

新思路、新技术、新方法
Novel Thinking & Technology

东方百合鳞茎快速增长的组培体系研究

胡凤荣* 席梦利* 刘光欣 王鹏凯 张睿婧 池坚 施季森**

国家林业局林木遗传和基因工程重点实验室, 南京林业大学, 南京, 210037

* 同等贡献作者

** 通讯作者, jshi@njfu.edu.cn

摘要 以东方百合栽培品种‘Sorbonne’和‘Siberia’的组培苗为试验材料, 研究了蔗糖、6-BA、IAA、PP₃₃₃及活性炭(AC)的添加浓度对组培苗小鳞茎增重和直径生长的影响; 结果表明: 80g/L 蔗糖浓度有利于‘Sorbonne’和‘Siberia’组培苗小鳞茎增重; 6-BA 浓度为 0.2mg/L、IAA 浓度为 0.5 和 1.0mg/L 时‘Sorbonne’和‘Siberia’组培苗小鳞茎平均直径增加最大, 分别为 120.7%和 138.0%; PP₃₃₃ 浓度达 3.2mg/L 和 1.6mg/L 时, ‘Sorbonne’和‘Siberia’的组培苗小鳞茎平均直径增加最大, 分别达到 505.7%和 211.3%; AC 浓度达到 2.0g/L 时‘Sorbonne’试管苗小鳞茎平均直径增加最大, 浓度达到 4.0g/L ‘Siberia’组培苗小鳞茎平均直径增加最大, 分别为 194.7%和 220.3%。

关键词 东方百合, 鳞茎生长, 组织培养

Establishment of Tissue Culture System for Rapid Growth of the Oriental Lily Bulblet

Hu Fengrong* Xi Mengli* Liu Guangxin Wang Pengkai Zhang Ruijing Chi Jian Shi Jisen**

The Key Laboratory of Forest Tree Genetics and Gene Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037

* These authors contributed equally to this work

** Corresponding author, jshi@njfu.edu.cn

Abstract The effects of the concentration of sucrose, 6-BA, IAA, PP₃₃₃ and AC on bulblet's diameter growth were studied with plantlet of oriental lily ‘Sorbonne’ and ‘Siberia’ in tube. The results showed that higher sucrose concentration could promote bulblet's diameter increasing, and the best concentration of sucrose was 80g/L. When the concentration of 6-BA was 0.2mg/L and the concentrations of IAA were 0.5mg/L and 1.0mg/L, the ratio of diameter increase for bulblets of ‘Sorbonne’ and ‘Siberia’ was the largest. They were 120.7% and 138.0% increase-ment compared with 80g/L both for ‘Sorbonne’ and ‘Siberia’ respectively. The ratios of diameter increased were the largest at the concentration of PP₃₃₃: 3.2mg/L and 1.6mg/L, which were 505.7% and 211.3% increasement. The best concentration of AC favored ‘Sorbonne’ bulblet swelling was 2.0g/L, while that favored Siberia bulblet swelling was 4.0g/L. The ratios of bulblet increasing were 194.7% for ‘Sorbonne’ and 220.3% for ‘Siberia’.

Keywords Oriental lily, Bulblet growth, Tissue culture system

传统的百合繁殖方法主要有以下几种方式: 通过种子发芽形成鳞茎; 由茎顶端叶腋形成珠芽; 由鳞茎基部和茎基部以不定芽形成鳞茎; 由母鳞茎鳞片的腋芽形成鳞茎; 由鳞片扦插形成的不定芽形成鳞茎(宁云芬等, 2002)。但这些方法, 繁殖系数较低, 特别是经多代繁殖以后, 常造成种性退化, 病毒积累, 严重影响百合种球的产量和质量。利用组织培养技

术, 能够迅速去除病毒和更新品种, 加快百合种球的繁殖速度, 缩短百合的生育周期(蒋细旺和司怀军, 2004)。但有关组培条件下诱导鳞茎快速增重及直径快速增大的报道不多。如能在组培条件下, 使脱毒材料快速培育成鳞茎和鳞茎直径快速增大, 缩短种球培育时间, 将有重要的理论和应用价值。

本研究以东方百合‘Sorbonne’、‘Siberia’的组培

苗为试验材料,研究了不同的植物生长物质对试管苗小鳞茎直径生长的影响,期望为百合试管苗工业化生产提供理论依据和技术支持,加快百合种球的国产化进程。

1 材料与方法

1.1 基本设施及供试材料

设施:接种工具(剪刀、镊子),接种器具灭菌器,超净工作台,培养基配制设备。

材料:从南京林业大学林木遗传与基因工程实验室百合组培室选取小鳞茎大小相近的东方百合‘Sorbonne’和‘Siberia’的组培苗。

1.2 培养基灭菌

本实验高压灭菌的条件是 121°C , $0.1\sim 0.12\text{MPa}$ 。培养基灭菌 18min。

1.3 接种

选取小鳞茎大小相近、健壮的组培苗,在超净工作台上将完整小鳞茎取出,切除周围杂乱组织和枯叶,接种到培养基上,每个培养瓶接种约 3 个小鳞茎(图 1-1, 1-2),进行培养。

1.4 组培苗鳞茎生长的数据测量

1.4.1 不同 PP_{333} (多效唑)、AC(活性炭)和蔗糖浓度对组培苗瓶内小鳞茎增重的影响

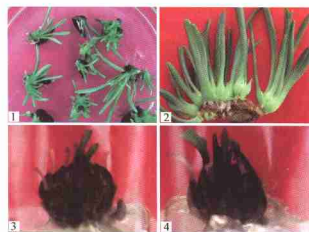


图 1 东方百合的瓶内结鳞茎

Figure 1 Bulblet formation in tube of oriental lily

注: 1: 鳞片分化不定芽; 2: 分化出的不定芽(本试验的接种材料); 3: 瓶内‘Sorbonne’组培鳞茎; 4: 瓶内‘Siberia’组培鳞茎

Note: 1: Adventitious buds of bulblet; 2: Adventitious buds; 3: Tissue culture bulblet of ‘Sorbonne’; 4: Tissue culture bulblet of ‘Siberia’

以 MS 为基本培养基, 添加 PP_{333} $0.1\sim 0.2\text{mg/L}$, AC $0\sim 1.0\text{g/L}$, 蔗糖 $40\sim 120\text{g/L}$, 琼脂 5.4g/L , 培养基 pH 值 5.8。培养 80d, 称量接种前后不同种类培养基上的鳞茎重量, 通过对比小鳞茎重量的增加得出东方百合不同品种瓶内结鳞茎最适宜的蔗糖浓度。

1.4.2 不同生长物质及不同浓度组和对组培苗小鳞茎直径生长的影响

以 MS 为基本培养基, 分别添加 6-BA $0.2\sim 0.5\text{mg/L}$, IAA $0.5\sim 4.0\text{mg/L}$; PP_{333} $0.2\sim 0.20\text{mg/L}$; AC $1.0\sim 8.0\text{g/L}$, 蔗糖 80g/L , 琼脂 5.4g/L , 培养基 pH 值 5.8。培养 50d, 记录接种前后不同种类培养基上的小鳞茎直径, 通过对比小鳞茎平均直径增加百分比得出东方百合不同品种瓶内结鳞茎适宜的生长物质浓度。

小鳞茎平均直径增加百分比 = (培养后小鳞茎的平均直径 - 接种时小鳞茎的平均直径) ÷ 接种时小鳞茎的平均直径 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同蔗糖浓度对组培苗瓶内结鳞茎的影响

培养基里蔗糖浓度相同的情况下, 添加不同浓度的分裂素和生长素, 发现瓶内结鳞茎的效果相差不多, 我们推测蔗糖浓度可能是影响组培苗结鳞茎的关键因子。因此, 在去除分裂素和生长素, 添加 AC 和 PP_{333} 的培养基上, 进行瓶内鳞茎增重的试验, 结果见图 2, 图 3。

统计分析后发现, 在蔗糖浓度相同的情况下, 同时添加 PP_{333} 和 AC 有利于瓶内鳞茎的增重。在 PP_{333} 和 AC 浓度相同时, 80g/L 的蔗糖浓度瓶内鳞茎增重最大, 鳞茎的直径生长也达到最大, 同时组培鳞茎的生长状态最好: 叶片较少、较绿; 根多、粗、长。为了确认蔗糖的影响, 我们利用去除了 PP_{333} 和 AC 的含

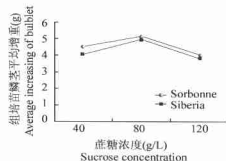


图 2 多效唑 0.1mg/L 、活性炭 1.0g/L 时, 蔗糖浓度对组培苗瓶内结鳞茎的影响

Figure 2 Effect of sucrose concentration on forming bulblets under PP_{333} 0.1mg/L , AC 1.0g/L

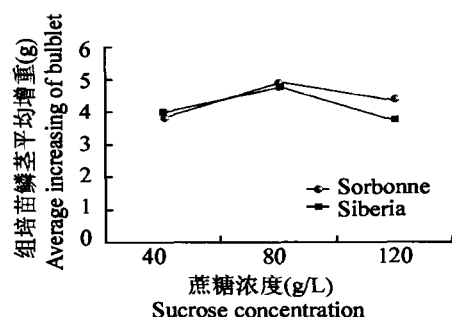


图3 多效唑 0.2mg/L 时,蔗糖浓度对组培苗瓶内结鳞茎的影响
Figure 3 Effect of sucrose concentration on forming bulbs under PP₃₃₃ 0.2mg/L

40g/L、80g/L、120g/L 蔗糖的培养基上进行了对比试验,得到了相同的结果。据此,笔者认为调节蔗糖浓度也就是调节 C/N 比,增加碳水化合物在鳞茎中的累积能力是影响瓶内鳞茎生长的重要因素。

2.2 6-BA 和 IAA 对小鳞茎直径生长的影响

细胞分裂素的主要生理作用是促进细胞的分裂和扩大,诱导芽的分化,促进侧芽的萌发生长,抑制衰老。由图 4,图 5 可以看出,在培养基中添加一定浓度

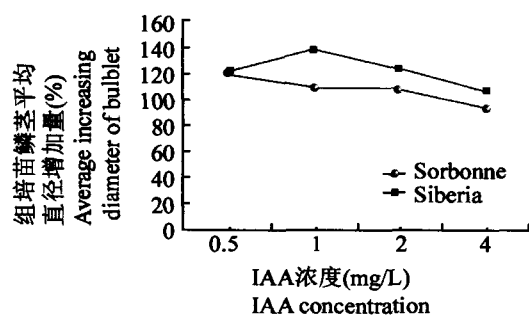


图4 6-BA 浓度 0.2mg/L 时,IAA 浓度对组培苗小鳞茎直径生长的影响

Figure 4 Effect of IAA concentration on bulbs diameter under 6-BA 0.2mg/L

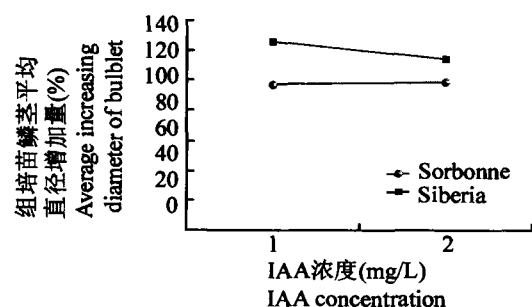


图5 6-BA 浓度 0.5mg/L 时,IAA 浓度对组培苗小鳞茎直径生长的影响

Figure 5 Effect of IAA concentration on bulbs diameter under 6-BA 0.5mg/L

的 BA 和 IAA 有利于小鳞茎直径的增大。其中以 6-BA 浓度为 0.2mg/L、IAA 浓度为 0.5 和 1.0mg/L 时小鳞茎平均直径增加量最大,‘Sorbonne’、‘Siberia’分别增加了 120.7%和 138.0%;6-BA 0.2mg/L 的浓度较 6-BA 0.5mg/L 直径生长量大。

2.3 多效唑对东方百合小鳞茎直径生长的影响

多效唑(PP₃₃₃)是一种生长延缓调节剂,可使植株矮小,茎粗,叶厚,生产上常用于培育壮苗。在组培试验的培养基中添加不同浓度的,对小鳞茎的增长效果显著。由图 6 可知,培养基中添加低浓度的多效唑对百合小鳞茎的增长有明显的促进效应,至多效唑浓度达 3.2mg/L 和 1.6mg/L 时,‘Sorbonne’和‘Siberia’小鳞茎的生长最快,小鳞茎平均直径增加量达到 505.7%和 211.3%,但随着 PP₃₃₃ 浓度的增加,‘Sorbonne’和‘Siberia’小鳞茎的生长逐渐变慢,鳞茎质量变差,散心现象严重并出现死亡。

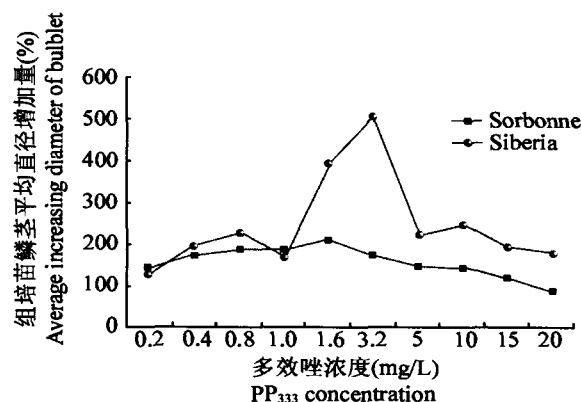


图6 PP₃₃₃ 浓度对组培苗小鳞茎直径生长的影响

Figure 6 Effect of PP₃₃₃ concentration on bulbs diameter

2.4 活性炭对小鳞茎直径生长的影响

活性炭具有强烈吸附能力,常被用作液体的净化剂与脱色剂,在植物组织培养中也经常用到。培养基中加入活性炭可以促进或抑制离体生长,因为活性炭给培养物创造了暗环境,产生了对生长抑制物的吸附作用,对生长调节剂及其它有机物的吸附作用,还有对其所吸附的生长促进物质的释放作用。在组培试验的培养基中添加不同浓度的活性炭,对小鳞茎的增长有一定的效果。由图 7 可知,随着培养基中活性炭浓度的增加,小鳞茎的生长逐渐加快。当活性炭浓度达到 2.0g/L 时‘Sorbonne’鳞茎生长最快,小鳞茎平均直径增加量达到 194.7%;活性炭浓度达到 4.0g/L ‘Siberia’鳞茎生长最快,小鳞茎平均直径增加量达到 220.3%。

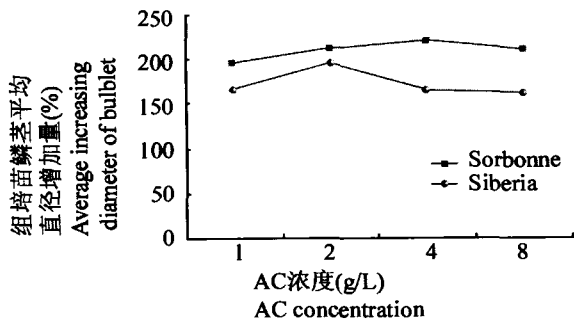


图 7 AC 浓度对组培苗小鳞茎直径生长的影响

Figure 7 Effect of AC concentration on bulbets diameter

3 结论与讨论

3.1 不同蔗糖浓度对百合组培苗瓶内鳞茎增长的影响

鳞茎是百合的营养贮藏器官,其周径大小直接与能否成花相关,百合组培苗的鳞茎大小是衡量组培苗质量的重要指标。本试验发现 8% 的蔗糖浓度是‘Sorbonne’和‘Siberia’组培苗鳞茎直径生长的最佳浓度,这与王爱勤等(1998)报道的蔗糖浓度为 3%~12% 和狄翠霞等(2005)报道的蔗糖浓度为 3%~9% 时,对鳞茎的生长具有促进作用的试验结果相同,所存在的差异可能是百合品种间的差异。

3.2 6-BA 与 IAA 对小鳞茎直径生长的影响

6-BA 的使用可以促进小鳞茎进一步膨大,改善鳞茎质量,是由于 6-BA 促进地上部的营养生长,延长了同化的时期,使植物体更多的积累了同化产物。6-BA 浓度 0.2mg/L 是东方百合小鳞茎生长的较适宜的浓度。

IAA 同 6-BA 一样可以促进小鳞茎进一步增大,改善鳞茎质量,这是由于 IAA 可以促进生根,有利于吸收营养,使植物体更多的积累了同化产物。IAA 浓度 0.5~1.0mg/L 是东方百合小鳞茎生长的适宜浓度。高于 1.0mg/L 的浓度时,生长反而减慢,这是因为过高外源 IAA 浓度抑制地上部的营养生长进而减少了同化产物的形成。这也体现了植物地上部与地下部的相关性。

3.3 多效唑(PP₃₃₃)对东方百合小鳞茎直径生长的影响

多效唑是一种高效低毒的植物生长调节剂,能够延缓植物的生长、抑制茎的伸长,还有促进成花及提高植物抗逆性等多种生物学效应。多效唑还能够改变同化物的分配,使同化物运输到正在生长的球茎上,促进球茎或鳞茎的形成与生长。本试验得出,

添加一定浓度的多效唑对百合组培苗小鳞茎的直径生长有明显的促进效应,多效唑浓度达 3.2mg/L 和 1.6mg/L 时,‘Sorbonne’和‘Siberia’小鳞茎的生长最快,随着 PP₃₃₃ 浓度的增加,‘Sorbonne’和‘Siberia’小鳞茎的生长逐渐变慢。这一结果与王爱勤等(1998)和庄志鸿和刘建(2002)的研究结果有很大差别,可能是因为不同种类的百合对多效唑的反应不同。

3.4 活性碳(AC)对小鳞茎直径生长的影响

活性碳的使用可以促进小鳞茎进一步膨大,改善鳞茎质量,是由于活性碳可以提供暗环境以及吸附离体培养中的抑制物。实验结果显示,添加一定浓度的活性碳对百合小鳞茎的直径生长有促进效应,当活性炭浓度达到 2.0mg/L 时,‘Sorbonne’鳞茎生长最快;浓度达到 4.0mg/L 时,‘Siberia’鳞茎生长最快。

本文初步研究了不同浓度的蔗糖、6-BA、IAA、PP₃₃₃ 和 AC 对东方百合‘Sorbonne’和‘Siberia’小鳞茎直径生长的影响,至于蔗糖浓度、6-BA、IAA、PP₃₃₃ 和 AC 的使用,是如何影响小鳞茎内源激素的变化,促进鳞茎直径的生长还有待于进一步的研究探索。

正常情况下,东方百合鳞茎需要在营养生长积累到一定程度,即种球达到一定周径时才能开花。本研究发现在壮苗继代培养基上继代 3 次时东方百合组培鳞茎周径可达 10~16cm,生根平均可达 27 条,并且根粗壮,移栽容易成活。因此,可以在继代培养的过程中获得大周径的生根组培鳞茎,完成一次成苗,节省培养时间,并且能比鳞茎在自然条件下生长提前 1~2 年开花,缩短切花生产周期。

致谢

本研究由上海市重点攻关“百合种质创新与品种快繁技术研究”项目(沪农科攻字 2004,第 1-1 号)资助。

参考文献

- Di C.X., An L.Z., Zhang M.X., and Xie Z.K., 2005, *In vitro* culture and bulblet formations of *Lilium × siberia* explants, Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica), 25(10): 1931-1936 (狄翠霞, 安黎哲, 张满效, 谢忠奎, 2005, 西伯利亚百合器官离体培养及结鳞茎的研究, 西北植物学报, 25(10): 1931-1936)
- Jiang X.W., and Si H.J., 2004, Summary on technology of lily tissue culture, Hubei Nongye Kexue (Hubei Agricultural Sciences), (1): 78-82 (蒋细旺, 司怀军, 2004, 百合的组织培养

- 技术综述, 湖北农业科学, (1): 78-82)
- Ning Y.F., Zhou H.G., Huang Y.Y., Ye X.B., Wang F.L., and Huang Z.F., 2002, Recent advances in the studies on the bulb propagation and breeding in lily (*Lilium* spp.), Zhongkai Nongye Jishu Xueyuan Xuebao (Journal of Zhongkai Agrotechnical College), 15(2): 66-70 (宁云芬, 周厚高, 黄玉源, 叶向斌, 王凤兰, 黄子锋, 2002, 百合种球繁育的研究进展, 仲恺农业技术学院学报, 15(2): 66-70)
- Wang A.Q., Zhou Q.W., He F.L., Xu H.Y., and Yang M.C., 1998, Study on the bulblet formation in tube of *Lilium longiflorum* L., Guangxi Nongye Daxue Xuebao (Journal of Guangxi Agricultural University (Natural Science)), 17(1): 71-75 (王爱琴, 周岐伟, 何飞龙, 许鸿源, 杨美纯, 1998, 百合试管结鳞茎的研究, 广西农业大学学报, 17(1): 71-75)
- Zhuang Z.H., and Liu J., 2002, Study on the bulblet formation in tube of bulb scale of oriental lily, Fujian Nongye Keji (Fujian Agricultural Science and Technology), (2): 26 (庄志鸿, 刘建, 2002, 百合鳞片试管结鳞茎的研究, 福建农业科技, (2): 26)

欢迎订阅

《分子植物育种》期刊

优惠: 2006 年 12 月 31 日前, 在编辑部订刊, ~~240 元/套~~ **200 元/套**

订购方法:

- 1、本刊为大 16 开本, 全年出刊 6 期。铜版纸彩色印刷, 每期 40 元, 全年 240 元(含邮寄费)。
- 2、填好订单, 用电子邮件或寄回到编辑部作为发行凭证。
- 3、汇款可通过邮局或银行帐号汇至编辑部海南办公室。

海南编辑部 E-mail: mpb@hitar.org

邮局汇款	银行汇款
邮编: 570206	开户银行: 中国农业银行海口市海秀支行
地址: 海南省海口市海秀中路 107 号北岸青年公寓 507 室	开户帐号: 21-16000 10400 23776
收款单位: 海南省生物工程协会	单位名称: 海南省生物工程协会
电话: 0898-68966415	传真: 0898-68958180

《分子植物育种》订购单

寄回此联作为发行凭证或用电子邮件通知编辑部(mpb@hitar.org)

订阅单位		收件人	
详细地址		邮 编	
电子邮件		电 话	
订购份数	份 总金额	银行汇款	邮局汇款