

火百合花器的鳞茎诱导和增殖培养研究

周俊辉, 周厚高, 林丽婵, 卢俊图

(仲恺农业工程学院 农业与园林学院, 广州 510225)

摘要: 采用4.5~6.5 cm长、花苞青色未开放的火百合花蕾作材料,切取其子房、花柱、花丝为外植体进行鳞茎诱导,结果表明:花丝的鳞茎诱导率最高,其次是花柱,子房的诱导率最低。以子房和花柱为外植体诱导出的鳞茎个体大小不一(1~7 mm),以花丝为外植体诱导出的鳞茎则普遍偏小,但较整齐一致(3~4 mm);小鳞茎诱导的最佳6-BA浓度是1.0 mg/L。研究了基本培养基、6-BA浓度、NAA浓度对小鳞茎增殖的效应及不同蔗糖浓度对小鳞茎增重的影响,结果表明:小鳞茎增殖的最佳培养基是:MS+6-BA2.0 mg/L+NAA0.2 mg/L,4%蔗糖对鳞茎增重效果最好。

关键词: 火百合; 花器; 鳞茎诱导培养; 增殖培养

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)06-0811-05

Study on induction and multiplication culture of bulblet from some parts of flower in *Lilium*

ZHOU Jun-Hui, ZHOU Hou-Gao, LIN Li-Chan, LU Jun-Tu

(Agriculture and Landscape College, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The some parts in flower such as ovary, style and filament as explants were cultured for inducing bulblet in *Lilium*. The results indicated that the highest bulblet inducing rate was gotten from filament while the lowest from ovary, there were bigger difference of the bulblets from ovary and style, while there were ordinary smaller but uniform bulblet from filament, there was best inducing effect for bulblet when the media added with 1.0 mg/L 6-BA among all concentration. The uniform bulblets were studied for multiplication culture with different media, different concentration of 6-BA and NAA, and for enlarging culture with different concentration of sugar, the results indicated that, MS medium+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA was the best one for bulblet multiplication, there was obvious effect of bulblet multiplication culture when the media added with glycine, there was the highest effect for enlarging culture of bulblets when the media added with 4% sugar, but with fewer or more concentration.

Key words: *Lilium*; flower organ; bulblet inducing culture; multiplication culture

火百合(*Lilium*)是东方型品种,是我国南方大面积栽培的优秀切花和盆花品种,消费量非常大。我国目前主要依靠进口种球进行火百合生产,由于价格昂贵,繁殖速度慢,特别是经多代分株繁殖以后,常造成种性退化,易感染病毒,百合的生产规模受到限制。

百合的许多器官都可作为外植体进行离体培养(丁兰等,2004)。在百合花器培养方面,蔡宣梅等(2001)以东方百合(*L. tenuifolium*)的花丝为外植体诱导出试管苗,Marina等(1994)、陈善娜等(1997)和许宝辉(2003)分别以 *L. rhodopaeum*、百合(*L. spp.*)和岷江百合(*L. regale*)刚开的花朵子房

收稿日期: 2007-07-16 修回日期: 2008-03-29

基金项目: 广东省科技攻关项目(20042040011)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangdong Province (20042040011)]

作者简介: 周俊辉(1963-),男,江西临川人,博士,副教授,从事园艺植物组织培养研究等, E-mail: junhuizhou@163.com。

为材料获得试管苗。但利用鳞片、茎段、叶片等进行初代培养时容易污染,试管苗移栽成活率低,容易重新感染病毒(张云等,2001)。采用试管内形成鳞茎的组培方法,可以诱导成苗,或直接诱导生根;相对于试管苗,试管鳞茎较小,其所占用的空间远比试管苗少,在短期内获得保持原种优良性状的大量种苗,可提高成活率、降低污染和感染病毒的机率,并有利于种质保存(王爱勤等,1998,庄志鸿等,2002)。百合以鳞片为外植体诱导小鳞茎已有报道(傅玉兰等,2001;张君等,2002;黄敏玲等,2004),但诱导的试管小鳞茎直径较小,结鳞茎时间较长,移栽成活率低。在百合鳞茎的诱导与增殖研究中,6-BA浓度对百合的结鳞茎率、鳞茎大小等的影响较大(赵祥云等,1993;丁兰等,2001;赵庆芳等,2003),蔗糖浓度对百合鳞茎的增殖效果影响结果不一(王家福等,1999)。

张施君等(2004)用火百合鳞片作外植体研究过诱导芽的快速繁殖,以火百合花器官诱导小鳞茎的研究尚未见报道。因此,有必要寻找能缩短结鳞茎时间和使鳞茎增粗的方法,为火百合种苗规模化生产提供科学参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料为广州芊卉集团有限公司基地内栽培的火百合盆栽品种,采集4.5~6.5 cm长、花苞未露白、仍为青色、未开放的花蕾。

1.2 试验方法

1.2.1 不同花器对火百合小鳞茎诱导的影响 将火百合未开放的花蕾用自来水冲洗并擦拭干净,棉花擦干,然后放在超净工作台上,用75%的酒精浸泡30 s后,无菌水冲洗1次,用0.10% HgCl_2 消毒10 min,再用无菌水冲洗5~6次,在无菌条件下,用手术刀将花蕾纵向切开,除去花药,取子房、花柱、花丝分别接种至MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L诱导培养基上。

1.2.2 不同6-BA浓度对火百合子房诱导的影响 MS附加0.1 mg/L的NAA,分别附加0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L的6-BA。

1.2.3 培养基不同成分对火百合诱导的小鳞茎增殖的影响 (1)基本培养基对小鳞茎增殖的影响:种类为MS、 B_5 、 N_6 ,分别附加0.1 mg/L NAA和1.0 mg/L 6-BA;(2)6-BA浓度对小鳞茎增殖的影响:

MS附加0.1 mg/L NAA,分别加入0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L 6-BA;(3)NAA浓度对小鳞茎增殖的影响:MS附加2.0 mg/L 6-BA,分别加入0.05、0.1、0.2、0.6、1.0 mg/L NAA。

1.2.4 蔗糖浓度对小鳞茎增重影响的影响 MS附加2.00mg/L6-BA和0.20 mg/L NAA,分别加入2%、4%、6%、8%蔗糖。选择已经诱导出的大小较一致小鳞茎3~5个一块,分别转接到1.2.3和1.2.4的不同培养基上,45 d左右统计结果。

1.3 培养条件与数据分析方法

各培养基加琼脂6~7 g/L,蔗糖20 g/L,pH值6.0。花器诱导小鳞茎试验培养温度为18~20℃,采用室内自然散射光,光照度为9~18 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,每天光照9~10 h;小鳞茎增殖与增重试验温度为21℃,光照度27 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,每天光照12 h左右。数据采用STATISTICA/w 5.0软件进行统计分析,统计测验均为90%水平。

2 结果与分析

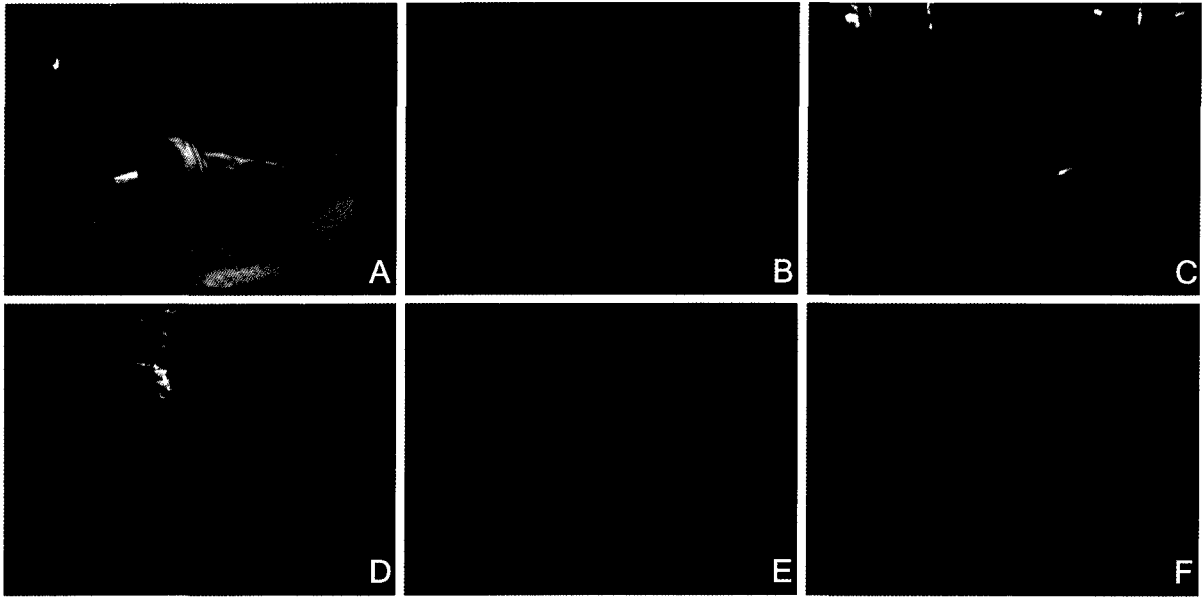
2.1 火百合不同花器外植体诱导小鳞茎的差异

火百合3种花器都能诱导出小鳞茎,所需时间最快为花丝(20~23 d),次为花柱(23~25 d),最慢为子房(25~28 d)。在百合子房和花柱诱导过程中,部分外植体膨大有类似胚状体的愈伤组织出现,小鳞茎后来就从这些类似胚状体的圆粒中长出来(图版I:A,B);而在花丝的诱导过程中则未观测到这种愈伤组织,小鳞茎从膨大的花丝中直接长出。培养25 d后,愈伤组织不断分化出小鳞茎(图版I:C,D,E)。在诱导过程中,有少数外植体出现褐化死亡的现象,小鳞茎培养时间超过50 d左右就会长芽。

从表1看出,小鳞茎诱导率以花丝最高,子房和花柱其次,子房与花柱差异不显著。从诱导出的鳞茎数看,子房显著多于花丝,但小鳞茎数目差异较大(1~14个),小鳞茎大小差异也较大(1~7 mm);虽然用子房可诱导直径较大的鳞茎,但数量较少。花丝诱导鳞茎数明显少于花柱和子房,但诱导出的鳞茎数量和大小非常整齐一致,每个外植体能诱导出2~3个直径在3~4 mm的鳞茎。

2.2 6-BA不同浓度对火百合子房小鳞茎诱导的影响

从表2可见,6-BA浓度为1.0 mg/L的诱导率最高,其次是0.5 mg/L,超过1.0 mg/L时,小鳞茎



图版 I A. 火百合子房接种后膨大; B. 火百合子房诱导成类似胚状体的愈伤组织; C. 火百合子房鳞茎诱导; D. 火百合花柱鳞茎诱导; E. 火百合花丝鳞茎诱导; F. 火百合小鳞茎增殖。

Plate I A. The ovary of *Lilium* was enlarged after being inoculated; B. The calli similarly to embryoid were induced from ovary of *Lilium*; C. The bulblets were induced by ovary of *Lilium*; D. The bulblets were induced by style of *Lilium*; E. The bulblets were induced by filament of *Lilium*; F. Multiplication of bulblets of *Lilium*.

表 1 火百合不同花器外植体离体培养诱导小鳞茎的差异

Table 1 Difference of bulblet inducing from different flower parts of *Lilium in vitro*

外植体 Explant	接种数 Inoculating No.	成活数 Surviving No.	成活率(%) Surviving rate	出鳞茎外植体数 Bulblet No.	诱导率(%) Inducing rate	诱导鳞茎总数 Total No. of bulblet	诱导鳞茎平均数 Average No. of bulblet
子房 Ovary	122	120	98.4	83	68.17 b	241	2.90 a
花柱 Style	122	113	92.6	84	74.34 b	238	2.83 a
花丝 Filament	732	710	97.0	632	89.01 a	1 454	2.30 b

注: 培养基为 MS+6-BA2.0 mg/L+NAA0.1 mg/L。 Note: The media was MS+ 2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA.

表 2 6-BA 不同浓度对火百合子房小鳞茎诱导的影响

Table 2 Influence of 6-BA concentration on bulblet formation from ovary of *Lilium in vitro*

6-BA 浓度 Conc. of 6-BA(mg/L)	接种成活数 Surviving No.	出鳞茎外植体数 No. of explant produced bulblet	诱导率(%) Inducing rate
0.5	31	28	90.32a
1.0	36	34	94.44a
2.0	31	14	45.16b
3.0	36	24	66.67b

注: 基本培养基为 MS+NAA0.1 mg/L。

Note: The basic media was MS+0.1 mg/L NAA.

诱导率开始下降,表明高浓度的 6-BA 会抑制小鳞茎的诱导。

2.3 不同培养基成分对火百合小鳞茎增殖的影响

2.3.1 基本培养基对火百合小鳞茎增殖的影响 结果表明,MS 对小鳞茎的增殖率优于其他的基本培

培养基,其次是 B5,N6 的增殖率最低(表 3)。

2.3.2 6-BA、NAA 不同浓度对火百合小鳞茎增殖的影响 从表 3 看出,随着 6-BA 浓度的增加,小鳞茎的增殖率也相应提高,以 6-BA 2.0 mg/L 的增殖率最高,6-BA 为 1.0 mg/L 的次之。当 6-BA 高于 2.0 mg/L 时,小鳞茎的增殖率反而明显下降,而形成更多的愈伤组织。低浓度的 NAA 有利于小鳞茎的形成(表 3),当 NAA 为 0.2 mg/L 时增殖率最高,低于 0.1 mg/L 时小鳞茎增殖较低,当浓度高于 0.6 mg/L,小鳞茎的增殖率也明显下降,而且产生较多的愈伤组织。

2.4 不同蔗糖浓度对火百合小鳞茎增重的影响

从表 4 可看出,不同蔗糖浓度对鳞茎增重的影响不同,增重率从大到小依次为 4% > 6% > 8% > 2%。可见,对鳞茎增重最佳的蔗糖浓度是 4%,常

用的2%浓度太低,不利于鳞茎增重,而当浓度达到6%时增重效果又开始下降。

表3 不同基本培养基、6-BA和NAA浓度对火百合小鳞茎增殖的影响

Table 3 Influence of different basic media, 6-BA concentration and NAA concentration on bulblet multiplication of *Lilium in vitro*

项目 Item	接种小鳞茎数 Inoculated bulblet No.	增殖小鳞茎数 Bulblet No. for multiplication	增殖率(%) Rate of multiplication	
基本培养基 Basic media ¹⁾	N6	26	36	138.46a
	B5	48	129	268.75b
	MS	31	73	235.48b
6-BA浓度(mg/L) Concentration of 6-BA ²⁾	0.5	50	46	92.00a
	1.0	49	60	122.45b
	2.0	125	164	131.20b
	3.0	115	121	105.22b
NAA浓度(mg/L) Concentration of NAA ³⁾	0.05	117	31	26.50a
	0.1	111	86	77.48c
	0.2	131	116	88.55c
	0.6	130	71	54.62b
	1.0	130	55	42.31b

注: ¹⁾各培养基附加6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; ²⁾基本培养基为MS+NAA 0.1 mg/L; ³⁾基本培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L。

Note: ¹⁾All of the tested media were added with 1.0 mg/L 6-BA and with 0.1 mg/L NAA; ²⁾The basic media was MS+0.1 mg/L NAA; ³⁾The basic media was MS+2.0 mg/L 6-BA.

表4 不同蔗糖浓度对火百合鳞茎增重培养的影响

Table 4 Influence of sucrose concentration on bulblet enlarging of *Lilium in vitro*

蔗糖浓度 Concentration of sucrose (%)	统计瓶数 Tested bottle No.	小鳞茎原重 Original wt. of bulblet(g)	小鳞茎增重 Increased wt. of bulblet(g)	增重率 Increased rate (%)
2 (CK)	16	0.353	0.441	124.93a
4	18	0.250	0.872	348.80 c
6	18	0.282	0.684	242.55 b
8	19	0.329	0.746	226.75 b

注: 培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

Note: The basic media was MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA.

3 讨论

3.1 火百合不同花器外植体及培养方式对小鳞茎诱导的影响

火百合子房、花丝、花柱均能诱导出小鳞茎,诱导时间短,从外植体接种至小鳞茎成功增殖只需两个多月。从诱导的鳞茎大小看,子房与花柱能诱导出直径较大的鳞茎,但数量少,大小整齐度差。花丝诱导的鳞茎普遍偏小,但大小整齐一致,花丝诱导的

小鳞茎总数远超过子房和花柱。

子房外植体经过诱导形成小鳞茎有两条途径:一是子房膨大成活后,直接诱导出小鳞茎,形成小鳞茎丛,因为不经过愈伤组织阶段,遗传性稳定,有利于母本优良性状的保持;二是子房诱导成类似胚状体的愈伤组织,再由愈伤组织分化成小鳞茎。试验中观察到,子房纵切比横切膨大快,易成活,诱导的小鳞茎比较多;如果接种的子房较大,外植体膨大也较快,但其诱导的小鳞茎相对较少;子房过小,外植体易干枯。因此,子房外植体大小宜在0.5~1.0 cm之间,与许宝辉(2003)的结果相似。

3.2 激素浓度与小鳞茎诱导和增殖的关系

火百合小鳞茎的诱导并不需要很高的6-BA浓度,0.5~1.0 mg/L就合适,当6-BA浓度为2.0 mg/L时小鳞茎的增殖最好,超过这一浓度后,小鳞茎的增殖受到抑制,与张施君等(2004)用火百合鳞片诱导鳞茎的结果相似。可能是高浓度的6-BA造成细胞的过度分裂,使小鳞茎的形成受阻(孙君社等,2001)。适合小鳞茎增殖的NAA浓度是0.1~0.2 mg/L,小鳞茎增殖的最佳培养基是:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L。对小鳞茎增殖的影响,似乎6-BA起主要作用,NAA起辅助作用。

3.3 蔗糖浓度与鳞茎增重的关系

王家福等(1999)认为糖的含量和鳞茎增殖率之间没有正相关性,而以2%的为最佳浓度,其次为3%,当蔗糖浓度为10%时,小鳞茎的直径最大,继续增加浓度,鳞茎的直径无明显变化。

Koda(1977)认为茉莉酸(Jasmonates)可能参与了植物的块茎、块根和鳞茎等在离体培养时的形态发生,这种诱导促进作用是由于糖的积累提高了渗透压以及改变了细胞壁的结构而影响细胞壁的伸展能力的缘故。我们的结果表明蔗糖浓度过低或过高都不利于鳞茎增重,最适浓度为4%。可能百合种类不同,鳞茎增重培养对蔗糖的敏感程度不同。

另外发现,小鳞茎的增殖有明显的群体效应,若是单个小鳞茎转接则繁殖较慢,或不增殖而分化出根;若3~5个小鳞茎一块转接能很快增殖形成小鳞茎丛。小鳞茎继代培养的次數最好在3~4次以内,随着继代次數的增多,分化的愈伤组织也增加,其变异的可能性也增加。

参考文献:

蔡宣梅,郑伟文,黄健华,等. 2001. 百合花丝组织培养试验[J].

- 福建农业科技,6:13-14
- Chen SN(陈善娜), Gao JL(高建莉), Zhen ZY(郑志英). 1997. Tissue culture of *Lilium ovary*(百合子房的组织培养)[J]. *J Yunnan Univ*(云南大学学报),19(4):374-375
- Ding L(丁兰), Liu GA(刘国安), Tian WD(田卫东), et al. 2001. Study on tissue culture and clonal propagation of *Lilium concolor* × *L. formosanum*(新铁炮百合组织培养和快速繁殖研究)[J]. *J Northwest Normal Univ*(西北师范大学学报),37(1):80-82
- Ding L(丁兰), Zhao QF(赵庆芳), Liu RM(刘瑞梅). 2004. Study on tissue culture and propagation of Maroco polo *in vitro*(马可波罗百合的组织培养和离体快繁)[J]. *Guihaia*(广西植物) 24(1):37-39,80
- Fu YL(傅玉兰), He FC(何凤群). 2001. Affecting factors on the proliferation of test-tube Lily bulb(影响百合试管鳞茎增殖因素的研究)[J]. *J Anhui Agric Univ*(安徽农业大学学报),28(2):179-181
- Huang ML(黄敏玲), Chen SL(陈诗林). 2004. Induction of bulblets from shoot apex *in vitro* and cultivation of flower bulb in Asiatic hybrid Lily(百合顶芽离体诱导小鳞茎及开花球培育)[J]. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报),26(6):636-641
- Marina IS, Valentina PI, Nedjalka AZ. 1994. Morphogenetic potential and *in vitro* micropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip[J]. *Plant Cell Reports*,13:451-453
- Sun JS(孙君社), Fang XH(方晓华). 2001. Influence of Hormone on Callus Growth of Novecento's Bulb(植物激素对百合鳞片愈伤组织生长的影响)[J]. *J China Agric Univ*(中国农业大学学报),6(2):58-61
- Wang AQ(王爱勤), Zhou QW(周岐伟), He LF(何龙飞), et al. 1998. Studies on the bulblet formation in tube of *Lilium longiflorum*(百合试管结鳞茎的研究)[J]. *J Guangxi Agric Univ*(广西农业大学学报),17(1):71-75
- Wang JF(王家福), Chen ZG(陈振光). 1999. Optimization of conditions for rapid propagation of Lily(百合快速繁殖条件的优化)[J]. *J Fujian Agric Univ*(福建农业大学学报),28(2):152-156
- Xu BH(许宝辉). 2003. Studies on the tissue culture in the different organs of *Lilium*(百合子房组织培养研究)[J]. *J Southwest Univ Sci Tech*(西南科技大学学报),18(3):65-67
- Zhang J(张君), Wu LM(武丽敏), Wang L(王雷), et al. 2002. Primary research on rapid propagation technique of tissue culture in Easter Lily(麝香百合组培快繁技术初步研究)[J]. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报),24(1):53-54,81
- Zhang SJ(张施君), Wang FL(王凤兰), Zhou HG(周厚高), et al. 2004. Study on tissue culture and rapid propagation of *Lilium*(火百合的组织培养及快速繁殖)[J]. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学),4:72-73
- Zhang Y(张云), Yuan YL(原雅玲), Liu QL(刘青林). 2001. Proceedings on cultivar improvement and biotechnology in *Lilium*(百合品种改良与生物技术研究进展)[J]. *J Beijing Fore Univ*(北京林业大学学报),23(6):56-59
- Zhuang ZH(庄志鸿), Liu J(刘建). 2002. Tissue culture of the bulblet formed in tube of *Lilium acapulco*(试管内形成东方百合鳞茎的组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯),38(2):149
- Zhao QF(赵庆芳), Zeng XY(曾小英), Ding L(丁兰), et al. 2003. Study on tissue culture and clonal propagation of *Acapulco*(东方百合组织培养和快速繁殖研究)[J]. *J Northwest Normal Univ*(西北师范大学学报),39(1):66-68
- Zhao XY(赵祥云), Cheng Q(程谦), Xing YM(邢尤美), et al. 1993. Studies on bulblet culture and devirus of *Lilium sulphureum*(百合珠芽组培及脱毒研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报),20(3):283-288
- Yasunori Kode. 1997. Possible involvement of jasmonetes in various morphogenic events[J]. *Physiologia Plantarum*,100:639-646

(上接第 779 页 Continue from page 779)

物进行风险评价,建立有害植物的监测和预警体系,积极清除或控制已发生严重危害的外来入侵植物。

致谢 参加野外考察的有覃家科、杜青、陈秋霞、唐海萍等同志,在此一并致谢。

参考文献:

- 丁建清,解焱. 1996. 中国外来种入侵机制及对策,《保护中国的生物多样性(二)》[M]. 北京:中国环境科学出版社:107-128
- 李振宇,解焱. 2002. 中国外来入侵种[M]. 北京:中国林业出版社
- 徐汝梅,叶万辉. 2003. 生物入侵—理论与实践[M]. 北京:科学出版社:1-2
- Andrew M, Lauri B, Anne N, et al. 2004. Non-indigenous woody invasive plants in a rural new England town[J]. *Biological Invasions*,6:205-211
- Montserrat V, Jordi P. 2001. Land-use and socio-economic correlates of plant invasions in European and North African countries [J]. *Biological Conservation*,100:297-401
- Ramaswami PP. 1997. Potential use of *Parthenium*. In: Proc. First International Conference on Parthenium Management,1:77-80
- Tang SC(唐赛春), Lu SH(吕仕洪), He CX(何成新), et al. 2008. Distribution and harmful effects of alien invasive plant *Parthenium hysterophorus* in Guangxi(外来入侵植物银胶菊在广西的分布与危害)[J]. *Guihaia*(广西植物),28(2):197-200
- Wu ZY(吴征镒). 1991. The areal-types of Chinese genus of seed plants(中国种子植物属的分布区类型)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究)[J]. Suppl.(增刊)IV:1-139
- Xu CD(徐成东), Lu SG(陆树刚). 2006. The invasive plants in Yunnan(云南的外来入侵植物)[J]. *Guihaia*(广西植物),26(3):227-234
- Zhu SX(朱世新), Qin HN(覃海宁), Chen YL(陈艺林). 2005. Alien species of Compositae in China(中国菊科植物外来种概述)[J]. *Guihaia*(广西植物),25(1):69-76