

朱顶红曼谷玫瑰愈伤组织途径再生体系的建立

杨 维^{1,2}, 刘心怡^{1,2}, 曾晶珏², 吴坤林², 房 林², 吴沙沙¹, 翟俊文^{1*}, 曾宋君^{1,2,3*}

1. 福建农林大学园林学院, 福建福州 350002; 2. 中国科学院华南植物园华南农业植物分子分析与遗传改良重点实验室, 广东广州 510650; 3. 中国科学院华南植物园广东省应用植物学重点实验室, 广东广州 510650

摘 要: 朱顶红是我国近年来从国外大量引种并进行推广的新潮花卉, 但其种苗昂贵, 常规的鳞片扦插繁殖速度慢且需要消耗大量的种球; 同时, 朱顶红的新品种培育常采用杂交育种, 定向性较差。为建立朱顶红的高效再生体系, 促进种球工厂化生产并进行定向育种, 以朱顶红曼谷玫瑰 (*Hippeastrum* ‘Bankkok Rose’) 无菌苗叶片基部为外植体, 建立愈伤组织再生体系, 探究不同植物生长调节剂对愈伤组织的诱导、增殖、分化及生根移栽的影响。结果表明: 将无菌苗叶片基部置于添加 2,4-D 2.00 mg/L+TDZ 0.50 mg/L 的 MS 培养基上培养 45 d, 愈伤组织诱导率最高, 为 39.67%。愈伤组织增殖的最佳培养基为 MS+6-BA 2.00 mg/L, 平均每 20 d 增殖 4.01 倍。愈伤组织分化的最适培养基为 MS+KT 0.50 mg/L, 60 d 时不定芽分化系数达 10.59, 成苗系数达 5.67。在 MS+IBA 0.50 mg/L 的培养基中进行生根培养, 30 d 生根率达 100%。将生根培养 30 d 的小植株移栽至椰糠: 泥炭土: 蛭石=1:1:1 的基质中培养, 30 d 后存活率达 93.33%。本研究能为朱顶红种苗的工厂化繁殖提供技术支撑, 也可为其后续分子育种提供优良的受体材料。

关键词: 朱顶红; 试管苗叶片; 植物生长调节剂; 组织培养

中图分类号: S682.31 文献标识码: A

Establishment of Callus Regeneration System of *Hippeastrum* ‘Bangkok Rose’

YANG Wei^{1,2}, LIU Xinyi^{1,2}, ZENG Jingjue², WU Kuilin², FANG Lin², WU Shasha¹, ZHAI Junwen^{1*}, ZENG Songjun^{1,2,3*}

1. College of Landscape Architecture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Gene Improvement, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China

Abstract: *Hippeastrum* is a new kind of flower introduced in large scale from abroad in recent years, but its seedlings are expensive, regular scale cuttage propagation speed is slow and needs a large number of mother bulbs. Cross breeding, a common method for its new varieties, however, has poor orientation. This aim of this study was to establish an efficient callus regeneration system for rapid propagation and factory production of seedlings, which can also be used for the orientation breeding of *Hippeastrum*. The effects about different plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration were studied with the leaves of *Hippeastrum* ‘Bankkok Rose’ plantlet *in vitro*. The highest induction rate of callus (39.67%) was observed when the basal leaves of the buds *in vitro* were cultured on MS+2,4-D 2.00 mg/L+TDZ 0.50 mg/L medium for 45 days. The optimal medium for callus proliferation was MS+6-BA 2.00 mg/L, and the average proliferation was 4.01 times every 20 days. The optimal medium for callus differentiation was MS+KT 0.50 mg/L. After 60 days, the adventitious bud differentiation coefficient reached 10.59, and the seedling formation coefficient was 5.67. The rooting rate reached 100% after 30 days in MS+IBA 0.50 mg/L. After 30 days of root culture, the small plants

收稿日期 2022-10-18; 修回日期 2022-11-08

基金项目 广东省科技计划项目 (No. 2020B020220005); 东莞市社会科技发展 (重点) 项目 (No. 20211800400022); 广东省现代农业产业技术体系花卉创新团队项目 (No. 2022KJ121)。

作者简介 杨 维 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 园林植物与应用。*通信作者 (Corresponding author): 翟俊文 (ZHAI Junwen), E-mail: zhai-jw@163.com; 曾宋君 (ZENG Songjun), E-mail: zengsongjun@scib.ac.cn。

were transplanted to the coir: peat soil: vermiculite = 1 : 1 : 1 substrate, and the survival rate reached 93.33% after 30 days. This study could provide technical support for industrial propagation of *Hippeastrum* seedlings, and also provide excellent receptor materials for subsequent molecular breeding.

Keywords: *Hippeastrum*; leave *in vitro*; plant growth regulators; tissue culture

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.05.013

朱顶红为石蒜科 (Amaryllidaceae) 朱顶红属 (*Hippeastrum* Herb.) 多年生球根花卉的总称, 原产南美洲。其品种繁多, 花朵硕大, 5~6 朵喇叭状花着生在一个直径 3~4 cm 的中空花葶上, 花色艳丽且丰富, 常被用于园林绿化或盆栽于室内, 也可应用于切花观赏^[1]。此外, 朱顶红属植物含有大量的生物碱, 药用价值高, 可应用于多种医药产品^[2-3]。近年来, 我国从国外大量引种并进行了市场销售, 但引种的朱顶红种苗昂贵, 严重地影响其产业化推广。

朱顶红鳞茎的自然繁殖率较低, 特别是引种的品种极少长出仔球, 难以进行分球繁殖。朱顶红的传统繁殖方式可采用播种和扦插等^[4], 但由于商品朱顶红品种多为杂交种, 自交后性状会发生分离, 不能保持母株的优良性状, 只应用于新品种的培育; 特别是重瓣型的品种多没有子房, 不能获得种子。而采用鳞片扦插进行规模化繁殖, 需要大量的种球且所需时间长、受季节影响大, 繁殖效率相对较低^[5-6]。组织培养技术是植物快繁最有效的方法之一, 繁殖过程不受病虫害和环境胁迫的危害^[7-8]。目前国内外对朱顶红的组织培养研究已有一些报道^[9-11], 大多以鳞茎为外植体进行不定芽的诱导, 增殖效率普遍较低, 本研究对 100 多个品种的以芽繁芽的组织培养实验中, 大部分品种均存在这个问题, 难以进行规模化快速繁殖。有关愈伤组织途径再生体系的研究较少。植物愈伤组织再生体系的建立不仅可以达到快速繁殖的目的, 还可获得良好的基因转化受体材料, 具有高效转化率、嵌合体少及无性系变异小等优点^[12]。张慧等^[13]和于波等^[14]分别以无菌苗小鳞茎和幼嫩花梗为外植体建立了胚性愈伤组织途径的再生体系, DE ALMEIDA 等^[15]以内花被片为外植体进行愈伤组织诱导, 诱导率为 48%。但是, 以这些器官作为外植体不可避免地存在资源和时间受限的问题。

本研究以白肋品种朱顶红曼谷玫瑰鳞茎来源的无菌苗叶片基部为外植体, 进行愈伤组织诱导、增殖、分化、生根及移栽研究, 以期建立一种高

效的愈伤组织途径再生体系, 为朱顶红工厂化繁殖提供技术支撑, 同时为其后续的分选育种提供优良的受体材料。

1 材料与方法

1.1 材料

朱顶红曼谷玫瑰的鳞片作为外植体在 MS+6-BA 5.00 mg/L 培养基上经不定芽途径诱导出的不定芽, 再经二次继代以上的无菌苗叶片基部为外植体。

1.2 方法

基本培养基均为 MS 固体培养基, 并添加蔗糖 30 g/L、琼脂 4.8 g/L, 灭菌前 pH 调为 5.80, 在 121 °C、104 kPa 条件下灭菌 20 min。接种后培养于 (25±2) °C、光照周期为 12 h/d、光照强度为 2500~3000 Lux 的培养室中。

1.2.1 愈伤组织的诱导 将继代培养的生长健壮、长势一致的试管苗取出置于无菌操作台上, 然后将叶片基部白色部分切成 0.5 cm×0.5 cm 左右的方形小块, 置于添加不同浓度的 2,4-D (0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mg/L) 和 TDZ (0.50 mg/L) 的 MS 培养基上, 每个处理 10 瓶, 每瓶 10 个外植体, 重复 3 次。45 d 后统计愈伤组织诱导率。愈伤组织诱导率=(每瓶诱导出愈伤组织的叶片数/每瓶接种的叶片数)×100%。

1.2.2 愈伤组织的增殖 将生长状态一致的愈伤组织切成 0.5 cm×0.5 cm 小块, 转接在添加不同浓度的 6-BA (0、1.00、2.00、4.00、6.00 mg/L) 的 MS 培养基上进行培养, 每周观察 1 次其生长情况, 培养 20 d 时统计愈伤组织增殖指数及芽分化系数。生物增重倍数=培养 20 d 时每瓶愈伤组织的重量/接种时每瓶愈伤组织的重量, 愈伤组织增殖倍数=培养 20 d 后每瓶愈伤组织的重量(去除不定芽后的愈伤组织重量)/接种时每瓶愈伤组织的重量, 不定芽分化率=(每瓶分化出芽的愈伤组织数/每瓶接种的愈伤组织数)×100%。

1.2.3 愈伤组织的分化 将经增殖后的愈伤组织切成 0.5 cm×0.5 cm 小块, 接种在添加不同浓度

6-BA (0.25、0.50、0.75、1.00 mg/L)、KT (0.25、0.50、0.75、1.00 mg/L)、NAA (0、0.10、0.20、0.50、1.00 mg/L) 及其组合的 MS 培养基上。每个处理接种 10 瓶, 每个瓶 5 个外植体, 重复 3 次。培养 30 d 后, 将愈伤组织对半切成 2 份, 转接在相同培养基上继续培养。再培养 30 d 时统计愈伤组织分化系数。分化系数=每瓶分化出的不定芽的愈伤组织数/接种的愈伤组织数, 成苗系数=每瓶长出的具有独立小鳞茎并有 2 片以上叶片的植株数/每瓶接种的愈伤组织数。

1.2.4 不定芽的生根与移栽 将经分化后得到的株高约 3~4 cm 的小苗去除植株上部分叶片, 分别接种在不同浓度 NAA (0、0.10、0.20 mg/L) 和 IBA (0、0.50、1.00、1.50 mg/L) 组合的 MS 培养基上培养。每个处理 10 瓶, 每瓶接种 8 株小苗, 重复 3 次。30 d 后统计生根数、根长及株高。生根率=(每瓶生根的小鳞茎数/每瓶接种的小鳞茎数)×100%。平均根数=每瓶小鳞茎根总数/每瓶小鳞茎数。

将经生根后的小植株从培养瓶中取出, 用自来水洗净根部的培养基, 移栽至椰糠: 泥炭土: 蛭石=1:1:1 的基质中培养。移栽苗数 300 株, 移栽后 60 d 时观察植株生长状况并统计成活率。

1.3 数据处理

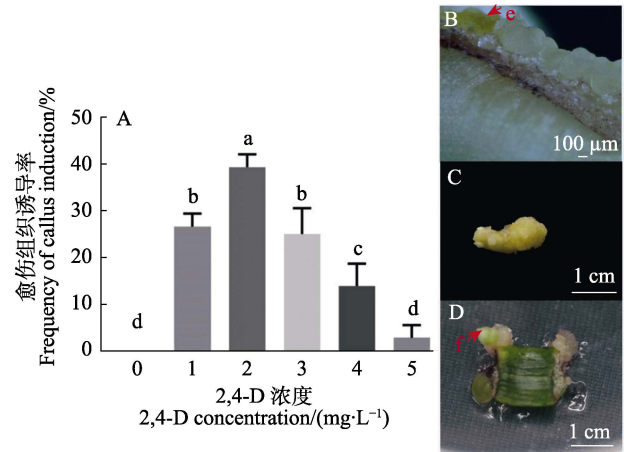
使用 Excel 和 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。采用邓肯新复极差法对实验数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

无菌苗叶片在愈伤组织诱导培养基上, 1 周后, 部分叶片逐渐膨大变厚, 呈肉质, 2 周后, 叶片切口处出现白毛状愈伤组织, 30~40 d 时, 器官开始发生, 部分叶片切口处开始分化出芽和淡黄色愈伤组织 (图 1B), 1 周内将其愈伤组织与叶片切离, 置于新鲜的相同培养基上, 愈伤组织可膨大增殖 (图 1C), 如未及时与叶片分离, 愈伤组织会随后分化, 60 d 时愈伤组织大部会转化为芽 (图 1D)。由图 1A 可知, 在培养基中加入 0.50 mg/L TDZ, 再添加 2,4-D 时, 愈伤组织诱导率随 2,4-D 浓度的提高出现先增加后递减的趋势, 且各处理之间呈现显著性差异, 在不添加 2,4-D 的培养上未能诱导出愈伤组织, 叶片一直呈现初始状态未启动。当 2,4-D 浓度达到 2.00 mg/L

时, 愈伤组织的诱导率最高, 达 39.67%。当 2,4-D 5.00 mg/L 时, 愈伤组织诱导率仅为 3.17%, 大部分叶片黑化死亡。因此, 朱顶红曼谷玫瑰无菌苗叶片愈伤组织诱导最佳培养基为 MS+2,4-D 2.00 mg/L+TDZ 0.50 mg/L。



A: 不同浓度 2,4-D 与 TDZ 0.50 mg/L 组合的 MS 培养基上愈伤组织的诱导率, 不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$); B: 叶片在 MS+2,4-D 2.00 mg/L+TDZ 0.50 mg/L 培养 45 d 时的状况, e: 诱导出的愈伤组织; C: 愈伤组织在 MS+6-BA 2.00 mg/L 增殖情况; D: 叶片培养 60 d 时的状况, f: 诱导出的愈伤不及时切离原叶片即分化为不定芽。

A: Callus induction rate on MS medium with different concentrations of 2,4-D and TDZ 0.50 mg/L, different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$); B: Regeneration status of leaves after 45 d of culture on MS+2,4-D 2.00 mg/L+TDZ 0.50 mg/L, e: Induced callus; C: Callus subcultured on MS+6-BA 2.00 mg/L; D: Regeneration status of leaves after 60 d of culture on MS+2,4-D 2.00 mg/L+TDZ 0.50 mg/L, f: Adventitious bud induced from calli that were not cut off from the original leaves in time.

图 1 愈伤组织诱导

Fig. 1 Induction of callus

2.2 愈伤组织的增殖

为了保持愈伤组织曼谷玫瑰材料, 设置不同 6-BA 浓度的培养基对诱导出的愈伤组织增殖进行培养, 每 7 d 观察统计愈伤组织的增殖状态。前 1 周愈伤组织处于受伤恢复期, 表面稍褐化, 增殖不明显, 第 2 周时愈伤组织处于生长高峰期, 体积迅速扩大, 质地变得蓬松, 第 3 周愈伤组织增殖缓慢。15~20 d 时的体积没有太大差别。由表 1 可知, 5 种处理下, 愈伤组织均能增殖, 增殖效果随 6-BA 浓度递增呈现先增加后减少的趋势, 当 6-BA 浓度为 2.00 mg/L 时, 愈伤组织增殖倍数最大, 达 4.01 倍, 未分化出芽, 与其他浓度存在显著性差异。当 6-BA 浓度在 2.00 mg/L 以下时, 愈伤组织的生物增重和不定芽分化率较高, 尤其

是没有添加 6-BA 时,愈伤组织分化率 100%,只有极少一部分继续保持为愈伤组织状态。由此得出,6-BA 浓度过高过低都不利于愈伤组织增殖,

低浓度 6-BA 下,愈伤组织易分化,曼谷玫瑰愈伤组织增殖的最佳培养基为 MS+6-BA 2.00 mg/L (图 2)。

表 1 不同 6-BA 浓度对愈伤组织增殖的影响
Tab. 1 Effects of different concentrations of 6-BA on callus proliferation

6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/(mg·L ⁻¹)	生物增重倍数 Biological weight gain multiple	愈伤组织增重倍数 Callus weight gain multiple	不定芽分化率 Adventitious bud differentiation rate/%	生长状态 Growth status
0.00	3.86±0.21 ^b	1.50±0.14 ^c	100.00±0.00 ^a	芽点较多,淡绿色,质地较脆
1.00	5.65±0.58 ^a	3.21±0.66 ^{ab}	50.00±5.77 ^b	下部橙黄色,部分有芽点
2.00	4.01±0.54 ^b	4.01±0.53 ^a	0.00±0.00 ^c	鲜黄色,质地蓬松
4.00	2.96±0.04 ^b	2.96±0.07 ^b	0.00±0.00 ^c	基部稍褐化,鲜黄色
6.00	2.84±0.24 ^b	2.84±0.24 ^b	0.00±0.00 ^c	基部褐化变黑,呈褐黄色

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).



A: 6-BA 0 mg/L; B: 6-BA 1.00 mg/L; C: 6-BA 2.00 mg/L; D: 6-BA 4.00 mg/L; E: 6-BA 6.00 mg/L.

图 2 不同浓度 6-BA 对愈伤组织增殖的影响

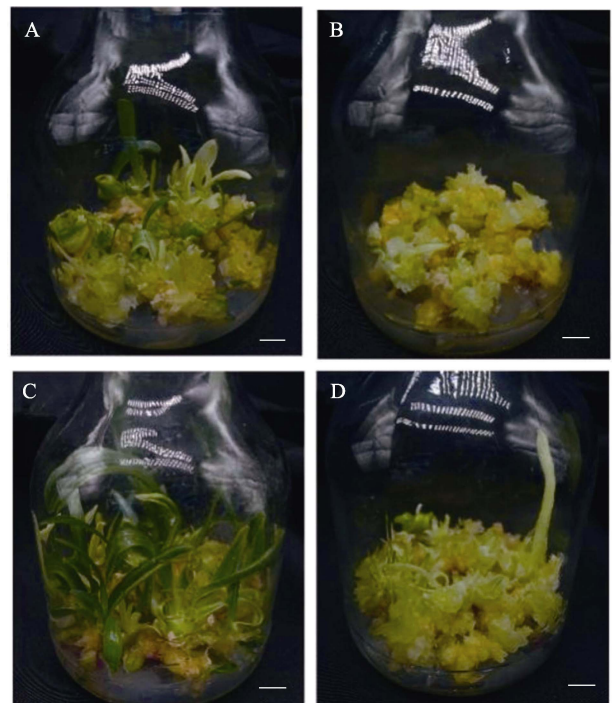
Fig. 2 Effects of different concentrations of 6-BA on callus proliferation

2.3 愈伤组织分化

愈伤组织接入到不同浓度 KT 和不同浓度 KT+NAA 的 MS 培养基上培养 20 d 时,大部分愈伤组织颜色由鲜黄色转变为翠绿色,开始分化出芽点,30 d 时长成肉眼可见的不定芽,45 d 时不定芽明显茁壮,60 d 时部分不定芽形成独立的小植株,叶片健壮。而在不同浓度 6-BA 和不同浓度 6-BA+NAA 培养基上的愈伤组织,20 d 后,大部分愈伤组织依旧保持鲜黄色,与 KT 处理组相比,只有少数有绿色小芽点,30 d 后有少数芽体出现,60 d 时形成小植株极少(图 3)。

由表 2 可知,KT 处理组愈伤组织分化率显著高于 6-BA 处理组,当 KT 0.50 mg/L 时愈伤组织分化系数最高,达 10.59,平均每团愈伤组织出苗数为 5.67,平均株高为 6.83 cm;其次为 KT 0.75 mg/L 时,愈伤组织分化系数为 8.33,平均每团愈伤组织出苗数为 2.58,平均株高为 4.83 cm;当 6-BA 浓度为 1.00 mg/L, NAA 浓度为 1.00 mg/L 时,愈伤组织分化系数最低,为 1.30,平均每团愈伤组织出苗数为 0.17,平均株高 2.07 cm。因此,本研究得出, NAA 对曼谷玫瑰愈伤组织的分化没有显著影响,KT 有利于愈伤组织分化,6-BA 对愈伤组织分化效果不显著,最佳愈伤组织分化培

培养基为 MS+KT 0.50 mg/L。



A: 6-BA 0.50 mg/L; B: 6-BA 0.50 mg/L+NAA 0.50 mg/L; C: KT 0.50 mg/L; D: KT 0.50 mg/L+NAA 0.50 mg/L.

图 3 不同浓度 6-BA、KT 与 NAA 组合对愈伤组织分化的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of 6-BA, KT and NAA on callus differentiation

表 2 不同浓度 6-BA、KT 与 NAA 组合对愈伤组织分化的影响

Tab. 2 Effects of different concentrations of 6-BA, KT and NAA on callus differentiation

6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/(mg·L ⁻¹)	KT 浓度 Concentration of KT/(mg·L ⁻¹)	NAA 浓度 Concentration of NAA/(mg·L ⁻¹)	分化率 Differentiation rate/%	分化系数 Differentiation coefficient	平均每团愈伤组织出苗数 Average number of seedlings produced from each callus group	平均株高 Average plant height/cm
0.25	0.00	0.00	83.33±8.33 ^{ab}	3.62±0.72 ^{ghl}	0.50±0.25 ^{fg}	3.83±0.44 ^{bcd}
0.25	0.00	0.50	58.33±8.33 ^b	3.04±0.40 ^l	1.17±0.83 ^{defg}	3.17±0.44 ^{cde}
0.50	0.00	0.00	83.33±16.67 ^{ab}	4.34±0.34 ^{gh}	1.83±0.41 ^{cdef}	4.33±0.33 ^{bcd}
0.50	0.00	0.50	58.33±22.05 ^b	3.00±0.40 ^l	0.75±0.25 ^{defg}	3.67±0.44 ^{bcd}
0.75	0.00	0.00	91.67±8.33 ^a	3.96±0.42 ^{ghl}	0.25±0.14 ^g	3.50±0.50 ^{bcd}
0.75	0.00	0.50	83.33±8.33 ^{ab}	2.75±0.14 ^l	0.58±0.22 ^{efg}	5.83±0.73 ^{ab}
1.00	0.00	0.00	58.33±16.67 ^b	3.96±0.11 ^{ghl}	0.58±0.22 ^{efg}	4.00±1.00 ^{bcd}
1.00	0.00	0.10	76.67±12.01 ^{ab}	3.72±0.26 ^{ghl}	1.07±0.97 ^{defg}	1.83±0.93 ^{de}
1.00	0.00	0.20	73.33±3.33 ^{ab}	3.10±0.60 ^{hl}	0.20±0.57 ^g	2.33±0.17 ^{cde}
1.00	0.00	0.50	58.33±8.33 ^b	2.92±0.50 ^l	0.58±0.22 ^{efg}	2.67±0.17 ^{cde}
1.00	0.00	1.00	58.33±4.41 ^b	1.30±0.12 ⁱ	0.17±0.67 ^g	2.07±0.67 ^{de}
0.00	0.25	0.00	100.00±0.00 ^a	7.88±0.31 ^{bc}	3.42±0.22 ^b	4.33±0.17 ^{bcd}
0.00	0.25	0.50	91.67±8.33 ^a	6.92±0.36 ^{cd}	1.42±0.22 ^{cdefg}	4.00±0.58 ^{bcd}
0.00	0.50	0.00	100.00±0.00 ^a	10.59±0.18 ^a	5.67±1.01 ^a	6.83±0.73 ^a
0.00	0.50	0.50	91.67±8.33 ^a	7.84±0.29 ^{bc}	0.92±0.68 ^{defg}	2.33±1.20 ^{cde}
0.00	0.75	0.00	100.00±0.00 ^a	8.33±0.300 ^b	2.58±0.30 ^{bc}	4.83±0.44 ^{abc}
0.00	0.75	0.50	83.33±8.33 ^{ab}	5.63±0.94 ^{ef}	0.25±0.25 ^g	1.00±1.00 ^c
0.00	1.00	0.00	100.00±0.00 ^a	8.04±0.42 ^{bc}	2.00±0.25 ^{cde}	4.33±1.33 ^{bcd}
0.00	1.00	0.50	91.67±8.33 ^a	4.63±0.07 ^{fg}	0.25±0.14 ^g	3.17±1.59 ^{cde}
0.00	0.00	0.00	100.00±0.00 ^a	5.88±0.50 ^{de}	2.08±0.58 ^{bcd}	4.00±0.50 ^{bcd}

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).

2.4 不定芽的生根培养和试管苗移栽

由表 3 可知，在不同浓度 IBA 和 NAA 组合的 MS 培养基上，朱顶红的绝大部分不定芽能生根，但是不同处理间存在差异。NAA 浓度为 0 时，不定芽生根率、平均根数、平均株高随 IBA 浓度增加呈现先上升后递减趋势，而后，在培养基中添加不同浓度 NAA，不定芽生根效果不显著。在本研究中，虽然对照组生根率 100%，平均根数 4.3，平均根长最长 2.63 cm，但是该处理下根细长，平均株高也只有 3.89 cm，植株整体表现较为瘦弱矮小。当愈伤组织在 IBA 0.50 mg/L 和 IBA 1.00 mg/L+NAA 0.10 mg/L 时出根效果最佳，二者生根率均为 100%，前者平均根数为 4.85，平均根长为 1.48，平均株高为 6 cm，后者平均根数为 6.57，平均根长 1.28，平均株高 4.38 (图 4)。考虑到节约成本，推荐以 MS+IBA 0.50 mg/L 作为曼谷玫瑰的最佳生根培养基。后将生根后植株转入温室，移栽至椰糠：泥炭土：蛭石=1：1：1 的基质中培养，存活率达 93.33%。

3 讨论

朱顶红愈伤组织离体再生体系的建立对其种苗的快繁和分子育种遗传转化体系的建立具有重要价值。目前，朱顶红的组织培养研究中，多以鳞茎为外植体建立再生体系，以不定芽进行增殖难以获得愈伤组织，繁殖周期长、繁殖率较低^[16-18]，而以花蕾、子房^[19]、幼嫩蒴果^[20]、花梗^[14]和花瓣^[15]等进行朱顶红离体再生研究时，虽然可以获得愈伤组织，但受取材时间、数量等的限制。本研究以朱顶红曼谷玫瑰鳞茎来源继代 2 次以上的无菌苗叶片基部为外植体，不受取材数量和取材时间的限制，成本低且效率高^[21]。本研究的预实验中，由朱顶红曼谷玫瑰温室中栽培的幼嫩叶片或鳞茎来源的初代组培或第一次继代的小植株叶片基部为材料难以诱导出愈伤组织，说明朱顶红叶片直接诱导愈伤组织的难度大，需要在培养基上多次继代幼化后才能诱导出愈伤组织。

植物生长调节剂种类和浓度是影响植物组织培养的关键因素^[22-23]。人工合成的 TDZ 作为一种

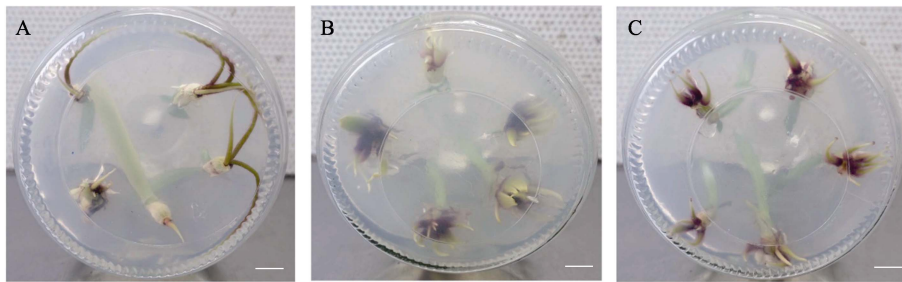
表 3 不同浓度 IBA 与 NAA 组合对不定芽生根的影响

Tab. 3 Effects of combinations of IBA and NAA at different concentrations on rooting of adventitious buds

IBA 浓度 Concentration of IBA /(mg·L ⁻¹)	NAA 浓度 Concentration of NAA /(mg·L ⁻¹)	生根率 Rooting rate/%	平均根数 Average root number	平均根长 Average root length/cm	平均株高 Average plant height/cm
0.00	0.00	100±0.00 ^a	4.30±0.42 ^{bc}	2.63±0.24 ^a	3.89±0.13 ^b
0.50	0.00	100±0.00 ^a	4.85±0.26 ^{abc}	1.48±0.19 ^c	6.00±0.35 ^a
1.00	0.00	95.00±5.00 ^{ab}	4.85±0.5 ^{abc}	0.85±0.12 ^{def}	4.75±0.43 ^{ab}
1.50	0.00	80.00±8.16 ^{abc}	4.50±0.71 ^{bc}	0.55±0.09 ^f	4.50±0.20 ^{ab}
0.00	0.10	95.00±5.00 ^{ab}	4.65±0.54 ^{bc}	2.00±0.20 ^b	5.50±0.35 ^{ab}
0.50	0.10	95.00±5.00 ^{ab}	4.45±0.49 ^{bc}	0.83±0.26 ^{def}	4.88±0.38 ^{ab}
1.00	0.10	100.00±0.00 ^a	6.57±0.49 ^a	1.28±0.75 ^{cd}	4.38±0.75 ^{ab}
1.50	0.10	70.00±12.91 ^c	3.25±0.78 ^c	0.48±0.25 ^f	5.38±0.66 ^{ab}
0.00	0.20	80.00±11.55 ^{abc}	3.60±0.63 ^c	1.23±0.15 ^{cde}	4.75±0.32 ^{ab}
0.50	0.20	95.00±5.00 ^{ab}	5.65±0.33 ^{ab}	1.23±0.10 ^{cde}	5.37±0.43 ^{ab}
1.00	0.20	70.00±10.00 ^c	4.00±0.38 ^{bc}	0.78±0.11 ^{ef}	5.13±0.66 ^{ab}
1.50	0.20	75.00±5.00 ^{bc}	5.05±0.38 ^{abc}	0.85±0.65 ^{def}	5.45±0.89 ^{ab}

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).



A: MS 0; B: IBA 1.00 mg/L+NAA 0.10 mg/L; C: IBA 0.50 mg/L.

图 4 不同浓度 IBA 与 NAA 组合对不定芽生根的影响

Fig. 4 Effects of combination of IBA and NAA at different concentrations on rooting of adventitious buds

新型植物生长调节剂，能够诱导外植体从愈伤组织形成到体细胞胚胎发生的一些反应^[24]。近年来，TDZ 已被广泛应用于植物形态发生研究，在朱顶红属植物中常与 6-BA 和 NAA 搭配使用^[25-26]。张慧等^[13]认为 2,4-D 浓度变化对胚性愈伤组织的诱导具有显著影响。AMANI 等^[6]认为 2,4-D 2.00 mg/L 时朱顶红鳞片愈伤组织诱导率最高。本研究中，叶片在 2,4-D 2.00 mg/L 和 TDZ 0.50 mg/L 激素浓度组合下愈伤组织诱导率最佳，与于波等^[14]的研究结果基本一致，但是诱导率要低，其原因可能是基因型和外植类型不同所导致。

诱导出的愈伤组织具有胚性能进行快速继代增殖和分化是建立高效愈伤组织再生体系的关键，朱顶红的愈伤组织可直接分化出芽或形成体细胞胚。已知 2,4-D 或 TDZ 可诱导体细胞胚，但是对体胚的发育有抑制作用^[27]，HUANG 等^[28]研

究认为 2,4-D 与 TDZ 组合使用会抑制朱顶红体细胞胚进一步发育形成完整植株，我们在预备实验中也获得了这样的结论。6-BA 在朱顶红再生体系建立中使用频率很高，很多研究表明，6-BA 是朱顶红不定芽增殖的主要因子^[29]。而 2,4-D、TDZ 常应用于愈伤组织的诱导和增殖。本研究中，2,4-D 和 TDZ 有利于愈伤组织的诱导，但在添加 2,4-D、TDZ 或其组合的培养上，大部分愈伤组织会生长停滞或死亡，而将愈伤组织置于合适的 6-BA 浓度的培养基上进行愈伤组织的有效增殖。本研究筛选得到 6-BA 浓度为 2.00 mg/L 时，愈伤组织的增殖效果最好，增殖倍数可达到 4.01 倍，在 20 d 的继代周期内，愈伤组织不会分化，但如果不及时转接培养，愈伤组织会分化。

6-BA 和 KT 同属嘌呤型细胞分裂素^[30]，以往研究表明，6-BA 在朱顶红不定芽诱导方面也具有

较优表现^[10, 31], AMIR 等^[32]研究认为 6-BA 对朱顶红不定芽的诱导效果明显优于 KT, 且诱导所需时间更短, 当 6-BA 浓度为 4.00 mg/L 时, 分生组织不定芽诱导率达 84%。此外, 不少学者将 6-BA 与 NAA 结合进行朱顶红不定芽诱导均取得较好的结果^[23, 33-35]。但是, 鲁娇娇等^[25]研究表明, 在 6-BA 和 NAA 两种植物生长调节剂配合下, 朱顶红花孔雀和黑天鹅的鳞片启动率很低。当培养基中含有合适浓度的细胞分裂素 KT 时, 可以提高分蘖的不定芽和不定根数^[36]。本研究中, 在不同浓度 6-BA、KT 的 MS 培养基中添加 NAA, 愈伤组织的分化效果并不明显, 使用单一的植物生长调节剂时, KT 的分化效果显著优于 6-BA, 最佳愈伤组织分化培养基为 MS+KT 0.50 mg/L 时, 分化率可达 100%, 分化系数达 10.59。由此可推断, 不同种或属的植物对细胞分裂素及与 NAA 结合的分化效果不同。

本研究以朱顶红曼谷玫瑰叶片为外植体, 建立了愈伤组织途径的高效再生体系, 获得的愈伤组织能够快速增殖, 每 15~20 d 时间内增殖倍数可达 4.01, 多次继代后依旧能保持原始状态, 即质地蓬松, 颜色金黄, 具有较强的分化能力。平均每 0.5 cm×0.5 cm 的愈伤组织团 60 d 就可分化出 5.67 株可直接生根的小苗。以朱顶红曼谷玫瑰试管苗叶片为外植体建立的愈伤组织再生体系, 不仅可以增加增殖倍数, 缩短增殖周期, 满足种苗工厂化育苗生产的需求, 还能为有效的转基因体系的建立提供基础并应用于分子育种。

参考文献

- [1] LIU X F, SUN Y B, ZHU G F, HUANG L L, YU B. Complete chloroplast genomes and comparative analyses of *Hippeastrum* 'Milady', *Hippeastrum albertii* and *Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae)[J]. PLoS One, 2022, 17(8): e0271335.
- [2] ABDELKADER H H. Postharvest physiology of cut *Hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum* Herb.) inflorescences[J]. World Applied Sciences Journal, 2012, 19(7): 943-950.
- [3] NAIR J J, VAN S J. Antiplasmodial constituents in the minor alkaloid groups of the Amaryllidaceae[J]. South African Journal of Botany, 2019, 126: 362-370.
- [4] 原雅玲, 张延龙, 赵锦丽, 张俭. 朱顶红鳞茎切块的繁殖方法[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(9): 108-112.
YUAN Y L, ZHANG Y L, ZHAO J L, ZHANG J. Study on the method of scale propagation of *Amaryllis vittataum*[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition). 2008, 36(9): 108-112. (in Chinese)
- [5] SULTANA J, SUTLANA N, SIDDIQUE M N A, ISLAM A K M A, HOSSAIN M M, HOSSAIN T. *In vitro* bulb production in *Hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum*)[J]. Journal of Central European Agriculture, 2010, 11(4): 469-474.
- [6] AMANI S, ZAREI H, AZAR A M, MASHAYEKHI K. Micropropagation of *Hippeastrum hybridum*[J]. Cumhuriyet University Faculty of Science Science Journal (CSJ), 2015, 36(4): 594-605.
- [7] 沈苗苗, 于晓南. 朱顶红组织培养研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2011(10): 135-138.
SHEN M M, YU X N. Advances in tissue culture of *Hippeastrum*[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2011(10): 135-138. (in Chinese)
- [8] ZHANG Y, BOZOROV T A, LI D X, ZHOU P, WEN X J, DING Y, ZHANG D Y. An efficient *in vitro* regeneration system from different wild apple (*Malus sieversii*) explants[J]. Plant Methods, 2020, 16(1): 1-10.
- [9] 廖焕琴, 钟敏艳, 徐放, 杨会肖, 杨晓慧, 陈新宇, 张卫华, 潘文, 徐斌. 朱顶红鳞茎组织培养中的抗褐化研究[J]. 林业与环境科学, 2020, 36(4): 90-95.
LIAO H Q, ZHONG M Y, XU F, YANG H X, YANG X H, CHEN X Y, ZHANG W H, PAN W, XU B. Studies on anti-browning in bulbs tissue culture of *Hippeastrum rutilum*[J]. Forestry and Environmental Science, 2020, 36(4): 90-95. (in Chinese)
- [10] 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.
SHAO S J, SHI Y M. *In vitro* micro-propagation from *Hippeastrum*'s little a septic bulb and its effecting factors[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2008, 26(1): 5-8. (in Chinese)
- [11] 袁水清. 杂交朱顶红鳞茎组织培养研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
YUAN S Q. Study on the tissue culture of *Hippeastrum hybridum*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [12] 翟彦, 张宗勤, 贾敏, 王岩, 宋西德, 周雷. 百合体细胞胚胎发生和植株再生[J]. 西北植物学报, 2011, 31(4): 834-841.
ZHAI Y, ZHANG Z Q, JIA M, WANG Y, SONG X D, ZHOU L. Plant regeneration and somatic embryogenesis of *Lilium* spp.[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2011, 31(4): 834-841. (in Chinese)
- [13] 张慧, 罗珍珍, 解晓旭, 孙印兵, 于文胜. 朱顶红愈伤组织诱导及增殖发育体系的建立及优化[J]. 山东林业科技, 2018, 48(6): 17-20.

- ZHANG H, LUO Z Z, XIE X X, SUN Y B, YU W S. System establishment and optimization for callus induction and proliferation and development of *Hippeastrum hybridum*[J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2018, 48(6): 17-20. (in Chinese)
- [14] 于波, 黄丽丽, 朱玉, 朱根发, 孙映波. 朱顶红幼嫩花梗胚性愈伤组织诱导和高效植株再生[J]. 园艺学报, 2020, 47(5): 907-915.
- YU B, HUANG L L, ZHU Y, ZHU G F, SUN Y B. Induction of embryogenic calli from immature pedicels and efficient plant regeneration of *Hippeastrum*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(5): 907-915. (in Chinese)
- [15] DE ALMEIDA N V, RIVAS E B, CARDOSO J C. Somatic embryogenesis from flower tepals of *Hippeastrum* aiming regeneration of virus-free plants[J]. Plant Science, 2022, 317: 111191.
- [16] 陈汉鑫, 余松金, 万学锋, 郑春生, 陈前程, 杨宗锦. 朱顶红的组培快繁技术[J]. 福建林业科技, 2016, 43(3): 170-173.
- CHEN H X, YU S J, WAN X F, ZHENG C S, CHEN Q C, YANG Z J. Study on tissue culture and rapid propagation techniques for *Amaryllis vittata*[J]. Jour of Fujian Forestry Sci and Tech, 2016, 43(3): 170-173. (in Chinese)
- [17] 龚雪琴, 由翠荣, 曲复宁, 陈礼学, 于文胜, 解晓旭. 朱顶红体细胞胚胎发生及植株再生研究[J]. 园艺学报, 2012, 39(2): 381-386.
- GONG X Q, YOU C R, QU F N, CHEN L X, YU W S, XIE X X. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Hippeastrum hybridum*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(2): 381-386. (in Chinese)
- [18] 娄晓鸣, 吕文涛, 周玉珍, 张文婧. 朱顶红新品种繁殖技术初探[J]. 北方园艺, 2016(15): 78-80.
- LOU X M, LYU W T, ZHOU Y Z, ZHANG W J. Preliminary study on propagation of new varieties of *Hippeastrum hybridum*[J]. Northern Horticulture, 2016(15): 78-80. (in Chinese)
- [19] KIM M J, KIM Y S, KIM H S, KO J. Effective *in vitro* propagation from pedicel culture of *Hippeastrum hybridum* Hort. 'Dazzler'[J]. Korean Journal of Plant Resources, 2005, 18(3): 382-389.
- [20] 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.
- JIANG M L, ZHONG W T. Callus induction and plant regeneration of *Amaryllis vittata*[J]. Plant Physiology Journal, 1984(1): 37-38. (in Chinese)
- [21] 王春夏, 张梦迪, 王锦霞, 王志平, 孙红梅. 朱顶红无菌苗叶片高效再生体系[J]. 园艺学报, 2020, 47(2): 301-309.
- WANG C X, ZHANG M D, WANG J X, WANG Z P, SUN H M. Establishment of an efficient regeneration system in *Hippeastrum vittatum* with plantlet leaves[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(2): 301-309. (in Chinese)
- [22] 李莺, 李星, 李生玲, 徐薇. 黄天霸百合花器官愈伤组织诱导及植株再生[J]. 热带作物学报, 2013, 34(8): 1507-1512.
- LI Y, LI X, LI S L, XU W. Callus induction and plant regeneration from floral organ of *Lilium* 'Manissa'[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, 34(8): 1507-1512. (in Chinese)
- [23] 希吉日, 田欣, 金牧兰, 何炎红, 田有亮. 基于朱顶红愈伤组织途径诱导形成原球茎的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(13): 51-54.
- XI J R, TIAN X, JIN M L, HE Y H, TIAN Y L. Research on the protocorm inducer from callus of *Hippeastrum vittatum*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(13): 51-54. (in Chinese)
- [24] 徐晓峰, 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 227-237.
- XU X F, HUANG X L. TDZ: an efficacious plant growth regulator[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2003, 20(2): 227-237. (in Chinese)
- [25] 鲁娇娇, 严瑞, 何香杉, 靳宏梅, 王锦霞, 王春夏, 孙红梅. 朱顶红'Red Lion'胚性愈伤组织诱导及体细胞胚发生[J]. 园艺学报, 2016, 43(12): 2451-2460.
- LU J J, YAN R, HE X S, JIN H M, WANG J X, WANG C X, SUN H M. The embryonic callus induction and somatic embryogenesis of *Hippeastrum vittatum* 'Red Lion'[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(12): 2451-2460. (in Chinese)
- [26] 张梦迪. 基于不同外植体的朱顶红'Blossom Peacock'和'Royal Velvet'高效离体再生[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- ZHANG M D. High-efficiency *in vitro* regeneration in *Hippeastrum vittatum* 'Blossom Peacock' and 'Royal Velvet' based on different explants[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [27] 陈云凤, 张春荣, 黄霞, 黄学林. TDZ 对植物体细胞胚胎发生的作用[J]. 植物生理学通讯, 2006(1): 127-133.
- CHEN Y F, ZHANG C R, HUANG X, HUANG X L. Effect of TDZ on somatic embryogenesis of plant[J]. Plant Physiology Journal, 2006(1): 127-133. (in Chinese)
- [28] HUANG C L, CHANG K C, OKUBO H. *In vitro* morphogenesis from ovaries of *Hippeastrum × hybridum*[J]. Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University, 2015, 50: 19-25.
- [29] 邓莎. 朱顶红和威尼替舞花姜及盐桦的组织培养研究[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2019.
- DENG S. Study of tissue culture of *Hippeastrum* 'Shengyin No.3' and *Globba winitti* and *Betula halophila*[D]. Guang-

- zhou: Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2019. (in Chinese)
- [30] 叶晓青, 余建明, 邓衍明, 童红玉. 不同类型细胞分裂素对扇蕨不定芽诱导和植株再生的影响[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(1): 172-175.
- YE X J, SHE J M, DENG Y M, TONG H Y. Effects of cytokinins of different types on induction of adventitious buds and plant regeneration in *Neocheiropteris palmatopedata* (Baker) Christ[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2012, 28(1): 172-175. (in Chinese)
- [31] 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(6): 62-63.
- PEI D S. Effects of different mediums on regenerate shoots initiation in *Amaryllis vittata*[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2008(6): 62-63. (in Chinese)
- [32] AMIR A, NIAZI R S, SAIRA Y, ABDUL M, NAVEED N H. Effect of different cytokinins and auxins on micropropagation and callogenesis in amaryllus (*Amaryllis vittata*)[J]. Asian Journal of Chemistry, 2013, 25(1): 287-291.
- [33] 张松, 达克东, 曹辰兴, 姜璐琰, 朱瑞芙, 吴禄平. 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.
- ZHANG S, DA K D, CAO Z X, JIANG L Y, ZHU R F, WU L P. *In vitro* rapid propagation system and embryogenesis of *Hippeastrum*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29(3): 285-287. (in Chinese)
- [34] 邹水平, 郭翔, 袁嘉铭, 吴小业. 朱顶红组培苗小鳞茎切割诱导新植株技术研究[J]. 湖南农业科学, 2018(4): 5-7.
- ZOU S P, GUO X, YUAN J M, WU X Y. *In vitro* micro-propagation from little a aseptic bulb of tissue-cultured *Hippeastrum*[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2018(4): 5-7. (in Chinese)
- [35] SEABROOK J E, CUMMING B G. The *in vitro* propagation of amaryllis (*Hippeastrum* spp. hybrids)[J]. *In Vitro*, 1977, 13(12): 831-836.
- [36] 袁凤英, 李秀芹, 朱孔杰. 激动素应用研究进展[J]. 广州化工, 2015, 43(23): 45-46, 72.
- YUAN F Y, LI X Q, ZHU K J. Research progress on application of kinetin[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2015, 43(23): 45-46, 72. (in Chinese)