

风信子的组织培养和植株再生

刘勇刚,徐子勤

(西北大学 陕西省生物技术重点实验室,陕西 西安 710069)

摘要:以风信子鳞茎为外植体经灭菌后切成小块接入到风信子愈伤组织诱导培养基 MS₁ 上得到了愈伤组织,这些愈伤组织在含 6BA,KT 的 MS 分化培养基(MS₂)上分化得到了芽,并在同样的培养基上有少量的根分化出来。当芽移至生根培养基上时可生成大量健壮的根,从而得到完整植株。建立了风信子离体诱导再生植株的体系。使用的方法不需要进行低温处理,摆脱了因设备不足在组织培养生产中的限制。同时还对风信子的灭菌方法进行了研究,发现对风信子地下器官的表面灭菌应以 75%乙醇浸泡 5 min 后再以 15%新洁尔灭浸泡 10 min,剥叶后用 0.1% 升汞浸泡 15 min,无菌水清洗 5 次效果最好。

关键词:风信子;组织培养;鳞茎;植株再生

中图分类号:Q943-1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274 X (2001)03-0255-04

风信子(*Hyacinth orientalis* L.)是百合科风信子属的多年生球根花卉植物。叶带状肥厚,花茎中空,花色繁多,是一种名贵的荷兰花卉。风信子性喜温暖、湿润、阳光充足的环境条件^[1-3],适宜我国大部分地区栽培。风信子的商品化生产也有报道,但多采用水培的技术^[4,5],生产效率较低,不能满足市场的需求。所以,利用组织培养技术对风信子进行生产有着较为广阔的前景,国内外已对风信子的组织培养进行了研究,并获得了再生植株。但是,这些研究所使用的外植体均为风信子的子房等生殖器官^[6,7]。使用风信子的鳞茎作为外植体的组织培养也有报道^[8],但需要 10℃低温培养 20~30 d,由于对设备的要求给实际应用及快速繁殖带来了一定的限制。本实验成功地利用风信子的鳞茎作为外植体进行组织培养获得大量再生植株,摆脱了对设备的依赖,对风信子的商品化生产有着重要的意义。

1 材料与方法

1.1 植物名称、来源

风信子属百合科风信子属。球茎购于西安市植物园。

1.2 无菌培养物的建立

风信子的鳞茎带菌严重,通常的灭菌方法往往难以取得满意的效果。给组织培养带来困难,我们采用了 5 种不同的灭菌方法对风信子鳞茎进行了表面灭菌,通过比较得到了适用于风信子鳞茎的灭菌方法。

1.3 愈伤组织的诱导

风信子鳞茎灭菌后在无菌条件下切掉鳞片边缘,将中间部分切成 5 mm² 的小块,以近轴面向上的方式接种于含不同激素配比的愈伤组织诱导培养基上,在温度为(25±2)℃,光强 1 200 lx,每天 12 h 光照的条件下进行培养。基本培养基为 MS 基本培养基,附加 3%蔗糖、0.7%琼脂,pH5.7。培养基中考虑含 2,4-D,6-BA,NAA3 种激素。根据正交表 L₉(3)⁴ 设计 9 种培养基用于建立无菌培养系。3 周后统计愈伤组织生成情况。

1.4 愈伤组织分化的诱导

将诱导的风信子愈伤组织切成 2 mm² 的小块,接种于含不同激素配比的愈伤组织分化培养基上,比较不同分化培养基对风信子愈伤组织分化的作用。在(25±2)℃,光强 1 200 lx,每天 12 h 光照的条件下进行培养。基本培养基为 MS 培养基,附加 3%

收稿日期:2000-07-05

基金项目:西北大学校内基金资助项目(98NW25H)

作者简介:刘勇刚(1976-),男,陕西安康人,西北大学硕士生,主要从事植物转基因方向的研究。

蔗糖, 0.7% 琼脂, pH5.7。培养基中考虑含 6-BA, KT, NAA, 3 种激素。根据正交表 $L_9(3)^3$ 设计 9 种培养基用于建立无菌培养系。3 周后统计愈伤组织分化情况。

1.5 再生芽根的分化、壮苗培养和移栽

待再生芽根至 3 cm 左右时可将芽切下转入生根培养基中生根。生根培养基为 MS 培养基含 6-BA (0.5 mg/L) + KT (1.0 mg/L) + NAA 1.0 (mg/L), 附加 3% 蔗糖, 0.7% 琼脂, pH5.7。培养 3 周后统计生根率。生根后可移入壮苗培养基中壮苗。经过 2 周壮苗培养的再生苗经过 3 d 的练苗, 将植株根部的培养基洗净后移栽于疏松、排水良好的砂

质土中, 定时浇灌 1/2MS 大量元素的营养液, 在温室中成活后可移入大田。

2 结果与讨论

2.1 不同灭菌方法对风信子鳞茎灭菌的效果

风信子鳞茎带霉菌较为严重, 通常的灭菌方法往往难以取得满意的效果。因此, 我们采用了 5 种不同的灭菌方法(见表 1)对风信子鳞茎进行了灭菌, 3 周后通过比较染菌率及存活状态得到了适用于地下器官的灭菌方法。

表 1 不同灭菌方法对风信子鳞茎灭菌效果的影响

The effect of different sterilize method of surface in hyacinth culture

编号	灭 菌 方 法	染菌率 [*]	存活状态
1	75%乙醇擦拭, 0.1%升汞浸泡 15 min, 无菌水清洗 5 次	45%	生长旺盛
2	75%乙醇浸泡 2 min, 0.04%升汞浸泡 30 min, 无菌水清洗 5 次	23%	生长旺盛
3	10%次氯酸钙浸泡 30 min, 无菌水清洗 5 次	51%	生长旺盛
4	75%乙醇浸泡 5 min, 0.1%升汞浸泡 30 min, 无菌水清洗 5 次	4%	生长不旺盛
5	75%乙醇浸泡 5 min, 15%新洁尔灭浸泡 10 min, 剥叶, 0.1%升汞浸泡 15 min, 无菌水清洗 5 次	4%	生长旺盛

* 染菌率 = (染菌外植体数 / 接种外植体总数) × 100%

从表 1 可以看出方法 5 效果最好, 染菌率低, 外植体存活状态好, 适于风信子地下器官的表面灭菌。

2.2 愈伤组织的诱导

将风信子球茎灭菌后接种于下述 9 种含不同激素配比的愈伤组织诱导培养基上(见表 2)。在培养 3 周后, 外植体均产生不同程度的变化, 但 7 号愈伤组

织诱导培养基中, 外植体生长状态好, 生长旺盛, 质地较硬, 表面形成了有很多近圆球形突起的愈伤组织(见图版 1)。其他培养基中的外植体也有少量这种结构形成。进一步的实验表明, 这种近圆球形突起为风信子的再生芽原基, 具有较强的分化能力。

表 2 不同的愈伤组织诱导培养基对风信子的诱导情况

Tab. 2 The effect of different phytohormones on callus induction medium in hyacinth culture

编号	激素配比 / (mg · L ⁻¹)			愈伤组织诱导情况		
	2,4-D	6-BA	NAA	存活状态	愈伤组织生成情况	表面是否有近圆球形突起
1	2.0	0.5	0.0	接近死亡	无生成	无
2	2.0	1.0	0.2	生长较差	极少生成	无
3	2.0	1.5	0.4	生长旺盛	大量生成	有少量
4	2.5	0.5	0.2	生长较好	大量生成	有少量
5	2.5	1.0	0.4	生长旺盛	大量生成	有少量
6	2.5	1.5	0.0	生长很差	极少生成	无
7	3.0	0.5	0.4	生长旺盛	少量生成	有很多
8	3.0	1.0	0.0	生长较差	少量生成	有少量
9	3.0	1.5	0.2	生长旺盛	少量生成	有较多

2.3 诱导芽的分化

将风信子鳞茎诱导的愈伤组织切成 2 mm³ 的小块, 对于表面有很多近圆球形突起的愈伤组织, 确保每块上有未被破坏的近圆球形突起 2~5 个。将其

移入 9 种含不同激素配比的愈伤组织分化培养基中(见表 3), 部分分化培养基中的愈伤组织能分化出芽(见图版 2), 但仅限于表面很多近圆球形突起的愈伤组织, 对于愈伤组织诱导培养基上诱导出的表

面无近圆球形突起的愈伤组织,在此9种分化培养基上均不能分化出芽。分化频率最高、速度最快的是3号分化培养基,培养两周后,出现绿色芽点,3周后

分化出芽,分化率可达85%。少数芽在3号分化培养基中有根的分化,但并不粗壮,同时也有极少量的畸形芽的出现(约占5%,见图版3)。

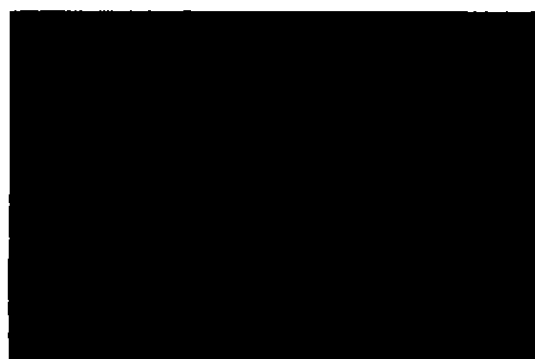


图1 风信子鳞片经器官发生途径诱导后产生近球状芽原基
Fig. 1 Globular primordia regenerated from bulb segment of *Hyacinth orientalis* L. via organogenetic pathway.

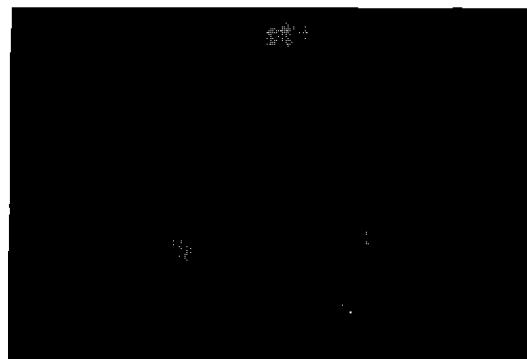


图2 风信子近球状芽原基在分化培养基中分化成绿苗
Fig. 2 Plantlets were differentiated from globular primordia on regeneration medium



图3 再生苗在分化培养基上生根

Fig. 3 Roots were regenerated on differentiation medium

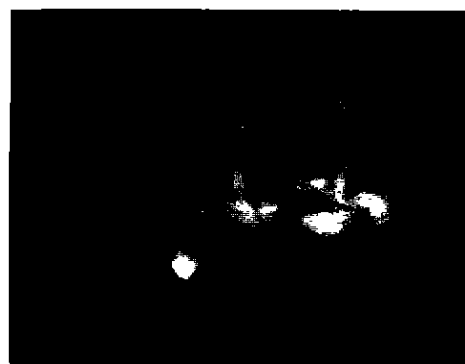


图4 再生过程中出现的畸形苗

Fig. 4 Abnormal plants were produced in regeneration process

表3 风信子在不同激素配比的愈伤组织分化培养基的诱导结果

Tab. 1 The result of hyacinth cultured in differentiation medium with different phytohormones proportion

编 号	激素配比/(mg · L ⁻¹)			愈伤组织诱导结果			
	6-BA	KT	NAA	接种数 ^a	分化数 ^b	分化频率 ^c /%	畸形芽出现频率 ^d /%
1	0.5	0.2	1.0	40	0	0	0
2	0.5	0.5	0.5	40	0	0	0
3	0.5	1.0	0.0	40	34	85	5
4	0.2	0.2	0.5	40	0	0	0
5	0.2	0.5	0.0	40	12	30	0
6	0.2	1.0	1.0	40	1	2.5	0
7	0.0	0.2	0.0	40	1	10	2.5
8	0.0	0.5	1.0	40	0	0	0
9	0.0	1.0	0.5	40	0	0	0

a 接种数为接种外植体表面的近圆球形突起总数;b 分化数为由外植体分化出的芽数;c 分化频率=(分化数/接种数) × 100%;d 畸形芽出现频率=(畸形芽数/接种数) × 100%。

2.4 根的分化及壮苗培养、移栽

当芽长到约 3 cm 长时,将芽切下移入生根培养基中开始生根,3 周后分化出根并较为粗壮(见图版 4),40 d 时后长度可达 2.5 cm,平均每株再生苗有 4~5 条不定根,生根率 75%。将长至 4~5 cm 长的苗移入含 1/2MS + 6-BA (0.25 mg/L) + KT (0.5 mg/L) + NAA (0.5 mg/L),pH5.7 的培养基中壮苗。在此阶段仍有新的再生苗出现,可以回到分化与生根培养基中再培养。经过 3 周壮苗培养的再生苗经过 3 d 的练苗,将植株根部的培养基洗净后移栽于疏松、排水良好的砂质土壤中,定时浇灌 1/2MS

大量元素的营养液,在温室中成活后可移入大田。

本实验说明风信子具有利用组织培养进行大规模生产的潜力,但灭菌方法在材料的起始阶段应采用本文第 5 种方法较好。由于由风信子诱导的愈伤组织中,只有生长旺盛、质地较硬,表面形成很多近圆球形突起的愈伤组织的愈伤组织才在分化时有较好的分化能力,所以应在诱导出愈伤组织后进行筛选来进一步降低生产成本。本实验成功地摆脱了对设备的依赖,对风信子的商品化生产有着重要的意义。

参考文献:

- [1] 孙可群. 花卉及观赏树木栽培手册[M]. 北京:中国林业出版社,1983. 643-645.
- [2] 陈俊愉,程绪可. 中国花经[M]. 上海:上海文化出版社,1989. 594.
- [3] 蔡 曾. 风信子的种球生产[J]. 中国花卉盆景,1998,(8):4-7.
- [4] 潘志好. 春节风信子水培促成栽培试验[J]. 中国花卉盆景,1997,(2):15-18.
- [5] 原雅玲,周德文,张 婷. 等. 风信子的商品化生产研究初报[J]. 西北植物学报,1998,18(6):75-77.
- [6] ENOMO K,梁 斌. 外源激素在诱导风信子花被外植体不同部位细胞再生花芽中的作用[J]. 植物学报,1994,36(8):581-586.
- [7] 陆文梁,白书农,张宪省. 诱导风信子再生花芽不断分化花被片的研究[J]. 植物学报,1999,41(9):921-927.
- [8] 顾根福,万志刚. 风信子组织培养简报摘编[J]. 植物生理学通讯,1997,33(4):227-230.

(编 辑 徐象平)

Tissue culture and plant regeneration of *Hyacinth orientalis* L.

LIU Yong-gang, XU Zi-qin

(Biotechnological Key Laboratory of Shaanxi Province, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Bulbs of hyacinth were cut up into little pieces after surface had been sterilized, then were cultured on series of solidified MS medium supplemented with different phytohormones. After three weeks calli were obtained from explant, and there were many approximately globular projections on partial explant. The projections regenerated to small buds after subcultured on differentiative culture medium for three weeks. In a series of differentiative culture media, the MS medium supplemented with 0.5mg/L 6-BA and 1.0mg/L KT is the best of all. The bud differentiated a lot of roots after being moved into root inducing medium. The little plant could be transplanted into soil after stronging culture. This hyacinth regenerative system had high regenerative frequency. It needn't low temperature treatment thus it broke away from restriction of equipment in tissue culture. At the same time, the means of sterilization to underground organs was investigated and a good means had been found.

Key words: *hyacinth orientalis* L.; tissue culture; bulb; regeneration