

朱顶红小鳞茎切割繁殖及其影响因素

邵素娟, 史益敏

(上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 利用双鳞片法获得朱顶红组培苗, 利用其小鳞茎为材料, 经切割诱导出芽产生新植株, 以探讨朱顶红种苗工厂化生产技术。结果表明, 用 1/2MS 培养基添加 6-BA、NAA 可诱导出芽; 培养基糖浓度为 $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 为 6.6 时诱导率最高; 小鳞茎四分切的繁殖系数高于二分切; 切割代数不影响再切割成苗诱导率; 添加磷酸二氢钾和三碘苯甲酸能提高小鳞茎重量。研究可为朱顶红种苗工厂化生产提供技术支持。

关键词: 朱顶红; 组织培养; 小鳞茎切割

中图分类号: S682.25

文献标识码: A

In Vitro Micro-propagation from *Hippeastrum*'s Little Aseptic Bulb and Its Effecting Factors

SHAO Su-juan, SHI Yi-min

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: The little bulbs of aseptic shoots, induced from the *Hippeastrum* bulb's twin scales *in vitro*, were re-cut to induce more offspring, and thus study how to improve the techniques of seedling industrial production. It is found that shoots can be induced in 1/2MS medium supplemented with 6-BA, NAA, and were best induced in the medium with $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sugar when pH reached 6.6. Cut the little bulbs into 4 sections can induce more shoots than 2 sections. The induce rate didn't decline even the little bulbs were cut many times. Add KH_2PO_4 and TIBA to the medium would increase the weight of induced bulbs obviously. This study provides techniques for the *Hippeastrum* seedling industrial production.

Key words: *Hippeastrum*; tissue culture; aseptic bulb re-cut

朱顶红是石蒜科朱顶红属球根花卉, 原产于中南美洲, 其杂交种在热带亚热带地区广泛种植。朱顶红花枝亭亭玉立, 4~6 朵喇叭形花朵着生于顶端, 给人华贵之感, 叶片狭长如君子兰, 即使在无花期也有很高的观赏价值。朱顶红一般通过分球繁殖, 但繁殖效率很低, 无法满足生产与市场的需要。所以, 研究朱顶红的组培繁殖技术有很好的现实意义。

1990 年, Chih Wei Huang 等的研究表明, 在 MS 培养基上, 用朱顶红鳞茎单鳞片培养能形成拟球体, 然后发育为幼苗, 而双鳞片则可直接诱导出小鳞茎^[1]; 储成才也证明朱顶红双鳞片是良好的外植体材料^[2], 还指出选择 BA 和 NAA 能更好地诱导鳞茎的生成, 组培的季节也影响着小鳞茎的诱导率。外植体一般选择朱顶红的大鳞茎(如张松等^[3-5]); 也有选择花梗、子

房^[6]以及幼嫩的蒴果^[4]等作为外植体的, Saker-M 等还提出了可以用茎尖培养, 并且效果要好于鳞片^[7]。以上这些研究包括了外植体的选择和消毒、各类培养基的筛选、无菌苗的移栽等内容。

目前尚有一些因素阻碍朱顶红种苗通过组培技术工厂化生产, 主要是外植体材料的选择, 如果选择朱顶红大球, 则受季节限制而且生产成本低, 而选择花萼、子房等, 则不但受季节限制, 诱导率也偏低。本文探讨用朱顶红组培苗无菌小鳞茎为材料, 进行大量、持续生产朱顶红种苗的技术。

1 材料与方

1.1 材料

收稿日期: 2007-11-08

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2005No.1-1-4)

作者简介: 邵素娟(1982-), 女, 江苏常州人, 研究方向: 园林花卉; 史益敏为本文通讯作者, E-mail: shiyimin@sjtu.edu.cn.

用朱顶红 (*Hippeastrum*) 橙色君主品种(Orange sovereign)的大鳞茎,通过双鳞片法获得无菌幼苗,然后以幼苗小鳞茎为材料再切割获得新一代的幼苗。

1.2 无菌苗的获得

朱顶红双鳞片法获得无菌苗小鳞茎参照高年春等人的方法^[9]。将种球用洗衣粉先清洗干净,切除种球的上半部分 1/3,在鳞茎盘处切取相连的鳞片和基盘,切分成内中外 3 层、3~4 cm 长的小块,放到恒温水浴锅中热处理。实验采用 4 因素 3 水平正交实验,采用 $L_9(3^4)$ 各实验因子见表 1。

表 1 朱顶红双鳞片法诱导无菌苗的影响因素及其水平

Table 1 *Hippeastrum*'s bulb sterilization factors and their levels

因素 Factors	水平 Levels		
	1	2	3
a 外植体 Explants	外层 Outer scales	中层 Middle scales	内层 Inner scales
b 温水温度 The sterilize water temperature / $^{\circ}\text{C}$	45	55	65
c 温水浸泡时间 Time the explants dipped in the water /min	35	45	55
d 饱和漂白粉溶液消毒时间 Time the explants dipped in the saturated solution of bleaching powder /min	12	15	18

在超净台上把朱顶红双鳞片接种到 1/2MS+BA 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上。在温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,每天光照 16 h 条件下培养,1 个月后统计污染率和芽诱导率。

1.3 小鳞茎切割诱导培养基的筛选

以双鳞片法获得的朱顶红小鳞茎为材料,每个小鳞茎纵切成 2 到 4 块,用 1/2MS 培养基,添加 AC(活性炭) 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,实验采用 4 因素 5 水平正交试验,正交表 $L_{25}(5^4)$,共 25 个处理,见表 2。结果用 SAS 软件进行数据统计分析。

表 2 朱顶红组培小鳞茎诱导培养基中的各因素及其水平

Table 2 Factors in *Hippeastrum*'s vitro bulb inducement medium and their levels

因素 Factors	水平 Levels				
	1	2	3	4	5
a pH value	5.4	5.8	6.2	6.6	7
b 6-BA /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	1	2	4	8
c NAA /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	0.1	0.5	1	2
d Sugar /($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	15	30	45	60	75

1.4 小鳞茎二分切与四分切的比较

把小鳞茎二分切和四分切,各用 25 个小鳞茎,每个鳞茎的切片接种在同一个培养瓶中。培养基为 1/2MS+BA 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,糖 45 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 6.6,AC 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。1 个月后比较 2 种切割方式的繁殖系数。

1.5 小鳞茎增重培养基的筛选

本次试验通过增加基本培养基 (1/2MS+BA 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 中 P、K 元素的浓度以及 TIBA (三碘苯甲酸)来控制幼苗叶片的生长,使得小鳞茎能够更快的形成和生长。本次正交实验采用了 $L_9(3^4)$ 正交实验表。

表 3 朱顶红组培小鳞茎增重培养基中各因素及其水平
Table 3 Factors in *Hippeastrum*'s vitro bulb weight-gain-medium and their levels

因素 Factors	水平 Levels		
	1	2	3
a Sugar /($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	30	45	60
b KH_2PO_4 /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	40	80
c TIBA /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	0.5	1
d BA:NAA	2:0	2:1	4:1

1.6 试管苗的分级与移栽

将无菌小苗按照重量分成 3 级,1 级苗重量在 0.5 g 以上,2 级苗重量在 0.25 g 到 0.5 g 之间,而 3 级苗重量在 0.1 g 到 0.25 g 之间。朱顶红试管苗移植到花盆中,基质中园田土、蛭石以及有机肥的比例为 6:3:1。先在室内或者阴凉处缓苗 1 周以上,再移到露地,1 个月后统计幼苗的成活率及苗高。

2 结果与分析

朱顶红大球切割成双鳞片,消毒后接种,培养 1 个月后得到朱顶红双鳞片的污染率和芽诱导率,结果分别见图 1、2。

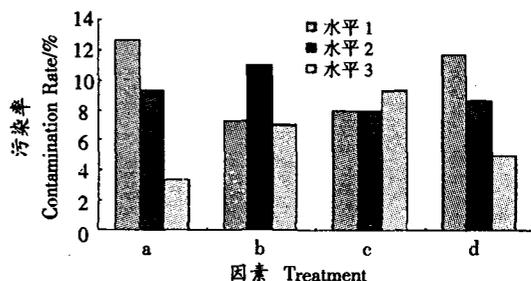


图 1 不同消毒条件对污染率的影响

Fig.1 Effects of sterilize conditions on contamination rate

图 1 及 SAS 分析的结果显示,外植体来源对污染率有显著影响,内层的污染率显著低于外层和中层;饱和漂白粉溶液浸泡时间对污染率的影响也达到了显著的水平,消毒 18 min 的污染率显著低于 12 min。温水处理所使用的温度 (45~65 $^{\circ}\text{C}$) 和时间 (35~55 min)对污染率没有显著的影响。

图 2 及 SAS 分析的结果表明,外植体对芽诱导率有显著影响,中层的诱导率显著高于内层和外层,而外层的诱导率又高于内层;温水浸泡所使用的温度对芽诱导率影响显著,而且在实验范围内,温度越低,诱导率越高,当温度达到 65 $^{\circ}\text{C}$ 时,所有的外植体都被

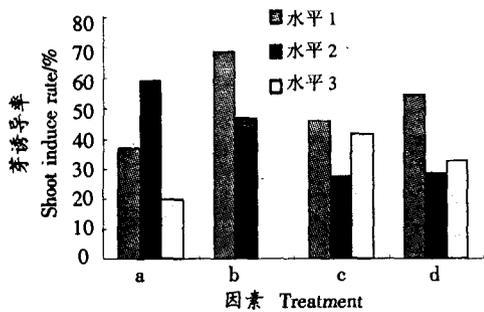


图 2 不同消毒条件对芽诱导率的影响

Fig.2 Effects of sterilize conditions on shoot induce rate

杀死;温水浸泡时间也达到了显著的水平,但是它远远没有其它 3 个因素差异显著;饱和漂白粉溶液浸泡时间对芽诱导率的影响也达到了显著水平,消毒 12 min 的诱导率显著高于 15 min 和 18 min 的处理。

综合以上结果,最佳的消毒条件为用 45 °C 温水浸泡 35 min 后用饱和漂白粉溶液浸泡 12 min,此时的芽诱导率最高。

2.2 小鳞茎切割诱导培养基的筛选

以朱顶红组培苗小鳞茎为材料,对小鳞茎切割后诱导培养,筛选培养基中各因素对切割的小鳞茎诱导芽的影响,得到实验结果见表 4。

表 4 朱顶红小鳞茎诱导培养基中各因素对芽诱导率的影响

Table 4 Effects of factors in *Hippeastrum's vitro* bulb inducement medium on re-cut shoot induce rate

因素 Factors	水平 Levels				
	1	2	3	4	5
a pH	59.17	67.29	64.98	84.99	83.75
b BA	76.17	70.63	69.389	66.29	77.2
c NAA	71.49	74.54	65.42	75.13	73.61
d Sugar	78.75	76.44	81.25	73.48	50.25

SAS 分析表明,糖浓度对再切割诱导的影响最大,其次是 pH 值,而激素的影响很小,没有达到显著的水平。糖浓度为 75 g·L⁻¹ 时,诱导率显著低于其他 4 个水平,而浓度为 45 g·L⁻¹ 时诱导率最高。pH 值为 6.6 时诱导率最高,达到 84.988%,但是当 pH 值进一步增加时诱导率有所下降。pH 值为 5.4 时诱导率最低。

朱顶红小鳞茎切块接种后,有 3 种成苗方式:一种是在 1 周之内叶片就能迅速生长,最先长出来的叶片一般弯曲如镰刀状,之后长出的叶子能恢复直立,1 个月左右即可成大苗。另一种成苗方式与母球双鳞片诱导相似,先从 2 片鳞片中间分化出芽,继而生长成苗。这种情况下,一般要 2 周才能见到明显的小芽,成苗较慢。

2.3 二分切与四分切的比较

结果表明,小鳞茎接种两个半月后,小鳞茎四分切的繁殖系数为 4.64,二分切为 2.52,四分切的繁殖系数

比二分切提高了约 1.8 倍。不用八分切的原因是切割操作起来比较困难,同时,切块太小容易死亡。

2.4 小鳞茎增重培养基的筛选

在朱顶红小鳞茎增重培养基中,P、K 浓度以及 TIBA 能控制幼苗叶片的生长,使小鳞茎更快地形成和生长。培养 1 个月后统计数据如表 5。

表 5 朱顶红小鳞茎增重培养基中各因素对生长的影响

Table 5 Effects of factors in *Hippeastrum's vitro* bulb weight-gain-medium on re-cut induced bulb weight

因素 Factors	水平 Levels		
	1	2	3
a Sugar	0.37	0.43	0.49
b KH ₂ PO ₄	0.29	0.45	0.55
c TIBA	0.41	0.50	0.39
d BA:NAA	0.34	0.44	0.51

结果表明,组培苗小鳞茎再切割诱导形成新的小鳞茎受磷酸二氢钾的影响最大,当增加浓度 80 mg·L⁻¹ 时,小鳞茎的重量由 0.29 g 增加到 0.55 g。进一步实验表明,当磷酸二氢钾浓度分别增加 80、120 和 160 mg·L⁻¹ 时,小鳞茎的重量分别为 0.59、0.44 和 0.43 g。即当磷酸二氢钾的浓度继续增高时,小鳞茎的重量并没有持续升高,反而有所下降。当磷酸二氢钾的浓度在 1/2MS 的基础上增加 80 mg·L⁻¹ 时小鳞茎增重最多。

2.5 试管苗的移栽

将无菌苗分成 3 级后移栽到花盆中,不同重量的小苗长势有显著差异。移栽 1 个月后统计成活率及平均苗高,结果见表 6。

表 6 不同重量朱顶红试管苗移栽成活率

Table 6 Aseptic seeding transplantation survival rate of different weight

苗级 Seeding rank	总数量/株 Total number	成活数/株 Survival number	成活率 Survival rate/%	苗高 Seeding height / cm
1	44	43	97.73	10.36
2	129	110	85.27	8.94
3	106	49	46.23	5.75

小苗的成活率与其重量呈现显著的相关性。重量达到 0.5 g 时,其成活率达到了 97.73%,几乎没有死亡,重量达到 0.25 g 的无菌苗的成活率也很高,达到了 85.27%,但是如果无菌苗的重量只有 0.1 g,则小苗半数以上都将死亡。从苗高可以发现,苗级达到 2 级时,1 个月后的苗高即已经达到 8.94 cm,只比 1 级苗少 1.44 cm,可见 2 级苗的生长速率较快,适合移栽。

3 讨论

用双鳞片法繁殖朱顶红,消毒条件对污染率和诱

导率有显著的影响。不同的外植体(内层、中层及外层),对消毒条件敏感度不同。内层鳞片比较容易被杀死,所以用不同的消毒流程进行分别消毒能取得更好的效果。储成才等^[2]、朱旭东^[4]以及张亚玲^[8]没有对消毒条件作详细研究,但储成才的研究指出,双鳞片诱导除了最内层的鳞片外,诱导率由内向外增加^[2],这与本实验结果是一致的。

本文的研究表明,以朱顶红无菌苗小鳞茎为材料,经过反复切割,能不断得到新一代的无菌苗,而且这种切割再生的能力不会随着切割次数的增加而减弱。对培养中各种因素的研究表明,用 1/2MS 培养时,培养基 pH 值在 6.6 时最有利于小鳞茎诱导出芽,这是前人没有研究过的;糖是培养基中的重要成分,浓度过高则会抑制芽的分化和生长,糖浓度一般都采用 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[3],而本次实验表明,用 $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 更有利于芽的诱导;增加磷酸二氢钾浓度 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及加入 TIBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以加快小鳞茎的生长和发育,Chih Wei Huang 指出,TIBA 能够促进单鳞片组织培养中的芽的诱导^[11],在我们的实验中,TIBA 不仅提高了芽的诱导率,还抑制了地上部分(叶片)生长从而有利于地下部分(鳞茎)的生长。

试管苗可以不经生根直接出瓶,在壤土:腐殖土:河沙为 5:3:1(体积比)基质中,成活率可达 98%^[4]。我们的研究表明,出瓶的无菌苗需要在阴凉的地方先缓苗 1 个月,否则死亡率较高。1 级苗的幼苗成活率高,但获得大苗需要较长的瓶内生长时间。3 级苗的成活率又太低。而 2 级苗的成活率达到 85.27%,并且它的生长速率较快,生长态势良好。所以最佳移苗大小为 2 级苗时期。

使用组培苗小鳞茎作为外植体,有许多优点。在整个生产过程中,只需要使用一次朱顶红大球,这样就大大减少了大球的用量;另外还免除了每次繁殖都

要对大球进行消毒的过程;同时也缩短了成苗时间,加快了生产周期。本研究可为朱顶红工厂化育苗提供技术支持。

参考文献:

- [1] Chih Wei Huang, Hiroshi Okubo and Shunpei Uemoto. Comparison of bullet formation from twin scales and single scales in *Hippeastrum hybridum* cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae*[J]. 1990, 42 (1-2): 151-160.
- [2] 储成才,李大卫,余慧琳.朱顶红组织培养一次成苗[J].植物生理学通讯,1989(3): 47.
- [3] 张松,达克东,曹展兴.朱顶红离体培养快速繁殖体系及胚状体发生[J].园艺学报,2002, 29(3): 285-287.
- [4] 朱旭东,田松青.朱顶红的组织培养[J].江苏农业科学,2002(6): 56-57.
- [5] 高年春,杨怡,曹荣祥,等.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.
- [6] 张克中,赵祥云,贾月慧.杂交朱顶红鳞片扦插繁殖研究[J].北京农学院学报,2001, 16(4): 37-41.
- [7] 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:山西农业大学,2004.
- [8] 张亚玲.朱顶红组织培养最佳繁殖途径的研究[D].陕西:西北农林科技大学,2005.
- [9] E N O'Rourke, W M Fountain and S Sharghi. Propagation of *Hippeastrum* from floral tissues by *in vitro* culture[J]. *Herbertia*, 1991, 47(1): 51-52.
- [10] Saker-M, Rady-M, El-Bahr-M. Towards commercial production of ornamental bulbs *in vitro* [J]. *Egyptian Journal of Horticulture*, 1998, 25(1): 113-128.
- [11] Okubo-H, Huang-ChihWei, Kishimoto-F. Effects of anti-auxins and basal plate on bulblet formation in scale propagation of amaryllis (*Hippeastrum* × *hybridum* Hort.)[J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1999, 68(3): 513-518.