

黄花马铃薯苣苔的离体培养与快速繁殖

潘梅, 黄赛, 戚华莎, 王景飞, 云勇*

海南省农业科学院热带园艺研究所, 海口571100

摘要: 本文对黄花马铃薯苣苔进行离体培养与快速繁殖技术研究。结果表明, 黄花马铃薯苣苔叶片外植体的最适初代诱导培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA, pH值为6.5。最适继代增殖培养基为MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA, 培养30 d的增殖系数为7.30。最适生根培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA, 生根率100%。对生根组培苗进行移栽, 成活率最高达91.43%。

关键词: 黄花马铃薯苣苔; 叶片; 离体培养

In Vitro Culture and Rapid Propagation of *Oreocharis flavida*

PAN Mei, HUANG Sai, QI Hua-Sha, WANG Jing-Fei, YUN Yong*

Tropical Horticulture Research Institute of Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China

Abstract: We investigated *in vitro* culture and rapid propagation of *Oreocharis flavida*. The optimal medium for bud induction from leaves was MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA (pH 6.5). The optimal medium for subculture of bud multiplication was MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA, and the proliferation coefficient was 7.30 at 30 d. The optimal rooting medium was MS+NAA 0.5 mg·L⁻¹, the rooting rate was 100%. The rooting plantlets were transplanted in the matrix and the highest survival rate was 91.43%.

Key words: *Oreocharis flavida*; leaf; *in vitro* culture

苦苣苔科植物为热带特有植物, 具有多重观赏特性, 兼观花、观叶、观形一体, 可选育出不同园林应用的类型, 是现代园林建设的重要组成部分, 也可作为家居美化绿化的特殊种类。黄花马铃薯苣苔是苦苣苔科马铃薯苣苔属多年生草本植物, 为海南特有种和珍稀野生花卉, 分布于海南的保亭、乐东、定安、白沙、陵水、东方和琼海7县市(李振宇和王印政2005)。其株型紧凑, 叶全部基生, 具长柄; 叶片卵形至宽卵形; 花序聚伞状, 每花序具3~4花; 花冠斜钟状, 淡黄色, 观赏价值高, 是极好的盆栽花卉材料, 也非常适合作为阴生地被植物应用于园林绿地(史佑海等2011)。有关野生苦苣苔科植物的组织培养已有一些报道, 其中付传明等(2010)利用桂林唇柱苣苔叶片诱导出生殖植株。汤正辉等(2005a, b)对台闽苣苔和异裂苣苔的幼叶诱导愈伤组织继而分化出不定芽获得再生植株。黄宁珍等(2010)对桂林小花苣苔的叶片离体培养获得再生芽。韦啸等(2011)以三苞唇柱苣苔带腋芽花梗为外植体, 研究了不定芽诱导、增殖和生根技术, 组培苗移栽成活率达到95%。康洗华等(2014)以文采唇柱苣苔肉质叶作为外植体, 建立起再生植株快速繁殖体系。目前对黄花马铃薯

苣苔的研究只有资源的分布与评价方面, 其组织培养与快速繁殖的研究尚未见报道, 马铃薯苣苔属植物组织培养与快速繁殖研究也未见有报道。本研究以黄花马铃薯苣苔叶片作为外植体诱导不定芽, 进而对不定芽的增殖和生根以及幼苗移栽管理技术进行研究, 以期建立黄花马铃薯苣苔的离体快速繁殖技术, 为其应用繁殖和保护提供技术保障。

材料与方法

1 试验材料

所用植物材料黄花马铃薯苣苔(*Oreocharis flavida* Merr.)采自海南省保亭县, 取叶片作为外植体。

2 试验方法

2.1 外植体消毒

剪取黄花马铃薯苣苔中上部健康叶片, 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, 0.02% HgCl₂溶液消毒3 min, 无菌水漂洗3次, 最后用2%

收稿 2015-05-12 修定 2015-08-25

资助 海南省科学事业费项目(kyys-2013-12)。

* 通讯作者(E-mail: yyong3819@163.com; Tel: 189075903361)。

NaClO消毒15 min, 无菌水漂洗5次。

2.2 培养基制备

以MS为基本培养基, 根据实验目的添加不同浓度的6-BA、KT、TDZ、NAA、IBA和IAA, 附加30 g·L⁻¹食用蔗糖和8 g·L⁻¹卡拉胶, 灭菌前pH 6.5, 配制分装后, 于温度121 °C灭菌20 min。

2.3 初代培养

将表面消毒好的叶片切除边缘组织, 切成1 cm×1 cm的小块, 以叶面朝上接种于初代培养基MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA和MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA中, 每袋接种1块, 接种后每周观察1次, 记录材料生长情况, 及时清除污染材料。

2.4 增殖培养

以MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA作为基本培养基, 分别添加0.5 mg·L⁻¹的6-BA、KT和TDZ 3种细胞分裂素, 筛选适宜增殖培养的细胞分裂素。

以MS作为基本培养基, 设置6-BA 0.1、0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹和NAA 0.1、0.2、0.3、0.5 mg·L⁻¹各4个浓度水平的配比, 共16种处理, 筛选增殖培养最佳生长调节剂组合。将生长状况、大小基本一致的芽团接入培养基, 每袋接种3块材料, 每种处理接种10袋, 重复3次, 定期观察记录, 培养30 d后统计不定芽增殖系数。

2.5 生根培养

以MS作为基本培养基, 设置NAA、IBA和IAA各0.5 mg·L⁻¹, 筛选适宜组培苗生根的生长素。

在MS培养基中添加不同浓度(0.2、0.5、0.8、1.0和1.5 mg·L⁻¹)的IBA, 以不加IBA的培养基作为对照, 筛选适宜组培苗生根的最佳IBA浓度。将高约1.5 cm的继代增殖苗从基部切下接入培养基, 每袋接种3个材料, 每种处理接种10袋, 重复3次, 定期观察记录, 30 d后统计生根率和生根数。

2.6 培养条件

材料接种后, 在光照强度40 μmol·m⁻²·s⁻¹的光照下培养, 光照时间9 h·d⁻¹, 温度(26±2) °C。

2.7 生根苗移栽

将根系发达和生长良好的袋苗移入拱棚内炼苗7 d, 从培养袋中取出小苗, 用清水洗净根部附着的培养基, 栽植于珍珠岩、河沙、表土和珍珠岩:河沙:表土(1:1:1) 4种基质中, 30 d后统计成活率。

2.8 数据处理分析

实验所得数据均用Excel 2007数据分析库进行数据统计、方差分析, 新复极差法进行均数间多重比较。

实验结果

1 黄花马铃薯的不定芽诱导

黄花马铃薯叶片外植体对HgCl₂非常敏感, 较高浓度和较长的消毒时间, 叶片容易褐化死亡, 组合式消毒程序较单一消毒方法好, 污染率和褐化率均较低。消毒成功的叶片培养15 d后, 叶片开始膨大隆起, 面积增大近1倍; 20 d左右最先由叶片边缘长出绿色的愈伤组织, 然后逐渐向叶面扩展(图1-A); 继续培养至35 d时, 愈伤组织分化出小叶片(图1-B); 50 d不定芽达到高峰, 在叶片边缘、主叶脉基部和叶片的上下表面均分化出大量的不定芽(图1-C)。

叶片外植体在培养基MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA上诱导出愈伤组织的时间较晚, 21 d才有愈伤组织长出, 诱导出的再生芽较少, 生长较好。而培养基MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA上的叶片外植体培养17 d就长出了愈伤组织, 诱导出的再生芽多且生长良好。因此, MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA宜作为黄花马铃薯初代诱导培养基。

2 不同细胞分裂素对黄花马铃薯不定芽增殖的影响

从表1可以看出, 3种细胞分裂素对黄花马铃薯不定芽的增殖影响极大。其中以6-BA的效果最好, 诱导出的芽绿色健康, 生长速度快, 30 d增殖系数达到6.77; KT的效果次之, 丛芽绿色, 生长也较快, 增殖系数为6.00; TDZ不定芽的增殖效果差, 不定芽较细小, 略黄, 增殖系数只有5.18。3种细胞分裂素对黄花马铃薯不定芽增殖系数的影响达到极显著性水平, 因此, 宜选用6-BA进行不定芽的增殖培养。

3 6-BA与NAA组合对黄花马铃薯不定芽增殖的影响

由表2看出, 16种培养基对黄花马铃薯的芽增殖效果不同, 增殖系数介于3.67~7.30。6-BA与NAA没有表现出明显的规律性, 组合0.5 mg·L⁻¹

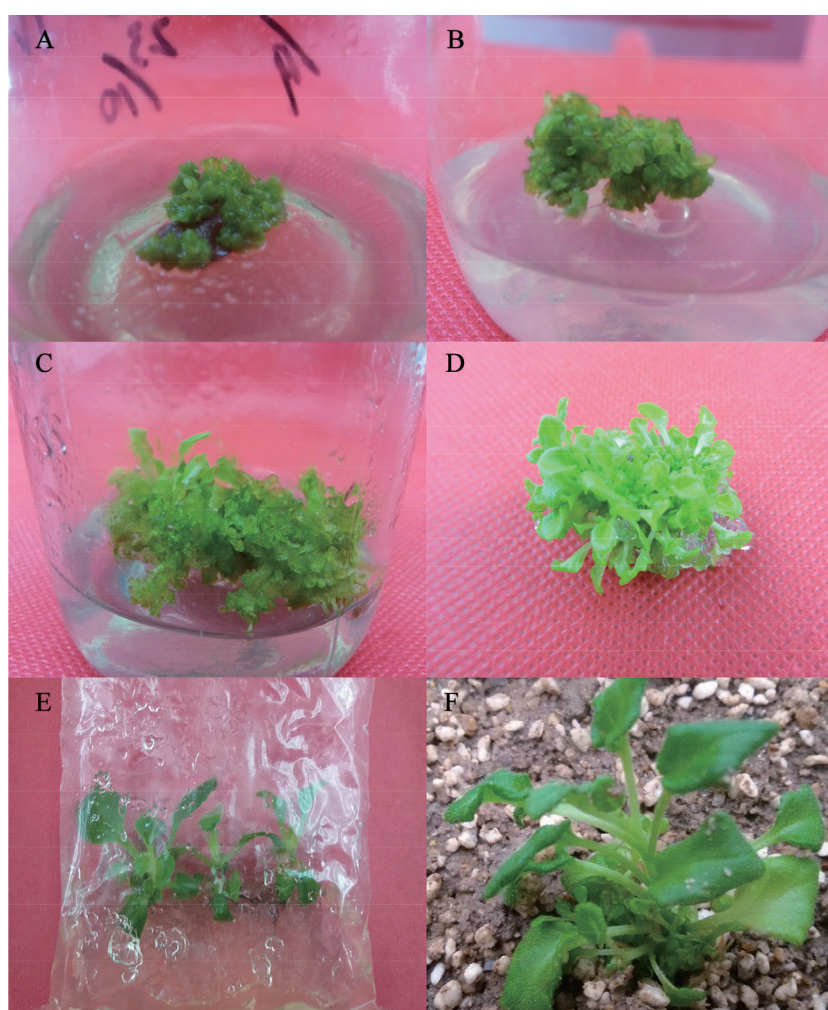


图1 黄花马铃薯苜蓿的离体培养和快速繁殖

Fig.1 *In vitro* culture and rapid propagation of *O. flavida*

A: 叶片外植体培养20 d后诱导的愈伤组织; B: 培养35 d后分化的小芽; C: 培养50 d后分化的芽丛; D: 再生芽增殖; E: 生根苗; F: 移栽成活小苗。

表1 不同细胞分裂素对黄花马铃薯苜蓿不定芽增殖的影响

Table 1 Effects of different cytokinins on bud propagation of *O. flavida*

细胞分裂素	增殖系数	芽的生长情况
6-BA	6.77 ^{Aa}	芽绿色健康, 生长速度快
KT	6.00 ^{Bb}	芽绿色, 生长速度较快
TDZ	5.18 ^{Cc}	芽较细小, 略黄

同一列数据后不同小写字母表示差异达显著水平($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异达极显著水平($P < 0.01$)。下表同此。

6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA的不定芽增殖系数最低, 只有3.67; 6-BA和NAA均为0.1 mg·L⁻¹时有最好的增殖效应, 芽分化多, 培养30 d增殖系数最高, 达到

7.30, 而且不定芽生长状态好, 叶片鲜绿, 生长均匀, 苗高多为1 cm左右(图1-D)。方差分析的结果表明, 0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA的组合与其它组合处理间的差异达到极显著性水平, 因此, 黄花马铃薯苜蓿芽增殖培养生长调节剂最优组合为0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA。

4 不同生长素对黄花马铃薯苜蓿不定芽根系分化的影响

从表3看出, 3种生长素对黄花马铃薯苜蓿小苗根系的诱导效果差异极大, 其中IBA极显著优于IAA和NAA。在含IBA的培养基中生长10 d, 植株开始生根; 30 d诱导的生根率100%, 生根数达到

表2 不同6-BA与NAA组合对黄花马铃薯不定芽增殖的影响

Table 2 Effects of different combinations of 6-BA and NAA on bud propagation of *O. flavid*a

6-BA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	增殖系数	芽的生长情况
0.1	0.1	7.30 ^{Aa}	芽均匀、高、粗壮、
0.1	0.2	5.59 ^{EFer}	芽较均匀、壮, 偶有长根
0.1	0.3	4.40 ^{Ii}	芽较均匀、细
0.1	0.5	4.93 ^{GHigh}	芽均匀、矮小, 有少量长根
0.5	0.1	5.78 ^{DEde}	芽较均匀、壮
0.5	0.2	6.71 ^{Bb}	芽均匀、细小、有少量长根
0.5	0.3	5.63 ^{DEFe}	芽较均匀、细小, 有少量长根
0.5	0.5	3.67 ^{Jj}	芽细弱、小, 有少量长根
1.0	0.1	4.63 ^{IIIhi}	芽均匀、细小, 偶有长根
1.0	0.2	6.37 ^{BCbc}	1/3的芽较粗、2/3细小, 偶有长根
1.0	0.3	5.56 ^{EFer}	芽均匀、较粗
1.0	0.5	5.15 ^{GFg}	芽均匀、细小
2.0	0.1	5.22 ^{FGfg}	芽较均匀, 略细, 偶有长根
2.0	0.2	5.22 ^{FGfg}	2/3的芽较大、1/3细小
2.0	0.3	5.96 ^{CDEde}	芽较均匀、矮小, 有少量长根
2.0	0.5	6.15 ^{CDcd}	芽均匀、矮小, 长根较多

表3 不同生长素对黄花马铃薯不定芽根系分化的影响

Table 3 Effects of different auxins on differentiation of rooting in *O. flavid*a

生长素	生根率/%	生根数/条	生长状况
IBA	100.00 ^{Aa}	7.27 ^{Aa}	健壮、根粗长
IAA	93.33 ^{Bb}	5.60 ^{Bb}	较壮、根细长
NAA	90.00 ^{Cc}	4.11 ^{Cc}	较弱、根粗短

7.27条, 根系粗长, 植株生长势好且健壮(图1-E)。在IAA培养基中, 植株14 d开始生根, 30 d的生根率93.33%, 生根数为5.60条, 根系较长, 植株长势一般。含NAA的培养基, 植株发根最慢, 15 d才有根系长出, 30 d生根率为90.0%, 平均每株生根4.11条, 根粗短, 植株较细弱, 因此宜选用IBA进行黄花马铃薯不定芽的生根培养。

5 不同浓度IBA对黄花马铃薯不定芽生根的影响

结果(表4)表明, IBA对黄花马铃薯不定芽的生根有明显的促进作用, 各处理的生根率和生根数均显著高于不加生长素的对照。在不添加IBA的培养基中, 不定芽的生根效果差, 生根率只有59.26%, 平均每株生根3.25条, 苗细弱。添加IBA之后, 生根率有极明显的提高。低浓度的IBA生根效果较差, 0.2 mg·L⁻¹ IBA的生根率96.67%, 生根数为3.48条; 0.5~1.5 mg·L⁻¹ IBA的生根率均达到100%, 小苗生长势良好, 其中0.5 mg·L⁻¹ IBA诱导的根数最多, 平均每株生根7.51条, 与其它处理的差异达到显著性水平。因此, 黄花马铃薯不定芽的生根培养最佳的IBA浓度是0.5 mg·L⁻¹。

表4 不同IBA浓度对黄花马铃薯不定芽根系分化的影响

Table 4 Effects of different concentrations of IBA on differentiation of rooting of *O. flavid*a

IBA浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%	生根数/条	生长状况
0 (对照)	59.26 ^{Cc}	3.25 ^{Cc}	细弱、叶淡绿
0.2	96.67 ^{Bb}	3.48 ^{Bd}	苗壮、枯叶较多
0.5	100.00 ^{Aa}	7.51 ^{Aa}	健壮、叶深绿
0.8	100.00 ^{Aa}	5.10 ^{Ab}	健壮、叶深绿
1.0	100.00 ^{Aa}	4.76 ^{Abc}	较壮、叶绿、基部分生较多小苗
1.5	100.00 ^{Aa}	4.14 ^{Ac}	较壮、叶绿、基部分生较多小苗

6 黄花马铃薯苔的移栽

从表5看出, 表土不适宜作为黄花马铃薯苔组培苗的移栽基质, 组培苗成活率低, 30 d的成活率只有28.57%, 这可能是由于表土通透性较差, 不利于根系的生长。基质河沙和珍珠岩的成活率也偏低, 分别为62.86%和88.57%。在等体积的表土、珍珠岩和河沙混合基质中, 黄花马铃薯苔组培苗生长良好(图1-F), 成活率最高达到91.43%, 可见, 黄花马铃薯苔宜选用等体积的表土、珍珠岩和河沙混合基质移栽组培幼苗。

表5 不同移栽基质对黄花马铃薯苔成活率的影响

Table 5 Effects of different matrixes on survival rate of *O. flavida*

基质	移栽株数/株	成活株数/株	成活率/%
珍珠岩	35	31	88.57
河沙	35	22	62.86
表土	35	10	28.57
珍珠岩:河沙:表土	35	32	91.43

讨 论

在植物的组织培养与快速繁殖过程中, 植物生长调节剂的种类及使用浓度是最为主要的的影响因子, 决定着培养材料的培养方向、数量和质量。主要使用的细胞分裂素有6-BA、KT、ZT和TDZ, 生长素有NAA、IBA和IAA。

TDZ是已被广泛用于植物组织培养形态发生的高效生物调节剂。它能诱导外植体从愈伤组织形成到体细胞胚胎发生的一系列不同反应, 具有细胞分裂素和生长素双重作用的特殊功能, 在组织细胞培养中TDZ是通过单独或与其他生长调节物质共同对植物细胞起作用(徐晓峰和黄学林2003)。目前TDZ在苦苣苔科植物组织培养中未见有应用。本研究采用 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TDZ对黄花马铃薯苔不定芽的增殖效果并不理想, 增殖率小, 芽也较细小。这也许与浓度不适有关, 也许是不同植物对细胞分裂素的需求不同。

6-BA与NAA组合使用, 黄花马铃薯苔再生芽的发生频率极显著高于其它几种植物生长物质组合, 最适浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA。这一结果与桂林唇柱苣苔(付传明等2010)和台闽苣苔(汤正辉等2005b)的增殖培养结果一致。菱叶

唇柱苣苔不定芽增殖所需的6-BA和NAA浓度相对较高, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA为最佳组合(李翠等2010)。与桂林唇柱苣苔同属的文采唇柱苣苔中, 洗康华等(2014)所筛选出的最佳组合为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; 另一同属植物烟叶唇柱苣苔中, 潘梅等(2014)选出的最优组合为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA。刘伟和黄勇(2010)在吊石苣苔的研究表明, 较高浓度的6-BA利于芽的增殖, 最佳组合为 $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; 在汤正辉等(2005a)的研究中发现, $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA组合的异裂苣苔不定芽再生频率最高。可见, 不同的苦苣苔科植物, 即使是亲缘关系比较接近的同属种, 植物生长调节剂的使用存在一定的差异, 使用的种类与浓度主要取决于不同外植体的反应。

本实验过程中, IBA诱导根系分化的能力极显著优于NAA和IAA。在含有不同浓度IBA培养基中诱导根系形成时发现, 随着IBA浓度的升高, 小苗分化根系的能力有所增强, 但当IBA浓度超过 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 根系分化能力反而下降, 平均根数减少, $1.0\sim 1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA还容易诱发产生较多的无效小苗。说明IBA浓度过高会抑制根系的再生能力, 可能是外源生长物质超过本身适应极限, 从而对自身根的形成与生长。与张占江等(2013)对于条叶唇柱苣苔组织培养的研究结果相比较, 诱导植株生根的IBA浓度有明显降低。在培养基中添加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, 烟叶唇柱苣苔(潘梅等2014)和吊石苣苔(刘伟和黄勇2010)的生根效果最佳。桂林唇柱苣苔(付传明等2010)和异裂苣苔(汤正辉等2005a)的再生芽生根均无需添加任何生长素。这些差别可能是由于不同植株外植体对于外源生长物质刺激的反应能力不同而造成的。

黄花马铃薯苔组培幼苗移栽基质使用等体积表土、珍珠岩和河沙的混合基质为好, 表土可以提供较好的营养和保持水量, 河沙和珍珠岩使得基质疏松透气, 有利于根系的生长和吸收营养, 移栽成活率最高。

参考文献

- 付传明, 黄宁珍, 唐凤鸾, 石云平, 赵志国(2010). 桂林唇柱苣苔的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 46 (3): 253~254
 黄宁珍, 付传明, 赵志国, 唐凤鸾, 石云平(2010). 桂林小花苣苔的离

- 体快速繁殖技术. 植物学报, 45 (6):744~750
- 李振宇, 王印政(2005). 中国苔藓科植物. 北京: 河南科学技术出版社, 46~47
- 李翠, 吕惠珍, 凌征柱, 姚绍嫦, 黄雪彦, 张占江(2010). 菱叶唇柱苔的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 46 (10): 1073~1074
- 刘伟, 黄勇(2010). 吊石苔的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 46 (2): 159~160
- 潘梅, 戚华莎, 黄赛, 王景飞, 吕德任, 符瑞侃(2014). 烟叶唇柱苔叶片分化与植株再生研究. 北方园艺, 23: 83~86
- 史佑海, 徐世松, 黄觉武(2011). 海南苦苔科野生资源及其观赏特性评价. 北方园艺, (11): 79~82
- 汤正辉, 石雷, 陈维伦, 苗琛. 邢全(2005a). 异裂苔的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 41 (5): 643
- 汤正辉, 石雷, 陈维伦, 苗琛, 邢全(2005b). 台闽苔的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 41 (4): 497
- 韦啸, 唐赛春, 黄素梅(2011). 三苞苔花梗的离体培养. 北方园艺, (6): 144~147
- 冼康华, 付传明, 唐凤鸾, 石云平, 何金祥, 黄宁珍(2014). 文采唇柱苔的组织培养与快速繁殖. 植物生理学报, 50 (7): 1065~1069
- 徐晓峰, 黄学林(2003). TDZ一种有效的植物生长调节剂. 植物学通报, 20 (2): 227~237
- 张占江, 李翠, 吕惠珍, 韦莹, 韦坤华, 李林(2013). 条叶唇柱苔组织培养研究. 种子, 32 (9): 19~22