

花烛无菌苗液体增殖培养的影响因子

徐彬¹, 陈海钟¹, 郭维明¹, 王广东^{1*}, 文方德², 金剑平²

(1. 南京农业大学园艺学院, 南京 210095; 2. 珠海市园艺研究所, 广东 珠海 519070)

摘要: 以花烛 (*Anthurium andraeanum* Lind.) 品种 Sonate 无菌苗为材料, 研究了液体培养条件下不同植物生长调节剂、蔗糖浓度、培养方式等因子对腋芽增殖的影响, 并比较了 Sonate、Valentino 和 Julanba 3 个品种间腋芽增殖的差异。结果表明: 在液体振荡培养条件下, 以 Nitsch + BA 0.5 mg L⁻¹ + KT 1.0 mg L⁻¹ + 蔗糖 30 g L⁻¹ 为 Sonate 品种适宜的增殖培养基; 在 20 μmol m⁻²s⁻¹ 弱光下培养 25 d 后转至 40 μmol m⁻²s⁻¹ 正常光照下培养, 对 Sonate 品种的增殖效果较好, 腋芽诱导数平均可达 11.1 个, 腋芽平均长度为 1.4 cm。花烛腋芽增殖能力在品种间存在差异, 但 3 个品种均可在以上培养基和光照条件下快速增殖, 其中以 Sonate 和 Valentino 品种的增殖较快。

关键词: 花烛; 液体培养; 腋芽增殖

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)04-0338-05

Auxiliary Bud Proliferation of *Anthurium andraeanum* Lind. in Liquid Culture

XU Bin¹, CHEN Hai-zhong¹, GUO Wei-ming¹,
WANG Guang-dong^{1*}, WEN Fang-de², JIN Jian-ping²

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Zhuhai Institute of Horticulture, Zhuhai 519070, China)

Abstract: The influences of different combinations of plant growth regulators, sucrose concentration and culture modes on proliferation rates and the quality of auxiliary buds were studied in *Anthurium andraeanum* cv. Sonate in liquid culture. Differences in the proliferation were compared among *A. andraeanum* cvs. Sonate, Valentino and Julanba. Nitsch basal medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ BA, 1.0 mg L⁻¹ KT and 30 g L⁻¹ sucrose was suitable for auxiliary bud proliferation of Sonate under liquid flask-shaking culture condition. Auxiliary bud proliferation of Sonate was promoted by the light of 20 μmol m⁻²s⁻¹ of 25-day culture followed by 40 μmol m⁻²s⁻¹, with the bud proliferation rate of 11.1 and the average bud length of 1.4 cm. The cultivars, Sonate, Valentino and Julanba, were well propagated under the above culture condition, especially Sonate and Valentino, but they showed differences in auxiliary bud emergence.

Key words: *Anthurium andraeanum*; Liquid culture; Auxiliary bud proliferation

花烛 (*Anthurium andraeanum* Lind.) 又名红掌、安祖花, 为天南星科 (Araceae) 花烛属多年生草本植物, 因其佛焰苞和叶片具有较高的观赏价值, 因此深受人们的喜爱, 已成为仅次于热带兰科植物 (Orchidaceae) 的第二大热带花卉^[1]。花烛的常规繁

殖以分株法为主, 少有扦插, 增殖速度较慢^[2]。Pierik 等^[3]最先报道了花烛的组织培养, 随后国内外围绕花烛组织培养开展了大量研究工作, 并在许多栽培品种上实现了种苗的规模化繁殖^[4]。但目前花烛种苗的商品化繁殖均建立在固体培养体系上^[4], 且主

收稿日期: 2006-09-14 接受日期: 2007-03-05

基金项目: 国家自然科学基金(30300244); 广东省科技厅项目(K130532002-1-4); 南京农业大学 SRT 项目(0303A08)资助

* 通讯作者 Corresponding author

要是通过愈伤组织诱导不定芽的途径再生和增殖^[5]。而液体培养相对于固体培养不但可以降低培养基成本,且可以提供均一的培养环境,促进培养材料对营养的吸收,还可简化无菌操作过程。此外,愈伤组织培养途径常导致花烛离体再生植株的变异^[6]。针对这种现象,我们^[7]曾使用 TDZ 代替 BA 和 2,4-D 的组合诱导愈伤组织,结果表明其再生不定芽的质量具有一定程度的提高,但随着继代时间的延长,无菌苗生长势衰退现象仍十分明显。而通过腋芽增殖则可以保持旺盛的生长势,因此,提高花烛腋芽增殖途径的增殖率是需要解决的关键问题之一。本研究以花烛优良品种无菌苗为材料,研究在液体培养条件下的腋芽增殖条件,为花烛种苗生产提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试花烛 (*Anthurium andraeanum* Lind.) 材料为本实验室通过叶片培养所再生的 3 个品种 Sonate、Valentino 和 Julanba 的无菌苗。无菌苗均具有 2-3 片直径 1.0-2.0 cm 的叶片,在相同培养条件下继代培养,继代培养基为 Nitsch 添加 0.2 mg L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-BA)和 0.2 mg L⁻¹ 吲哚丁酸(IBA)的固体培养基。

1.2 植物生长调节剂的影响

选取生长一致的花烛无菌苗,去除气生根后接种于不同液体增殖培养基中。增殖培养基以 Nitsch 为基本培养基,分别附加不同种类和浓度的植物生长调节剂(6-BA、KT、2iP、TDZ),蔗糖浓度为 30 g L⁻¹,pH 为 5.6,采用 150 ml 三角瓶,每瓶添加液体培养基 50 ml,培养 50 d 后统计平均腋芽诱导数及腋芽平均长度。

1.3 蔗糖浓度的影响

选取生长一致的花烛无菌苗,去除气生根后分别接种于附加 20、30、40、50 g L⁻¹ 蔗糖的增殖培养基 Nitsch + 0.5 mg L⁻¹ 6-BA + 1.0 mg L⁻¹ KT,培养 50 d 后统计结果。

1.4 光照条件的影响

将花烛无菌苗接种于液体培养基 Nitsch + 0.5 mg L⁻¹ 6-BA + 1.0 mg L⁻¹ KT + 30 g L⁻¹ 蔗糖中,

分别于 20 μmol m⁻²s⁻¹ 弱光下和 40 μmol m⁻²s⁻¹ 正常光照下振荡培养;培养 25 d 后,统一转置 40 μmol m⁻²s⁻¹ 正常光照下振荡培养,培养 50 d 后统计结果。

1.5 培养方式的影响

将花烛无菌苗接入液体培养基 Nitsch + 0.5 mg L⁻¹ 6-BA + 1.0 mg L⁻¹ KT + 30 g L⁻¹ 蔗糖中,分别置于弱光下(20 μmol m⁻²s⁻¹)培养 25 d 后转置光照下(40 μmol m⁻²s⁻¹)振荡培养,以及固体培养基上(含 6% 琼脂,其他成分相同)培养,比较液体培养与固体培养的差异,培养 50 d 后统计结果。

1.6 基因型差异

将品种 Sonate、Valentino 和 Julanba 的无菌苗接入液体培养基 Nitsch + 0.5 mg L⁻¹ 6-BA + 1.0 mg L⁻¹ KT + 30 g L⁻¹ 蔗糖中,先放置在弱光下(20 μmol m⁻²s⁻¹)培养 25 d 后转置光照下(40 μmol m⁻²s⁻¹)振荡培养,培养 50 d 后统计结果。

以上所有试验每个处理无菌苗均为 20 株,重复 3 次。数据统计分析使用 SPSS 统计软件,采用 0.05 水平上的 Duncan 分析。

2 结果和分析

2.1 植物生长调节剂的影响

如表 1 所示,以花烛 Sonate 品种为材料,以 Nitsch 为基本培养基,单独添加 1.0-3.0 mg L⁻¹ 的 6-BA、KT、2iP 及 0.04-0.12 mg L⁻¹ 的 TDZ 时,均不同程度地促进了花烛腋芽的增殖,但以 6-BA 与 KT 处理的平均增殖芽数较多,增殖系数最高分别为 7.65 和 8.2,但从增殖过程中的愈伤组织的形成情况来看,仅在添加 KT 1.0 mg L⁻¹ 的液体培养基中花烛愈伤组织发生率较低,且腋芽发生多,生长正常;添加 1.0 mg L⁻¹ 以上浓度的 6-BA 均导致愈伤组织的大量形成;而添加 TDZ 导致腋芽发生畸形,叶黄化,且不利于腋芽的发生,平均腋芽诱导数小于 5.0,但低浓度的 TDZ 能促进不定根的发生;2iP 虽不能诱导腋芽的大量发生(平均腋芽诱导数小于 5.5),但明显促进了腋芽的伸长生长(腋芽平均长度约 1.4 cm)。将 KT 与低浓度的 6-BA、TDZ 结合使用,以添加 1.0 mg L⁻¹ KT + 0.5 mg L⁻¹ 6-BA 或 1.0 mg L⁻¹ KT + 0.01-0.02 mg L⁻¹ TDZ 能显著促进腋芽的发生,平均腋芽诱导数分别为 7.9、8.2 和 7.3

表 1 不同植物生长调节剂对花烛 *Sonate* 腋芽增殖的影响Table 1 Effects of plant growth regulators on the proliferation of auxiliary buds of *Anthurium andraeanum* cv. *Sonate*

植物生长调节剂 Plant growth regulator (mg L ⁻¹)	平均腋芽诱导数 Mean number of buds induced	腋芽平均长度 Mean length of buds (cm)	鲜重 (g) Fresh weight
6-BA 1.0	6.6c	1.36b	1.40c
6-BA 2.0	7.0bc	0.92c	1.85a
6-BA 3.0	7.65ab	0.6c	1.53cb
KT 1.0	7.3abc	0.77c	1.33c
KT 2.0	8.0ab	0.86c	1.45c
KT 3.0	8.2a	0.77c	1.25c
2-ip 1.0	3.9e	1.51a	1.29c
2-ip 2.0	4.4de	1.5a	1.33c
2-ip 3.0	5.5cd	1.13b	1.46bc
TDZ 0.04	4.0de	0.8c	1.27c
TDZ 0.08	3.4e	0.84c	1.35c
TDZ 0.12	4.9d	1.33b	1.79ab

同栏数值后不同小写字母表示显著差异 ($P < 5\%$)。Data in the same column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$ level. 下同。The same as below.

(表 2)。但 TDZ 会影响无菌苗的生长质量, 发生叶片黄化, 影响以后的生长。因此以 Nitsch 为基本培养基, 添加 0.5 mg L^{-1} 6-BA + 1.0 mg L^{-1} KT 较适宜花烛腋芽的发生和生长。

表 2 不同植物生长调节剂对比对花烛 *Sonate* 腋芽增殖的影响Table 2 Effects of combination of plant growth regulators on the proliferation of auxiliary buds of *Anthurium andraeanum* cv. *Sonate*

植物生长调节剂 Plant growth regulator (mg L ⁻¹)	平均腋芽诱导数 Mean number of buds induced	腋芽平均长度 Mean length of buds (cm)
KT 1.0	7.0bc	1.0a
KT 1.0 + BA 0.5	7.9a	1.0a
KT 1.0 + TDZ 0.01	8.2a	1.0a
KT 1.0 + TDZ 0.02	7.3ab	1.0a

2.2 蔗糖浓度的影响

以花烛 *Sonate* 品种为材料, 在培养基 Nitsch + 0.5 mg L^{-1} 6-BA + 1.0 mg L^{-1} KT 中添加不同浓度的蔗糖对腋芽发生的影响无显著差异 (表 3), 单株腋芽诱导数约为 7.3–8.4 个。蔗糖浓度大于 40 g L^{-1} 的处理虽能促进腋芽的伸长生长, 但同时也诱导腋芽基部木质化, 腋芽的木质化可能会影响到以后腋芽切分后对培养基中营养成分的吸收, 且不利于基部不定根的发生; 同时在含 20 g L^{-1} 蔗糖培养基上所诱导的腋芽颜色浅、叶片薄且生长势弱; 而添加 30 g L^{-1} 蔗糖的处理植株生长健壮, 因此培养基中含

30 g L^{-1} 蔗糖较适宜腋芽的发生和生长。根据以上结果, 确定花烛无菌苗适宜的液体增殖培养基为: Nitsch + 0.5 mg L^{-1} 6-BA + 1.0 mg L^{-1} KT + 30 g L^{-1} 蔗糖, pH 为 5.6, 以下的实验均在此培养基中进行。

表 3 不同蔗糖浓度对花烛 *Sonate* 腋芽增殖的影响Table 3 Effects of sucrose concentrations on the proliferation of auxiliary buds of *Anthurium andraeanum* cv. *Sonate*

蔗糖 Sucrose (g L ⁻¹)	平均腋芽诱导数 Mean number of buds induced	腋芽平均长度 Mean length of buds (cm)
20	7.3a	1.1b
30	8.4a	1.2b
40	8.2a	1.4a
50	7.8a	1.6a

2.3 光照的影响

为了促进花烛 *Sonate* 品种腋芽的伸长, 以利于分株的切割操作, 我们将无菌苗进行液体培养时先放置于 $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的弱光处振荡培养 25 d, 然后转置 $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的正常光下培养。结果表明, 弱光下培养不仅促进腋芽的伸长生长, 而且有利于腋芽的发生, 弱光处理和连续光照培养的腋芽长度分别为 1.4 cm 和 1.2 cm , 二者也达到显著差异水平。弱光处理的无菌苗单株腋芽诱导数为 11.1 个, 而连

表4 培养方式对花烛 *Sonate* 腋芽增殖的影响Table 4 Effects of culture modes on the proliferation of auxiliary buds of *Anthurium andraeanum* cv. *Sonate*

培养方式 Culture mode	鲜重 (g) Fresh weight	平均腋芽诱导数 Mean number of buds induced	腋芽平均长度 Mean length of buds (cm)	愈伤组织形成率 Callus frequency (%)
液体培养 Liquid culture	1.98a	11.1a	1.37a	0.17b
固体培养 Solid culture	1.09b	5.8b	0.87b	0.22a

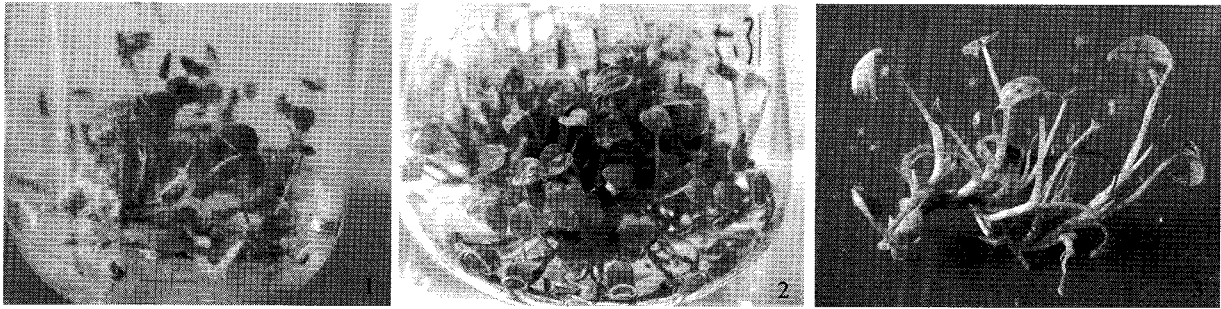


图1 花烛无菌苗的固体培养及液体培养

Fig. 1 Proliferation of *Anthurium andraeanum* in solid and liquid media

1. 固体培养 Solid culture; 2. 液体培养 Liquid culture; 3. 液体培养单个芽的增殖状况 Proliferation of single shoot in liquid medium.

续光照下为 8.4 个, 二者差异显著。

2.4 不同培养方式的影响

由表 4 可见, 相对于固体培养, 花烛 *Sonate* 品种无菌苗接种于液体培养基中进行振荡培养, 显著促进了腋芽发生的数量和生长质量, 液体振荡培养平均产生的腋芽数为 11.1 个, 而固体培养 50 d 平均产生的腋芽数仅为 5.8 个, 这可能是液体培养条件下无菌苗对培养基中的营养成分和植物生长调节剂的吸收较充分, 利于腋芽的萌发。且液体培养条件下, 愈伤组织形成比例较低, 腋芽长度和鲜重均与固体培养的存在显著差异 (图 1)。

2.5 品种间差异

将 *Sonate*、*Valentino* 和 *Julanba* 3 个品种无菌苗分别接种于相同的液体增殖培养基 Nitsch + 1.0 mg L⁻¹ KT + 0.5 mg L⁻¹ 6-BA + 30 g L⁻¹ 蔗糖中, 先放置在弱光下培养 25 d, 然后转置正常光照下振荡

培养。培养 50 d 后统计结果, *Sonate*、*Valentino* 和 *Julanba* 3 个品种间的腋芽发生能力和生长势均存在差异。其中 *Sonate* 和 *Valentino* 腋芽发生数量较多, 平均腋芽诱导数均为 11.1 个, 且腋芽伸长生长较快, 腋芽平均长度分别为 1.33 cm 和 1.37 cm (表 5)。但 *Valentino* 愈伤组织形成率偏高, 可通过缩短液体培养时间, 及时将腋芽切分, 转入固体培养基上以避免这一缺陷。

3 讨论

通常细胞分裂素类植物生长调节物质 (6-BA、KT、Zeatin、2ip) 具有促进植物腋芽的发生和生长的作用。植物生长调节剂的种类和浓度对植物的作用不同, 如 2ip、Zeatin 能够促进丁香 (*Syringa vulgaris*) 的茎节伸长和次级腋芽的发生, 而缩短增殖周期^[8], 在毛叶杜鹃 (*Rhodendron* spp.) 和西洋杜鹃 (*R. hybridum*) 的增殖培养中添加 Zeatin 具有非常理想

表5 花烛无菌苗液体培养腋芽增殖的品种间差异比较

Table 5 Effects of different cultivars on the proliferation of auxiliary buds of *Anthurium andraeanum* in liquid culture

品种 Cultivar	鲜重 (g) Fresh weight	平均腋芽诱导数 Mean number of buds induced	腋芽平均长度 Mean length of buds (cm)	愈伤组织形成率 Callus frequency (%)
<i>Sonate</i>	1.98b	11.1a	1.37a	0.17b
<i>Valentino</i>	2.45a	11.1a	1.33a	0.5a
<i>Julanba</i>	1.43c	8.2b	0.79b	0.18b

的效果等^[9]。但 6-BA 能促进多数植物的增殖,在本研究中,我们也发现 6-BA 具有较强的促进花烛腋芽萌发的作用,但 6-BA 浓度超过 1.0 mg L^{-1} 时易诱导花烛无菌苗的愈伤组织大量发生。而采用 0.5 mg L^{-1} 6-BA 和 1.0 mg L^{-1} KT 配合使用能够显著提高腋芽发生的数量,又不会形成大量愈伤组织。2ip 能够促进花烛茎节的伸长,但 2ip 对腋芽的诱导发生效果不佳。

除了常用的植物生长调节剂之外,苯基脲类化合物(如 CPPU、DPU、TDZ 等)^[10]也具有促进植物腋芽发生的功能。如 $0.002\text{--}0.05 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ 可诱导椴树(*Tilia tuan*)、花楸(*Sorbus pohuushanensis*)、洋槐(*Robinia pseudoacacia*)等植物形成大量的芽,而 6-BA 的浓度以 $0.2\text{--}1.0 \text{ mg L}^{-1}$ 较适宜^[10]。但 Meyer 等^[11]和 Preece 等^[12]报道通过 TDZ 诱导出的腋芽不能产生具有正常功能的根系,也不能正常伸长;而将 TDZ 诱导出的不定芽转接至仅含有 6-BA 和 NAA 的培养基中能够避免这种缺陷^[12-13]。本研究在花烛液体培养中采用 $0.04\text{--}0.12 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ 未能有效促进其腋芽的发生,且导致腋芽叶片黄化、脆弱,芽体畸形,采用低浓度 TDZ 与 KT 结合使用,仍然导致腋芽叶片黄化,芽体畸形。因此认为 TDZ 不适宜在花烛腋芽液体增殖培养中使用。

此外,花烛进行固体培养与液体培养的实验,固体培养的成本较高,且凝固剂限制了营养物质的移动,导致培养物生长缓慢。Perick^[14]最先报道使用液体振荡培养能促进花烛愈伤组织的生长,Leffring^[15]报道采用液体培养能进行腋芽增殖,Teng^[16]比较了液体振荡培养、介层培养(raft culture)和固体培养 3 种方式对花烛愈伤组织发生和不定芽性状的影响,结果表明一定时间的液体培养能够促进花烛的生长,或改善不定芽发生的性状。振荡培养可以解决液体培养中培养基的溶解氧含量不足的问题^[17],但液体培养也存在试管苗易出现玻璃化现象等不足,对培养物的后期生长可能存在不利影响,因此只在特定阶段采用液体培养比较适宜。在本试验中,与固体培养相比,增殖培养阶段进行液体振荡培养,腋芽诱导数量、腋芽平均长度均有显著提高,愈伤组织形成率下降。此外,花烛腋芽发生能力在不同基因型之间也存在显著差异,但本试验所用 3 个表现型差异较大的供试品种每株无菌苗均能在该增殖培养体系下发生 8.0 个以上的

腋芽,说明该腋芽增殖条件可适用于大多数花烛品种的无菌系快繁。

参考文献

- [1] Laws N, Galinsky B. *Anthurium* world market survey [J]. Floracult Inter, 1996, (6):21.
- [2] 向其柏, 向民, 刘玉莲. 室内观叶植物 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990:149-150.
- [3] Pierik R L M, Steegmans H H M, van der Meys J A J. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. [J]. Sci Hort, 1974, 2:193-198.
- [4] Geier T. *Anthurium* [M]// Ammirato P V, Evans D R, Sharp W R, et al. Handbook of Plant Cell Culture Vol. 5 Ornamental Species. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 1990:227-252.
- [5] Lan Q Y(兰芹英), Li Q R(李启任), He H Y(何惠英), et al. The callus induction and bud differentiation of *Anthurium andraeanum* Linden [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2003, 30(1):107-109.(in Chinese)
- [6] Geier T. Ploidy variation in callus and regeneration plants of *Anthurium scherzerianum* Schott [J]. Acta Hort, 1988, 226:293-296.
- [7] Zhao Y P(赵云鹏), Guo W M(郭维明), Wang G D(王广东), et al. Aseptic plantlet hardening of *Anthurium andraeanum* in vitro culture [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2004, 40(1):48-50.(in Chinese)
- [8] Pierik R L M. *In vitro* Culture of Higher Plants [M]. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987:196.
- [9] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1991:201-217.
- [10] 黄学林, 李菡菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控 [M]. 北京: 科学出版社, 1995:81-86.
- [11] Meyer H J, van Staden J. *In vitro* multiplication of *Ixia flexuosa* [J]. Hort Sci, 1988, 25(6):1070-1071.
- [12] Preece J E, Imel M R. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* P. J. M. hybrids [J]. Sci Hort, 1991, 48:159-170.
- [13] Nayak N R, Rath S P, Patnaik S. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation [J]. Sci Hort, 1997, 71:243-250.
- [14] Pierik R L M. Callus multiplication of *Anthurium andraeanum* Lind. in liquid media [J]. Neth J Agri Sci, 1975, 23:299-302.
- [15] Leffring I L, Socde A C. Weefselweek *Anthurium andraeanum* onderzoek teboven [J]. Vakblad Bloemisterij, 1979, 15:40-41.
- [16] Teng W L. Regeneration of *Anthurium andraeanum* Lind. in liquid or raft culture [J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 1997, 49(2):153-156.
- [17] Etienne H, Berthouly M. Temporary immersion system in plant micropropagation [J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 2002, 69:215-231.

表 1 *Viola lucens* 与 *Viola pulla* 的区别^[2]
Table 1 Difference between *Viola lucens* and *Viola pulla*^[2]

	<i>Viola lucens</i>	<i>Viola pulla</i>
植株体 Plant	矮小, 无地上茎, 被白色长柔毛, 柔弱, 高 5-7 cm, 具匍匐茎	具不显著暗色, 无地上茎, 矮小, 具匍匐茎
根 Root	直立, 短节, 厚 1-2 mm, 具小根, 匍匐茎具柔毛	直立, 具关节, 延伸, 具小根
托叶 Stipule	暗棕色, 披针形, 长流苏	宽, 卵状披针形, 暗棕色, 具密流苏, 流苏长度不超过托叶宽度
叶片 Leaf	具长叶柄, 具白色短柔毛, 基部深狭心形, 或卵圆形, 具不显著锯齿, 略尖至钝	暗绿色, 具圆锯齿, 略尖, 基部不显著心形, 具糙伏毛, 叶柄短
叶柄 Stipe	长毛	硬毛
花 Flower	花超出叶片; 花梗具柔毛, 小苞片位于中部以上, 对生, 狭; 花萼狭披针形, 具毛, 有时近无毛, 附属物短; 上方及侧方花瓣狭长圆形, 长 10-11 mm, 基部具柔毛, 下方花瓣船状, 连距长 9 mm, 距长 1-1.5 mm	花与叶等高; 花梗具长柔毛, 中部以上具两枚苞片, 长 8-9 mm, 对生; 花萼披针形, 被毛, 长 5-6 mm, 附属物短; 花瓣长 6 mm 以上, 长圆形, 侧方花瓣具须毛, 下方花瓣具短距
子房 Ovary	球状	圆锥状
花柱 Style	基部膝曲, 顶端平坦, 略具喙	基部略膝曲, 顶端平截, 具短喙

它们的主要区别存在于叶片和托叶的形态上。通过对我国各地多种堇菜属植物居群学的研究, 叶柄长度和托叶形状并非稳定的性状, 同一种中会出现叶柄长短的变化和托叶宽窄的变化, 同时叶片基部心形的深浅也不能将两个种明显分开; 在毛被上, 通过仔细观察模式标本, 发现毛被在两种中有稀疏和密集的变化, 柔毛和糙毛的标准并不可靠。在贵州省贵定县云雾镇的野外调查中, 通过对一个居群植株体观察后也发现叶柄长短与植株生长的立地条件有很大关系, 生长在石壁上的植株叶柄较短, 而生长于石壁边土壤中的植株叶柄较长, 叶片基部的形态变异亦较大。因此通过对原始文献、模式标本及野外调查进行的比较研究, 认为将 *V. pulla* 处理为 *V. lucens* 的异名较为合适。

贵州(Guizhou): 贵定县 (Guiding Xian), 周劲松 348 (IBSC).

致谢 感谢英国皇家植物园邱园标本馆(K)、中国科学院武汉植物园标本馆(HIB)及中国科学院华南植物园标本馆(IBSC)在查阅标本上提供方便, 以及贵州省贵定县云雾镇林业站杨光明、唐黔辉及王发平等在野外考察工作中的大力支持!

参考文献

- [1] Becker W. *Violae Asiaticae et Australenses* [J]. *Beih Bot Centralbl*, 1916, 34(2):232.
- [2] Becker W. New Chinese species of *Viola* [J]. *Kew Bull*, 1928, 6: 250.
- [3] Wang Q R(王庆瑞). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 51* [M]. Beijing: Science Press, 1991:51.(in Chinese)
- [4] Xing F W(邢福武), Qin X S(秦新生). A supplement to the *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (Vol. 51 *Violaceae*) [J]. *J South China Agri Univ*(华南农业大学学报), 2004, 25(1):120-121.(in Chinese)