

烟叶唇柱苣苔叶片分化与植株再生研究

潘 梅, 戚华莎, 黄 赛, 王景飞, 符瑞侃, 云 勇

(海南省农业科学院 园林花卉研究所, 海南 海口 571100)

摘 要:以烟叶唇柱苣苔叶片为外植体, MS 为基本培养基, 研究了植物生长调节剂对其不定芽诱导、增殖与不定根形成的影响, 以期建立烟叶唇柱苣苔的再生繁殖体系。结果表明: 采用 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基, 不定芽诱导率达到 100%, 该培养基对不定芽的增殖和生长效果好, 40 d 的增殖系数达到 7.43; 采用 MS+NAA 0.5 mg/L 培养基, 30 d 生根率 100%; 组培苗在珍珠岩基质中移栽, 成活率可达 94% 以上。

关键词:烟叶唇柱苣苔; 叶片; 离体培养

中图分类号:Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)23-0083-04

海南苦苣苔科植物约有 13 属 21 种 1 变种, 其中特有属 2 个, 特有种 10 种^[1], 许多种具有观赏和药用价值。烟叶唇柱苣苔(*Chirita heterotricha* Merr. O) 属苦苣苔科唇柱苣苔属多年生草本植物, 是海南特有珍稀苦苣苔科植物, 分布于海南的琼中、琼海、保亭、三亚、白沙、东方, 生于海拔约 430 m 的山谷林中或溪边石上^[2]。烟叶唇柱苣苔叶片绿色、大而挺立, 花冠淡紫色或白色, 极为优雅, 花期 5—10 月, 四季常绿, 是一种适合观赏和园艺的野生花卉, 目前尚鲜见人工栽培的报道。烟叶唇柱苣苔在自然条件下种子不易形成, 且种子细小难收集。可用叶片进行扦插繁殖, 但叶插繁殖系数小, 时间长, 需 60 d 以上才能出芽, 一叶可长出 1~3 个芽。组织培养技术是人工繁殖种苗最为有效的方法, 可以满足烟叶唇柱苣苔的商品性开发和技术研究的需要。有关烟叶唇柱苣苔组织培养研究的报道仅见 1 篇^[3]。该研究以烟叶唇柱苣苔叶片作为外植体, 研究了不定芽诱导、增殖、生根及移栽管理的最佳培养条件, 以期建立烟叶唇柱苣苔的快速繁殖体系, 为其应用研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植株烟叶唇柱苣苔采自海南省保亭县, 取其幼

叶作为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 以 MS 为基本培养基, 附加 30.0 g/L 的食用白糖, 9.0 g/L 的卡拉胶, 灭菌前 pH 6.0, 配制分装后于温度 121℃, 压力 0.14 MPa 的条件下灭菌 20 min。

1.2.2 培养条件 培养温度(26±2)℃, 光照强度 1 500 lx, 光照时间为 9 h/d。

1.2.3 外植体表面消毒与无菌材料的获得 从植株上剪下带叶柄的幼嫩叶片, 用棉花球蘸洗洁精液擦拭叶片两面, 然后用自来水清洗干净。在超净工作台上用 70% 酒精浸泡 20 s, 无菌水冲洗 1 次, 再用 0.02% HgCl₂ 溶液消毒 3 min, 最后用无菌水冲洗 5 次。将叶片切成 1 cm 见方的小块以叶面朝上接种于初代培养基中。接种 15 d 后, 叶面开始膨大隆起, 25 d 开始有小芽点萌动, 40 d 在叶片边缘、主叶脉基部和叶面处均分化出不定芽(图 1)。

1.2.4 初代培养 以 MS+NAA 0.1 mg/L 作为基本培养基, 分别添加 0.1 mg/L 的 6-BA、KT 和 TDZ 3 种细胞分裂素进行比较试验; 设置 6-BA 0.1、0.5、1.0 mg/L 和 NAA 0.1、0.5 mg/L 组成 6 个配比组合。取无菌植株小叶片(约 0.5 cm×0.5 cm)以叶面朝上接种进行不定芽诱导试验, 每种处理接种 8 袋, 每袋 3 叶, 3 次重复, 定期观察记录, 培养 40 d 后统计叶片不定芽诱导率和平均不定芽数。不定芽诱导率(%)=诱导芽叶片数/接种叶片数×100%, 平均不定芽数=不定芽总数/诱导芽叶片数。

1.2.5 增殖培养 在 MS+NAA 0.1 mg/L 的培养基中分别添加 0.5 mg/L 的 6-BA、KT 和 TDZ 3 种细胞分裂素进行比较试验; 设置 6-BA 0.1、0.5、1.0、2.0 mg/L 和 NAA 0.1、0.2、0.3、0.5 mg/L 各 4 个浓度水平的配

第一作者简介:潘梅(1962-), 女, 广西隆安人, 本科, 高级园艺师, 研究方向为植物组织培养研究与开发利用。E-mail: panmei200@sina.com.

责任作者:云勇(1965-), 男, 海南文昌人, 本科, 副研究员, 研究方向为热带作物种源收集与开发利用。E-mail: yyong3819@163.com.

基金项目:2013 年海南省科学事业费资助项目(琼财预[2013]131 号)。

收稿日期:2014-07-16

比,共 16 种处理。选择初代培养获得的较均一不定芽单个接种进行增殖试验,每袋接种 3 个材料,每种处理均接种 8 袋,重复 3 次,定期观察记录,40 d 后统计芽增殖系数。芽增殖系数=不定芽总数/接种芽数。

1.2.6 生根培养 以 MS 为基本培养基,添加 IBA、IAA 和 NAA 各 0.5 mg/L 3 种生长素进行比较试验;在 MS 培养基中添加不同浓度的 NAA(0.2、0.5、0.8、1.0、1.5 mg/L),以不加 NAA 的培养基作为对照。增殖培养获得的高约 1.2 cm 的芽苗接入各种生根培养基上,比较根系分化情况,每袋接种 3 个材料,每种处理均接种 8 袋,重复 3 次,定期观察记录,30 d 后统计生根率、生根数、株高。生根率(%)=生根苗数/接种苗数×100%,生根数为根长大于等于 0.2 cm 的根数。

1.2.7 组培苗的练苗与移栽 将生根培养 30 d 的小苗移入拱棚内练苗 7 d,用清水洗去根部残留的培养基,栽植于珍珠岩中,30 d 后统计成活率。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2007 软件进行统计、方差分析,新复极差法进行均数间多重比较,统计测验均为 99% 水平。

2 结果与分析

2.1 烟叶唇柱苣苔的初代培养

2.1.1 不同种类细胞分裂素对外植体芽诱导的影响

由表 1 可知,6-BA 和 TDZ 对叶片不定芽的诱导率均达到 100%,但诱导的平均不定芽数差异极为显著,6-BA 平均每叶不定芽达到 7.17 个,而 TDZ 仅为 4.25 个;诱导效果最差的为 KT,不定芽诱导率仅为 47.62%,平均不定芽数为 3.10 个。从生长势看,6-BA 诱导的不定芽长势好,KT 诱导的不定芽也正常,但较细小,而 TDZ 诱导的芽在 40 d 以后叶片出现水渍状,有较多的玻璃化现象。因此烟叶唇柱苣苔不定芽诱导培养的细胞分裂素宜选用 6-BA。

表 1 不同种类细胞分裂素对烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of different kinds of cytokinin on bud propagation of *Chirita heterotricha* Merr. O

细胞分裂素 Cytokinin (mg · L ⁻¹)	不定芽诱导率 Adventitious bud induction rate/%	平均不定芽数 The average number of adventitious buds/(个 · 叶 ⁻¹)	不定芽生长势 Adventitious bud growth
6-BA	100.00A	7.17A	长势良好,芽较大
KT	47.62B	3.10C	长势一般,芽细小
TDZ	100.00A	4.25B	长势一般,有玻璃化现象

2.1.2 不同 6-BA 和 NAA 浓度对比对烟叶唇柱苣苔芽诱导的影响 叶片接种于 6 种培养基中,25 d 后均有不定芽分化,40 d 平均不定芽数均达到 4 个以上。由表 2 可知,不同的 6-BA 和 NAA 对比对烟叶唇柱苣苔不定芽

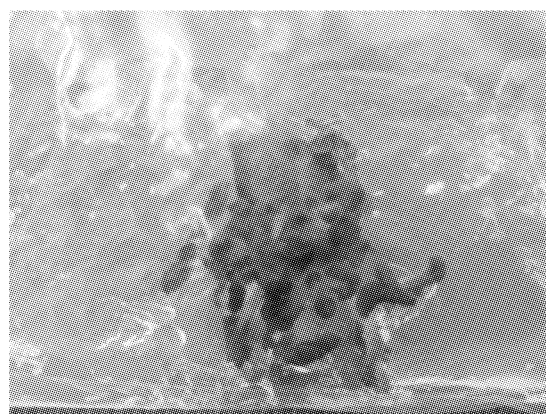


图 1 不定芽诱导

Fig. 1 Adventitious bud induction

诱导和生长影响极大,其中以 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的组合对不定芽的诱导效果最好,不定芽诱导率高达 100%,不定芽分化数量最多,平均每叶有 9.58 个,其芽苗生长势好,叶色绿而健壮。其次为 6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 组合,不定芽诱导率也高达 100%,但不定芽分化数量较少,为 7.20 个。方差分析结果表明,6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 组合与 6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 组合其不定芽诱导率差异不显著,与其它的配比组合差异则达到极显著水平;而平均不定芽数与其它配比的差异则达到极显著水平,因此,适合烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的 6-BA 和 NAA 浓度配比为 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

表 2 不同 6-BA 和 NAA 浓度对比对烟叶唇柱苣苔芽诱导的影响

Table 2 Effect of different 6-BA and NAA combinations on bud induction of *Chirita heterotricha* Merr. O

调节剂		不定芽诱导率	平均不定芽数	不定芽生长势
Regulator/(mg · L ⁻¹)		Adventitious bud	The average number of	Adventitious
6-BA	NAA	induction rate/%	adventitious buds/(个 · 叶 ⁻¹)	bud growth
0.1	0.1	100A	7.20B	长势良好
0.1	0.5	61.90E	5.22C	长势一般
0.5	0.1	100A	9.58A	长势良好
0.5	0.5	78.26D	4.19D	长势一般
1.0	0.1	90.48C	5.10C	长势良好
1.0	0.5	95.83B	5.34C	长势良好

2.2 烟叶唇柱苣苔的增殖培养

2.2.1 不同种类细胞分裂素对烟叶唇柱苣苔芽增殖的影响 由表 3 可知,3 种细胞分裂素对烟叶唇柱苣苔芽的增殖均有促进作用,其中 6-BA 的增殖效果最好,培养 30 d 和 40 d 的增殖系数分别达到 4.26 和 7.41,芽生长势最好,芽健壮;其次为 KT,30 d 和 40 d 的增殖系数分别为 2.74 和 6.00,芽长势好,芽体壮;最差的是 TDZ,30 d 和 40 d 增殖系数只有 1.85 和 3.18,且芽长势差,芽细小。方差分析表明,3 种细胞分裂素的不定芽增殖系

数间存在极显著差异,烟叶唇柱苣苔芽增殖培养中细胞分裂素宜选用 6-BA。

表 3 不同种类细胞分裂素对烟叶唇柱苣苔芽增殖的影响

Table 3 Effect of different kinds of cytokinin on bud propagation of *Chirita heterotricha* Merr. O

细胞分裂素 Cytokinin ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	30 d 增殖系数 30 days multiplication coefficient	40 d 增殖系数 40 days multiplication coefficient	生长状况 Growth status
6-BA	4.26A	7.41A	长势好,芽健壮
KT	2.74B	6.00B	长势好,芽壮
TDZ	1.85C	3.18C	长势差,芽细小

2.2.2 不同 6-BA 和 NAA 浓度对比对烟叶唇柱苣苔芽增殖的影响 从表 4 可以看出,16 种培养基对烟叶唇柱苣苔的芽增殖效果不同,6-BA 浓度为 0.5 mg/L 与 NAA 0.1 mg/L 两者配合时,增殖效果最好,培养 30 d 和 40 d 的增殖系数均最高,分别达到 4.05 和 7.43。低浓度和较高浓度的 6-BA 对烟叶唇柱苣苔芽的增殖生长不利,6-BA 0.1 mg/L 时,其与 NAA 0.3 mg/L 的组合芽分化最多,培养 30 d 和 40 d 的增殖系数分别为 3.21 和 6.28。6-BA 浓度在 1.0~2.0 mg/L 时,30 d 芽的增殖系数为 1.78~3.14,40 d 的增殖系数为 2.48~4.98。对各配比处理的增殖系数进行方差分析的结果表明,6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的组合与其它组合处理间的差异达到极显著性水平,而且芽苗长势好,健壮(图 2),因此,烟叶唇柱苣苔芽增殖培养的最优组合为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

表 4 不同 6-BA 和 NAA 组合对烟叶唇柱苣苔芽增殖的影响

Table 4 Effect of different 6-BA and NAA combinations on bud propagation of *Chirita heterotricha* Merr. O

调节剂 Regulator/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		30 d 增殖系数 30 days multiplication coefficient	40 d 增殖系数 40 days multiplication coefficient	生长状况 Growth status
6-BA	NAA			
0.1	0.1	2.54EF	4.44E	长势较好,芽较壮
0.1	0.2	3.11B	4.38E	长势较差,芽小
0.1	0.3	3.21B	6.28B	长势好,芽健壮
0.1	0.5	2.54EF	5.30CD	长势较好,芽较壮
0.5	0.1	4.05A	7.43A	长势好,芽健壮
0.5	0.2	3.00 BC	6.21B	长势好,芽健壮
0.5	0.3	2.68DEF	5.51BC	长势较好,芽较壮
0.5	0.5	2.68 DEF	4.79CDE	长势较好,芽较小
1.0	0.1	3.14B	4.52DE	长势较好,芽较壮
1.0	0.2	2.97BCD	4.33E	长势较差,芽小
1.0	0.3	2.70CDE	4.98CD	长势较好,芽较壮
1.0	0.5	2.41EFG	4.08E	长势较好,芽较壮
2.0	0.1	1.78I	2.48F	长势差,芽细
2.0	0.2	2.08H	2.92F	长势差,芽细
2.0	0.3	2.21GH	3.13EF	长势差,芽细
2.0	0.5	2.36FGH	3.09F	长势差,芽细

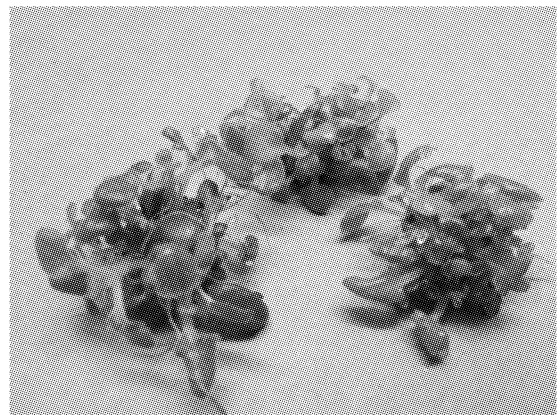


图 2 不定芽增殖

Fig. 2 Adventitious bud propagation

2.3 烟叶唇柱苣苔的生根培养

2.3.1 不同种类生长素对烟叶唇柱苣苔小苗生根的影响 培养 12 d 后小苗基部均开始生根,30 d 植株高 2.0 cm 左右。由表 5 可知,3 种生长素对烟叶唇柱苣苔小苗根系的分化有明显的促进作用,NAA 的效果最好,生根率达到 100%,根粗,平均生根数 19.95 条,植株健壮;其次是 IBA,生根率 94.74%,诱导的根细长,平均生根数 9.67 条,植株较弱,叶微黄;IAA 的诱根效果最差,生根率偏低,只有 80.95%,根细,平均根数 9.94 条,植株矮小。经方差分析,NAA 的生根率和平均根数均极显著高于 IBA 和 IAA,株高与 IBA 差异极不显著,而与 IAA 差异极显著,因此,烟叶唇柱苣苔组培苗的生根培养生长素宜选用 NAA。

表 5 不同种类生长素对烟叶唇柱苣苔根系分化的影响

Table 5 Effect of different kinds of auxin on differentiation of root

生长素种类 Auxin type	生根率 The rooting rate/ %	根数 The number of root/ 条	株高 Plant height / cm	生长状况 Growth status
IBA	94.74B	9.67B	2.13A	较弱、根细长、叶较黄
IAA	80.95C	9.94B	1.93B	较弱、根细长、叶绿
NAA	100A	19.95A	2.14A	健壮、根粗、叶深绿

2.3.2 不同 NAA 浓度对烟叶唇柱苣苔小苗生根的影响

从表 6 可以看出,NAA 对小苗根系分化的效果明显,诱导的生根率、生根数和株高均高于不加生长素的对照(CK);较低浓度的 NAA 有利于根系的生长,NAA 0.2、0.5、0.8 mg/L 的生根率均达到 100%,其株高差异不显著,而诱导的生根数则差异极显著,其中 NAA 0.5 mg/L 诱导的发根数目最多,平均根数达到 20.78,且植株健壮叶色深绿。高浓度的 NAA 诱根效果较差,NAA 1.0 mg/L 和 1.5 mg/L 的生根率偏低,平均根数较少,植株也较矮小,且茎基部有愈伤组织。因此,烟叶唇柱苣苔组培苗的生根培养最适培养基为 MS+NAA 0.5 mg/L。

表 6 不同浓度 NAA 对根系分化的影响

Table 6 Effect of different NAA concentrations on differentiation of root

NAA 浓度 NAA concentration /(mg · L ⁻¹)	生根率 The rooting rate/ %	根数 The number of root/条	株高 Plant height/ cm	生长状况 Growth status
0(CK)	60.53D	5.94E	1.43C	细弱矮小、叶淡绿
0.2	100A	14.32D	2.18A	苗壮、枯叶较多
0.5	100A	20.78A	2.15A	健壮、叶深绿
0.8	100A	16.61C	2.10A	较壮、叶深绿
1.0	90.48B	17.39C	1.98B	苗弱、叶绿、茎基部有少量愈伤
1.5	88.1C	18.94B	2.14A	较壮、叶绿、茎基部愈伤较多

2.4 烟叶唇柱苣苔组培苗的练苗和移栽

无根苗在生根培养基中培养 30 d 后,根系发达,有 6~8 片叶,将其移入拱棚内练苗 7 d 即可移栽。组培苗从培养袋中取出后,用清水洗净根上的培养基,小心栽植于珍珠岩基质中,浇透定根水后用透明塑料薄膜覆盖保湿,遮阳网遮荫,注意通风降温。植后 15 d 可揭去薄膜,30 d 成活率可达 94% 以上。

3 结论与讨论

植物生长调节剂在植物的组培快繁中起着重要的作用,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,同一种生长物质使用的浓度不同,起的作用也有变化^[4],而不同种类间的浓度配比对外植体的形态发生和生长有极大的促进作用。

在烟叶唇柱苣苔的叶片离体培养中,细胞分裂素和生长素的比对叶片不定芽的诱导和增殖以及生长状况影响很大。该研究中 6-BA 对烟叶唇柱苣苔叶片不定芽的诱导和增殖的效果最好,极显著优于 KT 和 TDZ; 6-BA 0.5 mg/L 与 NAA 0.1 mg/L 配合时,烟叶唇柱苣苔的叶片不定芽的诱导率最高,每叶分化的不定芽数最

多,该组合对单芽的继代增殖也表现出最佳效果,芽增殖系数最高,达到 7.43,而且芽生长状况好,极显著优于其它配比组合。该试验结果与汤正辉^[3]选用的细胞分裂素和生长素种类一致,但浓度配比略有偏差,汤正辉认为 6-BA 0.1 mg/L 与 NAA 0.1 mg/L 为最佳组合。

生长素能促进生根,而使用不同种类的生长素,不但影响生根的数量,而且影响根的质量^[6]。该研究中,生长素 NAA、IBA 和 IAA 对烟叶唇柱苣苔的生根均有促进作用,而以 NAA 的促根效果最好,NAA 诱导的根多而粗,IBA 和 IAA 诱导的根少而细长;较低浓度的 NAA(0.2~0.8 mg/L)的诱根效果优于高浓度的 NAA(1.0~1.5 mg/L),NAA 的最佳浓度为 0.5 mg/L,诱导的根系多,平均每株多达 20.78 条,生根率达到 100%,且植株健壮,叶色浓绿。汤正辉^[3]认为采用不添加生长素的 1/2 MS+活性炭 5.0 g/L 的培养基对生根最好。

该研究对烟叶唇柱苣苔叶片离体培养中的芽诱导、芽增殖以及生根的最佳植物生长调节剂的种类和浓度配比进行了筛选,已建立组培快繁体系,可以为其开发应用提供技术上的支撑。

参考文献

- [1] 史佑海,徐世松,黄觉武.海南苦苣苔科野生资源及其观赏特性评价[J].北方园艺,2011(11):79-82.
- [2] 李振宇,王印波.中国苣苔科植物[M].北京:河南科学技术出版社,2005:4-5.
- [3] 汤正辉.苦苣苔科植物的快速繁殖、离体保存及耐阴性研究[D].成都:四川大学,2007.
- [4] 王小菁,陈刚,李明军,等.植物生长调节剂在植物组织培养中的应用[M].北京:化学工业出版社,2010:73-74.
- [5] 王玉英,高新一.植物组织培养技术手册[M].北京:金盾出版社,2006:37,98.

Research on Differentiation and Plant from *in vitro* Leaf Tissues of *Chirita heterotricha* Merr. O

PAN Mei, QI Hua-sha, HUANG Sai, WANG Jing-fei, FU Rui-kan, YUN Yong

(Institute of Garden Flower, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571100)

Abstract: Using the leaves of *Chirita heterotricha* as explants, MS as basic culture medium, the effect of plant growth regulators on adventitious bud induction, multiplication and root formation were studied in order to establish regeneration reproductive system of *Chirita heterotricha* Merr. O. The results showed that using the MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L medium, adventitious bud differentiation rate reached 100%; the medium on shoot proliferation and growth was good, 40 days multiplication factor reached 7.43; MS+NAA 0.5 mg/L medium, 30 days rootage rate was 100%; the rooted plantlets were transplanted in the perlite matrix and the survival rate was over 94%.

Keywords: *Chirita heterotricha*; leaf; *in vitro* culture