

· 技术方法 ·

毛报春(*Primula × pubescens*)腋芽再生组织培养体系的建立

李孟悦, 刘柳, 刘艳, 张晓曼*

河北农业大学, 保定 071000

摘要 以毛报春(*Primula × pubescens*)无菌腋芽为外植体, 分析不同浓度激素对比对愈伤组织诱导和分化以及不定芽增殖和生根的影响, 筛选出不同阶段的最适培养基, 优化毛报春的组织培养再生体系。结果表明, 毛报春腋芽愈伤组织诱导及分化的最适培养基为MS+0.2 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA, 诱导率达84%, 出芽率达67%; 不定芽增殖最适培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA, 增殖率可达67%, 苗绿且健壮; MS+0.2 mg·L⁻¹ NAA培养基最有利于组培苗的生根及伸长, 平均单株生根数为9条, 生根率高达70%。该研究建立了毛报春的组织培养再生体系, 可为报春属其它植物的遗传研究及种质创新提供参考。

关键词 毛报春, 无菌腋芽, 组织培养, 植株再生

李孟悦, 刘柳, 刘艳, 张晓曼 (2021). 毛报春(*Primula × pubescens*)腋芽再生组织培养体系的建立. 植物学报 56, 732–739.

毛报春(*Primula × pubescens*)是报春花科(Primulaceae)报春花属(*Primula*)多年生草本花卉, 为欧报春组植物, 2018年自美国引种, 是多毛报春(*P. hirsute*)和耳叶报春(*P. auricula*)自然杂交种(黄祯强, 2010)。毛报春叶卵圆形或椭圆形, 肉质, 有叶香, 长5–14 cm, 上表面深绿色, 近无毛, 下表面淡绿色, 被白粉; 花葶较粗壮, 伞形花序通常1或2至多轮花。花冠高脚碟状, 颜色有淡粉色、黄色、橙黄色和紫色, 花色丰富绚丽。花瓣5片, 倒心形, 先端1裂, 花期长, 为6–10月, 可供室内外盆栽观赏, 在园林中具有较高的应用价值。毛报春引种后发现其开花后杂交不结实, 给杂交育种及种质创新利用带来阻碍。为促进毛报春种质资源的有效开发利用, 本研究建立了毛报春组培快繁体系, 可为后期遗传育种研究奠定基础。

组织培养技术已成功应用于园林植物脱毒培养、防止品种退化及通过无性繁殖方式在较短的时间内成功获得大量植株等研究(邵煜和李璐, 2019), 为园林植物育种和种质资源保护利用作出了重要贡献。自Coumans等(1979)通过离体鄂报春(*P. obconica*)

花芽成功获得再生植株以来, 国内外陆续报道了多项报春花属植物组织培养研究, 现已对21种报春花属植物成功建立了组培快繁体系, 其中研究较多的有小报春(*P. forbesii*) (金晓霞等, 2005)、鄂报春(宋建英等, 2007)、报春花(*P. malacoides*) (侯云屏和古志渊, 2001)和翠南报春(*P. siboldii*) (李春玲等, 1992)等, 利用其不同外植体建立组织培养再生体系。然而, 毛报春作为新引进种质, 其组织培养体系尚未见报道。

本研究以毛报春腋芽为外植体, 筛选出适宜腋芽愈伤组织诱导及分化、不定芽增殖和组培苗生根诱导3个阶段的最适培养基, 建立了高效的毛报春腋芽再生体系, 可保留亲本优良性状, 并克服毛报春杂交不结实影响后代繁育等缺陷。该组培体系的建立可为报春属植物遗传改良和种质创新奠定基础。

1 植物材料

毛报春(*Primula × pubescens* Jacq.)种子购自美国, 均保存于河北农业大学园林学院实验室4°C冰箱中。

收稿日期: 2021-05-03; 接受日期: 2021-08-27

基金项目: 河北省教育厅重点项目(No.ZD2016132)和河北省自然科学基金(No.C2021204113)

* 通讯作者。E-mail: zhangxiaoman1977@163.com

2 培养基成分与培养条件

2.1 无菌腋芽培养

将种子在蒸馏水中浸泡24小时, 参照郑云凤等(2018)的方法对种子进行消毒。将消毒后的种子接种到MS培养基, 待幼苗长至6–8 cm高, 叶片数3–6片时, 用无菌解剖刀将生长健壮的腋芽切下, 获得无菌腋芽。

2.2 愈伤组织诱导及分化

将无菌腋芽接种到分别添加不同浓度2,4-D (0.2、0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹)与6-BA (0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹)或者NAA (0.1、0.2、0.5、1.0 mg·L⁻¹)与6-BA (0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹)不同组合配比的1/2MS和MS培养基中, 共48种组合。此外, 添加5 g·L⁻¹琼脂、30 g·L⁻¹蔗糖, pH5.8, 121°C高压灭菌20分钟。每组接种30个腋芽, 每瓶接种3个, 重复3次, 每3周更换1次培养基。在温度为22–25°C、光周期为12小时光照/12小时黑暗、光照强度为27.5 μmol·m⁻²·s⁻¹的组培室培养。60天后观察记录各处理中愈伤组织的诱导及分化情况, 统计诱导率及分化率。

2.3 不定芽增殖培养

将分化培养出的长度1 cm以上、带有3–5片叶的不定芽分别接种到添加不同浓度NAA (0.2、0.5、1.0 mg·L⁻¹)和6-BA (0.2、0.5、1、2 mg·L⁻¹)的MS及1/2MS培养基中, 共24种组合。每组接种10瓶, 每瓶3个不定芽, 重复3次。接种后每2周继代1次, 30天后观察不定芽的生长情况, 统计不定芽增殖率。

2.4 生根诱导

将继代分化培养3周, 长至长度2 cm左右的芽纵切成单芽, 转接到含有不同浓度NAA (0、0.1、0.2 mg·L⁻¹)和IBA (0、0.2、0.3 mg·L⁻¹)的MS培养基中。培养30天, 观察生根情况并统计平均生根数, 计算生根率。

2.5 炼苗及移栽

待苗高3–4 cm、根长2–3 cm时进行移栽。移栽时, 首先打开瓶盖, 置于组培室炼苗3天, 然后再移到自然环境中驯化2天。炼苗后用镊子将组培苗从瓶内夹出, 洗净根上残留的培养基, 然后在0.1%多菌灵溶液中浸泡1–2小时, 最后栽植到灭菌后的混合营养土(草炭

土:珍珠岩=3:1, v/v)基质中(郑云凤等, 2018)。置于22–25°C、光周期为12小时光照/12小时黑暗的温室中进行后期管理。

2.6 统计分析

采用Microsoft Office Excel 2010软件进行数据统计。应用SPSS 20.0软件进行差异显著性分析。

3 结果与讨论

3.1 腋芽愈伤组织的诱导及分化

研究表明, 在添加2,4-D与6-BA的培养基中培养30天, 腋芽切口处膨大且均有小颗粒状淡黄色愈伤组织出现, 但长势弱, 愈伤组织块生长紧致, 均不分化, 逐渐干枯死亡(数据未显示)。不同基本培养基及添加不同浓度NAA与6-BA组合对毛报春腋芽愈伤组织诱导及分化的影响不同(表1)。接种在1/2MS培养基中的腋芽2周后切口处膨大, 有黄绿色愈伤组织出现但长势一般; 接种在MS培养基中的腋芽1周后底部切口处膨大, 2周后切口处有颗粒状绿色愈伤组织出现, 30天后已形成大块愈伤组织且均为绿色, 较1/2MS培养基中长势更加旺盛。在1/2MS培养基中, 当6-BA浓度不变时, 随着NAA浓度的升高, 腋芽愈伤组织的诱导率表现为先升高后降低的趋势, NAA浓度为0.2 mg·L⁻¹时诱导率最高, 当NAA浓度增至0.5–1.0 mg·L⁻¹时, 愈伤组织诱导率呈下降趋势, 甚至诱导率为0。其中, 当NAA浓度为0.2 mg·L⁻¹、6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹时, 在1/2MS培养基中愈伤组织的诱导率最高, 可达76.33%, 与其它组差异显著。

此外, 在MS培养基中, 当6-BA浓度不变时, 随着NAA浓度的升高诱导率逐渐降低, 只有当6-BA浓度为1.0 mg·L⁻¹时表现出先升高后降低的趋势。当NAA浓度为0.2 mg·L⁻¹时, 随着6-BA浓度的升高, 诱导率先升高后降低。当NAA浓度为0.1–0.2 mg·L⁻¹、6-BA浓度为0.5–1.0 mg·L⁻¹时愈伤组织的诱导率高且愈伤组织呈翠绿色, 长势好。其中, 当添加0.2 mg·L⁻¹ NAA、1.0 mg·L⁻¹ 6-BA时愈伤组织的诱导率最高, 可达84%, 且长势最好(图1A)。

在添加不同浓度激素的1/2MS和MS培养基中愈伤组织分化成芽率差异显著(表1)。在1/2MS培养基中, 当添加2.0 mg·L⁻¹ 6-BA时, 随着NAA浓度的升

高, 出芽率呈先升高后降低的趋势; 当NAA浓度介于0.2–1.0 mg·L⁻¹时, 出芽率随着6-BA浓度的升高呈先降低后升高的趋势; 其中, 当NAA浓度为0.5 mg·L⁻¹、6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹时, 愈伤组织分化出芽率最高, 可达67%。在MS培养基中, 当添加0.2 mg·L⁻¹ NAA时, 随着6-BA浓度的升高, 出芽率表现为先升高后降低的趋势; 当NAA浓度介于0.5–1.0 mg·L⁻¹时, 分化出芽率最低; 当添加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA时, 随着NAA浓度的升高, 愈伤组织分化出芽率呈先升高后降低的趋势; 其中, 当NAA浓度为

0.2 mg·L⁻¹、6-BA浓度为1.0 mg·L⁻¹时, 愈伤组织分化成不定芽(图1B), 且分化率最高, 可达67%, 丛生芽长势好, 苗健壮, 叶色较绿(图1C)。

综上表明, 毛报春腋芽外植体在NAA浓度为0.2 mg·L⁻¹、6-BA浓度为1.0 mg·L⁻¹的MS培养基中愈伤组织诱导率最高, 可达84%, 且愈伤组织呈绿色, 疏松, 长势好。虽然在NAA浓度为0.5 mg·L⁻¹、6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹的1/2MS培养基中和NAA浓度为0.2 mg·L⁻¹、6-BA浓度为1.0 mg·L⁻¹的MS培养基中, 分化率均高达67%, 但是在1/2MS培养基中分化出的

表1 不同浓度NAA与6-BA配比对毛报春愈伤组织诱导及分化的影响

Table 1 Effect of NAA and 6-BA ratio at different concentrations on *Primula × pubescens* callus induction and differentiation

No.	Culture medium	Inoculation number	Callus induction rate (%)	Callus growth situation	Callus differentiation rate (%)	Cluster bud growth situation
1	1/2MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	6.67±3.33 fg	+	0	–
2	1/2MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	15.67±2.96 efg	+	3.33±3.33 cd	+
3	1/2MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	6.67±6.67 fg	+	6.67±6.67 cd	+
4	1/2MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	63.33±8.81 abcd	++	13.33±3.33 bcd	+
5	1/2MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	43.33±12.02 bcde	+	20.00±11.55 bcd	+
6	1/2MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	76.33±8.21 ab	++	34.70±11.78 abcd	+
7	1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	0	–	10.00±10.00 bcd	+
8	1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	40.00±5.77 cdef	+	0	–
9	1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	6.00±3.05 fg	+	67.00±11.36 a	++
10	1/2MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	6.67±3.33 fg	+	26.70±3.33 bcd	+
11	1/2MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	0	–	23.33±3.33 bcd	+
12	1/2MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	0	–	30.00±30.00 abcd	++
13	MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	83.33±8.82 a	++++	40.00±11.55 abc	+++
14	MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	76.67±6.67 ab	++++	3.33±3.33 cd	+
15	MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	50.00±11.55 abcde	+++	16.70±3.33 bcd	+
16	MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	70.67±1.20 abc	++++	38.70±1.15 abc	++
17	MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	84.00±11.37 a	++++	67.00±11.36 a	++++
18	MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	38.33±7.27 cdef	++	47.30±6.36 ab	+++
19	MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	70.00±5.77 abc	++++	0	–
20	MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	63.33±8.82 abcd	+++	0	–
21	MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	16.00±3.06 efg	+	6.67±6.67 cd	+
22	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	32.00±2.00 defg	++	17.00±8.89 bcd	+
23	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	0	–	6.67±6.67 cd	+
24	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	0	–	13.33±8.82 bcd	+

+: 愈伤组织或丛生芽长势差; ++: 愈伤组织或丛生芽长势一般; +++: 愈伤组织或丛生芽长势好; ++++: 愈伤组织或丛生芽长势非常好; –: 没有愈伤组织或丛生芽。同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著。

+: Callus or fascicular bud grow poorly; ++: Callus or fascicular buds grow moderately; +++: Callus or tufted buds grow well; ++++: Callus or tufted buds grow very well; –: No callus or cluster bud. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level.

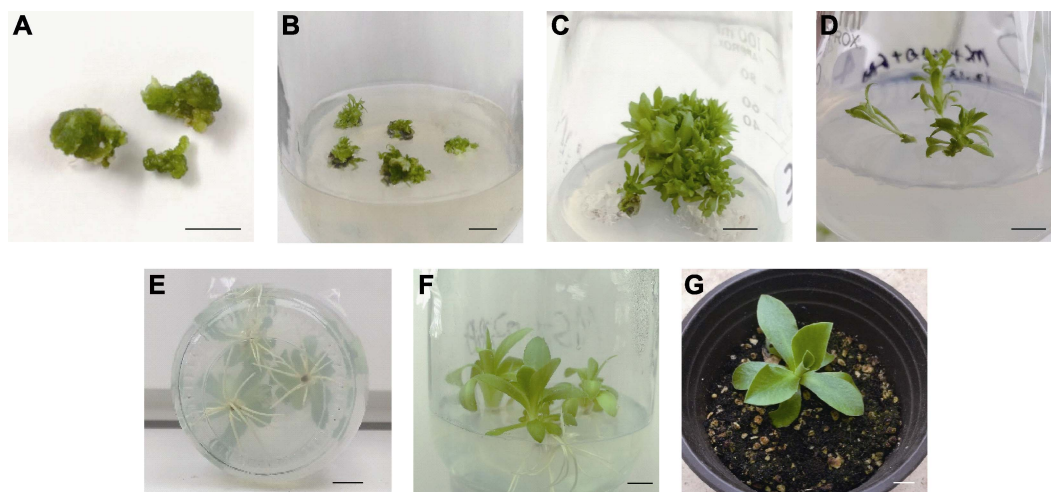


图1 毛报春的腋芽再生

(A) 腋芽诱导的愈伤组织; (B) 愈伤组织分化出不定芽; (C) 愈伤组织诱导分化丛生芽; (D) 增殖30天的不定芽; (E), (F) 30天后生根的再生苗; (G) 移栽成活的植株。Bars=1 cm

Figure 1 Axillary bud regeneration of *Primula × pubescens*

(A) Callus induced by axillary bud; (B) Callus differentiated into adventitious buds; (C) Callus differentiated into clustered buds; (D) Adventitious buds proliferated for 30 days; (E), (F) Regenerated plants rooted after 30 days; (G) Surviving plants after transplanting. Bars=1 cm

丛生芽叶色发黄, 长势弱, 后期成活率低; 在MS培养基中分化出的丛生芽叶色绿, 苗健壮, 长势好, 后期成活率高。因此, 毛报春腋芽外植体愈伤组织诱导及分化的最适培养基均为MS+0.2 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA。

3.2 不定芽增殖诱导

不同基本培养基及不同浓度激素配比对毛报春不定芽增殖诱导的影响差异显著(表2)。在1/2MS培养基中, 当6-BA浓度为0.2 mg·L⁻¹时, 随着NAA浓度的升高, 不定芽增殖率呈逐渐升高的趋势; 当NAA浓度为1.0 mg·L⁻¹时, 随着6-BA浓度的升高, 不定芽增殖率呈逐渐下降的趋势; 其中, 当NAA浓度为1.0 mg·L⁻¹、6-BA浓度为0.2 mg·L⁻¹时, 不定芽增殖率最高, 可达67%。在MS培养基中, 当6-BA浓度为0.2 mg·L⁻¹时, 随着NAA浓度的逐渐升高, 不定芽增殖率表现出先升高后降低的趋势; 当NAA浓度为0.5 mg·L⁻¹时, 随着6-BA浓度的逐渐升高, 不定芽增殖率表现出逐渐降低的趋势; 其中, 当NAA浓度为0.5 mg·L⁻¹、6-BA浓度为0.2 mg·L⁻¹时, 不定芽增殖率最高, 可达67%。虽然在1/2MS和MS培养基中最高增殖率均可达

67%, 但在NAA浓度为0.5 mg·L⁻¹、6-BA浓度为0.2 mg·L⁻¹的MS培养基中, 培养30天左右开始产生绿色的芽点, 随后逐渐增殖出不定芽, 增殖出的不定芽最多, 且丛生苗生长健壮, 叶色绿, 长势旺盛(图1D)。因此, 毛报春不定芽增殖的最适培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA。

3.3 生根诱导

添加不同浓度NAA和IBA的培养基均能诱导不定芽生根, 但不同培养基对生根诱导的影响差异显著(表3)。在不添加激素的MS培养基中也能诱导生根, 生根率达65%, 平均生根数为4条, 相对较少, 且随着根的伸长, 苗的长势变差, 叶色泛黄, 不利于生根诱导。当NAA浓度为0.2 mg·L⁻¹时, 随着IBA浓度的升高, 生根率呈先降低后升高的趋势; 当IBA浓度一定时, 随着NAA浓度的逐渐升高, 生根率呈先降低后升高的趋势。当IBA浓度为0、NAA浓度为0.2 mg·L⁻¹时, 生根率最高, 可达70% (图1E, F), 平均生根数为9条, 且根粗壮, 叶色绿, 苗长势健壮, 后期成活率高(图1G)。综上表明, 毛报春不定芽生根最适培养基为MS+0.2 mg·L⁻¹ NAA。

表2 不同浓度NAA与6-BA配比对毛报春不定芽增殖诱导的影响

Table 2 Effect of NAA and 6-BA ratio at different concentrations on *Primula × pubescens* adventitious bud proliferation

No.	Culture medium	Inoculation number	Multiplication rate (%)	Growth situation
1	1/2MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	0	—
2	1/2MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	3.33±3.33 cd	+
3	1/2MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	6.67±6.67 cd	+
4	1/2MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	13.33±3.33 bcd	+
5	1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	20.00±11.55 bcd	+
6	1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	34.67±11.78 abcd	+
7	1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	10.00±10.00 bcd	+
8	1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	0	—
9	1/2MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	67.00±11.36 a	++
10	1/2MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	26.67±3.33 bcd	+
11	1/2MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	23.33±3.33 bcd	+
12	1/2MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	30.00±0.00 abcd	+
13	MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	40.00±11.55 abc	+++
14	MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	3.33±3.33 cd	+
15	MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	16.67±3.33 bcd	++
16	MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	38.00±1.15 abc	++
17	MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	67.00±11.35 a	++++
18	MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	47.33±6.36 ab	+++
19	MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	0	—
20	MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	0	—
21	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	6.67±6.67 cd	+
22	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	17.00±8.89 bcd	++
23	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	6.67±6.67 cd	+
24	MS+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	30	13.33±8.82 bcd	++

+: 不定芽长势差; ++: 不定芽长势一般; +++: 不定芽长势好; ++++: 不定芽长势非常好; —: 无增殖。同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著。
+: Adventitious buds grow poorly; ++: Adventitious buds grow moderately; +++: Adventitious buds grow well; ++++: Adventitious buds grow very well; —: No proliferation. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level.

表3 不同浓度NAA与IBA配比对毛报春生根诱导的影响

Table 3 Effect of NAA and IBA ratio at different concentrations on *Primula × pubescens* rooting induction

No.	Culture medium	Inoculation number	Rooting number	Rooting rate (%)	Average number of bars	Growth situation
1	MS	20	13	65.00±5.00 a	4	+
2	MS+0.2 mg·L ⁻¹ IBA	20	10	50.00±5.77 ab	2	+
3	MS+0.3 mg·L ⁻¹ IBA	20	12	60.00±8.17 ab	5	+
4	MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA	20	2	10.00±5.77 c	1	+
5	MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ IBA	20	1	5.00±5.00 c	2	+
6	MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.3 mg·L ⁻¹ IBA	20	5	25.00±9.57 bc	4	+
7	MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA	20	14	70.00±5.77 a	9	++++
8	MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ IBA	20	10	50.00±5.77 ab	3	++
9	MS+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+0.3 mg·L ⁻¹ IBA	20	11	55.00±12.58 ab	10	+++

+: 根长势差; ++: 根长势一般; +++: 根长势好; ++++: 根长势非常好。同列不同小写字母表示在0.05水平差异显著。
+: Roots grow poorly; ++: Roots grow moderately; +++: Roots grow well; ++++: Roots grow very well. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level.

3.4 讨论

毛报春为杂交种,后期不易获得种子,且种子细小,不易保存,在自然条件下种子萌发率较低,利用传统的种子繁殖技术难以大量繁殖。植物组织培养体系的建立对种质资源保护及植物快速繁殖有重要意义(王亚琴等, 2020)。植物组织培养可利用的外植体种类很多,如植物的种子、腋芽、叶片、上下胚轴、叶柄、花药、根尖、花瓣和块茎(王红梅, 2019)。诸多成功经验表明,外植体的选取和诱导培养是影响植物组织培养成败的两大重要环节(邵煜和李璐, 2019)。在前人对报春花属植物组织培养研究中,通常选用叶片、叶柄、腋芽和上下胚轴作为外植体。研究发现,滇北球花报春(*P. denticulata* subsp. *sinodenticulata*) (张启翔等, 2007; 解玮佳等, 2010)种子胚轴和腋芽均能直接诱导出丛生芽,且可以诱导生根,已成功建立了组培体系;岩生报春(*P. saxatilis*) (赵妍等, 2010)、红宝石球花报春(*P. denticulata*) (郑云凤等, 2018)、霞红灯台报春(*P. beesiana*) (李翠娟, 2007)、橘红灯台报春(*P. bulleyana*) (李翠娟, 2007)和海仙花报春(*P. poissonii*) (李翠娟, 2007)等均由腋芽外植体诱导出丛生芽并成功建立了再生体系。因此,参照前人的研究方法,本研究以毛报春腋芽为外植体,选用不同浓度激素配比的培养基进行植株再生实验。结果发现,毛报春腋芽外植体再生能够成功获得生长健壮的组培苗。平均1个不定芽能够增殖6—8个芽,并且在植物激素的诱导下,生根率最高可达70%,平均每株生根9条。

不同种类植物对培养基条件要求不同,再生能力也存在差异。在对红宝石球花报春再生体系研究过程中,郑云凤等(2018)以腋芽为外植体,将其接种于MS+1.0 mg·L⁻¹ NAA+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA培养基上,结果发现腋芽能直接诱导出不定芽,且诱导率高达73.33%。赵妍等(2010)以岩生报春的腋芽为外植体进行组织培养,发现其腋芽也能直接诱导形成不定芽,这与毛报春存在显著差异。本研究以毛报春腋芽为外植体,接种于MS+0.2 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA培养基上,发现腋芽先经过脱分化形成愈伤组织,之后愈伤组织通过再分化逐渐形成不定芽。研究表明,诱导植物进入脱分化状态的关键因素是生长素和细胞分裂素。因此,分化途径出现差异的原因可能与植物激素含量和植物种类有关。

激素种类、不同浓度配比及基本培养基种类的选择对植物愈伤组织的诱导及分化、不定芽的增殖和生根起重要调节作用,也是决定植物再生的重要因素(崔激, 1983)。本研究选用1/2MS和MS两种基本培养基,添加生长激素2,4-D/NAA,与细胞分裂素6-BA组合使用。结果表明,接种在2种不同基本培养基中的腋芽均不同程度地诱导出愈伤组织,但接种在MS培养基中的腋芽外植体诱导出的愈伤组织长势旺,呈绿色,在1/2MS培养基中的愈伤组织长势较弱,呈黄色或黄绿色。上述结果表明,MS基本培养基更利于毛报春腋芽外植体愈伤组织的诱导,可能是由于MS培养基中的无机盐浓度较高,养分的数量和比例合适,能够满足组织生长所需的矿物质营养,并且还能加速愈伤组织的生长(徐丝羽等, 2019)。这与吴之坤等(2005)以及游晓会等(2012)关于其它报春花属植物的研究结果一致。

生长激素能够刺激细胞伸长,促进愈伤组织的诱导。本研究选择报春花属植物常用的2,4-D和NAA两种生长激素。细胞分裂素能够促进细胞分裂、诱导芽的形成并促进其生长,多用于初代培养(静一等, 2009)。本研究选用6-BA与两种生长激素分别组合。结果发现,接种在添加2,4-D与6-BA培养基中的腋芽大多能不同程度地诱导出愈伤组织,但数量少、长势弱,后期由黄变黑,逐渐干枯死亡(数据未显示)。这与查帅兵(2006)报道的安徽羽叶报春(*P. merrilliana*)愈伤组织诱导培养基MS+1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA存在差异。产生差异的原因可能与外植体材料不同有关,具体原因有待进一步研究。而接种在添加NAA与6-BA培养基中的腋芽大多可不同程度地诱导毛报春腋芽外植体产生愈伤组织,并能够不同程度地分化出不定芽,且生长旺盛,呈绿色,这与藏南粉报春(*P. jaffreyana*) (周国兴等, 2015)不定芽诱导培养基配方大致相同。本研究发现,低浓度或高浓度的激素配比均不利于愈伤组织的诱导和分化,同时,细胞分裂素6-BA浓度过高容易产生玻璃化苗,这与胡万银(2015)关于园林植物报春花的组织培养研究结果一致。

植物激素种类及配比对不定芽生根诱导也起重要作用。参照金晓霞等(2005)对小报春、宋建英等(2007)对鄂报春、李翠娟(2007)对橘红灯台报春以及赵妍等(2010)对岩生报春生根培养基的筛选,本研究选用MS基本培养基,通过单独使用IBA和NAA,以及

IBA与NAA配合使用,结果表明均能不同程度地诱导生根。但接种在添加IBA培养基中的不定芽生根速度慢,且不利于根的伸长;在IBA与NAA配合使用的培养基中,根短粗,不伸长,移栽后植株不易成活;当单独添加 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA时生根率最高。这与岩生报春生根培养基成分(MS+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA)大致相同,说明低浓度NAA能够促进毛报春根的生长,与小报春和鄂报春生根培养基为MS有差异。

通过探究不同种类和不同浓度激素及不同基本培养基对组织培养中愈伤组织的诱导及分化、不定芽的增殖和生根等不同阶段的影响,成功建立了毛报春快繁体系。利用该体系不仅提高了毛报春的繁殖系数,为其后续规模化生产奠定了基础,而且保留了其优良性状,可为报春花属其它植物的种质创新研究提供参考。

参考文献

- 崔激 (1983). 植物激素与细胞分化及形态发生的关系. 细胞生物学杂志 **5**(2), 1–6.
- 侯云屏, 古志渊 (2001). 报春花的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯 **37**, 234–235.
- 胡万银 (2015). 园林植物报春花的组织培养. 天津农业科学 **21**(11), 148–150.
- 黄祯强 (2010). 7种报春花属植物温室越冬栽培研究. 硕士论文. 北京: 北京林业大学. pp. 10–33.
- 金晓霞, 潘会堂, 张启翔 (2005). 小报春的组织培养和植株再生. 植物生理学通讯 **41**, 794.
- 静一, 雷开荣, 陈旭, 李启波, 林清 (2009). 生姜组培快繁技术优化研究. 南方农业 **3**, 62–64.
- 李春玲, 蒋钟仁, 熊佑清 (1992). 早春野生花卉组织培养研究初报. 园艺学报 **19**, 277–278.
- 李翠娟 (2007). 灯台组(*Primula* Sect. *Proliferae*)报春花栽培与杂交育种研究. 硕士论文. 北京: 北京林业大学. pp. 10–20.
- 邵煜, 李璐 (2019). 植物组织培养技术在园林植物育种中的应用进展. 农村经济与科技 **30**(9), 56–58.
- 宋建英, 叶建仁, 陈剑勇 (2007). 鄂报春的组培技术研究. 西南林学院学报 **27**(2), 53–56.
- 王红梅 (2019). 苜蓿胚性愈伤组织诱导及植株再生研究. 甘肃农业科技 (10), 24–28.
- 王亚琴, 韦陆丹, 王文静, 刘宝骏, 张春玲, 张俊卫, 何燕红 (2020). 万寿菊再生体系的建立及优化. 植物学报 **55**, 749–759.
- 吴之坤, 张长芹, 程治英 (2005). 不同培养基质及条件对三种报春花种子萌发及幼苗生长的影响. 种子 **24**(4), 1–5.
- 解玮佳, 李世峰, 李涵, 蒋亚莲, 蔡艳飞, 李树发 (2010). 滇北球花报春的组织培养(简报). 亚热带植物科学 **39**, 81.
- 徐丝羽, 王广期, 何琪, 刘清波 (2019). 植物激素调控姜组织培养的研究进展. 现代农业科技 (2), 81, 86.
- 游晓会, 马玉磊, 李小远, 潘会堂 (2012). 报春花属植物组织培养研究进展(综述). 亚热带植物科学 **41**, 73–78.
- 查帅兵 (2006). 安徽羽叶报春愈伤组织的诱导和培养. 生物学报 **23**(5), 43–45, 33.
- 张启翔, 李翠娟, 潘会堂, 梁树乐, 程堂仁, 孙明 (2007). 滇北球花报春的组培快繁方法. 中国专利, CN101015280A. 2007-08-15.
- 赵妍, 潘会堂, 张启翔, 王史琴, 董玲玲 (2010). 岩生报春的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯 **46**, 1275–1276.
- 郑云凤, 张晓曼, 刘晓 (2018). 红宝石球花报春腋芽再生体系的建立. 植物学报 **53**, 686–692.
- 周国兴, 欧珠朗杰, 扎西次仁, 钟扬 (2015). 藏南粉报春(*Primula jaffreyana* King)的组织培养与快速繁殖. 西藏科技 (6), 79–80.
- Coumans M, Coumans-Gillcs MF, Delhez J, Gaspar T (1979). Mass propagation of *Primula obconica*. *Acta Horti* **91**, 287–293.

Establishment of Tissue Culture System for Axillary Bud Regeneration of *Primula × pubescens*

Mengyue Li, Liu Liu, Yan Liu, Xiaoman Zhang^{*}

Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China

Abstract The effects of different concentrations of hormone on *Primula × pubescens* tissue culture were studied through callus induction and differentiation, adventitious bud proliferation culture and rooting. The optimal medium at different stages was selected to optimize the regeneration tissue culture system of *Primula × pubescens*. Our results showed that the best medium for callus induction and differentiation was MS+0.2 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA, with 84% induction rate and 67% budding rate; the optimal medium for adventitious bud proliferation was MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA, and the proliferation rate was 67%; MS+0.2 mg·L⁻¹ NAA medium was the best for rooting and elongation of tissue culture seedlings. The average number of roots per plant was 9, and the rooting rate was 70%. This study established a highly effect tissue culture and regeneration system of *Primula × pubescens*, which laid a foundation for genetic research and germplasm innovation of other *Primula* plants.

Key words *Primula × pubescens*, aseptic axillary bud, tissue culture, plant regeneration

Li MY, Liu L, Liu Y, Zhang XM (2021). Establishment of tissue culture system for axillary bud regeneration of *Primula × pubescens*. *Chin Bull Bot* **56**, 732–739.

^{*} Author for correspondence. E-mail: zhangxiaoman1977@163.com

(责任编辑: 朱亚娜)