

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201703014

闫海霞, 邓杰玲, 黄昌艳, 等. 褐纹报春苣苔组织培养与快速繁殖 [J]. 广西植物, 2017, 37(10):1270-1278

YAN HX, DENG JL, HUANG CY, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Primulina glandaceistriata* [J]. *Guihaia*, 2017, 37(10):1270-1278

褐纹报春苣苔组织培养与快速繁殖

闫海霞, 邓杰玲, 黄昌艳, 关世凯, 何荆洲, 张自斌, 卜朝阳*

(广西壮族自治区农业科学院 花卉研究所, 南宁 530007)

摘要: 褐纹报春苣苔 (*Primulina glandaceistriata*) 是一种极具观赏价值的喀斯特地区野生花卉, 目前尚未有褐纹报春苣苔组培快繁的研究报道。该研究以褐纹报春苣苔的叶片为外植体, 通过两种途径建立其组培快繁体系。结果表明: 适宜的不定芽诱导培养基为 MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹, 适宜的不定芽增殖培养基为 MS+ZT 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹+活性炭 0.05 g · L⁻¹, 增殖系数为 11.09; 适宜的愈伤组织诱导培养基为 MS+TDZ 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹, 适宜的愈伤组织分化培养基为 MS+ZT 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹, 分化系数为 12.46; 适宜的生根培养基为 1/2MS+IBA 0.1 mg · L⁻¹+活性炭 0.05 g · L⁻¹ 或 1/2MS+IBA 0.5 mg · L⁻¹+活性炭 0.05 g · L⁻¹, 生根率为 100%。该研究结果成功建立了褐纹报春苣苔的组培快繁体系, 为今后褐纹报春苣苔的种苗繁殖和遗传转化提供了技术支持。

关键词: 苦苣苔, 褐纹报春苣苔, 组织培养, 不定芽, 愈伤组织

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)10-1270-09

Tissue culture and rapid propagation of *Primulina glandaceistriata*

YAN Hai-Xia, DENG Jie-Ling, HUANG Chang-Yan, GUAN Shi-Kai,

HE Jing-Zhou, ZHANG Zi-Bin, BU Zhao-Yang*

(Flower Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: *Primulina glandaceistriata* is a highly ornamental value of the wild flowers in karst area, yet there is no research on the tissue culture of *P. glandaceistriata*. We took the leaves of *P. glandaceistriata* as material to study tissue culture and rapid propagation by two methods. The results showed that the optimum medium for adventitious bud regeneration was MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹, the optimum medium for multiplication culture was MS+ZT 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹+ active carbon 0.05 g · L⁻¹ and the multiplication coefficient was 11.09, the optimum culture medium which induced the callus was MS+TDZ 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹, the best differentiation medium

收稿日期: 2017-04-10 修回日期: 2017-06-05

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 1598006-5-8, 桂科能 1598022-1-5); 南宁市科学研究与技术开发计划项目(NC20152008-3); 广西农科院项目(2015YT89) [Supported by the Guangxi Science and Technology Construction Planning(1598006-5-8, 1598022-1-5); Nanning Science and Technology Construction Planning(NC20152008-3); Basic Research Fund of Guangxi Academy of Agricultural Sciences(2015YT89)]。

作者简介: 闫海霞(1981-), 女, 广西贵港人, 副研究员, 硕士, 主要从事花卉新品种选育与示范推广研究, (E-mail) 819307232@qq.com。

*通信作者: 卜朝阳, 研究员, 主要从事观赏植物的生物技术研究, (E-mail) yangnv@126.com。

was MS+ZT 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹ and the differentiation coefficient was 12.46, the optimum medium for rooting culture was 1/2MS+IBA0.1 mg · L⁻¹+ active carbon 0.05 g · L⁻¹ and 1/2MS+IBA0.5 mg · L⁻¹+ active carbon 0.05 g · L⁻¹, the rooting rate was 100%. In this study, tissue culture and rapid propagation system of *P. glandacestriata* was successfully developed to provide a theoretical basis and technical support for future research on genetic transformation.

Key words: Gesneriaceae, *Primulina glandacestriata*, tissue culture, adventitious buds, callus

褐纹报春苣苔(*Primulina glandacestriata*)是苦苣苔科(Gesneriaceae)报春苣苔属(*Primulina*)的多年生草本植物,本种在广西灵川县首次发现。该种的主要特征是叶片具有棕色的条纹,花朵形态美丽,四季常绿,是极具观赏价值的喀斯特地区野生花卉。目前尚未有褐纹报春苣苔的相关研究报道,对其物种保护十分不利。褐纹报春苣苔的繁殖可以采用种子播种或叶片扦插的方法,但种子细小不易收集,采种繁琐,扦插繁殖系数小,出芽时间长,不利于人工繁殖的规模化。离体快繁具有繁殖系数大、繁殖时间短的优点,是人工繁育种苗的极佳手段,也是种质资源保存重要手段,如张占江等(2014)利用离体培养的方法对弄岗报春苣苔进行了保存。

离体快繁的途径有不定芽途径和愈伤组织诱导途径。这两种途径在苦苣苔科报春苣苔属的其他植物上已有报道,其中以不定芽途径的相关报道较多,侯娜等(2015)以荔波报春苣苔的叶片为外植体,通过不定芽途径获得了再生植株,付传明等(2015)以条叶报春苣苔的叶片为外植体,通过不定芽途径建立了其离体快繁体系,潘梅等(2014)通过不定芽途径成功建立了烟叶报春苣苔的再生繁殖体系,张占江等(2013)以条叶报春苣苔的叶片、种子为外植体,建立了条叶报春苣苔的组织培养和再生体系。尽管苦苣苔的组培研究逐年增多,但关于褐纹报春苣苔的组培研究并未见有报道。本研究以褐纹报春苣苔的叶片为材料,通过不定芽途径和愈伤组织诱导途径建立其高效稳定的组培快繁体系,为褐纹报春苣苔的物种保育和遗传转化提供理论和技术基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

经人工驯化的褐纹报春苣苔成熟植株,由广西壮族自治区农业科学院花卉研究所提供。

1.2 培养基及培养条件

以 MS 为基本培养基,以培养目的添加不同种类和浓度的植物生长调节剂,白砂糖为 30 g · L⁻¹,琼脂为 6.0 g · L⁻¹,pH 5.8~6.2(生根培养用 1/2MS 为基本培养基,其大量元素和白砂糖为 MS 培养基中的 1/2,其余成分的含量和 MS 培养基保持一致),配制分装后,于 121 °C 灭菌 25 min。冷却后接种,在温度(28 ± 1) °C、光照强度 2 000 lx、光照时间 14~16 h · d⁻¹的条件下培养。

1.3 外植体的灭菌

春季取健康植株的幼嫩叶片,洗衣粉浸洗 10 min,再在流水下冲洗 0.5 h,然后转移到超净工作台进行灭菌的操作。先用棉球蘸取 75%酒精溶液拭擦叶片的正反两面,无菌水冲洗 5 次;再将叶片在 75%酒精溶液中浸泡 10~12 s,无菌水冲洗 5 次;最后将叶片在 0.1%升汞溶液中浸泡 10 min,无菌水冲洗 5 次。灭菌过程中,轻轻震荡使叶片充分接触溶液。灭菌结束后,将叶片切成 1 cm × 1 cm 大小,按照叶面朝上、叶背朝下的方式平铺接入不同的培养基中(图 1:A)。

1.4 不定芽诱导及增殖

1.4.1 不定芽诱导 将叶片接入培养基中。每种培养基接种叶片 30 片,3 次重复。培养 30 d 及 60 d 后,统计从叶片直接诱导出不定芽的数量,计算不定芽诱导率:不定芽诱导率=产生不定芽叶片数/接种数×100%。

1.4.2 不定芽增殖 将获得的不定芽接入增殖培养基中。每种培养基接种不定芽 30 株,3 次重复。培养 30 d 后计算增殖系数:增殖系数=新芽数/接种芽数。

1.5 愈伤组织诱导及分化

1.5.1 愈伤组织诱导 将叶片接入培养基中。每种培养基接种叶片 30 片,3 次重复。培养 30 d 及 60 d 后,统计从叶片直接诱导出的愈伤组织数、不定芽数以及愈伤分化出的不定芽数,计算愈伤组织诱导率。

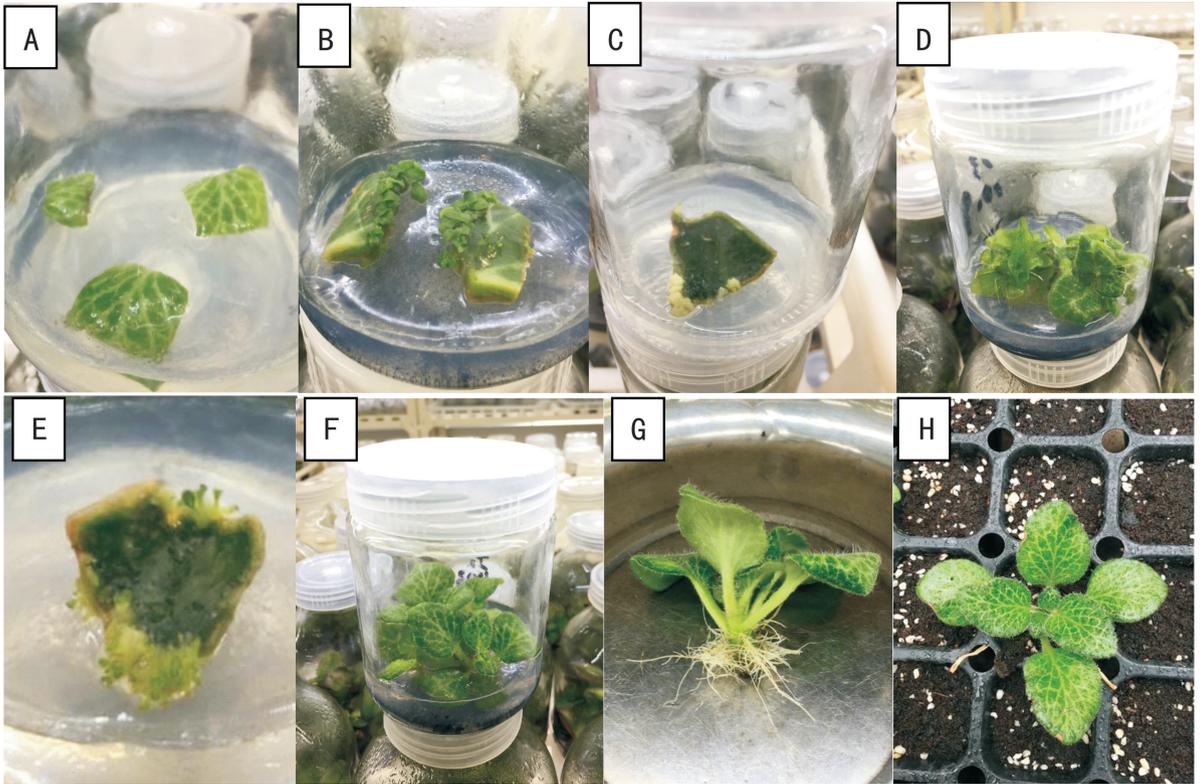


图 1 褐纹报春苣苔组织培养的主要过程 A. 外植体接种; B. 叶片诱导不定芽; C. 叶片诱导愈伤组织; D. 不定芽的增殖; E. 愈伤组织分化; F, G. 生根; H. 移栽。

Fig. 1 Main process of tissue culture for *Primulina glandaceistriata* A. Explant inoculation; B. Adventitious bud inducing from leaves; C. Callus inducing from leaves; D. Subculture of adventitious bud; E. Callus differentiation; F, G. Rooting; H. Transplanted plantlets.

愈伤组织诱导率 = 产生愈伤组织的叶片数 / 接种数 $\times 100\%$ 。

1.5.2 愈伤组织分化培养 将获得的愈伤组织接入愈伤组织分化培养基中。每种培养基接种愈伤组织 30 块, 3 次重复。培养 30 d 后统计新芽分化系数。

分化系数 = 分化新芽数 / 接种数。

1.6 生根培养与炼苗移栽

将具有 4 片以上叶片的小苗接入生根培养基中进行生根诱导培养。每种培养基接种小苗 30 株, 3 次重复。培养 30 d 后统计产生根的植株数量, 并对根长、根条数进行记录, 计算生根率。

待植株生根后, 将具有 6 片以上叶片、根数 7 条以上、根长 3 cm 以上的组培瓶苗放置温室中炼苗 5~7 d 后在温室中进行移栽, 移栽基质为泥炭混合珍珠岩 (体积比为 2 : 1), 20 d 后统计移栽成活率。

1.7 统计分析

采用 Excel 2003 软件进行统计处理, 采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析以及 Duncan's 多重比较。小写字母表示差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不定芽以及愈伤组织的诱导

2.1.1 不定芽的诱导 从表 1 可以看出, 在 30 d 的培养时间内, 添加 6-BA 的培养基可从叶片直接诱导出不定芽, 但无愈伤组织形成。在相同的 NAA 浓度下, 不定芽率及不定芽数随着 6-BA 浓度的增加呈先上升后下降的趋势, 当 6-BA 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不定芽率以及不定芽数为最高; 在相同的 6-BA 浓度下, 不定芽率以及不定芽数随着 NAA 浓度的增加而增加, 当 NAA 浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不定

表 1 不同植物生长调节剂配比对褐纹报春苜苔不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of different plant growth regulator combinations on inducing adventitious buds of *Primulina glandaceistriata*

编号 Code	植物生长调节剂浓度 Plant growth regulator concentration (mg · L ⁻¹)		30 d 愈伤 诱导率 Rate of callus induction after 30 d (%)	30 d 不定芽 诱导率 Rate of bud induction after 30 d (%)	30 d 不定芽数 Bud number after 30 d	60 d 愈伤 诱导率 Rate of callus induction after 60 d (%)	60 d 不定芽 诱导率 Rate of bud induction after 60 d (%)	60 d 不定芽数 Bud number after 60 d
	6-BA	NAA						
1	0.5	0.05	0	27.78d	69.00d	0	100	101.67e
2	1.0	0.05	0	44.44c	70.67d	0	100	104.00e
3	1.5	0.05	0	50.00bc	80.00bc	0	100	106.67e
4	2.0	0.05	0	64.44ab	82.67ab	0	100	155.00bc
5	2.5	0.05	0	51.11bc	72.67d	0	100	135.67d
6	3.0	0.05	0	52.22bc	80.67bc	0	100	143.33cd
7	0.5	0.10	0	53.33bc	74.00cd	0	100	158.67b
8	1.0	0.10	0	55.56abc	71.33de	0	100	166.00b
9	1.5	0.10	0	60.00abc	86.33ab	0	100	186.00a
10	2.0	0.10	0	71.11a	89.67a	0	100	190.00a
11	2.5	0.10	0	57.78abc	85.33ab	0	100	183.67a
12	3.0	0.10	0	55.56abc	84.67ab	0	100	182.67a

注: 同列数据后不同小写字母表示差异达显著水平($P < 0.05$)。下同

Note: In the same series, values with different lower case letters mean the differences was significant ($P < 0.05$). The same below.

表 2 不同植物生长调节剂配比对褐纹报春苜苔愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different plant growth regulator combinations on inducing callus of *Primulina glandaceistriata*

编号 Code	植物生长调节剂浓度 Plant growth regulator concentration (mg · L ⁻¹)		30 d 愈伤 诱导率 Rate of callus induction after 30 d (%)	30 d 不定芽 诱导率 Rate of bud induction after 30 d (%)	30 d 不定芽数 Bud number after 30 d	60 d 愈伤诱导率 Rate of callus induction after 60 d (%)	60 d 不定芽诱导率 Rate of bud induction after 60 d (%)	60 d 不定芽数 Bud number after 60 d
	TDZ	NAA						
Y ₁	0.5	0.05	31.11d	0	0	100	0	124.00e
Y ₂	1.0	0.05	43.33c	0	0	100	0	126.00e
Y ₃	1.5	0.05	54.44b	0	0	100	0	140.33d
Y ₄	2.0	0.05	58.89ab	0	0	100	0	153.00c
Y ₅	2.5	0.05	55.56ab	0	0	100	0	142.00d
Y ₆	3.0	0.05	57.78ab	0	0	100	0	141.33d
Y ₇	0.5	0.10	41.11c	0	0	100	0	137.67d
Y ₈	1.0	0.10	56.67bc	0	0	100	0	142.33d
Y ₉	1.5	0.10	61.11ab	0	0	100	0	185.67b
Y ₁₀	2.0	0.10	65.56a	0	0	100	0	208.00a
Y ₁₁	2.5	0.10	62.22ab	0	0	100	0	187.33b
Y ₁₂	3.0	0.10	58.89ab	0	0	100	0	184.00b

表 3 不同植物生长调节剂配比对褐纹报春苣苔不定芽增殖培养的影响

Table 3 Effects of different plant growth regulator combinations on subculture to adventitious buds of *Primulina glandaceistriata*

编号 Code	植物生长调节剂浓度 Plant growth regulator concentration (mg · L ⁻¹)			增殖系数 Multiplication coefficient	生长情况 Growing situation
	KT	ZT	NAA		
J ₁	1.0	0	0.05	7.30i	长势差,少数玻璃化 Poor growth, less vitrification
J ₂	2.0	0	0.05	7.91fgh	长势差,少数玻璃化 Poor growth, less vitrification
J ₃	3.0	0	0.05	7.45hi	长势差,少数玻璃化 Poor growth, less vitrification
J ₄	1.0	0	0.10	8.06fg	长势一般,少数玻璃化 Common growth, less vitrification
J ₅	2.0	0	0.10	8.46f	长势一般,少数玻璃化 Common growth, less vitrification
J ₆	3.0	0	0.10	8.20f	长势一般,少数玻璃化 Common growth, less vitrification
J ₇	1.0	0	0.15	7.43hi	长势一般,少数玻璃化 Common growth, less vitrification
J ₈	2.0	0	0.15	7.99fgh	长势差,大部分玻璃化 Poor growth, more vitrification
J ₉	3.0	0	0.15	7.58ghi	长势差,大部分玻璃化 Poor growth, more vitrification
J ₁₀	0	1.0	0.05	9.23e	长势良,极少玻璃化 Fine growth, little vitrification precious
J ₁₁	0	2.0	0.05	9.83cd	长势良,极少玻璃化 Fine growth, little vitrification precious
J ₁₂	0	3.0	0.05	9.30de	长势一般,少数玻璃化 Common growth, less vitrification
J ₁₃	0	1.0	0.10	10.24bc	长势好,无玻璃化 Excellent growth, none vitrification
J ₁₄	0	2.0	0.10	11.09a	长势好,无玻璃化 Excellent growth, none vitrification
J ₁₅	0	3.0	0.10	10.39bc	长势一般,少数玻璃化 Common growth, less vitrification
J ₁₆	0	1.0	0.15	9.43de	长势一般,少数玻璃化 Common growth, less vitrification
J ₁₇	0	2.0	0.15	10.51b	长势差,大部分玻璃化 Poor growth, more vitrification
J ₁₈	0	3.0	0.15	10.08bc	长势差,大部分玻璃化 Poor growth, more vitrification

注:所有培养基均添加 0.1 g · L⁻¹ 活性炭。

Note: All the medium added active carbon 0.1 g · L⁻¹.

芽率以及不定芽数最高。在 60 d 的培养时间内,在各培养基上无愈伤组织产生,各培养基之间的不定芽诱导率无显著差异,均为 100.00%,不定芽数以培养基 MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹ 的最多。综上可知,6-BA 结合 NAA 可直接从叶片诱导出不定芽(图 1:B),不能直接诱导出愈伤组织,因此,适宜的不定芽诱导培养基为 MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹。

2.1.2 愈伤组织的诱导 从表 2 可以看出,在 30 d 的培养时间内,添加了 TDZ 的培养基可从叶片直接诱导出愈伤组织,但无不定芽产生。在相同的 NAA 浓度下,愈伤诱导率随着 TDZ 浓度的增加呈现先上

升后下降的趋势,当 TDZ 浓度为 2.0 mg · L⁻¹ 时,愈伤诱导率最高;在相同的 TDZ 浓度下,愈伤诱导率随着 NAA 浓度的增加而增加,当 NAA 浓度为 1.0 mg · L⁻¹ 时,愈伤诱导率最高。在 60 d 的培养时间内,各培养基的愈伤诱导率无显著差异,均为 100%。此外,未获得从叶片直接诱导出的不定芽数,但获得了从愈伤组织分化出的不定芽,且各培养基之间的由愈伤组织分化出来的不定芽数具有显著差异,以培养基为 MS+TDZ 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹ 的不定芽最多,显著高于其他培养基。综上可知,TDZ 结合 NAA 可从叶片诱导出愈伤组织(图 1:C),不能直接诱导出不定芽,随着培养时间的

表 4 不同植物生长调节剂配比对褐纹报春苣苔愈伤组织分化的影响

Table 4 Effects of different plant growth regulator combinations on callus differentiation of *Primulina glandaceistriata*

编号 Code	培养基 Medium	ZT (mg · L ⁻¹)	NAA (mg · L ⁻¹)	IAA (mg · L ⁻¹)	分化系数 Differentiation coefficient	生长情况 Growing situation
C ₁	MS	0.5	0.05	0	11.11d	长势良, 苗较健壮, 少数玻璃化 Fine growth, stronger seedling, less vitrification
C ₂	MS	1.0	0.05	0	11.37bcd	长势良, 苗较健壮, 少数玻璃化 Fine growth, stronger seedling, less vitrification
C ₃	MS	1.5	0.05	0	11.13cd	长势一般, 苗细弱, 多数玻璃化 Common growth, weaker seedling, more vitrification
C ₄	MS	2.0	0.05	0	11.16cd	长势一般, 苗细弱, 多数玻璃化 Common growth, weaker seedling, more vitrification
C ₅	MS	0.5	0.10	0	11.70bcd	长势好, 苗健壮, 无玻璃化 Excellent growth, stronger seedling, none vitrification
C ₆	MS	1.0	0.10	0	12.46a	长势好, 苗健壮, 无玻璃化 Excellent growth, stronger seedling, none vitrification
C ₇	MS	1.5	0.10	0	11.83b	长势良, 苗较健壮, 少数玻璃化 Fine growth, stronger seedling, less vitrification
C ₈	MS	2.0	0.10	0	11.76bc	长势良, 苗较健壮, 少数玻璃化 Fine growth, stronger seedling, less vitrification
C ₉	MS	0.5	0.15	0	11.17cd	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₁₀	MS	1.0	0.15	0	11.44 bcd	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₁₁	MS	1.5	0.15	0	11.21cd	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₁₂	MS	2.0	0.15	0	11.19cd	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₁₃	MS	0.5	0	0.05	8.83h	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₁₄	MS	1.0	0	0.05	9.18 efgh	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₁₅	MS	1.5	0	0.05	8.91fgh	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₁₆	MS	2.0	0	0.05	8.89gh	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₁₇	MS	0.5	0	0.10	9.43efgh	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₁₈	MS	1.0	0	0.10	9.59e	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₁₉	MS	1.5	0	0.10	9.51efg	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₂₀	MS	2.0	0	0.10	9.53ef	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₂₁	MS	0.5	0	0.15	9.00 efgh	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₂₂	MS	1.0	0	0.15	9.33efgh	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₂₃	MS	1.5	0	0.15	9.11 efgh	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification
C ₂₄	MS	2.0	0	0.15	9.06 efgh	长势差, 苗细弱, 多数玻璃化 Poor growth, weaker seedling, more vitrification

表 5 不同植物生长调节剂对比对褐纹报春苜苔生根培养的影响

Table 5 Effects of different plant growth regulator combinations on rooting culture of *Primulina glandaceistriata*

编号 Code	植物生长调节剂浓度 Plant growth regulator concentration (mg · L ⁻¹)			生根率 Rooting rate (%)	平均根长 Root length (cm)	平均根数 Root number	生长情况 Growing situation
	IBA	NAA	IAA				
R ₁	0.10	0	0	93.33 bcde	3.33cd	7.00bcd	健壮,根长,根多 Stronger seedling, longer and more root
R ₂	0.50	0	0	96.67abcd	3.83ab	9.00ab	健壮,根长,根多 Stronger seedling, longer and more root
R ₃	0	0.05	0	92.22cde	2.90ef	6.00de	矮小,根短,根少 Small seedling, short and less root
R ₄	0	0.10	0	94.44 abcde	3.10de	8.00bed	细弱,根长,根多 Weak seedling, longer and more root
R ₅	0	0	0.10	90.00e	2.67f	4.33f	矮小,根短,根少 Small seedling, short and less root
R ₆	0	0	0.50	91.11de	2.70f	6.67cd	矮小,根短,根少 Small seedling, short and less root
R ₇	0.10	0	0	100.00a	3.80ab	8.33bc	健壮,根长,根多 Stronger seedling, longer and more root
R ₈	0.50	0	0	100.00a	4.00a	10.33a	健壮,根长,根多 Stronger seedling, longer and more root
R ₉	0	0.05	0	97.78abc	3.57bc	7.67bed	细弱,根长,根多 Weak seedling, longer and more root
R ₁₀	0	0.10	0	98.89ab	3.87ab	8.67abc	细弱,根长,根多 Weak seedling, longer and more root
R ₁₁	0	0	0.10	94.44 abcde	3.33cd	6.00de	矮小,根短,根少 Small seedling, short and less root
R ₁₂	0	0	0.50	95.56abede	3.63abc	7.33bed	矮小,根短,根少 Small seedling, short and less root

注: R₁-R₆ 的无机盐为 MS; R₇-R₁₂ 的无机盐为 1/2MS。所有培养基均添加 0.05 g · L⁻¹ 活性炭。

Note: R₁-R₆ of the inorganic salts were the same as MS medium; R₇-R₁₂ of the inorganic salts were the same as 1/2MS medium. All the medium added active carbon 0.05 g · L⁻¹.

增加,可从愈伤组织分化出不定芽,因此,适宜的愈伤组织诱导培养基为 MS + TDZ 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.10 mg · L⁻¹。

2.2 不定芽增殖培养

由表 3 可以看出,在培养基上附加不同浓度的植物生长调节剂对不定芽的增殖培养具有不同的影响。增殖系数随着 KT 和 NAA 浓度的增加而增加,同时,增殖系数也随着 ZT 和 NAA 浓度的增加而递增,当 ZT 为 2.0 mg · L⁻¹、NAA 为 0.10 mg · L⁻¹,增殖系数最大,为 11.09;当 NAA 的浓度相同时,ZT 处理组增殖系数显著高于 KT 处理组增殖系数。因此,ZT 更有利于褐纹报春苜苔的不定芽增殖,适宜褐纹报春苜苔不定芽增殖培养的培养基为 MS+ZT 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹+活性炭 0.05 g · L⁻¹,增殖系数为 11.09,在此培养基上,植株生长好,无玻璃化(图 1:D)。

2.3 愈伤组织的分化

由表 4 可知,随着植物生长调节剂浓度的增加,

愈伤组织的分化系数随之增加,并在达到一定浓度后下降,即在一定的 NAA 或 IAA 浓度下,随着 ZT 浓度的增加,分化系数先增加后减少,但变化不显著;在一定的 ZT 浓度下,随着 NAA 或 IAA 浓度的增加,分化系数也呈现出先增加后减少的趋势。此外,添加 NAA 培养基的分化系数的显著高于添加 IAA 培养基的分化系数,当 ZT 浓度为 1.0 mg · L⁻¹, NAA 浓度为 0.10 mg · L⁻¹时,分化系数最大(图 1:E),而添加 IAA 的培养基,分化得到的植株长势差,玻璃化严重。综上可知,生长素中,NAA 较 IAA 更适于褐纹报春苜苔的愈伤组织分化,适宜的分化培养基为 MS+ZT 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.10 mg · L⁻¹,分化系数为 12.46,植株长势好,苗健壮,无玻璃化。

2.4 生根培养与炼苗移栽

2.4.1 生根培养 根据表 5 的数据进行方差分析可知,随着生长素浓度的增加,生根率随之增加,但增加不显著。在 1/2MS 的培养基上附加 IBA 浓度为 0.10 mg · L⁻¹ 和 0.50 mg · L⁻¹ 时,生根率最大,为

100%, 平均根长无显著差异, 平均根数存在显著差异, 但植株的生长都健壮。因此, 适宜褐纹报春苣苔生根的培养基为 $1/2MS+IBA 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+$ 活性炭 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $1/2MS+IBA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+$ 活性炭 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 生根率为 100%, 植株健壮, 根长, 根多, 有利于后期的移栽成活(图 1:F、G)。

2.4.2 炼苗移栽 移栽好的褐纹报春苣苔应放置在遮阴处, 保持空气湿度在 75% 以上, 早晚浇水, 保持基质湿润, 20 d 后, 统计成活率, 为 100.00% (图 1:H)。

3 讨论与结论

植物生长调节剂是组培快繁的重要影响因子, 不同种类的植物生长调节剂对外植体生长和分化的作用不同, 同种植物生长调节剂浓度不同, 其作用也有差异, 因此, 对外植体的脱分化、生长和分化有关键作用的是植物生长调节剂浓度的配比。本研究在叶片的初代诱导中采用了两种不同的细胞分裂素结合同一种生长素进行诱导, 发现 6-BA 结合 NAA, 仅能诱导不定芽而不能诱导愈伤组织, TDZ 结合 NAA 仅能诱导愈伤组织而不能诱导不定芽, 初代培养后期获得的不定芽是由愈伤组织分化得到的。这与前人的结果有所不同: 谭晓风等(2009)在进行葇荑唇柱苣苔组培快繁时, 以 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 结合 NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 获得较好的愈伤组织; 文毅等(2016)则认为 TDZ 对大苞短毛唇柱苣苔的不定芽诱导起主要作用, 浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 有利于诱导率和不定芽数量的提高; 罗洁等(2016)以培养基 MS+TDZ $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}+$ NAA $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为双片苣苔叶片诱导不定芽发生的适宜培养基。可见, 在前人的研究中, 6-BA 结合 NAA 可以获得较好的愈伤组织, 而 TDZ 结合 NAA 可以直接从叶片诱导出不定芽。但潘梅等(2015)发现, 采用 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TDZ 对黄花马铃苣苔不定芽的增殖效果并不理想, 这与本试验的研究结果是相一致的。产生这种差异的原因是物种自身基因型的差异, 此外, 植物生长调节剂种类和浓度也是导致差异产生的重要原因。

通过组织培养获得再生植株的途径有两个: 一是直接诱导不定芽途径, 二是通过愈伤组织诱导不定芽途径。在已有的研究中, 桂林小花苣苔(苏以

丽, 2012; 黄宁珍等, 2010a) 和半蒴苣苔(阮慧泽等, 2014; 汤正辉等 2005) 通过两种途径成功建立了其组培快繁体系; 菱叶报春苣苔(李翠等, 2010)、多齿吊石苣苔(黄宁珍等, 2010b) 和刺齿唇柱苣苔(汤正辉等, 2004) 则通过愈伤组织诱导途径建立了组培快繁体系; 而桂黔吊石苣苔(付传明等, 2014) 虽然可以诱导出愈伤组织, 但愈伤诱导率较低、分化成苗困难。本研究通过两种途径成功建立了褐纹报春苣苔的组培快繁体系, 但褐纹报春苣苔叶片直接诱导不定芽的组培快繁途径, 比通过愈伤组织诱导不定芽途径更节省培养时间, 而且可以避免因愈伤组织分化不定芽过程可能产生的变异, 因此, 直接诱导不定芽途径是褐纹报春苣苔组培快繁的有效途径。

参考文献:

- FU CM, JIANG HT, HUANG NZ, et al, 2014. Tissue culture and rapid propagation of *Lysionotus aeshynanthoides* [J]. Guihaia, 34(6):874-878. [付传明, 江海涛, 黄宁珍, 等, 2014. 桂黔吊石苣苔的组织培养与快速繁殖 [J]. 广西植物, 34(6):874-878.]
- FU CM, XIAN KH, HE JX, et al, 2015. Rapid propagation technique of *Chirita ophiopogoides* in vitro [J]. Seed, 34(4):118-122. [付传明, 洗康华, 何金祥, 等, 2015. 条叶唇柱苣苔离体快繁技术研究 [J]. 种子, 34(4):118-122.]
- HOU N, TIAN XR, LOU L, et al, 2015. Efficient adventitious bud induction and plant regeneration from leaves of *Chirita liboensis* [J]. J For Eng, 29(4):67-70. [侯娜, 田晓瑞, 娄丽, 等, 2015. 荔波唇柱苣苔离体叶片不定芽的诱导及植株再生 [J]. 林业科技开发, 29(4):67-70.]
- HUANG NZ, FU CM, ZHAO ZG, et al, 2010a. Rapid propagation in vitro of *Chiritopsis repanda* var. *guilinensis* [J]. Chin Bull Bot, 45(6):744-750. [黄宁珍, 付传明, 赵志国, 等, 2010a. 桂林小花苣苔离体快速繁殖技术 [J]. 植物学报, 45(6):744-750.]
- HUANG NZ, ZHAO ZG, SHI YP, et al, 2010b. Tissue culture and rapid propagation of *Lysionotus denticulosus* W. T. Wang [J]. Plant Physiol Comm, 46(9):965-966. [黄宁珍, 赵志国, 石云平, 等, 2010b. 多齿吊石苣苔的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 46(9):965-966.]
- LI C, LÜ HZ, LING ZZ, et al, 2010. Tissue culture and rapid propagation of *Chirita subrhomboidea* W. T. Wang [J]. Plant Physiol Comm, 46(10):1073-1074. [李翠, 吕惠珍, 凌征柱, 等, 2010. 菱叶唇柱苣苔的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 46(10):1073-1074.]
- LUO J, YANG G, CHEN HF, 2016. Rapid propagation in vitro

- of *Didymostigma obtusum* [J]. *J NW For Univ*, 31(3):165-169. [罗洁, 杨国, 陈红锋, 2016. 双片苣苔的离体培养 [J]. *西北林学院学报*, 31(3):165-169.]
- PAN M, HUANG S, QI HS, et al, 2015. *In vitro* culture and rapid propagation of *Oreocharis flavida* [J]. *Plant Physiol J*, 51(10):1729-1734. [潘梅, 黄赛, 戚华莎, 等, 2015. 黄花马铃苣苔的离体培养与快速繁殖 [J]. *植物生理学报*, 51(10):1729-1734.]
- PAN M, QI HS, HUANG S, et al, 2014. Research on differentiation and plant from *in vitro* leaf tissues of *Chirita heterotricha* Merr. O [J]. *N Hortic*, (23):83-86. [潘梅, 戚华莎, 黄赛, 等, 2014. 烟叶唇柱苣苔叶片分化与植株再生研究 [J]. *北方园艺*, (23):83-86.]
- RUAN HZ, LI Z, REN YY, et al, 2014. Plantlet regeneration of *Hemiboea subcapitata* with subculturing [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 31(1):162-166. [阮慧泽, 李珍, 任燕燕, 等, 2014. 半蒴苣苔的叶片组织培养及植株再生 [J]. *浙江农林大学学报*, 31(1):162-166.]
- SHU YL, 2012. Studies on rapid reproduction and organ formation of *Chiritopsis repanda* var. *guilinensis* [D]. Guilin: Gaungxi Normal University. [苏以丽, 2012. 桂林小花苣苔的快速繁殖及器官发生研究 [D]. 桂林:广西师范大学.]
- TAN XF, DENG JJ, HU XY, et al, 2009. Tissue culture and plant regeneration in *Chirita langshanica* [J]. *Nonw For Res*, 27(3):24-27. [谭晓风, 邓建军, 胡晓义, 等, 2009. 茛山唇柱苣苔组织培养与植株再生 [J]. *经济林研究*, 27(3):24-27.]
- TANG ZH, SHI L, CHEN WL, et al, 2004. *In vitro* micropropagation of *Chirita spinulosa* [J]. *Plant Physiol Comm*, 40(2):211. [汤正辉, 石雷, 陈维伦, 等, 2004. 刺齿唇柱苣苔的离体快速繁殖 [J]. *植物生理学通讯*, 40(2):211.]
- TANG ZH, SHI L, CHEN WL, et al, 2005. Tissue culture and rapid propagation of *Hemiboea subcapitata* [J]. *Plant Physiol Comm*, 41(3):333. [汤正辉, 石雷, 陈维伦, 等, 2005. 半蒴苣苔的组织培养和快速繁殖 [J]. *植物生理学通讯*, 41(3):333.]
- WEN T, LOU L, HOU N, et al, 2016. *In vitro* culture and rapid propagation of *Chirita brachytricha* var. *magnibracteata* W. T. Wang et D. Y. Chen [J]. *Nat Prod Res Dev*, 28:350-353. [文昶, 娄丽, 侯娜, 等, 2016. 大苞短毛唇柱苣苔离体培养和快速繁殖 [J]. *天然产物研究与开发*, 28:350-353.]
- ZHANG ZJ, LI C, LÜ HZ, et al, 2013. Study on tissue culture of *Chirita ophiopogoides* D Fang et W. T. Wang [J]. *Seed*, 32(9):19-22. [张占江, 李翠, 吕惠珍, 等, 2013. 条叶唇柱苣苔组织培养研究 [J]. *种子*, 32(9):19-22.]
- ZHANG ZJ, LI C, WEI Y, et al, 2014. *In vitro* conservation technique of rare or endangered germplasm in *Chirita longgangensis* W. T. Wang in Guizhou [J]. *N Hortic*, (4):136-138. [张占江, 李翠, 韦莹, 等, 2014. 珍稀濒危药用植物弄岗唇柱苣苔离体保存研究 [J]. *北方园艺*, (4):136-138.]