

‘宜兴百合’珠芽不定芽诱导和增殖条件的研究

李翠花, 吴震*, 杨芸, 龙玉娟

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 以‘宜兴百合’珠芽作为外植体,研究了不同植物生长调节剂及其浓度配比和不同切割方式对珠芽不定芽诱导的影响,探讨了继代方式对不定芽增殖的影响。结果表明:0.2 mg/L NAA 和 1.5 mg/L 6-BA 组合对珠芽不定芽的诱导效果较好,不定芽诱导率和分化系数分别为 93.8% 和 5.32;珠芽单个鳞片的下半部分作为外植体,不定芽诱导率和分化系数分别为 87.5% 和 4.11;将初代培养获得的丛生芽直接接种,增殖系数较高,可获得大量的试管鳞茎。

关键词: ‘宜兴百合’; 珠芽; 不定芽; 增殖; 组织培养

中图分类号: S644.1; Q813.1 **文献标识码:** A

Study on inducing and proliferating conditions of adventitious buds from bulblets of ‘Yixing lily’

LI Cui-hua, WU Zhen*, YANG Yun, LONG Yu-juan

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Bulblets of ‘Yixing lily’ were used as explants to study effects of different combinations and concentrations of plant growth regulators and cutting ways on inducing adventitious buds from the bulblets, and effects of subculture ways on the proliferation of adventitious buds were also discussed. The results showed that the combination of 0.2 mg/L NAA and 1.5 mg/L 6-BA had a better effect on inducing adventitious buds from bulblets, and the inductivity and differentiation coefficient were 93.8% and 5.32, respectively. When the bottom part of single bulblet leaf was used as an explant, the inductivity and differentiation coefficient were 87.5% and 4.11, respectively. Subculturing the fasciculate buds without cutting could get a higher proliferation coefficient and a large number of test-tube bulbs.

Key words: ‘Yixing lily’; Bulblet; Adventitious bud; Proliferation; Tissue culture

‘宜兴百合’别名虎皮百合,分类学上定名为卷丹(*Lilium lancifolium* Thunb),是我国四大食用百合之一。‘宜兴百合’原产太湖一带的湖州和宜兴,有太湖参的美誉^[1,2]。‘宜兴百合’靠鳞茎进行无性繁殖,繁殖系数低,还常因病毒感染导致种性退化。已有利用组织培养技术进行百合繁殖的报道^[3-7],不仅繁殖系数高,还可周年进行,并能克服病毒感染,提高鳞茎产量和质量。

百合组织培养通常以鳞茎作为外植体,但鳞茎是地下器官,带菌较多,消毒困难,多次继代常出现内生菌导致的污染。‘宜兴百合’具有在地上茎叶腋处着生珠芽的特性,珠芽内生菌较少,可作为外植体的重要来源。本研究以珠芽为外植体,研究不定芽发生和增殖的条件,探讨百合组培苗培育的新途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为‘宜兴百合’(江苏宜兴产)。2005年10月将鳞茎播于南京农业大学玻璃温室内,2006年7月取百合植株的珠芽用于试验。

收稿日期:2007-03-05 初稿;2008-01-29 二改稿

基金项目:南京市科技招标项目(2004-02008-1);南京农业大学 SRT 计划项目(0303A01)资助

作者简介:李翠花(1981-),女,硕士研究生,主要从事植物组织培养研究

* 通讯作者, E-mail: zpzx@njau.edu.cn; Tel: (025)84396251

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 选取植株叶腋处饱满光亮、大小一致的珠芽作为外植体,将整个珠芽置于饱和洗衣粉水溶液中浸泡 30 min 后流水冲洗 2 h。然后于 75% 酒精中浸泡 20 s, 无菌水冲洗 3 次, 再于 0.1% HgCl₂ 溶液中浸泡 12 min, 无菌水冲洗 4 次后备用。

1.2.2 不同植物生长调节剂及浓度对比对不定芽诱导的影响 将消毒后的珠芽分成单个鳞片并横切, 取其下部约 0.5~0.8 cm² 大小的切块, 近轴面向上接种于添加不同植物生长调节剂的 MS 培养基中进行不定芽诱导(表 1, 图版 A)。每个处理重复 3 次, 每个重复 48 个外植体。培养过程中观察百合珠芽不定芽诱导情况, 接种 40 d 后统计不定芽诱导率和分化系数。

1.2.3 切分方式对珠芽不定芽诱导的影响 外植体采用以下 5 种切分方式:(1)整个珠芽;(2)单个珠芽鳞片;(3)鳞片近轴面表皮划伤(简称划伤);(4)在鳞片中部横切取其上部(简称 1/2 上)和下部(简称 1/2 下);(5)鳞片纵横切分为 4 块并按其原位置分为上部(简称 1/4 上)、下部(简称 1/4 下)。除整个珠芽以其形态学下端接种外, 其余均以近轴面向上的方式接种于诱导培养基(MS + NAA 0.2 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L)中。每个处理重复 3 次, 每个重复 40 个外植体。培养过程中观察珠芽不定芽发生情况, 接种 40 d 后统计不定芽诱导率和分化系数。

1.2.4 继代方式对不定芽增殖的影响 将初代培养获得的试管苗分别以带外植体丛生芽(简称为丛生芽)、将丛生芽切分为单芽(简称单芽)接种于继代培养基(MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + 1% 活性炭)中, 每个处理重复 3 次, 每个重复接种 36 株试管苗。培养过程中观察试管苗的长势, 接种 40 d 后统计增殖系数。

以上培养基均附加 6 g/L 琼脂粉, 30 g/L 蔗糖, pH 5.8。培养室温度为(25 ± 1) °C, 光照强度 2 000 lx, 光照周期 12 h/d。数据统计分析使用 EXCEL 和 SPSS 软件。

诱导率、分化系数和增殖系数计算公式如下:

诱导率(%) = 分化不定芽的外植体数/接种的外植体总数 × 100

分化系数 = 外植体再生不定芽总数/分化不定芽的外植体总数

增殖系数 = 试管苗形成的腋芽总数/接种的不定芽总数

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂及浓度对比对百合珠芽不定芽诱导的影响

在 NAA 和 6-BA 组合的培养基上, 4~5 d 后珠芽开始变色, 其远轴面由黑紫色转为深绿色, 近轴面转为黄绿色, 在切口处逐渐形成绿色突起, 20 d 后形成大量不定芽并开始抽生叶片成苗, 少量试管苗基部可形成 1~2 条白色短粗根(图版 B)。而在 2,4-D 和 6-BA 组合的培养基上, 珠芽变色所需时间较长, 约 6~7 d, 珠芽近轴面转为黄色, 远轴面仍为黑紫色, 接种 25 d 后开始出现芽点, 并在珠芽近轴面出现大量白色泡状突起。结果表明, NAA 和 6-BA 组合的诱导培养基, 珠芽不定芽的诱导率均显著高于 2,4-D 和 6-BA 的组合, 试管苗长势良好, 说明 NAA 更有利于诱导百合鳞片分化。其中以 MS + NAA 0.2 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L 培养基中外植体不定芽诱导率与分化系数最高, 植株长势最好(表 1, 图版 B)。

表 1 不同植物生长调节剂及浓度对比对珠芽不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of different combinations and concentrations of plant growth regulators on inducing adventitious buds from bulblets

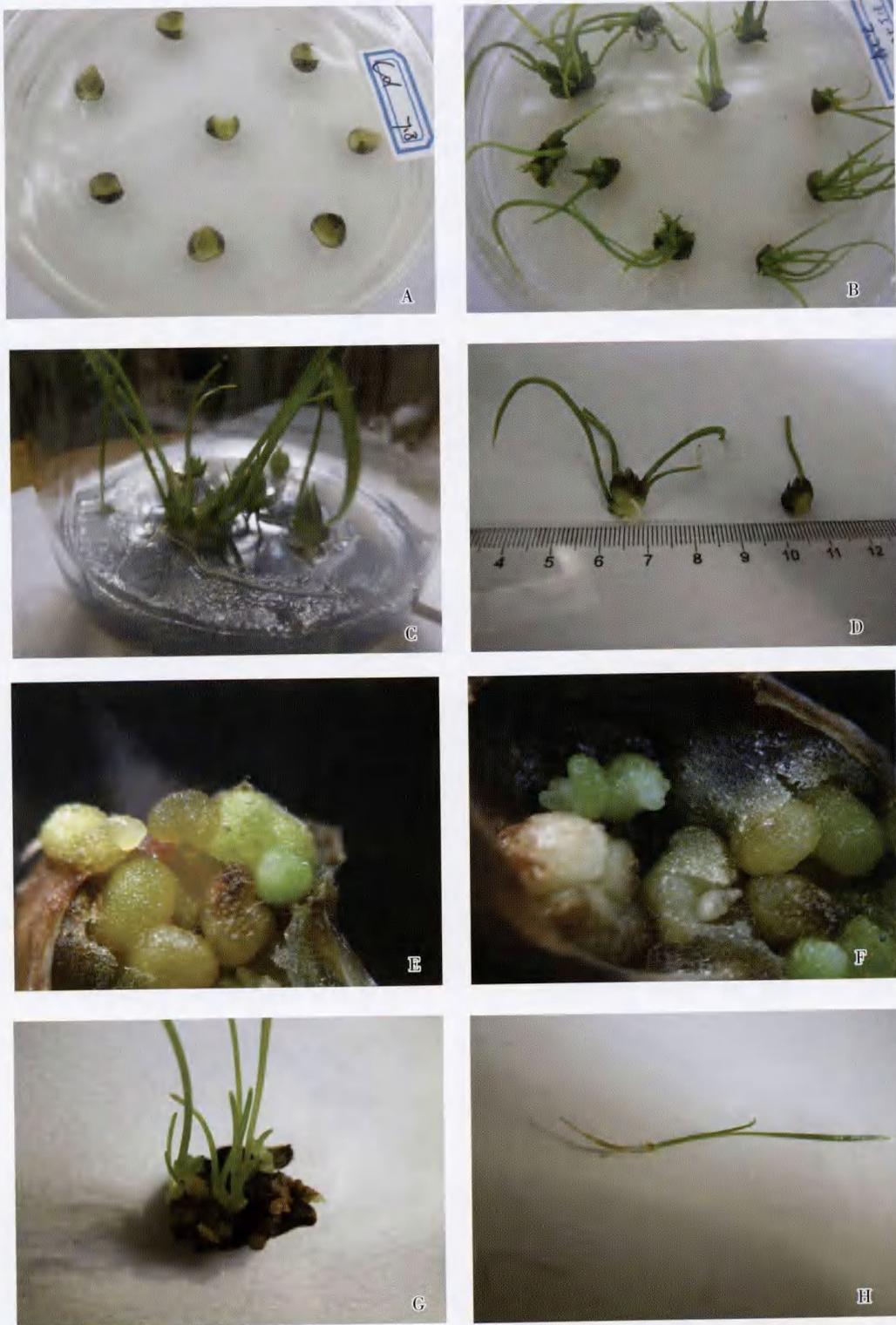
培养基 编号 Medium no.	植物生长调节剂浓度 /mg · L ⁻¹ Plant growth regulator			诱导率 /% Inductivity	分化系数 Differentiation coefficient	试管苗状态 State of test-tube plantlets
	NAA	2,4-D	6-BA			
1	0.1	0	1.0	91.7a	3.02b	生长整齐, 抽生叶片较长, 色浓 Growing evenly, long pullulated leaves, dark green
2	0.15	0	0.75	83.3ab	3.53b	生长整齐, 抽生叶片较长, 色浓 Growing evenly, long pullulated leaves, dark green
3	0.2	0	1.5	93.8a	5.32a	生长整齐, 抽生叶片较长, 色浓 Growing evenly, long pullulated leaves, dark green
4	0	2.0	0.5	64.6bc	3.45b	芽较小, 没有抽生叶片, 色浅 Small buds, no pullulated leaf, light green
5	0	4.0	0.5	50.0c	3.85b	芽较小, 有畸形芽, 没有抽生叶片 Small buds and some malformed, no pullulated leaf

注: 同一列内不同小写字母表示 Duncan's 分析中在 0.05 水平差异显著(以下各表同)。

Notes: Data followed by different letters in the same column are significantly different at $P = 0.05$ according to Duncan's test; The same below.

2.2 不同切割方式对珠芽不定芽诱导的影响

不同切割方式的外植体在接种后 7 d 左右均可转为绿色。以整个珠芽作为外植体时, 直接抽生叶片



图版说明: A—接种方式; B—百合珠芽直接再生的不定芽; C和 D—继代后获得的试管苗及试管鳞茎; E和 F—百合珠芽直接产生胚性结构 $\times 20$; G和 H—体胚萌发及获得的再生植株

Explanation of plate: A—methods of inoculation; B—adventitious buds regenerated directly from bulblets; C and D—test-tube plantlets and test-tube bulbs obtained by subculture; E and F—embryonic tissue regenerated directly from bulblets $\times 20$; G and H—germination of somatic embryos and somatic embryo-derived plantlet

并生根,未见不定芽发生。以珠芽的单个鳞片作外植体时,接种 4 d 后有不定芽形成,不定芽出现最早。以珠芽的 1/4 上部、1/4 下部作为外植体,接种后褐变较为严重。以 1/4 上部作外植体有褐变死亡的现象,说明外植体的大小及其营养状况会影响不定芽诱导率。对珠芽鳞片近轴面表皮划伤处理后,可在其内部形成大量的芽点,而其他处理的不定芽多集中发生在外植体形态学下端边缘的切口处。对珠芽进行切分处理(划伤、1/2 切分、1/4 切分)的分化系数均高于单个鳞片直接接种,其中又以 1/4 切分化系数最高。

说明对外植体进行一定程度的切割刺激可以显著促进不定芽的发生。虽然 1/4 上和 1/4 下切分的外植体分化系数显著高于其他处理,但 1/4 切分诱导率显著低于其他处理,且再生试管苗质量较差,主要表现为芽体细弱,色泽较浅。综合分析,1/2 下诱导率、分化系数均较高,且再生试管苗植株健壮、生长整齐(表 2)。因此,以珠芽鳞片下部 1/2 作为外植体进行不定芽诱导较合适。

表 2 切割方式对珠芽不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of different cutting ways on the induction of adventitious buds from bulblets

外植体切割方式 Way of cutting explant	诱导率/% Inductivity	分化系数 Differentiation coefficient	试管苗状态 State of test-tube plantlets
整个珠芽 Whole bulblet	—	—	珠芽直接抽生叶并长根 Bulblets pullulated directly and rooted
单个鳞片 Single bud scale	92.5a	2.07d	生长较整齐,抽叶较长,色浓绿 Shoots grew evenly, and pullulated leaves were comparatively long and dark green in color.
划伤 Incised wound	90.0a	3.29dc	生长不整齐,外植体边缘较内部发生不定芽早 Shoots grew irregularly, and buds on the edges of explants occurred earlier than those on the inside
1/2 上 1/2 of upper part	67.5c	2.83dc	生长较整齐,叶片嫩绿 Shoots grew evenly, and leaves presented light green
1/2 下 1/2 of lower part	87.5ab	4.11bc	生长较整齐,叶片嫩绿 Shoots grew evenly, and leaves presented light green
1/4 上 1/4 of upper part	37.5d	4.71ab	芽细弱,较小,色浅 Buds were small, weak and light in color
1/4 下 1/4 of lower part	40.0d	5.94a	芽细弱,较小,色浅 Buds were small, weak and light in color

2.3 继代方式对珠芽不定芽增殖的影响

丛生芽直接转接,其增殖系数显著高于单芽转接(表 3),试管苗长势较好,继代后多数试管苗基部可以形成小鳞茎,并有短粗根发生(图版 C),小鳞茎直径可达 0.8 cm 左右(图版 D)。由于‘宜兴百合’试管苗是通过其鳞片间腋芽的萌发进行增殖,而初代培养获得的单芽营养体有限,不定芽多数较为弱小,继代时一般先进行自身生长、鳞茎形成和膨大,且继代分离易造成机械损伤。而以丛生芽直接转接可以避免切割损伤,鳞茎膨大较快。因此,在试管苗第一次继代时应以丛生芽方式转接为好。

表 3 继代方式对珠芽不定芽增殖的影响

Table 3 Effects of subculture ways on proliferation of adventitious buds from bulblets

继代方式 Subculture way	增殖系数 Proliferation coefficient	试管苗状态 State of test-tube plantlets
单芽 Single bud	1.5b	苗较弱,基部形成的小鳞茎较小 Shoots were weak, and bulblets formed on the basal part were small
丛生芽 Clump buds	6.0a	芽苗大小不均匀,有的抽叶,基部形成小鳞茎,有的则为芽点 Shoots grew irregularly; Some had leaves and formed bulblets on the basal part, and some had buds only

3 讨论

赵祥云等^[3]在百合珠芽组培及脱毒的研究中发现,NAA 比 2,4-D 更有利于不定芽发生,本试验中也得到了同样的结果。王刚等^[4]发现 BA : NAA 介于 5 : 1 到 10 : 1 之间,对兰州百合鳞片诱导率较高。本试验诱导培养基中的 BA : NAA 介于 5 : 1 到 10 : 1 之间,珠芽不定芽诱导率差异不显著,但均在 80% 以上。张丕芳等^[8]在百合鳞片离体诱导小鳞茎发生的研究中发现,NAA 0.2 mg/L 配合 6-BA 2.0 mg/L 诱导百合鳞片分化的小鳞茎起源于培养组织的表层细胞,即外起源,类似于一般的不定芽起源。以 2,4-D 结合 6-BA 诱导分蘖体细胞胚的切片观察发现,胚状体起源于愈伤组织表层及以下细胞^[9]。本试验中,添加 2,4-D 的培养基中外植体未见愈伤组织发生,外植体诱导率较低,但其分化系数较高,可能是由于 2,4-D 作用强度高于 NAA,刺激了表层及其以下细胞的分化,有待于进行组织解剖观察证实。王洪隆等^[10]提出百合科植物愈伤发生需要高浓度的 2,4-D,但在本试验中以珠芽作为外植体接种于含 2,4-D 的 2 种诱导培养基中培养 40 d 后,外植体明显膨大,在近轴面内部形成白色气泡状结构,未形成愈伤组织。当 2,4-D 浓度提高为 4.0 mg/L 时,开始有畸形芽形成。这可能因为试验材料不同,导致离体再生途径发生了改变。上述培养材料经转接继代后,白色气泡状结构变为黄色颗粒状的胚性结构(图版 E, F),并能进一步发育为完整的植株(图版 G, H)。表明‘宜兴百合’珠芽作为外植体时,植株再生方式以器官型为

主,不易发生愈伤组织。同时也表明珠芽作为外植体时,通过体细胞胚胎发生途径获得再生植株,所需时间较器官发生途径所需时间更长。

本研究以整个珠芽作为外植体进行培养,珠芽直接抽生叶片并生根,没有不定芽发生。而郭海滨等^[5]在卷丹百合组织培养中发现,以整个珠芽作为外植体,不定芽诱导率为90%,造成这一差异的原因有待于进一步研究。试验中,不定芽多发生在外植体形态学下端,且珠芽下部的诱导率高于上部。这与鳞茎、根、叶片等作为外植体时不定芽的发生情况一致,表现出了类似百合鳞茎鳞片培养的位置效应^[6]。Robb^[7]指出,百合鳞片培养产生的细胞形态建成频率和类型,取决于发生外植体原有的部位,鳞茎中、下部分的诱导率高于上部。已有研究表明,鳞片中下部内源生长促进物质(IAA、CTK、GA)含量高于上部,而生长抑制物质(ABA)含量低于上部。不同部位分化能力的差异与二者的相对含量有关,并受二者的平衡调控^[11,12]。由此推测,珠芽的不同部位可能也存在内源激素含量上的差异。另外,百合珠芽离体再生不定芽的过程是细胞旺盛分裂的过程,珠芽鳞片下部比上部肥厚,下部比上部有较强的分化不定芽能力,也可能与外植体的营养状况有关。

褐变是由外植体的切口表面渗出的酚类物质氧化后成为醌类物质,使培养基变成褐色,从而对组织产生毒害作用的现象^[13]。褐变在植物组织培养过程中普遍存在,是植物组织培养发展的一大障碍。目前认为植物组织培养中的褐变多为酶促褐变,因此褐变的发生与外植体组织中酚类物质的含量及多酚氧化酶的活性有直接的关系。影响褐变的因素有:植物材料的基因型、年龄、取材部位、取材时期、外植体的大小和受伤害程度以及其他一些培养条件等^[14-17]。在本试验中,发现以珠芽作1/4切分时外植体褐变较严重,取珠芽1/4上部为外植体时甚至有外植体褐变死亡的情况。其原因一方面可能是与百合本身有关。有研究报道,百合鳞茎储藏过程中很容易发生酶促褐变,鳞茎组织内的PPO、POD起了重要的作用,褐变度与PPO、POD的活性呈正相关,其中POD活性的变化是引起褐变的主要因素^[18]。百合鳞片、叶片组培中也均有褐变现象发生^[19,20]。另一方面,可能是珠芽作1/4切分处理对外植体伤害较严重,外植体过小,与氧气接触面积大,更容易发生褐变。此外,珠芽上部营养状况较差也可能促进褐变发生,所以珠芽1/4上部为外植体褐变情况最严重。

在诸多百合组织培养的文献报道中,多采用百合鳞片作为外植体。但鳞茎是百合的地下贮藏器官,体内存在内生菌不仅造成在初代培养中外植体消毒困难,而且在长期的继代过程中容易出现内生菌引起的污染^[8,21]。珠芽是地上部分,表面光滑,因此,取用‘宜兴百合’叶腋着生的珠芽作外植体,较鳞茎更容易消毒,也可避免继代过程中内生菌造成的污染。

参 考 文 献

- [1] 周权军. 百合种植技术[M]. 南京: 江苏科学出版社, 1984.
- [2] 金波. 中国多年生蔬菜[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [3] 赵祥云, 程廉, 邢尤美, 等. 百合珠芽组培及脱毒研究[J]. 园艺学报, 1993, 20(3): 284-288.
- [4] 王刚, 杜捷, 李桂英, 等. 兰州百合和野百合组织培养及快速繁殖研究[J]. 西北师范大学学报, 2002, 38(1): 69-71.
- [5] 郭海滨, 雷家军. 卷丹百合鳞片及珠芽组织培养[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 72-74.
- [6] 龙春林, 程治英, 王俐, 等. 兰州百合器官离体培养外植体位置效应观察[J]. 云南植物研究, 2004, 26(2): 221-225.
- [7] Robb SM. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* [J]. J Exp Bot, 1957(8): 348-352.
- [8] 张丕芳, 倪德祥, 王富民, 等. 百合离体培养诱导小鳞茎发生的研究[J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(2): 177-182.
- [9] 张松, 李纪蓉, 李滨, 等. 分蘖组织培养体细胞胚胎发生的研究[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 264-268.
- [10] 王洪隆, 康玉庆, 张存金. 大蒜发芽叶培养体细胞胚发生[J]. 华北农学报, 1994, 9(1): 92-94.
- [11] 杨成德, 种康. 植物内源激素对兰州百合不同部位分化的影响[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1988, 24(3): 95-99.
- [12] 金淑梅, 杨利平, 吕品, 等. 细叶百合中内源激素的变化[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(1): 20-22.
- [13] 李凌明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 270.
- [14] 黄海波, 淡明, 郭安平, 等. 植物组织培养中存在的主要问题与对策[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 2632-2633, 2894.
- [15] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 501-506.
- [16] Rasmus Bro, Hanne Heimdal. Enzymatic browning of vegetables. Calibration and analysis of variance by mutiway methods [J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1996, 34(1): 85-102.
- [17] 李万德, 杜桂, 张剑. 植物组织培养实验中存在的问题及其解决办法[J]. 湖北生态工程职业技术学院学报, 2006, 2(4): 11-12.
- [18] 蒋益虹. 百合褐变与多酚氧化酶和过氧化物酶活性关系的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003, 29(5): 518-522.
- [19] 王丽娟, 樊金萍, 车代弟. 卷丹百合组培快繁技术的研究[J]. 国土与自然资源研究, 2006(2): 94-95.
- [20] 冷肖荀, 王青华. 外植体和培养因子对百合不定芽诱导的影响[J]. 河北林业科技, 2000(1): 1-2.
- [21] 罗丽萍, 杨柏云, 章敏华, 等. 百合的组织培养[J]. 中草药, 2001, 32(7): 640-642.