

中国石蒜的组织培养和快速繁殖

戴 萍¹, 张 春 霞¹, 张 智², 邓 波², 周 坚¹

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 江苏骏马农林科技股份有限公司, 江苏 张家港 215600)

摘 要:以中国石蒜的种胚为外植体,进行了组织培养与快速繁殖技术的研究。结果表明:种子表面消毒以 75%酒精预处理 30 s,再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 15 min 效果最好;愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS+2,4-D 2.0 mg/L;芽分化诱导最佳增殖培养基为 MS+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;小鳞茎生长最佳培养基为 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 3.0 mg/L;在理想的根分化培养基 MS+NAA 1.0 mg/L 上,生根率达到 81%。练苗后,移入营养土与珍珠岩(1:1)的基质中,移栽成活率达到 78%。

关键词:中国石蒜;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)22-0095-04

中国石蒜(*Lycoris chinensis*)属石蒜科石蒜属多年生草本植物。石蒜属植物全球约有 20 种,我国有 17 种,集中分布于长江中下游地区。中国石蒜花色艳丽,花型奇特,是颇有发展前途的鲜切花材料和园林观赏植物;其鳞茎中含有较高含量的贵重生物制药原料加兰他敏、石蒜碱、石蒜胺碱等 10 余种生物碱,以其鳞茎为原料提取的生物碱制成的生物制剂,主要用于消肿、解毒、消炎以及降血压等,能治疗小儿麻痹症,预防老年痴呆症。在工业上,由于中国石蒜鳞茎中含有大量淀粉^[1],不仅可用于植物胶提取,成为无污染的化工原料,还可用于酒精生产,成为新一代能源植物。由于其经济开发价值高,因而市场需求量日益增加。但目前无论是中国石蒜,还是石蒜属中的其它品种,绝大多数还处于野生状态,市场需求是依靠大量采挖野生种球自然资源维持,这对生态环境造成了极大破坏。种球繁殖问题已成为石蒜产业化发展的瓶颈。采用组织培养法进行石蒜的快速繁殖是解决种球繁殖的有效途径。关于石蒜属植物组织培养的研究主要以鳞茎为外植体诱导不定芽实现植株再生^[2-5]。该研究以中国石蒜的种胚为外植体,通过愈伤组织诱导途径实现中国石蒜的快速繁殖。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料中国石蒜的果实采自于江苏省句容市宝华山国家森林公园。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 将果实剥掉果皮,取出种子,适当风干后装于布袋中,于 4℃冰箱中保存备用。选取健康饱满的中国石蒜种子,先用洗洁精溶液洗涤种子表面,自来水冲洗 1 h;然后在超净工作台上,用 70%酒精处理种子 30 s,无菌水冲洗 3 次;再用 0.1% HgCl₂ 浸泡灭菌,无菌水冲洗 4~6 次;无菌滤纸吸干种子表面残留水分,切开种子,取出种子中的胚,0.1% HgCl₂ 浸泡灭菌时间设置 4 个梯度:A1:5、A2:10、A3:15 和 A4:20 min。培养 15 d 后统计污染率和存活率。污染率(%)=污染的外植体数/接种外植体总数×100%,死亡率(%)=死亡的外植体数/未污染外植体数×100%,存活率(%)=存活的外植体数/未污染外植体数×100%。

1.2.2 培养过程及方法 以 MS 为基本培养基,根据试验目的添加不同种类和浓度的 6-BA(6-苄基腺嘌呤)、NAA(萘乙酸)和 2,4-D(2,4-二氧苯氧乙酸)。附加 3.0%蔗糖和 6.0 g/L 琼脂,调整 pH 为 5.8,配制分装后,于温度 121℃、压力 1.1 kg/cm² 的条件下灭菌 20 min。外植体灭菌接种后,在暗培养和光照强度 20~30 μmol·m⁻²·s⁻¹,光照时间为 14 h/d 的光照培养 2 种条件下进行愈伤组织的诱导。芽分化诱导、小鳞茎生长及根诱导生长均在光照条件下培养。培养室温度(25±3)℃。

将取出的种子胚接种到愈伤组织诱导培养基上,在培养室内进行光照培养和暗培养。当愈伤组织块径达

第一作者简介:戴萍(1987-),女,在读硕士,现主要从事石蒜生长发育及繁殖方面的研究工作。

责任作者:周坚(1961-),男,教授,现主要从事植物生长发育及栽培方面的研究工作。E-mail:zhiwu@njfu.edu.cn.

基金项目:国家林业公益性行业科研专项资助项目(201004056);江苏省林业三项工程资助项目([2010]13)。

收稿日期:2012-07-17

到 3 cm 左右时,将其分块转入新鲜的增殖培养基。每 25~30 d 左右,转继代 1 次。将生长良好的愈伤组织转接到诱导芽分化的培养基上培养,待分化出不定芽。取分化良好芽丛,转种到小鳞茎生长培养基中,培养 30 d 左右,不定芽生长成小鳞茎。取生长健壮小鳞茎,转种到生根培养基中,诱导生根。取生根培养 30~40 d,根系发达的试管苗进行练苗和移栽。将培养瓶移至与培养室温度相近的温室大棚中,打开瓶口,进行练苗。1 周后,将植株取出,用水洗净根部的培养基,移栽入已消毒的基质中。采用基质为(A)珍珠岩:腐殖质=1:1;(B)腐殖质(下):园土(上)=1:1。在移栽入基质后,分为每天浇水和每 2~3 d 浇 1 次水 2 种处理,每次将基质湿润即可。30 d 后统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对接种效果的影响

不同处理时间对种子灭菌效果不一样。由表 1 可知,随着 HgCl_2 浸泡时间的延长,污染率呈下降趋势,但死亡率升高,存活率呈下降趋势。 HgCl_2 处理 5 min 时,存活率最高,为 90%,污染率也最高,高达 33%,处理 20 min 时,污染率最低,仅为 3%,死亡率升高到 37%,存活率也只有 63%。综合考虑外植体的存活率和污染率等,最佳的处理方法是用 0.1% HgCl_2 浸泡灭菌 15 min,该处理存活率达 85%,死亡率为 15%,污染率为 5%。

表 1 不同消毒时间对接种效果的影响

Table 1 Effect of different sterilization methods on inoculated result of *Lycoris chinensis*

HgCl_2 灭菌 时间/min	接种数 /个	污染数 /个	存活数 /个	污染率 /%	死亡率 /%	存活率 /%
5	36	12	19	33	10	90
10	36	7	25	19	14	86
15	36	2	29	5	15	85
20	36	1	22	3	37	63

2.2 愈伤组织诱导

2.2.1 光照对胚愈伤组织诱导的影响 在中国石蒜胚诱导愈伤组织的试验中采用光培养、光培养-暗培养、暗培养 3 种处理方式。由表 2 可知,光照条件对胚愈伤组织诱导影响非常明显,光照对愈伤组织诱导有抑制作用。光照培养条件下愈伤组织的诱导率极低,仅为 12%,暗培养条件有利于愈伤组织诱导,诱导率最高,达到 80%,而光培养-暗培养交替进行的条件下,诱导率介于光培养和暗培养 2 种条件之间,为 48%。

表 2 光照对胚愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of light condition on callus induction of *Lycoris chinensis*

处理	PGR/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种数/个	诱导率/%	愈伤状态
光培养	2,4-D 2+CH250	25	12	深黄色,结构紧密
光-暗培养	同上	25	48	黄色,结构紧密
暗培养	同上	25	80	浅黄色,结构疏松

2.2.2 不同植物生长物质浓度对比对愈伤组织诱导及继代培养的影响 不同生长调节物质及组合对胚诱导愈伤组织的结果均有一定影响(表 3)。将 2,4-D 单独使用或者与 6-BA 搭配使用均能诱导出愈伤组织。单独使用 2,4-D 时,浓度由 1 mg/L 变为 2 mg/L 再到 3 mg/L 时,愈伤诱导率先升高后降低,说明提高 2,4-D 浓度可促进愈伤组织的诱导,但浓度过高会对愈伤组织的诱导有抑制作用,因此在中国石蒜胚诱导愈伤中 2,4-D 为 2 mg/L 最佳。当 2,4-D 与 6-BA 搭配使用时,2,4-D 浓度为 2 mg/L 、6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时,愈伤组织诱导率最高,达到 82%。试验中诱导出的愈伤组织有 3 种不同类型的愈伤组织(表 3),A 型愈伤组织:白色透明或半透明,结构粘软,水浸状,含水量极高,生长缓慢或不生长,在培养过程中色泽越来越暗淡,并逐渐褐化死亡;B 型愈伤组织:黄色,质地坚硬,表明有颗粒突起,含水量少,长期培养后会通过器官发生途径分化出芽。C 型愈伤组织:浅黄色,结构疏松,颗粒状,含水量介于 A 型和 B 型之间,增殖较快,能保持长期继代。综合考虑到诱导率较高,又能获取浅黄色,结构较疏松、稳定的愈伤组织等因素,以处理 E4,即培养基中添加 2 mg/L 2,4-D 较适合中国石蒜胚愈伤组织的诱导及愈伤组织增值继代培养。

表 3 不同生长调节物质对胚愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of different PGR on callus induction of *Lycoris chinensis*

编号	2,4-D/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种数/个	诱导率/%	愈伤类型
E1	1	—	36	65	C
E2	1	0.5	36	50	B
E3	1	1	36	27	B
E4	2	—	36	80	C
E5	2	0.5	36	82	B
E6	2	1	36	54	B
E7	2	2	36	48	B
E8	3	—	36	70	A
E9	3	0.5	36	76	A
E10	3	1	36	60	A,B
E11	3	2	36	50	A,B
E12	3	3	36	33	A,B

2.3 不定芽的诱导和小鳞茎生长

2.3.1 生长调节物质对不定芽诱导的影响 将继代培养培养多次,并且保持良好生长状态的愈伤组织转至由 NAA 和 6-BA 不同浓度组合的培养基中,诱导不定芽的发生。由表 4 可知,随着培养基中 6-BA 浓度的升高,愈伤组织产生不定芽的诱导率呈上升趋势。用 6-BA 5 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L 按 10:1 的比例组成的不定芽诱导培养基得到的不定芽诱导率为 100%,为诱导率最高的组合,是中国石蒜愈伤组织诱导不定芽分化的最适培养基。

表 4 不同生长调节物质对诱导不定芽的影响

Table 4 Effect of different PGR on adventitious buds induction of *Lycoris chinensis*

编号	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种数/块	诱导率/%
G1	1	0.5	30	70
G2	3	3	30	80
G3	5	0.5	30	100
G4	5	1	30	95

2.3.2 生长调节物质对小鳞茎生长的影响 采用 6-BA 和 NAA 2 种生长调节物质设置不同浓度组合进行不定芽的继代培养,让其长成鳞茎。1 个月后试验结果见表 5,统计鳞茎的直径,发现组合 H3 中鳞茎的直径均大于 0.5 cm,而其它 2 个组合得到的鳞茎的直径均小于 0.5 cm。因此,若要使芽继代后快速长成小鳞茎,继代培养基选用 6-BA 3 mg/L+NAA 3 mg/L 为宜。

表 5 不同生长调节物质对不定芽继代培养的影响

Table 5 Effect of different PGR on adventitious buds subculture of *Lycoris chinensis*

编号	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	生长状况
H1	2	0.5	不定芽长成小鳞茎较慢,但在不定芽的基部有较多新的小芽产生。叶片黄绿色,细小
H2	3	1	不定芽长成的鳞茎较小,不定芽基部也有新芽产生,叶片绿色,长势正常
H3	3	3	不定芽长成的鳞茎生长最快,鳞茎较大,鳞茎基部有一些小芽产生,叶片深绿色,长势较好

2.4 生根培养

将鳞茎直径达到 1 cm 左右的小鳞茎转接到 MS 培养基添加 5 种不同浓度的 NAA 的生根培养基中进行生根培养。由 30 d 后统计结果(表 6)可知,随着 NAA 浓度的升高,生根率有所上升,根较粗壮,根数增多,但是当 NAA 浓度由 2 mg/L 升高到 3 mg/L 时,生根率从 81%下降到 76%,根长变短,较高浓度的 NAA 抑制了根的生长。I3 中的生根效果最好,再生植株在这种培养基中培养 30 d 后,生根率达到 80%。该种培养基中再生植株根系发育良好,具体表现为再生植株平均具有 4.2 条根,与其它组合培养基相比,平均根数最多,且根较长,为 2 cm,生长状况较好,基部粗壮,尖端渐细。

表 6 不同生长调节物质对诱导生根的影响

Table 6 Effect of different PGR on radication of adventitious buds

编号	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种数/株	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm
I1	0.1	20	20	1.5	2.2
I2	0.5	20	67	2.7	1.4
I3	1	20	80	4.2	2
I4	2	20	81	3.5	1.7
I5	3	20	76	3	1.5

2.5 练苗与移栽

生根培养一段时间后,当根的数量达到 2~3 条,根长在 3 cm 以上时,打开封口膜,将培养瓶移至与培养室温度相近的温室大棚中进行练苗,注意遮阳保湿。1 周

后,将植株取出,用流水洗净根部的培养基,移栽入已消毒的基质中。采用珍珠岩:腐殖质=1:1 和腐殖质(下):园土(上)=1:1 的 2 种移栽基质进行移栽。若每天都浇水或每次浇水过多,都会引起烂根,并逐渐死亡;在每 2~3 d 浇 1 次水,基质湿润即可的情况下,植株成活率大大提高。植株移入基质中几天后,外层叶片会变黄,枯萎,从鳞茎中心处又抽出新的叶子。试验结果表明,在采用腐殖质和园土的组组合基质中,成活率仅为 33%。在珍珠岩和腐殖质以 1:1 的比例基质中,其成活率为 67%。分析其原因,可能是用腐殖质和园土的移栽基质中园土存水能力强,粘性较大影响了基质的透气性;而珍珠岩和腐殖质组成的移栽基质较疏松、透气性好,且腐殖质能提供一定的养分供给植株生长,有利于不耐水湿的中国石蒜幼苗生长。

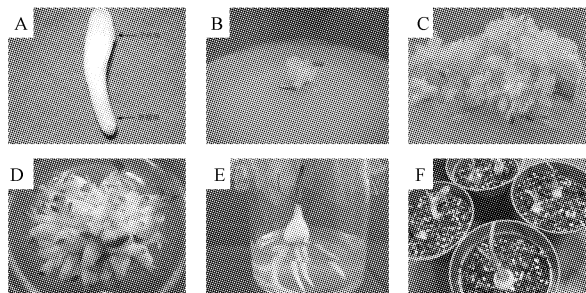


图 1 中国石蒜再生体系的建立

注:A:外植体种胚;B:愈伤组织;C:愈伤组织分化培养 35 d;D:小鳞茎簇;E:生根培养 35 d;F:生长在基质上的再生植株。

Fig. 1 Establishment of plantlet regeneration system from embryos of *Lycoris chinensis*

Note: A; Embryo of explants; B; Callus; C; Callus culture for 35 days; D; Clusters of bulblets; E; Rooting culture for 35 days; F; Regenerated plants growing on the substrate.

3 讨论与结论

中国石蒜(*Lycoris chinensis*)生长特性及 SSR 分子体系建立等方面的研究已有报道^[6-7],但关于中国石蒜的愈伤组织诱导及快速繁殖研究尚未见报道。该研究以中国石蒜种胚为外植体,通过愈伤组织诱导途径实现植株再生,从而达到快速繁殖目的。植物组织培养中,植物生长调节剂的种类、组合以及水平对组织的诱导、分化及增殖生长起着重要的调控作用。在中国石蒜种胚愈伤组织的诱导阶段,提高 2,4-D 浓度可促进愈伤组织的诱导,当 2,4-D 浓度由 1 mg/L 升为 2 mg/L 时,愈伤组织诱导率从 65%上升到 80%;但当 2,4-D 浓度达到 3 mg/L 时,不仅会降低愈伤组织的诱导率,而且诱导出的愈伤组织的质量较差,从外形上看,愈伤组织水浸状,结构粘软,生长缓慢易褐化或分化,不利愈伤组织的继代增殖培养,这在其它植物的愈伤组织培养研究中有类似结果^[8]。该研究表明,在中国石蒜愈伤组织分化培养

基中,以 6-BA 和 NAA 相组合可促进不定芽的诱导发生,又以 6-BA 5 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L 组合所得到的诱导率最高,为 100%,表明不定芽诱导时应去掉生长素或降低其含量,在较高 6-BA 与低浓度的 NAA 组合促进不定芽的诱导,这与其它研究中的结论相似^[9]。

该研究以中国石蒜的种胚为培养材料,筛选出了从愈伤组织诱导、增殖,不定芽分化、小鳞茎生长,直至生根的最适培养基,研究结果不仅对中国石蒜今后的规模化快速繁殖生产具有重要意义,而且研究过程中建立的愈伤体系,也为中国石蒜次生代谢物的研究及基因工程的研究等方面提供了技术平台。

参考文献

[1] 邵京,王晓静,周坚.中国石蒜鳞茎中淀粉粒的分布特征[J].西北植物学报,2012,30(4):645-651.

[2] 郭兆武,郭旭春,高建芳,等.黄花石蒜不同外植体的组织培养研究[J].西北植物学报,2010,30(8):1695-1700.

[3] 王光萍,陈英,周坚,等.长筒石蒜鳞片诱导植株再生[J].植物生理学通讯,2005,41(4):457-460.

[4] 王燕,许峰,李琳玲,等.红花石蒜的组织培养[J].江西农业学报,2007,19(7):57-59.

[5] Huang L C, Liu D M. Clonal multiplication of lycoris aurea by tissue culture[J]. Sei Hortic, 1989, 40:145-152.

[6] 鲍淳松,张海珍,江燕,等.中国石蒜生长特性及高量施肥研究[J].北方园艺,2011(11):66-69.

[7] 叶剑,童再康,黄华若,等.中国石蒜 SSR 体系的建立及性状对应分析[J].园艺学报,2011,38(3):571-578.

[8] 周建辉,张玉琼,李明凯,等.石蒜愈伤组织的诱导及其继代培养[J].植物生理学通讯,2010,46(12):1215-1218.

[9] 梁钻姬,潘超美,赖珍珍,等.药用植物华泽兰组织培养和快速繁殖[J].植物生理学学报,2012,48(1):85-89.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Lycoris chinensis*

DAI Ping¹, ZHANG Chun-xia¹, ZHANG Zhi², DENG Bo², ZHOU Jian¹

(1. College of Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037; 2. Jiangsu Junma Agricultural and Forestry Science and Technology Limited Company, Zhangjiagang, Jiangsu 215600)

Abstract: Seed mbryoes of *Lycoris chinensis* were used as explant in the study of tissue culture and rapid propagation. The results showed that the most suitable procedure for sterilization was to soak seeds into 0.1% HgCl₂ solution for 15 min after retreatment with 75% alcohol for 15 s. The results indicated that the best induced medium for callus induction was MS+2,4-D 2.0 mg/L. The best medium for bud differentiation was MS+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L. The best medium for little bulbs growth was MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 3.0 mg/L. The most optimum rooting medium was MS+NAA 1.0 mg/L, and the rooting rate was 81%. The rooting seedlings were effectively transplanted into base materials which contained nutritious soil and perlite (1:1). The survival rate was up to 75%.

Key words: *Lycoris chinensis* Traub; tissue culture; rapid propagation

全国中文核心期刊 全国优秀农业期刊

《中国种业》

《中国种业》是由农业部主管,中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。刊物目标定位:以行业导刊的面目出现,并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围:大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等,信息量大,导向性强,技术实用。

欢迎投稿、刊登广告

读者对象:各级种子管理、经营企业的领导和技术人员,各级农业科研、推广部门人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊,大 16 开,每期 8 元,全年 96 元。国内统一刊号:CN 11-4413/S,国际标准刊号:ISSN 1671-895X,全国各地邮局均可订阅,也可直接汇款至编辑部订阅,挂号需每期另加 3 元。

邮发代号:82-132

地址:(100081)北京市中关村南大街 12 号 中国种业编辑部

电话:010-82105796(编辑部) 010-82105795(广告发行部)

传真:010-82105796 网址:www.chinaseedqks.cn

E-mail:chinaseedqks@sina.com chinaseedqks@163.com