

濒危植物粗茎紫金牛茎段愈伤组织再生体系的建立

周艳^{1,2}, 李冬梅¹, 吴坤林¹, 宁祖林^{1*}

1. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650; 2. 贵州省植物园, 贵州贵阳 550001

摘要: 粗茎紫金牛 (*Ardisia gigantifolia* Stapf) 原产于云南河口县, 野生个体数量稀少, 被列为极危物种, 其叶、花、果均具较好的观赏性, 具有重要的保护价值和较好的园林开发应用前景。本研究以粗茎紫金牛茎段为外植体建立其高效愈伤组织再生体系。结果表明: 最佳愈伤组织诱导培养基为 WPM+0.50 mg/L TDZ+0.10 mg/L NAA, 诱导率为 96.67%; 愈伤组织在培养基 WPM+0.50 mg/L TDZ 中增殖系数达 4.42, 在培养基 WPM+2.00 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA 中不定芽诱导率为 100%; 不定芽在培养基 WPM+4.00 mg/L 6-BA 中增殖系数达 3.90, 于培养基 WPM+10% CW+0.20 mg/L NAA 中生根率为 100%, 且不定根发达, 植株生长健壮; 组培苗移栽至珍珠岩: 泥炭土=1:3 的混合基质中, 60 d 后成活率达 96.67%。该研究可为种苗的规模化生产提供技术支撑, 也为该物种的保护、种苗繁育和分子生物学研究提供理论基础和技术支持。

关键词: 濒危植物; 粗茎紫金牛; 愈伤组织; 再生体系

中图分类号: S688.9 文献标识码: A

Establishment of Regeneration System of Stem Callus for *Ardisia gigantifolia*, a Rare and Endangered Species

ZHOU Yan^{1,2}, LI Dongmei¹, WU Kunlin¹, NING Zulin^{1*}

1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China; 2. Guizhou Botanical Garden, Guiyang, Guizhou 550001, China

Abstract: *Ardisia gigantifolia* Stapf is native to Hekou county, Yunnan province, with few wild individuals, and is listed as a critically endangered species. It has important protection value and good prospect of garden development and application. The stem segments of aseptic seedlings of *A. gigantifolia* were used as the explants to establish a propagation *in vitro*. The results showed that the optimal medium for callus induction was WPM+0.50 mg/L TDZ+0.10 mg/L NAA, and the induction rate of callus was 96.67%. The optional medium for callus proliferation was WPM+0.50 mg/L TDZ and the multiplication coefficient was 4.42. The optimal medium for callus differentiation was WPM+2.00 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA, and the induction rate reached 100%. The optional medium for adventitious bud proliferation culture was WPM+4.00 mg/L 6-BA, the multiplication coefficient was 3.90, and the cluster buds grew well. The optional rooting medium was WPM+10% coconut water+0.20 mg/L NAA, the rooting rate reached 100%, the root system developed well and the test-tube plantlets grew vigorously. Plantlets were transplanted into the mixture substrate with the volume ratio of perlite and peat soil of 1:3, the survival rate was 96.67% after 60 days and plants grew well. This study can provide technical support for the large-scale seedling production of *A. gigantifolia*, as well as theoretical basis and technical support for the protection, seedling breeding, and molecular biology research of this species.

Keywords: endangered plant; *Ardisia gigantifolia*; callus; regeneration system

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.08.008

收稿日期 2022-08-29; 修回日期 2022-09-30

基金项目 广东省自然科学基金项目 (No. 2022A1515010904); 广东省重点领域研发计划项目 (No. 2022B1111040003)。

作者简介 周艳 (1994—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 园林植物种质资源及利用。*通信作者 (Corresponding author): 宁祖林 (NING Zulin), E-mail: ningzulin@163.com。

粗茎紫金牛 (*Ardisia gigantifolia* Stapf) 为报春花科 (Primulaceae) 紫金牛属常绿灌木, 高 50~70 cm, 株型紧凑优美, 茎粗壮不分枝, 叶通常聚生于茎顶端, 叶片肥大似扇子, 上面深绿色, 背面紫红色, 花紫红色或淡粉色, 花量大而密集, 花期长, 果熟时鲜红或紫粉色, 耐荫性强, 观赏价值高, 可作为室内盆花或园林花境素材, 极具市场开发应用前景^[1]。粗茎紫金牛自然分布范围狭窄, 仅分布于我国云南河口, 生于海拔 100~400 m 的沟谷常绿阔叶林下^[2], 笔者在野外调查过程中仅在河口南溪镇和古林箐镇两地沟谷林下发现个体数量极少的野生居群。因粗茎紫金牛野生资源稀少, 被列为《中国生物多样性红色名录-高等植物卷》极危 (CR) 物种^[3], 具有重要的保护价值和研究意义。

迁地保护于华南植物园的粗茎紫金牛生长良好, 每年开花, 但难以结实, 存在繁殖障碍问题。刘华等^[4]已申报了粗茎紫金牛扦插、压条繁殖专利技术, 但受季节和繁殖材料的限制, 繁殖效率不高。李冬梅等^[5]申报了利用粗茎紫金牛嫩叶为外植体的组织培养专利技术, 公开了其继代增殖系数最高为 4.0。孙英坤等^[6]研究认为 TDZ 能有效促进蔓叶紫金牛 (*A. violacea*) 不定芽分化。符运柳等^[7]对走马胎 (*A. kteniophylla*) 离体培养及植株再生生根壮苗阶段添加了 10% 的 CW, 但未起到壮苗增高效果。迄今为止, 紫金牛属植物组培快繁技术研究主要以茎段和嫩叶为外植体, 研究集中在外植体的消毒方式、不同植物生长调节剂配比对腋芽诱导、增殖与生根的影响、不同基质对移栽成活率的影响^[8-10]等方面。目前尚无粗茎紫金牛愈伤组织再生体系建立方面的研究。鉴于此, 本研究利用粗茎紫金牛茎段为外植体进行愈伤组织再生体系的建立, 探究植物生长调节剂和有机物对其组织培养的影响, 以期建立高效的粗茎紫金牛离体再生体系, 为该物种的保育和种苗的规模化生产提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为粗茎紫金牛 (*A. gigantifolia* Stapf) 无菌苗, 保存于华南植物园濒危植物繁育中心。

1.2 方法

1.2.1 TDZ 和 NAA 对茎段愈伤组织诱导的影响 将粗茎紫金牛无菌苗切成长约 2.0 cm 带 1 个茎节

的切段, 接种到培养基 WPM+NAA 0.10 mg/L+TDZ (0.10、0.25、0.50、0.80、1.00、1.50 mg/L) 进行愈伤组织诱导, 以不添加植物生长调节剂为对照, 每个浓度梯度处理 10 瓶, 每瓶接种 2 个外植体, 重复 3 次。培养 45 d 后观察记录各处理培养结果, 并统计其愈伤组织诱导率、不定芽诱导率和茎段存活率。

愈伤组织诱导率 = 产生愈伤组织的外植体数 / 接种外植体总数 × 100%

不定芽诱导率 = 产生不定芽的外植体数 / 接种外植体总数 × 100%

茎段存活率 = 外植体成活数 / 接种外植体总数 × 100%

1.2.2 TDZ 对愈伤组织增殖的影响 将诱导获得的愈伤组织分切成重约 0.10 g 的团粒, 接种到培养基 WPM+TDZ (0.30、0.50、0.80、1.00 mg/L) 进行愈伤组织的增殖培养, 以不添加植物生长调节剂为对照, 每个浓度梯度处理 10 瓶, 每瓶接种 2 团, 重复 3 次。培养 45 d 后统计愈伤组织存活率和愈伤组织增殖系数。

愈伤组织存活率 = 成活的愈伤组织团粒数 / 接种愈伤组织粒总数 × 100%

愈伤组织增殖系数 = 增殖培养后愈伤组织鲜重 / 接种愈伤组织鲜重

1.2.3 6-BA 和 NAA 对愈伤组织不定芽诱导的影响 将增殖培养的愈伤组织分切成重约 0.10 g 的团粒, 接种到培养基 WPM+0.20 mg/L NAA+6-BA (1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 mg/L) 进行不定芽诱导, 以不添加植物生长调节剂为对照, 每个浓度梯度处理 10 瓶, 每瓶接种 2 团, 重复 3 次。培养 45 d 后统计不定芽诱导率。

不定芽诱导率 = 产生不定芽的外植体数 / 接种外植体总数 × 100%

1.2.4 6-BA 对不定芽增殖的影响 将诱导出的丛生芽分切, 以双芽为单位接种到培养基 WPM+6-BA (2.00、4.00、6.00、8.00 mg/L) 上进行不定芽的增殖培养, 以不添加植物生长调节剂为对照, 每个处理 10 瓶, 每瓶接种 2 个单位, 重复 3 次。培养 45 d 后统计不定芽增殖系数。

不定芽增殖系数 = 新增不定芽数 / 接种不定芽数

1.2.5 NAA 和 CW 对生根壮苗的影响 将生长健壮、长势基本一致的高 2~3 cm 不定芽接种至 WPM+NAA 0.20 mg/L+CW (5%、10%、15%、20%、

25%体积分数)的培养基中进行生根壮苗实验,以不添加 CW 为对照,每个浓度梯度处理 10 瓶,每瓶接种 2 个不定芽,重复 3 次。培养 45 d 后统计生根率、株高、根数、根长、鲜重增量。

生根率 = 生根不定芽数/接种的不定芽总数 × 100%

鲜重增量 (g) = 培养后组培苗的鲜重 - 初始不定芽的鲜重

1.2.6 移栽基质对组培苗生长的影响 当粗茎紫金牛生根瓶苗高度达 4~5 cm、叶片数达 4 片时,于遮光率为 60%的温室中炼苗 2~3 d,接着开盖炼苗 2~3 d,将炼苗后的瓶苗取出,小心洗去附着于根部的琼脂,移栽到准备好的基质穴盘中,每个穴孔种植 1 株。以珍珠岩:泥炭土按体积比为 0:1、1:3、1:6、1:8 和 1:10 等 5 种比例混合基质作为移栽基质,采用 54 cm × 28 cm 的 32 孔育苗筛,用稀释 1000 倍的多菌灵溶液浸泡 2 h 后,滤干备用。每种比例混合基质处理 20 株,重复 3 次,期间保持湿度 90%以上,遮阴度 60%左右。60 d 后统计移栽成活率。

移栽成活率 = 成活苗数/移栽总苗数 × 100%

1.3 数据处理

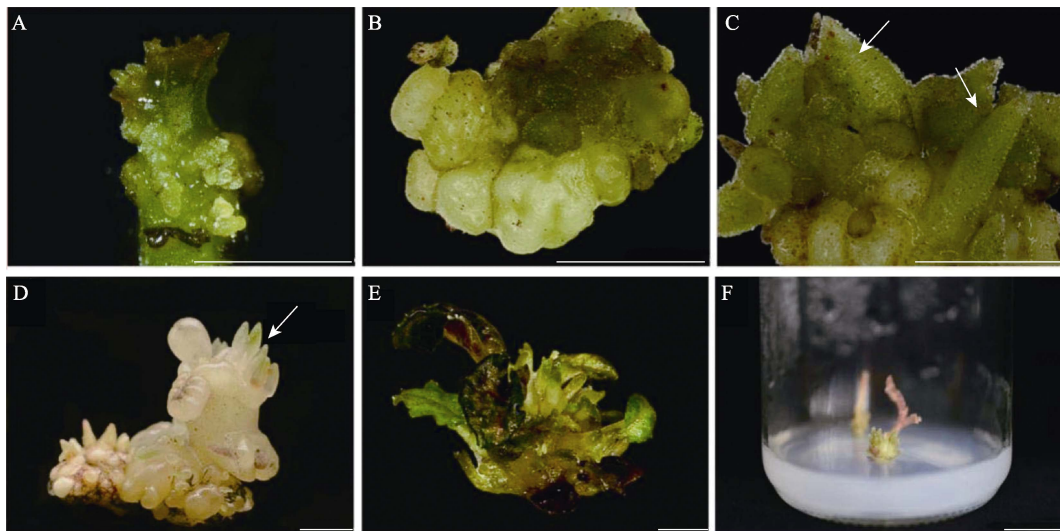
所有数据均采用 Excel 2003 软件进行统计处理,采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析和 Duncan's

多重比较。

2 结果与分析

2.1 TDZ 和 NAA 对茎段愈伤组织诱导的影响

从图 1 可看出,茎段外植体在培养基 WPM 中添加 0.10 mg/L NAA 和不同浓度的 TDZ 可成功诱导出愈伤组织和不定芽。TDZ 与 0.10 mg/L NAA 结合使用时,不同浓度的 TDZ 对茎段存活、愈伤组织和不定芽诱导具有促进作用。由表 1 可知,在不添加任何 TDZ 和 NAA 的培养基上,茎段存活率为 100.00%,但均无愈伤组织和不定芽形成。当 TDZ 浓度为 0.10~0.50 mg/L 时,TDZ 对茎段存活率和愈伤组织诱导的影响差异不显著,愈伤组织和不定芽的诱导率随 TDZ 增加而逐渐递增;TDZ 在 0.5 mg/L 时,愈伤组织诱导率最高达 96.67%,且愈伤组织长势良好,呈黄绿色或浅绿色(图 1C)。TDZ 浓度为 0.50~1.50 mg/L 时,茎短成活率、愈伤组织和不定芽的诱导率随 TDZ 浓度增加而逐渐降低,但 TDZ 浓度在 0.50~0.80 mg/L 范围内,TDZ 对愈伤组织和不定芽的诱导率差异不显著。当 TDZ 浓度为 1.50 mg/L 时,成活率降至 80.00%,愈伤组织诱导率达最低值 54.17%,不定芽诱导率低至 23.33%,此时愈伤组织长势差,且呈黄绿色(图 1D)。



A: 愈伤组织在叶腋处形成; B: 黄绿色的愈伤组织颗粒; C: 带不定芽的浅绿色愈伤组织; D: 带不定芽的黄绿色愈伤组织;

E: 不定芽生长成叶; F: 愈伤组织在组培瓶内的生长状态; 箭头指不定芽, 标尺=4 mm。

A: Callus formation at the leaf axillary; B: Yellow green callus granules; C: Light green callus with adventitious buds; D: Yellow green callus with adventitious buds; E: Adventitious buds grow into leaves; F: Growth state of callus in tissue culture flask;

Arrows means adventitious bud, bar=4 mm.

图 1 粗茎紫金牛愈伤组织类型及状态

Fig. 1 Type and state of callus tissue of *A. gigantifolia* in the medium

表 1 TDZ 和 NAA 对粗茎紫金牛茎段愈伤组织诱导的影响
Tab. 1 Effects of TDZ and NAA on induction of callus and leaf buds of *A. gigantifolia*

TDZ /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)	茎段存活率 Survival rate of stem segment/%	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	不定芽诱导率 Adventitious bud induction rate/%	生长状况 Growth status
0.00	0.00	100.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^f	无愈伤和不定芽形成, 少数外植体茎段的腋芽正常生长
0.10	0.10	96.67±3.33 ^{ab}	82.96±2.96 ^a	50.00±0.00 ^d	长势正常, 愈伤和不定芽少, 黄绿色
0.25	0.10	96.67±3.33 ^{ab}	90.00±5.77 ^a	61.57±3.24 ^c	长势正常, 愈伤和不定芽少, 黄绿色
0.50	0.10	100.00±0.00 ^a	96.67±3.33 ^a	89.63±0.37 ^a	长势良好, 愈伤不定芽多, 黄绿或浅绿色
0.80	0.10	90.00±0.00 ^b	88.89±6.42 ^a	83.66±2.99 ^a	长势一般, 愈伤和不定芽多, 黄绿色
1.00	0.10	90.00±5.77 ^b	67.22±4.34 ^b	72.22±5.56 ^b	长势一般, 愈伤和不定芽多, 黄绿色
1.50	0.10	80.00±0.00 ^c	54.17±4.17 ^b	23.33±1.67 ^c	基部膨大, 愈伤和不定芽少, 褐黄色

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).

2.2 TDZ 对愈伤组织增殖的影响

由表 2 可知, 以 WPM 培养基添加不同浓度 TDZ 对愈伤组织增殖具有显著影响。随着 TDZ 浓度增高, 愈伤组织存活率呈现先上升后下降的趋势, TDZ 浓度为 0.50 mg/L 时, 存活率达到最高 93.33%。在不添加 TDZ 的培养基上, 愈伤组织鲜重增殖系数为 1.62, 愈伤组织呈浅绿色, 仅有少数芽点。当添加 TDZ 浓度为 0.30 mg/L 时, 其增殖系数下降为 0.26, 愈伤组织呈浅黄绿色颗粒状, 结果表现为低浓度 TDZ 对愈伤组织鲜重增殖有明显的抑制作用。当 TDZ 浓度为 0.50 mg/L, 增殖系数为 4.42, 达到最大值, 愈伤组织呈浅绿或黄绿色; 而 TDZ 浓度在 0.80~1.00 mg/L 时增殖系数从 1.26 下降至 0.31, 愈伤组织由黄绿色、颗粒状逐渐呈现褐黄色, 且多数死亡。综合分析, WPM+0.50 mg/L TDZ 为愈伤组织增殖的最佳培养基。

表 2 TDZ 对粗茎紫金牛愈伤组织增殖的影响
Tab. 2 Effects of TDZ on proliferation of callus of *A. gigantifolia*

TDZ /(mg·L ⁻¹)	愈伤组织存活率 Survival rate of callus/%	愈伤组织增殖系数 Multiplication coefficient of callus	生长状况 Growth status
0.00	76.67±3.33 ^b	1.62±0.65 ^b	浅绿色, 少数芽点
0.30	80.00±5.77 ^b	0.26±0.10 ^c	浅黄绿, 颗粒状
0.50	93.33±3.33 ^a	4.42±0.55 ^a	浅绿或黄绿色, 颗粒状
0.80	70.00±0.00 ^b	1.26±0.17 ^{bc}	黄绿色, 颗粒状, 部分死亡
1.00	56.67±3.33 ^c	0.31±0.03 ^c	褐黄色, 多数死亡

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).

2.3 6-BA 和 NAA 对愈伤组织不定芽诱导的影响

由表 3 可知, 当 NAA 浓度保持在 0.20 mg/L 时, 随着 6-BA 浓度的增加, 不定芽的诱导率呈先增加后减少的趋势; 当 6-BA 浓度低于 2.00 mg/L 时, 每团愈伤诱导出的不定芽较少, 呈黄绿色或绿色 (图 2C); 当 6-BA 浓度为 2.00 mg/L 时, 不定芽的诱导率达到最高, 为 100.00%, 每团愈伤诱导大量不定芽, 芽体为绿色, 生长状况较好 (图 2A, 图 2B); 当 6-BA 浓度高于 2.00 mg/L 时, 不定芽诱导率随着 6-BA 浓度的增加而下降; 当 6-BA 浓度为 3.00 mg/L 时, 不定芽诱导率最低为 56.67%, 芽体为黄绿色至黄色 (图 2C)。综合考虑, WPM+2.00 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA 为粗茎紫金牛愈伤组织增殖的最佳培养基。

表 3 6-BA 和 NAA 对粗茎紫金牛不定芽诱导的影响
Tab. 3 Effects of 6-BA and NAA on induction of adventitious buds of *A. gigantifolia*

BA /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)	不定芽诱导率 Adventitious bud induction rate/%	生长状况 Growth status
0.00	0.00	0.00±0.00 ^d	愈伤组织增多, 黄绿色, 未诱导出不定芽
1.00	0.20	73.33±6.67 ^b	芽量少, 芽体黄绿色
1.50	0.20	83.33±6.67 ^b	芽量少, 芽体绿色
2.00	0.20	100.00±0.00 ^a	芽体绿色
2.50	0.20	80.00±0.00 ^b	芽量多, 芽体黄绿色
3.00	0.20	56.67±8.82 ^c	芽体黄绿色或黄色

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).

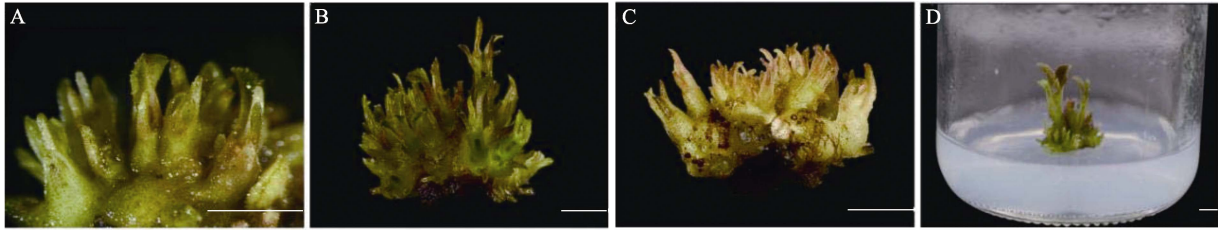


图 2 粗茎紫金牛愈伤组织分化的不定芽 (标尺=5 mm)
Fig. 2 Adventitious bud formation induced by callus of *A. gigantifolia* (bar=5 mm)

2.4 6-BA 对不定芽增殖的影响

由表 4 可知, 在 WPM 培养基上添加不同浓度的 6-BA 对不定芽的增殖具有显著差异。本研究发现, 单独使用 6-BA 对粗茎紫金牛不定芽的增殖有显著影响, 随着 6-BA 浓度的增加, 不定芽的增殖系数呈现先升高后降低的趋势, 当 6-BA 浓度为 4.00 mg/L 时, 诱导出的不定芽生长正常, 芽体为浅绿色或绿色, 小叶狭窄且未展开(图 2D), 增值系数达到最大值为 3.90; 当 6-BA 浓度高于 6.00 mg/L 时, 增殖系数显著下降; 当 6-BA 浓度为 8.00 mg/L 时, 增殖系数降至最低 0.97。可见, WPM+4.00 mg/L 6-BA 为对不定芽的增殖有较好的促进作用, 最适浓度因植物种类不同有所差异。

2.5 NAA 和 CW 对生根壮苗的影响

将无根苗转接到 WPM+0.20 mg/L NAA+CW 上进行生根壮苗, 15 d 左右开始生根, 生根率达 100%, CW 能诱导根系生长, 但对株高生长有抑制作用。由表 5 可知, NAA 浓度固定为 0.20 mg/L 时, 在不添加 CW 的培养基中, 植株平均高度为 4.25 cm, 在培养基中添加不同浓度 CW, 其平均株高均低于不添加 CW 的处理, 当 CW 浓度在 0~10% 范围时, 对株高的影响差异不显著, 而当

CW 浓度高于 10% 时, 随着 CW 浓度增加, 植株平均高度降低, 且达到显著性差异。

CW 浓度在 0~10% 范围时, CW 浓度对植株的根条数、根长和鲜重增量的影响均无显著差异。当 CW 浓度为 10% 时, 根长和鲜重增量达到最大值, 分别为 4.36 cm 和 1.48 g, 生长状态最佳(图 3)。当 CW 浓度高于 10% 时, 随着 CW 浓度的增加, 根条数、根长和鲜重均逐渐减少, 且达到显著差异。当 CW 浓度达到 20% 以上时, 根部出现褐化现象(图 3 白色箭头所示)。

表 4 6-BA 对粗茎紫金牛不定芽增殖的影响
Tab. 4 Effects of 6-BA on proliferation of adventitious buds of *A. gigantifolia*

6-BA (mg·L ⁻¹)	增殖系数 Proliferation coefficient	生长状况 Growth status
0.00	0.00±0.00 ^c	长势正常, 无芽增殖
2.00	1.34±0.17 ^c	长势正常
4.00	3.90±0.06 ^a	长势良好
6.00	1.90±0.10 ^b	长势正常
8.00	0.97±0.02 ^d	长势正常

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).

表 5 NAA 和 CW 对粗茎紫金牛无根苗生根壮苗的影响
Tab. 5 Effects of CW and NAA on rooting and seedling growth of *A. gigantifolia*

椰汁 Coconut water/%	NAA (mg·L ⁻¹)	生根率 Rooting rate/%	株高 Plant height/cm	根条数 Root number	根长 Root length/cm	鲜重增量 Fresh weight increment/g	生长状况 Growth status
0	0.20	100	4.25±0.20 ^a	3.37±0.17 ^{ab}	3.91±0.04 ^a	1.41±0.08 ^a	++++
5	0.20	100	3.84±0.08 ^b	3.88±0.23 ^a	4.01±0.04 ^a	1.40±0.01 ^a	++++
10	0.20	100	4.08±0.08 ^{ab}	3.80±0.31 ^a	4.36±0.08 ^a	1.48±0.05 ^a	+++++
15	0.20	100	3.71±0.15 ^b	2.93±0.13 ^{ac}	3.26±0.07 ^b	1.05±0.02 ^b	+++
20	0.20	100	3.30±0.06 ^c	2.63±0.13 ^c	2.86±0.12 ^{bc}	0.89±0.02 ^c	+++
25	0.20	100	3.24±0.04 ^c	2.37±0.19 ^c	2.56±0.18 ^c	0.71±0.04 ^d	++

注: +表示植株生长健康程度, 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: + indicates the healthy degree of plant growth, different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).

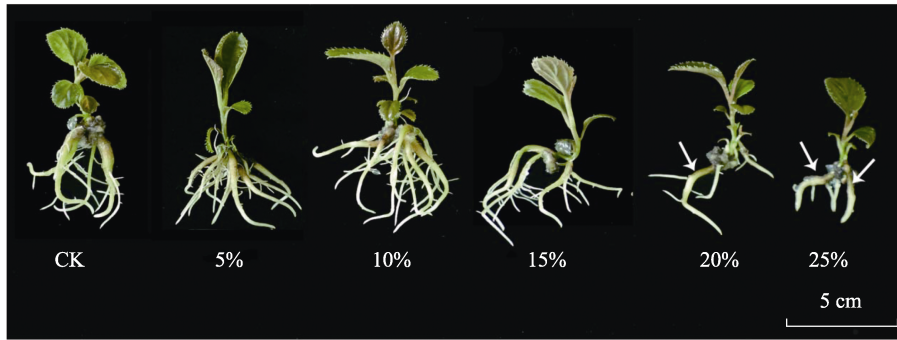


图 3 不同浓度 CW 对粗茎紫金牛无根苗生根壮苗的影响 (标尺=5 cm)
Fig. 3 Effects of CW on rooting and seedling growth of *A. gigantifolia* (bar=5 cm)

2.6 移栽基质对组培苗生长的影响

由表 6 可知，移栽基质对粗茎紫金牛组培苗移栽成活率有明显差异。在泥炭土基质中，培养 60 d，成活率为 82.78%，生长状态较差，植株弱小，叶片质地较薄且小；珍珠岩：泥炭土以体积比 1：3~1：10 混合范围时，培养 60 d，成活率无显著差异，其中珍珠岩：泥炭土以体积比 1：3 混合时，成活率最高达 96.67%，此时植株生长健壮，叶片质地较厚，有光泽且叶片较大（图 4）。

表 6 不同移栽基质对粗茎紫金牛组培苗移栽成活率和生长状况的影响

Tab. 6 Effects of different substrates on survival rate and growth of plantlets of *A. gigantifolia*

珍珠岩：泥炭土 Perlite：peat soil	成活率 Survival rate/%	生长状况 Growth status
0：1	82.78±1.47 ^b	++
1：3	96.67±1.67 ^a	++++
1：6	93.33±4.41 ^a	++++
1：8	91.67±1.67 ^a	+++
1：10	95.00±2.89 ^a	+++

注：+表示植株生长健康程度，同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: + indicates the healthy degree of plant growth, different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).



图 4 珍珠岩和泥炭土体积比 1：3 混合基质中的粗茎紫金牛植株 (标尺=5 cm)

Fig. 4 Plants of *A. gigantifolia* in mixed substrate with volume ratio of perlite and peat soil of 1：3 (bar=5 cm)

3 讨论

植物组织培养与快速繁殖技术是植物资源可持续开发利用的一种有效手段，可在短时间内生产大量优质种苗^[11]。彭光天^[12]对 9 种紫金牛属 (*Ardisia*) 植物进行组织培养，结果发现不同外植体诱导愈伤的能力存在差异，在 MS+1.0 mg/L NAA 培养基诱导 5 种紫金牛幼苗生根的效果不太理想，其中百两金 (*A. crispa*)、虎舌红 (*A. mamillata*)、紫金牛 (*A. japonica*) 的茎段愈伤组织分化仅形成一些不定根，血党 (*A. punctata*) 和莲座紫金牛 (*A. primulifolia*) 未能形成根。符运柳等^[7]对走马胎 (*A. kteniophylla*) 进行离体培养及植株再生，结果发现在 MS(改良)+0.50 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+10% CW 壮苗培养时，能够诱导不定芽伸长生长，但不能高频诱导不定芽增高。在本研究中，通过在 WPM 培养基上添加 0.20 mg/L NAA 和 CW 对粗茎紫金牛幼苗生根诱导效果良好，生根率达 100%，当添加 10% CW 时，不定根发达，植株生长健壮。推测低浓度的 NAA 可促进愈伤组织诱导生根，同时椰汁也促进了愈伤组织诱导生根和根的生长，使鲜重增加，植株生长健壮。

TDZ 作为一种新型的植物生长调节剂，已有文献报道其不但具有很强的细胞分裂素活性，能诱导愈伤组织形成不定芽^[13-14]，而且具有生长素的脱分化作用，能有效诱导愈伤组织形成^[15]。本研究通过 TDZ 和 NAA 的组合不仅能使粗茎紫金牛茎段诱导出愈伤组织和增殖，同时产生不定芽，与前人的研究结果一致^[16-17]。TDZ 促进愈伤组织形成，也促进不定芽形成，这可能与 TDZ 能有效促进外植体直接诱导不定芽产生有关^[18-19]。此外，本研究利用 TDZ 具有细胞分裂素与生长素的双重作用，对粗茎紫金牛愈伤组织进行增殖且效果

良好,这与刘守赞等^[10]研究发现 TDZ 对茎叶紫金牛茎段增殖作用效果显著优于 6-BA 和 KT,且当 TDZ 浓度为 0.50 mg/L 时,增殖倍率最高达 3.14 的研究结果类似。

6-BA 是常用的细胞分裂素,促进植物细胞分裂、伸长和分化。本研究使用 6-BA 搭配 NAA 诱导愈伤组织分化不定芽,结果表明细胞分裂素与生长素比值对粗茎紫金牛愈伤组织不定芽分化具有显著影响,当 6-BA/NAA=10 时,不定芽分化率高达 100%;比例大于 10 时不定芽分化率却呈下降趋势。符运柳等^[7]对紫金牛属走马胎进行离体培养研究,结果也发现,2.00 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA 的组合最利于愈伤组织分化不定芽,分化率为 88.9%,而当 6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时,不定芽分化率明显下降,因此合适的细胞分裂素与生长素比值对于紫金牛愈伤组织分化不定芽最重要。

有机物的添加有利于兰科植物组培生根壮苗培养^[20-21],但在紫金牛的组织培养中还未见 CW 对其生根壮苗培养影响的报道。本研究结果发现,将 2~3 cm 高的粗茎紫金牛无根苗接种在不添加植物生长调节剂的培养基中也能生根,但根量少且纤细;使用 0.20 mg/L 浓度的 NAA 能有效促进粗茎紫金牛无根苗生根,平均根条数为 3.37,根长为 3.91 cm,单株鲜重为 1.41 g;将 NAA 浓度固定为 0.20 mg/L,当添加浓度 10% 的 CW 时,会进一步促进无根苗的生长,平均根条数达 3.80,根长达 4.36 cm,单株鲜重达 1.48 g,试管苗生长状况较好;但高浓度椰汁会使根部出现褐化现象,抑制根部生长,因此低浓度的 CW 有促进粗茎紫金牛生根壮苗作用。

参考文献

- [1] 杨妙贤,杨瑞香,许丽萍,赖惠灵. 广东紫金牛科野生观赏植物资源[J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(4): 31-33.
YANG M X, YANG R X, XU L P, LAI H L. Wild ornamental resources and geographic distribution of Myrsinaceae in Guangdong province[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2007, 26(4): 31-33. (in Chinese)
- [2] HUANG G H, HU C M, HAO G. Rediscovery of *Ardisia gigantifolia* and the reinstatement of *A. kteniophylla* (Primulaceae)-finding the correct name for the Chinese medicinal plant 'Zou Ma Tai'[J]. Nordic Journal of Botany, 2017, 35: 628-632.
- [3] 覃海宁,赵莉娜. 中国高等植物濒危状况评估[J]. 生物多样性, 2017, 25(7): 689-695.
QIN H N, ZHAO L N. Evaluating the threat status of higher plants in China[J]. Biodiversity Science, 2017, 25(7): 689-695. (in Chinese)
- [4] 刘华,杨镇明,廖景平. 一种粗茎紫金牛的繁殖方法: ZL201510640997.1[P]. 2017-12-19.
LIU H, YANG Z M, LIAO J P. A propagation method of *Ardisia dasyrhizomatica*: ZL201510640997.1[P]. 2017-12-19. (in Chinese)
- [5] 李冬梅,宁祖林,陈玲,叶育石,廖景平. 一种粗茎紫金牛组织培养和快速繁殖方法: ZL201710735921.6[P]. 2019-08-02.
LI D M, NING Z L, CHEN L, YE Y S, LIAO J P. A tissue culture and rapid propagation method of *Ardisia dasyrhizomatica*: ZL201710735921.6[P]. 2019-08-02. (in Chinese)
- [6] 孙英坤,胡绍庆,庞基良,高凯,刘华红,陈焕伟,姚涛,陈林敬,沈柏春. 珍稀濒危物种茎叶紫金牛高效快繁体系的建立[J]. 植物学报, 2017, 52(6): 764-773.
SUN Y K, HU S Q, PANG J L, GAO K, LIU H H, CHEN H W, YAO T, CHEN L J, SHEN B C. Establishment of a tissue culture and propagation system for *Ardisia violacea*, a rare and endangered species[J]. Bulletin of Botany, 2017, 52(6): 764-773. (in Chinese)
- [7] 符运柳,徐立,李志英,黄碧兰,李克烈. 走马胎离体培养及植株再生[J]. 北方园艺, 2017(4): 98-101.
FU Y L, XU L, LI Z Y, HUANG B L, LI K L. *In vitro* culture and plant regeneration of *Ardisia gigantifolia* Stapf[J]. Northern Horticulture, 2017(4): 98-101. (in Chinese)
- [8] 唐凤鸾,赵健,赵志国,夏科,仇硕. 走马胎的组织培养与快速繁殖[J]. 植物学报, 2019, 54(3): 378-384.
TANG F L, ZHAO J, ZHAO Z G, XIA K, QIU S. Tissue culture and rapid propagation of *Ardisia gigantifolia*[J]. Bulletin of Botany, 2019, 54(3): 378-384. (in Chinese)
- [9] 蔡时可,梅瑜,顾艳,谢梅新,王继华. 走马胎的离体培养与快速繁殖[J]. 广东农业科学, 2019, 46(10): 7-12.
CAI S K, MEI Y, GU Y, XIE M X, WANG J H. Culture *in vitro* and rapid propagation of *Ardisia gigantifolia*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2019, 46(10): 7-12. (in Chinese)
- [10] 刘守赞,叶建丰,王江铭,饶盈,马丹丹,夏国华. 珍稀濒危植物茎叶紫金牛扦插和组培繁殖[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(19): 84-88.
LIU S Z, YE J F, WANG J M, RAO Y, MA D D, XIA G H. Study on tissue culture and cutting propagation for *Ardisia violacea*, a rare and endangered species[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(19): 84-88. (in Chinese)
- [11] 张薇,王强,陈国华,陈红锋. 瘤蕨孢子的不完全组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报, 2020, 56(4): 856-862.

- ZHANG W, WANG Q, CHEN G H, CHEN H F. Partial tissue culture and rapid propagation of *Phymatosorus scolopendria* spores[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, 56(4): 856-862. (in Chinese)
- [12] 彭光天. 九种紫金牛属植物的组织培养和愈伤组织中岩白菜素的形成[D]. 广州: 中山大学, 2003.
- PENG G T. The tissue culture of nine species in *Ardisia* and formation of bergenin in the calli.[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2003. (in Chinese)
- [13] MOK M C, MOK D W S, ARMSTRONG D J, SHUDO K, ISOGAI Y, OKAMOTO T. Cytokinin activity of N-phenyl-1,2,3 thiazol-5-ylurea (TDZ)[J]. *Phytochemistry*, 1982, 21: 1509-1511.
- [14] IBRAHIM R, DEBERGH P C. Improvement of adventitious bud formation and plantlet regeneration from *in vitro* leaflet explants of roses (*Rosa hybrida* L.)[J]. *Acta Horticulturae*, 2000, 520(520): 271-279.
- [15] 秦静远. TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 杨凌职业技术学院学报, 2005, 4(2): 19-22.
- QIN J Y. The use of TDZ in plant tissue culture[J]. *Journal of Yangling Vocational & Technical College*, 2005, 4(2): 19-22. (in Chinese)
- [16] 王虹, 刘燕, 王济红. 榉树嫩叶愈伤组织初诱导培养技术研究[J]. 贵州科学, 2017, 35(5): 17-21.
- WANG H, LIU Y, WANG J H. Early inducing culture of callus of tender leaf of *Zelkova schneideriana*[J]. *Guizhou Science*, 2017, 35(5): 17-21. (in Chinese)
- [17] 闫海霞, 邓杰玲, 黄昌艳, 关世凯, 何荆洲, 张自斌, 卜朝阳. 褐纹报春苣苔组织培养与快速繁殖[J]. 广西植物, 2017, 37(10): 1270-1278.
- YAN H X, DENG J L, HUANG C Y, GUAN S K, HE J Z, ZHANG Z B, BU Z Y. Tissue culture and rapid propagation of *Primulina glandaceistriata*[J]. *Guihaia*, 2017, 37(10): 1270-1278. (in Chinese)
- [18] 田歌, 彭绿春, 瞿素萍, 王继华, 赵正雄, 李世峰, 解玮佳, 关文灵. 马缨杜鹃离体叶片高效再生不定芽及其组织细胞学研究[J]. 园艺学报, 2020, 47(10): 2019-026.
- TIAN G, PENG L C, QU S P, WANG J H, ZHAO Z X, LI S F, XIE W J, GUAN W L. Studies on the adventitious buds induction from *in vitro* leaves of *Rhododendron delavayi* var. *delavayi* and histocytological observation on the buds formation[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(10): 2019-2026. (in Chinese)
- [19] 刘思佳, 高燕燕, 杨宁线, 田莉, 彭思静, 张明生. 杜鹃兰丛生芽诱导发生的适宜条件[J]. 分子植物育种, 2021, 19(9): 3022-3028.
- LIU S J, GAO Y Y, YANG N X, TIAN L, PENG S J, ZHANG M S. Appropriate condition for cluster buds induction of *Cremastra appendiculata*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(9): 3022-3028. (in Chinese)
- [20] 莫远琪, 郑枫, 房林, 李琳, 江南, 吴坤林, 曾宋君. 澳洲鸽子石斛组织培养快速繁殖研究[J]. 植物生理学报, 2018, 54(4): 677-685.
- MO Y Q, ZHENG F, FANG L, LI L, JIANG N, WU K L, ZENG S J. Tissue culture and rapid propagation of *Dendrobium kingianum* Bidwill[J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(4): 677-685. (in Chinese)
- [21] 莫远琪, 李汉文, 江南, 郑枫, 房林, 李琳, 周依清, 吴坤林, 曾宋君. 水莲石斛的组织培养与快速繁殖[J]. 热带作物学报, 2020, 41(6): 1179-1188.
- MO Y Q, LI H W, JIANG N, ZHENG F, FANG L, LI L, ZHOU Y Q, WU K L, ZENG S J. Tissue culture and rapid propagation of *Dendrobium Hibiki*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(6): 1179-1188. (in Chinese)