

# 百子莲组培快繁与植株再生

刘芳伊, 高永鹤, 尚爱芹

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

**摘要:**以百子莲为试材,研究了百子莲的无菌播种、组培快繁及植株再生。结果表明:百子莲成熟种子最佳的消毒方法:70%酒精消毒 1 min,然后用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  灭菌 3 min。将种子接种在不添加植物调节剂的 MS 培养基上,发芽状况良好;切取幼苗基部进行增殖培养,增殖的最佳培养基为 MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。最佳外植体为去根的无菌苗,最佳不定芽分化培养基为 MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,其不定芽分化率达 92%。在 1/2MS+IAA 0.5 mg/L 培养基上,生根率达 80%。驯化移栽后,其成活率达 90%。

**关键词:**百子莲;无菌播种;组培培养;植株再生

**中图分类号:**S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)13-0121-04

百子莲属(*Agapanthus*)植物是一种非常优秀的园林花卉,原产南非,于 1692 年从好望角传入英国。1679 年在欧洲第一次发布的百子莲的名字叫非洲水仙。之后 Linnaeus 开始提出非洲百合(又叫爱情花)叫法,直到现在欧美仍沿用此名<sup>[1]</sup>。它的种类丰富,叶形秀丽,花朵姿态优美,花期持续时间长。百子莲的抗性较强,各种土壤类型均可生长,喜湿润土壤,也较耐旱。目前,人工培育出很多品种,广泛地应用于切花生产、园林美化、药用成分提取等方面<sup>[2-3]</sup>。Sakae S. 等<sup>[4-5]</sup>建立了百子莲遗传转化体系,并试图通过基因工程手段培育新品种。但我国对百子莲引种栽培较晚,各方面的研究尚在起步阶段,卓丽环<sup>[6]</sup>、孙颖<sup>[7]</sup>等对百子莲的繁育系统进行了系统研究,但组织培养研究方面的资料较少,其组培快繁及植株再生尚未见报道。

该研究通过种子在无菌条件下萌发而获得无菌植株,进一步开展组织培养工作。通过组培快繁,可以周年生产,在比常规育苗节省大量空间的基础上获得大量的商品苗,从而满足都市园林绿化的需要,推动此花卉在我国的广泛应用,增加北方园林绿化苗木种类。该研究建立了百子莲无性快繁技术体系,为百子莲规模化育苗、利用基因工程技术实现对百子莲遗传转化以及改良百子莲种质奠定了技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

百子莲品种 *A. praecox*ssp. *praecox* 'Floribunda' 种植在河北农业大学花卉温室,该研究以其饱满种子为试验材料。

### 1.2 试验方法

1.2.1 无菌种子的制备与接种 将百子莲种子从成熟果实中剥出,自然风干。将种子浸入 70%酒精消毒 1 min,然后用无菌水冲洗 3~4 次,随后用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  溶液处理(1、3、5、8 min),期间不断用玻璃棒搅拌,最后用无菌水冲洗 5~6 次,将种子直接接种在以下培养基上:(1)不含任何激素的 MS 培养基;(2)MS+6-BA 0.5 mg/L。观察其生长状态,并记录数据。待试管苗生长至 3.0~4.0 cm 时自基部切下,移至生根培养基,接种在培养基上在光照条件下进行预培养,待无菌苗长至 4 片真叶以上时,切去根部,以上部作为外植体。

1.2.2 接种种子培养基及培养方法 采用 MS 培养基和 MS+6-BA 0.5 mg/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L, pH 调整为 5.8~6.0。每个三角瓶中接入百子莲种子 10~15 个,从接种之日起,接种 2 周后统计污染率,4 周后统计死亡率、存活率。

1.2.3 试管苗的增殖培养 将无菌幼苗去除根部,接种到增殖培养基上,以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA、NAA。30 d 后统计结果。

1.2.4 不定芽的再生 将切掉根系的小苗及叶段(长 1 cm),接种到含不同植物激素浓度及组合的 MS 培养基上(激素配比见表 2)。每个处理最少接种 50 个外植体,3 次重复。接种 6 周后统计不定芽分化率及外植体平均不定芽个数。

1.2.5 叶片愈伤组织诱导 将叶片切成长约 1 cm 的小段接种在 MS 附加不同浓度 2,4-D(1、2、4、8 mg/L)的培养基上,以诱导愈伤组织。

第一作者简介:刘芳伊(1987-),女,在读硕士,现主要从事观赏植物遗传育种研究工作。

责任作者:尚爱芹(1969-),女,博士,副教授,现主要从事观赏植物遗传育种及基因工程育种研究工作。E-mail: shangaiqin@126.com。

基金项目:保定市科技支撑计划资助项目(102C001);河北农业大学大学生科技创新活动基金资助项目。

收稿日期:2011-04-14

1.2.6 再生苗的生根培养 当不定芽长到 3 cm 左右时,从基部切割下来,转接到附加不同浓度的生根培养基中进行生根培养。统计其生根率并观察其根系的生长状况。

1.2.7 培养条件 所有培养均在以下条件下进行:(25±2)℃,光照强度:1 500~2 000 lx,光照时间:14 h 光照,10 h 黑暗。

1.2.8 组培苗驯化与移栽 当组培苗生根后,于组培室中去掉三角瓶的瓶塞,晾瓶 7 d 后,用自来水洗去幼苗根部的琼脂,移栽于泥炭与蛭石等量混合的营养土中,先在人工气候箱中缓苗 7 d,然后置于温室中进行驯化锻炼,15 d 后正常管理。统计成活植株数量,计算成活率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理的消毒效果

对于有果实外皮严密包裹的未成熟种子,经过消毒处理污染率为 0,比成熟种子更易获得无菌材料。

表 1 不同消毒处理方法对种子污染率及萌发率的影响

消毒处理方法			接种数	污染数	污染率/%	萌发数	萌发率/%
70%酒精 3 min			30	21	70	—	—
70%酒精 1 min+HgCl <sub>2</sub>	HgCl <sub>2</sub> /%	处理时间/min					
	0.1	1	81	30	37	45	55.6
	0.1	3	90	3	3	84	93.3
	0.1	5	81	0	0	9	11.1
	0.1	8	80	0	0	0	0

2.2 不同的接种培养基对种子萌发的影响

将百子莲的种子消毒后无菌条件下接入 2 种培养基中,观察其生长情况,记录种子的生长情况(表 2)。从表 2 可看出,不加任何激素的 MS 基本培养基较 MS+6-BA 0.5 mg/L 的培养基更有利于幼胚的生长成苗。在不含任何激素的 MS 培养基上,该品种的发芽率比较高,但发芽不整齐,接种的第 7 天,只有少量的种子萌发(图 1),随着发芽时间的延长,发芽率逐渐提高,当接种 3 周左右时,其发芽率达到最高,为 88%(图 2)。出现此种情况可能和种子的饱满度有一定的关系,在以后的试验中还需加强对种子整齐度的进一步筛选。

表 2 2 种激素组成对未成熟种子幼胚生长的影响

天数 /d	幼胚生长情况	
	MS	MS+6-BA 0.5 mg/L
1	接种	接种
5	种子开始膨大	种子开始膨大
7	部分种子开始萌芽	种子膨大而畸形
21	幼苗发芽率达 88%,幼苗生长正常	少数种子萌发,但其幼苗不能正常生长

2.3 激素及其比对芽增殖的影响

当幼苗达 20~30 d 时,将幼苗的根系切除,将以上部分外植体接种于 MS 培养基上,附加 6-BA、NAA,

而对于成熟的种子,由于果实已经开裂,种子缺乏外界保护层,部分暴露于空气中,受污染的几率大大提高,因而消毒处理需要重视。为降低百子莲成熟种子的污染率,同时又不伤害或杀死种子,设计了以下成熟种子消毒处理方案,即单纯用酒精消毒和用酒精表面杀毒后再用升汞进行不同时间的消毒 2 种不同的消毒处理。从而选择适宜的灭菌剂,确定该灭菌剂最佳的处理时间。

由表 1 可知,方法 1 中只用酒精做消毒处理 3 min,污染率很高,说明只用酒精消毒不能够达到消毒的效果。方法 2 中的 70%酒精 1 min+0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液振荡 3 min 处理使种子污染率较低而萌发率较高(93.3%),有助于提高初次接种的数量和质量。其余的处理方法有的由于消毒处理时间过短,导致消毒不彻底,污染率高;有的由于消毒处理时间过长,导致消毒过度,污染率虽然为 0,但是萌发率偏低,致使种子死亡。



图 1 接种后 7 d 种子萌发情况(MS)

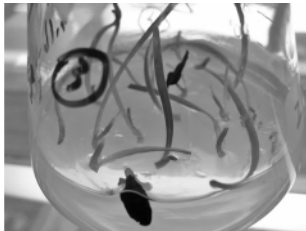


图 2 接种 3 周后种子的萌发情况(MS)

激素浓度配比及结果见表 3。由表 3 可知,6-BA 对百子莲增殖有重要影响,当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L, NAA 为 0.05、0.1 mg/L 时,其增殖系数分别为 2.2 和 3.4,二者差异不明显。但随着 6-BA 浓度的上升,其增殖系数逐渐增大,当 6-BA 浓度为 4 mg/L,其增殖系数最大,分别为 10 和 12(图 3)。但当 6-BA 浓度再升高时,其增殖系数又开始下降。可见 6-BA 对百子莲的增

殖起着重要作用,而 NAA 的影响不太显著,但各组合中 0.1 mg/L NAA 的增殖效果略好于 0.05 mg/L。因此百子莲的最佳增殖体系为 MS+6-BA 4 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

表 3 植物生长调节剂组合对芽增殖率的影响

处理	生长调节剂 /mg·L <sup>-1</sup>		芽增殖的情况		
	6-BA	NAA	接种数/个	增殖苗总数/个	增殖系数
1	1.0	0.05	30	36	2.2
2	1.0	0.1	30	102	3.4
3	2.0	0.05	30	30	5.0
4	2.0	0.1	30	78	6.6
5	4.0	0.05	30	30	10
6	4.0	0.1	30	135	12
7	6.0	0.05	30	30	3.0
8	6.0	0.1	30	45	4.5



图 3 接种 6 周后百子莲的增殖

2.4 不同外植体、不同激素及浓度配比对不定芽形成的影响

将百子莲根颈和叶片接种于附加不同植物生长调节物质的培养基上进行愈伤组织和不定芽的诱导。由表 4 可知,不同外植体的不定芽再生能力有很大差异,在相同的培养条件下,以叶片为外植体均没有愈伤组织及不定芽的形成。以根茎为外植体,不同细胞分裂素对愈伤组织及不定芽的形成也有很大区别。当根茎外植体接种 2 周后,其基部开始膨大,接种 3 周时有大量白色愈伤组织形成,接种 4 周时,有少量不定芽开始出现(图 4),继续培养至 6 周时,有大量不定芽开始形成(图 5)。该研究中不同浓度的 KT 和 NAA 组合均没有不定芽的形成。不同浓度的 6-BA 与 0.1 mg/L NAA 结合,均有愈伤组织及不定芽的形成,当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,其不定芽再生率仅为 40%,外植体

表 4 不同外植体、不同浓度及组合的植物激素对百子莲不定芽再生的影响

处理/mg·L <sup>-1</sup>		再生率/%		外植体平均不定芽数目/个	
细胞分裂素	生长素	根颈	叶片	根茎	叶片
6-BA	NAA				
	0.1	40	0	3	0
	0.1	72	0	5	0
	0.1	95	0	12	0
	0.1	80	0	6	0
	NAA				
KT	0.1	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	0

平均不定芽数只有 3 个,随着 6-BA 浓度的提高,其不定芽再生率快速上升,当 6-BA 浓度为 4.0 mg/L 时,其不定芽再生率达到最高,为 95%,外植体平均不定芽数目也达到最多,大多在 12 个以上,当 6-BA 浓度再增加时,其不定芽再生率及外植体平均不定芽数目均有所下降,因此 4.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 是百子莲不定芽最佳的诱导体系。



图 4 接种 3 周时不定芽的形成



图 5 接种 6 周时大量不定芽形成

2.5 叶片愈伤组织诱导

不同的外植体对不定芽的再生有很大的影响。以百子莲的叶片为外植体接种在含有不同浓度的细胞分裂素和生长素的培养基上,没有不定芽的形成,也没有出现愈伤组织。为了建立以叶片为外植体的再生体系,试验中再次以 2,4-D 作为主要生长调节剂来诱导愈伤组织的形成。2,4-D 通常是用来诱导愈伤组织的生长素,为了得到愈伤组织,该研究将细嫩的叶片切成约 1 cm 长的小段,接种到含不同浓度 2,4-D(1、2、4、8 mg/L)的培养基中,但是各处理均没有任何反应(数据略),可见百子莲的叶片对植物激素的反应极不敏感,因此,还有必要进一步研究以叶片为外植体,其愈伤组织和不定芽再生所需的最佳条件。

2.6 不定芽生根诱导(见表 5)

表 5 不同培养基对生根诱导的影响

编号	培养基	激素		生根率/%	均根数	均根长/cm
		IBA/mg·L <sup>-1</sup>	IAA/mg·L <sup>-1</sup>			
r1	MS	0.1	0	54	2	8.2
r2	MS	0	0.1	36	1	5
r3	MS	0.1	0.1	28	2	5.5
R1	MS	0.5	0	33	1	1.5
R2	MS	0	0.5	0	0	0
r4	1/2MS	0.1	0	62	2	3.7
r5	1/2MS	0	0.1	60	2	6.7
r6	1/2MS	0.1	0.1	60	2	3.5
R4	1/2MS	0.5	0	70	2	5.4
R5	1/2MS	0	0.5	80	2	5.7



图6 60 d后不定芽在培养基上生根状况

### 2.7 组培苗驯化与移栽

当组培苗形成完整根系以后,于组培室中去掉瓶塞,敞口晾瓶7 d,向培养瓶中倒入自来水,摇晃至琼脂散块。倒入大烧杯,用玻璃棒轻轻搅拌,使再生苗根系周围的琼脂全部脱落。最后用镊子轻夹小植株,涮洗苗根部残留的琼脂,移栽到泥炭与蛭石等量混合的营养土中(图7)中缓苗7 d,然后移入温室中锻炼。控制空气相对湿度从85%左右逐渐降低,开始时注意中遮荫。移栽后2~3 d不见光,以后逐渐增加光照强度和时



图7 移栽成活的幼苗

### 3 讨论与结论

外植体的类型对组培快繁成功起着重要作用,选择合适的外植体是成功建立快繁体系的重要前提<sup>[8]</sup>。因此,选择带菌少、容易获得的外植体就显得尤为重要。叶片是组织培养及植株再生常用的外植体,该研究以叶片为外植体未能得到愈伤组织,分析原因认为

百子莲为单子叶植物,需要生长素浓度较高,其最佳的诱导体系有待于进一步研究。但以百子莲成熟种子为试材,能够快速得到无菌苗。将无菌苗的根系切除,以上部分作为外植体,获得了较高增殖率。激素是影响植株再生的一个关键因素。激素的种类和比例对器官发生起决定作用。该研究中采用了6-BA和NAA结合的方法,结果表明,6-BA对百子莲增殖有着显著的促进作用,而当细胞分裂素采用KT时未能得到再生植株,至于其它的细胞分裂素和生长素对百子莲增殖效果如何还有待于进一步研究。

该研究首次建立了百子莲组织培养快繁及植株再生体系,不仅丰富了自身的基础理论,为基因工程育种研究提供快速而有效的平台,并且在实际生产中具有繁殖系数大、繁殖速度快、苗木整齐一致的特点,从而大大提高了生产效率和经济效益。

### 参考文献

- [1] 张伟艳. 百子莲属种子生物学和幼苗生长特性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [2] Veale D J H, Havlik I, Oliver D W, et al. Pharmacological effects of *Agapanthus Africanus* on the isolated rat uterus [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1999, 3(66): 257-262.
- [3] Kamara B I, Manong D T L, Brandt E V. Isolation and synthesis of a dimmeric dihydrochalcone from *Agapanthus Africanus* [J]. Phytochemistry, 2005, 10(66): 1126-1132.
- [4] Suzuki S, Supaibulwatana K, Mii M, et al. Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* ssp. *Orientalis* (Leighton) Leighton via *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli[J]. Plant science, 2001, 1(161): 89-97.
- [5] Suzuki S, Oota M, Nakano M. Embryogenic callus induction from leaf explants of the Liliaceous ornamental plant, *Agapanthus praecox* ssp. *Orientalis* (Leighton) Leighton Histological study and response to selective agents[J]. Scientia Horticulturae, 2002, 95: 123-132.
- [6] 卓丽环, 孙颖. 百子莲的花部特征与繁育系统观察[J]. 园艺学报, 2009, 36(11): 1697-1700.
- [7] 孙颖, 卓丽环. 百子莲的传粉昆虫及其访花行为研究[J]. 上海农业学报, 2009, 25(1): 87-91.
- [8] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.

## Tissue Culture and Plant Regeneration of *A. praecox* ssp. *praecox* 'Floribunda'

LIU Fang-yi, GAO Yong-he, SHANG Ai-qin

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

**Abstract:** The paper reported asepsis sowing, tissue culture, and adventitious bud regeneration of *A. praecox* ssp. *praecox* 'Floribunda'. The results showed that the mature seeds of agapanthus treated by 70% ethanol for 1 min and then treated by 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 3 min. The medium for the germination of seed was MS without any plant growth regulators. The optimum medium was MS medium containing 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L. The shoot regeneration medium was MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L. On the medium 1/2MS + IAA 0.5 mg/L, the elongated shoots rooted at the rate of 80% and the survival rate was 90% after transplant acclimatization.

**Key words:** *A. praecox* ssp. *praecox* 'Floribunda'; asepsis sowing; tissue culture; plant regeneration