

不同激素配比对红花石蒜小鳞茎及茎尖的分化培养的影响

林 田^{1,2}, 刘灶长^{1*}, 李天菲¹, 郑海柔¹, 罗利军¹

(¹ 上海市农业生物基因中心, 上海 201106; ² 华中农业大学, 武汉 430070)

摘 要: 以红花石蒜 (*Lycoris radiata*) 的鳞茎切块及茎尖为材料, 采用不同激素配比的 MS 培养基, 对离体小鳞茎的分化和增殖进行了研究。结果表明, BA 3 mg/L 及 NAA 1.5 mg/L 配比获得的小鳞茎诱导频率最高, 可达 53%, 诱导生成的小植株强健整齐。鳞茎茎尖培养可形成多种不同类型的愈伤组织, 本试验中有 2 种类型愈伤组织转入分化培养基后可产生大量的小鳞茎。

关键词: 石蒜; 组织培养; 小鳞茎; 茎尖培养; 愈伤组织

中图分类号: S682.2

文献标识码: A

石蒜科 (Amaryllidaceae) 石蒜属 (*Lycoris*) 植物为多年生球根花卉, 因其鳞茎形似蒜头, 故得名, 主要分布于我国喜马拉雅以东、长江以南的广大华南地区以及沿海诸岛, 朝鲜半岛, 琉球群岛, 日本的九州、四国和本岛等地方。石蒜开花时无叶, 花茎从裸露的地面长出, 花色艳丽、花朵硕大, 芳姿独特, 西方又称之为“魔术花”、“中国郁金香”。除具有重要的观赏价值外, 石蒜还有重要的药用价值, 为传统的药用植物, 在植物药用方面有着广阔的开发前景。目前, 石蒜属植物主要以野生状态分布为主, 公园的风景园林中有少量种植。由于石蒜从种植到开花一般需要 2~3 年, 且自然条件下繁殖系数低, 在一定程度上限制了它的开发利用。组织培养较传统方法繁殖系数高, 周期短, 是大量快速繁殖的有效方法, 同时也是种质保存(超低温保存)、诱变育种及遗传转化的基础。近年来石蒜组培方面有过一些相关研究^[1-5], 但繁殖系数以及大鳞茎种球获得率还比较低。本研究就起关键作用的激素配比对石蒜的鳞茎及生长点的分化培养的影响进行探索, 为石蒜种质快繁和保存利用搭建平台。

1 材料与方 法

1.1 材 料

红花石蒜 (*Lycoris radiata*), 为上海市农业生物基因中心收集。试验材料为展叶期的 3~4 年生鳞茎, 4℃ 黑暗预处理 20~40 d 后备用。

1.2 方 法

1.2.1 鳞片离体培养 将经鳞茎清洗, 切除全部叶及褐变部分, 用洗洁精浸泡 10~20 min 后流水冲洗 8 h, 再用 75% 的酒精消毒 1 min, 0.1% 的升汞溶液浸泡 10~15 min, 无菌水冲洗若干次。取基部内层带鳞茎盘的鳞茎切成带鳞茎盘双鳞片的外植体, 平均分为 4 块 (1.5~2 cm²), 每块约有 3~5 层鳞片, 接种于含不同植物生长调节剂配比的 MS 培养基上。

1.2.2 小鳞茎的切割繁殖 将经组织培养获得的鳞茎直径 0.5 cm 以上的试管小植株切除叶片及外面的部分鳞茎, 把内层部分鳞茎切成 4 块, 接种在含不同激素配比的 MS 培养基中。

1.2.3 石蒜生长点愈伤组织的诱导与分化 石蒜鳞茎消毒后(方法同上), 逐层剥去鳞片, 直至显露生长点, 切取约 5 mm 长的生长锥, 切割成约 1 mm 小块, 接种在 2,4-D 1~20 mg/L 或 2,4-D 1~3 mg/L, BA 0.5~3 mg/L 或 BA 1~3 mg/L, NAA 0.5~3 mg/L 的不同激素配比的 MS 培养基中。待完全愈伤化后, 转入到分化培养基中培养。

以上 3 种外植体组培试验重复 3 次, 每次约 15 个外植体。培养条件相同, 具体为培养温度

收稿日期: 2006-07-06 初稿; 2006-11-09 二改稿

基金项目: 上海市科技兴农攻关项目[沪农科攻字(2005)第 1-7 号]资助

作者简介: 林 田(1976-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事花卉生物技术研究

* 通讯作者, E-mail: lzc@sagc.org.cn, Tel: (021)52230526, Fax: (021)62204010

(25±2)℃,光照 12 h/d,光照强度 2000 lx,培养 2 个月。分化得到的小鳞茎转移至无激素或附加 NAA 2 mg/L 的 MS 培养基中培养,直至生根。生根后,将带根试管苗锻炼 1 周,洗净琼脂,移至蛭石/黄沙(1/1)的培养土中,遮荫,保持湿度。

表 1 不同激素对比对双鳞片诱导小鳞茎的影响

Table 1 Effect of different phytohormone combinations on bulblet induction from scale explants

培养基(mg/L) Medium	外植体数 Number of explants	小鳞茎块数 Number of bulblets	诱导率(%) Inductivity
MS+BA 2+NAA 0.5	16	5	31.2±2.0
MS+BA 3+NAA 0.5	18	7	38.9±1.7
MS+BA 5+NAA 0.5	16	5	31.2±2.1
MS+BA 10+NAA 0.5	18	4	22.2±1.8
MS+BA 3+NAA 0.1	14	4	28.6±2.2
MS+BA 3+NAA 1.5	15	8	53.3±3.8
MS+BA 3+NAA 3	15	0	0

为培养 3 个月后的结果。诱导率 = 分化小鳞茎的外植体块数/总的外植体块数(平均±SE),下同。

Culture period was 3 months; Inductivity = number of explants producing bulblets/total number of explants (Mean±SE). The same below.

表 2 不同激素对比对小鳞片切块诱导小鳞茎的影响

Table 2 Effect of different phytohormone combinations on bulblet induction from bulblet cuttings

培养基(mg/L) Medium	外植体数 Number of explants	小鳞茎块数 Number of bulblets	诱导率(%) Inductivity
MS+BA 5+NAA 0.5	11	6	54.5±2.5
MS+BA 5+NAA 1.5	10	5	50.0±1.8
MS+BA 3+NAA 0.1	19	14	73.7±2.8
MS+BA 3+NAA 3	23	7	30.4±1.5
MS+BA 3+NAA 1.5	23	5	38.5±2.1
MS+BA 1+NAA 0.5	14	14	100±0

2 结果与分析

2.1 双鳞片离体培养

外层鳞片接种后大多膨大直至玻璃化、死亡,且污染率较高,故本试验采用石蒜内层鳞片接种。采用激素两因子配合试验:在 BA 2~10 mg/L, NAA 0.1~3 mg/L 的范围内均能诱导分化。3 d 后鳞片膨胀卷曲,3 周后鳞片间可见有米粒状突起。在 BA 3 mg/L 及 NAA 3 mg/L 的培养基中外植体双鳞片间均长出粗壮根毛,而无球茎产生。在能产生球茎的激素组合中,BA 浓度超过 5 mg/L 均可诱导出紧密簇生的丛生芽,转入继代培养基后能陆续发育成小球茎,增殖率最高,但易玻璃化,畸形苗及弱苗较多;含 BA 3 mg/L 及 NAA 0.5 mg/L 培养基诱导的小球茎最大,2 个月后直径可达 1.2 cm,但每个外植体块只能产生 1~2 个小鳞茎;含 BA 3 mg/L 及 NAA 1.5 mg/L 的培养基诱导率最高,达 53%,且生长较苗壮均一(表 1,图版 1)。将诱导出的小鳞茎从鳞片间掰去后,可在原空间继续诱导出小鳞茎。在继代 3 个月后,每个鳞茎切块一般可分化 5~20 个小鳞茎(图版 1)。

2.2 小鳞茎的切割繁殖

小鳞茎切块接种后 2 d 即有芽叶伸长,随后膨大卷曲。最快接种 3 周后可在鳞片间诱导出小鳞茎(直径约 1~3 mm)。约 4~6 周后可产生出小鳞茎,最大直径可达 1.2 cm。在各激素组合中,以 BA 偏低的组合诱导率较高,其中 BA 1 mg/L, NAA 0.5 mg/L 的培养基,小鳞茎的诱导率为 100%(表 2)。

2.3 石蒜鳞茎茎尖的愈伤组织诱导与分化

2,4-D 1~10 mg/L 均能诱导出白色松散的愈伤组织,2,4-D 为 3 mg/L 时,愈伤组织生长最旺盛,但随浓度上升,有玻璃化产生,愈伤呈水渍状。2,4-D 为 10 mg/L 时,生长点褐变坏死较多,达 50%;2,4-D 20 mg/L 时,外植体全部死亡。愈伤组织在转入含 2,4-D 3 mg/L, BA 3 mg/L 的分化培养基上先增大并长出大量根,然后再在组织块上长出丛生芽(图版 2)。

在 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L 及在 NAA 3 mg/L, BA 3 mg/L 的培养基上,有个别愈伤组织表面有易剥离的球状松散愈伤组织。将此球状组织剥下在含较低激素浓度(在 2,4-D 0~0.1 mg/L, BA 0~0.5 mg/L)培养基上培养,可分化成完整小植株(图版 3)。

2.4 小鳞茎的生根及移栽

小鳞茎在继代过程中随时间延长(4 个月以上)也有根发生,但移栽到培养土后成活率不高。将老根切去后,移入不含激素 MS 培养基,含 NAA 2 mg/L 的培养基及 2 g/L 活性炭的生根培养基上均可产生新根。添加 NAA 2 mg/L 培养基的生根数较多,根较粗壮。将带根苗壮试管苗炼苗 1 周后,洗净琼脂,移至蛭石/黄沙(1/1)的培养土中,遮荫保湿培养,成活率可达 90% 以上。

3 讨 论

采用不同激素配比可产生不同类型的小鳞茎,适用于不同需要。从大量增殖的角度而言,较高的 BA 浓度(5 mg/L)以及采用生长点诱导可在短期产生大量的小鳞茎或丛生芽,但是苗弱,易畸形及发生变异,由此看来片面强调增殖率不能产生符合生产及实验要求的植株,但另一方面可以利用其数量大、易变异的



图版1 左(Left): MS+BA3 mg/L+NAA1.5 mg/L
中(Middle): MS+BA5 mg/L+NAA0.5 mg/L
右(Right): MS+BA3 mg/L+NAA0.5 mg/L



1 不同激素配比下诱导的小鳞茎 (Bulblets induced with different phytohormone combinations)

2 石蒜鳞茎茎尖愈伤组织诱导及分化状态 (Calli induction from bulb tips and root regeneration)

3 石蒜鳞茎茎尖类胚性愈伤组织诱导及小鳞茎分化 (Embryonic calli induction from bulb tips and bulblet regeneration)

图版说明

Explanation of plates

特点进行种质创新。含 BA 3 mg/L 及 NAA 0.5 mg/L 培养基所诱导球茎较大,可在较短时间内诱导一定规格的种球,但增殖率不高。而含 BA 3 mg/L 及 NAA 1.5 mg/L 培养基诱导小鳞茎从增殖率及规格来说均较理想,特别是能诱导出规格较整齐、生长生理状态一致的苗,适于商品苗生产的需要,同时对需严格控制条件的后续试验如生理生化及超低温保存试验也是很好的材料。笔者曾采用这种小鳞茎进行超低温保存方面的试验,取得较好的效果。曾有报道在含有 BA 3 mg/L 及 NAA 3 mg/L 的培养基上小鳞茎诱导率较高^[4],但在本试验中,只能在鳞片间诱导出粗壮的根。可能是在接种前低温预处理一段时间,从而改变了内源激素水平所致。此外,本试验中在 2,4-D 2 mg/L, BA 0.5 mg/L 的培养基上,曾出现类似胚性愈伤组织的结构,将其剥离后能独立发育成小植株。胚状体由于其增殖量大,遗传稳定等特点,作为优良基因个体广泛用于人工种子、诱变及转基因育种和种质保存方面。确定胚状体形成所需激素配比并开展下一步研究,应是很有意义的工作,相关工作正在开展中。

参 考 文 献

- [1] 张 露, 王光祥, 曹福亮. 石蒜类植物无性繁殖技术[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2002, 26(4): 1-5.
- [2] 鲁雪华, 陈杨春. 忽地笑胚外植体的培养[J]. 云南植物研究, 1986, 8(4): 467-469.
- [3] 董庆华, 田惠桥. 石蒜的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(3): 204.
- [4] 朱 锦, 诸葛强, 余水生, 等. 石蒜组织培养技术的研究[J]. 浙江林业科技, 2002, 22(4): 45-48.
- [5] 何树兰, 束晓春, 姚青菊, 等. 石蒜的组织培养[J]. 江苏林业科技, 2003, 30(4): 18-21.

Effects of different phytohormone combinations on bulblet induction and bulb-tip regeneration of *Lycoris radiata*

LIN Tian^{1,2}, LIU Zao-chang¹, LI Tian-fei¹, ZHENG Hai-rou¹, LUO Li-jun¹

(¹ Shanghai Agro-biological Gene Center, Shanghai 201106, China;

² Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Tissue culture was carried out to study the effect of different phytohormone combinations in MS medium on the bulblet induction and micro propagation from scale cuttings and bulb tip explants of *Lycoris radiata*. The result showed that the MS medium with the phytohormones of 3mg/L BA + 1.5mg/L NAA was the best for differentiation of vigorous and consistent bulblets and the inductivity reached 53%. Several types of calli had been induced from bulb tips and two of them differentiated into many bulblets.

Key words: *Lycoris radiata*; Tissue culture; Bulblet; Bulb-tip culture; Callus