

# 长筒石蒜叶片薄层培养诱导愈伤组织发生的研究

王 婷, 智 永 祺, 周 坚

(南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

**摘 要:**以切成 2 mm 左右的长筒石蒜幼嫩叶片薄片作为外植体,研究了不同激素组合以及不同接种方式对其愈伤组织诱导的影响,以期获得长筒石蒜叶片愈伤诱导的最佳条件。结果表明:在 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+TDZ 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+土豆粉 3 g/L 培养基中,愈伤诱导率最高可达 90.0%,TDZ 诱导愈伤效果明显优于 2,4-D;采用叶片垂直插入培养基的接种方式,培养 30 d 后获得愈伤诱导率最高为 83.3%。

**关键词:**长筒石蒜;叶片;薄层培养;愈伤组织

**中图分类号:**Q 949.71+8.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)01-0091-04

石蒜属(*Lycoris*)隶属于单子叶植物纲石蒜科(Amaryllidaceae)具地下鳞茎的一类多年生草本植物,是世界公认的著名球根花卉<sup>[1]</sup>。长筒石蒜(*Lycoris longituba*)属石蒜科石蒜属植物,是中国的特有植物,分布在江苏等地。长筒石蒜花型丰富,色彩艳丽,观赏价值较高,是理想的切花材料,适用于林下或草地丛植布置,被广泛应用于园林绿化,亦可作为育种材料储备种质资源<sup>[2]</sup>。由于目前石蒜属植物栽培技术落后、种殖繁殖系数低而使石蒜属野生资源遭受到无计划的乱采乱挖,造成如今石蒜属野生资源逐步减少<sup>[3]</sup>。近年来对石蒜属植物组织培养的研究较多,主要以鳞茎、种子为外植体,通过诱导愈伤组织或小鳞茎获得再生植株,而以叶片为外植体的薄层培养研究目前在换锦花(*Lycoris sprengeri*)中已有开展<sup>[4]</sup>。薄层培养对于器官发生理论的研究也具有重要的意义。故该试验以长筒石蒜叶片为试材,利用薄层培养技术,研究诱导愈伤组织的优良体系,以期为其大规模扩繁提供大量的繁殖材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2013 年 3 月,在南京林业大学石蒜种源基地采集刚出叶 10 cm 以下的长筒石蒜叶片。

**第一作者简介:**王婷(1988-),女,硕士研究生,现主要从事石蒜生长发育及繁殖等研究工作。

**责任作者:**周坚(1961-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事植物生长发育及栽培等教学与科研工作。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(lysx[2010]13);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

**收稿日期:**2013-09-09

### 1.2 试验方法

长筒石蒜叶片组织培养试验于南京林业大学森林资源与环境学院组培室内进行。

**1.2.1 外植体处理** 挑选刚发叶不超过 10 cm 的长筒石蒜幼嫩叶片,用洗涤剂清洗干净后,流水冲洗 2 h。在超净工作台上,将叶片置于已灭菌的玻璃瓶中,用 75%乙醇处理 15 s,无菌水冲洗 3 次,每次 30 s 左右;随后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 处理 8 min,无菌水冲洗 4 次,时间分别为 5、3、2、2 min,即获得无菌材料。将灭菌过后的叶片置于干燥洁净的滤纸上,用已灭菌的滤纸吸干叶片表面残留水分,用解剖刀将叶片两端各切去 0.5 cm,将剩余叶片切成 2 mm 左右的薄片,接种于已灭菌的诱导培养基上,每皿接种 10 片。

**1.2.2 长筒石蒜愈伤组织的诱导** 通过长筒石蒜的幼嫩叶片诱导愈伤组织,诱导培养在黑暗条件,(25±1)℃下进行,7 次重复,30 d 后统计结果。以 MS、1/2MS 为基本培养基,然后添加不同浓度的 2,4-D、6-BA、TDZ 以及 NAA 进行长筒石蒜愈伤组织的诱导,蔗糖浓度 30 g/L,琼脂 7 g/L,土豆粉 3 g/L,pH 值调为 5.8(表 1)。

**表 1 培养基配方及编号**

Table 1 Ingredient and number of culture medium mg/L					
培养基编号 No.	基本培养基 Minimal medium	2,4-D	6-BA	NAA	TDZ
E1	MS	1.0	0.5	—	—
E2	MS	2.0	0.5	—	—
E3	MS	—	10.0	0.5	—
E4	MS	—	12.5	0.5	—
E5	1/2MS	—	—	0.5	1.5
E6	1/2MS	—	—	0.5	2.0
E7	1/2MS	—	—	0.5	2.5
E8	1/2MS	—	—	0.5	3.0

1.2.3 长筒石蒜叶片不同接种方式的筛选 采用叶片水平接种于培养基上、叶片垂直插入培养基中 2 种接种方式,将长筒石蒜幼嫩叶片薄片接入筛选出的最佳愈伤组织诱导培养基中,培养 30 d 后统计愈伤组织的诱导率和褐化率并记录生长情况。

1.2.4 观察与拍照 用奥林巴斯体视解剖镜(Olympus SZ51)观察与拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 长筒石蒜愈伤组织诱导过程

以幼嫩叶片薄片为外植体接种后(图 1A),从第 5 天开始,薄片面积逐渐增大,为刚接种时叶片面积的 2~

3 倍(图 1B);接种 10 d 后,叶片切口处出现白色、肉眼可以观察到的微小突起,此为愈伤组织雏形(图 1C 和 1D)。接种 20 d 后,外植体叶面积达到接种时的 4~5 倍,白色突起范围变大,切口边缘处均有生长,质地较为疏松(图 1E 和 1F);接种 30 d 后,白色突起数量增多,在切口处密集排列,此为愈伤组织(图 1G 和 1H)。

### 2.2 长筒石蒜愈伤组织在不同激素水平上的诱导结果

由表 2 可知,各培养基的平均诱导率为 49.2%。在 E6 配方,即 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+TDZ 2.0 mg/L 的培养基上,诱导愈伤组织效率最高,可达 90.0%,E3、E5 培养基的诱导率也达到 60%以上,E4 培养基褐化率最

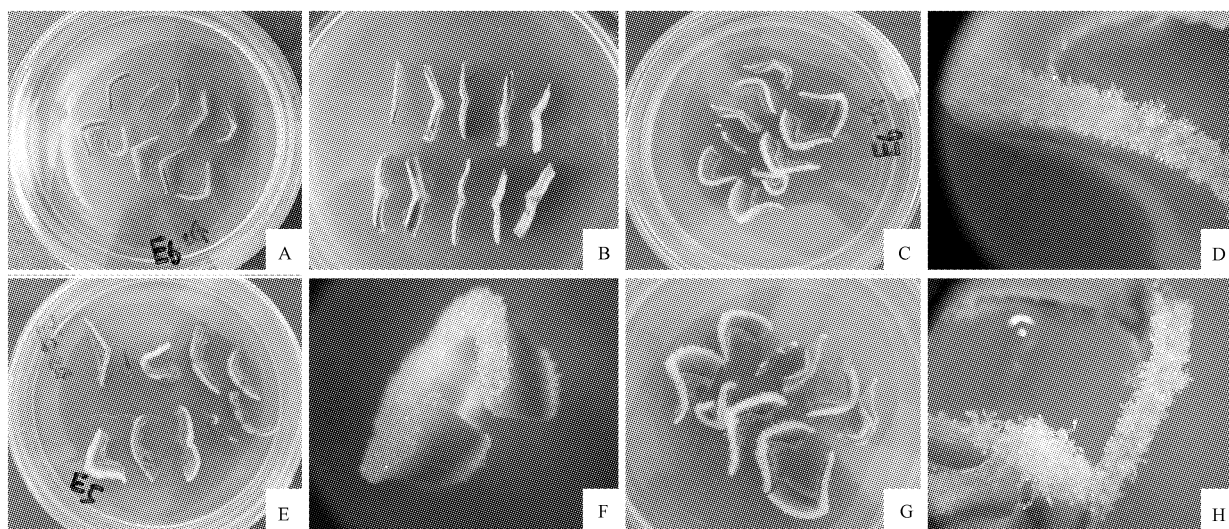


图 1 长筒石蒜叶片愈伤组织诱导

注:A:接种 0 d;B:接种 5 d,叶面积增大;C:接种 10 d,叶片切口处出现白色突起;D:接种 10 d 叶片微视图;E:接种 20 d,白色突起范围增大,质地疏松;F:接种 20 d 叶片微视图;G:接种 30 d,白色突起数量增多,在切口处密集排列;H:接种 30 d 微视图。

Fig. 1 Callus induction of *Lycoris longituba*

Note:A:Inoculation 0 day;B:Leaf area increased after inoculation 5 days;C:White bumps appeared in the edge of leaf blades after inoculation 10 days;D:Microgram of leaf blades after inoculation 10 days;E:White and soft bumps range increased after inoculation 20 days;F:Microgram of leaf blades after inoculation 20 days;G:Increased numbers of white bumps densely arranged on the leaf cut after inoculation 30 days;H:Microgram of leaf blades after inoculation 30 days.

表 2 长筒石蒜幼嫩叶片诱导愈伤组织结果

Table 2 Results of young leaves culture in *Lycoris longituba*

培养基 编号 Medium No.	接种数 Total number /个	愈伤诱导数 Induction No./个	褐化数 Browning No./个	诱导率 Inductivity rate /%	褐化率 Browning rate/%
E1	60	28	8	46.7	13.3
E2	60	6	10	10.0	16.7
E3	60	37	5	61.7	8.3
E4	60	18	23	30.0	38.3
E5	60	38	8	63.3	13.3
E6	60	54	0	90.0	0
E7	60	35	0	58.3	0
E8	60	20	8	33.3	13.3

高,达到 38.3%,E6、E7 培养基褐化率为 0。E5~E8 配方中均添加了不同浓度的 TDZ,在其浓度 1.5~2.0 mg/L 时,愈伤组织诱导率随着 TDZ 浓度的增加而增加,当 TDZ 浓度在 2.0~3.0 mg/L,愈伤组织诱导率随着 TDZ 浓度的增加而显著下降。

由表 3 可以看出,TDZ、NAA 与愈伤组织诱导率呈正相关,表明这 2 种激素组合均能促进愈伤组织的发生;NAA 与 TDZ 呈正相关,表明这 2 种激素同样也对于愈伤组织的诱导具有协同作用;就石蒜组培常易发生的变褐情况看,TDZ 与褐化率呈负相关,表明 TDZ 具有抑制材料褐化的作用;而 NAA、6-BA 与褐化率呈正相关,6-BA 与褐化率的相关系数达到 0.715896。因此,诱导长筒石蒜幼嫩叶片产愈伤组织的最佳培养基为 1/2MS+NAA



表 3 不同生长调节物质与愈伤诱导率及褐化率的相关系数

Table 3 Correlation coefficient of different hormones and callus induction rate and browning rate

	2,4-D	6-BA	NAA	TDZ	诱导率	褐化率
2,4-D	1					
6-BA	-0.27113	1				
NAA	-0.93326	0.290519	1			
TDZ	-0.50835	-0.57212	0.544705	1		
诱导率	-0.62828	-0.15081	0.520302	0.354675	1	
褐化率	-0.22413	0.715896	0.268321	-0.30449	-0.43011	1

0.5 mg/L+TDZ 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+土豆粉 3 g/L。

2.3 不同接种方式对愈伤组织诱导的影响

由表 4 可知,2 种接种方式的诱导率显著不同。将切好的叶薄片水平接种于培养基上,30 d 后,叶片大部分已经褐化,褐化率达到 80.0%,诱导率仅为 10.0% (图 2A 和 B);而将叶薄片以直立方式接种,即按照叶片在

表 4 不同接种方式对愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of different orientation on callus induction

接种方式	接种个数	诱导率	褐化率
Inoculation method	Total number/个	Inductivity rate/%	Browning rate/%
水平 Horizontal	30	10.0	80.0
直立 Vertical	30	83.3	6.7

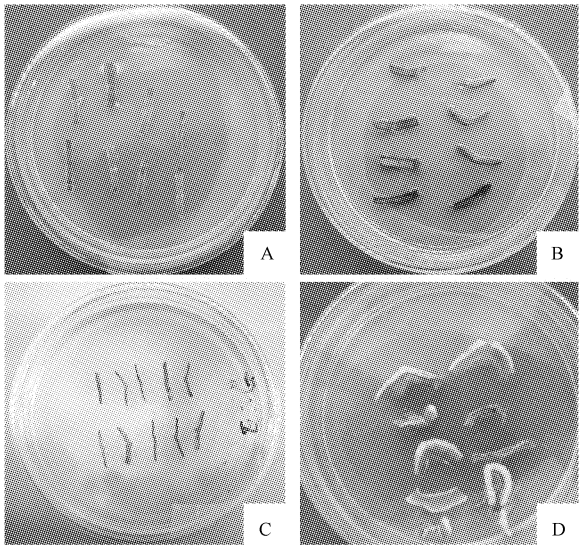


图 2 不同接种方式诱导愈伤组织效果

注:A:叶片水平放置培养 0 d;B:叶片水平放置培养 30 d;C:叶片垂直放置培养 0 d;D:叶片垂直放置培养 30 d。

Fig. 2 Different orientation on callus induction

Note:A:Place the leaf blades in a horizontal direction for 0 day cultivation;B:Place the leaf blades in a horizontal direction after 30 days cultivation;C:Place the leaf blades in a vertical direction for 0 days cultivation;D:Place the leaf blades in a vertical direction after 30 days cultivation.

母体植株上相似的生长方向放置,30 d 后观察,叶片边缘产生较多白色的愈伤组织,诱导率为 83.3%(图 2C 和 D),其诱导率显著高于叶片水平放置的接种方式。因此,长筒石蒜叶片愈伤组织诱导的最佳放置方式为直立放置。

3 讨论与结论

该试验采用薄层培养技术来获得长筒石蒜的愈伤组织。薄层培养技术(TCL)是利用非常小的外植体来促进一些植物物种体外形态发生的方法<sup>[5]</sup>。对石蒜属植物愈伤组织的研究表明,幼嫩叶片的细胞营养丰富,生理活动旺盛,脱分化与再分化的能力较强,且容易启动;同时,初代培养以愈伤组织方式发生时,选择激素大多为 2,4-D。赵志敏等<sup>[6]</sup>以忽地笑双鳞片为外植体,在培养基中添加 2 mg/L 2,4-D 诱导愈伤组织效果最佳,诱导率达 66%;刘合霞等<sup>[7]</sup>将石蒜种子胚接种于 MS+2,4-D 1 mg/L+6-BA 1 mg/L 培养基上,诱导形成愈伤组织效率最高。添加植物生长激素,如 2,4-D 等可以提高愈伤组织形成<sup>[8-9]</sup>。因此,可选用幼嫩叶片进行愈伤组织的诱导。

长筒石蒜幼嫩叶片诱导愈伤组织的试验结果表明,TDZ 与 NAA 组合的愈伤诱导率总体高于 2,4-D 与 6-BA/NAA 组合。TDZ 是一种新型的植物生长调节剂,具有强烈的细胞活性,其活性超过 6-BA 几十倍至几百倍,TDZ 可诱导离体培养材料的多种途径形态发生,其在低浓度下即可表现出较强的促进细胞增殖作用<sup>[10]</sup>。它能诱导外植体从愈伤组织形成到体胚发生的一系列过程,具有生长素和细胞分裂素双重作用<sup>[11]</sup>,并可以减少培养时间,增加繁殖速率<sup>[12]</sup>。该试验中,E5~E8 配方中添加了不同浓度 TDZ,其平均诱导率高于添加了 2,4-D 的培养基,最高诱导率达到 90.0%,其诱导愈伤效果优于 2,4-D。同时,由表 3 可知,TDZ 与褐化率呈负相关,因为 TDZ 可以延缓叶绿素降解,因而降低外植体的褐化率。NAA、6-BA 与褐化率呈正相关,6-BA 与褐化率的相关系数高达 0.7158%,添加 6-BA 的培养基中的材料褐化率较高,6-BA 浓度越高,褐化越严重,褐化率最高达 38.3%。通过相关系数分析,NAA 与 TDZ 呈正相关,表明这 2 种激素共同作用有利于促进愈伤组织的形成。因此,采用幼嫩叶片作外植体,诱导愈伤组织的最佳培养基为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+TDZ 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+土豆粉 3 g/L。

王跃华等<sup>[13]</sup>在对川贝母(*Fritillaria cirrhosa*)叶片高效诱导愈伤组织体系的研究中发现,不论叶的哪一面水平接种于培养基上,对其愈伤组织诱导情况均没有明

显影响;而将叶片垂直插入培养基的接种方式,愈伤组织诱导率最高达 92.27%。这主要是因为将外植体直接插入培养基中更易获得营养物质;而将叶平铺在培养基上,由于外植体在启动时会出现叶边缘卷曲的情况,因而使得叶的一部分不能直接接触培养基,从而造成外植体在培养过程中营养物质缺乏,进而影响愈伤组织的诱导率。该试验研究结果与前者相似,长筒石蒜幼嫩叶片以垂直方式接种培养获得的愈伤诱导率高且褐化率较低,并且诱导率显著高于叶片以水平方式接种培养获得的愈伤组织,这可能与外植体营养物质吸收的难易以及愈伤组织生长所需其它因素有关。

关于石蒜属植物的组织培养,目前报道中常采用的外植体一般为鳞茎和胚,其它部位诸如花瓣、叶片等作为外植体的研究进行较少。该试验采用长筒石蒜叶片为外植体进行愈伤组织诱导,虽在一定程度上获得了愈伤组织,但愈伤组织呈白色流苏状,与胚性愈伤组织有所不同。因此对于所得的以长筒石蒜叶片的愈伤组织后续的增殖、分化及继代培养还有待进一步研究。长筒石蒜叶片作为外植体诱导快繁具有极高的应用价值,它不损伤鳞茎,在珍稀种质的保存与扩繁中具有十分重要的现实意义。

#### 参考文献

- [1] 张海珍,周兔英,鲍淳松,等. “中国的郁金香”-石蒜属快繁及园林应用研究[J]. 园林科技, 2012(1):5-7.
- [2] 王磊,汤庚国,刘彤. 长筒石蒜切花衰败生理及超微结构的变化[J]. 浙江林学院学报, 2009(4):498-502.

- [3] 谷海燕,谢孔平,李世丽,等. 石蒜属植物的无性繁殖研究[J]. 中国林副特产, 2012(2):32-35.
- [4] 时剑,童再康,刘志高,等. 换锦花种胚和叶片的组织培养研究[J]. 江西农业大学学报, 2011(4):665-669.
- [5] Steinmacher D A, Krohn N G, Dantas A C M, et al. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique; induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation[J]. Annals of Botany, 2007, 100:699-709.
- [6] 赵志敏,钟湘云,杨帅,等. 黄花石蒜愈伤组织培养研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2009(5):48-50.
- [7] 刘合霞,周坚. 石蒜愈伤组织的诱导及其植株再生研究[J]. 北方园艺, 2013(6):93-96.
- [8] Lee Y, Lee D E, Lee H S, et al. Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.) [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2011, 105:9-19.
- [9] Guedes R S, Silva T L, Luis Z G, et al. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10 (52): 10774-10780.
- [10] 王关林,方宏筠,那杰. 高活性细胞激动素 TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 植物学通报, 1997(3):48-54.
- [11] 周红菊. TDZ 对欧亚旋覆花愈伤组织诱导的影响研究[J]. 湖北农业科学, 2010(4):798-799.
- [12] Nhut D T, An T T T, Nguyen H T D, et al. Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 111:146-151.
- [13] 王跃华,张阔军,张丽君,等. 川贝母叶高效诱导愈伤组织体系的研究[J]. 安徽农业科学, 2011(3):1374-1375.

## Study on Callus Induction of the Leaf Blades of *Lycoris longituba* Using Thin Cell Layer Culture

WANG Ting, ZHI Yong-qi, ZHOU Jian

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

**Abstract:** The young leaves of *Lycoris longituba* that were cut into 2 mm slices as explants, which cultured *in vitro* on several mediums supplemented with diverse concentrations of plant growth regulator and different inoculation method in order to find the best conditions of callus induction. The results showed that the highest induction rate 90.0% was obtained from the mediums which consist of 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+TDZ 2.0 mg/L+ sucrose 30 g/L+dried potato powder 3 g/L. Callus induction effect of TDZ was obviously better than that of 2,4-D; adopts blades vertically inserted into the culture medium of inoculation method, cultivation of 30 days could obtain the highest callus induction rate of 83.3%.

**Key words:** *Lycoris longituba*; leaves; thin cell layer; callus