

基于朱顶红愈伤组织途径诱导形成原球茎的研究

希吉日¹, 田欣¹, 金牧兰², 何炎红^{2*}, 田有亮²

(1. 内蒙古呼和浩特市第二中学, 内蒙古呼和浩特 010090; 2. 内蒙古农业大学, 内蒙古呼和浩特 010019)

摘要 [目的] 研究通过愈伤组织途径诱导形成朱顶红原球茎。[方法] 以朱顶红(*Hippeastrum vittatum*)鳞茎作为外植体, 通过愈伤组织途径诱导形成原球茎, 并建立再生植株。[结果] 诱导愈伤组织最佳培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L, 诱导率达到 80%; 诱导原球茎增殖的培养基为 MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 诱导原球茎系数达到 15~20 个; 诱导原球茎生长最佳培养基为 1/2MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + KH₂PO₄ 80 mg/L + TIBA 0.5 mg/L; 诱导原球茎生根培养基为 1/2MS + IBA 0.5 mg/L, 生根率可达 100%。[结论] 建立了朱顶红再生植株, 实现了朱顶红快速繁殖目标, 为朱顶红的种苗生产提供技术支持。

关键词 朱顶红; 愈伤组织; 原球茎; 再生植株

中图分类号 S682.2⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)13-051-04

Research on the Protocorm Inducer from Callus of *Hippeastrum vittatum*

XI Ji-ri¹, TIAN Xin¹, JIN Mu-lan², HE Yan-hong^{2*} et al (1. No. 2 Middle School of Hohhot, Hohhot, Inner 010090; 2. Forestry College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner 010019)

Abstract [Objective] The aim was to study the development of *Hippeastrum vittatum* by callus induced using bulbs as explants. [Method] Callus were induced using bulbs as explants then the protocorm was developed and regeneration plants were established. [Result] The results showed that the optimal medium for callus induction was MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L, the callus induction rate of bulbs was the highest, the induction rate reached 80%; medium to induce proliferation of protocorm like bodies was MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L, inducing protocorm coefficient could reach 15~20; the optimal medium of protocorm growth was 1/2 MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + KH₂PO₄ 80 mg/L + TIBA 0.5 mg/L; Induction of protocorm rooting medium was 1/2 MS + IBA 0.5mg/L, the rooting rate was up to 100%. [Conclusion] Regeneration plant of *Hippeastrum vittatum* was established, and realize the fast breeding goal, in order to provide technical support for seedlings production.

Key words *Hippeastrum vittatum*; Callus; Protocorm; Regenerated plant

朱顶红(*Hippeastrum vittatum*)属于石蒜科孤挺花属多年生草本植物^[1-2], 又名孤挺花、百支莲和喇叭花。常见的栽培品种有红狮子(Red lion)、橙色塞维(Orange Sovereign)、苹果(Apple Blossom)、蒙特布朗(Mount Blanc)等^[3]。朱顶红原产巴西和南非, 喜温暖湿润和阳光充足的环境^[4]。属于球根花卉, 地下部分具有鳞茎(Bulbs), 鳞茎是变态的茎, 有短缩而扁盘状的鳞茎盘, 肥厚多肉的鳞叶就着生在鳞茎盘上鳞茎中贮藏丰富的有机物和水分, 有利于渡过不利的气候条件。由于朱顶红花色艳丽等原因越来越受到国内外广大消费者的喜爱, 被广泛应用于盆栽、切花和园林绿化中。朱顶红还具有解毒消肿、抑制真菌^[5]等药用价值, 亦可提取天然食用色素^[6]。但朱顶红栽培品种自花不实, 通常采用无性分球法繁殖, 繁殖系数小, 且品种极易退化, 要解决好这一问题, 离体快繁研究的加速发展, 具有重要的现实意义, 也是进行工厂化育苗的一条有效途径。目前, 朱顶红组织培养技术研究虽然取得了长足发展, 但仍存在繁殖率低、繁殖周期长等问题, 限制了朱顶红组织培养技术的推广应用, 笔者在前人研究朱顶红组织培养技术的基础上, 通过诱导朱顶红鳞茎形成愈伤组织, 进而形成原球茎, 并建立再生植株, 实现朱顶红快速繁殖目标, 为朱顶红种苗生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 基本培养基的筛选 选择生长良好、无病虫害的朱顶

红为试验材料, 于 2012~2013 年在内蒙古农业大学林学院组织培养实验室进行研究。选取直径 5~8 cm 的鳞茎, 用自来水冲净表层, 去除须根、叶和最外一层的鳞茎片。常规消毒后将鳞茎切成 0.5~1.0 cm³ 大小的方块, 接种于不同浓度的 NAA 及 6-BA MS 培养基中, 从而筛选出最适的基本培养基。

1.2 愈伤组织的诱导 采用朱顶红鳞茎为外植体设计 2 种初代愈伤组织诱导培养基: ①MS + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L; ②MS + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L。将常规消毒后的鳞茎切块分别接种到不同诱导培养基中, 每个三角瓶中随机接种 4 块, 18 个重复, 在 (25 ± 1) °C 下暗培养 30 d, 统计愈伤组织诱导率。

1.3 原球茎的诱导及增殖 将 3~4 代愈伤组织转接到以下培养基: ①MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L; ②MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L; ③MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 诱导原球茎的发生。每瓶培养基接种 3~4 块愈伤组织, 每种培养基 18 个重复, 光照时间 12 h/d, 30 d 后统计原球茎的发生率。

1.4 诱导原球茎生长 以原球茎诱导培养和增殖培养直径未能达到 1 cm 的未感染原球茎作为外植体, 接种在附加 KH₂PO₄ 80 mg/L、TIBA 0.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L 和不同浓度 6-BA 的 1/2MS 培养基中, 培养 30 d 后观察原球茎生长情况。

1.5 生根及移栽 将增殖直径 0.5~0.8 cm 的小鳞茎分别接种于附加 NAA 0.1 mg/L 和不同浓度 6-BA 的 1/2MS 培养基中, 30 d 后观察原球茎生根状况。当苗高达到 3~4 cm、根长 2~3 cm 时进行驯化。

基金项目 内蒙古自治区科学技术厅项目(20130438)。

作者简介 希吉日(1997-), 女, 蒙古族, 内蒙古呼和浩特人, 内蒙古呼和浩特市第二中学在读学生。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事林木培育方面的研究。

收稿日期 2015-03-23

2 结果与分析

2.1 外植体消毒时间对朱顶红诱导愈伤组织的影响 朱顶红大球常年生于地下,极易感染红斑病,带菌较严重,因此选用 2% NaClO 试剂对外植体进行处理,应用 MS 培养基进行培养,观测其污染率和愈伤组织诱导和增殖情况。从表 1 可以看出,消毒时间直接影响愈伤组织的增殖。以污染率低和

表 1 不同消毒时间的朱顶红鳞茎消毒效果

消毒时间 min	污染率 %	愈伤组织增殖情况
7	35.0	正常
8	12.0	正常
9	10.0	缓慢
10	8.0	外植体少量被杀死,愈伤组织增殖慢
13	6.0	外植体少量被杀死,愈伤组织增殖慢
15	4.0	外植体大量被杀死,愈伤组织增殖慢



MS+ 6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L

表 2 6-BA 和 NAA 对朱顶红鳞茎愈伤组织诱导的影响

6-BA 浓度// mg/L	NAA 浓度// mg/L	愈伤组织诱导率// %
1.0	0.5	23
1.5	0.5	30
2.0	0.5	38
1.0	1.0	44
1.5	1.0	56
2.0	1.0	80
1.0	1.5	45
1.5	1.0	27
2.0	1.0	32

注:基本培养基为 MS。

愈伤组织诱导和增殖状况正常作为确定消毒时间的标准,结果表明,鳞茎浸泡 8.0 min 为最佳消毒时间,其污染率为 12.0%,愈伤组织增殖正常。

2.2 6-BA 对朱顶红愈伤组织诱导的影响 从表 2 和图 1 可以看出,诱导愈伤组织最佳培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L,诱导率达到 80%。



MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L

图 1 诱导愈伤组织

2.3 6-BA 对朱顶红原球茎发生和增殖的影响 将愈伤组织接种到诱导原球茎发生和增殖培养基中进行培养,结果表明,6-BA 1.5 mg/L 对诱导原球茎有明显的促进作用。MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的组合可诱导形成 15 ~ 20 个原球茎,诱导原球茎系数最大(表 3、图 2)。

2.4 6-BA 对朱顶红原球茎生长的影响 以原球茎诱导培养和增殖培养直径未能达到 1 cm 的未感染原球茎作为外植体,培养在附加 KH₂PO₄ 80 mg/L、TIBA 0.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L 和不同浓度 6-BA 的 1/2 MS 培养基中,从表 4 可以看

表 3 6-BA 和 NAA 对朱顶红外植体诱导芽的影响

6-BA 浓度//mg/L	NAA 浓度//mg/L	诱导原球茎个数//个
1.0	0.1	10
1.5	0.1	15
2.0	0.1	5
1.0	0.3	6
1.5	0.3	8
2.0	0.3	4
1.0	0.5	2
1.5	0.5	4
2.0	0.5	2

注:外植体为鳞茎,基本培养基为 MS。



MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L



MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L

图 2 诱导原球茎发生及增殖情况

出,当 NAA 浓度不变时,随着 6-BA 浓度的增加原球茎直径有增大趋势,当 6-BA 浓度达到一定值时,原球茎的直径出现

下降趋势,培养原球茎生长的最佳培养基为 1/2 MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + KH₂PO₄ 80 mg/L + TIBA

表 4 6-BA 对朱顶红原球茎生长的影响

6-BA 浓度	原球茎直径	6-BA 浓度	原球茎直径
mg/L	cm	mg/L	cm
1.0	0.3	4.0	3.0
1.5	0.5	4.5	2.3
2.0	1.6	5.0	1.9
3.5	2.1	6.0	1.7

注:外植体为鳞茎,基本培养基 MS。

0.5 mg/L,原球茎直径可达 3 cm(图 3)。

2.5 原球茎诱导生根 将直径 3 cm 左右未感染的原球茎作为外植体,置于 1/2MS + IBA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 mg/L + 琼脂 6 mg/L 诱导原球茎生根培养基上,结果表明培养 25 d 生根率可达 100%(图 4)。

2.6 朱顶红试管苗的驯化和移栽 朱顶红为球根花卉,在驯化和移栽时,容易成活。在驯化过程中,适当增加自然光



图 3 原球茎生长情况

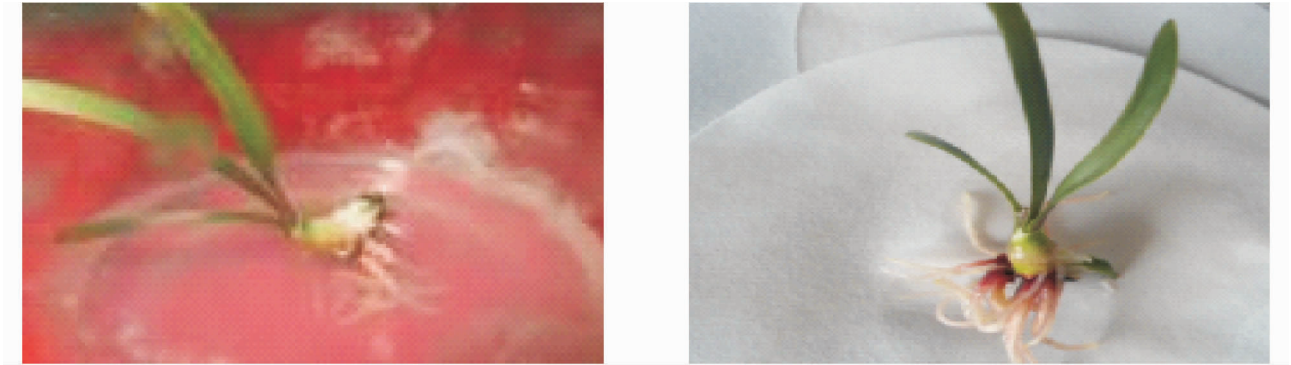


图 4 原球茎生根情况

照时间可以提高移栽成活率。当根数达到 2~4 条、根长 2~4 cm 时,可以驯化移栽。先揭开三角瓶瓶口,在培养室内放置 1 d,然后用镊子取出植株,洗掉根部附着的培养基,栽于

蛭石:腐殖土:珍珠岩 = 1:1:1 的基质上,保持基质湿润,10 d 后小植株成活,成活率可达 95% 以上(图 5)。



图 5 炼苗移栽情况

3 结论与讨论

诱导形成原球茎是朱顶红组织培养快繁技术的关键问题,如何快速诱导愈伤组织和原球茎、增加愈伤组织和原球

茎增殖数量成为解决关键问题的重要内容。张松等^[7]、张亚玲等^[8]对朱顶红组织培养快繁途径研究指出,不同激素配比的 MS 培养基,先诱导形成愈伤组织,再形成不定芽或胚状

体,能提高不定芽诱导率。高年春等^[9]认为诱导朱顶红不定芽 1/2MS 培养基比 MS 好,并指出在培养基中添加活性炭可以提高不定芽诱导率。这些研究者从不同角度研究了提高不定芽或胚状体诱导率技术。在植物组织培养中,再生植物形态发生的过程一般划分为愈伤组织形成和器官发生 2 个阶段,这 2 个阶段因不同的植物取材部位不同,其培养效果有显著差异^[10-11]。同一植物取自不同器官、组织的外植体,其形态发生也有很大差异。该研究认为影响朱顶红愈伤组织和原球茎诱导率主要因素是激素组合,通过研究不同的激素组合,筛选出能快速诱导愈伤组织和原球茎、提高愈伤组织和原球茎增殖数量的最佳培养基。该研究表明,MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L 培养基能快速从鳞茎诱导出愈伤组织,诱导率也较高(80%);以 MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L 为培养基诱导原球茎增殖数量最佳;原球茎生长培养的最佳培养基为 1/2MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + KH₂PO₄ 80 mg/L + TIBA 0.5 mg/L。

(上接第 41 页)

3% 以上则可定为不同的种。与该内生菌同源性最高的是未能培养细菌 Uncultured candidated bacterGS242. seq 和 Uncultured bacterium clone yf5-180, 达到 90.5% ~ 91.3%, 故可认为该内生菌虽然与未能培养的细菌(Uncultured bacterium)的亲缘关系较为接近,但该内生菌应该属于一个新的菌株。

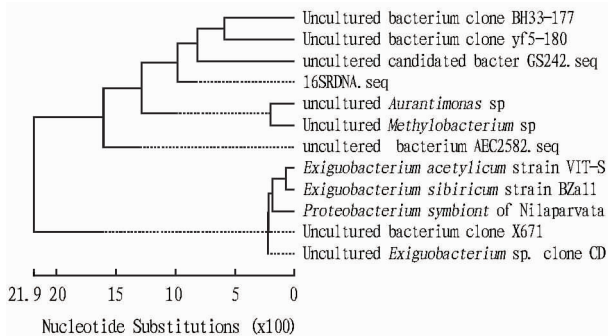


图 3 进化树分析

3 结论与讨论

未能培养的细菌(Uncultured bacterium)主要是指尚未能完全分离培养的细菌。因为目前还没有成功分离培养柑橘黄龙病病原的报道。研究表明,未能培养的细菌在柑橘黄龙病的内生菌所占比例大于 5%^[7],该内生菌可能为柑橘黄龙病的病原菌。16S rDNA 存在于所有原核生物的细胞中,它是研究细菌分类、进化和亲缘关系的重要指标,可用于进化程度不同的生物系统发育研究,特别对于不能进行人工培养的细菌,利用其进行分类是一个有力的工具。目前已知细菌和植原体 16S rDNA 基因只要相差 3% 以上则可定为不同的种^[8]。

该研究运用分子生物学的方法对广东肇庆地区柑橘黄龙病植株体的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,并对扩增产物进行

参考文献

- [1] 韦三立. 花卉组织培养[M]. 北京:中国林业出版社,2001
- [2] 姜明兰,钟文田. 朱顶红愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 植物生理学通讯,1984(1):37-38.
- [3] 张松,达克东,曹辰兴,等. 朱顶红离体培养快速繁殖体系及杯状体发生[J]. 园艺报,2002,29(3):285-287.
- [4] 王红芳,贾春兰. 园艺植物组培苗工厂化生产(三)—优良品种的快速繁殖[J]. 农村实用工程技术,1996(1):2.
- [5] 鲁红学,彭跃峰,熊定志. 朱顶红鳞茎提取物的抑菌作用研[J]. 安徽农业科学,2006(9):1906-1907.
- [6] 蒋新龙,蒋益花. 朱顶红红色素的提取条件及理化性质[J]. 浙江农业学报,2006,18(2):113-117.
- [7] 张松,达克东,曹辰兴. 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(3):285-287.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 曹改义. 实用组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科技出版社,2001.
- [11] 王爱勤,周岐伟,何龙飞,等. 百合试管结鳞茎的研究[J]. 广西农业大学学报,1998,17(1):71-75.

克隆、序列测定及同源关系分析,确定了该植株的分类地位。目前,国内外学者对柑橘黄龙病植株病原进行了大量研究,以期对柑橘黄龙病的防治提供参考依据。从该研究扩增到的肇庆柑橘黄龙病植原体 16S rDNA 基因中发现一个特殊的序列,在 NCBI 数据库的同源性对比中,与其相似度最高的是 Uncultured candidated bacterGS242. seq 和 Uncultured bacterium clone yf5-180, 达到 90.5% ~ 91.3%。同源性相差 3%,即可认为是不同种。尽管有研究利用含有柑橘叶脉提取物的培养基能成功培养出亚洲种黄龙病病原菌,并完成其柯赫氏法则验证的报道^[9],但该试验为孤例,尚无重复成功的报道^[9]。除了个例,目前还没有成功分离培养柑桔黄龙病病原的报道,所以该研究发现了一个尚未发现的细菌种属。此细菌很有可能是柑橘黄龙病的病原菌。对于此细菌的研究是一个较为有价值的课题。

参考文献

- [1] 田亚南,柯穗,李韬. 应用电泳与 PCR 技术检测王官溪蜜柚黄龙病病原[J]. 植物病理学报,2000,30(1):76-81.
- [2] LI W, LEVY L, HARTUNG J S. Quantitative distribution of Candidatus Liberibacter asiaticus in citrus plants with citrus huanglongbing[J]. Phytopathology, 2009, 99:139-144.
- [3] 孔维文,邓晓玲,梁志慧,等. 柑桔黄龙病病原 DNA 片段的克隆及序列分析[J]. 植物病理学报,2000,30(1):71-75.
- [4] 张会敏,冯友军. 一株野生细菌的 16S rDNA 序列分析与系统发育树的构建[J]. 生物信息学报,2004,8(3):2-4.
- [5] 廖晓兰,朱水芳,赵文军,等. 柑橘黄龙病病原 16S rDNA 克隆、测序及实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报,2004,12(1):80-85.
- [6] 单振菊,冯震,周根,等. 沙田柚黄龙病病原 16S rDNA 片段的克隆与序列分析[J]. 广西农业生物科学,2006,25(1):61-65.
- [7] 王爱华,殷幼平,熊红利,等. 广西柑橘黄龙病植株韧皮部内生细菌多样性分析[J]. 中国农业科学,2010,43(23):4823-4833.
- [8] 单振菊,冯震,周根,等. 南方 5 省区柑橘黄龙病病原 16S rDNA 片段的克隆与序列分析[J]. 华南农业大学学报,2008,1(2):29.
- [9] SECHLER A, SCHUENZEL E L, COOKE P, et al. Cultivation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', 'Ca. L. africanus', and 'Ca. L. americanus' associated with Huanglongbing[J]. Phytopathology, 2009, 99(5):480-486.