

潘梅, 戚华莎, 黄赛, 等. 烟叶唇柱苣苔不定芽的诱导因子[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 75-77.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.023

# 烟叶唇柱苣苔不定芽的诱导因子

潘梅, 戚华莎, 黄赛, 王景飞, 吕德任, 符瑞侃

(海南省农业科学院园林花卉研究所, 海南海口 571100)

**摘要:**以烟叶唇柱苣苔无菌叶片为试验材料, 研究培养基 pH 值、无机盐浓度、蔗糖浓度、植物生长调节剂种类及配比等对不定芽诱导的影响, 以期筛选出最佳诱导培养基。结果表明: 不定芽诱导的最佳培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 30 g/L, 灭菌前 pH 值为 6.0, 40 d 不定芽诱导率为 100%, 不定芽数平均为 9.58 个/张, 生长势好。

**关键词:**烟叶唇柱苣苔; 叶片; 不定芽; 组织培养

**中图分类号:** Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0075-03

苦苣苔科植物具有极重要的生物学价值和分类意义<sup>[1]</sup>, 其种类繁多, 全世界约有 150 属 3 000 余种, 我国有 58 属约 463 种<sup>[2]</sup>, 其中海南省约有 13 属 21 种 1 变种, 而特有种 10 种<sup>[3]</sup>。苦苣苔科植物中许多种类是重要的观赏植物、药用植物和特种蔬菜资源。烟叶唇柱苣苔(*Chirita heterotricha*)是苦苣苔科唇柱苣苔属多年生草本植物, 生于海拔约 430 m 的山谷林中或溪边石上, 是海南特有的野生花卉, 其花冠淡紫色或白色, 极为优雅, 而且花期长, 四季长绿, 适合观赏和园艺。此外, 唇柱苣苔属植物具有广泛的适应性<sup>[4]</sup>, 因而烟叶唇柱苣苔具有极大的开发潜力。目前, 烟叶唇柱苣苔仍处于野生状态, 未进行商品化开发。由于人类活动的干扰、生态环境恶化以及自身的原因, 烟叶唇柱苣苔资源逐渐减少, 因此极有必要进行组织培养研究, 以满足烟叶唇柱苣苔的保护和开发利用的需要。本试验以烟叶唇柱苣苔无菌叶片作为材料, 较系统地研究叶片分化不定芽过程中的若干影响因素, 以期筛选出最佳的不定芽诱导培养条件, 快速建立烟叶唇柱苣苔组培技术体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

植株采自海南省保亭县。取幼叶进行表面消毒后培养获得的无菌叶片作为试验材料。

收稿日期: 2014-02-09

基金项目: 海南省科学事业费项目(编号: 琼财预[2013]131 号)。

作者简介: 潘梅(1962—), 女, 广西隆安人, 高级园艺师, 主要从事植物组织培养研究。Tel: (0898) 65380711; E-mail: panmei200@sina.com。

通信作者: 符瑞侃, 园艺师, 主要从事药用植物资源开发与利用研究。

Tel: (0898) 65380711; E-mail: fu0898@163.com。

[6] 姜灵敏, 徐有明, 张冬梅, 等. 红刺玫愈伤组织诱导再生体系的建立[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(4): 914-916.

[7] 周杰, 曹清河, 周志林, 等. 菜用型甘薯不同品种组织培养差异研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 60, 62.

[8] 张弘弛, 马养民, 刘瑞, 等. 无花果内生真菌的研究 I. 抗植物病原真菌活性的筛选[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 232-236.

### 1.2 试验方法

在基本培养基中添加不同种类和浓度的植物生长调节剂, 除试验项目以外, 所有处理中的基本培养基中含食用蔗糖 30 g/L、卡拉胶 9 g/L, 灭菌前 pH 值为 6.0, 光照强度 1 500 lx, 光照时间 9 h/d, 培养温度 (26 ± 2) °C。取无菌植株小叶片(约 0.5 cm × 0.5 cm), 以叶面朝上接种于各种培养基上(图 1), 每个处理接种 8 袋, 每袋 3 张叶, 3 次重复, 定期观察并记录, 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 = 诱导出芽叶片数/接种叶片数 × 100%, 平均不定芽数 = 不定芽总数/诱导出芽叶片数。



图1 烟叶唇柱苣苔接种叶片

1.2.1 不同接种方式对不定芽诱导的影响 以 MS + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 为基本培养基, 接种叶片分别以叶背和叶面平放于培养基上, 共 2 种处理。

1.2.2 pH 值对不定芽诱导的影响 以 MS + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 为基本培养基, 灭菌前 pH 值分别调至 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0, 共 5 个处理。

1.2.3 无机盐浓度对不定芽诱导的影响 以 1/4MS、2/4MS、3/4MS、MS 作为基本培养基, 各添加 6-BA 0.1 mg/L +

[9] 孙丽娟, 关洪斌, 赵晶, 等. 无花果组织培养中防止外植体褐化的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(2): 535-536.

[10] 胡建刚, 郭继善. 无花果的组织培养[J]. 南京林业大学学报, 1994, 18(3): 73-76.

[11] 王亮, 王彩虹, 田义珂, 等. 无花果品种“中国紫果”离体培养与保存研究[J]. 河北林果研究, 2009, 24(1): 81-83.

NAA 0.1 mg/L,共 4 个处理。

1.2.4 不同种类细胞分裂素对不定芽诱导的影响 以 MS + NAA 0.1 mg/L 为基本培养基,分别添加 6 - BA 0.1 mg/L、KT 0.1 mg/L 和 TDZ 0.1 mg/L,共 3 个处理。

1.2.5 蔗糖浓度对不定芽诱导的影响 以 MS + 6 - BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 为基本培养基,设置蔗糖浓度 10、20、30、40、50 g/L 共 5 个处理。

1.2.6 不同植物生长调节剂组合对不定芽诱导的影响 以 MS 为基本培养基,设计 6 - BA 0.1、0.5、1.0 mg/L 与 NAA 0.1、0.5 mg/L 不同配比,共 6 个处理。

1.3 数据分析

采用方差分析法,*F* 测验显著后用新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同接种方式对不定芽诱导的影响

烟叶唇柱苣苔叶片几乎无明显的愈伤组织分化,可以直接分化出不定芽。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。从表 1 可见,以叶背和叶面 2 种方式接种培养的结果差异极大,以叶背接触培养基的叶片不定芽诱导率高达 100%,平均不定芽数为 7.22 个/张;而叶面接触培养基的不定芽诱导率只有 73.91%,平均不定芽数为 4.76 个/张。方差分析结果表明,2 种接种方式不定芽诱导率和平均不定芽数的差异均达到极显著水平,因此烟叶唇柱苣苔叶片不定芽的诱导以叶背平置于培养基上为宜。

表 1 不同接种方式对烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的影响

接种方式	不定芽诱导率 (%)	平均不定芽数 (个/张)	不定芽生长势
叶背朝下	100.00Aa	7.22Aa	++++
叶面朝下	73.91Bb	4.76Bb	+++

2.2 pH 值对不定芽诱导的影响

由表 2 可知,pH 值为 6.0 的培养基上不定芽的诱导率和平均不定芽数最高,分别为 100% 和 7.34 个/张;其次为 pH 值为 6.5 的培养基,其不定芽诱导率和平均不定芽数分别为 96.30% 和 6.07 个/张;最低的为 pH 值为 5.0 的培养基,其不定芽诱导率和平均不定芽数分别为 79.17% 和 4.01 个/张。经方差分析可知,pH 值为 6.0 的培养基与其他培养基处理的不定芽诱导率和平均不定芽数的差异极显著,因此烟叶唇柱苣苔不定芽诱导培养基的 pH 值在灭菌前宜调至 6.0。

表 2 不同 pH 值对烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的影响

pH 值	不定芽诱导率 (%)	平均不定芽数 (个/张)	不定芽生长势
5.0	79.17Ee	4.01Dd	++
5.5	85.19Dd	4.85Cc	+++
6.0	100.00Aa	7.34Aa	++++
6.5	96.30Bb	6.07Bb	++++
7.0	92.59Cc	5.12Cc	+++

2.3 无机盐浓度对不定芽诱导的影响

从表 3 可见,除 1/4MS 外,其余 3 种无机盐浓度对叶片不定芽的诱导率均能达到 100%,而平均不定芽数则随着无

机盐浓度的增加而增加,呈正相关关系。MS 对叶片不定芽的诱导效果最好,平均不定芽数最多,达 7.23 个/张,与其他处理差异极显著,且芽苗生长健壮,叶色浓绿;3/4MS 的诱导效果次之,分化芽数为 6.18 个/张,芽生长势也好,叶绿色;1/2MS 和 1/4MS 诱导的平均不定芽数差异不显著,但 1/4MS 诱导的不定芽生长势差,部分叶片出现黄化现象。说明全量 MS 培养基适合烟叶唇柱苣苔不定芽诱导培养。

表 3 不同无机盐浓度对烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的影响

基本培养基	不定芽诱导率 (%)	平均不定芽数 (个/张)	不定芽生长势
1/4MS	92.31Bb	3.78Cc	+
1/2MS	100.00Aa	3.79Cc	+++
3/4MS	100.00Aa	6.18Bb	++++
MS	100.00Aa	7.23Aa	++++

2.4 不同种类细胞分裂素对不定芽诱导的影响

由表 4 知,6 - BA 和 TDZ 对叶片不定芽的诱导率均达到 100%,但二者诱导的平均不定芽数差异极显著,6 - BA 平均不定芽数达 7.17 个/张,而 TDZ 仅为 4.25 个/张;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/张。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 以后出现较多的玻璃化现象。因此,烟叶唇柱苣苔不定芽的诱导培养,细胞分裂素宜选用 6 - BA。

表 4 不同种类细胞分裂素对烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的影响

细胞分裂素	不定芽诱导率 (%)	平均不定芽数 (个/张)	不定芽生长势
6 - BA	100.00Aa	7.17Aa	++++
KT	47.62Bb	3.10Cc	++
TDZ	100.00Aa	4.25Bb	++

2.5 蔗糖浓度对不定芽诱导的影响

由表 5 可以看出,30 g/L 蔗糖对烟叶唇柱苣苔不定芽的诱导效果最好,不定芽诱导率达到 100%,平均不定芽数为 7.50 个/张;其次是 20 g/L 蔗糖,不定芽诱导率和平均不定芽数分别为 100% 和 6.67 个/张;最差的为 50 g/L 蔗糖,不定芽诱导率和平均不定芽数分别为 92.31% 和 3.14 个/张。可见 5 种蔗糖浓度培养基的不定芽生长均正常。经方差分析结果可知,20、30 g/L 蔗糖诱导的不定芽诱导率和平均不定芽数差异均不显著,而二者与 10、40、50 g/L 蔗糖处理差异极显著,说明蔗糖浓度对烟叶唇柱苣苔不定芽的诱导影响较大,过高或过低的蔗糖均不利于不定芽的生长,因此烟叶唇柱苣苔不定芽的诱导培养可以选用 20 ~ 30 g/L 蔗糖。

表 5 不同蔗糖浓度对烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的影响

蔗糖浓度 (g/L)	不定芽诱导率 (%)	平均不定芽数 (个/张)	不定芽生长势
10	95.00Bb	4.44Bb	+++
20	100.00Aa	6.67Aa	++++
30	100.00Aa	7.50Aa	++++
40	95.83Bb	4.04Bbc	+++
50	92.31Cc	3.14Bc	++

2.6 不同植物生长调节剂组合对不定芽诱导的影响

叶片接种于 6 个含植物生长调节剂的培养基中,25 d 后

均有不定芽分化,40 d 平均不定芽数均超过 4 个/张。从表 6 可见,不同的 6-BA 和 NAA 对比对烟叶唇柱苣苔不定芽诱导和生长影响很大,其中以 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L 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,平均有 9.58 个/张,其芽苗生长势好,叶色绿而健壮(图 2)。其次为 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 组合,其不定芽诱导率也高达 100%,但不定芽分化数量较少,为 7.21 个/张。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 组合不定芽诱导率差异不显著,与其他配比组合差异极显著;而平均不定芽数与其他配比差异极显著,因此适合烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的植物生长调节剂组合为 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L。

表 6 不同植物生长调节剂组合对烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的影响

调节剂(mg/L)		不定芽诱导率	平均不定芽数	不定芽生长势
6-BA	NAA	(%)	(个/张)	
0.1	0.1	100.00Aa	7.21Bb	++++
0.1	0.5	61.90Ee	5.22Cc	+++
0.5	0.1	100.00Aa	9.58Aa	++++
0.5	0.5	78.26Dd	4.19Dd	++
1.0	0.1	90.48Cc	5.10Cc	+++
1.0	0.5	95.83Bb	5.34Cc	++++



图2 烟叶唇柱苣苔叶片分化出的不定芽

### 3 结论与讨论

本试验结果表明,影响烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的因素较多,接种叶片放置方式、培养基 pH 值、无机盐浓度、蔗糖浓度、植物生长调节剂种类及对比对不定芽诱导均有影响,本试验中所有处理均可诱导不定芽分化,但各处理间差异较大。

烟叶唇柱苣苔以叶背朝下的方式接入培养基为佳,表现为诱导率高,分化芽数多,与叶面朝下方式间差异极显著。桂林唇柱苣苔、三苞唇柱苣苔等苦苣苔科植物组织培养的叶片外植体均为叶背朝下接入培养基中<sup>[5-6]</sup>,不同植物外植体的生长与分化所需最适合的 pH 值不同,烟叶唇柱苣苔的叶片分化以 pH 值为 6.0 最适宜,与其他处理间的不定芽诱导率和不定芽分化数差异极显著。本试验中无机盐浓度对不定芽的诱导数量和生长势影响极大,在全量的 MS 培养基上平均不定芽数最多,生长势好;而在 1/4MS 培养基的诱导效果最差,不定芽诱导数量少,叶片黄化。培养基中的无机营养成分是组成植物生命体的主要元素,会影响植物的生长与分化,而

镁是叶绿素分子结构的一部分,缺镁时叶绿素不能形成,致使叶片失绿<sup>[7]</sup>,这可能是培养物出现黄化现象的原因。植物生长调节剂的种类及对比对不定芽的诱导影响极大,6-BA 的效果极显著优于 KT 和 TDZ。TDZ 兼有细胞分裂素和生长素的功效,在组培中应用广泛<sup>[8]</sup>,但在苦苣苔科植物中尚未有应用的报道。本试验中 TDZ 的效果并不理想,诱导率低分化芽数少,后期还会出现玻璃化现象,这也许是由于浓度偏高的原因。6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L 组合对不定芽的诱导效果最好,诱导率达到 100%,平均诱导不定芽数高达 9.58 个/张,较其他配比差异极显著。该结果与汤正辉的研究结果<sup>[9]</sup>有差异,汤正辉认为 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 组合的效果最佳<sup>[9]</sup>。蔗糖在组织培养中主要作为碳源和能源物质,同时可以调节培养基的渗透压<sup>[7]</sup>,其浓度与细胞增殖和分化有关<sup>[10-11]</sup>。本试验中蔗糖对烟叶唇柱苣苔不定芽诱导生长的作用十分明显,过高或过低的蔗糖浓度均不利于芽的诱导,以 30 g/L 浓度最佳。

综合试验结果可知,在温度(26 ± 2)℃、光照度 1 500 lx 的培养条件下,烟叶唇柱苣苔不定芽诱导的最佳培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 30 g/L,灭菌前 pH 值为 6.0,接种叶片以叶背平置于培养基上,不定芽诱导效果最好,其诱导率高,不定芽分化多,芽苗生长势好。

苦苣苔科植物由于叶片表面密布绒毛,消毒极为困难,初代培养污染率极高。目前,有关烟叶唇柱苣苔的组织培养研究极少,本试验通过系统研究建立起叶片诱导体系,减少了初代培养接种污染概率,且增殖效率高,可以快速建立高效再生体系,为烟叶唇柱苣苔的商品化开发奠定基础,也可以为其他苦苣苔植物的开发利用及技术研究提供技术参考。

### 参考文献:

- [1] 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[J]. 种质资源,2005,16(4):60-65.
- [2] 李振宇,王印波. 中国苣苔科植物[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2005:4-5.
- [3] 史佑海,徐世松,黄觉武. 海南苦苣苔科野生植物资源及其观赏特性评价[J]. 北方园艺,2011(11):79-82.
- [4] 王莉芳,黄士训,周太久,等. 广西唇柱苣苔属植物的引种栽培试验[J]. 福建林业科技,2012,39(2):109-112.
- [5] 付传明,黄宁珍,唐凤鸾,等. 桂林唇柱苣苔的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2010,46(3):253-254.
- [6] 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.
- [7] 王玉英,高新一. 植物组织培养技术手册[M]. 北京:金盾出版社,2006:113-114.
- [8] 陈肖英,叶庆生,刘伟. TDZ 研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学,2003,32(3):59-63.
- [9] 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.
- [10] 岳红,卢其能,赵昶灵,等. 蔗糖浓度和外源激素对马铃薯微型薯诱导的影响[J]. 江苏农业科学,2012,40(7):58-60.
- [11] 涂艺声. 经济植物大规模快速繁殖技术[M]. 北京:化学工业出版社,2009:33.