

# 换锦花种胚和叶片的组织培养研究

时 剑<sup>1</sup> 童再康<sup>1\*</sup> 刘志高<sup>2</sup> 高燕会<sup>1</sup> 姜小凤<sup>1</sup> 黄华宏<sup>1</sup>

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 园林学院 浙江 临安 311300)

**摘要:**换锦花是我国南方的优良球根花卉和重要的药用植物。采用组织培养技术以换锦花种胚和叶片为外植体,对其进行研究。结果显示:换锦花种胚的诱导率在各培养基上均较高,平均为75.8%,适宜的愈伤组织诱导培养基为MS+6-BA 2 mg/L+2 4-D 2 mg/L+蔗糖 60 g/L,适宜的丛芽诱导培养基为MS+6-BA 2 mg/L+2 4-D 1 mg/L+蔗糖 30 g/L;换锦花成熟叶段愈伤组织的平均诱导率为13.5%,而幼嫩叶段的平均诱导率为65.8%,两者差异极显著,适宜于幼嫩叶段诱导的培养基为MS+6-BA 20 mg/L+NAA 1 mg/L+蔗糖 30 g/L,各生长调节剂配比的试验结果显示,NAA较高时利于根的诱导,而6-BA较高时利于芽的诱导。

**关键词:**换锦花;石蒜属;组织培养;种胚;叶片

中图分类号:Q949.71<sup>+</sup>8.25;Q943.1 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)04-0665-05

## Tissue Culture of Leaves and Embryo in *Lycoris sprengeri*

SHI Jian<sup>1</sup>, TONG Zai-kang<sup>1\*</sup>, LIU Zhi-gao<sup>2</sup>,  
GAO Yan-hui<sup>1</sup>, JIANG Xiao-feng<sup>1</sup>, HUANG Hua-hong<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Agriculture and Forestry University, the Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Linan 311300, China; 2. Zhejiang Agriculture and Forestry University, Landscape Architecture College, Linan 311300, China)

**Abstract:** *Lycoris sprengeri* Comes ex baker is one of the most beautiful bulbs but hasn't been used in landscaping widely owing to lack of rapid propagation technique. The leaf blades and embryo of *L. sprengeri* were cultured in vitro on MS mediums supplemented with different concentrations of plant growth regulator. The results showed that high induction rates, 75.8% on average, were obtained in embryo culture. The most ideal callus induction medium for embryo culture was MS+6-BA 2 mg/L+2 4-D 2 mg/L+ Sucrose 60 g/L, while the most ideal clustered shoots induction medium was MS+6-BA 2 mg/L+2 4-D 1 mg/L+ Sucrose 30 g/L. The results of leaf tissue culture showed that the induction rate of young leaves was 65.8% on average which was higher than that of mature leaves(13.5% on average). The most ideal induction medium for young leaves tissue culture was MS+6-BA 20 mg/L+NAA 1 mg/L+ Sucrose 30 g/L. The results of growth regulator contrast test showed that higher NAA concentration was good for induction of roots, while higher 6-BA concentration was good for induction of shoots.

**Key words:** *L. sprengeri*; *Lycoris* Herb.; tissue culture; embryo; leaves

收稿日期:2011-02-10 修回日期:2011-05-08

基金项目:浙江省科技项目(2006C12003)、浙江省创新团队项目(2009R50034)和杭州市科技项目(20080632B29)

作者简介:时剑(1986—)男,硕士,主要从事观赏植物遗传改良研究, E-mail: about55@163.com; \* 通讯作者:童再康 教授, E-mail: zktong@zafu.edu.cn。

换锦花(*Lycoris sprengeri* Comes ex baker) 隶属石蒜科(Amaryllidaceae) 石蒜属(*Lycoris* Herb.) ,是一种优良的球根花卉,花粉红色、淡紫红色至紫红色,花被裂片顶端常带蓝色,盛夏开放,产安徽、江苏、浙江、湖北等地,常伴生于阴湿山坡或竹林中<sup>[1]</sup>。

换锦花是石蒜属植物中最具观赏价值的种类之一,以其独特的蓝紫色花瓣而著称,花朵色彩淡雅,花形优美。自然条件下,换锦花主要依靠种子自播和鳞茎分球进行繁殖,繁殖系数较低,难以满足大规模的生产应用。由于快繁技术措施的滞后,园林生产应用与药用的滥采滥挖,现已严重影响其野生分布,据笔者调查,分布于浙江舟山海岛的种群已遭到毁灭性破坏,野生资源数量极少。因此,解决其快繁技术问题已成为其种群保育与园林应用的关键。组织培养技术作为植物品种快繁的主要手段已在鳞茎植物中得到较为广泛的应用,它可以大幅度提高鳞茎的繁殖系数。然而,有关换锦花组织培养技术研究仅见于姚丽娟等<sup>[2]</sup>,以换锦花带基盘鳞片为外植体,在较高浓度(6-BA 5 mg/L) 细胞分裂素时,诱导率最大可达55.16%。而针对种子胚和叶片的诱导培养未见报道,利用种胚快繁在石蒜属植物杂交育种中具有不可替代的作用,叶片的诱导培养具有不破坏母鳞茎的优点,尤其对于珍稀种质的保育与快繁具有十分重要的意义。为此,本文系统研究了种胚与叶片二种外植体的组织培养方法,以期实现换锦花的快速繁殖。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及处理方法

选用饱满的换锦花种子,置于体积分数为75%乙醇中1~2 min,于无菌水中浸泡24 h,使其充分吸水,然后在质量分数为0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液中灭菌10~13 min后,用解剖刀和镊子将幼胚取出,即可接种于培养基上<sup>[3-5]</sup>。

换锦花叶片于初春采集,成熟叶段为绿色无缺损的叶片,幼嫩叶段为乳黄色尚未变绿的叶段,于体积分数为75%乙醇中30~60 s,质量分数为0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液中8~10 min 灭菌,切成0.8~1.0 cm 的片段,进行接种<sup>[6-8]</sup>。

### 1.2 培养基配方和培养条件

换锦花种子胚诱导培养所用的培养基为K、L、M、N、P、Q共6个,叶片诱导培养所用的培养基为W<sub>1</sub>~W<sub>9</sub>共9个,各培养基均以MS培养基为基础,具体的配方见表1。

表1 培养基配方及编号

Tab.1 Ingredient and number of culture medium

培养基编号 No.	蔗糖浓度/(g·L <sup>-1</sup> ) Sucrose concentration	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	6-BA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	2,4-D/ (mg·L <sup>-1</sup> )
K	30	—	2	1
L	30	—	2	2
M	30	—	2	4
N	30	—	0	2
P	60	—	0	1
Q	60	—	2	2
W <sub>1</sub>	30	1	1	—
W <sub>2</sub>	30	1	3	—
W <sub>3</sub>	30	1	5	—
W <sub>4</sub>	30	1	10	—
W <sub>5</sub>	30	1	20	—
W <sub>6</sub>	30	3	1	—
W <sub>7</sub>	30	3	3	—
W <sub>8</sub>	30	3	5	—
W <sub>9</sub>	30	3	10	—

换锦花种子幼胚、愈伤组织以及小鳞茎块的培养条件为: 温度(25 ± 2) °C, 光照 1 200 lx, 光照时间 14 h/d。换锦花叶片的诱导为暗培养, 温度(25 ± 2) °C<sup>[9-12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 换锦花种胚的诱导培养

换锦花种胚的愈伤组织和小鳞茎诱导率较高, 而且各培养基之间的差异明显。接种培养 3 个月后, 部分培养基中已有小鳞茎或丛芽出现, 如图 1 中培养基 K 条件下, 已可以看到白色小鳞茎的出现, 统计数据如表 2 所示。其中, 以培养基 K: MS + 6 - BA 2 mg/L + 2 4 - D 1 mg/L + 蔗糖 30 g/L 条件诱导小鳞茎效果最好, 以培养基 Q: MS + 6 - BA 2 mg/L + 2 4 - D 2 mg/L + 蔗糖 60 g/L 诱导的愈伤组织效果最好。结合各培养基的生长调节剂配比和蔗糖浓度, 对比各个培养基的诱导效果: 比对培养基 K 和 M, 表明 2 4 - D 浓度的增大, 有利于愈伤组织的形成; 比对培养基 M 和 Q, 显示高水平的 2 4 - D 会诱使愈

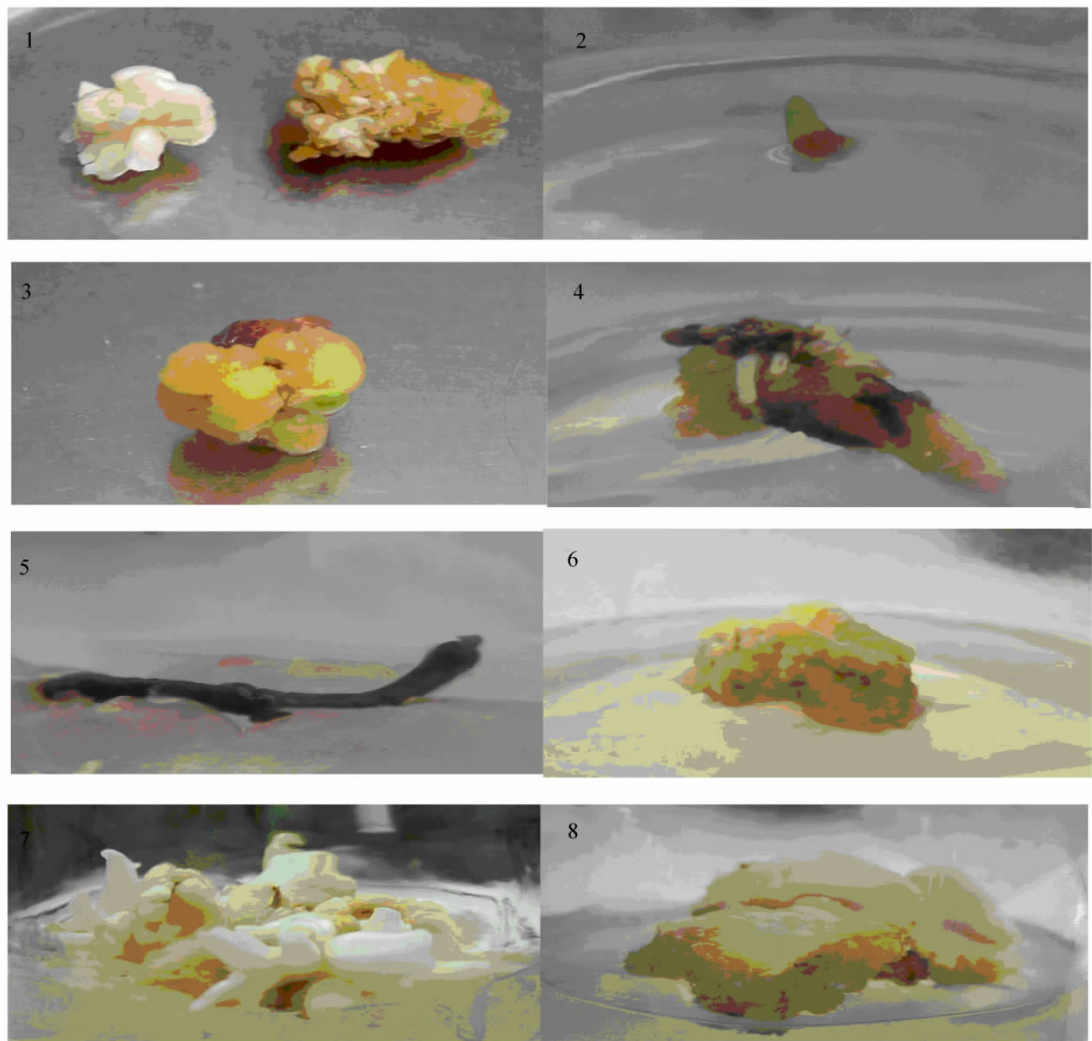


图 1-1 培养基 K 换锦花胚诱导的丛芽和愈伤组织; 图 1-2 培养基 L 换锦花胚形成的绿色胚芽; 图 1-3 培养基 M 换锦花胚诱导的乳黄色愈伤组织; 图 1-4 培养基 N 换锦花胚诱导的根和愈伤组织; 图 1-5 培养基 P 换锦花胚伸长后褐化; 图 1-6 培养基 Q 换锦花胚诱导的乳白色愈伤组织; 图 1-7 换锦花叶片诱导的小鳞茎; 图 1-8 换锦花叶片诱导的愈伤组织。

Fig1 - 1: Bulbus and callus of embryo culture on culture medium K; Fig1 - 2: Bulbus of embryo culture on culture medium L; Fig1 - 3: Creamy yellow callus of embryo culture on culture medium M; Fig1 - 4: Roots and callus of embryo culture on culture medium N; Fig1 - 5: Browning tissue of embryo culture on culture medium P; Fig1 - 6: Oyster white callus of embryo culture on culture medium Q; Fig1 - 7: Bulbus of leaves tissue culture; Fig1 - 8: Callus of leaves tissue culture.

图 1 换锦花种胚和叶片诱导培养

Fig. 1 Pictures of embryo culture and leaves tissue culture in *L. sprengeri*

表2 换锦花胚培养结果统计  
Tab.2 Results of embryo culture in *L. sprengeri*

编号 No.	数量 Total	愈伤诱导数 Induction No.	诱导率/% Inductivity	6周后 After six weeks	3个月后 After three months
K	14	10	71.4	胚膨大,渐形成很多小突起,顶端略呈绿色	形成丛状鳞茎芽,边缘有白色愈伤组织
L	12	8	66.7	胚芽端呈绿色,膨大不明显	绿色胚芽端未见进一步变化
M	16	12	75.0	胚芽端呈绿色,中部膨大,有较多的海绵状褶皱	绿色胚芽端未见进一步变化,胚轴膨大,形成蜡黄色愈伤
N	20	16	80.0	胚芽端呈绿色,中部膨大,呈白色	形成丛状根,边缘有少量愈伤组织,且有褐变迹象
P	18	16	88.9	胚伸长数倍后开始褐变	全部褐化
Q	22	16	72.7	胚膨大,形成海绵状愈伤组织	形成乳白色愈伤组织

伤组织变黄而降低分化能力; 比对培养基 K 和 Q 以及 L 和 Q 表明, 适宜的 2,4-D 浓度和蔗糖浓度有利于愈伤组织的诱导; 比对培养基 N 与 L 以及 P 与 L 表明 6-BA 的缺失易引起胚组织的褐变。

愈伤组织经过切割(切除外围海绵状组织)和 2 次转接(各处理仍接种于各培养基上,处理 P 除外),每次转接间隔 1 月左右,之后便可分化出小鳞茎或丛芽,而将成形的小鳞芽转接于无激素或低浓度 NAA(0.5 mg/L)的培养基上诱导生根<sup>[11-12]</sup>,即可形成完整的植株。

## 2.2 换锦花叶片的诱导培养

换锦花叶片的诱导在光照条件下极易褐变,本研究采用暗培养的方法对成熟叶段和幼嫩叶段进行对比试验,统计结果如表 3 所示。可以看到成熟叶段的褐化率仍然很高,最高达到 71.4%,其诱导率以培养基 W<sub>6</sub> 最高,为 37.5%,平均诱导率为 13.5%,而幼嫩叶段的平均诱导率为 65.8%,方差分析显示两者差异极显著, P 值为 1.03E-05。

W 系列的培养基以 NAA 和 6-BA 的不同配比组成,从成熟叶段的培养结果来看,W<sub>3</sub>、W<sub>5</sub>、W<sub>6</sub>、W<sub>8</sub>、W<sub>9</sub> 培养基,叶段有一定程度的愈伤组织诱导,但都没有出现鳞茎或芽;在幼嫩叶段的诱导中,各培养基均有愈伤组织诱导,其中以 W<sub>2</sub>、W<sub>5</sub>、W<sub>6</sub> 诱导率最高。从各培养基不同激素配比来看,NAA 较 6-BA 浓度高时利于愈伤组织根的诱导,如 W<sub>6</sub> 培养基 NAA 与 6-BA 之比为 3,其生根率为 60.0%,芽的诱导率为 0,而 6-BA 较 NAA 浓度高时利于鳞茎芽的诱导,如 W<sub>5</sub> 培养基 6-BA 与 NAA 之比为 20,其鳞茎诱导率为 22.2%,W<sub>9</sub> 培养基 6-BA 与 NAA 之比为 3.3,其鳞茎诱导率为 25.0%,但是 W<sub>9</sub> 的褐化率高达 20%,是 W<sub>5</sub> 的 2 倍以上,可能与激素浓度,特别是 NAA 浓度过高有关。

表3 换锦花成熟叶段的诱导培养统计  
Tab.3 Results of leaves tissue culture in *L. sprengeri*

成熟叶段 Mature leaves	总数 Total	褐化数 Browning No.	愈伤组织诱导数 Induction No.	生根数 Rooting No.	鳞茎诱导数 Germination No.	褐化率/% Browning ratio	愈伤诱导率/% Inductivity
W <sub>1</sub>	12	8	0	0	0	66.7	0
W <sub>2</sub>	10	4	0	0	0	40.0	0
W <sub>3</sub>	12	4	4	0	0	33.3	33.3
W <sub>4</sub>	14	8	0	0	0	57.1	0
W <sub>5</sub>	14	10	2	0	0	71.4	14.3
W <sub>6</sub>	16	6	6	0	0	37.5	37.5
W <sub>7</sub>	14	4	0	0	0	28.6	0
W <sub>8</sub>	18	6	4	0	0	33.3	22.2
W <sub>9</sub>	14	4	2	0	0	28.6	14.3

表4 换锦花幼嫩叶段的诱导培养统计

Tab. 4 Results of leaves tissue culture in *L. sprengeri*

幼嫩叶段 Young leaves	总数 Total	褐化数 Browning No.	愈伤组织诱导数 Induction No.	生根数 Rooting No.	鳞茎诱导数 Germination No.	褐化率/% Browning ratio	愈伤诱导率/% Inductivity
W <sub>1</sub>	12	6	4	4	0	50	33.3
W <sub>2</sub>	14	0	12	2	0	0	85.7
W <sub>3</sub>	12	4	4	2	0	33.3	33.3
W <sub>4</sub>	6	2	4	2	0	33.3	66.7
W <sub>5</sub>	22	2	18	6	4	9.1	81.8
W <sub>6</sub>	20	0	16	12	0	0	80
W <sub>7</sub>	28	0	22	8	0	0	78.6
W <sub>8</sub>	16	0	10	8	0	0	62.5
W <sub>9</sub>	20	4	14	4	4	20	70

### 3 小结与讨论

换锦花种子胚的培养试验表明,适宜的2,4-D浓度和蔗糖浓度有利于愈伤组织的诱导,低水平的2,4-D在一定浓度6-BA条件下会有小鳞茎的诱导,高水平的2,4-D会诱使愈伤组织变黄而降低分化能力,研究发现,换锦花种子胚的愈伤组织和鳞茎诱导都需要有适量的6-BA存在,否则,种子胚所诱导产生的愈伤组织会丧失持久性而逐渐褐化。该结果与鲁雪华等<sup>[9]</sup>忽地笑胚的培养结果基本一致,而不同的是,在2,4-D为2 mg/L,不加6-BA的条件下,忽地笑亦有愈伤组织和芽丛出现,而换锦花没有芽丛出现,这可能与不同种之间内源激素含量的差异有关。综合考虑愈伤组织活力与小鳞茎的诱导率,可以认为换锦花种子胚培养的最佳诱导培养基为MS+6-BA 2 mg/L+2,4-D 1 mg/L+蔗糖 30 g/L,小鳞茎生根培养基采用MS+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L或无激素的MS培养基。

与种子胚和鳞茎基盘作外植体相比,换锦花叶片作外植体的诱导快繁更具有应用价值,它不损伤鳞茎,在珍稀种质保存与扩繁中具有十分重要的现实意义。但在实际操作中普遍存在易褐变难诱导等问题,预试验研究中发现光照下的叶段极易褐变,而采用暗培养能有效降低褐变率。笔者对比成熟叶段和幼嫩叶段的诱导效果,发现二者在褐化率和诱导率上具有极显著差异,以幼嫩叶段为外植体的愈伤诱导率最高可达85.7%,平均为65.8%,而成熟叶段的诱导率最高仅为37.5%,一般认为与叶片不同部位生理和营养状况有关,成熟叶段的细胞功能趋于衰退,而幼嫩叶段部分的细胞营养丰富,生理活动旺盛,脱分化和再分化的能力较强,且容易启动<sup>[13]</sup>,所以,选用幼嫩叶段进行愈伤的诱导,效果更好。各生长调节剂配比的试验结果显示,NAA较高时利于生根,如W<sub>6</sub>的生根率可达60%;而6-BA较高时利于芽的诱导,如W<sub>5</sub>培养基的愈伤组织诱导效果较好,诱导率为81.8%,小鳞茎与丛芽的诱导率也达到了25%。可见,采用幼叶作外植体,适宜的的培养基为MS+6-BA 20 mg/L+NAA 1 mg/L+蔗糖 30 g/L。然而,多数培养基的鳞芽诱导率极低,如W<sub>2</sub>的愈伤诱导率达85.7%,而鳞芽的诱导率为0,其原因需要进一步的研究,如何提高叶片诱导的愈伤组织形成鳞芽是进一步研究的重点。

#### 参考文献:

- [1] 裴鉴, 丁志遵. 中国植物志(第16卷第1分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 16-27.
- [2] 姚丽娟, 杨燕萍, 徐晓薇, 等. 3种观赏石蒜的离体快速繁殖 [J]. 浙江农业科学, 2009(4): 688-690.
- [3] 宗红, 陈运起, 王秀峰, 等. 大葱成熟胚培养再生植株激素浓度及配比的研究 [J]. 山东农业科学, 2006(5): 23-25.
- [4] 何盛莲, 崔党群, 陈军营, 等. 小麦幼胚培养特性对外源物质响应的研究 [J]. 西北农业学报, 2006, 15(2): 49-53.
- [5] 邓小敏, 雷家军, 薛晟岩. 君子兰种子的离体培养研究 [J]. 北方园艺, 2008(2): 201-203.
- [6] 王光萍, 陈英, 周坚, 等. 长筒石蒜鳞片诱导和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(4): 457-460.
- [7] 张延龙, 徐炎, 王洁纯, 等. 东方百合叶片组织培养研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(1): 47-50.
- [8] 张慧英, 薛延军, 张耀华, 等. 射干叶片愈伤组织诱导及植株再生研究 [J]. 中药材, 2010, 33(2): 176-178.
- [9] 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.
- [10] 刘志高, 童再康, 储家森, 等. 乳白石蒜组织培养 [J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(3): 347-350.
- [11] 龙祥友, 孙长生. 稻草石蒜的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(12): 1207-1208.
- [12] 王清, 彭菲, 肖艳. 黄花石蒜的组织培养和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(2): 259-259.
- [13] 王玉英, 高新一. 植物组织培养技术手册 [M]. 北京: 金盾出版社, 2006: 55-60.