47A	7.33 ± 0.47A	8.33 ± 0.47A	10.33 ± 0.47A	9.67 ± 0.47A	11.33 ± 0.94A
2	2.79 ± 0.35A	5.33 ± 0.47AB	6.67 ± 0.47AB	7.67 ± 0.94AB	6.67 ± 0.47B	7.33 ± 0.47B	8.00 ± 0.82B
5	2.79 ± 0.35A	4.67 ± 0.47AB	5.67 ± 0.47BC	6.33 ± 0.47BC	5.67 ± 0.47B	6.00 ± 0.82B	6.33 ± 0.47B

2.2.4 丙二醛(MDA)含量变化 结果表明(表5),在保存1~3个月期间,方案2保存材料的MDA含量显著低于方案1、5和对照材料,方案1和方案5保存材料的MDA含量与对照差异均不显著。在

保存4~5个月期间,方案2与方案5保存材料的MDA含量差异极显著($P<0.01$);方案1和方案5保存材料的MDA含量在第4个月差异显著,在第5个月差异极显著($P<0.01$)。

表5 花叶玉簪保存无菌苗过程中MDA含量变化

Table 5 Changes of MDA content during the preservation of *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch. (nmol/g·DW)

方案 Test	第0月 Initial	第1月 1st month	第2月 2nd month	第3月 3rd month	第4月 4th month	第5月 5th month	第6月 6th month
CK	8.20 ± 0.59A	5.41 ± 0.72A	3.97 ± 0.64A	4.25 ± 0.25A	—	—	—
1	8.20 ± 0.59A	4.75 ± 0.65A	3.47 ± 0.39A	3.67 ± 0.4A	4.55 ± 0.37B	4.67 ± 0.28B	4.79 ± 0.74A
2	8.20 ± 0.59A	3.04 ± 0.58B	2.23 ± 0.28B	2.76 ± 0.4B	3.49 ± 0.48C	4.07 ± 0.25C	4.61 ± 0.56A
5	8.20 ± 0.59A	4.86 ± 0.51A	3.88 ± 0.33A	3.85 ± 0.65A	5.77 ± 0.21A	5.78 ± 0.10A	5.47 ± 0.59A

2.3 不同保存方案恢复培养的花叶玉簪无菌苗表型差异

结果表明(表6),经过恢复培养后的方案2和方案5的保存材料,与对照材料的株高、紧密度、开展度、圆度和相对叶绿素含量,均无显著差异,而

方案1中保存材料的紧密度、开展度和相对叶绿素含量虽与对照材料差异不显著,但株高、圆度则呈现显著性差异(表6)。由此可见,方案1中保存材料经过恢复培养后短时间内并不能恢复至原始表型。

表6 花叶玉簪保存无菌苗恢复培养后表型变化

Table 6 Phenotypic changes of *Hosta plantaginea* (Lam.) Asch. in resumed culture after preservation

方案 Test	株高(cm) Plant height	紧密度 Plant compactness	开展度 Plant caliper length	圆度 Plant roundness	相对叶绿素含量(%) Relative chlorophyll content
CK	6.65 ± 0.38A	0.41 ± 0.03A	1161.67 ± 122.53A	260.00 ± 12.57A	96.63 ± 1.81A
1	3.58 ± 0.27B	0.42 ± 0.02A	1168.67 ± 61.76A	157.33 ± 17.25B	95.63 ± 1.23A
2	6.03 ± 0.27A	0.45 ± 0.03A	1068.67 ± 89.45A	246.50 ± 6.18A	98.00 ± 0.67A
5	6.21 ± 0.45A	0.48 ± 0.05A	1150.00 ± 93.56A	227.00 ± 15.94A	97.77 ± 1.26A

综合存活率、表型和生理生化物质变化结果,方案1和方案2保存材料的抗氧化酶活性总体高于方案5,且MDA含量低于方案5,方案2为花叶玉簪中长期离体保存最佳方案,即在MS基础培养基上添加蔗糖50 g/L、甘露醇20 g/L、ABA 1 mg/L、CCC 20 mg/L。

3 讨论

目前限制生长保存方法在不同物种得到了成功的应用^[30-32]。研究表明,不同植物对适宜的甘露醇浓度要求不同,这可能是由于不同植物抵抗渗透胁迫的能力有差异,如菊花试管苗在添加10~20 g/L甘露醇的培养基中可保存12个月^[33];文心兰试管苗在添加30 g/L甘露醇的培养基中可保存12个月^[34];马铃薯试管苗在添加40 g/L甘露醇的培养基中可保存18个月^[35];也有研究表明10~50 g/L甘露醇对百合试管苗生长没有起到明显的限制作用^[36]。矮壮素被作为延缓剂而广泛地应用于种质保存中,但不同试材所用浓度也有较大差异,如文心

兰试管苗在添加30 mg/L CCC的培养基中可保存12个月^[37];添加200 mg/L CCC的培养基对宝石无核葡萄试管苗的生长抑制效果明显^[36];培养基中CCC浓度达1500~2000 mg/L时对纪伊潮菊等效果较好^[28];也有研究表明,400 mg/L CCC的培养基会引起葡萄组培苗玻璃化^[38]。蔗糖在培养基中起双重作用,合适浓度的蔗糖作为碳源为植株提供营养物质,高浓度的蔗糖会形成渗透胁迫,抑制植株的生长,不同植物对蔗糖耐性也不同,如50~90 g/L高浓度蔗糖可以保存百合试管苗11个月^[36];90~110 g/L蔗糖可以抑制大花卷丹试管苗生长^[39];高浓度的蔗糖也会对试管苗产生毒害作用,如兰伟等^[40]发现那贺川野菊试管苗在含有60~90 g/L蔗糖的培养基中保存时间比对照短,且存活率低。研究发现0.5~2.0 mg/L ABA具有抑制紫背天葵试管苗生长的作用^[41],保存6个月后存活率100%;1.0~3.0 mg/L ABA可有效延长百合试管苗保存时间^[36];0.2~2.0 mg/L ABA不利于木薯试管苗的离体保存^[42];7.6~11.4 μmol/L浓度的ABA会导致百里香植株难以恢复生长^[43]。

同时采用两种或两种以上限制生长的方法来保存植物的种质资源可以提高离体保存的效果,如 Thakur 等^[24]发现 2.0% 甘露醇或者 2.0% 山梨醇与 1.5% (w/v) 的蔗糖添加在 1/2 MS 培养基可以使大赖草在常温下保存 6 个月,成活率 70% 以上。

有学者认为植物衰老过程与细胞膜透性的变化有关,衰老过程即是细胞和组织中活性氧伤害积累的过程。有研究表明渗透剂能够清除自由基,保护植物组织免受氧化应激损伤^[44-45]。抗氧化酶类物质 SOD、POD、CAT 可防止活性氧对细胞膜造成的损害,稳定其代谢平衡,酶活性可作为观测植物生活力和抵抗胁迫能力的重要指标。从生长延缓剂处理后试管苗生长受到抑制的生长状态和生理代谢变化的结果来看,达到或超过试管苗生长受到明显抑制的处理后,其 SOD 等酶活性及 MDA 含量也发生显著变化。本研究发现,较佳 3 种方案(方案 1、2、5)保存材料的 SOD、POD、CAT 酶活性均高于对照组,但 MDA 含量均低于对照组,可能通过提高材料的抗氧化酶活性,延迟材料的衰老以达到延长保存时间的目的,这一结论与姚凤琴等^[46]研究结果一致。

本研究获得的玉簪适宜的培养基,即在培养基中添加蔗糖 50 g/L+甘露醇 20 g/L+ABA 1 mg/L+CCC 20 mg/L,保存 6 个月后,材料的存活率为 100%,且在保存过程中试管苗发生生理代谢协调变化,以减低逆境对试管苗细胞膜系统的伤害,增强保护酶的活性,增强试管苗对环境的抗逆性,延缓衰老,达到延长保存时间的目的,为玉簪属植物种质资源保存提供了技术支撑。

参考文献

[1] 何军伟,杨丽,钟国跃. 民族药玉簪的化学成分、药理活性、临床应用及质量控制研究进展. 中草药, 2016, 47(23): 4295-4300
He J W, Yang L, Zhong G Y. Research progress in chemical constituents, pharmacological activities, clinical practices and quality control of folk medicine *Hosta plantaginea*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(23): 4295-4300

[2] Lee S R, Kyeonghee K, Lee B Y, Lim C E. Complete chloroplast genomes of all six *Hosta* species occurring in Korea: molecular structures, comparative, and phylogenetic analyses. BMC Genomics, 2019, 20: 833

[3] 陈旦蕊. 玉簪及其栽培管理技术. 现代园艺, 2019(1): 60-61
Chen D R. Cultivation and management technology of *Hosta*. Modern Horticulture, 2019(1): 60-61

[4] 杨丹,顾德峰,董然,赵和祥,孙唯一. 三种玉簪新品种离体快繁技术的研究. 北方园艺, 2012(1): 124-126
Yang D, Gu D F, Dong R, Zhao H X, Sun W Y. Study on rapid propagation in vitro of *Hosta plantaginea* of three new species. Northern Horticulture, 2012(1): 124-126

[5] Jinhyeuk K, Phuong C T T, Jinwoo K. First report of stem rot on *Hosta plantaginea* caused by *Sclerotium rolfsii* in Korea. Plant Pathology Journal, 2010, 26(3): 297

[6] Currier S, Bel L. Characterization of a potyvirus infecting *Hosta* spp. Plant Disease, 1996, 80(9): 1040

[7] Ryu K H, Park M H, Lee M Y, Lee J S. Characterization and seed transmission of *Hosta virus X* isolated from *Hosta* plants. Acta Horticulturae, 2006, 722: 91-93

[8] Koeda S, Matsumoto S, Matsumoto Y, Takisawa R, Kataoka K. Medium-term *in vitro* conservation of virus-free parthenocarpic tomato plants. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 2018, 54(4): 392-398

[9] Chauhan R, Singh V, Quraishi A. *In vitro* conservation through slow-growth storage//Faisal M. Synthetic seeds. Springer Cham, 2019: 397-416

[10] 赖钟雄,陈振光,何碧珠,林顺权. 四季桔胚培养离体种质保存研究. 作物品种资源, 1997(4): 44-46
Lai Z X, Chen Z G, He B Z, Lin S Q. Studies on germplasm preservation *in vitro* from embryo culture of *Citrus microcarpa*. Crop Germplasm Resources, 1997(4): 44-46

[11] 吕玲玲,徐雪荣,孙德权,罗萍,董新红. 菠萝种质的离体保存研究. 西北植物学报, 2007, 27(4): 834-838
Lv L L, Xu X R, Sun D Q, Luo P, Dong X H. Conservation of pineapple germplasm. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2007, 27(4): 834-838

[12] Sarkar D, Naik P S. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. Euphytica, 1998, 102(2): 275-280

[13] Negash A, Krens F, Schaart J, Visser B. *In vitro* conservation of onset under slow-growth conditions. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2001, 66(2): 107-111

[14] Gopal J, Chamail A, Sarkar D. Slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm at normal propagation temperature. Potato Research, 2002, 45(2): 203-213

[15] Ayed A A, Rida S, Muhanad A, Manar R, Tamara A Q. *In vitro* preservation of transgenic tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) plants overexpressing the stress-related slareb1 transcription factor. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(7): 1477

[16] Sharma N, Satsangi R, Pandey R, Singh R, Kaushik N, Tyagi R K. *In vitro* conservation of *Bacopa monnieri* (L.) using mineral oil. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2012, 111(3): 291-301

[17] Trejgell A, Kaminska M, Tretyn A. *In vitro* slow growth storage of *Senecio macrophyllus* shoots. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(11): 234

[18] Marino G, Negri P, Cellini A, Masia A. Effect of carbohydrates on *in vitro* low-temperature storage of shoot cultures of apricot. Scientia Horticulturae (Amsterdam), 2010, 126(4): 434-440

[19] Schnapp S R, Preece J E. *In vitro* growth reduction of tomato and carnation microplants. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1986, 6(1): 3-8

[20] Thompson M R, Douglas T J, Obata S, Thorpe T. Mannitol metabolism in cultured plant cells. Physiologia Plantarum, 1986, 67(3): 365-369

[21] Srivastava M, Purshottam D, Srivastava A, Misra P. *In vitro* conservation of *Glycyrrhiza glabra* by slow growth culture. Research Journal of Biotechnology, 2013, 3: 49-58

[22] Sharaf S A, Shibli R A, Kasrawi M A, Baghdadi S H. Slow-

- growth conservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) microshoots from Jordan. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 2012, 10(2): 1359-1364
- [23] Ozudogru A, da Silva D P C, Kaya E, Dradi G, Paiva R, Lamberd M. *In vitro* conservation and cryopreservation of *Nandina domestica*, an outdoor ornamental shrub. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2013, 41(2): 638-645
- [24] Thakur S, Tiwari K L, Jadhav S K. *In vitro* approaches for conservation of *Asparagus racemosus* Willd. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2015, 51(6): 619-625
- [25] Du Y P, Li W Y, Zhang M F. The establishment of a slow-growth conservation system *in vitro* for two wild lily species. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(8): 1981-1990
- [26] Kepenek K, Karoglu Z. The effects of paclobutrazol and daminozide on *in vitro* micropropagation of some apple (*Malus domestica*) cultivars and M9-rootstock. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(24): 4851-4859
- [27] Kofidis G, Giannakoula A, Ilias I F. Growth, anatomy, and chlorophyll fluorescence of coriander plants (*Coriandrum sativum* L.) treated with prohexadione-calcium and daminozide. *Acta Biologica Cracoviensia*, 2008, 50(2): 55-62
- [28] 兰伟,陈发棣. 纪伊潮菊离体保存及其遗传稳定性分析. *西北植物学报*, 2010, 3(8): 65-72
Lan W, Chen F D. *In vitro* conservation and genetic stability of *Chrysanthemum shiwogiku* var. *kinokuniense*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 3(8): 65-72
- [29] 李合生. *植物生理生化实验原理和技术*. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-169, 260-261
Li H S. *Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments*. Beijing: Higher Education Press, 2000: 164-169, 260-261
- [30] Negri V, Tosti N, Standardi A. Slow growth storage of single node shoots of apple genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2000, 62(2): 159-162
- [31] Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2011, 47(1): 5-16
- [32] Rabia F E H, Jeffrey A, Jacqueline N A, Eisenreich R, Meij J V D. The effect of slow-growth strategy on a production of *Petunia×hybrida* Vilm. microcuttings. *Plant Tissue Culture*, 2019, 55: 433-441
- [33] 王艳芳,房伟民,陈发棣,赵宏波,刘灶长. ‘神马’菊花的离体保存及遗传稳定性. *西北植物学报*, 2007, 27(7): 1341-1348
Wang Y F, Fang W M, Chen F D, Zhao H B, Liu Z C. *In vitro* conservation of chrysanthemum ‘Jinba’ and genetic stability of regenerated plantlets. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, 27(7): 1341-1348
- [34] 叶秀仙,黄敏玲,吴建设,钟淮钦,林兵,罗远华. 甘露醇和生长抑制剂对文心兰离体保存的影响. *福建农业学报*, 2011, 26(1): 76-82
Ye X X, Huang M L, Wu J S, Zhong H Q, Lin B, Luo Y H. Effect of mannitol and growth inhibitor on *in vitro* preservation of *Oncidium*. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 26(1): 76-82
- [35] Gopal J, Chauhan N S. Slow growth *in vitro* conservation of potato germplasm at low temperature. *Potato Research*, 2002, 45(2-4): 203-213
- [36] 陈辉,陈晓玲,陈龙清,卢新雄. 百合种质资源限制生长法保存研究. *园艺学报*, 2006, 33(4): 789-793
Chen H, Chen X L, Chen L Q, Lu X X. Studies on germplasm conservation of lily (*Lilium* L.) by restricting growth method. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(4): 789-793
- [37] 褚明宇,毛娟,陈佰鸿. PP₃₃₃ 和 CCC 对葡萄试管苗生长的影响. *西北农业学报*, 2012, 21(11): 151-157
Chu M Y, Mao J, Chen B H. The effects of different mass concentrations of PP₃₃₃ and CCC on growth of grape tube-plantlets. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2012, 21(11): 151-157
- [38] 徐志微,杨丽丽,杜国强,师校欣. 培养基渗透压和生长调节剂对葡萄种质离体保存的效应. *分子植物育种*, 2014, 12(4): 720-725
Xu Z W, Yang L L, Du G Q, Shi X X. Efficacy of osmotic pressure and plant growth regulators in media on conservation of grape plantlets *in vitro*. *Molecular Plant Breeding*, 2014, 12(4): 720-725
- [39] 傅伊倩,孔滢,刘燕. 大花卷丹的组织培养及限制生长保存. *植物生理学报*, 2012, 48(3): 277-281
Fu Y Q, Kong Y, Liu Y. *In vitro* propagation and restrict growth preservation of *Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii* Baker. *Plant Physiology Communications*, 2012, 48(3): 277-281
- [40] 兰伟,陈素梅,尹冬梅,陈发棣. 那贺川野菊的离体保存. *园艺学报*, 2010, 37(12): 2007-2016
Lan W, Chen S M, Yin D M, Chen F D. Studies on *in vitro* conservation of *Chrysanthemum yoshinaganthum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37(12): 2007-2016
- [41] 邵玲,卢夏玲,陈芝敏. 濒危植物紫背天葵种质离体保存技术研究. *广东农业科学*, 2015, 42(19): 43-47
Shao L, Lu X L, Chen Z M. Research on germplasm *in vitro* preservation technology of endangered plant *Begonia fimbriatipula*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(19): 43-47
- [42] 刘连军,黎萍,李恒锐,彭靖茹,李慧敏. 木薯种质资源离体保存技术研究. *湖北农业科学*, 2016, 55(8): 2120-2123
Liu L J, Li P, Li H R, Peng J R, Li H M. Study on *in vitro* conservation technique of *Cassava*. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55(8): 2120-2123
- [43] Tahtamouni R, Shibli R, Al-Abadllat A, Al-Qudah T. Analysis of growth, oil yield, and carvacrol in *Thymbra spicata* L. after slow-growth conservation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2016, 40: 213-221
- [44] Shen R G J, Bohnert H J. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology*, 1997, 115(2): 527-532
- [45] Abebe T. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology*, 2003, 131(4): 1748-1755
- [46] 姚凤琴,赖钟雄. 香蜂花的离体保存及试管苗抗氧化酶活性的变化. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2014, 43(3): 263-268
Yao F Q, Lai Z X. *In vitro* conversation and the changes of antioxidase activity of *Melissa officinalis* plantlets. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition*, 2014, 43(3): 263-268