

# 紫娇花花蕾离体培养及再生体系的建立

何月秋, 祝志勇, 章丰涛

(宁波城市职业技术学院 浙江 奉化 315502)

**摘 要:**以花蕾为外植体,首次建立了紫娇花离体再生体系。结果表明:用 0.1%的 HgCl<sub>2</sub> 处理紫娇花花蕾 10 min 是较好的灭菌处理方式,污染率可控制在 8.33%;而成活率相对较高,为 33.33%。紫娇花花蕾在 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 3 mg/L 的诱导培养基中可形成再分化能力强的、疏松、淡黄的高质量愈伤组织,且诱导率为 50.79%。适宜浓度 6-BA 和 NAA 的配比是紫娇花愈伤组织形成小鳞茎的关键,在 MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上,小鳞球分化率达到 98.2%,同时形成的小鳞球能较快的增殖。紫娇花试管苗适宜的生根培养基为 1/2MS+NAA 0.1 mg/L,生根率可达 100%,且紫娇花组培苗移栽 1 个月 后成活率可达 95%以上。

**关键词:**紫娇花;花蕾;愈伤组织;再生体系

**中图分类号:**S 682.29 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)16-0151-04

紫娇花(*Tulbaghia violacea*),别名野蒜或非洲小百合,原产南非,为石蒜科紫娇花属多年生常绿球根花卉。该植物成株丛生状,株高 45~60 cm;叶狭长线形,光滑,深绿色,含韭味;细长而直立的花茎自叶丛中抽出,顶端着生数十朵淡紫色小花,颇为美丽。伞形花序高于叶丛 10 cm 以上,小花淡紫色,长 2 cm,具香味。喜高温,也耐低温(-10℃),生长的适温为 24~30℃,较耐土壤瘠薄。适宜庭院栽植、盆栽或切花。紫娇花在华东地区 5 月开花,花期延续到 11 月。近年来紫娇花凭借其独特的观赏价值以及较强的适应性在园林绿化中应用广泛<sup>[1]</sup>。但由于传统的分株繁殖和播种繁殖方式,使其增殖系数低,增殖周期长,故而市场缺口较大。查阅国内外文献资料关于紫娇花组培快繁研究未见报道。组织培养技术是大量快速繁殖紫娇花的有效途径,也是植物进行遗传改良的重要基础。因此,探索紫娇花的组培关键技术,实现其规模化繁殖,不但可丰富园林绿化植物品种,满足市场需求,也对石蒜科其它植物的组培技术研究具有重要的借鉴意义。

## 1 材料与方法

外植体材料的处理 于 2008 年 8 月在宁波鄞州绿城园艺花卉培育基地用剪刀将盆栽紫娇花花蕾小心剪下,带回实验室。先用洗洁精浸泡 15 min,后用流水冲洗 4~5 次。分装好后移至超净工作台采用不同的灭菌方法进行处理,以获得最佳的灭菌方法,具体见表 1。将

不同灭菌方法处理的外植体,接入培养基 MS0 培养基中,每天观察外植体的污染状况作好记录。接种 10 d 以后,确定最佳的灭菌方法。

紫娇花花蕾愈伤组织的诱导:将花蕾接种至 MS 分别添加 6-BA 为 3 mg/L, NAA 为 0.05、0.1、0.3、0.5、1.0 mg/L 的诱导培养基中。自接种后,每隔 5 d 观察并记录外植体的生长状况、愈伤组织的诱导情况,统计不同外源激素配比下的愈伤组织诱导率。

紫娇花愈伤组织分化培养:按二因子完全随机设计,将诱导形成的愈伤组织转入附加不同浓度 6-BA 0、2、3、5 mg/L, NAA 为 0.0、0.1、0.2、0.5 mg/L 的分化培养基中进行培养,从中筛选出比较适合的生长调节物质浓度,每 5 d 观察并记录小鳞茎分化状况。紫娇花小鳞茎的生根培养:待小鳞茎长至 2 cm 左右,将其转入 1/2MS 添加 NAA 浓度为 0、0.05、0.1、0.15、0.2 mg/L 的生根培养基中,每 5 d 观察并记录小鳞茎生根情况。

表 1 不同灭菌方法中灭菌剂种类及处理时间

处理	灭菌剂种类及处理时间			
	75%酒精	处理时间/s	0.1%升汞	处理时间/min
S1	√	5	√	7
S2	√	10	√	7
S3	√	15	√	7
S4	—		√	7
S5	—		√	10
S6	—		√	13

注:“√”已选灭菌剂,“—”未选灭菌剂。

以上培养基中除生根阶段蔗糖的浓度为 1.5%之外,其它阶段蔗糖均为 3%,琼脂为 0.7%,pH 5.8。培养室内控制恒温(25±1)℃,光照为 40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间 14 h/d。3~5 次重复,每个试验包括 30~70 个外植体,数据采用 SPSS 软件进行分析。愈伤组织诱

第一作者简介:何月秋(1975-),女,四川成都人,博士,讲师,现主要从事植物组织培养研究工作。E-mail: heyueqiu\_2004@163.com。  
基金项目:宁波市农业科研攻关资助项目(2009C10019)。  
收稿日期:2010-05-25

导率(%)=分化芽数(个)/接种芽数(个)×100%;愈伤组织分化率(%)=分化愈伤组织数(块)/接种愈伤组织数(块)×100%进行计算。

2 结果与分析

2.1 紫娇花无菌体系的建立

紫娇花花蕾属比较幼嫩的器官,经过消毒剂处理后死亡率较高,无菌体系不易建立。分别采用了6种灭菌处理方法,具体见表2。采用乙醇与HgCl<sub>2</sub>组合、单独使用HgCl<sub>2</sub>均可获得少量无菌的外植体。当HgCl<sub>2</sub>处理时间不变,随着乙醇处理时间加长,虽然外植体污染率有所下降,但外植体成活率明显降低。这表明,乙醇处理时间越长紫娇花花蕾的伤害越大。而当单独使用HgCl<sub>2</sub>时,随着处理时间的延长,外植体的污染率逐渐由11.67%降低至6.67%,而成活率也由35.0%降低至26.70%。考虑乙醇的高渗透对植物组织的伤害以及提高工作效率方面考虑,试验中采用单独使用HgCl<sub>2</sub>处理10 min的灭菌处理方法。

表2 不同灭菌方法对外植体的影响

灭菌方法	接种总数/块	污染数/块	污染率/%	成活数/块	成活率/%
S1	60	7	11.67	20	33.33
S2	60	7	11.67	22	36.67
S3	60	5	8.33	18	30.00
S4	60	7	11.67	21	35.00
S5	60	5	8.33	20	33.33
S6	60	4	6.67	16	26.70

2.2 紫娇花花蕾愈伤组织的诱导

将紫娇花花蕾接种至愈伤组织诱导培养基上,经观察,该种植物生长期较长。大多数外植体培养60~75 d后才开始膨大变形;继续培养60 d后,外植体出现愈伤组织(图1)。在不同的激素配比处理下,愈伤组织的诱导率和生长状态均有明显差异。培养基中NAA为0.05 mg/L时,外植体不能愈伤化;只有NAA为0.1 mg/L时,少量外植体愈伤化。由表3可知,NAA在0.3 mg/L以上时,大部分外植体可愈伤化。以后的试验证明,NAA越高,所诱导形成的愈伤组织很难分化形成小鳞茎。而只有当NAA在0.1~0.5 mg/L时,形成的愈伤组织容易分化出小鳞茎。因此,适宜浓度的激素组合是诱导形成具备分化能力愈伤组织的重要条件。

表3 不同外源激素配比对愈伤组织诱导及分化的影响

培养基		接种外植体/块	出愈伤时间/d	产生愈伤组织数/块	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织的生长状态
6-BA	NAA					
/mg·L <sup>-1</sup>	/mg·L <sup>-1</sup>					
3	0.05	60	/	0	0	/
3	0.1	57	60	7	12.28	致密、色淡黄
3	0.3	66	63	27	40.91	致密、色黄绿
3	0.5	63	63	32	50.79	疏松、淡黄绿色
3	1.0	65	63	40	63.49	疏松、乳白色

2.3 紫娇花愈伤组织的分化和增殖

将诱导形成的愈伤组织接种至分化培养基中,30 d后淡黄色的愈伤组织逐渐变绿,并形成鳞球,40 d后长出大量嫩绿的小鳞茎(图2);但疏松、乳白色的愈伤组织虽能增殖但不能形成小鳞球。表4表明,在无生长调节物质的培养基中愈伤组织不增殖,也不分化;在含有6-BA和NAA培养基中,均有小鳞球的形成,但分化的频率有较大的差异。6-BA对紫娇花小鳞茎的形成作用非常关键,6-BA浓度低于2 mg/L时,小鳞茎的诱导率均在16%以下;6-BA浓度在3 mg/L以上时,小鳞茎的诱导率明显增加,均在85%以上。但6-BA浓度在3 mg/L以上时,形成的小鳞茎生长状态逐渐变差,叶片卷曲甚至畸形,出现玻璃化趋势(甚至死亡)。NAA在0.1、0.2、0.5 mg/L 3个水平变化时,对愈伤组织组织和小鳞球增殖影响较大。NAA浓度在0.1 mg/L时,愈伤组织几乎不能增殖;而NAA浓度为0.5 mg/L时,愈伤组织增殖速度很快,但容易出现褐变,且形成的小鳞茎叶片干枯、甚至死亡。说明,细胞分裂素和生长素之间适宜的配比对紫娇花愈伤组织的增殖、形成生长正常的小鳞茎起着关键性的作用。综合多方面因素,紫娇花愈伤组织分化培养基选择以MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.2 mg/L,在该培养基中,愈伤组织既能较快增殖也能形成正常的小鳞球和小鳞茎。

表4 不同外源激素配比对紫娇花愈伤组织分化的影响

培养基		小鳞茎诱导率/%	生长状态
6-BA	NAA		
/mg·L <sup>-1</sup>	/mg·L <sup>-1</sup>		
0	0	0 a	愈伤组织没有分化,愈伤组织不增殖
2	0.1	12.8±1.1 a	有少量愈伤组织形成鳞球,有叶片分化,愈伤组织没有增殖
2	0.2	15.6±1.4 b	有少量愈伤组织形成鳞球,有叶片分化,愈伤组织有增殖
2	0.5	15.5±1.1 a	有部分愈伤组织形成鳞球,长出两片嫩叶,愈伤组织有增殖
3	0.1	87.1±7.0 bc	愈伤组织形成大量鳞球,旁边分化嫩绿的小鳞茎,但叶形较小,鳞球不增殖
3	0.2	98.2±2.7 c	愈伤组织形成大量鳞球,旁边分化嫩绿的小鳞茎,叶形较大,鳞球增殖速度快
3	0.5	98.2±2.6 c	愈伤组织形成大量鳞球,旁边分化嫩绿的小鳞茎,叶形较大,鳞球增殖速度快,但鳞球部分有褐化
5	0.1	95.1±5.1 bc	愈伤组织形成大量鳞球,旁边分化嫩绿的小鳞茎,叶形小,鳞球不增殖
5	0.2	97.6±1.6 c	愈伤组织形成大量鳞球,形成的小鳞茎叶色深绿,有玻璃化趋势
5	0.5	99.5±0.5 c	愈伤组织都能形成大量鳞球,但分化形成的小鳞茎叶尖变枯

注:同一列小写字母表示差异显著(P<0.05)。

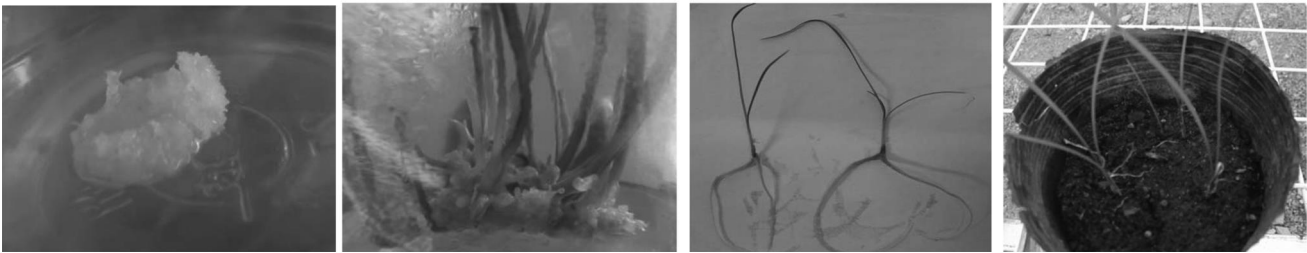


图 1 紫娇花花蕾形成  
的愈伤组织

图 2 紫娇花小鳞球和  
小鳞茎的形成

图 3 生根的紫娇  
花组培苗

图 4 移栽成活的紫  
花组培苗

2.4 紫娇花试管苗的生根与移栽

待紫娇花小鳞茎长到 2 cm 左右,单株切下接种至添加有不同 NAA 的 1/2MS 培养基中诱导紫娇花组培苗的生根,而细小的苗则用于继续增殖。结果表明,紫娇花小鳞茎比较容易生根,在不添加任何生长素的情况下部分植株便可长出根系。由表 5 可知,随着 NAA 浓度的增加,紫娇花试管苗的生根率增加,NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,生根率可达到 100%(图 3)。NAA 浓度超过 0.1 mg/L 时,试管苗切口处易形成大量愈伤组织,形成的不定根与试管苗的根茎不相连,这样的试管苗移栽容易死亡。因此,在 1/2MS+NAA 0.05~0.1 mg/L 生根培养基上,能形成生长健壮、生根率为 90%以上、移栽易成活的紫娇花试管苗。

一般而言,紫娇花生根苗长至 3.0 cm 以上,并具有 2~3 条根时,便可出瓶移栽。移栽前先将瓶苗移植常温下光照强度为 2 500 lx 的条件下练苗 5~7 d,然后将瓶苗取出,洗去附着在根部的培养基,自然光、湿度 80%的温室大棚中,1 个月后成活率达到 95%;2 个月后,出圃率可达 90%以上(图 4)。

表 5 不同浓度 NAA 对紫娇花试管苗生根的影响

NAA / mg · L <sup>-1</sup>	小鳞茎数 / 根	生根的小鳞 茎数/ 根	诱导率 / %	生长状况
0.00	60	32	53.3	苗色绿、细弱、根细弱,直接从切口处长出
0.05	63	58	92.6	苗色绿、生长健壮、根粗状,直接从切口处长出
0.10	65	65	100	苗色绿、生长健壮、根粗状,直接从切口处长出,有部分须根形成
0.15	66	66	100	苗淡绿,根粗状,从切口愈伤组织长出
0.20	64	64	100	部分叶子变黄、变卷,根粗状,从切口愈伤组织长出

3 结论与讨论

试验中曾用嫩叶、小鳞茎、茎尖等器官作为外植体,但均无法诱导出愈伤组织,而用紫娇花花蕾作为外植体最终获得了大量生长旺盛的愈伤组织。不过,紫娇花比一般石蒜科植物如玉帘<sup>[3]</sup>、虎耳兰<sup>[3]</sup>、大花君子兰<sup>[4]</sup>等诱导期长。一般从外植体接种到愈伤组织形成需要近 3 个多月的时间,而小鳞球的形成也需要 2 个多月的时间,因此进一步探讨紫娇花愈伤组织诱导期过长的生理和生化因子是该研究尚需做的后续工作。该研究表明,适宜浓度的 NAA 是形成再分化能力强的愈伤组织关键因子,而过高浓度的 NAA 容易导致愈伤组织不易分化。在此阶段 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 3 mg/L 的激素水平,可获得质量较高的愈伤组织。试验也表明,与其它石蒜科的植物一样<sup>[3]</sup>,适宜浓度的 6-BA 和 NAA 组合是紫娇花愈伤组织分化的关键。在培养基 MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.2 mg/L 上,小鳞球既可大量形成,也可较快的增殖,这样简化了中间环节,可大大节约生产成本。紫娇花试管苗对 NAA 比较敏感,低浓度下即可诱导其根的形成,在 1/2MS+NAA 0.05~0.1 mg/L 培养基中可形成健壮的生根苗,且移栽成活率可达 95%。

参考文献

[ 1 ] 张连全. 夏日清凉的紫娇花[J]. 花草谱英, 2006(10):41.  
[ 2 ] 何龙飞, 周嫦. 玉帘的组织 and 原生质体培养[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1995 41(2): 213-217.  
[ 3 ] 杨银萍, 史益敏, 陶懿伟. 虎耳兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理通讯, 2004, 40(4): 462.  
[ 4 ] 李春荣, 奚惕, 杨文杰, 等. 大花君子兰快速繁殖技术的研究[J]. 东北师范大学学报(自然科学版), 1991(4): 87-81.  
[ 5 ] 瞿素萍, 屈云慧, 王继华, 等. 南美水仙组培外植体再生体系建立中的关键技术研究[J]. 种子, 2004, 23(10): 16-17.

Buds Culture of *Tulbaghia violacea* in vitro and System Establishment of Plant Regeneration

HE Yue-qiu, ZHU Zhi-yong, ZHANG Feng-tao

(Environmental Faculty of Ningbo City College of Vocational Technology, Fenghua Zhejiang 315502 )

**Abstract:** The *in vitro* plant regeneration system of *ulbaghia violacea* as established firstly using buds as explants in the article. The results showed that the optimum sterilization method was 0.1% HgCl<sub>2</sub> treatment 10 minutes for explants with

# 菊花组织培养技术研究

袁成志, 李 波, 杨蔚然

(齐齐哈尔大学 生命科学与工程学院 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘 要:**以菊花的叶片为外植体,在 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基诱导叶片产生愈伤组织,并进行丛生芽的继代培养,研究 6-BA 和 NAA 不同配比对愈伤组织丛生芽的分化及不同浓度的 IBA 对根诱导的影响,并对试管苗的移栽成活率进行了比较。结果表明:丛生芽诱导的最适培养基为 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;试管苗在 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 的生根培养基上生根效果最佳;在练苗 3 d 时,试管苗移栽的成活率最高,达 95%以上。通过调节生长素与细胞分裂素的浓度比例可以有效的控制菊花丛生芽的分化、生长及生根。

**关键词:**菊花;激素;组织培养

**中图分类号:**S 682.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)16-0154-03

菊花是菊科菊属的多年生宿根草本植物,在我国有悠久的栽培历史。主要靠扦插繁殖,但扦插繁殖均需较多的母株材料,且受季节和外界环境条件的限制,繁殖速度慢,对于一些名贵菊花品种和母株来源不足的品种更不能及时满足生产和市场的需要<sup>[1-3]</sup>。组织培养技术除了可进行优良品种的快速繁殖外,还可以进行种质资源保存等。现在不同激素水平的培养基上进行菊花叶片丛生芽和根的诱导及试管苗移栽的研究,以期通过植物组织培养技术实现菊花植株的再生。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以菊花品种‘炼丹炉’为试材,由齐齐哈尔市龙沙公园提供,选择其叶片为外植体。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 取材与消毒** 选取新鲜幼嫩的叶片,在自来水中洗 2~3 h,用 70%酒精消毒 30 s,用无菌水冲洗后再用 0.1% 升汞消毒 5~7 min,无菌水冲洗 4~5 次。

**第一作者简介:**袁成志(1975-),男,硕士,讲师,现从事园艺作物科研及教学等工作。

**收稿日期:**2010-05-10

**1.2.2 愈伤组织的诱导** 将叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 小块,接种到 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基中,每瓶接种 3~4 块外植体,在 25℃培养室中,散射光条件下培养 25 d。

**1.2.3 不同激素水平丛生芽的分化** 将有愈伤组织产生的叶片,切割成 0.5 cm × 0.5 cm 小块,分别接种在以 MS 为基本培养基,附加不同的 6-BA 和 NAA(表 1),培养 25 d 后统计分化芽的状况。培养条件为温度 25℃,光照强度 1 000~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

**1.2.4 丛生芽的继代培养** 在丛生芽生长以后,把长有丛生芽的愈伤组织块分离或是对长成较高的无根苗切成段,接种于 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的继代培养基。培养条件为温度 25℃,光照强度 1 000~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

**1.2.5 不同 IBA 浓度对根分化的影响** 将产生的 2~3 cm 的芽苗分别接种在不同的 IBA(表 2)的 1/2MS 培养基上,进行诱导生根,弱光下培养 15 d 后观察统计不同 IBA 浓度对根诱导的影响。

**1.2.6 练苗与移栽** 在芽苗生根后,先将瓶塞打开,让其由无菌环境转至有菌且湿度较低的环境中进行练苗。选择 2、3、4 d 作为练苗时间。练苗后,取出试管苗,用清

a pollution rate 8.33% and survival rate was 33.33%. The optimum callus inducing medium was Murashige and Skoog (MS)+NAA 0.5 mg/L+6-BA 3.0 mg/L with an induction rate was 50.79%. Bulb putting were effectively generated and proliferated on MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L with a differentiation rate was 98.2%. The best rooting medium was 1/2MS+NAA 0.1 mg/L with a rooting rate was 100%. The plantlet was transplanted with a transplanting survival rates up to 95% after a month.

**Key words:** *Tulbaghia violacea*; buds; callus; regeneration system