

研究报告

Research Report

胭脂花离体快繁及遗传稳定性检测

卢婉佩 游晓会 潘会堂*

北京林业大学园林学院, 城乡生态环境北京实验室, 国家花卉工程技术研究中心, 花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室, 北京, 100083

*通讯作者, htpan@bjfu.edu.cn

摘 要 胭脂花(*P. maximowiczii*)是报春花属多年生草本植物, 具有优良的观赏特性, 建立一个稳定、高效的胭脂花离体培育技术体系, 对胭脂花优良性状的保存与应用具有重要意义。本试验以经过低温处理的胭脂花未萌发芽作为外植体进行组培快繁技术研究, 并利用 SSR 和 AFLP 分子标记对再生植株进行遗传稳定性检测。结果表明, 以经过低温 60~90 d 处理的胭脂花芽鳞片作为外植体接种, 外植体的最佳表面消毒方法为 75%酒精浸泡 30 s 后, 再用 3%次氯酸钠灭菌 15 min; 最适宜启动培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA, 芽诱导率达 100%; 最适宜继代增殖培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, 增殖系数达 4.77。遗传稳定性检测发现, 继代 5 代的胭脂花组培苗 SSR 和 AFLP 分子标记检测变异率分别是 4.35%和 3.80%, 遗传一致性在 95%以上。本研究结果表明, 以经过低温处理的胭脂花未萌发芽为材料进行组培扩繁是保存胭脂花优异种质的理想途径。

关键词 胭脂花, 离体快繁, 遗传稳定性, SSR, AFLP

Rapid Propagation of *Primula maximowiczii* in vitro and its Detection of Genetic Stability

Lu Wanpei You Xiaohui Pan Huitang *

Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing, 100083

* Corresponding author, htpan@bjfu.edu.cn

Abstract *Primula maximowiczii* is a perennial herb of the genus *Primula*, which has excellent ornamental

基金项目: 本研究由中央高校基本科研业务费专项资金资助(2015ZCQ-YL-03)和教育部新世纪优秀人才计划项目(NCET-10-0231)共同资助

characteristics. It is important to establish an effective micropropagation of *P. maximowiczii* for its garden application and fundamental scientific study on heterostyly. The cold-stored dormant buds of *P. maximowiczii* were used as explants to develop an efficient *in vitro* regeneration system and the genetic stability of micropropagated plants were determined based on SSR and AFLP markers. The results showed that the best disinfection method to the explants was 75% ethanol for 30 seconds, followed by 3% sodium hypochlorite solution for 15 minutes. The suitable medium for induction was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA. The induction rate was 100% and the induction time was 15 to 20 days. The suitable medium for multiplication of shoots was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA and the multiplication coefficient was 4.77. The genetic stability detection showed that, the variation rates of SSR and AFLP molecular markers were 4.35% and 3.80% in 5 generations of *P. maximowiczii* plantlets in tissue culture, respectively, and its genetic consistency was over 95%. The results of this study showed that, it is an ideal way to preserve the excellent germplasm of *P. maximowiczii* by tissue culture and propagation from dormant buds with low temperature treatment.

Keywords *Primula maximowiczii*, *In vitro* reproduction, Genetic stability, SSR, AFLP

报春花科报春花属(*Primula*)植物被列为“世界三大高山花卉”之一,全世界约有 500 种,中国约有 300 种(陈封怀和胡启明, 1990)。该属植物大部分具有丰富的花朵和艳丽的花色,有很高的观赏价值,著名的欧报春(*Primula vulgaris*)、多花报春(*P. polyantha*)和鄂报春(*P. obconica*)等在世界各地广泛栽培。报春花属大部分种类是花柱二型植物,有长花柱与短花柱两种类型,并且自交不亲和,难以获得自交后代。报春花属植物是研究花柱二型特征以及花柱二型自交不亲和特性的模式植物(Franklin-Tong, 2008)。胭脂花(*P. maximowiczii*)是报春花属多年生草本植物,植株翠绿,花色艳丽,具有良好的观赏价值,在野生胭脂花群体中存在多种具有观赏价值的天然变异,花色、花眼变异丰富(穆绘莉等, 2012),是培育园林植物新品种的优良种质资源。但胭脂花是异花授粉植物,用种子繁殖容易丧失优良特性,而分株繁殖方法的繁殖系数太低。另外,胭脂花原产地为 1 600~1 800 m 的高山地区,在平原地区适应性较差,越冬困难,引种和资源保存难度大。因此,建立一个稳定、高效的胭脂花种质离体培育技术体系,对保存与应用胭脂花的优良性状具有重要的意义。

国内外对多个报春花属植物的组织培养进行研究(游晓会等, 2012; Hayta et al., 2016; 郑云凤等, 2017, 私人通讯),分别采用叶片、叶柄、无菌苗上下胚轴、花梗、腋芽和花药等为外植体进行增殖培养获得再生植株。然而,关于胭脂花组织培养的研究则较少,其中利用无菌种子萌发获得无菌幼苗为外植体进行再生

诱导获得再生植株,但是诱导率与增殖率较低(游晓会等, 2011; 2012; 宋韵霏等, 2012)。胭脂花是花柱二型自交不亲和植物,通过无菌幼苗进行再生培养无法判断每个再生株系的花柱类型,解决不了优良种质保存的目的。

在组织培养中,采用芽鳞片为外植体进行离体培养是获得再生苗的有效手段。自然生长的胭脂花在 10 月至翌年 4 月进行休眠,植株地上部分枯萎,在地下形成饱满的休眠芽度过休眠期(唐明等, 2011)。采集刚形成休眠芽的胭脂花植株进行不同时间的低温处理,结果显示胭脂花植株在低温处理 60 d 和 90 d 胭脂花成花质量最好(马玉磊, 2013),表明休眠芽经过低温处理促进了植株的生长发育。因此,本试验对胭脂花休眠后的植株进行-2℃处理 60~90 d 后采用植株的芽为外植体进行离体培养。以胭脂花未萌发芽为外植体构建再生体系,能够提前确认每个株系的花柱类型。另外,通过 SSR 与 AFLP 分析检测组培苗遗传稳定性,确定胭脂花诱导组培苗的遗传一致性。建立高效、稳定的离体培养体系是构建胭脂花遗传转化体系的基础,能够保存胭脂花的优良种质,对报春花植物新品种的培育以及花柱二型特征和自交不亲和特性分子机理的深入研究具有重要意义。

1 结果与分析

1.1 外植体消毒后的效果

在不同的次氯酸钠消毒处理中,6%次氯酸钠灭菌 15 min 效果最好,外植体污染率为 58.93%,但是高浓度次氯酸钠灭菌的外植体边缘容易变黑,并逐渐变褐,萌芽率降低。综合比较,3%次氯酸钠灭菌 15 min 能获得比较高的成功率(表 1)。

表 1 不同消毒方法对外植体污染率和诱导率的影响

Table 1 Effects of different sterilization methods on the percentages of pollution and induction rate of explants

处理	污染率(%)	诱导率(%)
Treatment	Pollution rate (%)	Induction rate (%)
3%次氯酸钠 10 min	86.67±10.41 Aa	58.33±3.82 Aa
3% sodium hypochlorite 10 min		
3%次氯酸钠 15 min	66.67±7.64 Bb	48.33±5.20 Bb
3% sodium hypochlorite 15 min		
6%次氯酸钠 10 min	71.67±7.64 ABab	40.83±1.44 Bc
6% sodium hypochlorite 10 min		
6%次氯酸钠 15 min	58.33±2.89 Bb	27.50±2.50 Cd
6% sodium hypochlorite 15 min		

注: 同一列不同小写字母代表处理间差异显著($p<0.05$); 同一列不同大写字母代表处理间差异极显著($p<0.01$)

Note: Different small letters in a column mean significant difference at $p<0.05$ level; Different capital letter in a column mean extremely significant difference at $p<0.01$ level

1.2 启动培养

外植体接种后(图 1A), 颜色逐渐由白变绿, 5 d 后, 外植体基部长出 1~2 个新芽, 20 d 后, 芽高约 1~1.5 cm。结果表明, 启动培养 20 d 时, 前 4 个分裂素 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)与生长素吲哚丁酸(IBA)的处理组合, 显著比后两个处理有利于芽诱导(表 2), 其中 3 号培养基(1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA)的诱导率达到 100%, 平均苗高为 1.66 cm, 新芽叶片浓绿、植株健壮、长势良好(图 1B)。而 5 号(1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D)和 6 号(1.0 mg/L KT+0.2 mg/L IBA)组合在诱导率和平均苗高上都显著低于前 4 个组合(表 2)。综上所述, 在分裂素与生长素的组合中, 分裂素 6-BA 比激动素(kinetin, KT)对胭脂花芽的诱导效果要好; 而生长素 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)在胭脂花芽诱导中不如生长素 IBA。因为生长素 6-BA 的活性比 KT 的活性高; 生长素苯酚化合物活性要比吲哚化合物高, 即苯酚化合物 2,4-D 比吲哚化合物 IBA 活性高(孔庆浩和章亚莲, 2009, 中国农业科学技术出版社, pp.75-95), 可能在胭脂花的诱导分化中需要较高活性的分裂素与较低活性的生长素的组合。因此, 3 号培养基(1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA)对胭脂花芽的诱导效果最佳, 而较低活性的分裂素 KT 与较高活性的生长素 2,4-D 对胭脂花的芽诱导效果较差。

表 2 不同激素组合处理对芽诱导的影响

Table 2 Effects of plant growth regulator combinations on induction of shoots

处理	诱导率(%)	平均苗高(cm)	生长状况
Treatment	Induction rate (%)	Height of plantlet (cm)	Growth situation
1	84.00±4.83 BCDbc	1.2±0.06 ABbc	植株绿色, 较健壮 Plants were stronger and green
2	90.53±3.56 BCb	1.48±0.16 Aab	植株绿色, 健壮 Plants were strong and green
3	100.00±0.00 Aa	1.66±0.13 Aa	植株绿色, 健壮 Plants were strong and green
4	91.67±5.51 Bb	1.42±0.18 Aab	植株绿色, 较健壮 Plants were stronger and green
5	78.70±5.65 CDcd	0.65±0.23 Cd	叶较小, 叶片发黄, 柔弱 Plants were weak and leaves were small and yellow
6	69.43±5.61 Dd	0.94±0.23 BCcd	叶片发黄, 柔弱 Plants were weak and leaves were yellow

注: 同一列不同小写字母代表处理间差异显著($p<0.05$); 同一列不同大写字母代表处理间差异极显著($p<0.01$)

Note: Different small letters in a column mean significant difference at $p<0.05$ level; Different capital letter in a column mean extremely significant difference at $p<0.01$ level

1.3 增殖培养

启动诱导的新芽在 1 号培养基(1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA)上接种 35 d 后, 平均增殖系数达到 4.77 (表 3), 植株生长较健壮、叶片绿色(图 1C), 表现出最优的诱导效率; 在 2 号培养基(1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA)的增殖系数和平均苗高也达到了较高的水平, 而在 3 号(1.0 mg/L KT+0.2 mg/L NAA)和 4 号(1.0 mg/L KT+0.2 mg/L IBA)培养基中的增殖结果显著低于前者。这些结果说明细胞分裂素 6-BA 对胭脂花芽幼叶的增殖培养比 KT 的诱导效果显著, 生长素萘乙酸(NAA)比 IBA 的效果略好, 但差异不显著; 而 4 个处理的再生苗高度以及生长状况都表现良好, 差异较小。因为 6-BA 比 KT 的活性高, 能够更好地促进胭脂花的分化。而在幼芽分化后, 这些激素都能促进幼芽的生长发育而获得健壮的再生苗。因此, 在这些处理中虽然得到了不同的诱导结果, 但是再生苗生长状态都表现良好。

表 3 不同激素组合处理对丛生芽增殖的影响

Table 3 Effects of different plant growth regulator combinations on multiplication of shoots

处理 Treatment	增殖系数 Multiplication coefficient	平均苗高 Height of plantlet	生长状况 Growth situation
1	4.77±0.45 Aa	3.47±0.31 Aa	植株绿色, 较健壮 Plants were stronger and green
2	3.87±0.30 Aa	3.84±0.34 Aa	植株绿色, 较健壮 Plants were stronger and green
3	1.70±0.70 Bb	3.63±0.62 Aa	植株绿色, 健壮 Plants were strong and green
4	1.33±0.25 Bb	4.37±0.48 Aa	植株绿色, 健壮 Plants were strong and green

注: 同一列不同小写字母代表处理间差异显著($p<0.05$); 同一列不同大写字母代表处理间差异极显著($p<0.01$)

Note: Different small letters in a column mean significant difference at $p<0.05$ level; Different capital letter in a column mean extremely significant difference at $p<0.01$ level

1.4 IBA 浓度对试管苗生根的影响

在生根诱导中, 适当的 IBA 浓度, 能够促进胭脂花再生植株的生根率, 没有添加 IBA 以及过高的 IBA 浓度都不利于生根诱导。1 号无激素添加以及 5 号浓度高达 0.20 mg/L 时, 生根率都较低, 平均根条数和根长都明显降低, 而 2 号 0.02 mg/L 和 3 号 0.05 mg/L 浓度处理的平均根长和根条数都维持在较高的水平, 在 0.05 mg/L 时生根率最高, 为 97.50% (表 4)。接入生根培养基培养 30 d 后, 3 号 0.05 mg/L 培养基生根状态最好, 出现 2 级根, 根粗壮、根毛多、叶色浓绿(图 1D)。综合分析认为, IBA 浓度为 0.05 mg/L 为生根最佳浓度, 此时最有利于提高移栽成活率。

表 4 IBA 浓度对试管苗生根的影响

Table 4 Effects of different IBA concentration on rooting of *in vitro* plantlets

处理	生根率(%)	平均根条数	平均根长(cm)	生长状况
Treatment	Rooting rate (%)	No. of root	Root length (cm)	Growth situation
1	80.83 ±5.77 Cc	3.35±0.65 Aa	2.12±0.83 Bb	根细长, 根毛多, 叶色浓绿 Roots were long and thin with large of root hairs; leaves were strong green
2	93.33±1.44 ABa	4.18±0.76 Aa	4.02±0.67 Aa	根粗壮, 根毛多, 叶色浓绿 Roots were thick and strong with large of root hairs; leaves were strong green
3	97.50±2.50 Aa	4.30±1.17 Aa	3.97±0.46 Aa	根粗壮, 根毛多, 叶色浓绿 Roots were thick and strong with large of root hairs; leaves were strong green
4	91.67±3.82 ABab	3.23±0.47 Aa	3.07±0.74 ABab	根粗壮, 根毛较多, 叶色浓绿 Roots were thick and strong with large of root hairs; leaves were strong green
5	85.83±2.89 ABCbc	3.08±0.82 Aa	2.65±0.33 ABb	根粗壮, 根毛少, 叶色浓绿 Roots were thick and strong with few root hairs; leaves were strong green

注: 同一列不同小写字母代表处理间差异显著($p<0.05$); 同一列不同大写字母代表处理间差异极显著($p<0.01$)

Note: Different small letters in a column mean significant difference at $p<0.05$ level; Different capital letter in a column mean extremely significant difference at $p<0.01$ level



A



B



C

D

图 1 胭脂花芽再生苗不同阶段生长状况

注: A: 接种第一天; B: 3 号诱导培养基启动培养 20 d, 植株生长健壮, 叶片绿色; C: 1 号增殖培养基增殖培养 30 d, 植株生长健壮, 叶片绿色; D: 3 号生根培养基生根培养 30 d, 根粗壮, 根毛多, 叶色浓绿

Figure 1 Growth situation of plantlets in different stages in *in vitro* culture

Note: A: Vaccination at first day; B: Plants were strong and green after starting culture for 20 days in the third treatment; C: Plants were strong and green after multiplication culture for 30 days in the first treatment; D: Roots growth situation after rooting culture for 30 days in the third treatment, roots were thick and strong with large of root hairs, leaves were strong green

1.5 胭脂花组培苗遗传稳定性的 SSR 分子检测

检测结果表明, 胭脂花芽组培苗 DNA 无降解和杂质, 纯度和浓度均符合 SSR 和 AFLP 两种分子标记方法对模板的要求, 可用于遗传一致性分析。利用筛选出的 3 对 SSR 引物进行 PCR 扩增, 检测胭脂花组织培养后代的变异率。结果表明, 3 对引物得到 23 个扩增位点, 22 个非特异性位点, 特异性位点只有 1 个, 其后代的遗传一致性为 95.65%, 组培苗遗传稳定性较高。

1.6 胭脂花组培苗遗传稳定性的 AFLP 分子检测

以样品 DNA 为模板酶切连接 14 h 后, 利用酶切产物进行预扩增与选择性扩增, 结果显示酶切产物的预扩增与选择性扩增产物符合预期, 可用于 AFLP 检测。采用 6 对引物进行检测, 平均每对引物约扩增 40 个位点, 共得到扩增位点 237 个, 其中多态性位点只有 9 个, 表明其遗传一致性为 96.20%, 结果与 SSR 分子检测结果基本一致, 组培苗表现较高的遗传稳定性。

2 讨论

2.1 外植体对胭脂花植株再生的影响

在前人的研究中, 采用胭脂花无菌实生苗的幼芽、叶柄、叶片进行再生苗培养, 获得了再生植株, 但是增殖系数较低, 最高只有 3.8; 以叶柄进行诱导的诱导率 52%, 而以叶片为材料进行诱导培养则没有获得再生苗(游晓会等, 2011; 宋韵霏等, 2012)。本试验以胭脂花经过低温处理的未萌发混合芽为材料, 诱导率达到 100%, 增殖率 4.77, 能够较高效的获得优良的再生苗。本研究经观察发现, 没有经过低温贮藏的胭脂花休眠芽较瘦长, 芽体包裹紧实, 芽鳞片不容易剥离。将没有低温处理的休眠芽接种到诱导培养基中, 15 d 内几乎没有萌发, 25 d 后仅有极少量外植体萌发出新芽, 且大部分生长较弱, 一周后便萎蔫死亡, 因此未经低温贮藏的休眠芽不适合进行再生繁殖。胭脂花休眠芽在 -2°C 低温处理后, 芽发生膨大, 腋芽开始发育, 这与前人研究结果一致, 不同的低温冷藏时间影响胭脂花的生长发育与成花质量(马玉磊, 2013), 表明胭脂花的生长发育受到低温积累的影响。本试验证明对胭脂花休眠后的植株进行 -2°C 处理 60~90 d 后采用休眠芽进行离体培养, 能够高效的获得优良的再生苗。

2.2 不同植物激素对胭脂花再生的影响

在外植体再生体系建立过程中,植物组织的分化受到不同激素的调控,主要包括细胞分裂素与生长素。细胞分裂素 6-BA 与 KT 等能够诱导离体组织的细胞分裂和组织分化;植物生长素 IBA、2,4-D 和 NAA 等主要诱导外植体生根(孔庆浩和章亚莲, 2009, 中国农业科学技术出版社, pp.75-95)。不同激素配比在不同植物种类中会产生有差异的诱导结果, Morozowska 和 Wesolowska (2004)采用 2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D 配方对黄花九轮草进行芽诱导;和文佳等(2007)采用 1.86 mg/L NAA+ 0.2 mg/L KT 配方对灰岩皱叶报春(*P. forrestii*)进行芽诱导与增殖培养; Sharaf 等(2011)采用 0.2 mg/L TDZ+0.4 mg/L NAA 配方对 *P. heterochroma* 进行芽诱导与增殖培养, 这些不同的激素配方在不同的报春属物种中获得了各自最佳的诱导效果。本研究表明, 对胭脂花经过低温处理的芽再生诱导的最佳培养配方与其它研究结果不同, 启动培养配方是 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA, 增殖培养配方是 MS+1.0 mg/L 6-BA +0.2 mg/L NAA; 6-BA 对胭脂花的诱导率显著高于其它组合, 2,4-D 以及 KT 组合的诱导率明显低于前者。显然, 分裂素 KT 在胭脂花芽的离体培养中诱导活性不如 6-BA; 而生长素 IBA 和 NAA 比 2,4-D 更适用于胭脂花的再生培养。

2.3 胭脂花继代组培苗的遗传稳定性

组织培养是进行种质资源保存、种苗扩繁以及进行新品种育种的有效手段,但是在植物不同外植体的诱导增殖过程中会使组培苗产生变异,例如苹果茎尖组培苗的变异(杜国强等, 2006)以及香蕉组培苗的变异(吴伟怀等, 2007)等, 这些变异可能影响物种的性状, 影响后续应用。可以根据形态学与细胞遗传学研究判断植物无性系的变异, 还可以利用分子标记对组培苗的稳定性进行检测, 分子标记技术快捷、准确, 能够提高研究效率而被广泛应用, 包括 RFLP、SNP、SSR、ISSR 和 AFLP 等技术(罗冉等, 2010; 胡杨等, 2016)。本研究采用 SSR 与 AFLP 两种方法对胭脂花芽的离体培养组培苗进行遗传稳定性检测, 两种方法的检测结果相近, 都表明以胭脂花芽为外植体的组培苗遗传一致性较高, 遗传变异较小, 说明胭脂花组培苗在继代 5 代时稳定性较高, 能够较好的保持物种的特性, 减少对后续研究的影响。本研究为花柱二型的胭脂花提供了一种稳定的保存优良种质资源的方法, 为胭脂花种质资源的开发利用提供了帮助。

3 材料与方法

3.1 试验材料

将已进入休眠期的胭脂花植株于 2014 年 10 月初移至-2℃的冷库中冷冻处理 60~90 d 后(图 2A), 取出植株, 剥出未萌发的芽(图 2B), 切取其紧密包裹的芽鳞片作为外植体进行培养。试验采用 MS 为基本培养基, 添加琼脂 7 g/L, pH 值调至 5.8~6.0, 118℃灭菌 18 min。培养温度为 25℃, 日光灯光源, 光照强度 2 200 lx, 光照时间为每天连续 14 h (游晓会等, 2012)。

3.2 外植体消毒

将生长健壮的胭脂花芽去除根部(图 2C)，用洗洁精和自来水洗净后，在流水下冲洗 30 min，在超净工作台内先用 75%乙醇消毒 30 s，无菌水冲洗 3 次，再分别用 3%次氯酸钠处理 10 min 和 15 min，以及 6%次氯酸钠处理 10 min 和 15 min，共 4 个不同消毒处理进行操作。然后将次氯酸钠冲洗干净(无菌水冲洗 6 次)，在无菌操作台中切取芽鳞片，将其从基部切成 1.5 cm×1.5 cm 的方块，从基部插入培养基中，每个不同消毒处理接种 20 瓶，每瓶 2 个外植体，重复 3 次。每隔 2 d 记录 1 次污染数和发芽数，20 d 后统计污染率和诱导率。

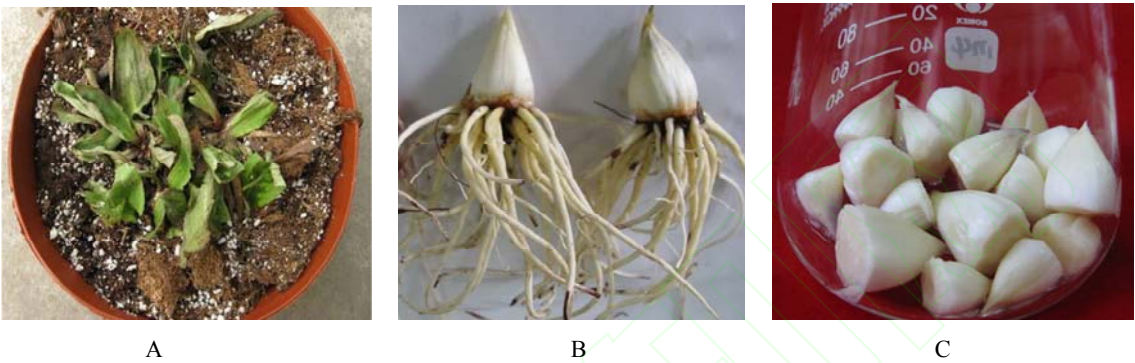


图 2 胭脂花植株与芽

注: A: 冷库中保存的胭脂花; B: 芽; C: 消毒后的芽

Figure 2 Plant and buds of *P. maximowiczii*

Note: A: *P. maximowiczii* plant stored in cold storage; B: Buds; C: Buds after being disinfected

3.3 启动培养

选择最佳消毒方式对胭脂花芽进行消毒，然后将外植体接种到不同的诱导培养基中(表 5)，操作流程同外植体消毒步骤(3.2)。每瓶接种 2 个外植体，每个处理 15 瓶，20 d 后统计诱导率和生长状况。

表 5 启动培养，增殖培养与生根培养的不同激素组合

Table 5 Different growth regulator compositions on induction, multiplication and rooting

处理编号	启动培养激素配方(mg/L)	增殖培养激素配方(mg/L)	生根培养激素配方(mg/L)
NO. of	Growth regulator compositions on	Growth regulator compositions on	Growth regulator compositions on
treatments	induction (mg/L)	multiplication (mg/L)	rooting (mg/L)
1	0.2 6-BA+0.2 IBA	1.0 6-BA+0.2 NAA	无激素
			No growth regulator
2	0.5 6-BA+0.2 IBA	1.0 6-BA+0.2 IBA	0.02 IBA
3	1.0 6-BA+0.2 IBA	1.0 KT+0.2 NAA	0.05 IBA
4	1.0 6-BA	1.0 KT+0.2 IBA	0.10 IBA
5	1.0 6-BA+0.2 2,4-D	-	0.20 IBA
6	1.0 KT+0.2 IBA	-	-

3.4 增殖培养

外植体在诱导培养基上培养 15~20 d，在诱导长出的嫩芽高达 1.5 cm 左右时，将其切下转接到增殖培

培养基中进行增殖培养(表 5)，每瓶接种 3 个芽，每个处理 10 瓶，重复 3 次。35 d 后统计增殖系数、株高和生长状况。

3.5 生根培养

采用 5 种不同生根培养基对丛生芽进行生根诱导，培养基分别为无激素添加、添加 0.02 mg/L、0.05 mg/L、0.1 mg/L 以及 0.2 mg/L IBA (表 5)，每个处理 10 瓶，重复 3 次。在诱导的幼芽长出 3~4 片叶时，分别取出单个幼芽，接种生根培养基，每瓶接种 2 个幼芽。诱导培养 30 d 后统计植株生长状况、根长、根数和生根率。

3.6 组培苗遗传稳定性的 SSR 检测

检测材料：经 60~90 d 冷冻处理的植株，剥出未萌芽，取幼嫩叶片，于硅胶中干燥保存，作为母株 DNA 的提取材料；取同一植株的未萌发芽作为外植体，消毒后接种至 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 培养基上进行诱导，诱导出的腋芽在相同的培养基上继代 5 次，约 30 d 继代一次，从获得的无菌苗中随机选取 30 个植株，取其新鲜叶片作为母株的繁殖后代 DNA 的提取材料。利用以上 31 个样本进行遗传稳定性检测。

DNA 提取：利用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根, 中国)，对 31 份样本材料提取基因组 DNA，用于 SSR 和 AFLP 标记分析。利用 1%的琼脂糖进行电泳，检测提取的 DNA 纯度及有无降解，将符合条件的 DNA 样品保存于-20℃下备用。

SSR 检测：利用报春花属其他物种中筛选出的具有多态性位点的 3 对 SSR 引物 P2、P66 与 P74 (Ueno, et al., 2009; Huang et al., 2010)进行遗传一致性检测。本试验利用 FAM、HEX 等荧光染料对 SSR 正向引物 5'端进行修饰和标记，采用荧光标记多态性检测方法进行多态性检验。PCR 产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后，进行毛细管电泳，通过 DNA 分析仪检测，Gene Maker V1.5 进行图像收集和分析，统计扩增片段的大小及变异水平。试验所用试剂购自 Promega 公司(美国)。

SSR 反应体系如下：0.5 μ L Mg^{2+} (25 mmol/mL)+1 μ L PCR buffer (10x)+0.4 μ L dNTP (2.5 mmol/ μ L)+0.2 μ L 上游引物(10 μ mol/ μ L)+0.2 μ L 下游引物(10 μ mol/ μ L)+0.5 μ L Taq (5 U/ μ L)+1 μ L DNA 模板+6.2 μ L ddH₂O。反应程序为：95℃ 3 min；94℃ 30 s，T_m 30 s，72℃ 30 s，30 个循环；72℃ 7 min。引物序列：P2 上游引物为 TCCTATCTGCAAATACCAAAGTCA，下游引物为 AATTGGGATGCGGAAGAGT，退火温度为 56℃；P66 上游引物为 ATATGCGGTTACAGTAGAAA，下游引物为 TAGATGGGTAGGTATTGACG，退火温度为 57℃；P74 上游引物为 TTTCAGTCGCATATCTACAC，下游引物为 AACAAACAAACC AGCGAACT，退火温度为 53℃。

3.7 组培苗遗传稳定性的 AFLP 检测

AFLP 检测材料与 SSR 检测材料一致。试验所用试剂购自 NEB 公司(美国)。利用报春花属其他物种中筛选的引物进行检测(陈强, 2008), 具体试验步骤如下:

(1)酶切连接: 采用 *Mse* I 和 *Eco*R I 两种限制性内切酶进行双酶切, *Eco*R I adaptor 和 *Mse* I adaptor 接头由各自的正、反两条链混合后在 PCR 仪中 95℃变性 5 min 后获得。反应体系总体积 20 μL, 将各种试剂混合后, 放置于 37℃的全温振荡培养箱中连接 14 h。完成后, 将产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 检测酶切连接产物是否酶切充分。将反应充分的酶切产物存放于-20℃保存备用。

酶切连接体系: 0.4 μL *Eco*R I adaptor (5 μmol/L)+0.4 μL *Mse* I adaptor (50 μmol/L)+0.1 μL *Eco*R I (20 U/μL)+0.2 μL *Mse* I (10 U/μL)+2 μL T₄ Buffer+0.4 μL T₄ Ligase (400 U/μL)+2 μL DNA 模板+14.5 μL ddH₂O。引物序列(5'-3'): *Eco*R I adaptor1 引物 CTCGTAGACTGCGTACC, *Eco*R I adaptor2 引物 AATTGGTACGCAGTCTAC; *Mse* I adaptor1 引物 GACGATGAGTCCTGAG, *Mse* I adaptor2 引物 TACTCAGGACTCAT。

(2)预扩增: 将酶切产物稀释 5 倍用于预扩增反应, 利用 1%的琼脂糖凝胶在 60 v 的电压下电泳 1 h, 检测预扩增产物, 检测合格后用于选择性扩增。

预扩增体系: 1.2 μL Mg²⁺ (25 mmol/L)+0.2 μL dNTP (2.5 mmol/μL)+2 μL Reaction BufferV (10x)+1 μL M00V (10 μmol/L)+1 μL E00V (10 μmol/L)+0.3 μL *Taq* 酶(5 U/μL)+2 μL 模板 DNA+12.3 μL ddH₂O。预扩增反应程序: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 4 min; 4 °C 保存。引物序列(5'-3'): E00 引物 GACTGCGTACCAATTC; M00 引物 GATGAGTCCTGAGTAA。

(3)选择性扩增: 选择性扩增为 20 μL 的反应体系, 预扩增产物稀释 30 倍, Mg²⁺体积为 1.1 μL。利用筛选出的 6 对引物组合(陈强, 2008)进行扩增: M19E36、M19E38、M19E41、M50E42、M50E44、M50E46。

引物序列: M19 引物 GATGAGTCCTGAGTAAGA, E36 引物 GACTGCGTACCAATTCACC, E38 引物 GACTGCGTACCAATTCACCT, E41 引物 GACTGCGTACCAATTCAGG, M50 引物 GATGAGTCC TGAGTAACAT, E42 引物 GACTGCGTACCAATTCAGT, E44 引物 GACTGCGTACCA ATTCATC, E46 引物 GACTGCGTACCAATTCATT。

(4)采用荧光标记多态性检测方法进行 AFLP 多态性检验, 利用 FAM、HEX 等荧光染料对 AFLP 引物中的 M19、M50 或者 E36、E38、E41、E42、E44 和 E46 序列的 5'端进行修饰和标记。具体方法与 SSR 检测方法相同。

3.8 数据处理与分析

污染率(%)=污染的外植体数/试验外植体总数×100%。

诱导率(%)=萌芽的外植体数/试验外植体总数×100%。

增殖系数=增殖后的芽数/接种芽数。

生根率=生根的苗数/接种的苗数×100%。

采用 Excel 进行数据记录，并采用 SPSS18 等进行分析(Duncan 检验方差分析)。

作者贡献

卢婉佩及游晓会是本研究的实验设计和实验研究的执行人；卢婉佩完成数据分析，论文初稿的写作；潘会堂是项目的构思者及负责人，指导实验设计，数据分析，论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由中央高校基本科研业务费专项资金资助(2015ZCQ-YL-03)和教育部新世纪优秀人才计划项目(NCET-10-0231)共同资助。

参考文献

- Chen F.H., and Hu Q.M., eds, 1990, *Flora reipublicae popularis sinicae*, Science Press, Beijing, China, 59(2): pp.1 (陈封怀, 胡启明, 编著, 1990, 中国植物志, 科学出版社, 中国, 北京, 59(2): pp.1)
- Chen Q., 2008, Genetic diversity of *Primula cockburniana* by AFLP analysis, Thesis for M.S., Sichun Nongye Daxue (Sichuan Agricultural University), Supervisor: Pan Y.Z., pp.20-21 (陈强, 2008, 鹅黄灯台报春遗传多样性 AFLP 分析, 硕士学位论文, 四川农业大学, 导师: 潘远智, pp.20-21)
- Du G.Q., Shi X.X., Zhang Q.L., and Ma B.K., 2006, Isozyme patterns and RAPD analysis of apple plantlets repeatedly subcultured *in vitro*, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 33(1): 33-37 (杜国强, 师校欣, 张庆良, 马宝焜, 2006, 苹果不同继代次数的茎尖组培苗同工酶谱及 RAPD 分析, 园艺学报, 33(1): 33-37)
- Franklin-Tong V., 2008, *Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, German, pp.5-6
- Hayta S., Smedley M.A., Li J., Harwood W.A., and Gilmartin P.M., 2016, Plant regeneration from leaf-derived callus cultures of primrose (*Primula vulgaris*), *HortScience*, 51(5): 558-562
- He W.J., Xu Z.Z., He J.W., and Li Y., 2007, Tissue culture and rapid propagation of *Primula forrestii* Balf. f., *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications)*, 43(2): 323 (和文佳, 徐中志, 和加卫, 李燕, 2007, 灰岩皱叶报春的组织培养与快速繁殖, 植物生理学通讯, 43(2): 323)
- Hu Y., Li Y., Huang Y.Z., and Liu P.W., 2016, Genetic diversity evaluation of sugarcane varieties using SSR and RAPD markers, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 35(9): 2494-2503 (胡杨, 李赞, 黄有总, 刘平武, 2016, 利用 SSR 与 RAPD 分子标记评估甘蔗品种的遗传多样性, 基因组学与应用生物学, 35(9): 2494-2503)
- Huang Y., Wang X.Q., Yang C.Y., and Long C.L., 2010, Development of 11 polymorphic microsatellite loci from *Primula amethystina* Franchet (Primulaceae), *HortScience*, 45(1): 148-149
- Luo R., Wu W.L., Zhang Y., and Li Y.H., 2010, SSR marker and its application to crop genetics and breeding, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 29(1): 137-143 (罗冉, 吴委林, 张旻, 李玉花, 2010, SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用, 基因组学与应用生物学, 29(1): 137-143)

- Ma Y.L., 2013, The growth, development and flowering control of *Primula maximowiczii*, Thesis for M.S., Beijing Linye Daxue (Beijing Forestry University), Supervisor: Pan H.T., pp.47-52 (马玉磊, 2013, 胭脂花生长发育和花期调控研究, 硕士学位论文文, 北京林业大学, 导师: 潘会堂, pp.47-52)
- Morozowska M., and Wesolowska M., 2004, *In vitro* clonal propagation of *Primula veris* L. and preliminary phytochemical analysis, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 46: 169-175
- Mu H.L., You X.H., Shi C., Ma L., Jiang Y., Pan H.T., and Zhang Q.X., 2012, Phenotypic variation in natural populations of *Primula maximowiczii*, *Beijing Daxue Xuebao (Journal of Beijing Forestry University)*, 34(3): 97-102 (穆绘莉, 游晓会, 石超, 马琳, 姜岩, 潘会堂, 张启翔, 2012, 胭脂花野生群体表型多样性研究, 北京林业大学学报, 34(3): 97-102)
- Sharaf A.R.N., Hamidoghli Y., and Zakizadeh H., 2011, *In vitro* seed germination and micropropagation of primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) an endemic endangered Iranian species via shoot tip explants, *Horticulture Environment & Biotechnology*, 52(3): 298-302
- Sun Y.F., Wang J.L., Bi K.L., Zhang L., and Li J.F., 2012, Tissue culture and plant regeneration of *primula maximowiczii*, *Hebei Daxue Xuebao (Journal of Hebei University (Natural Science Edition))*, 32(6): 630-634 (宋韵霏, 王俊丽, 毕凯丽, 张璐, 李建飞, 2012, 胭脂花的组织培养与植株再生, 河北大学学报自然科学版, 32(6): 630-634)
- Tang M., You X.H., Mu H.L., Mao J.J., Pan H.T., and Zhang Q.X., 2011, Growth, development and flower differentiation of wild *Primula maximowiczii*, *Xibe Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica)*, 31(11): 2192-2197 (唐明, 游晓会, 穆绘莉, 毛娟娟, 潘会堂, 张启翔, 2011, 野生胭脂花生长发育和花芽分化研究, 西北植物学报, 31(11): 2192-2197)
- Ueno S., Yoshida Y., Taguchi Y., Honjo M., Kitamoto N., Washitani I., Ohsawa R., and Tsumura Y., 2009, Development of 120 microsatellite markers for *Primula sieboldii* E. Morren for linkage mapping, *Conservation Genetics*, 10(6): 1945-1952
- Wu W.H., Zheng X.L., and Zheng F.C., 2007, Reasons, precaution and application of the variation of tissue-cultured banana, *Zhongguo Nanfang Guoshu (South China Fruits)*, 36(4): 31-34 (吴伟怀, 郑肖兰, 郑服丛, 2007, 香蕉组培苗变异的原因, 防止及其利用研究综述, 中国南方果树, 36(4): 31-34)
- You X.H., Ma Y.L., Li X.Y., and Pan H.T., 2012, A review of research progress on tissue culture of *Primula*, *Yaredai Zhiwu Kexue (Subtropical Plant Science)*, 41(1): 73-78 (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(1): 73-78)
- You X.H., Mu H.L., Tang M., Pan H.T., and Zhang Q.X., 2011, *In vitro* culture of *Primula maximowiczii* from seeds, *Dongbei Linye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Forestry University)*, 39(11): 33-35 (游晓会, 穆绘莉, 唐明, 潘会堂, 张启翔, 2011, 野生花卉胭脂花(*Primula maximowiczii*)组培体系的建立, 东北林业大学学报, 39(11): 33-35)
- You X.H., Yang B.J., Ma Y.L., Li X.Y., and Pan H.T., 2012, Seed sterilization and aseptic seeding of *Primula maximowiczii*, *Shandong Nongye Daxue Xuebao (Journal of Shandong Agricultural University)*, 43(2): 174-178 (游晓会, 杨冰洁, 马玉磊, 李小远, 潘会堂, 2012, 胭脂花(*Primula maximowiczii*)种子消毒及无菌播种的研究, 山东农业大学学报, 43(2): 174-178)