

# 朱顶红组织培养研究进展

沈苗苗<sup>1</sup>, 于晓南<sup>1,2</sup>

(1. 北京林业大学 园林学院, 北京 100083; 2. 国家花卉工程技术中心, 北京 100083)

**摘要:**为了给朱顶红组织培养的发展提供有价值的参考,从基因型、外植体选择、切割方式和消毒、基本培养基选择、植物生长调节物质以及活性炭在组织培养中的影响等方面,综述了国内外对朱顶红组织培养的研究进展,提出了目前朱顶红组织培养在外植体的选择、培养基的筛选和激素的应用等方面还存在问题有待进一步研究解决。

**关键词:**朱顶红;组织培养;外植体;生长调节物质

**中图分类号:**S682.25

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2011)10-0135-04

朱顶红(*Amaryllis vittata*)又名孤挺花、百枝莲和喇叭花,为石蒜科朱顶红属植物<sup>[1]</sup>。朱顶红为多年生常绿草本植物,鳞茎卵状球形;叶4~8枚,二列状着生,略肉质<sup>[2]</sup>。花期为5月上旬至6月初。花茎自叶丛外侧抽出,为高60 cm左右的伞房花序,着花3~6朵,大型,漏斗状,花冠筒状,具裂片2轮,各3片,花色繁多,十分艳丽。朱顶红原产巴西和南非,性喜温暖湿润、阳光不过于强烈的环境,稍耐寒,在中国云南地区可全年露地栽培,华东地区稍加覆盖便可越冬,而华北地区仅作温室盆栽<sup>[2]</sup>。土壤要求富含腐殖质、疏松肥沃而排水良好的砂质壤土。朱顶红常用的繁殖方法主要有:自然分球、扦插和播种等,但是繁殖速度很慢,很难满足市场的需求。所以近年来,国内外已广泛采用鳞茎扦插、组织培养和刻伤法来繁殖,以加快其繁殖速度<sup>[3]</sup>。鳞茎扦插和刻伤法操作程序繁琐,成本高且生根率低,扦插苗长势弱,成苗率低。组织培养技术是目前植物快繁最有效的方法之一,具有繁殖系数高、成苗时间短和便于商品化和产业化生产的优势。虽然朱顶红的组培技术还没有投入到商品化生产,形成产业链,但国内外对朱顶红组织培养的研究一直不断。

## 1 基因型对不定芽诱导的影响

不同品种的朱顶红不定芽分化的差异很大。娄晓明等<sup>[4]</sup>对朱顶红品种苹果和杂交后代18的鳞茎进行诱导得出,杂交后代比外国引进品种更

难诱导出不定芽;张晓燕等在对朱顶红杂交品种库哈、奇妙的丁香和一普通国产品种朱顶红进行不定芽诱导时得出了相似的结论,即杂交朱顶红品种比普通品种难运用组培诱导增殖<sup>[5]</sup>;高年春等<sup>[3]</sup>对荷兰进口的朱顶红杂交种库哈、奇妙的丁香和橙色赛维进行不定芽诱导试验,结果表明,奇妙的丁香诱导频率最高。

## 2 外植体种类、切割方式和消毒方式对植株再生的影响

在无菌条件下培养的植物离体材料称为外植体<sup>[6]</sup>。包括顶芽、腋芽、茎段、茎尖、花瓣、叶片、叶柄和胚等。

### 2.1 外植体选择

在植物组织培养中,选择合适的植物材料是进行组织培养成功的关键。朱顶红组织培养中目前研究较多的是以鳞茎为外植体,很多研究者用朱顶红鳞茎诱导不定芽都取得了良好的效果<sup>[7-9]</sup>;朱顶红鳞茎诱导不定芽最适部位为鳞茎下部<sup>[4]</sup>,张松等<sup>[10]</sup>也指出鳞茎基部取材容易诱导出愈伤组织和不定芽;带有鳞茎盘的鳞片大部分能长出小鳞茎,而不带鳞茎盘的鳞片全未启动。外围鳞片的小鳞茎诱导率比里面的鳞片高得多<sup>[11]</sup>;王培军<sup>[12]</sup>用鳞茎的上部、中部和鳞茎盘作为外植体进行实验得出,用鳞茎盘作为外植体,污染率较低,死亡率和褐化率均为最低,愈伤组织的诱导频率高达92.5%,外植体的取材部位以鳞茎基部为佳。在用鳞茎盘作外植体的基础上,又有很多人提出了用双鳞片作为外植体。储成才等<sup>[13]</sup>的研究指出,朱顶红双鳞片是良好的外植体材料,双鳞片诱导除了最内层的鳞片外,诱导率由内向外增加。Chih Wei Huang等<sup>[14]</sup>的研究表明,在MS培养基上,用朱顶红鳞茎单鳞片培养能形成拟球

收稿日期:2011-04-26

第一作者简介:沈苗苗(1987-),女,安徽省六安市人,硕士,从事组织培养研究。E-mail:shenmiao2010@163.com。

通讯作者:于晓南(1974-),女,山东省文登市人,博士,副教授,从事园林植物研究。E-mail:yuxiaonan626@126.com。

体,然后发育为成熟幼苗,而双鳞片则可以直接诱导出小鳞茎;邵素娟等<sup>[15]</sup>用双鳞片法获得朱顶红组培苗,利用其小鳞茎为材料也获得了很好的试验效果;另外也有选择花梗、子房<sup>[16]</sup>和幼嫩的蒴果<sup>[17]</sup>等为外植体来诱导植株的报道,Saker-M 等还提出了用茎尖培养要好于鳞片的观点<sup>[18]</sup>。王纪方等早在 1989 年就用朱顶红花器官或鳞茎切块为材料组培成苗并观察其生长习性<sup>[19]</sup>。朱顶红无菌苗的鳞茎具有再切割诱导出芽的能力,而叶片却只能诱导出雪花状愈伤组织<sup>[20]</sup>。也有用朱顶红成熟种子长成的无菌苗下胚轴进行诱导实验<sup>[21]</sup>。Zimmerman<sup>[22]</sup>用未成熟的种胚对朱顶红的组织培养做了一定的研究。

## 2.2 外植体切割方式

朱顶红在进行鳞茎组织培养时,很多研究者认为其切割方式对其繁殖速率有很大的影响。切分方式不同对朱顶红鳞茎增殖具显著效应,偏离切分鳞茎可显著提高增殖系数,最高增殖系数可达 6.0,平均增殖系数为 3.6;而对半切分或未切分的增殖系数较低<sup>[23]</sup>。而邵素娟等<sup>[15]</sup>在利用双鳞片法得到的小苗的小鳞茎为材料进行试验时得出,小鳞茎四分切的繁殖系数高于二分切;切割代数不影响再切割成苗诱导率;在对不同品种朱顶红的不定芽进行诱导试验时,张晓燕等<sup>[5]</sup>验证了以横剖鳞茎和纵剖鳞茎的方式为最佳,其中横剖方式的不定芽诱导率最高,切除朱顶红鳞茎基部的叶片进行不定芽的诱导,诱导频率较低。

## 2.3 外植体消毒

对朱顶红外植体消毒方法的研究不是很多,很多科研工作者都没有对消毒条件作详细研究,但使用 HgCl 对朱顶红外植体进行消毒的方法似乎备受青睐,很多研究者在实验中都使用的 HgCl 消毒方式并取得了很好的效果<sup>[9-10]</sup>。孙红梅和宋丽娜<sup>[7]</sup>以大花朱顶红 Red Lion 鳞茎作外植体,研究了最佳外植体消毒方式,用 NaClO 与 HgCl 做比较,最后得出,朱顶红鳞茎的最佳外植体消毒方法为 0.1% 升汞浸泡 8 min,污染率仅为 5.0%,外植体正常生长;当然也有其它消毒方式的研究,邵素娟<sup>[20]</sup>在对朱顶红大球进行组织培养时证明了,朱顶红大球的最佳消毒条件为 45℃ 温水浸泡 35 min 后用饱和漂白粉溶液浸泡 12 min,此时的芽诱导率最高,达到 68.33%。Ilczuk 和 Winkelmann 等<sup>[24]</sup>在对朱顶红杂种 18 鳞茎进行组培时用 1.5% 的 NaClO 消毒 10 min,之后用 3 次无菌水冲洗的消毒方式。

## 3 基本培养基

培养基是植物组织培养的物质基础<sup>[6]</sup>。基本培养基包括大量元素和微量元素、维生素和氨基酸,还有糖和水等,常用的基本培养基有 MS、1/2MS、B5、WPM 和 White 等。朱顶红组织培养中应用较为广泛的是 1/2MS 和 MS 培养基。高年春等<sup>[3]</sup>在对几种杂交朱顶红进行不定芽诱导试验时用 MS 培养基作对照,将鳞茎接种在不同激素配比的 MS 或 1/2MS 培养基上,结果表明,1/2MS 培养基的诱导频率略高于 MS 培养基;刘群龙等<sup>[23]</sup>也在试验中得出了相似的结论,好以 1/2MS 有利于诱导腋芽直接萌发及根的诱导还成生长。张亚玲等在朱顶红最佳繁殖途径的研究中指出,MS 培养基直接诱导鳞茎中部位再生植株效果最好,LS 培养基直接诱导鳞茎下部位再生植株效果最好,1/2MS 对朱顶红生根效果最佳<sup>[9]</sup>。在对球根花卉唐菖蒲的组织培养中,有不少人应用液体震荡培养<sup>[24-25]</sup>,洋葱和大蒜也有相似的报道<sup>[26]</sup>。Ilczuk 等<sup>[27]</sup>的试验结果表明,液体培养是快速繁殖最有效的方法;但 Munoz M 等在对石蒜科植物组织培养实验中证明了液体培养的玻璃化率高达 16%~40%,而其植株驯化成功率只有 38%~69%<sup>[28]</sup>。Takayama 等的试验结果表明,在生物反应器中的繁殖速率比固体培养基要高<sup>[29]</sup>。用 TIS 系统比液体震荡培养有更高的繁殖速率<sup>[28]</sup>。张松等<sup>[10]</sup>将诱导产生的不定芽和胚状体接种在 MSO 培养基可以 100% 生根。

## 4 生长调节物质对植株再生的影响

生长调节物质包括生长抑制剂在植物繁殖特别是植物组织培养中起到非常关键的作用<sup>[30]</sup>,其中影响最显著的是生长素和细胞分裂素。

### 4.1 生长调节物质对鳞茎不定芽诱导的影响

在朱顶红鳞茎不定芽诱导时要选择合适的生长调节物质,而且细胞分裂素和生长素的比例至关重要。娄晓鸣等<sup>[4]</sup>在对朱顶红品种苹果和杂交后代 18 进行不定芽诱导时得出,不定芽发生最适培养基为 MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA,无论是诱导频率还是外植体诱导不定芽数均为最高;在朱顶红不定芽诱导试验中应用最多的激素组合是 NAA 和 6-BA,6-BA/NAA 的比值大小对朱顶红鳞茎外植体诱导形态发生有很大影响<sup>[7]</sup>,当然不同品种间适宜的激素配比也是有很大差异的。刘群龙<sup>[23]</sup>、田青松等<sup>[31]</sup>证明了朱顶红鳞茎增殖的最佳培养基为 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+

0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA;而也有一些研究者提出了朱顶红不定芽诱导的最佳培养基组合为 2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1 mg·L<sup>-1</sup> NAA<sup>[7,10,32-33]</sup>;高年春的最佳激素配比是 4.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+2.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA<sup>[3]</sup>,而邵素娟使用的最佳激素配比为 8 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1 mg·L<sup>-1</sup> NAA<sup>[20]</sup>;朱旭东等论证了最适不定芽诱导激素为 0.5 mg·L<sup>-1</sup> KT+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA,不定芽增殖激素 1.50 mg·L<sup>-1</sup> KT+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA<sup>[8]</sup>;在张松的试验中还论证了 NAA 的诱导效果优于 2,4-D,BA 优于 KT 的结论<sup>[10]</sup>。Mujib A 等<sup>[34]</sup>在美国杂交朱顶红的组培实验中,在含有 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 和 10% 耶乳的 MS 培养基中诱导愈伤组织,然后把愈伤组织置于富含 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BAP 和 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 的 NAA 的培养基上,获得了大量不定芽。Janet 等指出用 2,4-D 和 BAP 相结合可以增加再生植株的数量<sup>[35]</sup>,但是 Mori 等在试验中证明了细胞分裂素对于所研究的朱顶红植物材料没有影响<sup>[36]</sup>。

#### 4.2 生长调节物质对根诱导的影响

在对朱顶红的生根诱导中应用最多的是生长素 NAA,刘群龙用 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA 加活性炭使鳞茎的生根率达到了 100%<sup>[23]</sup>;田青松等在种子试管苗培养中显示生根的最佳激素为 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA<sup>[31]</sup>;纪春燕<sup>[21]</sup>在朱顶红种子下胚轴离体培养中用 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA 诱导生根达到了良好的效果。而在王培军<sup>[12]</sup>和邵素娟<sup>[20]</sup>的试验研究中用 BA 和 NAA 相结合的方式诱导生根。Bapat 和 Narayanaswamy 很早就提出了用 IAA 代替 NAA 来诱导小植株根的生成<sup>[37]</sup>,而张亚玲等<sup>[9]</sup>研究证明 1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA 的组合对朱顶红的生根效果最有效,而 Mujib A 等<sup>[34]</sup>也是用 IBA 来诱导不定芽生根的。

### 5 活性炭对朱顶红组织培养的影响

在朱顶红组织培养中活性炭的应用显得尤为重要,不管在启动阶段、增殖阶段还是生根培养中,在培养基中加入活性炭都能达到显著的效果。在朱顶红鳞茎增殖培养基中加入 2.0 g·L<sup>-1</sup> 的活性炭显著提高了鳞茎生根率,在生根培养基中加入 2.0 g·L<sup>-1</sup> 的活性炭使得生根率达到了 100%,而未加活性炭的生根率较低<sup>[23]</sup>;王培军在试验中指出活性炭是影响启动率的主要因素,对外植体褐变的防治也有一定作用,浓度为 1.0 g·L<sup>-1</sup> 启动培养效果最优<sup>[12]</sup>;高年春等也得出在不定芽诱导中有活性炭的处理效果明显好于没有活性炭的处

理<sup>[3]</sup>。在培养基中加入活性炭(AC)主要是为了吸附植物的有害泌出物,但活性炭对物质吸附的选择性很低,它同时也可能吸附某些植物必需的化合物<sup>[38]</sup>。孙红梅等的研究结果表明在朱顶红不定芽的诱导中加入 0.2 g·L<sup>-1</sup> VC 可直接诱导成完整植株;VC 对外植体褐变的抑制效果好于活性炭(AC)<sup>[7]</sup>。

### 6 朱顶红组培苗的移植

朱顶红组培苗诱导生根后,经 25 d 的自然光驯化后,移栽于壤土:腐叶土:河沙为 5:3:1(体积比)的基质中,成活率可达 98%<sup>[8]</sup>。不生根直接将不定芽移栽到消毒蛭石中,成活率为 85%以上<sup>[10]</sup>。

### 7 结论与讨论

朱顶红组织培养从 20 世纪 80 年代就开始研究了,但是到目前为止还没有形成系统。在外植体的选择、培养基的筛选和激素的应用等方面还不够完善。虽然经过多年来国内外科工作者不懈努力已有了一定的发展,但是真正要运用组培技术实现工厂化育苗,目前在技术上还存在不少困难。希望经过科研工作者的不断研究,朱顶红组织培养技术能尽快进入商品化生产。

#### 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] 刘燕. 花卉学[M]. 北京:中国林业出版社,2003.
- [3] 高年春,杨怡,曹荣祥,等. 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.
- [4] 娄晓鸣,周玉珍,孔贤,等. 杂交朱顶红鳞茎不定芽诱导研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(34):16769-16770.
- [5] 张晓燕,高年春,曹荣祥,等. 不同品种朱顶红不定芽的诱导实验[J]. 北京农业(科技论文),2007(9):40-41.
- [6] 沈海龙. 植物组织培养[M]. 北京:中国林业出版社,2005.
- [7] 孙红梅,宋利娜. 大花朱顶红鳞茎不定芽的诱导[J]. 中国农学通报,2010,26(14):247-250.
- [8] 朱旭东,田松青. 朱顶红的组织培养[J]. 江苏农业科学,2006(2):56-57.
- [9] 张亚玲,原雅玲,赵锦利. 朱顶红组织培养最佳繁殖途径的研究[C]. 王秀峰,李宪利. 中国园艺学会第七届青年学术讨论会论文集. 北京:中国农业出版社,2006.
- [10] 张松,达克东,曹辰兴,等. 朱顶红离体培养快速繁殖体系及胚状体发生[J]. 园艺学报,2002,29(3):285-287.
- [11] 陈扬春,鲁雪华. 朱顶红鳞片的试管培养[J]. 亚热带植物科学,1988(2):33-36.
- [12] 王培军. 朱顶红组织培养技术体系的建立及其相关研究[D]. 太谷:山西农业大学,2004.
- [13] 储成才,李大卫,余慧琳. 朱顶兰组织培养一次成苗[J]. 植物生理学通讯,1989(3):47.
- [14] Chih Wei Huang, Hiroshi Okubo, Shunpei Uemoto. Com-

- parison of Bullet Formation from Twin Scales and Single Scales in *Hippeastrum hybridum* Cultured in Vitro[J]. Scientia Horticulturae, 1990, 42(1-2): 151-160.
- [15] 邵素娟, 史益敏. 朱顶红小鳞茎切割繁殖及其影响因素[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2008, 26(1): 5-8.
- [16] O'Rourke E N, Fountain W M, Sharghi S. Propagation of *Hippeastrum* from floral tissues by in vitro culture[J]. *Herbertia*, 1991, 47(1): 51-52.
- [17] 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.
- [18] Saker, Rady, El-Bahr. Towards commercial production of ornamental bulbs in vitro[J]. *Egyptian Journal of Horticulture*, 1998, 25(1): 113-128.
- [19] 王纪方, 贾春兰, 金波. 朱顶红组培株生长习性的观察[J]. 中国农业科学, 1989, 22(1): 53-56.
- [20] 邵素娟. 朱顶红快繁技术研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [21] 纪春艳. 朱顶红种子下胚轴离体培养与植株再生的研究[J]. 北方园艺, 2008(6): 190-191.
- [22] Zimmerman R H. Tissue culture as a plant production system for Horticultural crops[M]. New York: Martinus nig-hoff publishers, 1986.
- [23] 刘群龙, 段国锋, 周兰. 朱顶红鳞茎芽诱导及植株再生体系的建立[J]. 西北植物学报, 2007, 27(12): 2551-2554.
- [24] Nhut D T, da Silva J A T, Huyen P X, et al. The importance of explant source on regeneration and micropropagation of *Gladiolus* by liquid shake culture[J]. *Scientia Horticulturae*, 2004, 102(4): 407-414.
- [25] Prasad V S S, Gupta S D. In vitro shoot regeneration of *gladiolus* in semi-solid agar versus liquid cultures with support systems [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2006, 87(3): 263-271.
- [26] Mukhopadhyay M J, Sengupta P, Mukhopadhyay S, et al. In vitro stable regeneration of onion and garlic from suspension culture and chromosomal instability in solid callus culture[J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, 104(1): 1-9.
- [27] Munoz M, Seemann P, Jara G, et al. Influence of vessel type, physical state of medium and temporary immersion on the micropropagation of three rhodophiala species[J]. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2009, 69(4): 581-587.
- [28] Ilczuk A, Winkelmann T, Richartz S, et al. In vitro propagation of *Hippeastrum* × *chmielei* Chm. -influence of flurprimidol and the culture in solid or liquid medium and in temporary immersion systems[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 83: 339-346.
- [29] Takayama S, Yokokawa A. Effect of abscisic acid and light irradiation on mass propagation of *Hippeastrum hybridum* Hort in shake and jar fermentor culture[J]. *Japan Soc. High Technol. Agric.*, 1996(8): 168-174.
- [30] Ziv M. The contribution of biotechnology to breeding, propagation and disease resistance in geophytes[J]. *Acta Hort.*, 1997, 430: 247-258.
- [31] 田松青, 朱旭东, 成海钟, 等. 朱顶红不同繁殖方法比较研究[J]. 江苏农业科学, 2008(5): 153-156.
- [32] 裴东升. 植物生长调节剂对朱顶红不定芽诱导影响的研究[J]. 山西农业科学, 2008, 36(6): 62-63.
- [33] 张亚玲, 张延龙, 原雅玲. 6-BA 和 NAA 对朱顶红组织培养的影响[J]. 陕西林业科技, 2006(1): 7-9.
- [34] Mujib A, Banerjee S, Ghosh P D. Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture-raised *hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations)[J]. *Propagation of Ornamental Plants*, 2007, 7(4): 169-174.
- [35] Janet E A, Seabrook Bruce G, Cumming. The in vitro propagation of *amaryllis* (*Hippeastrum* spp. Hybrids)[J]. *In vitro cellular & Developmental biology-plant*, 1977, 13(12): 831-836.
- [36] M Mii, T Mori, N Iwase. Formation from the excised bulb scales of *hippeastrum hybridum* in vitro[J]. *hort. Sci.*, 1974, 49: 241-244.
- [37] Bapat V A, Narayanaswamy S. Growth and organogenesis in explanted tissues of *Amaryllis* in culture[J]. *Bull. Torrey Bot. Club*, 1976, 103: 53-56.
- [38] Altman A. Horticultural Biotechnology, a historical perspective and future prospects[J]. *Acta Hort.*, 1997(447): 31-35.

## Research Advances on the Tissue Culture of *Amaryllis vittata*

SHEN Miao-miao<sup>1</sup>, YU Xiao-nan<sup>1,2</sup>

(1. Landscape Architectural College of Beijing Forestry University, Beijing 100083; 2. National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing 100083)

**Abstract:** In order to provide some valuable references for the development of the tissue culture of *Amaryllis vittata*, the research situations of the tissue culture of *Amaryllis Vittata* at home and abroad were summarized from the aspects of the variety, explant selection, cutting and disinfection, basic medium selection, plant growth regulators, activated carbon and so on. The existing problems in the aspects of explant selection, basic medium selection and application of hormone in the current tissue culture of *A. vittata* were pointed out to further study in the future.

**Key words:** *Amaryllis Vittata*; tissue culture; explants; plant growth regulators