

## 大花飞燕草的组织培养及再生体系建立

王金发, 何小玲\*, 何炎明

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘要:** 分别采用种子切段、无菌苗真叶作外植体首次成功建立了大花飞燕草的组织培养和再生体系。结果表明: 大花飞燕草种子切段和无菌苗真叶大多数是通过愈伤组织途径再生, 也有极少数不经过愈伤组织阶段而直接再生出小植株。在合适的培养基上, 种子切段和叶片两种外植体离体培养均能高效再生, 平均每个外植体能分化出 10-20 个不定芽。种子切段培养的最适通用培养基为改良 MS 附加 ZT  $3 \text{ mg L}^{-1}$  和 NAA  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$ ; 叶培养的最适通用培养基为 MS 附加 6-BA  $3 \text{ mg L}^{-1}$  和 NAA  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$ 。

**关键词:** 大花飞燕草; 观赏植物; 组织培养; 再生

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2000)04-0315-04

## TISSUE CULTURE AND ESTABLISHMENT OF REGENERATION SYSTEM OF *DELPHINIUM GRANDIFLORUM*

WANG Jin-fa, HE Xiao-ling\*, HE Yan-ming

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The explants from seed and leaf segments of *Delphinium grandiflorum* were used to establish culture *in vitro* and regeneration system. The experiments showed that most explants induced calli, few of them could form plantlets directly from seed or leaf segments. Under suitable culture condition, high regeneration rates could be obtained from explants of seed and leaf segments, each explant regenerating 10-20 plantlets. Optimum medium for seed segments of *Delphinium grandiflorum* was the modified MS medium (half of macronutrients and sucrose, 10 times the amount of Vit B<sub>1</sub>) supplemented with  $3 \text{ mg L}^{-1}$  ZT and  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  NAA, and for leaf segments, the medium of MS with  $3 \text{ mg L}^{-1}$  6-BA and  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  NAA.

**Key words:** *Delphinium grandiflorum*; Ornamental plant; Tissue culture; Regeneration

大花飞燕草 (*Delphinium grandiflorum* L.), 又名翠雀, 属毛茛科翠雀属宿根草本花卉。“美丽飞燕草太平洋混色”是其优良的重瓣切花品种, 其花形奇特, 花色淡雅, 是名贵的背景切花和花境用花; 目前主要用种子繁殖, 但出苗迟缓, 增殖率低, 且有种子繁殖后代发生分离的问题<sup>[1]</sup>。1998 年我们首次成功进行了大花飞燕草的离体培养<sup>[2]</sup>, 现又分别采用其种子切段、无菌苗

收稿日期: 2000-01-18

基金项目: 广东省自然科学基金资助 (930244, 990258)

\*现工作单位: 四川省农科院作物所, 成都 610066

真叶作外植体离体培养,成功地建立了大花飞燕草的再生体系。

## 1 材料和方法

**材料** 大花飞燕草(*Delphinium grandiflorum* L.)的种子由四川省成都市明日风花卉种苗公司提供,是香港高华种子有限公司的种子,其品种名为:“美丽飞燕草太平洋混色”。

**种子萌发** 种子用无菌水浸泡两天,再用饱和漂白粉浸泡 10 min,无菌水冲洗 5-8 次后,用 0.1%  $\text{AgNO}_3$  处理 3 min,用无菌水洗净后植于  $1/2\text{MS} + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg L}^{-1}$  培养基。

**种子切段培养** 将消毒好的无菌种子切成两段植于固体培养基中进行培养。以 MS 培养基<sup>[3]</sup>为基本培养基,附加不同的激素,添加 3% 蔗糖,0.7% 琼脂。培养温度 21-25 ℃,每日光照 10 h,光照强度 1200 lx。

**无菌苗真叶培养** 取无菌种子苗真叶切成  $0.5 \text{ cm}^2$  的小块(带中脉),依次接种到以下的培养基中:①愈伤组织诱导培养基:MS + 6-BA  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ (单位下同) + NAA 0.5 + IAA 0.2。②芽分化培养基:MS + 6-BA 3 + NAA 0.1。③生根培养基:MS + IBA 0.5。培养基①中添加 3% 蔗糖,0.3% 琼脂。培养基②、③中添加 3% 蔗糖,0.8% 琼脂。pH 5.8。培养温度 21-25 ℃,每日光照 14 h,光照强度 1500 lx。将再生健壮的植株进行炼苗移栽。

## 2 结果与分析

### 2.1 无菌苗的获得

大花飞燕草的种子不经消毒用常规方法在苗床中萌发,其发芽率为 60%-80%,在我们的实验条件下,种子发芽率为 75%-95%,长势良好且均匀。

种子用饱和漂白粉溶液和 0.1%  $\text{AgNO}_3$  联合消毒的方法较好。植于  $1/2\text{MS} + 6\text{-BA } 0.5$  培养基上,约 10 d 左右种子开始萌发,再 10 d 后长出真叶。

### 2.2 种子切段愈伤组织诱导与芽分化

将消毒好的种子横切成两段植于愈伤组织诱导培养基上培养,第 3 天开始增大,两周后在不同的诱导培养基上形成不同类型的愈伤组织。在含有 6-BA 0.5 和 NAA 0.1 的 MS 培养基上不能诱导出愈伤组织,在含有 6-BA 1 和 NAA 0.1 的 MS 培养基上诱导率较低(30%),生长速度较慢,仅形成少量透明状水样化愈伤组织(图版 I:1)。梯度增加激素的含量,形成的愈伤组织逐渐增多,类型变为半透明的瘤状愈伤组织。当培养基中激素组合为 6-BA 2.5 + NAA 1 + 2,4-D 1 时,形成大量半透明的瘤状愈伤组织,诱导率达 90%。继续增加激素用量,在激素组合为 6-BA 3 + NAA 1 + 2,4-D 1 时,形成浅绿色的致密瘤状愈伤组织块,极少数外植体可不经愈伤组织阶段而直接分化出小植株,这可能是经过了胚状体发生途径,因为它很容易从母体组织上剥离下来,这是区别胚状体和不定芽的标准之一。在激素组合 6-BA 4 + NAA 1 + 2,4-D 1 时,形成大量结实的愈伤组织块,如果持续使用这种浓度的激素培养,那么形成的愈伤组织将逐渐褐化,丧失分化能力。

大花飞燕草种子切段在诱导培养基上形成的愈伤组织有三种类型:一种为透明的含水量较多的愈伤组织,第二种为半透明的瘤状愈伤组织,第三种为致密的瘤状愈伤组织。在合适的分

化培养基上, 水样化透明的愈伤组织只有极少数有芽的分化, 而半透明的和致密的瘤状愈伤组织均能 100% 分化出不定芽(图版 I:2), 只是半透明的瘤状愈伤组织分化的丛生芽明显比致密的瘤状愈伤组织多, 平均每个外植体能分化出 20-30 个小芽, 而致密的瘤状愈伤组织平均每个外植体只能分化出 5-10 个小芽, 但长出的小植株更为健壮且畸变率很低。

### 2.3 种子切段的分化培养

大花飞燕草种子切段外植体在几种培养基中芽的诱导与分化情况见表 1。

从表 1 可见, 在我们的实验条件下, 提高 6-BA 的浓度可得到较高的出芽外植体数和总出芽数, 用 KT 或 ZT 代替 6-BA, 出芽外植体数和总出芽数都有较大提高, 特别是 KT 3 代替 6-BA 3, 不仅出芽外植体数达到 100%, 每个外植体的出芽数量也会大大提高。如果用改良的 MS 培养基, 不仅出芽外植体数达到 100%, 且每个外植体的平均出芽数达到 20 个, 大大提高了增殖效率。

表 1 大花飞燕草种子切段在不同培养基的出芽率(接种 60 d 后观察)

Table 1 Effect of growth regulators on shoot proliferation of *Delphinium grandiflorum* from seed segments cultured after 60 days

激素 Growth regulators (mg L <sup>-1</sup> )	外植体数 No. of explants	出芽外植 体数 No. of budding explants	总出芽数 Total no. of shoots	平均每块外植体 出芽数 Average no. of shoots per explant
MS+6-BA 1+NAA 0.1	60	8	13	1.7
MS+6-BA 2+NAA 0.2	60	40	184	4.6
MS+6-BA 3+NAA 0.3	30	27	135	5.0
MS+KT 3+NAA 0.3	30	30	150	5.0
MS+ZT 3+NAA 0.3	30	30	300	10.0
MS*	30	30	600	20.0

\*改良 MS 培养基组成为: 大量元素和糖减半, Vit B<sub>1</sub> 扩大 10 倍, 附加 ZT 3+NAA 0.3. Modified MS: Half of macronutrients and sucrose, 10 times the amount of Vit B<sub>1</sub>, with ZT 3 mg L<sup>-1</sup>+NAA 0.3 mg L<sup>-1</sup>.

### 2.4 无菌苗真叶愈伤组织诱导与芽分化

无菌种子苗的幼嫩真叶切块接种到合适的培养基上, 培养 10 d 后, 叶片边缘开始膨大形成愈伤组织(图版 I:3), 有些颜色变浅。培养 20 d 后统计 40 个外植体, 愈伤组织发生率为 100%, 并开始有小芽点产生。切口的变化由原态→白色→白色膨胀愈伤组织→玉绿色愈伤组织→分化出不定芽(图版 I:4)。少数外植体不经过愈伤组织阶段而直接分化出小植株(图版 I:5)。要及时将绿色半透明愈伤组织块转移到合适的芽分化培养基上, 否则会褐化死去。约 7 d 后, 愈伤组织表面有绿色的芽点产生, 培养 5 周后统计 20 个外植体, 平均每个外植体分化的芽数为 20 个(图版 I:6)。

激素浓度配比的不同, 叶片切口小芽分化再生的速度和数量有很大差异。当 6-BA 的浓度为 0.5 mg L<sup>-1</sup> 时, 培养 20 d, 只有少数变为绿色, 培养 30 d, 只有个别长出小芽。若将 6-BA 的浓度提高到 3 mg L<sup>-1</sup>, 培养 20 d 后, 将近一半外植体转变成绿色, 并形成芽点, 培养 30 d, 芽高达 0.2 cm, 40 d 后, 芽高达到 0.5 cm。若是在 MS 培养基中添加 ZT 3+NAA 0.1, 培养 20 d, 叶片外植体几乎全部形成愈伤组织, 培养 30 d, 全部形成小芽, 培养 40 d, 芽高达 0.5 cm。

### 2.5 继代增殖培养

将在诱导和分化培养基上培养 60 d 后的幼苗依次分别转入两种培养基增殖, 即① MS+6-BA 1+NAA 0.1 和② MS+ZT 1+NAA 0.1, 每次继代培养约 70-80 d。幼苗在初转入增殖培养基时, 均有 15-20 d 的停滞期, 随后进入较快的增殖期, 此阶段幼苗不断分生但不长高, 两个月后增殖逐渐减慢, 进入幼苗缓慢生长和缓慢增殖并存期, 此时个别幼苗长出极少量幼根, 分

生的芽逐渐分生成独立小植株。①号培养基增殖6倍,叶片皱缩明显,但叶色浓绿。②号培养基增殖4倍,叶片宽而舒展,叶色黄绿。相比之下,①号培养基增殖倍数高,保绿好,而②号培养基幼苗生长较快。

## 2.6 生根壮苗培养

经继代增殖的苗,数量大增,但根系不发达,苗欠健壮。此时除一部分再次继代增殖外,其他分别转入两种生根壮苗培养基:①号(将MS中无机盐减半),②号(为改良MS,其中大量元素减半,维生素B<sub>1</sub>扩大10倍,并附加0.5 mg L<sup>-1</sup> IBA)。经80 d培养,瓶苗根系发达,植株较健壮(图版 I:7),可供炼苗移栽。直观比较下,②号处理根系更发达,株高和叶片大小显著优于①号,叶片浓绿色,光泽极强;而①号根系较短而纤弱,植株较矮小,叶片黄绿,缺乏光泽。

## 2.7 炼苗移栽

在壮苗培养基中生长80 d后,打开瓶盖,炼苗2-3 d,然后移栽。栽植前用清水洗掉苗根上的琼脂。栽植小苗的基质是营养土:砂土=1:3,上面覆盖少许苔藓。初期用透明有孔的塑料薄膜盖在容器上保湿,10 d后除去塑料薄膜,用低浓度氮磷钾叶面复合肥喷洒小苗(图版 I:8),以后每15 d一次,用此法出苗成活率可达70%以上。

## 3 讨论

大花飞燕草具有较高的观赏价值和经济价值。特别是近年来,由于其花形的奇特和花色的淡雅以及具有较强的抗逆性等优点而越来越受到人们的喜爱。但迄今为止,国内外尚未有其组织培养成功的报道。我们在外植体的选择、激素的配比组合、以及增殖方法的使用等多方面进行了广泛的探索和大量的试验,从而摸索出了一套较为成功的大花飞燕草的组织培养方法,建立了大花飞燕草的高效再生体系,为快速繁殖、规模化生产以及培育优质大花飞燕草的新品系奠定了基础,为利用基因工程技术改良其品质提供了可行途径。

## 参考文献:

- [1] 余树勋, 吴应祥. 花卉词典 [Z]. 北京: 农业出版社, 1993, 71-72.
- [2] 何小玲, 王金发. 大花飞燕草的组织培养及植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(1):39-40.
- [3] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and biosassay with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15:473-497.

## 图版说明

1. 种子切段诱导形成的透明状愈伤组织; 2. 种子切段愈伤组织分化为丛生芽; 3. 叶切段诱导形成的愈伤组织; 4. 叶切段愈伤组织分化出不定芽; 5. 叶切段直接再生出小植株; 6. 叶切段愈伤组织分化的丛生芽; 7. 大花飞燕草的生根苗; 8. 移栽后的大花飞燕草组培苗。

## Explanation of plate

1. Transparent callus induced from seed segment; 2. Multiple-shoots redifferentiated from callus of seed segments; 3. Callus induced from leaf segment; 4. Adventitious shoots redifferentiated from callus of leaf segment; 5. Plantlet regenerated directly from leaf segment; 6. Multiple-shoots redifferentiated from calli of leaf segments; 7. Rooting plantlets of *Delphinium grandiflorum*; 8. Plantlet of *Delphinium grandiflorum* after transplanting.