

# 大苞短毛唇柱苣苔离体培养和快速繁殖

文 弢, 娄 丽, 侯 娜\*, 李从瑞, 王莲辉

贵州省林业科学研究院, 贵阳 550005

**摘要:** 为了探索大苞短毛唇柱苣苔离体培养和快速繁殖的最佳培养条件。以大苞短毛唇柱苣苔叶片为外植体, 建立其组培快繁再生体系。结果表明大苞短毛唇柱苣苔叶片外植体的最优消毒方法为: 采用 75% 酒精灭菌 15 s, 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌 4 min; 叶片诱导不定芽最佳培养基为: MS + TDZ 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 诱导率为 83.75%; 不定芽增殖最佳培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 增殖系数可达 16, 且不定芽生长良好; 生根培养基以 1/2MS + IBA 0.1 mg/L 为最好, 生根率达 96.67% 以上。组培苗经炼苗及移栽, 成活率达 95% 以上。建立了大苞短毛唇柱苣苔叶片组织培养的快繁体系, 为规模化生产大苞短毛唇柱苣苔提供技术指导。

**关键词:** 大苞短毛唇柱苣苔; 离体培养; 快速繁殖

中图分类号: S731

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.005

## *In vitro* Culture and Rapid Propagation of *Chirita brachytricha* var. *magnibracteata* W. T. Wang et D. Y. Chen

WEN Tao, LOU Li, HOU Na\*, LI Cong-rui, WANG Lian-hui

Guizhou Academy of forestry, Guiyang 550005, China

**Abstract:** In this study, the condition of *in vitro* culture and rapid propagation of *Chirita brachytricha* var. *magnibracteata* W. T. Wang et D. Y. Chen was investigated with its leaves as explants. The effects of different hormones for callus induction and plant regeneration of leaves were studied. The results showed that: the optimal way to obtain sterile explant for leaves were sterilized in 75% ethyl alcohol for 15 s then 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 4 min; The optimal medium for callus of leaves was MS + TDZ 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, induction rate was 83.75%; The optimal medium of induction of adventitious buds was MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, Multiplication factor was 16, and seedlings grew well; The optimal medium and plant growth substances combination for rooting induction was 1/2MS + IBA 0.1 mg/L; Rooting rate was 96.67%. Transplant survival rate of plantlet reached more than 95%. In conclusion, the condition of plant regeneration and clonal propagation system was established. It provided technical guidance for production of *C. brachytricha* var. *magnibracteata* W. T. Wang et D. Y. Chen.

**Key words:** *Chirita brachytricha* var. *magnibracteata* W. T. Wang et D. Y. Chen; *in vitro* culture; rapid propagation

大苞短毛唇柱苣苔 (*Chirita brachytricha* var. *magnibracteata* W. T. Wang et D. Y. Chen) 为苦苣苔科唇柱苣苔属植物, 是多年生草本植物, 自然分布区狭小, 产贵州荔波; 其叶片纸质, 叶较大, 花冠紫色, 花期 5 月, 色彩绚丽<sup>[1-4]</sup>, 极富观赏价值; 大苞短毛唇柱苣苔原生境于山谷林下石上, 因此具有较强的抗干旱耐瘠薄能力, 可作园林绿化地被植物。由于自身的遗传缺陷以及人为对野生资源的过度开发, 很多极具观赏价值的唇柱苣苔属植物濒临灭绝, 因此

中国所有的唇柱苣苔物种均已列入《中国物种红色名录》<sup>[5-7]</sup>。目前苦苣苔科植物因花繁色艳、叶片独特及株形紧凑而深受人们喜爱, 但有些仍处于深山人未知的状况, 尚未进入商品开发阶段, 因而具有极大的开发潜力。

大苞短毛唇柱苣苔是短毛唇柱苣苔的变种<sup>[1]</sup>, 目前仅在贵州荔波发现一个分布点, 数量稀少, 仅有 100 株左右, 急需保护。该植物叶和花序苞片较大, 具有很高的观赏和育种价值, 可做室内观赏盆栽花卉, 并且对室内环境适应性良好, 极具室内观赏盆栽花卉开发前景<sup>[3,4]</sup>。有许多研究者已成功组织培养了唇柱苣苔属中一些植物<sup>[8-11]</sup>, 因此本文以大苞短毛唇柱苣苔的叶片为外植体, 建立和优化了大苞短毛唇

柱苣苔植株的组培快繁体系,利用该快繁方法为大苞短毛唇柱苣苔植物的资源保存、遗传转化体系建立提供参考。

## 1 实验材料

试验材料为大苞短毛唇柱苣苔健康叶片,采自贵州省荔波茂兰自然保护区。

## 2 实验方法

### 2.1 培养基与培养条件

以 MS 为基本培养基, pH 5.8, 蔗糖 25 g/L, 琼脂 5 g/L。培养温度为  $(25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ , 光照强度 1500 ~ 2000 lx, 光照时间 12 h/d。

### 2.2 消毒

外植体经流水冲洗 2 h, 用不同消毒方法消毒后无菌水冲洗 3 ~ 5 次, 接种于无生长调节剂的 MS 固体培养基上, 每种方法处理 30 个外植体, 光照培养 10 d 后, 记录外植体污染数和存活数。

### 2.3 叶片诱导不定芽

将消毒的外植体叶片切成  $0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$  的小块, 接种于含有不同生长调节剂配比的 MS 固体培养基上, 附加不同浓度的 TDZ 和 NAA 培养基中, 进行叶片诱导丛生芽试验。设计 NAA 浓度为 0.1 mg/L, TDZ 浓度为 0.1、0.3、0.5、0.8 和 1.0 mg/L 5 个浓度梯度, 30 d 统计不定芽萌芽情况。每个处理 10 瓶, 每瓶接种 1 个外植体, 每个水平重复 3 次。光照培养 30 d 后, 观察记录。

### 2.4 不定芽增殖培养

将诱导出的丛生芽, 接种于附加不同浓度的 6-

BA、NAA 的 MS 培养基上进行培养。设计 NAA 浓度为 0.1 mg/L, 细胞分裂素 (6-BA) 分别设 0.1、0.5、0.8/1.0 mg/L/4 个浓度, 30 d 统计不定芽分化情况。每个水平接种 10 瓶, 每瓶接种 1 个外植体, 每个水平 3 次重复。光照培养 30 d 后, 观察记录。增殖系数 = 瓶苗在一个周期内形成的有效苗数/接种苗数。

### 2.5 不定芽生根培养

待丛生芽生长至 4 ~ 5 片正常叶片时, 剪下生长健壮的小苗, 接种于附加不同浓度的 IBA (0、0.1、0.3、0.5 mg/L) 的 MS 固体培养基中, 每个水平接种 10 瓶, 每瓶接种 1 个外植体, 每个水平 3 次重复。光照培养 30 d 后, 观察植株生长情况并计算生根率。

$$\text{生根率} = \frac{\text{生根小苗数}}{\text{总苗数}} \times 100\%$$

### 2.6 再生植株炼苗与移栽

选择生长健壮的大苞短毛唇柱苣苔再生植株, 打开瓶盖, 室内培养 7 d 后, 洗尽根上残余的培养基, 将小苗移于经高锰酸钾消毒的腐殖土和蛭石 (体积比 3:1) 混合的基质中, 温室内培养, 每 7 d 喷洒 0.1% 的磷酸二氢钾, 直至小苗能正常生长。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同消毒方法对大苞短毛唇柱苣苔成活率的影响

结果表明 (见表 1), 75% 酒精消毒时间一定时, 随着 0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡时间延长, 成活率下降, 叶片出现褐化现象, 故采用 75% 酒精处理 15 s 后 0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡 4 min, 叶片能够获得较高的成活率和较低的污染率, 也能达到较好的消毒效果。

表 1 不同方案效果结果统计表

Table 1 Statistics of different results

消毒方案 Disinfection solution	污染数 Pollution number (n)	污染率 Pollution rate (%)	成活数 Survival number (n)	成活率 Survival rate (%)
酒精 75% 15s + $\text{HgCl}_2$ 2 min	29	96.67%	1	3%
酒精 75% 15s + $\text{HgCl}_2$ 4 min	11	36.67%	17	57%
酒精 75% 15s + $\text{HgCl}_2$ 6 min	13	43.33%	8	27%
酒精 75% 15s + $\text{HgCl}_2$ 8 min	12	40.00%	4	13%

### 3.2 不同生长调节剂组合对大苞短毛唇柱苣苔叶片不定芽诱导的影响

大苞短毛唇柱苣苔接种于 (表 2) 所示的培养基上培养 45 d 左右在绿白色的愈伤组织上出现不定芽, 且大部分出现在切口处 (图 1A)。根据方差分

析和多重比较试验结果发现, 不同生长调节剂组合对大苞短毛唇柱苣苔叶片不定芽诱导具有明显差异 (表 2); 在前 20 d 的培养过程中, 芽的分化和生长速度较慢, 但继续培养 15 d 左右, 不定芽的分化数量增多, 生长速度加快。在 NAA 浓度一定, TDZ 浓

度在 0.1 ~ 1.0 mg/L 之间变化时,叶片诱导不定芽率呈先上升后下降的趋势,在 0.5 mg/L 时,诱导率达到最高,为 83.75%;NAA 浓度固定不变时,低浓度的 TDZ 不利于不定芽的分化,诱导率和平均发芽数随着 TDZ 浓度的增加先升高后下降,在 0.5 mg/L 时达到最高;而高于 0.5 mg/L 时,玻璃化现象严重,诱导率反而下降。因此,NAA 浓度为 0.1mg/L 时,TDZ 浓度为 0.5 mg/L 更适合诱导不定芽,诱导率达到最高,为 83.75%,平均萌芽数为 16.35 个。因此,适合叶片诱导不定芽的最佳培养基为 MS + 0.5

mg/LTDZ + 0.1 mg/LNAA。

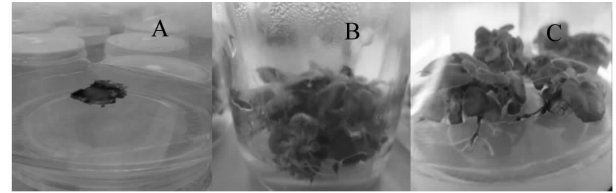


图 1 大苞短毛唇柱苣苔组织培养不同阶段

Fig. 1 Tissue culture of *C. brachytricha*. var. *magnibracteata* W. T. Wang et D. Y. Chen at different stages

表 2 不同生长调节剂组合对大苞短毛唇柱苣苔叶片不定芽的诱导

Table 2 Induction of the blade of *C. liboensis* with different hormone combinations

编号 No.	生长调节剂组合 Hormone combination (mg/L)		诱导率(均值 ± SE) Induction rate (average ± SE) (%)	平均发芽数(均值 ± SE) Average germination number (average ± SE) (%)
	TDZ	NAA		
1	0.1	0.1	54.63 ± 0.021c	9.21 ± 0.015
2	0.3	0.1	60.31 ± 0.102bc	10.36 ± 0.021
3	0.5	0.1	83.75 ± 0.025a	16.35 ± 0.043
4	0.8	0.1	71.32 ± 0.035b	13.34 ± 0.045
5	1	0.1	73.45 ± 0.074b	13.85 ± 0.021

### 3.3 不同浓度生长调节剂组合对大苞短毛唇柱苣苔不定芽增殖的影响

30 d 后统计其增殖情况,并观察不定芽分化数量及不定芽生长状况。大苞短毛唇柱苣苔无菌苗增殖主要靠分化不定芽。大部分丛生芽浓密,一些长势旺盛的芽能够直接生根(图 1B)。本试验中由于生长调节剂浓度不同,不定芽分化的数量以及萌发

后不定芽的长势都有明显差异(见表 3)。观察比较发现,6-BA0.5 mg/L + NAA0.1 mg/L 为大苞短毛唇柱苣苔不定芽增殖最佳生长调节剂配比,分化不定芽较快,很快形成小植株形态,数量多,部分分生出根,不定芽伸长生长明显;无菌芽在该组合培养基上 15 d 开始大量增殖,每个无菌芽分化不定芽 10 ~ 18 个不等,平均增殖系数 16(图 1B)。

表 3 不同浓度生长调节剂处理对不定芽增殖生长的影响

Table 3 Effects of different concentrations of hormone treatment on the growth of adventitious bud multiplication

生长调节剂组合 Hormone combination (mg/L)		接种数 Number of vaccination (n)	分化不定 芽数量 Number of adventitious bud differentiation (n)	增殖系数 Growth coefficient	不定芽生 长情况 Adventitious bud growth
6-BA	NAA				
0.1	0.1	30	10	10	分化不定芽慢,半数以上能分生出根
0.5	0.1	30	18	18	分化不定芽较快,很快形成小植株形态,部分分生出根
0.8	0.1	30	16	16	分化不定芽快,较快形成小植株形态,但不定芽数量多、小
1.0	0.1	30	17	17	分化不定芽快,较快形成小植株形态,但不定芽数量多、小,部分有玻璃化现象

### 3.4 不同浓度 IBA 对大苞短毛唇柱苣苔根诱导的影响

选择生长健壮的不定芽接种到生根培养基上,接种 15 d 左右芽苗底部有白色突起形成,开始生根(图 1C)。根据方差分析和多重比较结果表明不

同试验处理之间具有明显差异,叶片明显增大,根开始发生,一般在 15 d 内,陆续长出新叶 1 ~ 2 对,根 4 ~ 6 条;3 周后生根率最少 36.67%(见表 4)。从试验结果而知:大苞短毛唇柱苣苔生根较为容易,在无生长调节剂的 MS 培养基中生长 15 d 左右,长出较

少的根,而附加0.5 mg/L的 IBA 时,根系发达,植株生长健壮,须根多,发育良好,有利于移栽,生根率可

达 96.67%。因此大苞短毛唇柱苣苔的最佳生根培养基为 1/2MS + 0.5 mg/L IBA。

表 4 不同培养基对不定芽诱导生根情况

Table 4 the different culture medium on adventitious bud of inducing rooting

序号 No.	IBA(mg/L)	培养瓶数 Culture number (n)	诱导生根瓶数 Bottle to take root (n)	生根率(均值 ± SE) Rooting rate (average ± SE) (%)	根生长情况 Root growth
1	0	30	11	36.67% ± 0.27d	根短,无须根,生根时间长
2	0.1	30	15	50.00% ± 0.31c	平均 3-4 根,有须根,根较长
3	0.3	30	22	73.33% ± 0.28b	平均 4-5 根,有须根,根较长
4	0.5	30	29	96.67% ± 0.35a	平均 5-6 根,须根多,根长

### 3.5 大苞短毛唇柱苣苔炼苗与移栽

选择生长健壮的大苞短毛唇柱苣苔再生植株,打开瓶盖,室内培养 7 d 后,将生根苗从培养瓶中小心取出,洗掉根部附着的培养基,用 0.1% 多菌灵浸泡 15 min,然后移入腐殖土和珍珠岩(体积比 3:1)的混合基质中,盖上塑料膜保持空气湿度,3 d 浇一次水,保持基质湿润;每 7 d 喷洒 0.1% 磷酸二氢钾,2 周长势稳定后,揭去塑料膜,成活率达到 95% 以上。

## 4 结论

在消毒过程中,大苞短毛唇柱苣苔叶片对酒精的敏感度较高,大苞短毛唇柱苣苔叶片有短毛,酒精消毒时间过长叶片出现枯黄色斑点,掌握适当的酒精处理时间对获得叶片的无菌外植体非常重要,因此本试验叶片采用 75% 酒精处理 15 s 后 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 4 min,能够获得较高的成活率(57%),也能达到较好的消毒效果。

不同生长调节剂浓度组合对大苞短毛唇柱苣苔叶片不定芽的诱导试验结果表明,TDZ 对不定芽诱导起主要作用,TDZ 浓度为 0.5 mg/L 有利于诱导率和不定芽数量的提高,浓度质量高于 0.5 mg/L 时,不定芽玻璃化现象严重;利用不同浓度的生长调节剂配比进行不定芽增殖的试验中发现,0.5 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 配合使用时,更利用不定芽增殖。

在生根过程中无生长调节剂的 1/2MS 培养基能够使不定芽生根,但添加一定浓度的 IBA,更有利于大苞短毛唇柱苣苔的生根,且根的分枝条数较多,植株生长健壮。室外移栽时,大苞短毛唇柱苣苔的再生植株适应能力较强,对空气相对湿度要求较高,组培苗经炼苗后,生长迅速,成活率达 95% 以上。

### 参考文献

- 1 Editorial Committee of the Administration Bureau of Chinese Plant Medicine (中国植物志编辑委员会). Flora of China (中国植物志). Beijing: Science Press, 1990, 69: 375.
- 2 Li ZY(李振宇), Wang YZ(王印政). Chinese Gesneriaceae. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2004.
- 3 Luo Y(罗扬), Deng LX(邓伦秀), Yang CH(杨成华), et al. Guizhou Wild Herbaceous Flowers. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press, 2009.
- 4 Li CR(李从瑞), Deng LX(邓伦秀), Chen ZP(陈志萍), et al. The distribution and landscape application of *Chirita's* germ plasm resource. *Seed* (种子), 2014, 33(1): 63-64.
- 5 Li ZY(李振宇). The geographical distribution of the subfamily *Cyrtandroideae* Endl. Emend. Burt (Gesneriaceae). *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1998, 34: 341-360.
- 6 Wang S(汪松), Xie Y(解焱). China Species Red List. Beijing: Higher Education Press, 2004.
- 7 Zhang DY(张大勇), Jiang XH(姜新华). Progress in studies of genetic diversity and conservation biology of endangered plant species. *Biodivers Sci* (生物多样性), 1999, 7(1): 31-37.
- 8 Wen F(温放), Zhang QX(张启翔), Ren XX(任翔翔). *In vitro* culture and rapid propagation of *Chirita lutea* Yan Liu & Y. G. Wel. *Plant Physiol Communic* (植物生理学通讯), 2008, 44: 301-302.
- 9 Liang GY(梁桂友), Wen F(温放), Li ZD(李湛东). Tissue culture and rapid propagation of *Chirita pungentisepala* W. T. Wang. *Plant Physiol Communic* (植物生理学通讯), 2007, 43: 321.
- 10 Liang GY(梁桂友). Study on micropropagation of three species of gesneriads. Beijing: Beijing Forestry University, MSc. 2007.
- 11 Wen F(温放). *In vitro* micropropagation of *Chirita eburnean* Hance. *Plant Physiol Communic* (植物生理学通讯), 2006, 42: 906.