

# 有髯鸢尾杂交种成熟胚培养成苗技术

张全锋<sup>1,2</sup>, 尹新彦<sup>1,2</sup>, 储博彦<sup>1,2</sup>, 贾红姗<sup>3</sup>, 李金霞<sup>1,2</sup>, 赵玉芬<sup>1,2</sup>

(1. 河北省林业科学研究院, 河北 石家庄 050061; 2. 河北省林木良种工程技术研究中心, 河北 石家庄 050061;

3. 河北农业大学 园林与旅游学院, 河北 保定 071000)

**摘要:**以有髯鸢尾“白与蓝”×“印度首领”杂交种子成熟胚为试材, 采用组织培养法, 研究了消毒方式、生长调节剂的种类与浓度对有髯鸢尾种胚成苗影响, 以期为鸢尾育种提供理论依据。结果表明: 成熟胚诱导最适培养基为 MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA, 萌发率达 86.6%, 成苗率达 85.0%; 丛生芽在 MS+4.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA 的培养基上增殖系数最大, 为 5.76; 适宜的生根培养基为 MS+0.7 mg·L<sup>-1</sup> PP<sub>333</sub>, 接种后 7 d 开始生根, 生根率达 83.33%; 组培苗生根后无需练苗便可移栽至蛭石中, 移栽成活率 89.53%。

**关键词:**有髯鸢尾; 杂交种; 成熟胚; 培养; 成苗

**中图分类号:**S 682.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)22-0111-06

有髯鸢尾是垂瓣上有髯毛附属物鸢尾的统称, 是近观赏花卉中发展最迅速、花朵变化最惊人、品种增加也最多的一类鸢尾<sup>[1]</sup>, 为世界范围内重要的宿根花卉<sup>[2]</sup>。自 19 世纪初以来, 人们通过有髯鸢尾品种杂交获得了大量性状多样的品种。长期以来, 有髯鸢尾新品种采用播种后得到实生苗, 并以实生苗进行分株繁殖或采用茎尖、花序等为外植体进行组培繁殖<sup>[3-9]</sup>。繁殖速度慢, 育种周期长。

**第一作者简介:**张全锋(1969-), 男, 山东德州人, 本科, 高级工程师, 研究方向为园林植物育种与栽培。E-mail: zqfeng10@163.com.

**责任作者:**尹新彦(1971-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向为园林植物育种与栽培。E-mail: yinxyl2@163.com.

**基金项目:**石家庄市科技支撑计划资助项目(141520862A)。

**收稿日期:**2016-08-04

种胚培养是传统育种技术与现代育种技术的有效结合, 它可以极大地缩短育种年限, 加快育种进程。目前胚培养技术已经在农作物小麦<sup>[10-12]</sup>、玉米<sup>[13]</sup>、大豆<sup>[14]</sup>、花生<sup>[15]</sup>丛生芽诱导中应用; 木本经济树种中冬枣<sup>[16]</sup>、樱桃<sup>[17]</sup>、板栗<sup>[18]</sup>、核桃<sup>[19]</sup>、杏<sup>[20]</sup>; 观赏树种珙桐<sup>[21]</sup>、油松<sup>[22]</sup>; 园林花卉品种芍药<sup>[23]</sup>、牡丹<sup>[24]</sup>、石斛兰<sup>[25]</sup>、兰花<sup>[26]</sup>、桂花<sup>[27]</sup>和八仙花<sup>[28]</sup>等也进行了胚培养研究; 在鸢尾的胚培养研究上仅对玉蝉花<sup>[29]</sup>有相关报道, 对有髯鸢尾的种胚培养尚鲜见报道。现以有髯鸢尾杂交种子成熟胚为试材, 研究了影响幼胚萌发和成苗的因素, 以期建立有髯鸢尾杂交种胚培养的技术体系, 为加速鸢尾育种进程提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

有髯鸢尾“白与蓝”×“印度首领”果实取自河北省

## Development and Utility of EST-SSR Markers in *Lagerstroemia indica*

ZHANG Enliang, WANG Peng, LI Ya, WANG Shu'an, LI Linfang, YANG Rutong

(Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

**Abstract:** *Lagerstroemia indica* was used as test material, the EST-SSR molecular markers of *Lagerstroemia indica* were sought from transcriptome sequencing, 45 308 unigenes were analyzed by MISA. The results showed that a total of 10 905 EST-SSRs were recognized from 9 074 unigenes, 1 486 sequences contained more than one SSR and 550 SSRs presented in compound formation. In this study, a total of 4 501 primer pairs were designed from 7 620 SSRs. To validate SSR markers, 68 primer pairs were randomly selected to PCR amplification and 61 SSR markers were amplified successfully. Of these validated SSR markers, 28 primer pairs were detected polymorphism.

**Keywords:** *Lagerstroemia indica*; EST-SSR; transcriptome sequencing; molecular markers

林业科学研究院鸢尾种质资源圃。

## 1.2 试验方法

1.2.1 消毒处理 将果实外包被的干黄苞片剥去,用洗衣粉水浸泡,自来水冲洗 20 min,取出种子。种子用自来水冲洗 30 min 后于超净工作台上先用 75%酒精消毒,以无菌水冲洗 3 次后,再用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  (升汞)消毒,以无菌水冲洗 6 次,整个消毒过程不断震荡。75%酒精和 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒时间见表 1。将已消毒的种子分为 2 部分:一部分不加处理;另一部分在解剖镜下,用手术刀将种子沿腹缝切开,取出完整种胚。不同处理后的外植体材料接种于 MS 培养基中。每处理接种 10 瓶,重复 3 次。接种完成后,置于培养室中培养。5 d 后统计污染情况,14 d 后统计胚萌发情况。污染率(%)=污染个数/接种个数 $\times 100$ ;胚萌发率(%)=胚萌发数/种胚接种个数 $\times 100$ 。

1.2.2 种胚萌发诱导培养基的筛选 将种胚接种到含不同浓度 6-BA、IBA 和 NAA 的 MS 培养基中,研究植物生长调节剂对种胚萌发和成苗的影响。以种胚体积膨大、弯曲并有块状组织长出为萌发标准,以叶片形成为成苗标准;以成苗率高低作为胚培养效果的最终标准。每种培养基接种 20 瓶,重复 3 次。14 d 后统计胚的萌发及成苗情况。成苗率(%)=成苗数/胚萌发数 $\times 100$ 。

1.2.3 丛生芽增殖培养基的筛选 芽丛数试验:将芽丛分成每丛 1、2、3、5 芽接种到 MS+2.0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+0.5 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  IBA 培养基中,每瓶接种 3 丛,每种培养基接种 20 瓶,重复 3 次。28 d 后统计芽苗增殖情况。增殖系数=增殖后的丛生芽数/接种的丛生芽数。增殖培养基筛选试验:向培养基中添加不同浓度的 6-BA、IBA 和 NAA,待试管芽苗达到一定基数时,切取 1~2 cm 的芽块用 MS+2.0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+0.5 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  IBA 培养基连续继代 2 次,使试管芽丛体内激素水平一致后,切取约 1 cm 高、生长势一致的芽丛,分别转入增殖试验培养基中。每个芽丛 3 株,每瓶接种 3 个芽丛,每处理 10 瓶。20~25 d 转接 1 次,随时观察记录试管芽苗生长与增殖情况,调查苗高、长势、增殖倍数。

1.2.4 丛生芽生根培养基的筛选 当丛生芽长到 4 cm 左右时,将芽丛分成每丛 3~5 芽接种到 MS 附加 PP<sub>333</sub> (0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ )的培养基中。每种培养基接种 10 瓶,每瓶接种 3 丛,重复 3 次。观察统计生根情况。生根率(%)=生根的丛芽数/接种的丛生芽数 $\times 100$ 。

1.2.5 培养条件 以上试验 MS 培养基中添加琼脂 6.5 g $\cdot\text{L}^{-1}$ ,白砂糖 30 g $\cdot\text{L}^{-1}$ ,pH 5.8~6.0,采用塑料封口膜封口,高压灭菌温度为 121 $^{\circ}\text{C}$ ,灭菌时间为 18 min。培养温度 23~25 $^{\circ}\text{C}$ ,光照强度 1 000~1 500 lx,光照时数 12 h $\cdot\text{d}^{-1}$ (每日 06:00—18:00)。

1.2.6 练苗与移栽 将生长良好,根系发达的幼苗进行练苗移栽。当试管苗根长到 2 cm 左右时,将封口膜逐渐打开,分别练苗 0、1、2、3 d。轻轻取出小苗,洗净根部残留的培养基,用 0.1%多菌灵溶液浸 30 s,然后分别移栽到灭菌后的 3 种基质,即蛭石、蛭石:草炭=1:1(V/V)、草炭,用塑料薄膜覆盖,保持湿度 80%~90%,温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$ ,70%遮阳网遮光。7 d 后,逐渐将薄膜揭去,并适时喷水,7 d 喷施杀菌剂 1 次,每处理重复 3 次。20 d 后调查移栽成活率。移栽成活率(%)=移栽成活丛芽数/移栽的丛芽数 $\times 100$ 。

## 1.3 数据分析

采用 DPS v7.05 软件对所测数据进行统计分析,采用 LSD 多重比较法进行差异显著性检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒处理对种子和种胚污染率的影响

由表 1 可知,不同消毒处理对杂交种子及种胚的污染率影响显著。随消毒时间的增加,种子和种胚的污染率显著或极显著降低。种子在培养 14 d 后萌发率均为 0,种胚萌发率先上升后下降。种胚的最佳消毒时间为 75%酒精消毒 10 min+0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 8 min,污染率、萌发率分别为 27.3%、72.7%。消毒时间过长会对种胚产生毒害作用,不利于发芽。

表 1 不同消毒处理对有髯鸢尾杂交种子及种胚萌发的影响

Table 1 Effect of different treatments on seed and seed embryo germination of bearded *Iris*

75%酒精 75% $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ /min	0.1% $\text{HgCl}_2$ /min	污染率		萌发率	
		Contamination rate/%		Germination rate/%	
		种子 Seed	种胚 Seed embryo	种子 Seed	种胚 Seed embryo
3	4	41.3aA	44.2aA	0	52.5dC
3	6	34.5bB	36.6bB	0	63.1bCB
5	8	28.3cC	30.6cB	0	67.4bAB
10	8	26.1dC	27.3dB	0	72.7aA
10	10	20.8eD	22.4eD	0	60.8cB
15	15	13.4fE	16.1fE	0	43.9eD

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。下同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level; different capital letters indicate highly significant difference at 0.01 level. The same below.

### 2.2 有髯鸢尾杂交种子成熟胚诱导培养基筛选

由表 2 可知,不同激素浓度处理对杂交种胚萌发影响显著。添加不同浓度 6-BA、IBA、NAA 的处理 M1~M6,均高于或显著高于对照 M0。其中,M5 萌发率和成苗率最高,分别为 86.6%和 85.0%,高于或显著高于其它处理及对照。M3、M4 萌发率与成苗率均低于或显著低于其对照 M2 处理。因此,最佳诱导培养基为 MS+

表 2 不同激素配比对有髯鸢尾杂交种胚萌发与成苗的影响

Table 2 Effect of the medium ingredients and concentration on the germination and seedling of seed embryo of beared *Iris*

处理 Treatment	培养基配方 Medium ingredients/(mg · L <sup>-1</sup> )			萌发率 Germination rate	成苗率 Seedling rate
	6-BA	IBA	NAA	/%	/%
M0	0	0.0	0.0	55.7cD	55.7dC
M1	1.0	0.5	0.0	58.9cD	57.2cdC
M2	1.0	1.0	0.0	73.4bC	73.2bB
M3	1.0	1.0	0.1	71.5bBC	62.2cC
M4	1.0	1.0	0.2	59.5cD	58.6cdC
M5	2.0	0.5	0.0	86.6aA	85.0aA
M6	2.0	1.0	0.0	83.2aAB	79.5aAB

2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg · L<sup>-1</sup> IBA。

2.3 增殖培养

2.3.1 继代芽丛数筛选 由表 3、图 1 可知,把不定芽分成不同芽丛数转接到增殖培养基中培养 28 d 后,芽丛

增殖明显,生长良好。当每丛为 5 芽时,增殖系数最高为 4.28,高于每丛 2、3 芽处理,显著高于每丛 1 芽处理。说明继代增殖时,单芽接种不利于芽丛增殖。种胚苗继代增殖的最佳处理为每丛 3~5 芽,具体的数量可根据芽块大小及不定芽生长状态决定。

表 3 不同芽丛数增殖系数比较

Table 3 Comparison of multiplication coefficient among different adventitious buds

芽丛数 Number of adventitious bud/个	增殖系数 Multiplication coefficient
5	4.28a
3	3.38ab
2	2.60ab
1	2.00b

注:A. 每丛 1 芽;B. 每丛 2 芽;C. 每丛 5 芽。

Note:A. 1 bud;B. 2 buds;C. 5 buds.

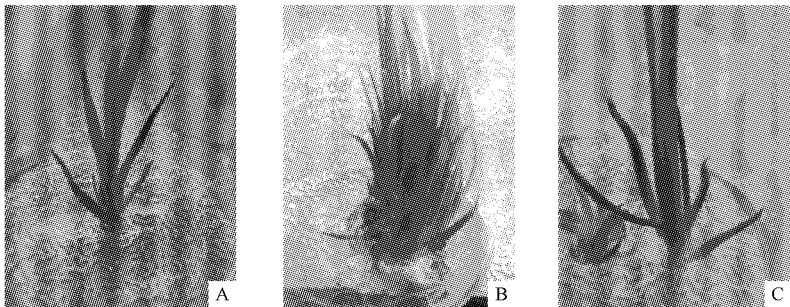


图 1 不同芽丛数继代 28 d 增殖情况

Fig. 1 Multiplication of different buds after 28 days

2.3.2 增殖培养基筛选 把丛生不定芽转接到增殖培养基中培养 25 d 后,在 6 个处理中,仅 1 瓶出现污染情况,芽丛增殖明显。通过对试管苗增殖和生长状况的调查,将增殖试管苗分为 3 个等级。Ⅰ级苗:植株长势好,增殖倍数>5,叶片舒展,叶色深绿;Ⅱ级苗:植株长势较好,3<增殖倍数<5,叶片偶有卷缩,叶色浅绿;Ⅲ级苗:

表 4 不同生长激素对有髯鸢尾试管苗增殖的影响

Table 4 Effect of different medium ingredients of test-tube plantlet multiplication of beared *Iris*

处理 Treatment	培养基配比 Medium ingredients/(mg · L <sup>-1</sup> )			增殖系数 Multiplication coefficient	试管苗分级 Test-tube plantlet grade/%		
	6-BA	IBA	NAA		I	II	III
JD1	2.0	0.5	0	3.50abA	6.67	86.66	6.67
JD2	4.0	0.5	0	5.76aA	66.67	23.33	10.00
JD3	4.0	0.5	0.1	2.74bA	3.33	20.00	76.67
JD4	4.0	0.5	0.2	2.30bA	3.33	16.67	80.00
JD5	4.0	1.0	0	3.34abA	6.67	80.00	13.33
JD6	5.0	1.0	0	3.44ab	6.67	83.33	10.00

注:生长状况按分级标准,用每个处理中各级苗占总数的百分数表示。

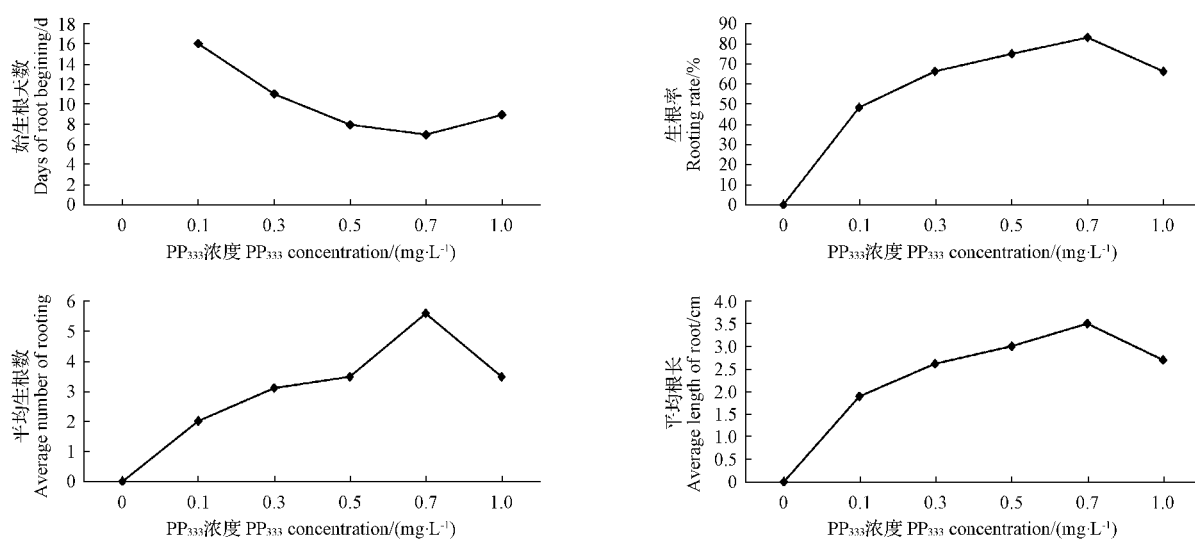
Note:According to the grading standard,growth status is expressed in every treatment by a percentage of the total plantlet.

植株长势一般,增殖倍数<3,叶片卷缩,叶色浅绿,偶有黄叶现象。根据此分级标准,对各处理进行综合评分,由表 4 可知,培养基 JD2 增殖倍数为 5.76,高于其它处理,显著高于 JD3 和 JD4 处理。JD2 株丛生长状况最佳,Ⅰ级苗最多,占 66.67%;JD3、JD4 株丛长势最差,植株黄叶现象较严重,Ⅱ级苗以上植株少于 30.00%。因此,最佳继代增殖培养基为 MS+4.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg · L<sup>-1</sup> IBA,增殖倍数可达 5.76,长势Ⅱ级以上植株占 90.00%。

2.4 生根培养

2.4.1 PP<sub>333</sub>对生根时间的影响 由图 2 可知,不添加 PP<sub>333</sub>的处理没有生根,说明在基本培养基不能诱导鸢尾组培苗生根。在 0.1~1.0 mg · L<sup>-1</sup>范围内,随 PP<sub>333</sub>浓度增加,组培苗始生根天数先缩短后延长,浓度为 0.7 mg · L<sup>-1</sup>时,生根时间最短为 7 d。

2.4.2 PP<sub>333</sub>对组培苗生根的影响 在 0.1~1.0 mg · L<sup>-1</sup>范围内,随 PP<sub>333</sub>浓度增加,组培苗生根率、平均根条数、平均根长的曲线趋势是先升高,后降低,峰值均出现在 PP<sub>333</sub>为 0.7 mg · L<sup>-1</sup>,各指标峰值分别为 83.33%、5.6 和 3.5 cm。

图2 PP<sub>333</sub>浓度对有髯鸢尾组培苗生根的影响Fig. 2 Effect of PP<sub>333</sub> concentration on test-tube rooting of bearded *Iris*

2.4.3 生根和生长状况调查 将生根试管苗分为3个等级,Ⅰ级苗:植株长势好,根系粗壮,根条数>5,根长>3 cm,叶色深绿;Ⅱ级苗:植株长势较好,3<根条数<5,根长2~3 cm,叶色浅绿;Ⅲ级苗:植株长势一般,根细弱,根条数<3,根长<2 cm,叶色浅绿,偶有黄叶现象。根据此分级标准,对各处理进行综合评分,由表5可知,Ⅰ、Ⅱ级苗达到95%以上的处理有0.5、0.7、1.0。0.5 mg·L<sup>-1</sup>的处理Ⅱ级苗最多,达86.67%;0.7 mg·L<sup>-1</sup>处理的Ⅰ级苗最多,达73.33%,且没有Ⅲ级苗;1.0 mg·L<sup>-1</sup>处理的Ⅰ、Ⅱ级苗达到100.00%,但Ⅱ级苗占80.00%。综合各项指标,PP<sub>333</sub>浓度为0.7 mg·L<sup>-1</sup>是鸢尾组培苗生根的最适浓度,接种后7 d开始生根,25 d时生根率达83.33%,平均根条数为5.6条,平均根长3.5 cm;PP<sub>333</sub>浓度过高(大于0.7 mg·L<sup>-1</sup>)会抑制组培苗的生根。

表5 有髯鸢尾组培苗在不同浓度PP<sub>333</sub>处理的生根分级情况Table 5 Rooted seedlings grade of bearded *Iris* under different PP<sub>333</sub> treatments

PP <sub>333</sub> 浓度 PP <sub>333</sub> concentration/(mg·L <sup>-1</sup> )	生根苗分级 Rooted seedling grade/%		
	I	II	III
0	—	—	—
0.1	10.00	13.33	76.67
0.3	6.67	66.67	26.67
0.5	10.00	86.67	3.33
0.7	73.33	26.67	0.00
1.0	20.00	80.00	0.00

注:生根苗分级用每个处理中各级苗占总数的百分数表示。

Note: Rooted seedling grade is expressed in every treatment by a percentage of the total plantlet.

## 2.5 练苗时间与移栽基质筛选试验

随着练苗时间的增加,瓶中试管苗的叶片有干枯变黄现象,可能是开瓶后瓶内湿度下降,导致瓶内组培苗

叶片缺水造成的。但在3种基质中,无论组培苗是否进行练苗,移栽20 d后,生长状况均良好健壮。

以蛭石为基质的处理,各项指标均显著高于或极显著高于其它2种基质,且新生叶片生长较快。可能是蛭石较疏松,通透性好,且保水力强,栽植后根系与基质结合紧密,适于根系生长,缓苗期短。

在草炭基质中,组培苗移栽成活率最低,但平均苗高极显著高于混合基质。草炭保水性能好,但与根系的结合不紧密,因此水分供应不均匀,造成缓苗期长、成活率低,然而一旦成活,由于草炭含有丰富的养分,可以促进植株的迅速生长。

混合基质综合了2种基质的物理性质,因此缓苗期介于二者之间,移栽成活率也介于二者之间,但营养成分不如草炭,造成组培苗生长缓慢,苗高值最低。

由表6、7可知,不同基质对组培苗移栽成活率和苗高影响较大,各基质间移栽成活率与苗高2项指标均呈

表6 有髯鸢尾组培苗练苗与移栽不同处理方差分析

Table 6 Analysis of hardening-seedling and transplanting of bearded *Iris* test-tube plantlet

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean squares	F值 F value	显著性 Significance
基质	移栽成活率	0.10	2.00	19.32	0.00
	苗高	367.52	2.00	183.76	0.00
练苗天数	移栽成活率	0.00	3.00	0.00	0.93
	苗高	13.80	3.00	4.60	0.58
基质×练苗时间	移栽成活率	0.00	6.00	0.00	0.95
	苗高	6.75	6.00	1.12	0.98
误差	移栽成活率	0.05	18.00	0.00	
	苗高	122.28	18.00	6.79	
总计	移栽成活率	20.45	30.00		
	苗高	8 724.49	30.00		

极显著差异,从移栽成活率上看,蛭石>混合基质>草炭;从苗高上看,蛭石>草炭>混合基质。因此,蛭石为组培苗移栽最适基质,移栽成活率和平均苗高分别为89.53%和20.29 cm。

从表6、8可以看出,不同练苗时间对组培苗移栽成活率和苗高无显著影响,组培苗生根后无需练苗,可直接移栽。

表7 不同基质的移栽成活率与苗高多重比较

Table 7 Multiple comparison of transplanting survival rate and seedling height in different bases

基质 Base	移栽成活率 Survival rate/%	苗高 Plant height/cm
蛭石	89.53aA	20.29aA
蛭石:草炭=1:1	81.72bB	12.14cB
草炭	74.78cC	17.79bA

表8 不同练苗时间的移栽成活率与苗高多重比较

Table 8 Multiple comparison of transplanting survival rate and seedling height of different hardening time

练苗时间 Hardening time/d	移栽成活率 Survival rate/%	苗高 Plant height/cm
2	81.22a	16.09a
1	82.43a	17.05a
0	82.48a	17.14a
3	82.72a	16.06a

### 3 讨论

#### 3.1 种胚获取与消毒

在有髯鸢尾的取胚过程中,需经过切割种皮、胚乳的过程,方能取出完整胚。相关研究<sup>[30-31]</sup>发现,大部分病毒不能在种子胚中存在,种胚培养可以排除无性繁殖中的污染问题。但因为有髯鸢尾种皮、胚乳厚重,切割不易,容易带入细菌,造成种胚接种后的污染,导致种胚培养的失败;且在该试验中,最佳消毒处理的污染率仍高达27.3%,污染较严重;因此,考虑有必要对剥取的完整胚进行二次消毒。又因离体胚材料过小,直接消毒很容易导致胚被杀死<sup>[32-33]</sup>。所以,在今后的工作中,应进一步对种胚二次消毒进行研究,注意种胚的二次消毒要严格筛选最佳试剂并控制消毒时间。

#### 3.2 种胚萌发

该试验发现,种胚接种后主要有2种生长方式:一种脱分化形成愈伤组织,再分化出无菌苗;一种直接萌发长成幼苗,幼苗又有单苗与丛苗2种形态。在后续的培养中,无论是经过愈伤组织分化出的无菌苗还是种胚直接萌发长成的无菌苗,均苗相整齐,增殖显著。另外,在种胚直接萌发长成幼苗的过程中,观察到种胚萌发时首先出现下胚轴,继而根环处膨大产生下胚轴毛;而后胚芽的位置开始膨大,长出子叶;再后胚根进一步发育,形成根系。这说明有髯鸢尾种胚苗端发育先于根端。

这与张超<sup>[34]</sup>、孙颖<sup>[35]</sup>、刘强等<sup>[36]</sup>关于鸢尾属植物种子萌发特性的研究结果相同。

#### 3.3 继代复壮

该试验继代增殖11代后,无菌苗普遍出现增殖倍数降低、生长缓慢、株丛矮化等现象,也出现了玻璃化苗、褐化苗、株丛退化等现象,这可能是无菌苗继代次数增多,体内激素积累过多导致的<sup>[37-38]</sup>,这时就需要对无菌苗进行复壮培养。在该试验生根过程中,发现PP<sub>333</sub>不仅能显著促进无菌苗生根,且株丛生长健壮,叶片浓绿;在后续培养中,将部分生根苗剪去根系,接种到最佳增殖培养基中继代培养,发现株丛叶片变宽变绿、生长状况较正常继代无菌苗健壮,增殖倍数也有所增加。这说明,PP<sub>333</sub>在一定程度上可能起到了壮苗的作用。魏鹏等<sup>[39]</sup>通过在增殖培养基中添加不同浓度的多效唑0.4~1.0 mg·L<sup>-1</sup>,发现鸢尾试管苗叶片伸长被控制、叶片变宽变绿、根状隐芽萌发系数提高,但未涉及到复壮的内容;吴建华等<sup>[3]</sup>研究提出有髯鸢尾‘常春黄’组培苗的最佳复壮培养基为MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.4 mg·L<sup>-1</sup> IBA+2.0 mg·L<sup>-1</sup> PP<sub>333</sub>。这说明利用PP<sub>333</sub>进行无菌苗的复壮有一定的可行性,在今后的研究中,可对有髯鸢尾组培苗复壮进行更加深入、系统的研究。

胚具有形成新植株的潜力,离体萌发容易;胚培养技术可以打破种子的休眠,提高萌发率,使出苗整齐;与茎尖、根茎或花蕾为外植体相比,种子胚具有取材方便、易消毒、萌发(诱导)率高、繁殖速度快等特点。通过该试验,在获得杂交种子当年就能成功培育出杂种无性系,通过1~2年的扩繁就能达到区域试验所需的种苗数量,比常规育种周期提前4~5年,可大大加快有髯鸢尾杂交育种工作的进程。

#### 参考文献

- [1] 郭翎. 鸢尾[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000:14-15.
- [2] 孙国峰,张金政. 有髯鸢尾栽培品种的育种简史[C]. 抓住2008年奥运机遇进一步提升北京城市园林绿化水平论文集,2008:180-184.
- [3] 吴建华,李永华. 有髯两季花鸢尾‘常春黄’组织培养快繁技术研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(33):18671-18672.
- [4] 黄苏珍,韩玉林,谢明云,等. 德国鸢尾的组织培养[J]. 江苏林业科技,2000,27(6):37-44.
- [5] 张金政,石雷,王平,等. 有髯鸢尾“常春黄”的组织培养[J]. 植物生理学报,2004,40(2):210.
- [6] 陈晨,毕晓颖,卢明艳,等. 德国鸢尾组织培养快速繁殖技术研究[J]. 沈阳农业大学学报,2010,41(1):27-32.
- [7] 张芳,董然,赵和祥,等. 德国鸢尾新品种‘魂断蓝桥’离体快繁的研究[J]. 北方园艺,2011(9):146-148.
- [8] 祝剑峰,李芬,袁宇明,等. 鸢尾组织培养快速繁殖技术研究[J]. 江西农业学报,2015,27(5):25-28.
- [9] 董艳芳,郭彩霞,周媛,等. 2种德国鸢尾组织培养体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(2):107-112.
- [10] 李朝伟,姚彬,苗苗,等. 不同品种小麦成熟胚愈伤组织的诱导与分

- 化[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(13): 3279-3282.
- [11] 王军虹, 郑成成, 于晶. 冬小麦‘东农冬麦 1 号’成熟胚组织培养及再生体系建立[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(11): 8-15.
- [12] 刘洋, 王根平, 王超杰, 等. 普通小麦新品种陕农 33 未成熟胚高频再生体系的建立[J]. 西北农业学报, 2015, 24(2): 51-58.
- [13] 李国圣, 张卿伟, 张举仁, 等. 玉米丛生芽体系的建立及抗除草剂转基因植株再生[J]. 中国科学, 2001, 31(5): 385-391.
- [14] 袁鹰, 刘德璞, 郑培和, 等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(1): 9-12.
- [15] 徐平丽, 单雷, 王传堂, 等. 花生胚轴丛生芽的诱导和植株再生[J]. 花生科技, 1999(增刊): 254-256.
- [16] 梁春莉, 赵锦, 刘孟军, 等. 冬枣极早期幼胚培养成苗技术研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(10): 2115-2124.
- [17] 李明, 赵改荣, 刘聪利, 等. 早熟欧洲甜樱桃高效胚培养成苗技术研究[J]. 果树学报, 2014, 31(增刊): 70-73.
- [18] 郭素娟, 孙小兵, 秦天天, 等. 板栗成熟胚再生体系的建立与优化[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(3): 89-93.
- [19] 张智英, 张旺林. 核桃杂交胚的离体培养研究[J]. 农业科技通讯, 2015(8): 153-154.
- [20] 胡紫璟, 毛娟, 赵长增, 等. ‘李广杏’幼胚的离体培养[J]. 甘肃农业大学学报, 2015, 6(3): 97-101.
- [21] 方志荣, 蔡光泽. 珙桐未成熟胚的萌发及植株再生的研究[J]. 西昌学院学报(自然科学版), 2015, 29(1): 7-10.
- [22] 买凯乐, 邵砾群, 李荣珍, 等. 油松成熟胚培养不定芽状态对其生根状况的影响[J]. 林业科学, 2014, 50(5): 147-153.
- [23] 沈苗苗. 观赏芍药胚培养及茎段愈伤组织诱导研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- [24] 何桂梅. 牡丹远缘杂交育种及其胚培养与体细胞胚发生的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
- [25] 曾宋君, 程式君, 张京丽, 等. 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究[J]. 园艺学报, 1998, 25(1): 75-80.
- [26] 李玉萍, 罗凤霞, 汤庚国, 等. 兰属植物杂交亲和性及杂交胚培养研究[J]. 林业科技开发, 2015, 29(5): 14-17.
- [27] 李球红, 宋华东, 周文怡, 等. 桂花幼胚离体培养形成丛生苗[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2015, 14(5): 507-510.
- [28] 陈宜栋, 郁书君, 杨玉勇. 八仙花杂交种胚培养研究[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2015, 28(1): 17-20.
- [29] 庄春慧, 陈荀, 付尧, 等. 玉蝉花种胚的丛生芽诱导和植株再生技术[J]. 草业科学, 2014, 31(9): 1712-1717.
- [30] 张涛, 于水亮. 花卉组织培养研究概况[J]. 河北林学院学报, 1994, 9(4): 358-362.
- [31] 王大元. 果树的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1980(5): 1-4.
- [32] 李玉萍, 李红玲, 应浩. 冬小麦成熟胚离体培养中的消毒处理研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(15): 7764-7766.
- [33] 王洪振, 陈徐, 黄二冲, 等. 玉米种子消毒条件的优化及成熟胚愈伤组织诱导的研究[J]. 吉林师范大学学报, 2014(4): 91-94.
- [34] 张超. 鸢尾种子萌发的奇特现象[J]. 植物杂志, 2002(2): 38.
- [35] 孙颖. 东北野生鸢尾属 6 种植物种子生物学及种苗发育过程的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.
- [36] 刘强, 刘剑锋, 程云清, 等. 野鸢尾种子至种苗的发育形态学[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(2): 23-25.
- [37] 蒙爱东, 余丽莹, 董青松, 等. 铁皮石斛原球茎常温保存研究[J]. 广西植物, 2009, 29(6): 808-811.
- [38] 王文静, 王鹏, 左金森. 鸢尾组织培养中防褐化技术研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 6858-6859.
- [39] 魏鹏, 任杰, 吴建华. 多效唑对鸢尾试管苗增殖效应的影响[J]. 北方园艺, 2010(13): 154-156.

## Regeneration System for Mature Embryo of Beared *Irises* Hybrid Seeds

ZHANG Quanfeng<sup>1,2</sup>, YIN Xinyan<sup>1,2</sup>, CHU Boyan<sup>1,2</sup>, JIA Hongshan<sup>3</sup>, LI Jinxia<sup>1,2</sup>, ZHAO Yufen<sup>1,2</sup>

(1. Hebei Academy of Forestry Science, Shijiazhuang, Hebei 050061; 2. Hebei Engineering Center for Trees Varieties, Shijiazhuang, Hebei 050061; 3. College of Landscape and Travel, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** Mature embryo of beared *Irises* (*geranica* cv. ‘Baiyulan’ × *germanica* × ‘Indian chief’) hybrid seeds were selected as materials. By tissue culture, the effect of disinfection methods, different types and concentrations of growth hormones on the development of seed embryo and plantlet formation was studied. The results showed that the optimal culture medium for mature embryogenesis was MS + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> IBA, the rate of embryo germination and seedling formation could reach 86.6% and 85.0%. During the proliferating period of clustered shoots, the medium of MS + 4.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> IBA showed the best effect. The multiplication coefficient was 5.76. MS + 0.7 mg · L<sup>-1</sup> PP<sub>333</sub> was the optimum for rooting. The majority of root after seven days started to grow, and the rooting rate was 83.33%. Vermiculite was the best transplanting medium for rooting plantlets. The transplant survival percent was 89.53% without hardening-seedling.

**Keywords:** beared *Irises*; hybrid seeds; mature embryo; culture; seedling formation