

文章编号: 1002-2724(2018)06-0017-04

朱顶红愈伤组织诱导及增殖发育体系的建立及优化

张 慧, 罗珍珍, 解晓旭, 孙印兵, 于文胜*

(烟台市园林管理处, 山东 烟台 264000)

摘要:以朱顶红带有小鳞茎的试管苗作为外植体,进行愈伤组织的诱导、增殖及不定芽分化研究,结果表明:诱导愈伤组织形成的最佳培养基为MS+2,4-D 2.0mg/L+6-BA1.0mg/L+KT2.0mg/L。愈伤组织增殖需要的最佳2,4-D 2.0mg/L浓度为1.0mg/L,促进不定芽分化及植株再生的6-BA浓度为0.5mg/L。

关键词:朱顶红;愈伤组织诱导;增殖;分化;植株再生

中图分类号:S722.3+7 文献标识码:A

System Establishment and Optimization for Callus Induction and Proliferation and Development of *Hippeastrum hybridum*

ZHANG Hui, LUO Zhenzhen, XIE Xiaoxu, SUN Yinbing, YU Wensheng*

(Yantai Landscape Scientific Institute, Yantai Shandong 264005)

Abstract:The in vitro bulblets of *Hippeastrum hybridum* were used as explants, to study the induction and proliferation of callus, and the differentiation of the adventitious buds. The results showed that: the optimal medium for inducing callus formation was 1/2MS+2,4-D 2.0mg/L+6-BA 1.0mg/L+KT 2.0mg/L. The optimal concentration of 2,4-D for callus proliferation was 1.0mg/L, and the concentration of 6-BA for promoting adventitious buds differentiation and plantlets regeneration was 0.5 mg/L.

Keywords: *Hippeastrum hybridum*; induction of callus; proliferation; differentiation; plantlets regeneration

朱顶红(*Hippeastrum hybridum*),石蒜科多年生球根花卉,又名君子红、孤挺花、朱顶兰等。朱顶红原产美洲热带地区,性喜温暖湿润、阳光不过于强烈的环境,稍耐寒;生长期需给予充分的水肥,夏季宜凉爽,冬季休眠期要求冷凉干燥;要求富含腐殖质、疏松肥沃而排水良好的砂质壤土^[1-3]。朱顶红花大色艳,叶型优美,色泽鲜绿,一般用于盆栽观赏,也可以用作切花,部分品种还可以应用到园林中是,是一种优良的观赏花卉,具有广阔的市场潜力^[4]。

朱顶红常用的繁殖方法主要有自然分球、扦插和播种等,但是繁殖速度慢,很难满足市场的需求^[5]。采用组织培养技术进行离体快繁,具有繁殖系数高、成苗时间短和便于商品化和产业化生产的优势^[6]。本试验在充分吸取前人研究经验的基础上,以朱顶红的试管小苗为外植体,详细研究了不同激素种类及浓度对愈伤组织诱导的影响,以及不同激素浓度对不定芽分化及植株再生的影响,旨在系统地探索适合朱顶红的组织培养方法并构建高效的离体快

繁体系,缩短生长周期,为朱顶红的产业化生产提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料取自烟台园林科研所温室,采用从国外引进的重瓣大花朱顶红‘仙女’(‘fairy’)品种,采其未绽放的花蕊,主要挑选花托、花梗部位作为外植体,进行初代愈伤组织诱导及增殖及不定芽分化研究。经过前期的离体培养,在实验室已成功获取一定数量生出小鳞茎的试管苗。在此研究的基础上,采用无菌试管小苗为外植体进一步优化其愈伤组织诱导及增殖分化体系。

1.2 试验方法

本试验以MS为基本培养基,添加琼脂粉5.8g/L,蔗糖30g/L,肌醇、酪蛋白各100mg/L,pH值为5.8,121℃/20min高压灭菌。培养室培养温度为25±1℃,相对湿度一般保持在70%~75%。

收稿日期:2018-10-23

基金项目:烟台市科技发展计划项目(2015GNC113)

作者简介:张慧(1985-),女,工程师,组织培养及园林植物栽培管理。邮箱:326012964@qq.com

*通讯作者:于文胜(1963-),男,工程应用研究员,园林绿化和花卉栽培相关工作。邮箱:1963ysq@sina.com

1.2.1 外植体的处理及初培养愈伤组织诱导

选取生长健壮,无病虫害的母株,采集未开放的花蕾,注意多留存部分幼嫩花梗,剪去上半部分的苞片,将花梗连同花序部分分离出来,放入烧杯中,杯口罩纱布,先在流水下冲洗1h,然后在超净工作台上,把材料放入10%的NaClO溶液中消毒7min,用无菌水冲洗3次,再用0.1%HgCl₂处理5min,然后用无菌水冲洗3次。用经过灭菌的接种刀将花蕾剥开,连带花托进行横向切割,将花序分开,切割成长0.5~1cm,厚度大约2~3mm的薄片,将其接入预实验的初代诱导培养基。大概经过1年左右的培养及筛选,获取到直径1cm左右的小鳞茎,本实验以带有小鳞茎的无菌试管苗为外植体,将小鳞茎上端的叶片切下,然后对小鳞茎进行纵向切割,切成1mm左右薄片,接入表1所列的培养基,以1/2MS为基本培养基,每个处理接种12瓶,每瓶4块,设3次重复。暗培养30d后,统计胚性愈伤组织诱导率及出芽率。

表1 愈伤组织诱导培养基的正交设计

诱导培养基	激素浓度/mg/mL		
	2,4-D	6-BA	KT
Y1	1.0	0.5	0.5
Y2	1.0	1.0	1.0
Y3	1.0	2.0	2.0
Y4	2.0	0.5	1.0
Y5	2.0	1.0	2.0
Y6	2.0	2.0	0.5
Y7	4.0	0.5	2.0
Y8	4.0	1.0	0.5
Y9	4.0	2.0	1.0

1.2.2 愈伤组织的增殖培养

将初代培养得到的愈伤组织,挑选白色半透明部分,分割为直径8~10mm的小块,分别设置2,4-D浓度为0.5、1.0、2.0、4.0mg/L,KT浓度0.5mg/L,6-BA浓度1.0mg/L,每瓶接种6块,遮光暗培养30d,统计增殖倍数及出芽率。

增殖倍数=新增愈伤组织的质量/接种时愈伤组织的质量

出芽率=出芽的外植体数/接种外植体数

1.2.3 不定芽的分化及植株再生

将培养得到的愈伤组织,分割为直径1cm左右的小块,接种在以下培养基上:以1/2MS为基本培养基,加入6-BA,浓度分别设置为0(ck),0.5,1.0,2.0mg/L,每瓶接种4块,光照培养50天,采用的光照强度为2000~3000Lx,光照周期为每天16h。统计出芽率,将出芽的部分纵向分割成直径1.5cm左右小块,再次接种在同样的培养基上,30天后,长成丛状小植株,统计大于1cm的芽数。

1.2.4 再生植株生根

选取高度均匀、生长良好约2cm左右的植株,分割为单株,以1/2MS为基本培养基,进行生根培养。

试验所得数据采用数据分析软件SPSS进行单因素或两因素方差分析,并采用LSD、Duncan新复极差法等检测各处理组间试验结果的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对愈伤组织诱导的影响

本实验中,采用LSD法进行多重比较,发现2,4-D的浓度变化对于胚性愈伤组织的诱导呈现显著性差异,6-BA与KT的浓度对于诱导效果的影响不显著。由表2可见,在Y5培养基中,愈伤组织的诱导率最高为60.42%,在Y1培养基中出芽率最高,为39.58%,从表中还可以看出,试验设置浓度区间内对于愈伤组织的诱导率都高于出芽率,说明2,4-D在1.0~4.0mg/L浓度区间对愈伤组织的诱导作用强于对芽的诱导,所以合理控制好对于诱导发生显著作用的激素,用量至关重要。

由表3可见,2,4-D浓度为2.0mg/L时,愈伤组织的平均诱导率最高为36.1%,而出芽率随2,4-D浓度升高呈现出下降的趋势,综合来看,Y5培养基中,愈伤组织的诱导率高,而丛芽的诱导效果处于中等,符合试验意图,所以,诱导愈伤组织形成的最佳培养基为:1/2MS+2,4-D 2.0mg/L+6-BA1.0mg/L+KT2.0mg/L。

2.2 不同2,4-D浓度对愈伤组织增殖的影响

由表4可见,2,4-D浓度在1.0mg/L时,愈伤组织的增殖倍数最大,与其他浓度存在显著性差异,而在4.0mg/L时,增殖倍数最低,可以看出2,4-D浓度在超过1.0mg/L后,增殖倍数随着浓度的升高而降低。体胚发生率在2,4-D浓度为2.0mg/L时最大,与其他浓度存在显著性差异。愈伤组织增殖的最佳

表 2 初代愈伤组织的诱导

诱导培养基	2,4-D 浓度/mg/L	6-BA 浓度/mg/L	KT 浓度/mg/L	愈伤组织形成率/%	芽形成率/%
Y1	1.0	0.5	0.5	33.33±19.46	32.58±16.71
Y2	1.0	1.0	1.0	35.42±12.87	35.42±24.91
Y3	1.0	2.0	2.0	31.25±11.31	10.41±22.19
Y4	2.0	0.5	1.0	22.92±7.22	8.33±16.28
Y5	2.0	1.0	2.0	60.42±24.91	20.83±17.94
Y6	2.0	2.0	0.5	24.98±12.87	12.50±16.85
Y7	4.0	0.5	2.0	14.58±12.87	6.25±11.31
Y8	4.0	1.0	0.5	12.50±13.06	0.00±0.00
Y9	4.0	2.0	1.0	18.74±12.31	16.67±19.46

表 3 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响

2,4-D 浓度/mg/L	愈伤组织形成率	芽形成率
1.0	33.33±16.40a	28.47±25.20a
2.0	36.1±15.75b	18.89±17.37b
4.0	15.90±15.67b	7.64±14.42b

状态是不断增殖出新的愈伤组织,所以胚状体形成是此项试验的负指标,所以,促进愈伤组织增殖的最佳浓度是 1.0mg/L。

表 4 2,4-D 浓度对愈伤组织增殖的影响

2,4-D 浓度/mg/L	增殖倍数	出芽率/%
0.5	3.67±1.74bc	20.57±17.24c
1.0	6.50±2.96a	33.30±19.07b
2.0	4.28±0.94b	48.80±24.58a
4.0	2.89±1.22c	15.70±10.59c

2.3 不同 6-BA 浓度对愈伤分化及出芽的影响

愈伤组织接入分化培养基开始分化出芽,由表 5 可见,出芽率在不添加 6-BA 时(ck 组)最低,6-BA 浓度为 0.5mg/L 时最高,为 93.75%,存在显著性差异,之后出芽率随 6-BA 浓度升高而降低,呈负相关,可以看出 6-BA 浓度超过一定范围后对于出芽会产生抑制作用,所以此阶段添加 0.5mg/L 6-BA 可以较好的促进芽的分化。

6-BA 浓度对于大于 1cm 的芽数的影响存在显著性差异,同样是在 0.5mg/L 时,大于 1cm 的芽数最多,平均为 7.83 株,芽的高度及整体生长状态最好,在 6-BA 浓度为 2.0mg/L 时最低。综上可知,6-BA 浓度为 0.5mg/L 时最利于愈伤组织分化出芽。

表 5 6-BA 浓度对体细胞胚发育的影响

培养基	6-BA 浓度/mg/L	出芽率/%	大于 1cm 的芽数
Z1	0.0(ck)	64.58±15.73c	5.08±1.62b
Z2	0.5	93.75±6.25a	7.83±1.19a
Z3	1.0	72.92±9.55b	4.42±0.79b
Z4	2.0	77.08±13.01b	2.75±1.14c

2.4 植株的生根及移栽

单株苗转接到无植物生长调节剂的 1/2MS 培养基上,接种 25d 左右可获得完整生根小植株,并进一步转入温室炼苗栽培环节,进行下一步研究。

3 结论与讨论

本实验以朱顶红带有小鳞茎的试管苗作为外植体,进行愈伤组织的诱导及增殖分化研究,结果表明:诱导愈伤组织形成的最佳培养基为:MS+2,4-D 2.0mg/L+6-BA 1.0mg/L+KT 2.0mg/L,愈伤组织的诱导率可达到为 60.42%;愈伤组织增殖需要的最佳 2,4-D 2.0mg/L 浓度为 1.0mg/L,增殖倍数为 6.5 倍,促进不定芽分化及植株再生的 6-BA 浓度为 0.5mg/L,此浓度下出芽率可达到为 93.75%,大于 1cm 的芽数平均为 7.83 株。

对于朱顶红的离体快繁,近年来有很多研究,所采用的外植体包括很多部位,多数选用鳞茎^[7-10],也

有用叶片基部、花萼、花梗、内侧鳞片和子房等部位^[11],本研究最初采用幼嫩花苞作为初培养材料,以离体快繁产生的小鳞茎作为外植体进行后续试验,这样大大减少了污染率,提高了试验材料的整齐度,也缩短了成苗时间,加快了生产周期,是近几年的新尝试^[12]。另外,对于组培各个阶段应用的植物生长调节剂,大部分研究采用 6-BA 和 NAA 的组合进行愈伤组织和不定芽的诱导^[13-16],本研究采用 6-BA、2,4-D 和 KT 的组合也产生了理想的诱导效果。不同研究因意图不同采用了不同的激素种类、浓度,也采用了不同的发生方式,本研究主要针对产业化生产,选取常用的激素种类及快速的发生途径,期待建立更加高效稳定的离体快繁体系,为产业化生产提供指导。

参考文献:

[1]沈苗苗,于晓南.朱顶红组织培养研究进展[J].黑龙江农业科学,2011,(10):135-138.
 [2]王宇,江黎.朱顶红花梗与子房组织培养技术研究[J].上海农业科技,2017,(02):79-81.
 [3]李静.朱顶红球茎组织培养扩繁的影响因素研究[D].内蒙古大学,2016.
 [4]希吉日,田欣,金牧兰,何炎红,田有亮.基于朱顶红愈伤组织途径诱导形成原球茎的研究[J].安徽农业科学,2015,43(13):51-54.
 [5]施艳萍.不同品种朱顶红在宁夏地区日光温室中的引

种试验研究[D].西北农林科技大学,2015.
 [6]张威.大花朱顶红‘Red lion’不同外植体离体再生体系的建立[D].沈阳农业大学,2013.
 [7]高年春,杨怡,曹荣祥.几个杂交朱顶红品种不定芽诱导试验[J].江苏农业科学,2003,(6):80-82.
 [8]刘群龙,段国锋,周兰.朱顶红鳞茎诱导及植株再生体系的建立[J].西北植物学报,2007,27(12):2551-2554.
 [9]张亚玲.朱顶红组织培养最佳繁殖途径的研究[A].中国园艺学会.中国园艺学会第七届青年学术讨论会论文集[C].中国园艺学会:,2006:9.
 [10]姜晓鸣,周玉珍,孔贤,等.杂交朱顶红鳞茎不定芽诱导研究[J].安徽农业科学,2009,37(34):16769-16770.
 [11]Janete.A.Seabrook and Bruceg.Cumming. The in vitro propagation of Amaryllis (Hippeastrum spp.Hybrids) [J]. In Vitro, 1977,13(12):831-836.
 [12]龚雪琴,由翠荣,曲复宁,陈礼学,于文胜,解晓旭.朱顶红体细胞胚胎发生及植株再生研究 [J]. 园艺学报,2012,39(02):381-386.
 [13]张亚玲,张延龙,原雅玲.6BA 和 NAA 对朱顶红组织培养的影响[J].陕西林业科技,2006,(1):7-9.
 [14]王培军.朱顶红组织培养技术体系的建立及其相关研究[D].山西农业大学,2004.
 [15]邵素娟,史益敏.朱顶红小鳞茎切割繁殖及其影响因素[J].上海交通大学学报(农业科学版),2008,(01):5-8.
 [16]邵素娟.朱顶红快繁技术研究[D].上海交通大学,2008.

(上接第 16 页)林绿化中的应用[J].现代农业科技,2011,(3):213.
 [2]任瑞雪.扶芳藤的特征特性及其在园林绿化中的应用[J].现代农业科技,2011,(12):242-243.
 [3]何卓彦,戴耀良,庄雪影.7种园林地被植物耐盐性研究[J].广东园林,2011,(6):67-73.
 [4]张鹏骞,钟震宇,王丽斌,等.不同浓度 NaCl 处理对扶芳藤幼苗生理效应的影响[J].山西农业大学学报(自然科学版),2012,(3).
 [5]李建忠.不同浓度 MgCl₂ 处理下扶芳藤幼苗光合作用变化规律研究[J].山西林业科技,2015,(2):26-27.
 [6]马洪英,郭锐,李洪安,等.不同盐胁迫处理下番茄种子萌发期的耐盐性研究 [J]. 安徽农业科学,2008,(32):13947-13948.
 [7]白宝璋,王景安.植物生理学测试技术[M].北京:中国科学技术出版社,1993:43-48.

[8]李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,1999,(16):18-22.
 [9]候福林.植物生理学实验教程[M].北京:科学出版社,2004:91.
 [10]温刘君,朴顺姬,易津.4种小麦族牧草种子耐盐补偿生长特性研究[J].中国草地学报,2009,(6):30-32.
 [11]李妍.盐胁迫对番茄幼苗生长及保护酶活性的影响[J].北方园艺,2008,(6):18-20.
 [12]吕金海,刘鹏.盐胁迫对鱼腥草几种膜保护酶活性的影响[J].怀化学院学报,2017,(5):1-4.
 [13]汪月霞,孙国荣,王建波,等. NaCl 胁迫下星星草幼苗 MDA 含量与膜透性及叶绿素荧光参数之间的关系[J].生态学报,2006,(1):122-129.
 [14]徐俊芝,朱磊,李严曼,等.盐胁迫对芥菜幼苗生理生化特性的影响[J].河南科学,2015,(3):389-393.