安徽石蒜组培快繁体系的建立

姜自红 (滁州职业技术学院食品与环境工程系,安徽滁州 239000)

摘要 [目的] 建立安徽石蒜组织培养体系。[方法] 将直径3~4 cm的鳞茎切成数块带鳞茎盘的双鳞片作为外植体,通过消毒、诱导生芽、增殖、生根过程建立组织培养体系。[结果] 鳞茎外植体用0.1%氯化汞溶液进行二次灭菌后接种效果最好。最适宜的芽诱导培养基为MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L+白糖30 g/L,最适增殖培养基为MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L+白糖30 g/L,最适生根培养基为1/2MS+NAA 0.5 mg/L+白糖30 g/L,生根小鳞茎在泥炭∶蛭石=7∶3的介质中成活率达93.3%。[结论] 该研究可为提供大量的安徽石蒜组培苗提供技术基础。

关键词 安徽石蒜;鳞茎;组织培养
中图分类号 S604+.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)31-0085-03

The Rapid Propagation System of *Lycoris anhuiensis* in Anhui

JIANG Zi-hong (Food and Environmental Engineering Department, Chuzhou Vocational and Technical College, Chuzhou, Anhui 239000)

Abstract [Objective] To establish a tissue culture system of *Lycoris anhuiensis*. [Method] The bulbs with a diameter of 3-4 cm were cut into several scales with bulbs as explants, and the tissue culture system was established by disinfection, induction of sprouting, proliferation and rooting. [Result] Bulb explants were best inoculated with 0.1% mercuric chloride solution after secondary sterilization. The most suitable bud induction medium was MS+6-BA 3 mg/L + NAA 0.5 mg/L + white sugar 30 g/L. The optimal proliferation medium was MS+6-BA 3 mg/L+ NAA 0.5 mg /L + white sugar 30 g/L, the most suitable medium for rooting was 1/2MS + NAA 0.5 mg/L + white sugar 30 g/L. The domesticated seedlings had a survival rate of 93.3% in a medium with peat∶vermiculite=7∶3. [Conclusion] The research could provide a technical basis for providing a large number of *L. anhuiensis* tissue culture seedlings.

Key words *Lycoris anhuiensis*; Bulb; Tissue culture

DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2018.31.026

石蒜属(*Lycoris* Herb)隶属石蒜科(Amaryllidaceae),具有丰富的花型[1],如大花型和小花型;皱瓣、平瓣、宽瓣和窄瓣;百合型和长筒型等,花后冬春季又可观叶,有着极高的观赏价值[2],很早以前就受到人们的喜爱,目前石蒜、乳白石蒜、忽地笑、爱斯石蒜、香石蒜等11种已实现商品化生产[3]。李淑顺等[4]以灰色关联度对14种石蒜属花卉的观赏性状进行了评价,结果表明安徽石蒜(*Lycoris anhuiensis*)排在第2,观赏效果好。但目前安徽石蒜多处于野生状态[5],资源稀缺,以自然分球法繁殖的繁殖速度慢,繁殖系数相当低;种子难以正常成熟,自然结实率不高[6],种子成熟度差,限制了其在园林中的推广应用,解决种球快速繁殖问题是安徽石蒜产业化开发的关键[7]。笔者以鳞茎为外植体,对安徽石蒜的组培快繁技术进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料 安徽石蒜鳞茎,取材于安徽琅琊山。

1.2 方法

1.2.1 不同预处理及消毒方法对石蒜鳞茎外植体成活率的影响。选取生长健壮、直径3~4 cm、大小基本一致的鳞茎,剥除外层褐色皮膜,在流水下冲洗1~2 h,将冲洗干净的鳞茎切去顶端。

预处理方法:选取冷藏0(对照)、7、21、35、49 d处理方式。

消毒方法:先用0.1%氯化汞消毒10 min,再根据切球后是否进行0.1%氯化汞二次消毒1 min设置2种处理,接种21 d后记录每种处理的接种数及污染数。接种培养基为MS+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+白糖30 g/L。

1.2.2 不同激素及浓度配比对不定芽诱导的影响。将经预处理后的安徽石蒜鳞茎切成带基盘的双层或三层鳞片,消毒后接种在MS培养基上,对不同植物生长调节剂6-BA和NAA的不同浓度配比进行筛选。每个处理接种10个外植体,重复3次,将鳞片接种后,每隔3 d观察1次,50 d后统计不定芽诱导率,不定芽诱导率=分化不定芽的外植体数/接种的外植体数×100%。

1.2.3 不同激素及浓度配比对小鳞茎扩繁增殖的影响。经过初代培养,以筛选出的最佳培养基为基础,对6-BA、NAA、2,4-D进行不同浓度组合试验,35 d后分别记录每组处理小鳞茎的增殖情况。重复3次,以筛选出最佳增殖培养基,增殖倍数=诱导不定芽总数/接种不定芽总数。

1.2.4 不同培养基对小鳞茎生根的影响。将长势较好的小鳞茎转入含不同激素及浓度的生根培养基中进行生根培养,对小鳞茎的最佳生根条件进行研究。

1.2.5 不同土壤条件对生根苗移栽成活率的影响。按朱景存等[8]的方法,将经过处理的生根幼苗分别移植于营养土和掺蛭石10%、30%、50%、70%的营养土中,每个处理5盆,每盆3株,常规管理,30 d后统计成活率,成活率=成活数/驯化株数×100%。

2 结果与分析

2.1 鳞茎不同预处理方法比较 有研究认为石蒜鳞茎为内生菌[9],彻底灭菌较为困难,试验设计了预处理及二次灭菌。从表1可以看出,石蒜鳞茎经过预处理后,明显降低了污染率,尤其是经二次消毒后,污染率为0,效果非常显著,但同时也出现了外植体干褐的现象。该试验鳞茎球冷藏效果比较

基金项目 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2016A539);滁州职业技术学院院级科技创新团队项目(YJCXTD-2017-01);安徽省高校优秀青年骨干人才国内外访学研修项目(gxfx2017223);滁州职业技术学院教学质量与教学改革工程"园林技术优秀教学团队"项目(2017zlgc007)。

作者简介 姜自红(1979—),女,山东临沂人,副教授,硕士,从事园林植物栽培及应用研究。

收稿日期 2018-07-30

好的是冷藏 21 d 的处理。综合分析得出石蒜鳞茎的最佳灭菌方式为冷藏 21 d 后，用 0.1%氯化汞溶液处理10 min，无菌水冲洗 4～5 次，切成双鳞片后再用 0.1%氯化汞溶液处理 1 min，无菌水冲洗 4～5 次。

表 1 鳞茎不同预处理方法比较

Table 1 Comparison of different pretreatment methods for bulbs

序号 Number	冷藏处理 Refrigerated treatment//d	氯化汞消毒时间 Disinfection time of mercury chloride//min	氯化汞二次消毒时间 Secondary disinfection time of mercuric chloride//min	接种数 Inoculation number 块	污染率 Pollution rate//%	备注 Remarks
1	0	10	0	120	40	—
2	0	10	1	120	20	—
3	7	10	0	120	20	—
4	7	10	1	120	0	—
5	21	10	0	120	10	—
6	21	10	1	120	5	—
7	35	10	0	120	10	—
8	35	10	1	120	0	外植体干褐
9	49	10	0	120	10	—
10	49	10	1	120	0	外植体干褐

2.2 不同浓度组合对双鳞片出芽影响的双因素试验 将双鳞片接种到 A_1～A_8 培养基中，发现鳞片于 28 d 开始出现向内侧卷曲发绿的情况(图 1)。不同部位的外植体，其卷曲程度亦有所差别，随后长出白色的生长点，侧芽由白变绿(图 2)，诱导过程中没有愈伤组织出现。由表 2 可知，双鳞片外植体的诱导率总体偏低，最高 A_4 培养基中也仅 33.3%，其中 A_1 培养基的不定芽诱导率最低，其长出的侧芽量也最少，不定芽长势最差，其次是 A_2 和 A_3 培养基。因此，MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+白糖 30 g/L 为不定芽诱导的最佳培养基。

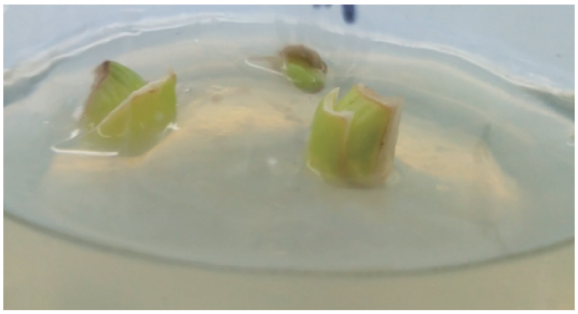

图 1 接种 35 d 的双鳞片

Fig.1 Double-scaled tablets inoculated for 35 days

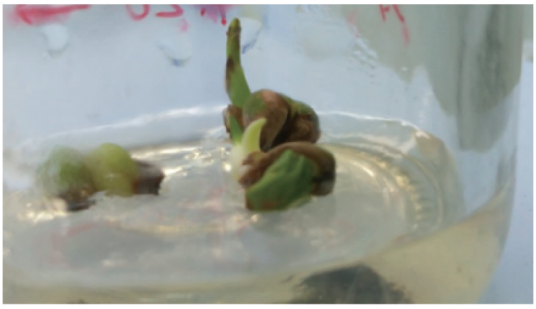

图 2 在 A_4 培养基上接种 56 d 的侧芽

Fig.2 Inoculation of 56 d lateral buds on A_4 medium

表 2 6-BA 和 NAA 配比对双鳞片诱导率的影响

Table 2 Effect of 6-BA and NAA ratio on the induction rate of double scales

培养基编号 Medium number	6-BA mg/L	NAA mg/L	接种双鳞片总数 Inoculated double-scaled tablets	诱导不定芽总数 Total number of induced adventitious buds	诱导率 Induction rate %
A_1	1	0.5	30	3	10.0
A_2	1	0.3	30	5	16.7
A_3	3	0.1	30	5	16.7
A_4	3	0.5	30	10	33.3
A_5	5	0.3	30	8	26.7
A_6	5	0.1	30	8	26.7
A_7	8	0.5	30	6	20.0
A_8	8	0.3	30	8	26.7

2.3 鳞茎不定芽的增殖情况 将诱导形成的带不定芽的石蒜鳞茎切割转至增殖培养基，经观察发现，20 d 后各培养基上乳白色的不定芽陆续开始形成，同时，部分双鳞片间还有石蒜叶长出(图 3)。由表 3 可知，增殖倍数均较低，其中 B_1 和 B_3 培养基的平均增殖倍数最低，其芽的长势也较差，增殖倍数相对最高的是 B_6 培养基，其增殖倍数为 1.83。确定 B_6

图 3 在 B_6 培养基上增殖 28 d 的鳞茎生长结果

Fig.3 Growth results of proliferation on B_6 medium for 28 days

培养基为最优不定芽增殖培养基，即 MS+6-BA 3 mg/L+NAA 1.0 mg/L+白糖 30 g/L。

2.4　不同培养基对小鳞茎生根的影响　从表 4 可以看出，C_6 培养基即 1/2MS+NAA 2.0 mg/L+白糖 30 g/L 为最佳生根培养基。在一定浓度范围内，不定根的诱导率会随着 NAA 含量的增加而增加，且不定根的长势也较好。

表 3　不同激素浓度组合对不定芽增殖的影响

Table 3　Effect of different hormone concentration combinations on adventitious bud proliferation

培养基编号 Medium number	6-BA mg/L	2,4-D mg/L	NAA mg/L	接种不定芽总数 Total number of inoculated adventitiousbuds	诱导不定芽总数 Total number of induced adventitious buds	增殖倍数 Proliferation times
B_1	1	0	0.5	18	20	1.11
B_2	1	0.5	0	18	21	1.17
B_3	3	0	0.5	18	20	1.11
B_4	3	0.5	0	18	28	1.56
B_5	3	1.0	0	18	27	1.50
B_6	3	0	1.0	18	33	1.83
B_7	5	1.0	0	18	31	1.72
B_8	5	0	1.0	18	30	1.67

表 4　不同培养基对小鳞茎生根的影响

Table 4　Effect of different mediums on rooting

培养基编号 Medium number	基本培养基 Basic medium	NAA mg/L	平均根长 Average root length cm	根的生长情况 Root growth
C_1	MS	0.5	2.72	根生长较短
C_2	MS	1.0	3.23	根粗细不均匀
C_3	MS	2.0	3.24	根粗细不均匀
C_4	1/2MS	0.5	3.20	根生长较少
C_5	1/2MS	1.0	3.31	根生长较多
C_6	1/2MS	2.0	3.35	根生长较多，粗壮

2.5　炼苗与移栽　石蒜属植物多耐旱、耐贫瘠、易管理[10]，驯化时保持基质湿润即可。一般移入基质中几天后，外层叶片会逐渐变黄、枯萎，呈现出与休眠期叶片变化相似的现象，同时从鳞茎中心处又抽出新的叶子。驯化 30 d 后记录的成活结果见表 5，经过炼苗的组培苗移栽后最高成活率为 93.3%。

表 5　不同栽培基质驯化结果

Table 5　Domestication results of different culture substrates

基质编号 Substrate number	基质配方 Substrate formula	驯化株数 Domesticated plants	成活率 Survival rate//%
D_1	泥炭∶蛭石=9∶1	15	86.7
D_2	泥炭∶蛭石=7∶3	15	93.3
D_3	泥炭∶蛭石=1∶1	15	86.7
D_4	泥炭∶蛭石=3∶7	15	80.0

3　结论与讨论

此次研究完成了安徽石蒜植物组培体系的构建，鳞茎球冷藏处理可以降低污染率，其中 21 d 冷藏污染率低。最适合的消毒方法为 0.1%氯化汞消毒 10 min，无菌水冲洗 4~5 次，鳞片处理好后再用 0.1%氯化汞处理 1 min，无菌水冲洗 4~5 次。初代培养中，最佳诱导不定芽的培养基为 MS+6-BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L+白糖 30 g/L，卡拉胶 5.5 g/L，pH 5.8，与刘志高等[11]研究报道的乳白石蒜带基盘双鳞片诱导不定芽的最佳培养基一致。继代培养中，不定芽增殖倍数最高的培养基为 MS+6-BA 3 mg/L+NAA 1.0 mg/L+白糖 30 g/L，卡拉胶 5.5 g/L，pH 5.8；最佳生根培养基为 1/2MS+NAA 2 mg/L+白糖 30 g/L，卡拉胶 5.5 g/L，pH5.8。出瓶苗在泥炭∶蛭石=7∶3的介质中成活率达 93.3%。在鳞茎不定芽诱导过程中发现，较高的 6-BA 含量有利于促进不定芽的形成，6-BA 含量超过 3 mg/L 后启动较容易。该研究为安徽石蒜组培苗规模化、工厂化生产提供了理论依据和基础数据支撑。

参考文献

[1] 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.

[2] TAE K H，KO S C.A taxonomic study on epidermal haracters of the genus Lycoris in Korea[J].Kor Plant Tax，1995，25(3)：177-193.

[3] 江燕，朱炜，章银柯.石蒜属植物资源及其在园林中的应用(综述)[J].亚热带植物科学，2009，38(3)：79-82.

[4] 李淑顺，赵九洲，袁娥.几种石蒜属花卉观赏性状的灰色评价[J].徐州师范大学学报(自然科学版)，2004，22(1)：69-72.

[5] 张宇和.我国最早栽培的球根花卉——石蒜[J].武汉园林，1996，26(1)：14-15.

[6] 訾兴中.琅琊山植物志[M].北京：中国林业出版社，1999：190-194.

[7] 张露，曹福亮.石蒜属植物栽培技术研究进展[J].江西农业大学学报，2001，23(3)：375-378.

[8] 朱景存，张玉琼，刘春池，等.石蒜组织培养和植株再生的研究[J].生物学杂志，2010，27(6)：46-48.

[9] 高燕会，童再康，朱婷.两种石蒜属植物组培快繁体系的建立[C]//张启翔.中国观赏园艺研究进展(2015).北京：中国林业出版社，2015：317-321.

[10] 余本祺，周守标，罗琦，等.石蒜属植物的药用和观赏利用前景[J].中国野生植物资源，2006，25(4)：29-32.

[11] 刘志高，童再康，储家淼，等.乳白石蒜组织培养[J].浙江林学院学报，2006，23(3)：347-350.