

三苞唇柱苣苔花梗的离体培养

韦 啸¹, 唐赛春², 黄素梅^{2,3}

(1. 广西壮族自治区永福县林业局, 广西 永福 541800; 2. 中国科学院 广西植物研究所, 广西 桂林 541006;

3. 广西农业科学院 生物技术研究所, 广西 南宁 530007)

摘要:以三苞唇柱苣苔带腋芽花梗为外植体, 对外植体消毒、不定芽的诱导与增殖、生根培养以及生根苗的移栽等组织培养相关技术进行研究。结果表明: 外植体的消毒以 0.1% 的升汞消毒 7 min 最佳, 其成活率为 73.3%; MS 基本培养基适合于芽的诱导及生长; 不定芽诱导及增殖的最佳培养基为: MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L; 最佳的生根培养基为: MS + IBA 0.3 mg/L, 最佳的移栽基质为腐殖土, 移栽成活率为 95%。

关键词:三苞唇柱苣苔; 花梗; 离体培养

中图分类号:S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)16-0144-04

三苞唇柱苣苔(*Chirita tribracteata* W. T. Wang)为

第一作者简介: 韦啸(1972-), 男, 广西永福人, 本科, 工程师, 现主要从事园林植物与观赏园艺方面的工作。E-mail: hsmei74@yahoo.com.cn。

责任作者: 黄素梅(1974-), 女, 博士, 副研究员, 现主要从事植物资源开发利用等研究工作。

收稿日期: 2011-05-04

苦苣苔科唇柱苣苔属多年生草本植物, 其叶片墨绿、叶脉清晰、花冠蓝色, 具有较高的观赏价值和很大的发展潜力^[1]。此外, 唇柱苣苔属植物的许多种类还是我国民间传统的药用植物, 该属植物在医药领域同样具有较大的开发潜力^[2-3]。由于唇柱苣苔属植物大多对生境要求严格, 分布范围十分狭窄, 这使得该属很多植物成为珍稀濒危种类, 其中三苞唇柱苣苔仅在广西的凤山县发现一个自然分布点。因此, 有必要加强植物资源保护及开发利用研究, 尤其是加强繁育及种质保存

体系影响最小; dNTPs 在 3 个水平内有效扩增, 对反应体系影响也不大; Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时, 扩增条带特异性好, 都为预扩增条带, Mg^{2+} 与扩增条带的特异性相关性强, 对反应体系影响最大。与王娟等^[6]优化苹果 EST-SSR 标记 PCR 反应最佳体系一致(除 DNA 模板 30 ng/20 μ L、引物 0.4 μ mol/L)。佟海申等^[7]研究了 4 个因素(不含 Mg^{2+}) 对大白菜 EST-SSR 标记 PCR 反应体系的影响, 最佳反应浓度与该研究有差异, 且表明引物对反应影响最大。原因可能是试验材料不同所致, 试验所得最佳体系浓度均符合常规 PCR 反应体系所需浓度。

参考文献

[1] 贺俊, 张忠华, 李颖, 等. 国际马铃薯和番茄基因组测序进展[J]. 园

艺学报, 2008, 35(10): 1545-1549.

[2] 陈佳, 沈火林, 杨文才. 番茄分子标记开发进展[J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 130-138.

[3] Squirrel J, Hollingsworth P M, Woodhead M, et al. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants[J]. Mol. Ecol., 2003(12): 1339-1348.

[4] 林元震, 郭海, 刘纯鑫, 等. EST-SSR 标记在木本植物中的开发和应用[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(12): 1221-1225.

[5] Varshney R K, Hiremath P J, Lekha P, et al. A comprehensive resource of drought- and salinity- responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [M]. BMC Genomics, 2010, 10(1): 523-541.

[6] 王娟, 宋尚伟. 苹果 EST-SSR 引物的开发及部分品种亲缘关系分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.

[7] 佟海申, 宋琳, 张志刚, 等. 大白菜 EST-SSR 反应体系优化及引物筛选[J]. 科技导报, 2010, 28(3): 75-81.

Optimization of EST-SSR Marker PCR System on Tomato

HAN Ming-li^{1,2}, HOU Li-xia¹, CUI Na², WANG Shi-hui¹, YU Zhi-hai², GUO Cai-jie²

(1. Institute of Vegetable Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory for Biology of Greenhouse Vegetable of Shandong Province, National Improvement Center for Vegetable, Shandong Branch, Jinan, Shandong 250100; 2. College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: $L_{16}(4^4)$ orthogonal design was used in the EST-SSR Marker PCR system optimization of tomato. The results showed that the best PCR system was: 45 ng/20 μ L DNA template, 0.75 μ mol/L primer, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.4 mmol/L dNTPs, 0.5 U/20 μ L *Taq* DNA polymerase, and the effect of the primer concentration was the greatest for this system. The system had been verified by five pairs of primers and P_1 , P_2 genome DNA, and provided experiments reference on molecular marker assisted selection of tomato.

Key words: tomato; EST-SSR; system optimization; PCR

等研究。但三苞唇柱苣苔种子微小、难以收集贮藏,极大地限制了常规播种繁育的规模及速度,而组织培养则是实现快速繁殖的有效途径之一。近年关于唇柱苣苔属植物组织培养研究已陆续有些报道^[4-8],但关于三苞唇柱苣苔的组织培养方面的研究,除余海霞等^[8]以幼嫩叶片为外植体诱导不定芽取得成功之外,未见其它报道。现以带腋芽的幼嫩花梗为外植体,对三苞唇柱苣苔的组织培养相关技术进行研究,以期为该植物的种质保存、繁育、开发、利用等提供更多参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 植物材料采用从野外引种后种植于广西植物研究所分类研究室种质圃内的三苞唇柱苣苔植株上带腋芽的幼嫩花梗。

1.1.2 培养基及培养条件 无特殊说明情况下,在基本培养基中添加 3% 的白糖、0.4% 的琼脂, pH 5.8~6.0, 培养温度为 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, 光照时间为 10 h/d, 光照强度为 2 000 lx。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的表面消毒 取三苞唇柱苣苔健壮无病害植株上带腋芽的幼嫩花梗,用自来水轻轻冲洗干净后,用纱布吸干表面水分,在超净工作台上,用 75% 酒精表面消毒 30 s 后,再用 0.1% HgCl_2 浸泡消毒 3~11 min,然后用无菌水冲洗 3~5 遍后,接入培养基中。

1.2.2 不同表面消毒时间对外植体的影响 将经不同时间消毒处理的外植体剪成 1 cm 左右带腋芽小段。接入 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基中

进行培养,20 d 后开始统计各处理外植体的污染率和褐化死亡情况,获得的无菌材料用于后续试验。

1.2.3 芽的诱导、增殖 将萌动 20 d 的侧芽接入 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基。将在该培养基上继代 3 次后的试管苗叶片切成 1 cm×1 cm 的正方块,接入不同的培养基中,60 d 后进行观测和数据统计。考察不同基本培养基、不同激素组合对芽诱导及生长的影响。

1.2.4 生根培养 将高度为 1.2 cm 左右的无根苗接入不同的生根培养中,30 d 后进行观测和数据统计。考察不同基本培养基、不同生长素、不同糖分浓度对生根的影响。

1.2.5 移栽 将在 MS+IBA 0.3 mg/L+3% 蔗糖培养 30 d 的健壮生根苗在自然光下开盖练苗 3 d 后,洗净根部的培养基,移栽到消毒过的沼泽土、火土、火土+珍珠岩(1:1)、腐殖土(收集于阔叶林下)等基质中,保证一定的水分和湿度,1 个月后进行观测及数据统计。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对外植体的影响

由表 1 可知,外植体的污染率随着消毒时间的增加而降低,消毒时间为 7 min,其污染率仅为 26.7%,成活率达 73.3%;当消毒时间超过 9 min 后,污染率仅为 6.7%,但外植体很容易变褐最后死亡;大部分未污染的花梗在 10~15 d 侧芽开始萌动,消毒时间越长,侧芽就越难萌动,60 d 后未褐化死亡的外植体萌动率可达 100%。总体上说,花梗的消毒时间以 7 min 为佳。

表 1 消毒时间对外植体消毒效果的影响

Table 1 Effects of sterilization time on the explants disinfection

消毒时间 Sterilization time/min	变褐枯死率 Brown death rate/%	污染率 Contamination rate/%	成活率 Survival rate/%
3	0	60.0	30.0
5	0	33.3	66.7
7	0	26.7	73.3
9	13.3	20.0	66.7
11	40.0	6.7	53.3

2.2 不同基本培养基对芽诱导及生长的影响

将三苞唇柱苣苔的试管苗叶片分别接入添加 BA 0.5 mg/L 及 NAA 0.1 mg/L 的 MS、B₅、White 培养基中连续培养 2 代后,进行观测及数据统计。由表 2 可知,3 种基本培养基中,MS 培养基对不定芽的诱导效

果最好,平均为 15.3 芽/块,而且苗高及生长状况也优于其它处理。在 White 培养基上培养的苗细弱,而且颜色发黄,生长最差,平均芽数明显少于其它处理,由此可推断,高无机盐含量的基本培养基可能更利于三苞唇柱苣苔试管苗的生长。

表 2 基本培养基对芽诱导及生长的影响

Table 2 Effect of basical medium on bud induction and growth

培养基 Medium/mg · L ⁻¹	不定芽 Adventitious bud/芽 · 块 ⁻¹	苗高 Height of plant/cm	生长情况 Growth condition
MS+BA 0.5+NAA 0.1	15.3	1.1	苗粗壮、叶片大而青绿
B ₅ +BA 0.5+NAA 0.1	9.6	0.6	苗细弱、叶片中等、黄绿
White+BA 0.5+NAA 0.1	6.7	0.5	苗极细弱、叶片细小、黄白色

2.3 不同激素比对芽诱导及生长的影响

将三苞唇柱苣苔的试管苗叶片分别接入添加不同的

BA(0.3、0.5、0.8 mg/L)和 NAA(0.1、0.3、0.5 mg/L)配比的 MS 培养基中,除 1 号培养基外,其它培养基中的叶片

均在接种 24~27 d 长出绿色芽点,而 1 号培养基上仅 1 块叶片长出 3 个芽点,而且芽苗长势非常弱,由此可知,BA、NAA 等植物生长调节剂缺乏,对三苞唇柱苣苔丛生芽的诱导及生长极其不利。继续培养后发现,在 5 号培

养基(MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L)上诱导的芽苗较壮,叶色青绿,而且苗高也高于其它的处理,该处理对不定芽的诱导及生长都好于其它培养基。因此 5 号培养基被认为是芽诱导及生长的最佳培养基。

表 3 激素对比对芽诱导及生长的影响

Table 3 Effect of hormone combination on bud induction and growth

培养基编号 Medium No.	不定芽 Adventitious bud/芽·块 ⁻¹	苗高 Height of plant/cm	生长情况 Growth condition
1	—	—	50 d 后,仅 1 块叶片长出 3 个芽,其余叶片均枯黄死亡
2	12.85	0.8	27 d 长出绿色小芽,苗长势中等
3	6.5	0.6	27 d 长出小芽点,芽苗叶片薄、黄绿,茎细弱、气生根多
4	5.25	0.65	27 d 长出小芽点,芽苗叶片黄绿,茎细弱、气生根多
5	15.3	1.25	25 d 长出芽点,苗壮、叶片大而绿,少量气生根
6	14.1	1.0	25 d 长出芽点,苗长势中等、叶片稍薄
7	8.05	0.7	26 d 长出芽点,苗细弱、叶片黄绿色、部分顶芽水渍状
8	10.9	1.0	24 d 长出芽点,苗细弱、叶片黄绿色、部分顶芽水渍状
9	11.2	1.1	25 d 长出芽点,苗长势相对较好、叶片黄绿,部分顶芽水渍状
10	11.3	0.8	25 d 长出芽点,苗细、叶黄、茎弱、部分顶芽水渍状

注:培养基编号:1. MS;2. MS+BA 0.3+NAA 0.1;3. MS+BA 0.3+NAA 0.3;4. MS+BA 0.3+NAA 0.5;5. MS+BA 0.5+NAA 0.1;6. MS+BA 0.5+NAA 0.3;7. MS+BA 0.5+NAA 0.5;8. MS+BA 0.8+NAA 0.1;9. MS+BA 0.8+NAA 0.3;10. MS+BA 0.8+NAA 0.5。

2.4 不同基本培养基对生根培养的影响

将高约 1.2 cm 左右的无根苗接到添加 NAA 0.3 的 1/2MS、MS 培养基上进行生根培养,12 d 后长出新根。由表 4 可知,在 MS 或 1/2MS 培养基上诱导根的数量无明显差别,但在诱导根的形态上具有一定差异,

在 MS 诱导的根相对较粗,而在 1/2MS 上诱导的根则相对细长。此外,在 MS 培养基上的苗的高度及长势都优于 1/2MS 培养基。因此,MS 培养基更适合于三苞唇柱苣苔的生根培养。

表 4 基本培养基对生根培养的影响

Table 4 Effect of basal medium on rooting culture

培养基 Medium	生根率 Rooting rate/%	根数 Number of roots/条·株 ⁻¹	苗高 Height of plant/cm	生长情况 Growth condition
1/2MS+NAA 0.3	100	27.2	2.9	植株黄绿、叶大而薄,根稍细长,韧性一般
MS+NAA 0.3	100	27.0	3.6	植株黄绿,叶大稍厚,根相对稍粗,韧性较好

2.5 生长素对生根培养的影响

通过不同浓度的不同生长素对三苞唇柱苣苔生根的影响试验发现(表 5),不加任何生长素的处理苗细弱且叶色发黄,基本上不产生新根,苗高明显低于加有生长素的处理;从表 5 可看出,只要在培养基中加一定浓度的 IBA 或 NAA 即可诱导产生根,可见三苞唇柱苣苔是十分容易诱导生根的;IBA 诱导的根比 NAA 诱导的

根粗壮,而且诱导出根时间短、苗壮、叶大而绿,长势好于添加 NAA 的培养基;还发现当 IBA 或 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时,诱导的根出现数根并成一块(根)的现象,这可能是由于生长素浓度过高引起,因而在诱导生根时生长素浓度不宜过高(不宜超过 0.5 mg/L);经比较发现,K₆(MS+IBA 0.3 mg/L)培养基不但诱导的根多、粗壮,而且苗也健壮青绿,因而是最佳的生根培养基。

表 5 生长素对生根培养的影响

Table 5 Effect of auxins on rooting culture

培养基编号 Medium No.	生根率 Rooting rate/%	根数 Number of roots/条·株 ⁻¹	苗高 Height of plant/cm	生长情况 Growth condition
K ₁	100	0.5	1.9	15 d 后,叶色逐渐变黄,植株生长缓慢,有少量气生根
K ₂	100	20.0	3.6	15 d 后长出新根,植株黄绿色,根系胡须状,根细不易折断
K ₃	100	29.7	3.7	12 d 后长出新根,植株健壮青绿,叶大而大,根较 K ₂ 粗,韧性好,须根发达
K ₄	100	21.2	3.7	12 d 后长出新根,植株青绿,苗健壮,根粗壮、侧根短,部分根并生成块
K ₅	100	14.0	3.6	15 d 后长出新根,植株叶色青绿,苗健壮,主根较粗、侧根少
K ₆	100	22.0	3.7	10 d 后长出新根,植株健壮青绿,叶大、根粗壮韧性好,须根少
K ₇	100	15.7	3.6	10 d 后长出新根,植株健壮青绿,叶大、根短粗易折断,须根不发达,部分根并生成块

注:培养基编号:K₁. MS;K₂. MS+NAA 0.1;K₃. MS+NAA 0.3;K₄. MS+NAA 0.5;K₅. MS+IBA 0.1;K₆. MS+IBA 0.3;K₇. MS+IBA 0.5。

2.6 糖分浓度对生根培养的影响

将无根苗分别接种在 MS+IBA 0.3 mg/L+1%~

4%蔗糖的各种培养基上诱导生根。结果发现,三苞唇柱苣苔无根苗在 4 种糖分浓度均能生根,但当糖分浓

度太低(如为 1%)时,诱导出的根相对细弱,根质量(如粗壮程度、韧性等)明显不及其它处理,而且苗的叶片黄白色,苗生长慢;从表 6 可看出,生根苗的高度及苗的质量(青绿度、叶片大小、茎粗壮程度等)与糖分浓度

成正相关,当糖分浓度为 4%时苗的长势好于其它处理,根也粗壮,因此是最佳的糖分浓度,但是从降低生产成本的角度考虑,以选择 2%~3%糖分浓度的培养基诱导生根为佳。

表 6 糖分浓度对生根培养的影响
Table 6 Effect of sugar concent on rooting culture

糖分浓度 Sugar concent/%	生根率 Rooting rate/%	根数 Number of roots /条·株 ⁻¹	苗高 Height of plant/cm	生长情况 Growth condition
1	100	11.3	2.2	植株叶黄、茎细,叶较其它处理细小,根短
2	100	14.4	3.0	叶色正常,根比 1%糖的处理粗
3	100	21.9	3.5	植株茎粗、叶大、叶色青绿,根粗壮,韧性好
4	100	15.5	4.3	植株茎粗、叶大、叶色青绿,根粗壮,侧根、气生根多

2.7 不同基质对移栽成活率的影响

生根苗在移栽后约 15 d 后开始长出新叶,30 d 后检查成活率。从表 7 可看出,生根苗在腐殖土中移栽成活率最高(95%),其次是沼泽土(90%),而其它处理移栽成活率则比较低,这可能是因为这 2 种土的保水能力及通透性与野生三苞唇柱苣苔的生长土壤更接近。因此移栽最好选择腐殖土或沼泽土。

表 7 移栽基质对移栽成活率的影响

Table 7 Effect of transplanting substrate on survival rate

移栽基质 Transplanting substrate	移栽苗数 Plants/株	成活率 Survival rate/%
沼泽土	40	90
火土	40	42.5
火土+珍珠岩(1:1)	40	45
腐殖土	40	95

3 结论与讨论

在以三苞唇柱苣苔的花梗为外植体的组织培养过程中,外植体用 0.1% HgCl₂ 表面消毒 7 min 效果最好,成活率可达 73.3%;MS 基本培养基更利于芽的诱导及生长,最佳的增殖培养基为 MS+BA 0.5+NAA 0.1,用该培养基诱导的芽苗较壮,叶色青绿,长势好;三苞唇柱苣苔试管苗根的诱导十分容易,生根培养基以 MS+IBA 0.3+2%~3%糖为佳;生根苗的最佳移栽基质为腐殖土,移栽成活率可达 95%。

虽然余海霞等^[8]报道用 MS+BA 0.5+NAA 0.1 成功诱导三苞唇柱苣苔叶片产生不定芽。但是,在试

验中发现,用野生植株上的叶片不但表面消毒难度较大(褐化死亡严重),且芽诱导也比用花梗诱导更难,而用经过继代培养 2 代后试管苗的叶片则很容易诱导不定芽,这可能是因为植物激素累积所产生的效应。因此,认为以带腋芽的花梗为外植体进行组织培养比用叶片为外植体更具优势。此外,在培养过程中,还发现三苞唇柱苣苔芽苗顶部叶片容易出现水渍状,有玻璃化的趋势,尤其是随着培养代数的增加,这种现象更明显。因此在三苞唇柱苣苔的组织培养中如何控制玻璃化苗的发生还有待进一步的研究。

参考文献

[1] 温放,张启翔,王越.广西唇柱苣苔属和小花苣苔属植物的观赏性状评价与筛选[J].园艺学报,2008,35(2):239-250.
[2] 李家美,常颖,夏至.唇柱苣苔属 5 种药用植物的考证[J].河南农业大学学报,2010,44(1):103-105.
[3] 温放,张启翔.广西苦苣苔科野生观赏植物资源的调查、引种及现状分析[C].2007 年中国园艺学会观赏园艺专业委员会年会,2007:60-65.
[4] 李翠,凌征柱,姚绍嫦,等.苦苣苔科植物组织培养研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(31):17387-17388,17390.
[5] 谭晓风,邓建军,胡孝义,等.蕨山唇柱苣苔组织培养与植株再生[J].经济林研究,2009,27(3):24-27.
[6] 李翠,吕惠珍,凌征柱,等.菱叶唇柱苣苔的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2010,46(10):1073-1074.
[7] 梁桂友,温放,李湛东.尖萼唇柱苣苔的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2007,43(2):321.
[8] 余海霞,凌征柱,黄雪彦,等.三苞唇柱苣苔的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2010,46(11):1177-1178.

In vitro Culture of Pedicel from *Chirita tribracteata* W. T. Wang

WEI Xiao¹, TANG Sai-chun², HUANG Su-mei^{2,3}

(1. Yongfu Forestry Bureau, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Yongfu, Guangxi 541800; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi 541006; 3. Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract: Using the pedicels with an axillary bud from *Chirita tribracteata* W. T. Wang as materials, technologies related to tissue culture(including explant sterilization, induction and proliferation of adventitious buds, rooting culture and transplanting of plants) were studied. The results showed that the optimal sterilization time was about 7 min, and its survival rate was 73.3%; for induction and proliferation of adventitious buds, MS was the optimal basal medium, and the optimal medium was MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L; the optimal medium for rooting was MS+IBA 0.3 mg/L; humus soil was the optimal transplanting substrate, and its survival rate was 95%.

Key words: *Chirita tribracteata* W. T. Wang; pedicel; *in vitro* culture