

文章编号: 1000-5692(2006)03-0347-04

乳白石蒜组织培养

刘志高^{1,2}, 童再康¹, 储家森³, 高燕会¹, 张露²

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 江西农业大学 园林与艺术学院, 江西 南昌 330045; 3. 浙江林学院 园林工程部, 浙江 临安 311300)

摘要: 以乳白石蒜 *Lycoris albiflora* 的鳞茎作为外植体, MS 为基本培养基, 比较 9 种不同配方对乳白石蒜不定芽诱导和增殖的作用。结果表明: MS + 1.0 mg·L⁻¹BA + 0.1 mg·L⁻¹NAA 是最佳的不定芽诱导培养基, 最高诱导率达到 100%; 通过切割诱导得到的小鳞茎, 在 MS + 5.0 mg·L⁻¹BA + 2.0 mg·L⁻¹NAA 培养基上得到了最好的增殖效果, 最高增殖倍数达到 15; MS + 1.0 mg·L⁻¹BA + 2.0 mg·L⁻¹NAA 是较好的生根培养基。表 5 参 11

关键词: 植物学; 乳白石蒜; 组织培养; 诱导; 增殖**中图分类号:** Q943.1; S682.2⁺9 **文献标识码:** A

石蒜属 *Lycoris* 隶属石蒜科 Amaryllidaceae, 全世界约有 20 多个种, 主要分布于亚洲。我国石蒜属植物资源丰富^[1,2], 《中国植物志》记载我国产 15 种^[3]。石蒜属植物花色艳丽, 花型奇特, 在我国作为观赏植物应用由来已久, 除此之外, 石蒜属植物体内含有加兰他敏等多种生物碱, 在抗阿尔茨海默病(简称 AD, 老年性痴呆症早期症状)方面具有特殊的疗效^[4], 因而受到人们的关注。但自然状态下石蒜属植物分球繁殖系数很低^[5], 随着对石蒜属植物资源的不断开发利用, 野生种球已经不能满足人们的需要, 因此研究人员致力于通过组培和扦插等手段提高其繁殖系数^[6-11], 并已经取得了很好的效果, 这对于满足生产应用的需要及保护野生石蒜资源都有重要的意义。乳白石蒜 *Lycoris albiflora* 花期 7~9 月, 正是少花的季节, 开花期约 10 d, 其花色花型变异十分丰富, 出叶期株型挺拔, 叶色浓绿, 在园林上具有良好的应用前景, 但目前仍处于野生状态, 相关研究少, 限制了它的应用。组织培养技术可以大幅度提高鳞茎繁殖系数, 从而解决大规模扩繁应用的问题, 同时, 也为乳白石蒜新品种选育及遗传学特性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选用 2004 年 8 月从江苏宜兴采回的大小较为均一的乳白石蒜野生种球。试验于 2004 年 10 月 20 日开始。

1.2 方法

将鳞茎去除根系, 用清水冲洗, 去除表面膜质鳞茎皮和泥土。用洗洁精浸泡鳞茎 15 min, 后用清

收稿日期: 2005-10-19; 修回日期: 2006-03-01

基金项目: 浙江省科学技术攻关项目(2005C32029)

作者简介: 刘志高, 硕士研究生, 从事植物遗传育种研究。E-mail: vzhigao@sina.com。通讯作者: 童再康, 教授, 博士, 从事植物遗传育种等研究。E-mail: zktong@zjfc.edu.cn

水冲洗4~5次;用体积分数为70%乙醇溶液浸泡鳞茎20 s,移至超净工作台,用质量浓度为 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 升汞溶液浸泡15~20 min,再用无菌水冲洗3~4次。用双鳞片法^[7]切割鳞茎,每个鳞茎可得到双鳞片22~26个,双鳞片的大小约为 $1.5\text{ cm}\times 2.0\text{ cm}$,最内部3~5层鳞片作为整体一起切割,每瓶接种1个双鳞片。MS为基本培养基,分别添加不同质量浓度的6-苄基嘌呤(BA)和萘乙酸(NAA)2种植物生长调节物质。不定芽诱导培养基设计如表1,接种后每5 d观察记录芽的诱导及生长情况,统计不同培养基的诱导芽个数。将诱导得到的直径5~8 mm的子球进行纵向切割,一分为二,再接入增殖培养基中。增殖培养基的设计如表2。从接种第7天开始,每5 d观察记录切割鳞茎的生长情况,当芽数稳定不再增加时,统计芽个数,并记录其生长情况。

培养室内温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,培养前期即小鳞茎没有形成叶以前,不加光照,在小鳞茎抽叶后加人工光照(800 lx),每天12 h。

表1 不定芽诱导培养基中植物生长调节物质配方设计

Table 1 The different concentrations of plant growth regulators in induction media

培养基编号	植物生长调节物质质量浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	
	BA	NAA
A1	1.0	0.1
A2	1.0	0.5
A3	1.0	1.0
A4	5.0	0.1
A5	5.0	0.5
A6	5.0	1.0
A7	10.0	0.1
A8	10.0	0.5
A9	10.0	1.0

表2 不定芽增殖培养基中植物生长调节物质配方设计

Table 2 The different concentrations of plant growth regulators in proliferation media

培养基编号	植物生长调节物质质量浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	
	BA	NAA
B1	1.0	0.1
B2	1.0	1.0
B3	1.0	2.0
B4	3.0	0.1
B5	3.0	1.0
B6	3.0	2.0
B7	5.0	1.0
B8	5.0	0.1
B9	5.0	2.0

2 结果与分析

2.1 不定芽诱导培养基的筛选

鳞片在接入不定芽诱导培养基5 d后均出现不同程度的向内侧卷曲,最内层的鳞片卷曲最为明显,随着时间的推移,卷曲程度加剧,接种后的10 d内,部分较小的鳞片发生褐化,但随着不定芽的出现,褐化现象不再发生。外植体太小可能是褐化的主要原因。接种25 d左右,除最内层鳞片以外各培养基中的其他层次鳞片间开始出现圆球形突起,30 d左右不定芽开始形成。

乳白石蒜不定芽的诱导比较容易,由表3可知,各培养基的不定芽诱导率差异不显著,普遍较高,都在66%以上,在A1培养基 $\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{BA}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}$ 中的诱导率达到100%,是诱导不定芽的最佳培养基。不同培养基诱导形成不定芽的个数也有差异,其中A2培养基 $\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}$ 得到的芽平均数最多,达到4.9个,这为增殖培养基的设计提供了参考。

不同培养基中不定芽的个数与生长情况存在差异。由表3可知,乳白石蒜在A2和A3培养基中的双鳞片间有较多的不定芽形成,且紧密相连,呈丛生状;而A6, A7, A9培养基中双鳞片形成的芽个数相对较少但个体较大,接种后50 d左右直径接近5 mm, A4, A5, A8培养基中不定芽个体较小(经分割转接后,小芽在30 d内可成长为直径为3 mm的小鳞茎)。不定芽形成后生长比较缓慢,需要及时分割和转接,从而为其生长提供充足的营养。为了模拟自然状态下鳞茎上不定芽形成的条件,在芽诱导阶段不加光照,当不定芽形成以后,再加上光照,这样可以促使小鳞茎萌生叶片,此时小鳞茎的生长主要依靠培养基内的营养物质,但培养瓶空间有限,不利于新叶伸展,因此转接时将小鳞茎叶子的1/2剪去。

表 3 不同培养基对于不定芽诱导效果比较

Table 3 The differentiation of buds induction on different mediums

培养基 编号	接种 数/个	最多诱导芽 数/个	平均诱导芽 数/个	褐化率/%	诱导率/%	芽生长情况
A1	20	4	2.9	0	100 ± 0 a	芽饱满, 排列密度适中
A2	24	7	4.9	25.0	66.7 ± 11.8 a	芽圆珠状, 排列十分紧密
A3	21	5	3.1	4.0	91.7 ± 18.8 a	芽丛生状, 排列紧密
A4	23	4	2.2	4.0	93.8 ± 5.9 a	芽个体较小, 排列疏松
A5	26	5	2.9	13.3	79.2 ± 12.4 a	芽较小, 圆珠状, 排列疏松
A6	24	4	2.3	16.0	71.3 ± 14.1 a	芽饱满, 圆珠状, 排列疏松
A7	21	3	1.9	8.0	90.0 ± 11.4 a	芽体饱满, 排列密度适中
A8	25	5	2.7	15.0	79.5 ± 11.8 a	芽较小, 排列密度适中
A9	19	5	2.5	5.0	91.7 ± 11.8 a	芽饱满, 疏松排列

说明: 诱导率 = 出芽瓶数/接种瓶数, 系 2 次统计的平均值。

2.2 不定芽增殖培养基的筛选

结果发现, 直径小于 4 mm 的鳞茎容易褐化死亡, 而直径大于 5 mm 的鳞茎没有褐化现象, 因此应在小鳞茎长到直径大于 5 mm 时再行切割转接。

从表 4 可以看出, BA 处理、NAA 处理及其交互作用对芽的增殖效果都有极显著差异。从多重比较的结果看, B9 培养基 MS + 5.0 mg · L⁻¹ BA + 2.0 mg · L⁻¹ NAA 对乳白石蒜不定芽增殖效果最佳, 平均增殖系数为 11.18 (表 5), 明显优于其他培养基组合, 是不定芽增殖的最佳培养基。

转接 10 d 时内部鳞片顶端呈现绿色, 进而生长叶, 叶形态卷曲, 长度 2 ~ 3 cm。25 d 时, 在各培养基中均开始出现不定芽。值得注意的是, 被切割的子球在形成不定芽时均比刚切割时有不同程度的长大, 约为切割时的 2 ~ 3 倍, 且

新生的不定芽多出现在最外层鳞片与内部鳞片之间的鳞茎盘上, 排列整齐, 有少部分出现在鳞茎盘周围和底部。35 d 时可将得到的不定芽分离后再次转接, 再经过 50 ~ 55 d 的培养, 第 2 代子球大小已达到切割的要求, 可以再次切割继代培养。

试验过程中乳白石蒜的鳞茎在 B2 和 B3 增殖培养基中都有较多根系形成, 其中 B2 中形成的根系多为细弱须根且分布过于密集, 没有明显的主根, B3 中形成的根系发达, 分布密度适中, 主次分明, 是良好的生根培养基。

3 小结与讨论

乳白石蒜不定芽都在双鳞片之间的鳞茎盘上形成, 在诱导效果好的培养基上形成不定芽丛。MS

表 4 增殖培养基方差分析

Table 4 Variance analysis of proliferation medium

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
区组间	0.61	3	0.21	1.32	0.29
BA 处理	191.64	2	95.82	611.63	**
NAA 处理	76.79	2	38.40	245.09	**
混合处理	117.85	4	29.46	188.06	**
误差	3.76	24	0.16		
总变异	390.66	35			

表 5 增殖培养基增殖效果多重比较

Table 5 Multiple comparison of proliferation rate

培养基 编号	接种瓶数	最多芽个数/个	平均增殖系数	5% 水平	1% 水平
B9	30	15	11.18	a	A
B8	25	11	9.68	b	B
B5	25	10	8.70	c	C
B4	23	6	4.15	d	D
B7	30	6	3.58	de	D
B6	22	5	3.45	e	D
B1	25	3	2.53	f	E
B3	22	5	2.50	f	E
B2	23	4	2.45	f	E

+ 1.0 mg·L⁻¹BA + 0.1 mg·L⁻¹NAA 是乳白石蒜不定芽诱导最佳培养基, 诱导率达到 100%。在不定芽诱导阶段, 最内层鳞片(3~5层)之间均没有形成不定芽, 中层和近外层鳞片形成的不定芽长势良好, 是诱导芽的最佳材料。在增殖培养阶段, 切割小鳞茎的时机选择尤为重要, 为了缩短培养的周期又不影响增殖的效果, 应当在小鳞茎直径大于 5 mm 时进行切割。在各培养基组合中 MS + 5.0 mg·L⁻¹BA + 2.0 mg·L⁻¹NAA 是不定芽增殖的最佳培养基, 平均增殖系数可达到 11.18。乳白石蒜小鳞茎生根较容易, 在 MS + 1.0 mg·L⁻¹BA + 2.0 mg·L⁻¹NAA 培养基中得到了发育良好的根系。此外, 诱导得到的小鳞茎切割培养 20 d 后, 在 B4, B6 和 B7 培养基中有 30% 形成了愈伤组织, 分割后接入原培养基中, 培养 90 d 没有诱导出芽或者根。

参考文献:

- [1] 李根有, 楼炉焕, 吕正水, 等. 泰顺县野生观赏植物资源[J]. 浙江林学院学报, 1994, 11(4): 402-418.
- [2] 孙海平. 浙江大鹿山森林植物资源及开发利用[J]. 浙江林学院学报, 2000, 17(4): 373-377.
- [3] 钱嘯虎. 中国植物志: 第16卷第1分册[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 16-17.
- [4] 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.
- [5] 杨志玲, 谭梓峰. 石蒜资源的开发利用和繁育研究建议[J]. 经济林研究, 2003, 21(4): 97-99.
- [6] 董庆华. 石蒜的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(5): 54.
- [7] 林纯瑛, 马溯轩. 金花石蒜之鳞片组织培养繁殖[J]. 中国园艺, 1987, 33(4): 255-264.
- [8] 张露, 王光萍, 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.
- [9] HUANG L C, LIU D. Clonal multiplication of *Lycoris aurea* by tissue culture [J]. *Sci Hortic*, 1989, 40: 145-152.
- [10] 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): 18-20.
- [11] 朱锦, 诸葛强, 余水生, 等. 石蒜组培繁殖技术的研究[J]. 浙江林业科技, 2002, 22(4): 45-48.

Tissue culture in vitro of *Lycoris albiflora*

LIU Zhi-gao^{1,2}, CHU Jia-miao³, CHU Jia-miao³, GAO Yan-hui, ZHANG Lu²

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. School of Landscape Architecture and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China; 3. Department of Landscape Engineering, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: The bulb segments of *Lycoris albiflora* were cultured in vitro on MS mediums supplemented with different concentrations of BA and NAA. The results showed that the highest induction frequency (100%) was obtained on the medium of MS + BA (1.0 mg·L⁻¹) + NAA (0.1 mg·L⁻¹) and MS + BA (5.0 mg·L⁻¹) + NAA (2.0 mg·L⁻¹) was most ideal proliferated medium, its proliferation multiple was 15. While MS medium supplemented with BA (1.0 mg·L⁻¹) + NAA (2.0 mg·L⁻¹) was effective for rooting. [Ch, 5 tab. 11 ref.]

Key words: botany; *Lycoris albiflora*; tissue culture; induction; proliferation