

‘Sorbonne’ 百合器官离体培养再生鳞茎的研究

蔡宣梅, 方少忠, 郭文杰, 张洁

(福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 通过对东方百合索蚌鳞片、鳞片叶分段诱导再生鳞茎以及鳞茎膨大的研究, 建立了快繁体系。结果表明: 诱导鳞片及鳞片叶产生再生鳞茎的最佳培养基都为 MS+ 6-BA 0.2 (单位: $mg \cdot L^{-1}$, 下同) + NAA 0.2+ 2, 4-D 0.1; 三种放置鳞片的方式对诱导生成的鳞茎的数量、鲜重、诱导率影响不显著; 鳞片叶基部切段再生鳞茎的诱导率最高, 其次为中部切段, 由下向上再生鳞茎的诱导率逐渐降低; 最适合诱导再生鳞茎的蔗糖浓度为 30~ 60 $g \cdot L^{-1}$, 黑暗条件下促使鳞茎膨大的蔗糖浓度以低于 90 $g \cdot L^{-1}$ 为宜, 散射光条件下促使鳞茎膨大的蔗糖浓度以低于 120 $g \cdot L^{-1}$ 为宜。

关键词: 索蚌百合; 鳞片; 鳞片叶; 膨大

中图分类号: S 682.2

文献标识码: A

Regeneration of Bulblets from Tissue Culture of Oriental Hybrid *Lilium*, “Sorbonne”

CAI Xuan-mei, FANG Shao-zhong, GUO Wen-jie, ZHANG Jie

(Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: An efficient tissue culture was developed using the bulb scale, scale's leave segments and bulblet enlargement of the Oriental Hybrid *Lilium*, “Sorbonne”. Results showed that (a) the appropriate induction medium for regeneration of the bulblet from the bulb scale and scale's leave segments was MS+ 0.2 $mg \cdot L^{-1}$ 6-BA + NAA 0.2 $mg \cdot L^{-1}$ + 0.1 $mg \cdot L^{-1}$ 2, 4-D; (b) there was no significant difference in quantity, induced rate and fresh weight of the regenerated bulblets resulting from the 3 putting methods; (c) the induction rate of the regenerated bulblet of scale's leave segments was the highest in the basal, followed by the middle section, and gradually decreased from bottom to top; (d) 30~ 60 $g \cdot L^{-1}$ was the optimal sucrose concentration for inducing the bulblet regeneration; (e) for bulblet enlargement, the sucrose concentration should be lower than 90 $g \cdot L^{-1}$ when treated in the dark, and 120 $g \cdot L^{-1}$ when exposed under scattered light.

Key words: “Sorbonne” lily; bulb scale; scale leave; enlargement

东方百合‘Sorbonne’花色艳丽、芳香宜人,备受消费者青睐, 在国内外市场上需求量很大。通常采用分球、鳞片扦插等方法进行繁殖, 长期的营养繁殖易感染病毒, 造成发育不良和品质退化, 因此目前花卉市场上多依赖进口种球, 利用组织培养的方法进行快速繁殖, 具有去病毒、迅速更新品种等优点^[1-2]。但百合组培过程中存在外植体污染严重、繁殖系数不高、组培苗在出瓶移栽过程中存活率低, 容易重新感染病毒等问题, 通过试管内结鳞茎, 可以克服组培苗移栽的缺点^[3]。然而, 百合试管内结鳞茎的过程中存在鳞茎形成时间长, 新增小球数较少等问题。本研究通过对东方百合‘Sorbonne’离体培养条件下鳞片培养、鳞片叶切段

培养及试管鳞茎的膨大进行了较系统的研究, 旨在建立可靠稳定的东方百合组织培养快速繁殖体系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料选用从荷兰进口的东方百合品种‘Sorbonne’种球。鳞片叶来自于鳞片产生的再生鳞茎生长的鳞片叶。

1.2 培养条件

本试验采用的基本培养基是 MS 培养基, 附加不同浓度的 6-BA、NAA 和 2, 4-D(单位: $mg \cdot L^{-1}$, 下同)。基本培养基中, 蔗糖为 3%, 琼脂为 0.65%, pH 为 5.8~ 6.0。培养条件为 (23±

2) °C, 试管鳞茎膨大为暗培养及散射光培养。

1.3 无菌外植体的获得

选择健康的鳞茎, 把根剪掉, 去掉外面2~3层鳞片, 用水冲洗干净, 把鳞片掰开, 尽量不伤着鳞茎基盘, 挑选无病、无虫斑的鳞片, 用洗衣粉浸泡, 用刷子轻刷, 然后用自来水冲洗干净。在超净工作台上用75%的酒精浸泡30 s, 再用0.1%的升

汞消毒10 min, 无菌水冲洗3~4次, 将消毒后的鳞片接种在诱导培养基上, 以靠近鳞茎基盘部接触培养基。激素种类、浓度以及不同的组合见表1。1个月左右可诱导产生再生小鳞茎, 再经1个月的培养再生小鳞茎在暗培养下鳞片叶开始抽长, 剪取嫩叶, 分切为基部、中部、上部的片段, 接种于各种诱导培养基上(表4)。

表1 不同激素浓度对索蚌百合鳞片诱导再生鳞茎的影响

Table 1 Effect of plant hormones on inducing regenerated bulblets from bulb

处理	6-BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	2,4-D (mg·L ⁻¹)	接种外植 体片数	诱导形成再生 鳞茎的外植体数	诱导率 (%)	平均每个鳞片上 再生鳞茎数量(个)
1	0.2			90	9	10.00	1.29 d
2	0.2	0.2		89	79	88.76	1.51 c
3	0.2		0.1	88	32	36.36	1.28 d
4	0.2	0.2	0.1	90	85	94.44	2.49 a
5	0.5			88	8	9.09	1.33 d
6	0.5	0.2		92	80	86.96	1.58 c
7	0.5		0.1	89	31	34.83	1.31 d
8	0.5	0.2	0.1	91	83	91.21	2.09 b
9	1.0			91	8	8.79	1.34 d
10	1.0	0.2		84	75	89.29	1.53 c
11	1.0		0.1	85	34	41.18	1.34 d
12	1.0	0.2	0.1	87	78	89.66	1.66 c

1.4 蔗糖浓度处理

小心切下小鳞茎, 置于添加不同蔗糖浓度的膨大培养基上, 蔗糖浓度依次为3%、6%、9%、12%。

1.5 测量项目

再生鳞茎的诱导率= (形成再生鳞茎的外植体数/接种外植体数) × 100%

平均每个鳞片上再生鳞茎数量= 形成再生鳞茎的总数量/有形成再生鳞茎的鳞片数

2 结果与分析

2.1 鳞片诱导再生鳞茎

在暗培养条件下, 接种2周左右鳞片下部靠近鳞茎基盘处开始膨大出现白色的突起(图1), 然后突起慢慢长大, 形成小鳞茎, 每个鳞片长1~4个小鳞茎, 中间为半透明状的突起, 外周为乳白色。而在散射光下, 突起为绿色。接种1个月后, 逐渐形成完整的小鳞茎(图2)。

2.1.1 不同激素浓度对索蚌百合鳞片诱导再生鳞茎的影响 外植体经培养后再生鳞茎的诱导情况见

表1, 不同培养基的诱导率不同。当BA浓度分别为0.2、0.5、1.0, NAA为0, 2,4-D为0时, 接种40 d后, 鳞片的诱导率低, 分别为10%、9.09%、8.79%。当BA浓度分别为0.2、0.5、1.0, NAA为0, 2,4-D为0.1时, 接种40 d后, 鳞片的诱导率分别为36.36%、34.83%、41.18%, 而在加了NAA的组合中, 诱导率增加, 其中处理4诱导率最高, 达到94.44%, 平均每个外植体诱导的再生鳞茎数也最多, 达到2.49个。

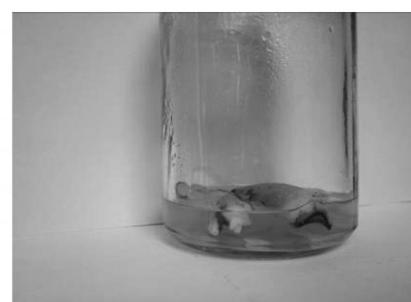


图1 诱导长出白色的突起

Fig 1 Induced white bulge



图 2 凹面朝上诱导出的再生鳞茎

Fig 2 Induced concave regenerative bulblets

2.1.2 外植体放置方式对诱导再生鳞茎的影响

从表 2 可以看出, 3 种放置鳞片的方式对诱导生成的鳞茎的数量、鲜重、诱导率影响不显著, 对再生鳞茎的形状影响也不大 (图 2、3)。

表 2 外植体放置方式对诱导再生鳞茎的影响

Table 2 Effect of explant putting on inducing regenerated bulblets

外植体 放置方式	平均每个鳞片上 再生鳞茎数量(个)	鳞茎鲜重 (g)	诱导率 (%)
凹面朝上	2.30 a	0.210 a	94.21
凹面朝下	2.17 a	0.204 a	93.89
垂直插入	2.21 a	0.223 a	94.15

注: 培养基为 MS + 6-BA 0.2 + NAA 0.2 + 2,4-D 0.1。



图 3 凹面朝下诱导出的再生鳞茎

Fig 3 Induced convex regenerative bulblets

2.2 鳞片叶诱导再生鳞茎

2.2.1 鳞片叶切段部位对诱导再生鳞茎的影响

取长约 3~5 cm 长的鳞片叶, 按基部、中部、上部分切为每段长度为 1.5 cm, 接种在培养基上 (表 3)。经过 30~60 d 的培养, 可以看到大部分的鳞片叶一端 (靠鳞茎基部部分) 逐渐膨大, 以“小鳞茎”的形态发生方式实现不定芽的分化, 也就是体细胞胚胎发生, 小部分鳞片叶褐化 (图 4), 还有

部分先诱导产生黄色、致密的愈伤组织, 再分化产生再生鳞茎 (图 5), 还有一些先出现具白色根毛的不定根, 再分化出现再生鳞茎。从表 3 可知: 鳞片叶基部切段再生鳞茎诱导率最高, 其次为中部切段, 由下向上再生鳞茎诱导率逐渐降低。

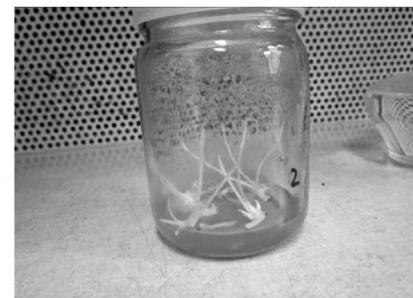


图 4 鳞片叶切段诱导出的再生鳞茎

Fig 4 Regenerative bulblets induced from scale leave segment



图 5 鳞片叶切段诱导出愈伤组织

Fig 5 Callus induced by scale leave segments, then redifferentiating regenerative bulblets

表 3 鳞片叶切段部位对诱导再生鳞茎的影响

Table 3 Effect of scale leave segments on inducing regenerated bulblets from bulb

切段部位	接种外 植体数	诱导形成再生鳞 茎的外植体数	诱导率 (%)	平均每段上再 生鳞茎数量(个)
上部切段	35	12	34.29	1.51 c
中部切段	40	26	65.00	2.13 b
基部切段	38	33	86.84	2.49 a

2.2.2 不同激素浓度对索蚌百合鳞片叶诱导再生鳞茎的影响 从表 4 可以看出: 鳞片叶诱导再生鳞茎最佳培养基为 MS + 6-BA 0.2 + NAA 0.2 + 2,4-D 0.1, 其诱导率达到 96.67%, 其次为 MS + 6-BA 0.2 + NAA 0.2, 诱导率也达到 83.33%, 而 NAA 浓度较低时 (≤ 0.05), 其诱导率较低。在 MS + 6-BA 0.2 + NAA 0.05 + 2,4-D 0.1 时诱导的

愈伤组织最多。

2.3 蔗糖浓度对百合鳞茎膨大的影响

由表5可看出,无论是在黑暗条件还是在散射光条件下,随蔗糖质量浓度的增加,百合鳞茎的鲜重均增加;当蔗糖质量浓度为 $120\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,形成的鳞茎最大,鳞片叶鲜重则减少,黑暗条件下鳞茎平均鲜重为 1.23 g ,为对照的2.28倍,且鳞茎增大倍数达4.39倍,但畸形严重;散射光条件下形成的鳞茎平均鲜重为 1.21 g ,鳞茎增大倍数为4.48倍,只有轻微畸形;无论是在黑暗条件还是在散射光条件下,当蔗糖质量浓度为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,新增鳞茎个数差异不显著,与蔗糖质量浓度为 $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $120\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 比较,差异显著。当蔗糖浓度为 $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时也有利于鳞茎的膨大,在黑暗条件下鳞茎平均鲜重为 0.89 g ,增大倍数达3.71倍,有轻微畸形;而在散射光条件下,鳞茎平均鲜重为 0.85 g ,增大倍数达3.40倍,无畸形。同时可以看出在散射光条件下增大倍数除了当蔗糖质量浓度为 $120\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时大于黑暗条件,其余都小于黑暗条件下同样蔗糖质量浓度的增大倍

数,而同样蔗糖质量浓度时黑暗条件下的鳞片叶鲜重均小于散射光条件下鳞片叶鲜重(图6)。



图6 黑暗条件下蔗糖浓度为 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时鳞茎膨大

Fig 6 Bulblet enlargement at sucrose concentration at $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in darkness

综上所述,对于百合试管鳞茎培养而言,以增殖小鳞茎为目的时,蔗糖浓度以 $30\sim60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。以小鳞茎膨大为目的时,小鳞茎膨大培养时蔗糖浓度在黑暗条件下以低于 $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜,散射光条件下以低于 $120\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。

表4 不同激素浓度对索蚌百合鳞片叶诱导再生鳞茎的影响

Table 4 Effect of plant hormones on inducing regenerated bulblets from scale leave

处理	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	2,4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	接种外植 体片数	诱导形成再生 鳞茎的外植体数	诱导率 (%)	平均每个鳞片上 再生鳞茎数量(个)
1	0.2	0.2	0.1	30	29	96.67	2.49 a
2	0.2	0.2		30	25	83.33	2.27 a
3	0.2	0.05	0.1	60	35	58.33	2.14 b
4	0.2	0.01	0.1	58	30	51.72	1.56 c

注:鳞片叶基部切段。

表5 蔗糖浓度对百合鳞茎膨大的影响

Table 5 Effect of sucrose concentration on in vitro bulblet development

培养条件	蔗糖浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	初始小鳞茎鲜重 (g)	鳞茎培养 40 d			
			鳞片叶鲜重(g)	鳞茎鲜重(g)	新增鳞茎数(个)	增大倍数
黑暗	30(CK)	0.25	0.48	0.54	1.50 a	2.16
	60	0.27	0.96	0.77	1.97 a	2.85
	90	0.24	0.40	0.89	0.88 b	3.71
	120	0.28	0.23	1.23	0.74 b	4.39
散射光	30(CK)	0.24	0.61	0.47	1.45 a	1.96
	60	0.26	1.07	0.69	1.87 a	2.65
	90	0.25	0.46	0.85	0.82 b	3.40
	120	0.27	0.19	1.21	0.70 b	4.48

注:黑暗条件下数据本课题组已发表^[4];表中显著性检验为黑暗条件或散射光下4个处理间的比较。

从图 1 可以看出, 在散射光条件下鳞茎的鳞片叶数量随着蔗糖浓度的增加而减少, 蔗糖浓度在 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 平均每个鳞茎大约有 1.8 片鳞片叶生成, 当浓度增加到 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 鳞片叶生成的数量减少到 1.2 片, 当浓度增加到 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时鳞片叶生成的数量减少到 0.7 片, 有的鳞茎已没有鳞片叶生成, 当浓度增加到 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 大部分鳞茎没有鳞片叶生成。

3 讨 论

百合组培过程中存在外植体污染严重、繁殖系数不高、组培苗在出瓶移栽过程中存活率低等问题, 本试验建立了以鳞片初代培养结合鳞片叶切段扩大繁殖及直接对再生小鳞茎进行膨大的东方百合快繁技术体系, 有效提高了东方百合的繁殖系数, 缩短了繁殖时间, 减少了鳞片初代培养污染的影响, 建立了有别于诱导丛生芽——分切丛生芽——鳞茎膨大生根的技术路线^[5-8], 同时试管鳞茎种植, 可以大大提高移栽成活率。

3.1 鳞片放置方式对诱导不定芽的影响

赵银萍等^[9]按远轴面与近轴面接种, 得出结论: 远轴面比近轴面接种外植体平均多产生 0.2~0.5 个芽, 他认为: 在采取近轴面接种时, 由于在近轴面形成的不定芽生长到培养基内部, 通气不良, 因此 15 d 后褐化死亡, 而在实验中未发现这种现象(图 2)。3 种放置鳞片的方式对诱导生成的鳞茎的数量、鲜重、诱导率没有显著影响, 对再生鳞茎的形状影响也不大。这种结果差异可能是与试验材料及培养条件不同造成的。

3.2 鳞片叶切段不同部位对诱导再生鳞茎的影响

本试验对鳞片叶切段不同部位对诱导再生鳞茎的影响进行了研究。结果发现: 索蚌百合组培时存在着位置效应。再生鳞茎分化率: 鳞片叶基部> 中部> 上部。龙春林等^[10]在研究兰州百合不同外植体离体培养中发现: 切段不定芽分化速率和数量是下段> 中段> 上段。唐东芹等^[11]在对西伯利亚鳞茎分化研究中发现, 鳞片的分化也存在位置效应: 鳞片下段> 中段> 上段, 本试验结论与此相同。

3.3 NAA 浓度对鳞片及鳞片叶诱导的影响

Yoshiji 等^[12]对 *L. rubellum* 研究发现, NAA 对鳞茎的形成必不可少。Skoog 等^[13]认为在百合鳞片中自身就含有激素, 所以在不加任何激素的培养基中也有鳞茎生成, 加入少量 NAA 后鳞茎的数量会加倍。在本试验中发现: 在鳞片、鳞片叶诱导时, 培养基中不加 NAA 或加入低浓度的 NAA,

再生鳞茎诱导率极低, 随着 NAA 浓度的升高, 诱导率增加, 与上述结论一致。

3.4 关于蔗糖在小鳞茎膨大中的作用

曹晓燕等^[14]指出, 在植物的组织培养中, 蔗糖不仅影响着植物的生长速度和生长量, 还影响着代谢水平、次生物质的合成以及细胞形态的建成, 是影响植物组织培养成功的关键。王家福等研究认为, 蔗糖浓度是百合试管内结鳞茎形成的决定性因素, 直接影响鳞茎形成和鲜重的大小^[15-16]。Yoshiji 等^[12]对 *L. rubellum* 研究发现, 含蔗糖 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中鳞茎生成数量最多, 说明低浓度的蔗糖有利于再生鳞茎数量的增多。本研究结果表明, 东方百合索蚌试管鳞茎诱导培养的蔗糖适宜浓度为 $30\sim 60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 这与王家福、Yoshiji 等人的研究结果相似。相同蔗糖适宜浓度下, 黑暗和散光对鳞茎诱导培养效果相同。

狄翠霞等^[17]在研究西伯利亚百合壮鳞茎时发现: 蔗糖对西伯利亚结鳞茎、生根具有重要作用, 在 $30\sim 90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 可增大鳞茎直径和厚度, 根缩短变粗, $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度抑制鳞茎生长和生根。本研究观察了黑暗和散光下蔗糖浓度对鳞茎膨大发育的影响, 结果显示, 黑暗条件下蔗糖浓度在 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 虽然形成的鳞茎鲜重较大, 但出现不同程度的畸形现象, 蔗糖浓度 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时鳞茎形状正常。而在散射光条件下蔗糖浓度达到 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时生成的鳞茎出现轻微畸形, 蔗糖浓度为 $30\sim 90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 鳞茎形状正常, 以 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下的鳞茎膨大最快。说明在光照条件下鳞茎更能适应较高蔗糖浓度 ($90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 这可能是光照条件下受光合作用的影响培养基中会有更多的蔗糖被吸收转化成淀粉和 CO_2 ^[16], 使得光照培养下, 鳞茎能适应更高浓度的蔗糖。

参考文献:

- [1] 崔徵, 桂耀林. 经济植物的组织培养与快速繁殖 [M]. 北京: 农业出版社, 1985.
- [2] 徐文兴, 金国良, 潘荷娟. 百合组织培养两次成苗 [J]. 植物生理学通讯, 1988, (3): 57~59.
- [3] 王爱勤, 何龙飞, 周琼, 等. 百合试管苗的移栽对比试验 [J]. 广西农业生物科学, 1999, (3): 187~190.
- [4] 张洁, 蔡宣梅, 林真, 等. 百合试管鳞茎诱导及膨大研究 [J]. 福建农业学报, 2010, 25 (3): 328~331.
- [5] 庄志鸿, 刘建. 试管内形成东方百合鳞茎的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38 (2): 149.
- [6] 王爱勤, 周岐伟, 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.

- [7] 陈丽静, 马爽, 李丽丽, 等. 东方百合“索蚌”离体培养快繁体系建立 [J]. 西南农业学报, 2010, 23 (5): 1652- 1655.
- [8] 邹迎春, 覃大吉, 魏代俊, 等. 东方百合组培快繁技术研究 [J]. 湖北民族学院学报, 2009, 27 (4): 448- 451.
- [9] 赵银萍, 张九东, 程建国. 用百合叶片及其鳞茎叶片离体诱导不定芽 [J]. 西安文理学院学报, 2005, (1): 21- 23.
- [10] 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.
- [11] 唐东芹, 黄丹枫, 唐克轩, 等. 东方百合鳞片的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 5: 450- 452.
- [12] YOSHII NIMI, TSUYOSHI ONOZAWA. In vitro bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* baker [J]. Scientia Horticulturae, 1979, 11: 379- 383.
- [13] SKOOG F, MILLER C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures cultured in vitro [J]. Symposium of the Society of Experimental Biology, 1957, 11: 18- 30.
- [14] 蔡晓燕, 王喆之, 赵银萍. 毛刺槐花药培养及再生植株的获得 [J]. 西北植物学报, 2003, 23 (3): 456- 459.
- [15] 王家福, 陈振光. 百合快速繁殖条件的优化 [J]. 福建农业大学学报, 1999, 28 (2): 152- 156.
- [16] 傅玉兰, 何风群. 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.
- [17] 狄翠霞, 安黎哲, 张满效, 等. 西伯利亚百合器官离体培养及结鳞茎的研究 [J]. 西北植物学报, 2005, 25 (10): 1931- 1936.

(责任编辑: 柯文辉)