

长筒石蒜鳞片诱导和植株再生

王光萍¹ 陈英¹ 周坚¹ 张露^{1,2} 黄敏仁^{1,*}

¹南京林业大学林木遗传和基因工程重点实验室, 南京 210037; ²江西农业大学林学院, 南昌 330045

摘要 采用长筒石蒜带基盘鳞片为外植体, 以MS为基本培养基, 附加不同种类和浓度的植物生长调节物质诱导小鳞茎, 在NAA 0.1 mg·L⁻¹+6-BA 5.0 mg·L⁻¹及ZT 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 5.0 mg·L⁻¹的培养基上, 小鳞茎(芽)增殖率可达480%; 以蔗糖浓度为6%的MS培养基上的小鳞茎生长量最高; 小鳞茎在MS培养基上生根率可达100%; 移栽成活率为90%左右。

关键词 长筒石蒜; 鳞片诱导; 植株再生

Bulb Induction and Plant Regeneration of *Lycoris longituba*

WANG Guang-Ping¹, CHEN Ying¹, ZHOU Jian¹, ZHANG Lu^{1,2}, HUANG Min-Ren^{1,*}

¹The Key Laboratory of Forestry Genetics & Gene Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; ²College of Forestry, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract Scales with bulb bases used as explants were cultured on MS-based medium applied different combinations of plant hormones to induce bulblets. The multiplication rate of bulblets reached 480% on MS medium added NAA 0.1 mg·L⁻¹+6-BA 5.0 mg·L⁻¹ and ZT 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 5.0 mg·L⁻¹. The highest production of bulblets was on MS medium with 6% sugar; the rooting rate of bulblets was 100% on MS medium; the survival rate of bulb transplanting was about 90%.

Key words *Lycoris longituba*; bulb induction; plant regeneration

长筒石蒜(*Lycoris longituba*)为石蒜科石蒜属植物, 分布于我国长江中下游, 花大而形似百合, 花色艳丽, 有白色、乳黄色、深黄色、淡紫色、淡绿色或白色带红条、紫色带蓝晕等, 花色和花型变异之大, 实属罕见, 而且花梗粗壮挺拔, 是理想的切花材料。但目前尚处于野生状态, 未得到有效开发利用。石蒜属植物的自然繁殖率较低, 开花植株每年只产生1~2个子球, 采用组织培养方法可大量繁殖鳞茎, 为快速繁殖种球创造了条件。董庆华和田惠桥^[1]及何树兰等^[2]曾对石蒜(*Lycoris radiata*)的组织培养作过研究, 但对长筒石蒜的鳞片培养和植株再生尚未见报道。

材料与方 法

选用生长健壮的长筒石蒜(*Lycoris longituba*)鳞茎, 剥去鳞茎外褐色鳞皮及干鳞片, 切除球颈及根系, 流水冲洗1~2 h, 置于75%乙醇灭菌1 min, 再用0.1%氯化汞溶液消毒15 min, 无菌水冲洗5次。将鳞茎分割成六等分, 每份分别含2~8片鳞片(带有与鳞片基部相连接的基盘), 接种于诱导腋芽的培养基, 或将鳞茎分割成二、四、八

等分, 直接置于腋芽诱导培养基上; 腋芽或不定芽产生后, 转接到诱导鳞茎的培养基上; 将已展叶的小鳞茎置于生根培养基诱导生根。培养基为MS附加不同浓度的6-BA、ZT和NAA, 蔗糖浓度为3%~7.5%, 琼脂为0.6%, pH 5.7。光照时间14 h·d⁻¹, 光照度1 200 lx, 温度25~28℃。再生植株移栽于市售培养土, 每日喷水2次。

结果与讨论

1 外植体与小鳞茎诱导

外植体的切割与鳞茎诱导有较大关系。将鳞茎切割成六等分, 去除顶芽后分别采用2、4、6、8片带基盘鳞片(图1-a)诱导腋芽; 或将鳞茎分割成二、四、八等分, 直接置于腋芽诱导培养基。实验结果表明, 具2个鳞片的外植体逐渐

收稿 2004-11-01 修定 2005-05-08

资助 国家“863”课题(2002AA241051)和国家自然科学基金(30160672)。

*通讯作者(E-mail: mrhuang@njfu.edu.cn, Tel: 025-85427412)。

枯萎死亡, 4~8个鳞片的均能产生腋芽或不定芽并诱导鳞茎(图1-b、c)形成, 以4~6个鳞片所形成的腋芽或不定芽较多且健壮, 8个鳞片的外植体产生的腋芽或不定芽可能因受挤压而部分畸形。

鳞茎二至八等分直接置于培养基的外植体, 顶芽切除的也能诱导不定芽, 但多数畸形; 而未切除顶芽的可迅速伸出叶片, 抑制鳞片间的腋芽生长及不定芽的产生, 而无小鳞茎形成。

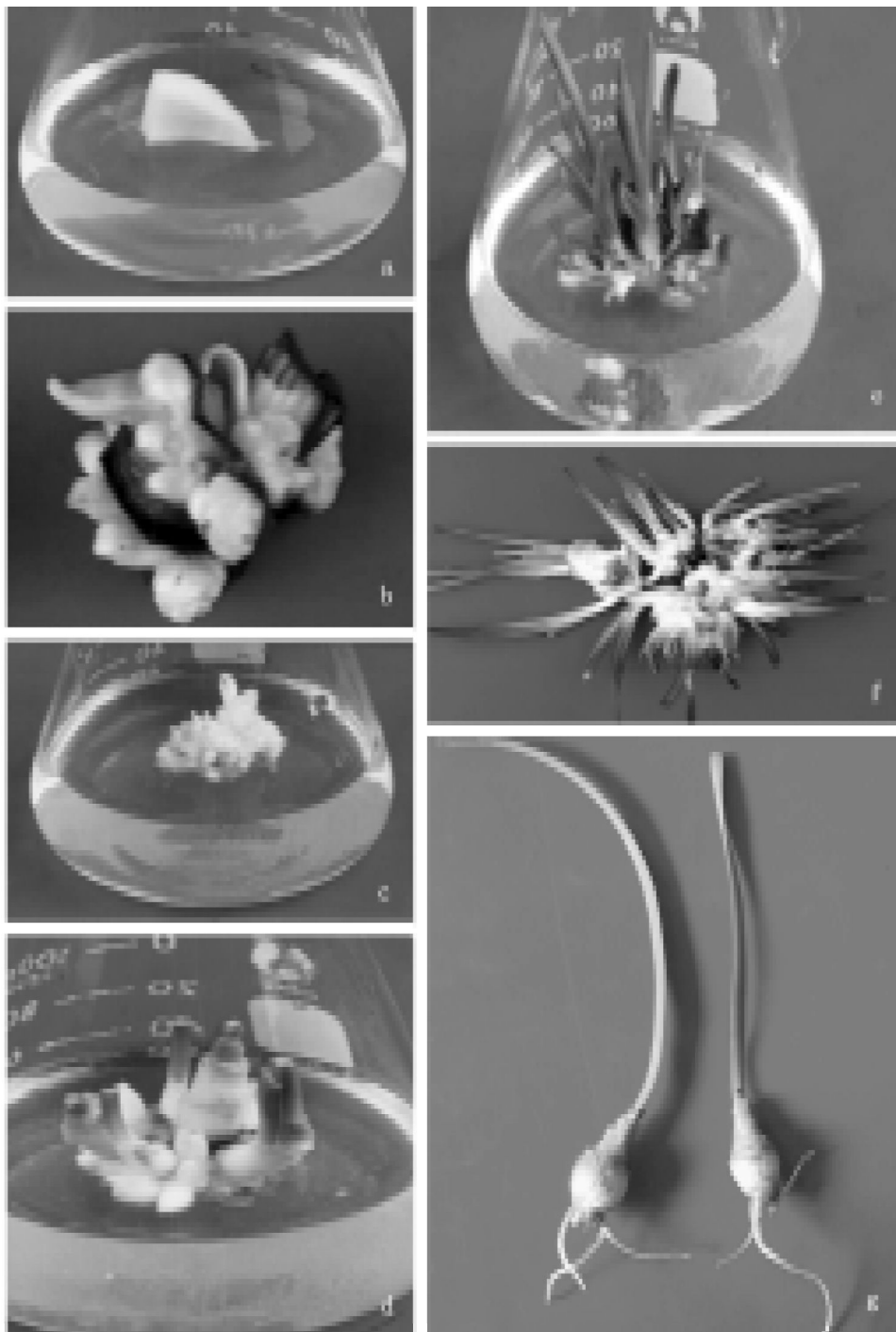


图1 长筒石蒜鳞片诱导和植株再生

Fig. 1 Bulb induction and plant regeneration of *L. longituba*

a: 带基盘鳞片; b: 新萌发小鳞茎(芽); c: 小鳞茎(芽)丛; d: 膨大后小鳞茎; e、f: 无根小植株; g: 再生植株。

2 生长调节物质对鳞茎诱导的影响

本文采用两步法诱导鳞茎: 第一步诱导腋芽及不定芽, 第二步诱导小鳞茎形成。

(1) 分别将2、4、6、8片带基盘的鳞片外植体接种于培养基MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹及MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹, 培养20~25 d, 除带2个鳞片的外植体逐渐枯萎死亡外, 其余外植体鳞片间均有腋芽萌发并产生不定芽, 6-BA为1.0 mg·L⁻¹时数量较多, 表明细胞分裂素类似物的浓度提高对不定芽的诱导有明显效果。

(2) 在小鳞茎形成过程中, 生长调节物质的不同组合及浓度对小鳞茎的诱导与增殖有较大影响, 结果见表1。将NAA浓度固定为0.1或3.0 mg·L⁻¹时, 当6-BA浓度有1.0 mg·L⁻¹增加到5.0 mg·L⁻¹, 小鳞茎增殖率逐渐提高, 最高达480%, 而6-BA浓度超过10.0 mg·L⁻¹, 则开始下降; 当6-BA浓度高达20.0 mg·L⁻¹, 配合不同浓度的NAA, 均未能形成小鳞茎而仅产生大量愈伤组织。由此可见, 在鳞茎诱导时, 较高浓度的细胞分裂素类似物对鳞茎产生有促进作用, 但浓度过高又会抑制鳞茎的分化。在6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 3.0 mg·L⁻¹的培养基上, 不定芽可产生大量的愈伤组织, 而未能诱导小鳞茎的发生, 说明生长素类似物浓度高于细胞分裂素类似物浓度也不利于鳞茎诱导。本文中观察到, 当NAA浓度为3.0 mg·L⁻¹、6-BA

浓度分别为3.0和10.0 mg·L⁻¹时, 有少量不定根形成; 在NAA 0.1 mg·L⁻¹附加6-BA 1.0 mg·L⁻¹的组合中, 在诱导小鳞茎的同时生根率可达62.5%。在无生长调节物质的MS培养基上, 不定芽增殖率仅为25%(表1)。

(3) 鳞茎形成受细胞分裂素类物质的影响较大, 尤其在鳞茎分化初期, 较高浓度的细胞分裂素类物质是鳞茎膨大的启动因子之一。本文采用两种细胞分裂素类似物协同诱导小鳞茎的产生, 结果表明, 随着6-BA浓度的增加, 小鳞茎增殖率不断上升, 最高达467%, 但当6-BA为20 mg·L⁻¹时, 则无小鳞茎产生, 仅形成愈伤组织, 同样表现出高浓度的细胞分裂素类似物会抑制小鳞茎的形成(表2)。

总之, 生长调节物质组合为6-BA 5.0 mg·L⁻¹+ZT 0.5 mg·L⁻¹或6-BA 5.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹的培养基, 有利于鳞茎的诱导, 而低浓度的6-BA与NAA组合则易使鳞茎生根。采用MS附加一定浓度的细胞分裂素类物质有利于小鳞茎的分化, 但浓度不宜过高, 当6-BA达到20 mg·L⁻¹时, 无论与NAA还是与ZT配合使用, 均形成愈伤组织, 说明生长调节物质浓度对长筒石蒜离体培养的发育过程有较为明显的影响。

此外, Lercari和Micheli^[3]测定生长于长日和短日照条件下洋葱植株叶片中细胞分裂素含量时发现, 在短日条件下生长的植株, 其叶片中细胞分

表1 NAA和6-BA不同组合对诱导小鳞茎的影响

Table 1 Effects of different combinations of NAA and 6-BA on the regeneration of bulblet

组	处理	生长调节物质组合/mg·L ⁻¹		接种芽数/个	小鳞茎发生数/个	增殖率/%	备注
		NAA	6-BA				
I	1	0.1	1.0	24	81	338	5瓶生根
	2	0.1	3.0	30	83	277	
	3	0.1	5.0	30	144	480	
	4	0.1	10.0	30	107	357	
	5	0.1	20.0	18	0	0	
II	6	3.0	1.0	30	0	0	愈伤组织
	7	3.0	3.0	30	74	247	2瓶生根
	8	3.0	5.0	18	47	261	
	9	3.0	10.0	30	118	393	1瓶生根, 4瓶有愈伤(其中1瓶有芽分化)
	10	3.0	20.0	30	0	0	愈伤组织
	对照	0	0	20	5	25	有较多根系产生

表2 ZT和6-BA不同组合对诱导小鳞茎的影响

Table 2 Effects of different combinations of ZT and 6-BA on the regeneration of bulblet

处理	长调节物质 组合/mg·L ⁻¹		接种芽 数/个	小鳞茎发 生数/个	增殖 率/%	备注
	ZT	6-BA				
1	0.5	1.0	15	24	160	
2	0.5	3.0	18	16	367	
3	0.5	5.0	24	109	454	
4	0.5	10.0	24	112	467	
5	0.5	20.0	15	0		愈伤组织

裂素含量很低, 几乎测不出; 当植株转移到长日条件下时, 细胞分裂素含量不断上升, 第29天

含量最高, 此时鳞茎也开始膨大。本文中6-BA对石蒜小鳞茎的分化和增殖均有明显的促进作用, 进一步佐证了细胞分裂素类物质对鳞茎分化和膨大是十分必要的观点^[4,5]。

3 不同浓度蔗糖对小鳞茎膨大的影响

诱导小鳞茎膨大(图1-d)过程中碳源也是重要因素之一, 蔗糖对离体小鳞茎的膨大有一定的影响。在无生长调节物质的MS培养基上, 随着蔗糖浓度的增加, 小鳞茎的增殖率提高, 当蔗糖浓度为6%时, 小鳞茎的增殖率达到255%, 但鳞叶开始减少; 蔗糖浓度达到7.5%时, 小鳞茎增殖下降, 鳞叶多数枯萎(表3)。由此可见, 促进小鳞茎膨大的同时又有利于植株生长的最佳蔗糖浓度为4.5%~6%, 这与蔡朝晖等^[6]在暗紫贝母的离

表3 不同浓度蔗糖对再生小鳞茎的影响

Table 3 Effects of different concentrations of sucrose on the regeneration of bulblet

蔗糖浓度/g·L ⁻¹	接种小鳞茎数/个	培养前球重/g	培养后球重/g	增殖率/%	备注
30	15	0.1620	0.2169	134	根、叶多
45	15	0.1825	0.3031	166	根、叶多
60	15	0.0769	0.1965	255	有根, 叶少
75	15	0.1976	0.3579	181	有根, 叶枯

体培养中的结果有相似性。

4 再生植株的移栽

将膨大的带叶小鳞茎(图1-e、f)接种于无生长调节物质的MS培养基上, 15 d左右, 在叶片伸长的同时可产生白色不定根。将再生植株(图1-g)炼苗后移栽于市售培养土, 成活率达95%以上。

在鳞茎类植物组织培养中, 百合类植物已报道较多, 而石蒜属植物的报道则较少。Huang和Liu^[7]采用双鳞片法诱导忽地笑小鳞茎的产生, 每年可获30 000个植株。本文采用两步法, 先在含低浓度生长调节物质的培养基上诱导腋芽或不定芽的产生, 然后在适宜的培养基上诱导小鳞茎的形成与膨大, 如此可在较短时间内形成大量小鳞茎, 虽然其繁殖系数尚不能达到百合类植物那么高, 但1个芽体每25~30 d增殖率可达2.0~4.5倍。另外, 在本文中还观察到, 长筒石蒜的外植体选择很重要, 外植体为1~2个鳞片时褐化率较高, 采用4~6个带基盘的鳞片则较为理想, 这与Huang

和Liu^[7]采用双鳞片法培养忽地笑有一定的差别。另外, 带顶芽的外植体抑制鳞片间的腋芽或不定芽产生, 不易诱导小鳞茎的发生。

参考文献

- 董庆华, 田惠桥. 石蒜的组织培养. 植物生理学通讯, 1995, 5: 54
- 何树兰, 束晓春, 姚青菊等. 石蒜的组织培养. 江苏林业科技, 2003, (4): 18~20
- Lercari B, Micheli P. Photoperiodic regulation of cytokinin levels in leaf blades of *Allium cepa* L. Plant Cell Physiol, 1981, 22: 501~505
- 刘明志, 林雪艳. 激素对百合植株再生的影响. 广西植物, 2002, (2): 167~17
- 郭得平. 光敏素和激素对洋葱鳞茎形成的调控及作用机制. 植物生理学通讯, 1996, 32(3): 228~234
- 蔡朝晖, 朱丹妮, 陶金来等. 培养基中蔗糖浓度及添加氨基酸对组培暗紫贝母生长的影响. 中国药科大学学报, 1996, 27(1): 1~3
- Huang LC, Liu DM. Clonal multiplication of *Lycoris aurea* by tissue culture. Sci Hortic, 1989, 40: 145~152