

东方百合索邦的组织培养及鳞茎快繁研究

张永平^{1,2}, 乔永旭¹, 陈 超¹, 李艳梅¹, 赵端端¹

(1. 唐山师范学院生命科学系, 河北唐山 063000; 2. 浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310029)

摘要: 以东方百合索邦的鳞片为外植体, 对影响小鳞茎的诱导、增殖、成球等因子进行系统研究。结果表明, 鳞片不同部位诱导小鳞茎的能力从强到弱依次为基部 > 中部 > 尖部。小鳞茎诱导的最佳培养基为 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA。在一定浓度范围内, 随蔗糖和 PP₃₃₃ 浓度的增加, 小鳞茎的增殖速度加快, 二者最适浓度分别为 9% 和 15 mg/L。黑暗较光照利于小鳞茎的增殖。液体悬浮培养小鳞茎的增殖率高于固体培养。

关键词: 东方百合; 组织培养; 快繁; 鳞茎

中图分类号: S682.2⁺90.4⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1002-1302(2007)05-0120-03

东方百合是百合科百合属多年生球根类花卉, 花大美丽, 色彩丰富, 香味浓郁, 具有较高的观赏价值和经济价值, 是世界四大切花之一。我国切花产业中东方百合所占的比重越来越大, 然而其种球仍靠进口, 严重制约了我国百合鲜切花的发展^[1]。改变这种局面的主要办法是繁育大量的优质种球, 利用组织培养诱导大量的商品小鳞茎是一种快速而有效的途径^[2-4]。因此本试验采用东方百合索邦 (*Lilium oriental* “Sorbonne”) 的鳞片为外植体, 对小鳞茎的诱导、增殖及成球等因子进行系统研究, 以期建立百合小鳞茎大量繁殖的技术流程, 为国内东方百合商品种球的大量生产提供理论与技术支持。

1 材料及方法

1.1 供试材料

东方百合索邦种球由北京克劳沃公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选择及消毒 取种球中层鳞片^[5], 除去表面杂质, 在洗衣粉水中振荡 30 min, 用清水冲洗干净, 无菌条件下 70% 酒精处理 30 ~ 60 s, 0.1% 升汞消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 ~ 6 遍备用。

1.2.2 小鳞茎的诱导培养 将鳞片切成基部、中部、尖部 3 个部分, 内侧向上^[6] 嵌入诱导培养基中培

养。培养基设 4 种: (1) MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA; (2) MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA; (3) MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA; (4) MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA。添加蔗糖 3%, 琼脂 5.5 g/L, pH 值 5.8。培养条件: 温度 (25 ± 2) °C, 光照强度 2 000 lx, 光照 12 h/d。

1.2.3 小鳞茎增殖培养

1.2.3.1 蔗糖浓度对小鳞茎增殖的影响 将小鳞茎上长至 3 ~ 4 cm 的丛生芽分成单芽, 接入含有不同浓度蔗糖的增殖培养基中培养。增殖培养基为: (1) MS + 0.4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 蔗糖 3%; (2) MS + 0.4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 蔗糖 6%; (3) MS + 0.4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 蔗糖 9%; (4) MS + 0.4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 蔗糖 12%。

1.2.3.2 多效唑 (PP₃₃₃) 浓度对小鳞茎增殖的影响

将小鳞茎上长至 3 ~ 4 cm 丛生芽分成单芽, 接入 MS + 0.4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 蔗糖 9% + 琼脂 5.5 g/L 和附加不同浓度 PP₃₃₃ 的培养基中进行增殖培养, PP₃₃₃ 浓度分别为 0.5、10、15 mg/L。

1.2.3.3 光照对小鳞茎增殖的影响 将小鳞茎上长至 3 ~ 4 cm 的丛生芽分成单芽, 接入 MS + 0.4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 并附加 9% 蔗糖、琼脂 5.5 g/L、PP₃₃₃ 15 mg/L 的培养基中, 分别置于光照和黑暗条件下培养。

1.2.3.4 小鳞茎继代增殖培养 以固体培养和液体悬浮培养两种方式在黑暗条件下进行小鳞茎的继代增殖培养。固体培养基: MS + 0.4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 蔗糖 9% + 琼脂 5.5 mg/L; 液体培养基: MS + 0.4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 蔗

收稿日期: 2007-03-22

基金项目: 河北省科技项目 (编号: 052201131); 唐山市生物与化学新技术重点实验室项目 (编号: 04360701B-9)。

作者简介: 张永平 (1978—), 女, 山西晋城人, 博士研究生, 从事设施园艺植物生理学研究。E-mail: zh-yongping@163.com。

通讯作者: 乔永旭 (1978—), 硕士, 讲师。E-mail: qiaoyx123@163.com。

糖 9%。每种处理 10 瓶。液体培养为回旋振荡器 (100 r/min) 上振荡培养。转接前, 无菌条件下用电子天平称量小鳞茎的重量, 培养 30 d 后再次称重。计算固体和液体两种培养方式下小鳞茎的总生长量和单位生长量。

2 结果与分析

2.1 小鳞茎的诱导

2.1.1 鳞片不同部位对小鳞茎诱导的影响 如表 1 所示, 鳞片不同部位形成小鳞茎的时间不同, 基部形成小鳞茎的时间为 15 d, 中部和尖部则分别为 17 d 和 20 d。26 d 后基部开始形成小鳞芽, 45 d 后小鳞芽长至 3 cm 左右, 少量小鳞芽基部有根出现。综合上述结果, 鳞片不同部位诱导小鳞茎的能力从强到弱依次为: 基部 > 中部 > 尖部。观察发现, 不同部位形成小鳞茎的大小也有差异, 基部最大, 中部和切口处次之, 尖部最小。

表 1 鳞片不同部位小鳞茎的生长情况

培养时间 (d)	小鳞茎数(个)		
	基部	中部	尖部
15	3	0	0
17	8	8	0
20	10	10	2
22	10	12	2
25	10	12	2

2.1.2 生长调节剂对小鳞茎诱导的影响 如表 2 所示, NAA 浓度一定时, 随 6-BA 浓度的增加, 小鳞茎诱导率和小鳞茎数均增加; 当 6-BA 浓度一定时, 随 NAA 浓度的增加, 小鳞茎诱导率和诱导数均降低。6-BA 能够促进小鳞茎的发生, 适当提高 6-BA 浓度, 有利于小鳞茎的诱导, 同时应配以较低浓度的 NAA, 以 2.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 的浓度配比最适合诱导小鳞茎。

表 2 生长调节剂对小鳞茎诱导的影响

6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种 块数	诱导 块数	诱导率 (%)	鳞茎数	生长情况
2.0	0.2	36	30	83.3	8.0	健壮, 无根
2.0	0.5	36	29	80.6	7.5	健壮, 有根
1.0	0.2	36	27	75.0	6.5	细弱, 无根
1.0	0.5	36	24	66.7	5.7	细弱, 有根

2.2 小鳞茎的增殖

2.2.1 不同浓度蔗糖对小鳞茎增殖的影响 如表 3 所示, 当蔗糖浓度在 3% ~ 9% 的范围内, 随蔗糖增

加, 小鳞茎的增殖率和直径也逐渐增大。当蔗糖浓度为 9% 时, 增殖率最高, 达 425%, 鳞茎的平均直径增长趋势同增长率, 不同处理间二者差异极显著。当蔗糖浓度为 3% 时, 出现了明显的玻璃化现象, 当蔗糖浓度为 6%、9%、12% 时无此现象。当蔗糖浓度增加到 12% 时, 鳞茎的增殖率和直径明显降低。综合以上结果表明以 9% 为蔗糖最佳浓度。

表 3 蔗糖浓度对小鳞茎增殖的影响

蔗糖浓度 (%)	每瓶接种 鳞茎个数	30 d 后每瓶 鳞茎个数	增殖率 (%)	30 d 后鳞茎 直径(cm)
3	4	13.6	240A	0.38A
6	4	17.5	328B	0.56B
9	4	21.0	425C	0.74C
12	4	19.8	395D	0.68D

注: 不同大写字母表示极显著性的差异。表 4、表 5 同。

2.2.2 不同浓度 PP₃₃₃ 对小鳞茎增殖的影响 观察结果(表 4)发现, 不含 PP₃₃₃ 培养基的试管苗芽体生长较快, 50 d 后长至 4 ~ 6 cm, 小鳞茎生长不明显, 添加 PP₃₃₃ 的试管苗则生长较慢, 小鳞茎增殖明显, 随着 PP₃₃₃ 浓度的增加, 小鳞茎的增殖率和直径均明显增加, 当 PP₃₃₃ 浓度在 15 mg/L 时, 小鳞茎的增殖率和直径达到最大值, 与 PP₃₃₃ 0、5、10 mg/L 处理差异极显著。分析表明, 一定浓度的 PP₃₃₃ 可通过抑制试管苗芽体的生长, 来促进小鳞茎的增殖。

表 4 PP₃₃₃ 浓度对小鳞茎增殖的影响

PP ₃₃₃ (%)	每瓶接种 鳞茎个数	30 d 后每瓶 鳞茎个数	增殖率 (%)	30 d 后鳞茎 直径(cm)
0	4	4.0	0A	0.27A
5	4	13.2	230.0B	0.54B
10	4	15.7	292.5C	0.57B
15	4	18.0	350.0D	0.66C

2.2.3 光照和黑暗培养对小鳞茎增殖的影响 由表 5 所示, 将 26 d 及 45 d 时小鳞茎的直径和重量分别进行比较, 暗培养的小鳞茎直径增加 0.153 cm, 重量增加 0.186 g, 分别是光培养的 1.50 倍和 3.38 倍。方差分析表明: 二者差异达极显著水平, 暗培养较光培养更利于小鳞茎的增殖。

表 5 培养条件对小鳞茎增殖的影响

培养 条件	26 d		45 d		直径增 加(cm)	重量增 加(g)
	直径 (cm)	重量 (g)	直径 (cm)	重量 (g)		
光培养	0.390	0.228	0.492	0.283	0.102A	0.055A
暗培养	0.491	0.313	0.644	0.499	0.153B	0.186B

2.4 培养方式对小鳞茎增殖的影响

由表 6 可知,培养 30 d 后,液体悬浮培养小鳞茎的总增重量和单位增重量分别是固体培养的 2.28 倍和 3.71 倍,表明液体悬浮培养对小鳞茎的增殖效果明显优于固体培养。

表 6 培养方式对小鳞茎增殖的影响

培养方式	接种前总重量(g)	30 d 后总重量(g)	总增量(g)	每克增量(g)
固体	14.53	19.50	4.97	0.34
液体悬浮	8.99	20.31	11.32	1.26

3 讨论

鳞片的不同部位及生长状况影响小鳞茎的诱导。试验中采用了王爱勤等人的研究结果,取中层鳞片为外植体进行接种^[5]。发现不同鳞片的不同部位诱导小鳞茎的能力不同,这可能与同一鳞片不同部位细胞的内源激素水平、生理生化特性^[7]或所含的营养物质不同有关。鳞片基部的细胞内源激素水平高,贮藏的营养物质丰富,同样条件下,更易诱导出小鳞茎^[4,8-10]。切口处聚集较多的伤流液,营养丰富,可能也是诱导小鳞茎的因素。

PP₃₃₃ 对于小鳞茎的增殖有明显的影响。其机理可能是通过抑制百合芽体的生长,来促进小鳞茎的生长,PP₃₃₃ 高浓度较低浓度表现的效果更加明显,15 mg/L 的 PP₃₃₃ 对小鳞茎的增殖作用最佳,这与蒋细旺等人的研究结果存在一定的差异,他们认为 PP₃₃₃ 浓度在 10 mg/L 时对鳞茎增殖作用效果最佳,其结鳞茎率最高,鳞茎直径较大^[11],这可能与品种和种球的保存环境有一定的关系。另外,蔗糖浓度也影响小鳞茎的增殖,高浓度蔗糖能促进小鳞茎对碳源的吸收、转化和贮存,从而使鳞茎增殖。但浓度过高,会使培养基渗透压增大,小鳞茎失水,以至小鳞茎生长受到影响^[12-13]。本研究结果与傅玉兰等人^[14-15]的结论相差甚远,他们认为 2%~3% 的蔗糖更利于小鳞茎的生长,蔗糖浓度超过 5% 会导致芽畸形生长^[15],本研究没有发现这种现象,原因有

待于进一步研究。

本试验还发现培养方式和培养条件对于小鳞茎的生长有明显影响。液体悬浮培养比固体培养更有利于小鳞茎的增殖,可能是液体培养时,外植体接触的养分更多,养分更容易被吸收,从而导致液体培养的小鳞茎细胞分裂旺盛,生长加快。暗培养的小鳞茎增殖效果优于光培养,这可能与光对细胞分裂的抑制有关^[16]。

参考文献:

- [1] 辛广,侯冬岩,刘琳琳,等. 5 种东方百合过氧化物酶同工酶的分析[J]. 鞍山师范学院学报,2003,5(6):59-61.
- [2] 王丽艳,梁鲁国. 百合的离体培养及再生植株的快速繁殖[J]. 贵州农业科学,2003,31(6):19-21.
- [3] 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,2004,32(1):47-50.
- [4] 唐东芹,黄丹枫,唐可轩,等. 东方百合鳞片的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2003,39(5):450-452.
- [5] 王爱勤,何龙飞,盛玉萍,等. 百合鳞片不同处理与鳞茎形成关系的研究[J]. 广西农业生物科学,2003,22(3):182-185.
- [6] 吕玉虎,李彬青,吴淑平,等. 百合的离体组织培养和快速繁殖[J]. 信阳农业高等专科学校学报,2002,12(2):31-32.
- [7] 屈姝存,刘选明,周朴华,等. 百合鳞片细胞形态发生中生理生化特性研究[J]. 生命科学研究,1988,2(4):288-294.
- [8] 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.
- [9] 丁兰,刘国安,田卫东,等. 新铁炮百合组织培养和快速繁殖研究[J]. 西北师范大学学报,2001,37(1):80-82.
- [10] 刘雅莉,张剑侠,潘学军. 东方百合“索邦”的花器官培养与快速繁殖[J]. 西北植物学报,2004,24(12):2350-2354.
- [11] 蒋细旺,司怀军. 百合的组织培养技术综述[J]. 湖北农业科学,2004,39(1):78-82.
- [12] 潘瑞帜. 植物生理学[M]. 4 版. 北京:高等教育出版社,2003.
- [13] 王爱勤,周歧伟,何龙飞,等. 百合试管结鳞茎的研究[J]. 广西农业大学学报,1998,17(1):71-75.
- [14] 傅玉兰,何凤群. 影响百合试管鳞茎增殖因素的研究[J]. 安徽农业大学学报,2001,28(2):179-181.
- [15] 张施君,王凤兰,周厚高,等. 火百合的组织培养及快速繁殖[J]. 江苏农业科学,2004(4):72-73.
- [16] 万勇,毛凌华,黄永萍,等. 万载百合组织培养快速繁殖的研究[J]. 江西农业学报,2000,12(4):26-29.