

君子兰花器官离体培养

邢桂梅, 毕晓颖, 雷家军*

(沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161)

摘要: 以君子兰品种‘油匠’的花瓣、花丝、胚珠等花器官为外植体进行离体培养, 结果表明: 采用 0.1% 升汞消毒 10 min, 花器官外植体污染率较低, 仅为 9.9%; 不同花器官外植体愈伤组织诱导与分化能力不同, 花瓣的愈伤组织诱导率和分化率最高, 分别达到 15.6% 和 57.1%; 花瓣外植体诱导愈伤组织和分化成苗的能力与花蕾大小、植物生长调节剂及蔗糖浓度等因素有关, 最适培养基为 MS + 2,4-D 2.0 mg · L⁻¹ + BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + 蔗糖 3.0%, 适宜的花蕾长度为 0.6 ~ 1.0 cm。蔗糖浓度为 3% 时, 花器官外植体愈伤组织诱导率与分化成苗率较高。

关键词: 君子兰; 花器官; 离体培养

中图分类号: S 682.1⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1563-06

Floral Organ *in Vitro* Culture of *Clivia miniata* Regei

XING Gui-mei, BI Xiao-ying, and LEI Jia-jun*

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The petal, filament and ovule of *Clivia miniata* Regei ‘Youjiang’ were used as explants for *in vitro* culture. The results showed that the explants disinfected with 0.1% HgCl₂ for 10 min were most effective with the average contamination rate of 9.9%. The rates of induction and differentiation of three kinds of floral organ explants were different. The petals had the highest induction and differentiation rates of 15.6% and 57.1%, respectively. There was direct relationship between percentage of induction and differentiation of petals and size of flower buds, concentration of hormone and sucrose. The rates of callus induction and differentiation were the highest when the length of flower bud was 0.6 – 1.0 cm. The optimum medium was MS + 2,4-D 2.0 mg · L⁻¹ + BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + 3.0% sucrose. The rate of induction and differentiation of floral organ explants was much higher while the concentration of sucrose was 3%.

Key words: *Clivia miniata* Regei; Floral organ; Tissue culture

目前君子兰 (*Clivia miniata* Regei) 生产主要采用播种和分株繁殖。但君子兰为高度杂合体, 播种繁殖难以保持其优良性状 (陈宣耀, 2004; 郭文场, 2004), 而分株繁殖系数低, 繁殖速度慢 (谢成元, 1982; 荣玉艺, 1983), 远远不能满足商品化生产的需求。为此, 许多学者开始探索利用组织培养技术快速繁殖君子兰, 但进展较缓慢 (刘敏和舒金生, 1984; 陈为民, 1986; Finnie, 1998)。

本试验旨在利用君子兰花器官为外植体, 对其诱导愈伤组织与分化成苗进一步进行较系统的探索研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材取自沈阳农业大学花卉基地, 君子兰品种为‘油匠’, 温室内正常盆栽管理。2005 年 3 ~ 4

收稿日期: 2007-04-19; 修回日期: 2007-09-01

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jiajunlei@yahoo.com.cn)

月在君子兰刚刚抽箭时,选取幼小的花蕾用于接种,花蕾依据长度分为4级:0.1~0.5、0.6~1.0、1.1~1.5、1.6~2.0 cm。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒

花蕾分别采用不消毒、70%酒精棉球擦拭、0.1%升汞消毒5 min、0.1%升汞消毒10 min 4种方法进行处理,然后用无菌水冲洗4~5次,在超净工作台上剥取花瓣、花丝、胚珠接种于培养基上,每个处理8瓶,每瓶6~8个外植体。培养1周后调查污染情况,污染率(%)=(污染外植体数/接种外植体)×100。

1.2.2 愈伤组织诱导和分化

在MS培养基中附加不同浓度的2,4-D、BA、NAA和IBA,蔗糖浓度3%,用于筛选诱导愈伤组织和分化最佳培养基;将MS+2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基的蔗糖浓度设为2%、3%、4%,每个处理分别接种花瓣、花丝、胚珠3种外植体,比较蔗糖浓度对其离体培养再生的影响;在MS+2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖3%培养基上,接种花瓣、花丝、胚珠,比较不同外植体离体培养再生效果,接种不同大小花蕾的花瓣,用于筛选花瓣离体培养的适宜花蕾大小。

上述培养基琼脂用量 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8。接种的外植体用同种培养基每3周继代1次。培养室温度24℃,光照强度2000 lx,每天光照12 h。以上每个处理接种8瓶,每瓶6~8个外植体。定期记录观察外植体生长、诱导和分化情况。10周时调查愈伤组织诱导情况,诱导率(%)=(诱导愈伤组织外植体数/接种外植体数)×100,30周时统计分化成苗数,分化率(%)=(分化成苗外植体数/诱导愈伤组织外植体数)×100。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法对花器官外植体接种污染的影响

从表1可以看出,没有经过消毒的外植体接种后污染率较高,仅用70%酒精棉球擦拭的外植体污染率也较高,用0.1%升汞消毒5 min或10 min后接种的外植体污染率均较低,说明用0.1%升汞消毒对降低花器官接种污染有一定效果。

表1 不同消毒方法对君子兰花器官外植体接种污染的影响
Table 1 Effects of different disinfection methods on contamination of floral organ explants of *Clivia miniata* Regei 'Youjiang'

消毒方法 Methods of disinfection	外植体 Explants	接种外植体数 Number of explants incubated	污染外植体数 Number of explants contaminated	污染率 Rate of contami- nation (%)	平均污染率 Average rate of contamination (%)
不消毒 No disinfection	花瓣 Petal	59	22	37.3	26.1
	花丝 Filament	54	15	27.8	
	胚珠 Ovule	60	8	13.3	
70%酒精擦拭 Cleaning with 70% alcohol	花瓣 Petal	53	19	35.8	22.1
	花丝 Filament	49	10	20.4	
	胚珠 Ovule	50	5	10.0	
0.1%升汞5 min 0.1% HgCl ₂ for 5 min	花瓣 Petal	46	9	19.6	13.0
	花丝 Filament	57	6	10.5	
	胚珠 Ovule	55	5	9.0	
0.1%升汞10 min 0.1% HgCl ₂ for 10 min	花瓣 Petal	60	8	13.3	9.9
	花丝 Filament	58	5	8.6	
	胚珠 Ovule	52	5	8.0	

3 种外植体中, 花瓣的污染率最高, 其次是花丝, 胚珠最低。且用 3 种消毒方法, 胚珠的污染率均较低, 可能是由于花瓣裸露在外易受细菌侵染, 而花丝和胚珠生长在由花瓣所包被的无菌环境中, 所以污染率很低。

2.2 植物生长调节剂对外植体愈伤组织诱导及分化的影响

将花瓣接种于附加不同浓度 2,4-D、BA、NAA、IBA 的 5 种培养基上, 结果 (表 2) 表明, 在 MS + 2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上外植体愈伤组织诱导率与分化率最高, 分别达到 15.6% 与 57.1%。随着 BA 浓度的升高, 外植体愈伤组织诱导与分化的能力有所降低, 可见, 较低浓度的 BA 与 2,4-D、NAA 配合有利于花瓣外植体的诱导与分化。在 BA 与 NAA、IBA 组合的 1 号、2 号培养基上均未见愈伤组织形成, 说明附加 2,4-D 对愈伤组织诱导有利。

表 2 植物生长调节剂对君子兰花瓣外植体愈伤组织诱导及分化的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on induction and differentiation of petals explants in *Clivia miniata* Regei 'Youjiang'

培养基号 No. of media	浓度 Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)				接种外植体数 Number of explants incubated	形成愈伤组织的外 植体数 Number of explants induced	诱导率 Rate of callus induction (%)	分化成苗的外植体数 Number of explants differentiated	分化率 Rate of differentiation (%)
	2,4-D	BA	NAA	IBA					
1		1.0	1.0	1.0	50	0	0.0	0	0.0
2		1.0	3.0	1.0	48	0	0.0	0	0.0
3	2.0	4.0	0.5		56	5	8.9	2	40.0
4	2.0	2.0	0.5		49	7	14.2	3	42.8
5	2.0	1.0	0.5		45	7	15.6	4	57.1

2.3 蔗糖浓度对外植体愈伤组织诱导及分化的影响

蔗糖浓度为 3% 时, 3 种花器官外植体愈伤组织诱导率均较低, 但分化率均最高 (表 3)。蔗糖浓度为 2%、4% 时, 虽然花器官的愈伤组织诱导率很高, 但分化率很低, 其中胚珠外植体愈伤组织分化率为 0, 可见, 诱导愈伤组织培养基适宜的蔗糖浓度为 3%。

表 3 蔗糖浓度对君子兰花器官外植体愈伤组织诱导及分化的影响

Table 3 Effects of concentration of sucrose on induction and differentiation of three floral organ explants in *Clivia miniata* Regei 'Youjiang'

外植体 Explants	蔗糖浓度 Concentration of sucrose (%)	接种外植体数 Number of explants incubated	形成愈伤组织的外植 体数 Number of explants induced	诱导率 Rate of callus induction (%)	分化成苗的外植体数 Number of explants differentiated	分化率 Rate of differentiation (%)
花瓣 Petal	2	58	6	12.7	2	33.3
	3	45	7	15.6	4	57.1
	4	60	20	33.3	5	25.0
花丝 Filament	2	55	15	27.2	3	20.0
	3	50	7	14.0	3	42.8
	4	58	22	37.9	3	13.6
胚珠 Ovule	2	49	25	51.0	0	0.0
	3	48	20	41.7	3	15.0
	4	43	36	83.7	0	0.0

2.4 不同花器官外植体愈伤组织诱导与分化的比较

试验观察到, 君子兰花器官离体培养过程中愈伤组织诱导与分化均十分缓慢。花瓣、花丝、胚珠 3 种外植体中, 花瓣外植体的愈伤组织诱导率和分化率最高, 分别为 15.6% 与 57.1% (表 4)。

表 4 君子兰不同花器官外植体愈伤组织诱导及分化的比较

Table 4 The induction and differentiation of three floral organ explants in *Clivia miniata* Regei 'Youjiang'

外植体 Explants	接种外植体数 Number of explants incubated	形成愈伤组织的外植体数 Number of explants induced	诱导率 Rate of callus induction (%)	分化成苗的外植体数 Number of explants differentiated	分化率 Rate of differentiation (%)
花瓣 Petal	45	7	15.6	4	57.1
花丝 Filament	50	7	14.0	3	42.8
胚珠 Ovule	48	20	41.7	3	15.0

新接种花瓣外植体为淡黄绿色 (图 1, A), 2 周后少数外植体变为黄色, 表面有光泽, 4 周后转为深绿色, 花瓣生长扭曲, 8 周后花瓣基部开始形成愈伤组织, 10 周后愈伤组织出现绿色突起, 28 周后分化出芽 (图 1, B), 38 周后每个外植体上平均分化出芽 3.8 个, 最多达 13 个 (图 1, C)。

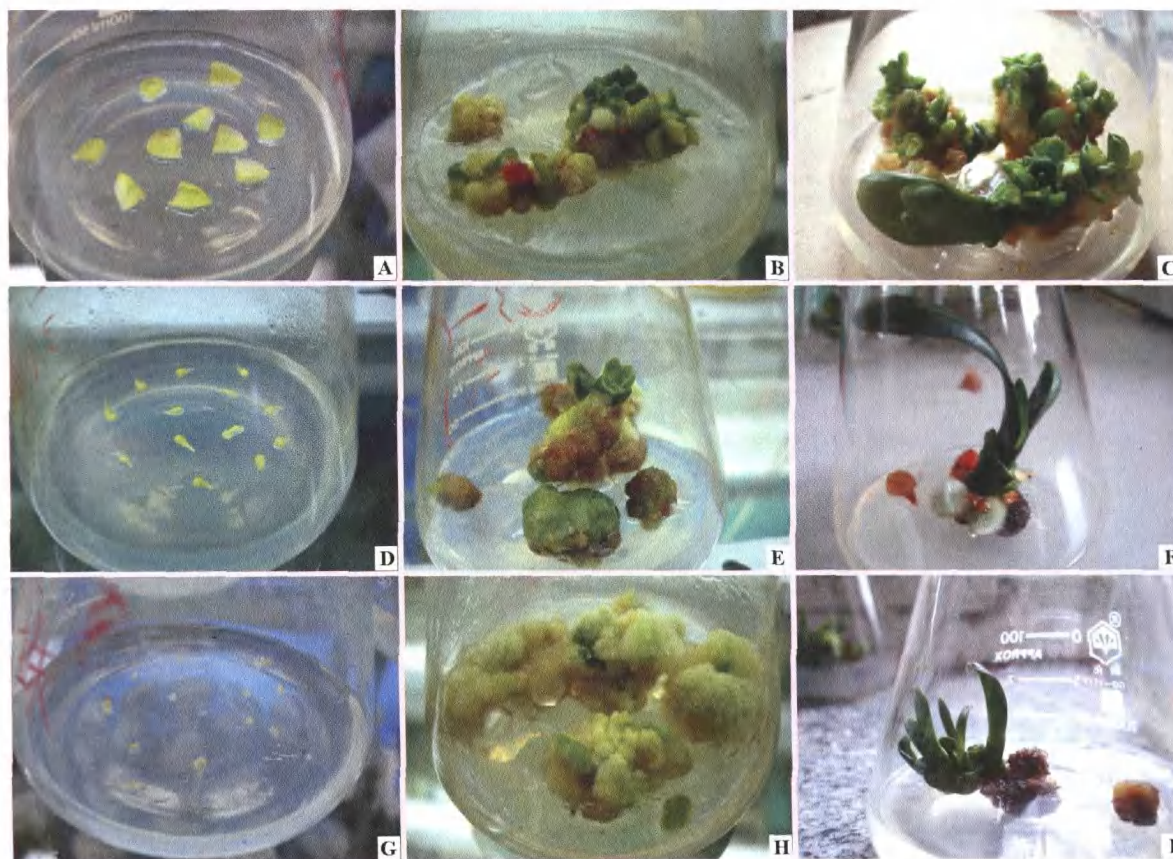


图 1 君子兰花器官离体培养愈伤组织诱导与分化

- A. 刚接种的花瓣外植体; B. 28 周后花瓣外植体分化出的芽; C. 38 周后花瓣外植体芽的增殖; D. 刚接种的花丝外植体;
E. 29 周后花丝由愈伤组织分化出芽; F. 30 周后花丝外植体的再生苗; G. 刚接种的胚珠外植体;
H. 10 周后胚珠形成的愈伤组织; I. 32 周后胚珠外植体的再生苗。

Fig. 1 Callus induction and differentiation from floral organ explants *in vitro* culture of scarlet kaffir lily (*Clivia miniata* Regei) 'Youjiang'

- A. Petal explants inoculated just; B. Buds differentiated from callus of petal explants after culturing 28 weeks;
C. Buds multiplied from callus of petal explants after culturing 38 weeks; D. Filament explants inoculated just;
E. Buds differentiated from callus of filament explants after culturing 29 weeks;
F. Plantlets derived from filament explants directly after culturing 30 weeks;
G. Ovule explants inoculated just; H. Callus induced from ovule explants after culturing 10 weeks;
I. Plantlets differentiated from callus of ovule explants after culturing 32 weeks.

花丝外植体的愈伤组织诱导与分化率次之。新接种的花丝外植体为淡黄绿色(图1, D), 培养2周后, 一部分外植体变为黄色, 3周后转为黄绿色, 表面光亮, 8周后形成愈伤组织, 29周后由愈伤组织分化出芽(图1, E)。还有一小部分花丝外植体2周后开始膨大转绿, 色泽鲜艳, 24周时直接出芽, 30周后花丝外植体形成再生苗(图1, F)。

胚珠愈伤组织的诱导率最高, 达到41.7%, 但分化率最低, 仅为15.0%。新接种胚珠外植体为白色(图1, G), 10周形成疏松的愈伤组织(图1, H), 后期大量褐化死亡, 使芽分化率显著降低, 少数愈伤组织32周后分化成苗(图1, I)。

2.5 不同花蕾大小对花瓣外植体诱导和分化的影响

不同花蕾大小的花瓣外植体的愈伤组织诱导率和分化率差异显著, 表明花瓣外植体的诱导和分化能力与花蕾大小有关(表5)。花蕾长度为0.6~1.0 cm时, 花瓣的愈伤组织诱导率与分化率最高, 分别为15.6%与57.1%, 其他花蕾长度的外植体则基本褐化死亡。

表5 不同花蕾大小对君子兰花瓣外植体愈伤组织诱导和分化的影响
Table 5 Effects of size of flower buds on induction and differentiation of petal explants
of *Clivia miniata* Regei 'Youjiang'

花蕾长度 Length of flower buds (cm)	接种外植体数 Number of explants incubated	形成愈伤组织的外植体数 Number of explants induced	诱导率 Rate of callus induction (%)	分化成苗的外植体数 Number of explants differentiated	分化率 Rate of differentiation (%)
0.1~0.5	64	2	3.1	0	0.0
0.6~1.0	45	7	15.6	4	57.1
1.1~1.5	50	2	4.0	0	0.0
1.6~2.0	56	0	0.0	0	0.0

3 讨论

茎尖是大多数植物离体培养最普遍应用的外植体, 但君子兰植株生长缓慢, 生长点很少, 取茎尖后对母株造成的伤害无法恢复, 而且取材难度大, 易污染, 因此君子兰不适宜取茎尖做离体培养的外植体。

选用君子兰的花瓣、花丝、胚珠为外植体进行培养, 具有取材方便、不损伤母本植株、能保存母本品种优良性状的特点, 一旦取得成功, 其应用前景广阔。

本试验中, 君子兰品种‘油匠’的花瓣、花丝、胚珠的诱导效果不同, 花瓣产生愈伤组织及再分化的频率较高, 同时不定芽的分化往往发生于花瓣的基部, 这与刘敏和舒金生(1984)的研究结果相似。君子兰花器官离体培养过程中愈伤组织诱导与分化均十分缓慢, 特别是芽的分化需要长达半年时间的继代培养才能得到。

有关君子兰愈伤组织诱导与分化培养基的研究较少, 王永明等(1985)以胚、花丝、根、子房壁为培养材料, 认为在MS培养基里添加一定浓度的2,4-D ($0.5 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、6-BA ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和NAA ($0 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)可促进芽的分化。

本试验采用2,4-D、BA与NAA配合对君子兰花器官诱导成苗的效果较好, 附加2,4-D对愈伤组织诱导有利, 得到最佳培养基为MS+2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

本试验还发现在培养基中添加不同浓度的蔗糖对芽的诱导和分化有一定程度的影响, 蔗糖浓度为3%时, 外植体的愈伤组织诱导率与再分化率较高, 较低(2%)或较高(4%)均抑制外植体分化成苗, 这与张施君和王凤兰(2004)的结果一致。较低或较高的蔗糖浓度虽然使愈伤组织诱导率较高, 但愈伤组织呈透明或淡黄色水渍状, 结构疏松, 易褐化死亡, 不利于分化成苗。

References

- Chen Wei-min. 1986. Tissue culture and plantlet regeneration of *Clivia miniata*. *Plant Physiology Communications*, (3): 46. (in Chinese)
- 陈为民. 1986. 大花君子兰子房、花托和花丝培养再生植株. *植物生理学通讯*, (3): 46.
- Chen Xuan-yao. 2004. Appreciation and culture of scarlet kafirlily in Changchun. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishing House. (in Chinese)
- 陈宜耀. 2004. 长春君子兰精品赏析与培育. 沈阳: 辽宁科学技术出版社.
- Finnie J F. 1998. *In vitro* culture of *Clivia miniata*. *Clivia Yearbook*, 1: 7 - 11.
- Guo Wen-chang. 2004. Scarlet kafirlily. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 郭文场. 2004. 君子兰. 北京: 中国林业出版社.
- Liu Min, Shu Jin-sheng. 1984. Tissue culture of kafirlily (*Clivia nobilis*). *Acta Horticulturae Sinica*, 11 (1): 47 - 49. (in Chinese)
- 刘 敏, 舒金生. 1984. 垂笑君子兰的组织培养. *园艺学报*, 11 (1): 47 - 49.
- Rong Yu-yi. 1983. Scarlet kafirlily. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishing House. (in Chinese)
- 荣玉艺. 1983. 君子兰. 沈阳: 辽宁科学技术出版社.
- Wang Yong-ming, Chen Ying, Zhao Jing-ru. 1985. Preliminary study on tissue culture of *Clivia miniata*. *Journal of Chinese Landscape Architecture*, (2): 47 - 48. (in Chinese)
- 王永明, 陈 颖, 赵静茹. 1985. 君子兰组织培养初探. *中国园林*, (2): 47 - 48.
- Xie Cheng-yuan. 1982. Scarlet kafirlily. Changchun: Jilin People's Publishing House. (in Chinese)
- 谢成元. 1982. 君子兰. 长春: 吉林人民出版社.
- Zhang Shi-jun, Wang Feng-lan. 2004. Tissue culture of *Lilium formosanum* × *L. longiflorum* and *L. trompeten* for rapid propagation. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2 (12): 135 - 137. (in Chinese)
- 张施君, 王凤兰. 2004. 新铁炮百合和金百合的组织培养与快速繁殖技术. *湖南农业大学学报 (自然科学版)*, 2 (12): 135 - 137.



第四届智能化农业信息技术国际学术会议在北京召开

由国家农业信息化工程技术研究中心、中国农业大学、中国科技大学、南京农业大学、北京师范大学和北京农业信息化学会联合举办的“第四届智能化农业信息技术国际学术会议”(ISIITA2007)于2007年10月26~29日在北京召开。会议以信息技术改造传统农业为中心,将不同研究背景包括植物科学、畜牧、农学、环境科学、水产养殖等方面的研究者组织在一起共同探讨信息农业应用技术这一主题,从而为我国数字农业发展和科技信息交流提供了平台。

本次大会共有来自15个国家的100多名代表参会,由中国农业科技出版社出版了包含151篇论文的英文论文集“Progress of information technology in agriculture-proceedings of the 4th international symposium on intelligent information technology in agriculture”。会议按主题分成两个专题:(1)信息通信技术、模型、虚拟与决策支持系统、其它智能化农业信息技术;(2)精准农业技术与设备、遥感与地理信息系统、农业传感器与控制技术。大会安排特邀报告5个,分别为希腊 Simon Blackmore 的“机器人农业的研究”,南京农业大学曹卫星的“作物氮素状况的无损监测与精确诊断”,美国 Albert Weiss 的“作物生长模型:挑战与潜在机遇”,国家农业信息化工程技术研究中心赵春江的“中国农业信息技术研究应用概况”以及荷兰 Gerard Bot 的“温室生产系统的技术发展概述”,此外大会还交流了口头报告29个,通过各种活动安排大家进行了充分的学术交流,取得了良好的效果。

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 贺超兴)