

瑶山苣苔的不定芽诱导及植株再生

张博¹, 莫耐波², 陈龙¹, 梁宏伟¹, 王玉兵^{1,*}

¹三峡大学生物技术研究中心, 湖北宜昌443000; ²广西壮族自治区金秀老山自然保护区, 广西金秀545799

摘要: 将瑶山苣苔无菌苗幼叶接种于添加不同植物生长调节剂(PGRs)和活性炭(AC)的MS培养基中, 研究PGRs和AC对叶片直接诱导丛生芽及幼芽生根的影响, 并建立瑶山苣苔的植株再生体系。结果表明: 叶片外植体在MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基上的丛生芽诱导率较高(96.43%); MS培养基中添加0.1% AC时, 丛生芽的诱导率为83.67%, 但丛生芽比添加PGRs诱导出来的生长健壮; 在1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+2%蔗糖的培养基上, 不定根诱导率高达100%; 1/2MS培养基中添加AC, 幼苗的生长比在添加NAA的培养基上的健康; 幼苗经炼苗后移栽到混合基质(沙子:蛭石:珍珠岩=1:1:1)中成活率可达85%。

关键词: 瑶山苣苔; 丛生芽; 不定根; 植株再生

Adventitious Shoot Induction and Plant Regeneration of *Dayaoshania cotinifolia* W. T. Wang

ZHANG Bo¹, MO Nai-Bo², CHEN Long¹, LIANG Hong-Wei¹, WANG Yu-Bing^{1,*}

¹Biotechnology Research Center, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443000, China; ²Laoshan Nature Reserve of Jinxiu in Guangxi Zhuang Autonomous Region, Jinxiu, Guangxi 545799, China

Abstract: The objective of this study was to investigate the direct effect of different culture media with a series of concentrations of plant growth regulators (PGRs) and activated charcoal (AC) on initiation of multiple shoots and budlet rooting, then the regeneration system of *Dayaoshania cotinifolia* was established. The explants used in this study were the young leaves of aseptic seedlings obtained from the seeds of *D. cotinifolia*. The results showed that the explants inoculated on MS medium with 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg·L⁻¹ NAA were provided with a relatively high induction rate about 96.43% of the multiple shoots. The MS medium added with 0.1% AC was also found to be beneficial to the growth of multiple shoots. Meanwhile, the buds inoculated on 1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+2% sucrose can also obtain a 100% ideal induction rate of adventitious roots. Moreover, the seedlings grew better than the ones grew on the 1/2MS medium with NAA when AC was added in the medium with a proper concentration. As much as 85% of plantlets survived following acclimatization and transfer to potting mixture (sand:vermiculite:perlite=1:1:1).

Key words: *Dayaoshania cotinifolia*; multiple shoots; adventitious roots; plant regeneration

瑶山苣苔为苦苣苔科(Gesneriaceae)瑶山苣苔属的多年生草本植物, 1983年由王文采命名发表的瑶山苣苔属植物新种, 为广西特有植物。据1999年广西珍稀植物调查统计, 瑶山苣苔分布面积约0.2 hm², 株数约9 600株。在1999年国务院颁布的《国家重点保护植物名录》(第一批)中被列为国家I级重点保护野生植物, 被《中国物种红色名录》定为极危种(critically endangered) (汪松和解焱2004)。2004~2006年实地全面调查(实地调查和访问相结合)的结果表明, 瑶山苣苔种群数量已经明显减小, 数量在1 000株左右, 减少了近90%左右。由于其居群数量少, 分布范围狭窄, 并受人为

活动的影响, 其种群数量和分布面积正急剧减少。瑶山苣苔是苦苣苔科较原始的种, 具有较高的科研价值和经济价值。目前, 有关瑶山苣苔的研究和报道很少, 仅对瑶山苣苔的自然概况、分布现状、生物学特性和濒危原因进行了研究(王玉兵等2008, 2011; 莫耐波等2012)。本文探讨不同植物生长调节剂(PGRs)和活性炭(AC)对瑶山苣苔组织培养的影响, 建立了高效的繁育体系, 以期为拯

收稿 2013-05-19 修定 2013-07-02

资助 国家自然科学基金(31000146)。

* 通讯作者(E-mail: tomswfc1977@163.com; Tel: 0717-6397188)。

救这一珍稀濒危植物、保护其种质资源及开发利用等奠定基础。

材料与amp;方法

1 实验材料

瑶山苜苔(*Dayaoshania cotinifolia* W. T. Wang)成熟种子于2010年10月取自广西大瑶山自然保护区。采集好后带回实验室,置于4℃冰箱中保存备用。

2 方法

2.1 无菌材料的获得

将瑶山苜苔种子从冰箱中取出,在超净工作台上先用10% (V/V)次氯酸钠消毒处理15 min,再用无菌蒸馏水漂洗3次,每次漂洗时间在5 min以上;将种子均匀接种于含1/2MS固体培养基的培养皿中,共接种30个培养皿;然后置于光照强度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、温度为(25±2)℃、每天12 h光照的条件下培养(以下培养条件同此),用以得到无菌幼苗。除特殊说明外,MS培养基中均添加3% (W/V)蔗糖和0.75% (W/V)琼脂。

2.2 叶片诱导丛生芽

待上述得到的无菌苗长至2 cm左右时,取生长状态和大小基本一致的无菌苗叶片,将其近轴面向上接种于添加0、0.05%、0.1%、0.2% (W/V) AC的MS固体培养基上。每种培养基接种7瓶,每瓶接种7个叶片外植体。

另取足够数量生长状态和大小一致的无菌苗幼叶,先于MS固体培养基上培养20 d,再挑选生长一致且无褐化的叶片,接种于添加不同含量的6-BA和NAA组合(0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA)和不同含量AC (0.05%、0.1%、0.2%)的MS固体培养基中。每种培养基接种7瓶,每瓶接种7个叶片。

丛生芽诱导率=(产生丛生芽的外植体数/接种的外植体总数)×100%。

2.3 不定芽生根培养

从上述培养的丛生芽中剥离单个芽体,选取长约1 cm、长势一致的瑶山苜苔幼芽,接种于分别添加不同量NAA (0、0.1、0.2、0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和AC (0.05%、0.1%、0.2%)的1/2MS+2%蔗糖固体培养基上诱导生根。每种培养基接种5瓶,每瓶接种15

个幼芽。生根率=(生根的植株数/接种的植株总数)×100%;生根系数=植株生根总数/接种的植株总数。

2.4 炼苗与移栽

待幼苗生长到约4 cm高时,打开培养瓶瓶盖,置于温度为25℃、空气湿度为80%、光照强度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、每天光照12 h的人工气候箱中炼苗3 d,再从培养基中取出幼苗,清洗干净表面的培养基,移栽到温室的混合基质(沙子:蛭石:珍珠岩=1:1:1)。每天采用喷雾的方法保持湿润,分3次,每次30 min。30 d后统计幼苗的成活率及生长状况。

2.5 数据分析

用SPSS 11.5软件中的Duncan新复极差法对数据进行统计分析,差异显著性水平为0.05。

实验结果

1 AC对防止叶片褐化的影响

外植体在添加不同含量AC的MS培养基上培养10 d,所有培养基上均可观察到褐化现象。经过35 d培养后,统计叶片的褐化率,结果显示不同培养基上的褐化率存在差异:添加0.05% AC的MS培养基上,叶片的褐化率最低,仅为26.53%,其次是添加0.1% AC的培养基,两者都能较好地降低褐化率;增加或降低AC浓度,叶片的褐化率都会升高(表1)。因此,MS+0.05% AC为比较适合于瑶山苜苔叶片培养的初代培养基。

表1 AC对瑶山苜苔叶片褐化的影响

Table 1 Effect of AC on leaf browning of *D. cotinifolia*

培养基	接种外植体数/个	褐化数/个	褐化率/%
MS	49	23	46.94±0.23 ^b
MS+0.05% AC	49	13	26.53±0.37 ^a
MS+0.1% AC	49	15	30.61±0.18 ^a
MS+0.2% AC	49	29	59.18±0.27 ^c

数据为平均值±SD,不同字母表示差异显著;表2~5同此。

2 PGRs和AC对丛生芽诱导的影响

瑶山苜苔无菌叶片接种培养20 d后,在MS+1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的培养基(4)上,首先观察到肉眼明显可见的突起(图1-A),而其他培养基上的叶片无此生长迹象;该突起经进一步培

培养, 最终发育为不定芽(图1-B)。继续培养30 d后的统计结果显示, 7种丛生芽诱导培养基中, (2)~(5)的诱导率均在90%以上。其中, 培养基(4)的丛生芽诱导率最高, 为96.43%, 半数以上的叶片表面长满大小不同的丛生芽, 最多的大于120个; 培养基(5)

中的诱导率仅次于培养基(4), 1/3的叶片表面长满丛生芽, 但单个叶片上的丛生芽数量没有培养基(4)上的多。诱导率最低的是培养基(1), 仅为72.72%, 单个叶片上的丛生芽数量也较少, 每个叶片上平均只有2~3个芽体, 最多10个(表2)。

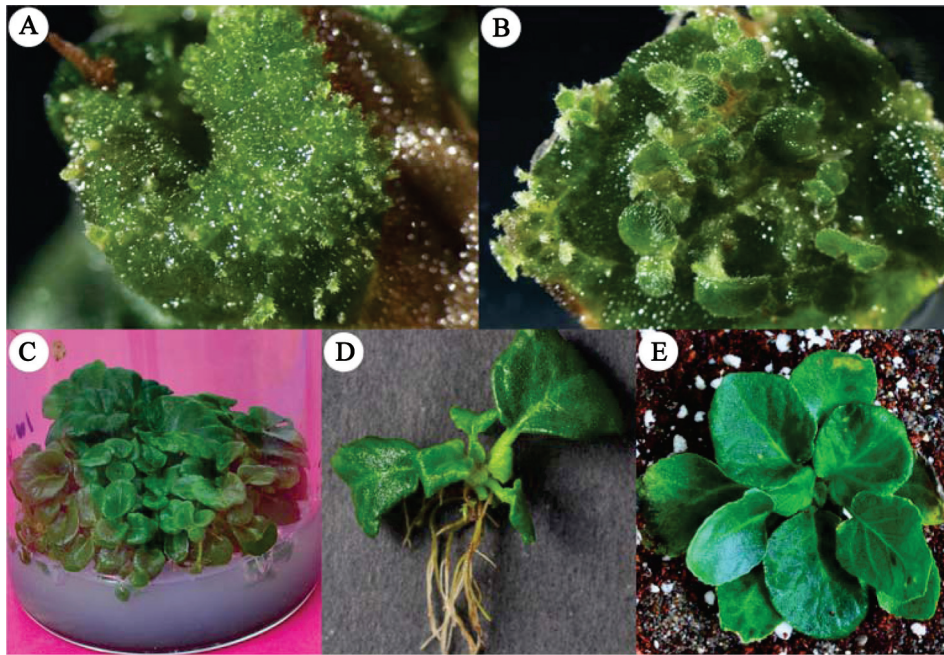


图1 瑶山苕苔不定芽的诱导与植株再生

Fig. 1 Adventitious shoot induction and plant regeneration of *D. cotinifolia*

A: 叶片在MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基上经20 d培养诱导的早期丛生芽; B: 叶片经50 d培养诱导的丛生芽; C: 延长培养时间至100 d, 在只添加AC的培养基上, 由一个叶片诱导的丛生芽长满整个培养瓶; D: 不定芽诱导生根; E: 移栽。

表2 PGRs对瑶山苕苔丛生芽诱导的影响

Table 2 Effect of PGRs on induction of multiple shoots in *D. cotinifolia*

编号	培养基组成 (浓度/mg·L ⁻¹)	丛生芽 诱导率/%	丛生芽 生长量	生长状况	
				生长速度	平均幼芽数/个·外植体 ⁻¹
(1)	MS	72.72±0.14 ^c	+	较慢	2~3
(2)	MS+6-BA 0.1+NAA 0.1	92.59±0.12 ^{ab}	+	缓慢	10
(3)	MS+6-BA 0.5+NAA 0.1	94.37±0.08 ^a	++	一般	30
(4)	MS+6-BA 1.0+NAA 0.1	96.43±0.06 ^a	++++	最快	80
(5)	MS+6-BA 1.5+NAA 0.1	95.65±0.07 ^a	+++	较快	60
(6)	MS+6-BA 2.0+NAA 0.1	89.47±0.11 ^{ab}	++	较快	20
(7)	MS+6-BA 2.5+NAA 0.1	80.95±0.13 ^{bc}	+	一般	8

“+”表示生长量小; “++”表示生长量中等; “+++”表示生长量大; “++++”表示生长量极大。表3~5同此。

将叶片置于添加有不同含量AC的MS培养基中培养60 d时, 均可观察到数量和大小各异的突起, 这些培养基上诱导出的丛生芽生长速度比上述添加PGRs培养基上的缓慢, 生长量也相对较小,

但从生芽叶片绿色更深, 生长健壮。当延长培养时间到100 d时, 仍可获得较高的生长量, 有些生长良好的外植体一个叶片上诱导的丛生芽就可以长满整个培养瓶(图1-C)。从培养60 d后的统计结果

可以看出, 在MS+0.1% AC的培养基上, 诱导的丛生芽生长状况最佳, 生长速率和诱导的丛生芽数量均比另外两组高(表3), 因此在培养基中添加0.1% AC有利于瑶山苜苔叶片诱导丛生芽。

表3 AC对瑶山苜苔丛生芽诱导的影响

Table 3 Effect of AC on induction of multiple shoots in *D. cotinifolia*

培养基	丛生芽诱导率/%	生长量	生长状况
MS+0.05% AC	75.51±0.13 ^b	+	少数叶片出现一定程度的褐化, 多数叶片上都长出数量不一的丛生芽, 但生长较慢
MS+0.1% AC	83.67±0.10 ^a	++	个别叶片出现一定程度的褐化, 大多数叶片上长出数量不一的丛生芽, 且生长较快
MS+0.2% AC	77.55±0.15 ^b	+	少数叶片出现一定程度的褐化, 多数叶片上都长出数量不一的不定芽, 不定芽生长状况良好, 但生长较慢

3 PGRs和AC对生根的影响

瑶山苜苔幼芽的生根培养结果显示, 经过18 d的培养, 个别芽体的基部有微小的白色突起产生, 经进一步培养, 最终发育成不定根(图1-D)。培养50 d后, 观察并统计不同培养基上的生根状况。结果表明: 不定芽在不含NAA和含不同含量NAA的生根培养基上都能生根, 且生根率较高, 但不同培养基上生根效果存在差异, 随着NAA浓度的增加, 生根系数先升高后降低。当NAA浓度为0.1 mg·L⁻¹时, 生根率和生根系数均最大, 且生根最快, 单个

外植体上诱导的根系最为发达, 根毛较多, 平均长度也最长; NAA浓度为0.2 mg·L⁻¹时, 虽然生根率和生根系数也很高, 但单个植株的生根系数变化不稳定, 且幼苗的生长状态没有NAA浓度为0.1 mg·L⁻¹的好; NAA浓度升高到0.4 mg·L⁻¹时, 不仅生根率和生根系数都降低, 且出现一定程度的褐变现象, 幼苗也表现出生长缓慢、颜色变浅等不良生长状态, 个别植株甚至变黄(表4)。综合生根率、生根系数和幼苗生长状况可看出, 1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+2%蔗糖为诱导瑶山苜苔幼苗生根的最佳培养基。

表4 PGRs对瑶山苜苔生根的影响

Table 4 Effect of PGRs on root induction of *D. cotinifolia*

培养基 (浓度/mg·L ⁻¹)	生根率/%	生根系数/条·株 ⁻¹	生长量	生长状况
1/2MS	86.67±0.13 ^b	2.80	+	苗基部长出不定根, 多无根毛, 幼苗生长状况良好
1/2MS+NAA 0.1	100.00±0 ^a	5.60	+++	苗基部呈放射状长出不定根, 多有根毛, 幼苗生长状况良好
1/2MS+NAA 0.2	94.67±0.06 ^{ab}	5.47	++	苗基部呈放射状长出不定根, 幼苗生长状况良好
1/2MS+NAA 0.4	88.00±0.14 ^{ab}	3.73	++	苗基部呈放射状长出不定根, 培养基出现一定程度变色, 幼苗长势不佳, 出现轻微黄化现象

接种于添加不同含量AC的1/2MS+2%蔗糖培养基中的幼芽, 经过25 d的培养, 都可陆续观察到早期的不定根; 培养50 d后, 不定根的诱导效果差异不显著, 生根系数和生根率都在一个很小的范围内变化(表5), 但幼苗的生长状况明显比上述添加不同含量NAA的培养基中的健康。可见, 添加AC对瑶山苜苔幼芽生根率和生根系数无明显促进作用, 但有利于幼苗的健康生长。

4 炼苗和移栽

瑶山苜苔幼苗经炼苗后移栽到温室中, 30 d后幼苗的成活率高达85%, 成活的幼苗正常生长(图1-E)。

讨 论

由于植物细胞在离体状态下缺乏合成生长素和分裂素的能力, 因此, 在组织培养过程中往往需

表5 AC对生根的影响

Table 5 Effect of AC on root induction of *D. cotinifolia*

培养基	生根率/%	生根系数/条·株 ⁻¹	生长量
1/2MS+0.05% AC	90.67±0.14 ^a	2.78	++
1/2MS+0.1% AC	89.33±0.09 ^a	2.67	++
1/2MS+0.2% AC	90.67±0.11 ^a	2.74	++

要添加适当的外源PGRs以促进细胞的生长和分化(崔凯荣等2000)。本文中,在丛生芽和不定根的诱导过程中,外源PGRs的作用效果都很明显:低浓度的NAA配合适当高浓度的6-BA具有较高的丛生芽诱导率,而NAA能诱导出较多的不定根。

一些苦苣苔科植物组织培养的研究结果表明,6-BA和NAA配合使用可以促进其不定芽的诱导(黄宁珍等2010; Ma等2011);这与本文结果一致,只是在不同植物中使用浓度和比例稍有差异,这可能与不同植物的遗传差异相关。另外,培养基中添加NAA和AC有利于苦苣苔科植物不定芽诱导生根(王辉等2010;刘伟和黄勇2010;谭晓风等2009;余海霞等2012);本实验也得到同样的结果。

污染、褐变和玻璃化被称为组织培养过程中的三大难题,其中,早期材料的褐变问题在本试验中较为突出。为防止实验材料的褐化,常在培养基中添加一些防褐化剂,如AC等。本研究结果显示,合适浓度的AC能有效防止褐化,这与陈菲等(2005)在蝴蝶兰组织培养中的结果一致。值得一提的是,AC的量太小起不到防褐化作用,而量太大则会促进褐化、抑制生长。本试验初代培养时添加0.2% AC的培养基中褐化率比不加AC的大很多,这说明过量的AC有负面效应。这与AC的吸附作用没有选择性相关,因为AC不仅吸附了有毒、有害物质,还吸附培养基中的营养成分,造成培养材料不能得到足够的养分,从而影响生长。

此外,AC在组织培养材料的生长过程中也起到一定的促进作用。张利等(2012)的研究表明,AC对白皮松芽增殖的作用不大,但能显著促进芽的伸长,而AC含量过高又会对芽的伸长产生抑制作用;熊丹等(2007)对宜昌百合的研究也表明,AC能促进芽长得粗壮,使根系发达。本研究中,添加0.1% AC对瑶山苣苔丛生芽的诱导效果最好,降低

或提高AC含量,都会降低丛生芽诱导率。在生根方面,毛元荣等(2004)的研究表明,AC对高山杜鹃的生根率和生根量没影响,但有利于根的生长整齐和形态正常;这与本文中AC对瑶山苣苔生根的影响是一致的。因此,综合考虑各方面因素,在实验中应注意选择能满足吸附需要的最低AC含量。

参考文献

- 陈菲,李黎,宫伟(2005).植物组织培养的防褐化探讨.北方园艺,(2): 69
- 崔凯荣,刑更生,周攻克,刘新民,王亚馥(2000).植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节.遗传,22(5): 349~354
- 黄宁珍,赵志国,石云平,唐凤鸾,付传明,盘波,周太久(2010).多齿吊石苣苔的组织培养与快速繁殖.植物生理学通讯,46(9): 965~966
- 刘伟,黄勇(2010).吊石苣苔的组织培养与快速繁殖.植物生理学通讯,46(2): 159~160
- 毛元荣,路群,汤敏,周根余(2004).影响高山杜鹃生根的几个因素.曲阜师范大学学报,30(1): 88~91
- 莫耐波,谢云珍,覃康平,涂德华,王玉兵(2012).珍稀濒危植物瑶山苣苔伴生群落特征.广西林业科学,41(3): 242~247
- 谭晓风,邓建军,胡孝义,乌云塔娜,包梅荣(2009).莨菪山唇柱苣苔组织培养与植株再生.经济林研究,27(3): 24~27
- 王辉,钟泰林,夏国华,李根有(2010).闽赣长蒴苣苔的组织培养和快速繁殖.植物生理学通讯,46(12): 1267~1268
- 汪松,解焱(2004).中国物种红色名录(第一卷):红色名录.北京:高等教育出版社
- 王玉兵,梁宏伟,陈发菊,覃康平,莫耐波(2008).广西特有植物瑶山苣苔的濒危原因及保护对策.生态环境,17(5): 1956~1960
- 王玉兵,梁宏伟,莫耐波,覃康平,汤庚国(2011).珍稀濒危植物瑶山苣苔开花生物学及繁育系统研究.西北植物学报,31(5): 861~867
- 熊丹,陈发菊,梁宏伟,王玉兵,张德春(2007).宜昌百合的组织培养研究.福建林业科技,34(4): 91~94,97
- 余海霞,张占江,吕惠珍,韦莹,黄雪彦(2012).钟冠唇柱苣苔组织培养研究.湖北农业科学,51(12): 2606~2608,2615
- 张利,闰辉,高文强,赵红霞,樊金会(2012).白皮松组织培养研究.中国农学通报,28(7): 13~16
- Ma GH, da Silva JAT, Lü JF, Zhang XH, Zhao JT (2011). Shoot organogenesis and plant regeneration in *Metabriggsia ovalifolia*. Plant Cell Tiss Org Cult, 105: 355~361