

蔡坤秀, 陈振东, 林宗铿, 等. 叶底红组织培养和快速繁殖条件的优化 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (6): 621-625.

CAI K-X, CHEN Z-D, LIN Z-K, et al. Optimization of Culture and Rapid Propagation for *Phyllagathis fordii* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (6): 621-625.

## 叶底红组织培养和快速繁殖条件的优化

蔡坤秀, 陈振东, 林宗铿, 林秀香, 郑少缘

(福建省热带作物科学研究所, 福建 漳州 363001)

**摘要:** 应用正交试验方法研究 6-BA, NAA 及 KT 等 3 个因子对叶底红组培苗增殖系数的影响, 同时考查了 IBA、NAA 和活性炭等 3 个因子对叶底红组培苗生根培养的影响, 试验均按正交表  $L_9(3^4)$  形成三因素、三水平的不同配比。结果表明: 适宜叶底红增殖的培养基为  $MS+6-BA\ 1.2\ mg \cdot L^{-1}+NAA\ 0.4\ mg \cdot L^{-1}+KT\ 0.1\ mg \cdot L^{-1}$ , 平均增殖系数 3.62; 适于生根的培养基为  $1/2MS+IBA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}+活性炭\ 1.0\ g \cdot L^{-1}$ 。以泥炭土和珍珠岩 (2:1) 作为移栽基质, 移栽成活率可达 90% 以上。

**关键词:** 叶底红; 组织培养; 快速繁殖; 正交试验

**中图分类号:** S 682

**文献标识码:** A

### Optimization of Culture and Rapid Propagation for *Phyllagathis fordii*

CAI Kun-xiu, CHEN Zhen-dong, LIN Zong-keng, LIN Xiu-xiang, ZHENG Shao-yuan

(Fujian Institute of Tropical Crops, Zhangzhou, Fujian 363001, China)

**Abstract:** Effects of hormones and activated carbon in medium on the proliferation and rooting of *Phyllagathis fordii* were studied for the culture optimization. Plant tissues from aseptic seedlings were used as the explants for the orthogonal design experiment [ $L_9(3^4)$ ]. The result showed that (a) MS supplemented with 6-BA  $1.2\ mg \cdot L^{-1}+NAA\ 0.4\ mg \cdot L^{-1}+KT\ 0.1\ mg \cdot L^{-1}$  was appropriate for the proliferation; (b) 1/2 MS supplemented with IBA  $0.5\ mg \cdot L^{-1}+activated\ carbon\ 1.0\ g \cdot L^{-1}$  was suitable for rooting; and (c) the survival rate were greater than 90% when the plantlets were transplanted to a soil medium containing 2/3 peat and 1/3 perlite.

**Key words:** *Phyllagathis fordii*; tissue culture; rapid propagation; orthogonal experiment

叶底红 *Phyllagathis fordii* (Hance) C. Chen, 别名野海棠 (《中国高等植物图鉴》)、叶下红、大毛蛇、血还魂、沙崩草、还魂红、假紫苏等, 原产中国, 分布浙江、江西、广西、广东、福建、贵州、香港, 为野牡丹科锦香草属常绿直立亚灌木状草本植物, 全株可供药用, 具有通经活血、清热燥湿、化积消食等功效<sup>[1-2]</sup>。叶底红株型低矮小巧, 叶背及花瓣均呈紫红色, 植株密披红棕色柔毛和长腺毛, 形态优美, 色泽艳丽, 是盆栽的佳品, 适宜作室内盆栽观赏, 又有家庭保健功能, 极具市场开发前景。但在叶底红的栽培与引种驯化过程中, 受常规种子播种所需的时间较长、种子发芽

成活率极低等因素的影响, 难于满足生产需求, 组织培养可大大提高繁殖效率, 为进一步开展相关研究提供技术和材料保障<sup>[3-4]</sup>。

在野牡丹科植物中, 组织培养技术的应用研究开展较晚, 2000~2004 年马国华等<sup>[5-7]</sup>对野牡丹、多花野牡丹、毛稔、地稔和银毛野牡丹建立了有效的芽繁殖体系和植株再生体系, 之后相继报道了铺地锦、紫毛野牡丹等的组培快繁研究<sup>[8-12]</sup>。本研究旨在探索和建立叶底红组培技术优化体系, 以期对叶底红种质资源的保护和应用开发利用提供技术和方法。

收稿日期: 2012-04-06 初稿; 2012-04-17 修改稿

作者简介: 蔡坤秀 (1976-), 女, 助理研究员, 主要从事园艺植物组织培养的研究与应用

通讯作者: 陈振东 (1966-), 男, 高级农艺师, 主要从事园林花卉引种栽培研究与推广

基金项目: 福建省科技计划重点项目 (2004N012)

1 材料与方 法

1.1 外植体的培养

选取饱满的叶底红成熟种子，在洗洁精水中浸泡 20 min，自来水冲洗 30 min，于超净工作台上用 70%酒精表面消毒 30 s，置于 0.1%升汞中浸泡 12 min，无菌水冲洗 5 次，用接种刀剥除种壳，将种子播种于不添加激素的 1/2MS 培养基中培养成无菌苗，备用。

1.2 增殖培养基筛选

从无菌苗继代培养后获得的丛生芽中切取高为 1 cm 左右的芽作为增殖材料。用  $L_9(3^4)$  正交设计<sup>[13]</sup>，选择 6-BA、NAA、KT 3 因素的 3 种浓度水平，根据增殖系数分析不同因素、不同水平的差异显著性，对效果显著的因子进行多重比较。基本培养基为 MS，蔗糖  $30.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每处理接种 50 个材料，3 次重复。培养基添加组合成分见表 1。调查从 1 个芽上产生的新芽数即增殖系数（有效芽高 $\geq 1\text{ cm}$ ）<sup>[14]</sup>。

表 1 增殖培养正交试验因素水平表  $L_9(3^4)$   
Table 1 Factors and levels of orthogonal design  $L_9(3^4)$  for proliferation experiment

水平 (培养基代号)	因素		
	A:6-BA/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	B:NAA/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	C:KT/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
M <sub>1</sub>	0.4	0.0	0.0
M <sub>2</sub>	0.4	0.2	0.1
M <sub>3</sub>	0.4	0.4	0.2
M <sub>4</sub>	0.8	0.0	0.1
M <sub>5</sub>	0.8	0.2	0.2
M <sub>6</sub>	0.8	0.4	0.0
M <sub>7</sub>	1.2	0.0	0.2
M <sub>8</sub>	1.2	0.2	0.0
M <sub>9</sub>	1.2	0.4	0.1

1.3 生根培养基的筛选

在组织培养丛生芽中切取高为 2 cm 的芽进行生根培养。采用  $L_9(3^4)$  正交设计，观察 IBA、NAA、活性炭等 3 个因素对生根的影响，基本培养基为 1/2MS，分别添加蔗糖  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每处理接种 50 个材料，3 次重复。培养基添加组合成分见表 2。培养 60 d 后调查生根情况，包括根数、根长、苗高等，将不同配方培养出的生根苗分开移栽于相同的基质中，管理方法一致，1 个月后调查移

栽成活率。

表 2 生根培养正交试验因素水平表  $L_9(3^4)$   
Table 2 Factors and levels of orthogonal design  $L_9(3^4)$  for rooting experiment

水平 (培养基代号)	因素		
	A:IBA/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	B:NAA/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	C:活性炭/ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
R <sub>1</sub>	0.0	0.0	0.0
R <sub>2</sub>	0.0	0.1	1.0
R <sub>3</sub>	0.0	0.3	2.0
R <sub>4</sub>	0.3	0.0	1.0
R <sub>5</sub>	0.3	0.1	2.0
R <sub>6</sub>	0.3	0.3	0.0
R <sub>7</sub>	0.5	0.0	2.0
R <sub>8</sub>	0.5	0.1	0.0
R <sub>9</sub>	0.5	0.3	1.0

1.4 培养条件

接种后的材料放在温度为  $25\pm 2^\circ\text{C}$  的培养室中培养，光照强度为  $1\,500\text{ lx}$ ，每日光照 12 h。

1.5 数据分析

试验数据采用 DPS 统计分析软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对叶底红增殖的影响

对添加不同激素水平正交设计的组合进行极差和方差分析，得出的结果见表 3。极差分析显示，6-BA 因子是对试验结果影响最大的因素，KT 次之；方差分析结果也表明 6-BA 对芽的增殖作用有极显著影响，同时 NAA、KT 的影响效果也达到极显著。由结果可以看出，随 6-BA、NAA 浓度的增加，增殖系数也相应提高；而 KT 浓度在  $0\sim 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  间二者呈正比关系，而浓度达到  $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时增殖系数反而下降。试验过程中 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>、M<sub>5</sub>、M<sub>6</sub>、M<sub>7</sub>、M<sub>8</sub>、M<sub>9</sub> 均可诱导分化出不定芽，但增殖系数存在极显著差异。M<sub>8</sub> 和 M<sub>9</sub> 上不定芽诱导数最多，增殖系数分别达到 3.62、3.40。各种培养基上芽的长势也存在差别，在 M<sub>8</sub>、M<sub>9</sub> 上长势最好，芽高 2.5 cm 以上的分别达到 38%和 42%，其他培养基均在 20%以下；且在这 2 个培养基上长出的芽粗壮，叶面宽最大可达 1.2 cm，叶面浓绿带绒毛、叶背紫红色，能正常表现出叶底红原有的性状（图 1-a）。

由极差分析和方差分析得出最佳的激素配比组

合是 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>，这恰与该次正交试验中增殖系数最高的 9 号处理相同。因此，叶底红增殖培养基的最佳激素配比为 6-BA 1.2 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.4 mg · L<sup>-1</sup> + KT 0.1 mg · L<sup>-1</sup>，平均增殖系数 3.62。

2.2 不同添加物对叶底红生根壮苗的影响

生根培养方差分析结果（表 4）显示，叶底红不定芽在 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub>这 9 个培养基上都有根的生长，但各处理在根数、根长、苗高、移栽成活率这 4 个观察指标均存在极显著差异。在 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>上长出的根又细又短，苗细弱，叶色淡绿，移栽成活率明显低于其他培养基的生根苗；R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub>上的生根苗健壮，根粗且二级根较多，叶片能表现出叶底红原有的性状（叶面浓绿带有绒毛，叶背紫红色）（图 1-b、c），移栽成活率都在 90%以上，特别是 R<sub>7</sub>、R<sub>9</sub>的生根苗移栽成活率分别达到 95%、94%。

极差分析结果（表 4）表明，IBA 对试验结果影响最大，由 R 值大小比较各因子的主次顺序是：IBA>活性炭>NAA。由此认为，IBA 是影响叶底红生根壮苗的关键因子。

由试验结果分析并结合实际应用，筛选出叶底

红生根壮苗最佳的处理组合为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>，即 IAB 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+活性炭 1.0 g · L<sup>-1</sup>。

2.3 试管苗的炼苗和移栽

将生根好的试管苗在温室内先炼苗 7 d，然后逐渐旋松瓶盖炼苗 2 d 后，将生根试管苗移出，用清水洗净根部培养基，用 0.1% 多菌灵浸泡 2~5 min，移栽至装有泥炭土和珍珠岩（2：1）混合基质的苗盘内，浇足定根水，初期用小拱棚覆盖薄膜 7~14 d 保湿，

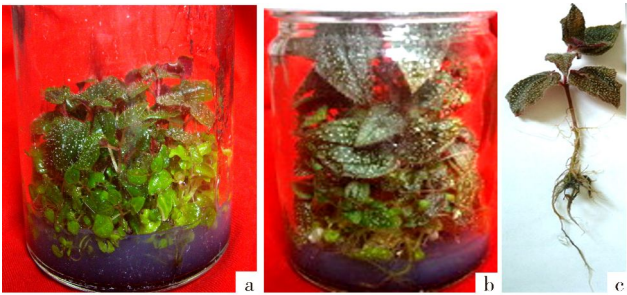


图 1 叶底红组织培养和生根培养结果  
Fig. 1 Results of tissue culture and rooting culture of *Phyllagathis fordii*  
注：a-增殖；b-生根瓶苗；c-生根苗

表 3 增殖培养正交试验设计与极差分析结果  
Table 3 Results of proliferation orthogonal experiment and range analysis

试验号	因 素			平均增殖 系 数	芽长势
	A	B	C		
1	1	1	1	1.48C	弱小,叶偏黄,无绒毛
2	1	2	2	1.80C	弱小,叶淡绿,无绒毛
3	1	3	3	1.56C	弱小,叶偏黄,无绒毛
4	2	1	2	2.52B	较粗壮,叶较绿,有绒毛,叶背微紫色
5	2	2	3	1.79C	弱小,叶淡绿,无绒毛
6	2	3	1	2.72B	较粗壮,叶较绿,有绒毛,叶背微紫色
7	3	1	3	2.56B	较粗壮,叶较绿,有绒毛,叶背微紫色
8	3	2	1	3.40A	粗壮,叶深绿,绒毛粗,叶背紫红色
9	3	3	2	3.62A	粗壮,叶深绿,绒毛粗,叶背紫红色
K <sub>1</sub>	1.61	2.19	2.53		
K <sub>2</sub>	2.34	2.33	2.65		
K <sub>3</sub>	3.19	2.63	1.97		
R	1.58	0.45	0.68		
SS	11.25	0.94	2.41		
df	2	2	2		
MS	5.63	0.47	1.20		
F	148.47	12.42	31.77		
差异显著性	**	**	**		

表 4 生根培养正交试验设计与极差分析结果  
Table 4 Results of rooting orthogonal experiment and range analysis

试验号	因 素			平均根数	平均根长 /cm	平均苗高 /cm	移栽成活率 /%	根长势
	A	B	C					
1	1	1	1	8.60	1.71	4.62	58	根细弱
2	1	2	2	8.65	1.66	4.71	61	根细弱
3	1	3	3	8.90	2.86	4.59	62	根细弱
4	2	1	2	18.33	3.63	5.53	83	根较粗壮
5	2	2	3	21.4	4.14	4.69	86	根较粗壮
6	2	3	1	17.37	3.21	4.65	82	根较粗壮
7	3	1	3	20.03	4.99	5.60	95	根粗壮,长势旺
8	3	2	1	18.27	4.01	5.15	91	根粗壮
9	3	3	2	19.4	4.25	5.91	94	根粗壮,长势旺
根数	K <sub>1</sub>	8.71	15.99	14.41				
	K <sub>2</sub>	18.30	15.70	15.46				
	K <sub>3</sub>	19.57	14.89	16.71				
	R	10.85	1.10	2.30				
根长	K <sub>1</sub>	2.07	3.44	2.97				
	K <sub>2</sub>	3.66	3.27	3.18				
	K <sub>3</sub>	4.41	3.44	3.99				
	R	2.34	0.17	1.02				
苗高	K <sub>1</sub>	4.64	5.26	4.81				
	K <sub>2</sub>	4.96	4.85	5.38				
	K <sub>3</sub>	5.56	5.05	4.97				
	R	0.92	0.41	0.58				

3 讨 论

前人研究表明同科野牡丹、铺地锦、多花野牡丹、毛稔、地稔、银毛野牡丹和紫毛野牡丹等野牡丹科等 7 个种均适用 MS 基本培养基,且 6-BA 与 NAA 按一定的配比使用对野牡丹科各种芽有较理想的增殖效果,6-BA 适用浓度为 0.1~5.0 mg·L<sup>-1</sup>,NAA 浓度为 0.01~1.0 mg·L<sup>-1</sup><sup>[5-12]</sup>。本研究结果表明:6-BA 是叶底红增殖的关键因子,与 NAA 的最佳浓度分别为 1.2 mg·L<sup>-1</sup>、0.4 mg·L<sup>-1</sup>,与前人研究结果一致;本研究还发现,配合使用 0.1 mg·L<sup>-1</sup> KT 对叶底红的增殖系数有显著的促进作用,6-BA、NAA 和 KT 3 种生长调节剂配合使用效果更佳。

不定根的形成是组织培养过程中一个非常关键环节,它直接影响到组培苗移栽成活率的高低,关系到组织培养成败<sup>[15]</sup>。叶底红与上述几种同科的植物一样,生根都比较容易。在增殖培养过程中,有些芽长至 3 cm 以上在芽节会有根的形成,但根

细弱、每个芽节只有 1~2 条根,这样的生根芽直接进行移栽无法成活。同时,在移栽过程中,移栽成活率与苗的粗壮程度及根数成正比关系。因此,要生产出可移栽的生根苗,生根培养这个环节是必不可少的。添加 0.5mg·L<sup>-1</sup> IBA 既能生产出粗壮的生根苗,活性炭对叶底红生根培养具有重要的作用。活性炭在植物组织培养特别是生根培养的积极作用:一是提供了黑暗条件,二是吸附并排除培养基中的有害物质<sup>[16]</sup>。在组织培养过程中,一般是植物自身产生了有害物质,培养基才会出现褐化现象<sup>[17]</sup>。在叶底红的组织培养过程中,很少发现褐化现象,因此可能是叶底红生根培养过程需要黑暗条件,而活性炭提供黑暗条件,所以对生根起到促进的作用。

叶底红组培苗叶片较大,在炼苗和移栽过程中很容易因失水而萎蔫,直接影响到移栽成活率。因此,在炼苗时采用逐渐旋松而不去掉瓶盖,让组培苗对外界环境的温湿度有一个逐渐适应的过程;移栽后覆盖薄膜 7~14 d,并每天叶面喷雾,以减少

叶片水分蒸发，提高移栽成活率；以泥炭土和珍珠岩（2：1）作为移栽基质，移栽成活率可达90%以上。

#### 参考文献：

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志：第五十三卷 第一分册 [M]. 北京：科学出版社，1984.
- [2] 福建科学技术委员会（福建植物志）编写组. 福建植物志：第四卷 [M]. 福州：福建科学技术出版社，1989.
- [3] 刘敏. 花卉组织培养与工厂化生产 [M]. 北京：地质出版社，2002.
- [4] 熊丽，吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产 [M]. 北京：化学工业出版社，2002.
- [5] 马国华，林有润，简曙光，等. 野牡丹和地稔的离体培养和植株再生 [J]. 植物生理学通讯，2000，36（3）：233—234.
- [6] 马国华，林有润，简曙光，等. 华南野牡丹科野生花卉种质资源的收集和繁殖 [J]. 中国野生植物资源，2001，20（6）：72—73.
- [7] 马国华，张静峰，刘念，等. 从多花野牡丹和野牡丹花柄直接诱导出芽 [J]. 植物生理学通讯，2004，40（6）：719.
- [8] 戴小英，温强，江香梅，等. 铺地锦组培快速繁殖研究 [J]. 江西林业科技，2004（4）：22—23.
- [9] 张朝阳，许桂芳. 铺地锦的组织培养和快速繁殖 [J]. 西北林学院学报，2004，19（2）：75—76.
- [10] 伍成厚，冯毅敏，陈妙贤，等. 印度野牡丹茎段的培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯，2006，42（6）：1145—1146.
- [11] 唐艳，汪卫星，郭启高，等. 展毛野牡丹组培快繁技术的研究 [J]. 山西农业大学学报：自然科学版，2010，30（2）：122—124.
- [12] 彭东辉，张启翔，陈龙菊. 紫毛野牡丹组织培养与快速繁殖研究 [J]. 福建林学院学报，2010，30（1）：6—10.
- [13] 盖钧镒. 试验统计方法 [M]. 北京：中国农业出版社，2000：278—295.
- [14] GRAZIA M, GIANPAOLO B. Micropropagation of actinidia deliciosa cvs ‘hayward’ and ‘Tomuri’ [J]. Scientia Horticulturae, 1990, 45: 65—74.
- [15] 陈菊，陈国惠. 何首乌生根培养因子的优先研究 [J]. 西南农业大学学报：自然科学版，2006，28（5）：756—758.
- [16] 孙占育，孙志强. 活性炭在促进组培苗植物生根中的作用 [J]. 湖南农业科学，2010，（4）：3—5.
- [17] 陈凯. 植物组织培养中褐变的产生机理及抑制措施 [J]. 安徽农业科学，2004，32（5）：1034—1036.

（责任编辑：黄爱萍）