

石蒜愈伤组织的诱导及其植株再生研究

刘合霞, 周 坚

(南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘 要:以石蒜为试材,研究了不同激素组合和外植体选择对石蒜愈伤组织诱导及植株再生的影响。结果表明:外植体选择是石蒜愈伤组织诱导的关键因素,3种外植体中,种子胚诱导愈伤组织的效果最好;在MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L培养基中,诱导愈伤率最高可达82.4%。并能较好地诱导愈伤组织发生不定芽,MS+NAA 0.1 mg/L能较好地诱导愈伤组织发生根。石蒜再生植株进行移栽的最佳基质应为腐殖质和珍珠岩以1:1的比例组成,其成活率为70%。

关键词:石蒜;愈伤组织;植株再生

中图分类号:S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0093-04

石蒜(*Lycoris radiata* Herb.)属单子叶植物纲石蒜科(Amaryllidaceae)多年生草本植物^[1],别名老鸦蒜、蒜头草,有些地方因多数种类花被裂片强烈反卷而称其为龙爪花,还有些地方因其鳞茎有毒性,可作土农药杀灭害虫,又称之为蟑螂花^[2]。石蒜属植物不仅外形美观,还具有较高的药用及营养保健价值,有广阔的开发应用前景^[3]。近年来市场上对石蒜属植物的需求量日益增加,但石蒜有性杂交结实率很低,大部分是花而不实^[4];

其自然分球繁殖系数低、速度慢,因而它的快速繁殖成为迫切需要解决的问题^[5]。目前对石蒜组织培养的研究较多,主要以鳞茎等为外植体,通过器官发生途径获得再生植株,而通过诱导愈伤组织,再诱导细胞分化获得完整植株的研究则较少;在大部分的研究中,愈伤组织都是由诱导鳞茎等外植体获得,以种子胚为外植体诱导愈伤组织获得完整植株的研究尚鲜见报道。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2010年9月,待石蒜果实成熟后,于南京林业大学南大山苗圃采集石蒜种子;石蒜组培苗,培养于南京林业大学森林资源与环境学院组培室。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 石蒜种子处理:挑选健康饱满、大小一致的石蒜种子,用洗涤剂洗净后,流水冲洗2~4 h。在超净工作台上,将种子置于已灭菌的玻璃瓶中,用

第一作者简介:刘合霞(1984-),女,山东滕州人,在读博士,研究方向为发育植物学。E-mail:liuhexia2010@163.com.

责任作者:周坚(1961-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为发育植物学。

基金项目:江苏省教育厅资助项目(JH07-012);镇江市科技局资助项目(NY2008034);江苏省研究生培养创新工程资助项目(CXZZ12_0519)。

收稿日期:2012-12-10

Culture of Strong Regenerated Seedling of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl.

SHI Cai-juan, FAN Gao-tao, ZHU Meng-li, WANG Wan-jun

(College of Bioengineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610031)

Abstract: Taking the seeds of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. as material, the effect of media with sucrose, hormones and hormone combinations of NAA (Naphthaleneacetic acid), IAA (3-indoleacetic acid) and IBA (3-indolebutyric acid) on growth of plantlets were studied. The results showed that the new roots of regenerated plantlets could be efficiently induced, and the development of stems and roots could be promoted on the basal medium with half of macronutrients and all the other micronutrients and organic nutrients of MS (Murashige and Skoog) medium, supplemented with 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L IAA and 2% sucrose.

Key words: *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl.; regenerated plantlets; tissue culture

75%乙醇处理 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 每次 30 s 左右; 随后用 0.1% 升汞处理 15 min, 无菌水清洗 4~6 次即为无菌材料。用解剖刀切开石蒜种子, 取出胚, 水平接种于已灭菌的诱导培养基上, 每皿接种 4 个胚。石蒜组培苗处理: 挑选健壮、长势良好、生长均一的石蒜组培苗, 用洗涤剂洗净后, 流水冲洗 2~4 h。在超净工作台上, 取组培苗的鳞茎和叶片切成 5 mm×5 mm 大小放于已灭菌的玻璃瓶中, 用 75%乙醇处理 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 每次 30 s 左右; 随后用 0.1% 升汞处理 15 min, 无菌水清洗 4~6 次即为无菌材料, 水平接种于已灭菌的诱导培养基上, 每瓶接种 1 个材料。

1.2.2 石蒜愈伤组织的诱导 分别通过石蒜的胚、鳞茎和叶片诱导愈伤组织, 诱导培养在黑暗条件, (25±1)℃ 下进行。3 次重复, 20 d 后统计结果。以 MS 为基本培养基, 然后添加不同浓度的 2,4-D 及 6-BA 进行石蒜愈伤组织的诱导, 蔗糖浓度为 30 g/L, 琼脂 7 g/L, pH 值调为 5.8(具体配方见表 1~3)。

1.2.3 石蒜愈伤组织的培养 在 (25±1)℃ 温度条件下, 光照环境中对诱导得到的石蒜愈伤组织进行分化培养, 3 次重复, 20 d 后统计结果。选用的基本培养基为 MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L, 蔗糖浓度为 30 g/L, 琼脂 7 g/L, pH 值调为 5.8(具体配方见表 5); 以 MS 为基本培养基, 然后添加不同浓度的 2,4-D 及 6-BA 进行石蒜根的诱导, 蔗糖浓度为 30 g/L, 琼脂 7 g/L, pH 值调为 5.8(具体配方见表 6)。

2 结果与分析

2.1 石蒜愈伤组织的诱导

2.1.1 石蒜愈伤组织诱导过程 该研究使用了 4 种不同激素组合对 3 种外植体进行愈伤组织的诱导。以种子胚为外植体接种后, 白色种子胚逐渐膨大, 接种后 8 d, 外植体的某些部位出现浅黄色, 肉眼可以观测到此处有微小突起出现, 此为愈伤组织的雏形(图 1)。10 d 后, 鳞茎块进一步膨大, 体积达到接种时的 2 倍; 在白色的鳞茎块上有白色小颗粒出现, 此为芽的雏形; 黄色突起范围变大, 占据鳞茎块的大部分, 质地较为疏松, 此为愈伤组织(图 2)。以鳞茎为外植体接种后, 所接种的鳞茎块逐渐膨大, 接种后 8 d, 外植体的某些部位出现浅黄色, 肉眼可以观测到此处有微小突起出现, 此为愈伤组织的雏形。10 d 后, 鳞茎块进一步膨大, 体积达到接种时的 2 倍; 在白色的鳞茎块上有白色小颗粒出现, 此为芽的雏形; 黄色突起范围变大, 占据鳞茎块的大部分, 质地较为疏松, 此为愈伤组织。以叶片为外植体接种后, 绿色的叶片逐渐膨大, 接种后 8 d, 外植体的某些部位出现浅黄色, 肉眼可以观测到此处有微小突起出现, 此为愈伤组织的雏形。10 d 后, 叶片进一步膨大, 体积达到接种时的 2 倍; 在白色的叶片上有白色小颗粒出现, 此为芽的

雏形; 黄色突起范围变大, 占据叶片的大部分, 质地较为疏松, 此为愈伤组织。



图 1 愈伤组织雏形
Fig. 1 Callus prototype

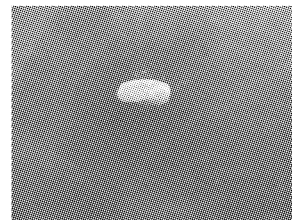


图 2 愈伤组织增大
Fig. 2 Callus gets bigger

2.1.2 石蒜愈伤组织在不同激素水平上的诱导结果 由表 1 可知, 不同生长调节物质对石蒜种子胚诱导愈伤组织过程中, MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基, 诱导愈伤效率最高, 可达 82.4%。由表 2 可知, 不同生长调节物质对石蒜鳞茎诱导愈伤组织过程中, MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基, 诱导愈伤效率最高, 可达 26.1%。由表 3 可知, 不同生长调节物质对石蒜叶片诱导愈伤组织过程中, MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基, 诱导愈伤效率最高, 可达 5.0%。以诱导出愈伤组织的处理进行比较, 结果见表 4 和图 3。由表 4 和图 3 可知, 不同材料愈伤组织诱导率不同。其中, 以种子胚为外植体进行愈伤组织诱导, 诱导率最高, 达到 82.4%, 是鳞茎诱导率的 3.17 倍, 是叶片诱导率的 15.73 倍。由表 4 和图 3 还可以看出, 不同激素水平条件下愈伤组织诱导率也有所区别, MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基, 诱导种子胚长出愈伤组织诱导率最高达到 82.4%; MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基诱导鳞茎长出愈伤组织的诱导率最高达 26.1%; MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基诱导叶片长出愈伤组织的诱导率最高, 达到 5.0%。

表 1 不同生长调节物质对
石蒜种子胚诱导愈伤组织的影响

Table 1 Effect of different hormone treatments on
Lycoris radiata seed embryo callus induction

培养基	接种数 /个	诱导出的愈伤 组织块数/个	诱导率 /%
MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L	68	64	82.4
MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L	72	52	63.9
MS+2,4-D 3.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L	83	0	0.0
MS+2,4-D 4.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L	75	0	0.0

2.2 石蒜愈伤组织不定芽的诱导

对种子胚诱导得到的愈伤组织进一步培养, 种子胚上的白色突起逐渐增大, 6 d 后, 分化出白色的不定芽(图 4); 10 d 后, 绿色的小叶片出现(图 5), 此时, 植物体可以自己行使光合作用, 制造有机物; 26 d 后, 不定芽非常明显, 此时, 体积是种子胚的 50 倍(图 6)。

表 2 不同生长调节物质对鳞茎诱导愈伤组织的影响

Table 2 Effect of different hormone treatments on *Lycoris radiate* bulb callus induction

培养基	接种数/个	诱导出的愈伤组织块数/个	诱导率/%
MS+2,4-D 1 mg/L+6-BA 1 mg/L	92	24	26.1
MS+2,4-D 2 mg/L+6-BA 1 mg/L	80	16	20.0
MS+2,4-D 3 mg/L+6-BA 1 mg/L	84	0	0.0
MS+2,4-D 4 mg/L+6-BA 1 mg/L	76	0	0.0

表 3 不同生长调节物质对叶片诱导愈伤组织的影响

Table 3 Effect of different hormone treatments on *Lycoris radiate* leaf callus induction

培养基	接种数/个	诱导出的愈伤组织块数/个	诱导率/%
MS+2,4-D 1 mg/L+6-BA 1 mg/L	92	4	4.3
MS+2,4-D 2 mg/L+6-BA 1 mg/L	80	4	5.0
MS+2,4-D 3 mg/L+6-BA 1 mg/L	85	0	0.0
MS+2,4-D 4 mg/L+6-BA 1 mg/L	72	0	0.0

表 4 种子胚、鳞茎、叶片诱导愈伤组织的诱导率的比较

Table 4 Comparison of callus induction rate from seed embryo, bulb and leaf

外植体	诱导率 1/%	诱导率 2/%	平均诱导率/%
种子胚	82.4	63.9	73.15
鳞茎	26.1	20.0	23.05
叶片	4.3	5.0	4.65

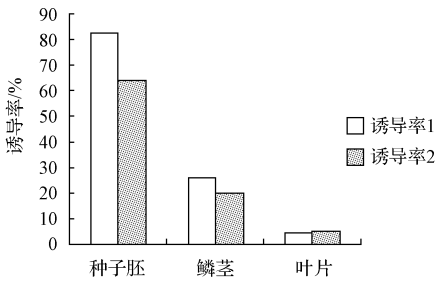


图 3 种子胚、鳞茎和叶片诱导愈伤组织诱导率的比较
Fig. 3 Comparison of callus induction rate from seed embryo, bulb and leaf



图 4 不定芽
Fig. 4 Adventitious buds

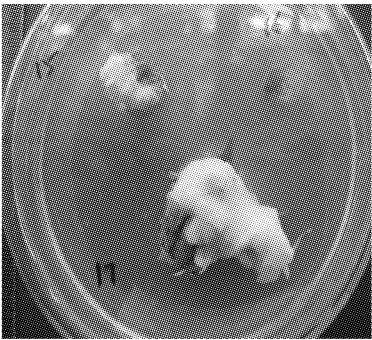


图 5 叶片出现
Fig. 5 Leaves appear

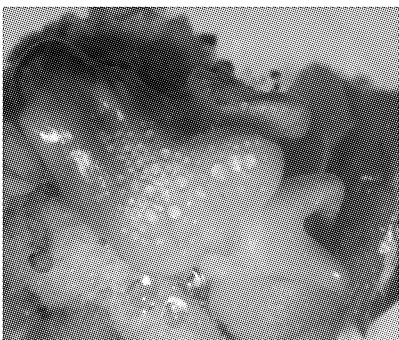


图 6 芽增大
Fig. 6 Buds increase

由表 5 可以看出,MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 诱导石蒜愈伤组织产生芽的诱导率最高,为 76.2%。另外,对石蒜鳞茎诱导出的愈伤组织进一步培养,随着培养的继续,愈伤褐化死亡。

表 5 不同激素处理对愈伤组织诱导芽的影响

Table 5 Effect of different hormone treatments on *Lycoris radiate* callus bud induction

培养基	接种数/个	诱导出的芽数/个	诱导率/%
MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L	105	80	76.2
MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L	100	60	60.0
MS+2,4-D 3.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L	83	0	0.0
MS+2,4-D 4.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L	75	0	0.0

2.3 石蒜愈伤组织分化出根

对石蒜的不定芽进行生根诱导,培养基激素配比见表 6。由表 6 可以看出,MS+NAA 0.1 mg/L 诱导石蒜分化出根的诱导率最高(图 7),为 95.0%。

表 6 不同激素处理对石蒜的生根诱导的影响

Table 6 Effect of different hormone treatment on *Lycoris radiate* knot root induction

培养基	接种数/个	诱导出的愈伤组织块数/个	生根率/%
MS+NAA 0.1 mg/L	103	98	95.0
MS+6-BA 1.0 mg/L	90	20	22.2

2.4 石蒜再生植株的练苗和移栽

该试验中,再生植株驯化培养经历瓶练和盆练 2 个阶段。挑选健壮、根的数量在 3 条以上、根长在 3 cm 以上的植株移出培养室,在外界环境中放置 2~3 d,适应外界温度;再打开封口膜,放置 3 d 左右。值得注意的是



图7 种子胚诱导培养出的石蒜完整植株

Fig. 7 Complete plant of *Lycoris radiata* induced by seed embryo cultivation

为防止水分蒸发,植物缺水,可在培养基上加薄薄的一层水膜,同时借此还可有效防止培养基干裂及外界霉菌的大量繁殖。将植株取出,用温水洗净根部的培养基,移栽入预备好的基质中进行生长,基质事先已消毒。由表7可以看出,不同移栽基质对植株成活率有明显的影响,石蒜再生植株进行移栽的最佳基质应为腐殖质和珍珠岩以1:1的比例组成,其成活率为70%;而采用腐殖质和园土的组合基质中,成活率仅为40%。不同移栽基质对再生植株的成活率有一定影响,这可能与基质的保水能力、通气状况以及养分供应等因素有关。腐殖质和珍珠岩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;而用腐殖质和园土的移

表7 不同移栽基质对再生植株成活率的影响

Table 7 Effect of different content mediums on survival rate

移栽基质	移栽株数/株	成活数/株	成活率/%
腐殖质:珍珠岩=1:1	30	21	70
腐殖质:园土=1:1	30	12	40

栽基质中园土存水能力强,粘性较大影响了基质的通气性,从而容易导致植株烂根的现象发生。

3 讨论

石蒜有性生殖不育是由于胚囊的形成发育不正常所致,在育种工作中不可能用其作为母本利用^[4],因此,石蒜以无性繁殖为主。然而以往研究都是以鳞茎分球繁殖为主,此缺点是不能使后代有较大的变异性。该试验以愈伤繁殖进行植株再生,使再生植株有更多的变异性,利于石蒜本身的进化。同时,在该试验中,由种子胚培育出愈伤组织,效率较高,形成愈伤后,形成植株的形成率也较高,可以作为石蒜繁殖的一种途径加以推广。石蒜种子胚诱导愈伤效率高,进而培养中可以形成芽,进而形成完整植株,推测其原因是由于种子胚相对于鳞茎和叶片而言,分化程度低,因而较易脱分化形成愈伤组织。

参考文献

- [1] 殷培峰,汪美英. 安徽琅琊山石蒜属植物分布及开发应用[J]. 资源开发与市场,2008,24(9):823-833.
- [2] 秦卫华,周守标,汪恒英,等. 石蒜属植物的研究进展[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版),2003,26(4):385-390.
- [3] 令狐昱慰,李多伟. 石蒜属植物的研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学,2007,36(2):73-76.
- [4] 戴叶辉,张露,柳正藏,等. 石蒜有性生殖败育的原因探讨[J]. 仲恺农业工程学院学报,2011,24(3):12-15.
- [5] 朱景存,张玉琼,刘春滢,等. 石蒜组织培养和植株再生的研究[J]. 生物学杂志,2010,27(6):46-48.

Study on Callus Induction and Plant Regeneration of *Lycoris radiata* Herb.

LIU He-xia, ZHOU Jian

(Institute of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract: Taking *Lycoris radiata* Herb. as material, the effect of some factors such as various hormone concentration, different parts of *Lycoris radiata* Herb. on callus induction and plant regeneration were studied. The results showed that the explants selection was the most significant factor of callus induction, and the seed embryos was the best explants for callus induction. The optimal mediums for the callus induction was MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L and the rate reached 82.4%. In the subsequent callus further training, the optimal mediums for the callus induction was MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L, the optimal mediums for the callus induction was NAA 0.1 mg/L. The best matrix for *Lycoris radiata* regeneration plants was humus and perlite in the proportion of 1:1 composition, with survival rate 70%.

Key words: *Lycoris radiata*; callus; plant regeneration