

石蒜愈伤组织的诱导及其继代培养

周建辉, 张玉琼*, 李明凯, 朱景存

安徽农业大学生命科学学院, 合肥230036

摘要: 以石蒜鳞茎为外植体, 研究了不同激素组合、鳞茎不同部位和不同生长时期等因素对石蒜愈伤组织诱导的影响及其继代培养。结果表明: MS+2,4-D 1 mg·L⁻¹+6-BA 1 mg·L⁻¹ 激素组合能较好的诱导出石蒜愈伤组织, 诱导率达61.13%; 外植体的选择是石蒜愈伤组织诱导的关键因素, 内层鳞茎诱导愈伤组织的效果最好; 在一个生长周期中, 9、10月的鳞茎作为外植体诱导愈伤组织最佳; MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹ 是愈伤组织较好的继代培养基, 继代周期为24~27 d。

关键词: 石蒜; 愈伤组织; 鳞茎; 继代培养

Inducing Callus Tissues and Callus Subculture of *Lycoris radiate* Herb.

ZHOU Jian-Hui, ZHANG Yu-Qiong*, LI Ming-Kai, ZHU Jing-Cun

School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: Some factors such as various hormone concentration, different parts of bulb and different developing stages of *Lycoris radiate* callus induction and its subculture were studied. The results showed that the optimal mediums for the callus induction was MS+2,4-D 1 mg·L⁻¹+6-BA 1 mg·L⁻¹ and the rate reached 61.13%. The explants selection was the most significant factor of callus induction. The inner bulb of *L. radiate* was the best explants for callus induction. The optimal callus induction period was September and October in the growth of *L. radiate*. The optimal callus subculture medium was MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹ + KT 0.5 mg·L⁻¹ and the proper subculture cycle of callus was 24–27 days.

Key words: *Lycoris radiate*; callus; bulb; subculture

石蒜是石蒜科(Amaryllidaceae)多年生草本植物, 也称红花石蒜, 主要分布于我国华东、华南和华中地区, 日本也有分布。石蒜鳞茎含有石蒜碱、力克拉敏、加兰他敏等十多种生物碱。石蒜碱具有抗癌活性和潜在的抗SAS-CoV病毒的活性(Li等2005); 加兰他敏的临床用药形式氢溴酸加兰他敏为乙酰胆碱酯酶(AchE)抑制剂, 目前已成功地用于小儿麻痹后遗症、重症肌无力、肠麻痹等疾病的治疗, 有较好的市场前景(秦卫华等2003; 唐君波等2006)。红豆杉、人参、紫草(卞爱华等2008)等悬浮细胞培养的成功, 为石蒜类生物碱的获得提供了新的途径。在自然状态下石蒜主要以自然分球繁殖为主, 结实率和繁殖率较低, 加之近年来生态环境的破坏, 其种质资源急剧下降, 因此迫切需要寻找其他方法获取石蒜类生物碱。近年来石蒜组织培养的研究主要集中在石蒜的快速繁殖(Huang和Liu 1989; 张露等2002; 何树兰等2003; 林田等2006; 谢菊英等2006), 赵志敏等(2009)对石蒜属植物黄花石蒜的愈伤组织进行离体培养, 并检

测到其含有生物碱成分。本研究以石蒜鳞茎为材料诱导石蒜愈伤组织, 以期对石蒜悬浮细胞的培养、诱变及转基因育种、次生代谢产物的研究等方面提供技术平台。

材料与方 法

挑选大小一致的石蒜(*Lycoris radiata* Herb.)鳞茎作为材料, 切去叶和根, 剥去外层褐色鳞茎片, 用洗涤剂洗净后, 流水冲洗2~4 h。用75%乙醇处理30 s, 再用0.1%升汞处理10~15 min, 无菌水清洗3~5次即为无菌材料。以MS培养基作为基本培养基, 蔗糖浓度为3%, 0.7%琼脂, pH 5.7~5.9。取出消毒鳞茎, 分别取外、中、内层鳞茎片, 均纵切成4块作为外植体, 分别接种到2,4-D 1 mg·L⁻¹ (单位下同)+6-BA 1的MS培养基上, 40 d后统计结果。

收稿 2010-08-27 修定 2010-09-08

资助 国家自然科学基金(30972401)。

* 通讯作者(E-mail: zhyuqiong.ah@126.com; Tel: 0551-5786232)。

将消毒鳞茎的内层部分纵切分成4块, 分别接种在2, 4-D 0.1~2+6-BA 1~3的MS培养基上进行愈伤组织的诱导。采用双因素完全随机设计, 每个处理接种30个外植体, 3次重复, 每隔25 d继代一次, 愈伤组织诱导率=外植体诱导出愈伤组织的数/外植体数×100%, 染菌的去除, 不计算在内。在石蒜不同生长时期诱导愈伤组织的试验中分别在9、10、11、12月和次年1、2、3月采集石蒜鳞茎, 材料处理方法同上, 外植体接种在MS+2, 4-D 1+6-BA 1培养基上诱导愈伤组织。

愈伤组织继代培养中生长曲线的绘制试验中, 将生长较好的愈伤组织切成1 g左右转接到继代培养基中, 每隔3 d随机取出3瓶, 滤纸吸干愈伤组织表面的水分称取重量。愈伤组织增长率=(取出时质量-初始质量)/初始质量×100%。

试验数据采用DPS统计软件进行分析。

实验结果

1 石蒜鳞茎不同部位愈伤组织的诱导

石蒜鳞茎不同部位作为外植体诱导愈伤组织的差异较大(表1)。内层鳞茎片的诱导率高达52.08%, 诱导率明显高于其他两种外植体。外层鳞茎愈伤组织诱导率低, 虽然在诱导的过程中也能形成米粒状组织, 但是米粒状组织不能继续长大, 而且在鳞茎基部陆续生长出小鳞茎或者不定根, 之后鳞片死亡, 只留下鳞茎盘处的不定根或者芽。中层鳞茎褐化率和染菌率比较高, 愈伤组织诱导率不如内层鳞茎。

2 不同激素组合对石蒜愈伤组织的诱导

外植体接种到培养基上3~4 d就会向内稍微卷曲, 之后膨大, 10 d之后外植体的切口处出现细小

表1 鳞茎不同部位愈伤组织的诱导

Table 1 Effects of different parts of bulb sections on callus induction of *L. radiate*

外植体	诱导率/%
内层鳞片	52.08±1.05 ^A
中层鳞片	24.94±1.73 ^B
外层鳞片	5.73±5.27 ^C

同列中不同小写字母表示在0.05水平上差异显著, 不同大写字母表示在0.01水平上差异显著, 下表同。

的米粒状的组织, 15 d后在外植体下横向组织会慢慢膨大, 到40 d左右形成大块坚硬的愈伤组织(图1-A)。

由表2可知, 各激素组合都能诱导出愈伤组织, 其中以1 mg·L⁻¹ 2, 4-D+1 mg·L⁻¹ 6-BA激素组合最佳, 诱导率可达61.13%。愈伤组织生长状态较好。高浓度的2, 4-D和6-BA对石蒜愈伤组织的诱导不利, 诱导率低, 愈伤组织较小(图1-B), 容易分化, 褐化率较高。

3 石蒜不同生长时期对愈伤组织的诱导的影响

石蒜在一个生长周期中, 9月份和10月份的鳞茎愈伤组织的诱导率较高, 分别为59.63%和55.56%, 明显高于其他月份(表3), 到生长周期的后期, 鳞茎愈伤组织的诱导率明显下降。

4 愈伤组织的继代培养

石蒜愈伤组织比较容易分化成不定根, 给愈伤组织继代培养带来了诸多不便。研究发现使用激动素可以大大降低分化(表4)。MS+2, 4-D 0.5+KT 0.5是石蒜愈伤组织继代较好的培养基, 能明显降低分化, 愈伤组织增长率高达571%。随着激素浓度



图1 不同激素组合诱导的愈伤组织

Fig. 1 Callus of different hormones inducing

A: MS+2, 4-D 1+6-BA 1 诱导的愈伤组织; B: MS+2, 4-D 2+6-BA 2 诱导的愈伤组织; C: 继代培养的愈伤组织。

表2 不同激素组合对石蒜愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different hormones on callus induction of *L. radiate*

激素组合/mg·L ⁻¹		平均诱导率 / %	愈伤组织生长状况
2, 4-D	6-BA		
0.1	1	12.36±0.8457 ^E	黄色, 颜色深, 致密, 愈伤组织小
0.1	2	11.79±3.1061 ^E	黄色, 颜色深, 疏松, 呈水渍化, 愈伤组织较小
0.5	1	23.33±2.8868 ^{CD}	淡黄, 颜色深, 比较致密, 愈伤组织较大
0.5	2	10.96±0.8900 ^E	黄色, 颜色深
1.0	1	61.13±4.8231 ^A	淡黄, 颜色较淡, 比较致密, 愈伤组织较大
1.0	2	28.97±4.1791 ^C	淡黄, 颜色较淡, 比较致密, 愈伤组织较大
1.5	1	44.17±7.0323 ^B	淡黄, 致密, 愈伤组织较大
1.5	2	17.25±1.6186 ^{DE}	淡黄, 颜色较深, 愈伤组织大
2.0	1	24.85±4.1973 ^{CD}	淡黄, 颜色较深, 愈伤组织大
2.0	2	14.03±6.4582 ^E	黄色, 颜色深, 疏松, 呈水渍化, 愈伤组织较小

表3 石蒜不同生长期对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of different developing stages on callus induction of *L. radiate*

时间/月份	平均诱导率 / %
9	59.63±11.86 ^A
10	55.56±5.56 ^A
11	41.61±5.79 ^B
12	36.58±8.47 ^B
次年1	10.69±3.87 ^C
次年2	6.56±0.64 ^C
次年3	6.55±6.27 ^C

的增加, 愈伤组织容易褐化, 颜色变深, 愈伤组织致密。后期的试验中, 随着愈伤组织的继代次数的增多, 愈伤组织结构疏松, 为后续研究提供了较好状况的愈伤组织(图 1-C)。

5 石蒜愈伤组织生长曲线

石蒜愈伤组织的生长符合“S”型生长曲线(图 2), 0~9 d为迟缓期, 9~21 d愈伤组织生长较快, 到24~27 d愈伤组织生长趋缓, 35 d之后愈伤组织容易分化成不定根, 应及时将愈伤组织转接到新鲜继代培养基中继代培养。因此, 石蒜愈伤组织的转接最佳周期为24~27 d。

表4 不同激素组合对愈伤组织继代培养的影响

Table 4 Effects of different hormones on subculture of *L. radiate* callus

激素组合/mg·L ⁻¹		愈伤组织增长率 / %	愈伤组织生长状况
2, 4-D	KT		
0.1	0.1	257±16 ^e	愈伤组织生长较慢
0.1	0.5	354±36 ^d	生长较慢
0.1	1.0	424±53 ^c	有不定芽分化
0.5	0.1	441±50 ^{bc}	不定根分化较多
0.5	0.5	571±46 ^a	疏松, 生长较快
0.5	1.0	466±19 ^{bc}	愈伤组织颜色变深
1.0	0.1	329±23 ^d	生长较慢, 有的分化不定根
1.0	0.5	457±31 ^{bc}	有不定根分化
1.0	1.0	472±32 ^b	愈伤组织致密

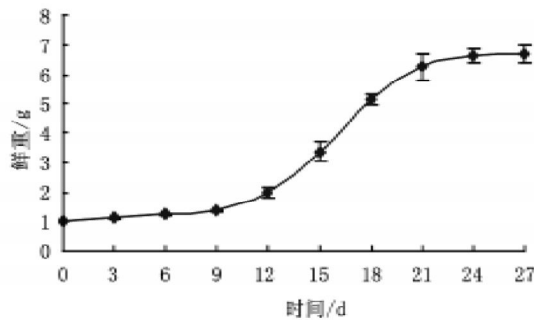


图2 石蒜愈伤组织生长曲线

Fig. 2 The callus growth curve of *L. radiata*

讨 论

黄花石蒜(*Lycoris aurea*)愈伤组织的离体培养及其生物碱含量分析已有报道(赵志敏等2009),但关于石蒜愈伤组织的诱导和继代培养尚未见发表。本实验通过石蒜不同鳞茎部位作为外植体诱导愈伤组织的结果表明,虽然外层鳞茎愈伤组织诱导率低,但是内层鳞茎片诱导率较高,可达61.13%。外层鳞茎不容易形成愈伤组织,可能是相对于中层或内层鳞茎,外层鳞茎分化程度较高,在激素的作用下易形成根或芽,而根或芽的产生抑制了外植体的切口产生愈伤组织。

石蒜在9、10月份鳞茎愈伤组织的诱导率较高,随着石蒜的生长,愈伤组织的诱导率逐渐下降,且褐化也越来越严重,可能是石蒜在8、9月份开始新的生长周期,之后随着次生代谢的加强,次生代谢产物的积累影响愈伤组织的诱导。

在石蒜愈伤组织的继代培养中,愈伤组织较易分化成不定根。彭菲等(2008)通过对石蒜属黄花石蒜的研究表明,黄花石蒜愈伤组织也容易分化成不定根。本实验使用激动素进行继代培养,筛选出了石蒜愈伤组织继代培养较好的激素组合。

参考文献

- 卞爱华, 高文远, 王娟(2008). 不同附加物对甘草悬浮培养细胞中甘草酸积累的影响. 中国中药杂志, 32 (23): 2737~2740
- 何树兰, 束晓春, 姚青菊, 夏冰(2003). 石蒜的组织培养. 江苏林业科技, 30 (4): 18~20
- 林田, 刘灶长, 李天菲, 郑海柔, 罗利军(2006). 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. 上海农业学报, 22 (4): 45~47
- 彭菲, 钟湘云, 谭朝阳, 雷思琪, 李云耀(2008). 黄花石蒜不定根的离体诱导与培养研究. 湖南中医药报, 28 (1): 44~48
- 秦卫华, 周守标, 汪恒英, 王晖(2003). 石蒜属植物的研究进展. 安徽师范大学学报(自然科学版), 26 (4): 385~390
- 唐君波, 彭六保, 崔巍, 平静波(2006). 加兰他敏市场前景浅析. 中国药房, 7 (22): 1690~1692
- 谢菊英, 张露, 连芳青, 黄敏仁, 刘青, 陈蕾伊(2006). 生长调节剂对石蒜无性繁殖的影响. 南京林业大学学报(自然科学版), 30 (3): 125~127
- 张露, 王光萍, 曹福亮(2002). 石蒜类植物无性繁殖技术. 南京林业大学学报(自然科学版), 26 (4): 1~5
- 赵志敏, 钟湘云, 杨帅, 鲁耀邦, 彭菲(2009). 黄花石蒜愈伤组织培养研究. 湖南中医药大学学报, 29 (5): 48~50
- Huang LC, Liu DM (1989). Clonal multiplication of *Lycoris aurea* by tissue culture. Sci Hortic, 40 (2): 145~152
- Li SY, Chen C, Zhang HQ, Guo HY, Wang H, Wang L, Zhang X, Hua SN, Yu J, Xiao PG et al (2005). Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. Antiviral Res, 67 (1): 18~23