

东方百合花器官组织培养研究

赵得萍, 唐道城, 刘米会, 郭志

(青海大学 高原花卉研究中心 青海 西宁 810016)

摘要:取东方百合 Sorbonne 的花萼、花瓣和花丝为外植体, 接种于经过筛选的最佳诱导培养基上, 进行诱导率和分化率的比较, 将花丝分成 3 段, 进行分段培养的最佳培养基和最佳花丝部位筛选。结果表明: 花萼的愈伤诱导率 and 不定芽再分化率最高, 分别为 92.0% 和 89%, 花瓣次之, 花丝最低。花丝分段培养的最佳诱导培养基为 MS+NAA 1.0 mg/L+BA 0.2 mg/L; 花丝各部位分化能力是中部>基部>顶部; 中部花丝在 MS+NAA 1.0 mg/L+BA 0.2 mg/L 培养基上的愈伤诱导率 and 不定芽再分化率都达到 100%。

关键词: 东方百合; 组织培养; 花萼; 花瓣; 花丝

中图分类号: S 682.2⁺ 9; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)02-0198-03

东方百合杂种系为百合中的名贵品种群, 所占栽培比例最大, 由于其花型奇特、花色艳丽、芳香宜人而成为国内外市场上长期热销的花卉种类之一^[1]。百合生产主要靠常规分球、分珠芽、鳞片扦插、鳞片包埋等, 这些繁殖方法造成百合体内病毒积累使品质退化, 组织培养能在一定程度上脱除病毒, 但是, 植株体内病毒分布的不均匀性会造成不同外植体对病毒的脱除效果不同^[2-4]。试验以花萼、花瓣、花丝为外植体, 进行诱导能力和再分化能力比较, 首次进行了花丝不同部位的诱导能力研究, 旨在为对不同外植体的脱毒效果进行检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验以 Sorbonne 为材料, 取花蕾 2~3 cm 的花萼、花瓣和整条花丝作为外植体, 取花蕾 4~6 cm 时的花丝作为分段培养的外植体。

1.2 培养基和培养方法

花萼和花瓣的诱导培养基为 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 1.0 mg/L (单位下同); 整条花丝诱导培养基为 MS+6-BA 2.0+NAA 2.0+IAA 0.2; 分段花丝诱导培养基为以下 3 种: MS+NAA 0.05+BA 0.6+KT 2.0; MS+NAA 0.05+BA 0.5; MS+NAA 1.0+BA 0.2。以上培养基都添加蔗糖 3%, 琼脂 0.5%, pH 6.0, 培养温度 (24±2) °C, 光照强度 1 500~2 000 lx, 光照时间 10~12 h/d。

1.3 试验方法

1.3.1 试验设计 花萼、花瓣和整条花丝以瓶为重复, 各接 25 瓶, 每瓶 4 个外植体; 分段花丝, 设花丝部位 (A) 和培养基组合 (B) 2 个因素, 采用 2 因素随机区组设计。花丝分基部 (A1)、中部 (A2) 和顶部 (A3), 培养基为 MS+NAA 0.05+BA 0.6+KT 2.0 (B1), MS+NAA 0.05+BA 0.5 (B2), MS+NAA 1.0+BA 0.2 (B3) 3 个组合。试验设 9 个处理, 10 次重复, 共 90 瓶, 每瓶接 8 个花丝段。接种后每周观察记录各处理下外植体的成活数、愈伤组织脱分化数和不定芽再分化数, 15 周后对数据进行统计分析。

1.3.2 材料处理与消毒 将采集的花蕾用洗衣粉水清洗干净, 然后在自来水下冲洗 1~2 h, 用滤纸吸干表面水分后进行消毒。花萼、花瓣和整条花丝的消毒方法是首先将花蕾在 70% 酒精中浸泡 15 s, 然后用 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min, 最后用无菌水冲洗 3~5 遍。分段花丝的消毒方法是, 将花蕾在无水乙醇中浸蘸一下, 然后在酒精灯火焰上烧烤 40 s 即可用于接种。

1.3.3 接种 剥下花萼、花瓣和整条花丝, 分别进行接种, 花萼和花瓣凹面朝上放置, 花丝平放。将分段培养的花丝按基部、中部、顶部切分成 3 部分, 按部位分别接种。

2 结果与分析

2.1 花萼、花瓣和整条花丝愈伤诱导及芽分化比较

从表 1 可以看出, 3 种花器官愈伤组织诱导率均较高 (诱导率均大于 80%), 诱导能力依次为花萼>花瓣>花丝。花萼自接种后 13 d 左右体积开始膨大, 28 d 左右在基部产生愈伤组织, 这与花瓣相一致。而花丝接种 1 周后体积就开始膨大, 但产生愈伤组织时间较晚, 发生在接种后 40 d 左右。3 种花器官不定芽再分化能力依次为花萼>花瓣>花丝, 它们由愈伤组织到再分化器官

第一作者简介: 赵得萍 (1982-), 女, 在读硕士, 研究方向为观赏植物遗传育种。E-mail: zhaodep@126.com。

基金项目: 国家科技部农业科技成果转化资助项目 (05EFN216300380)。

收稿日期: 2007-09-13

的时间为 3 周左右。

表 1 花萼、花瓣和整条花丝愈伤组织诱导及芽分化比较

外植体	接种数	形成愈伤数	愈伤诱导率/%	芽分化数	芽分化率/%
花萼	100	92	92.0	89	89.0
花瓣	100	83	83.0	76	76.0
花丝	100	81	81.0	58	58.0

2.2 培养基对分段花丝愈伤诱导及芽分化的影响

由图 1 可看出,在 3 种培养基上,各段花丝都是从接种 1 周后产生愈伤组织,在接种后 2~3 周内 B3 培养基上的愈伤化速度较快,从第 4 周后开始减慢,其最终愈伤率最高,达到 92.7%。其他 2 种培养基上各段花丝愈伤化一直保持较慢速度,且愈伤率也较低,B1 培养基上的愈伤率为 80.9%,B2 培养基上仅为 64.9%。方差分析表明,3 种培养基对分段花丝愈伤诱导率影响差异极显著(见表 2)。

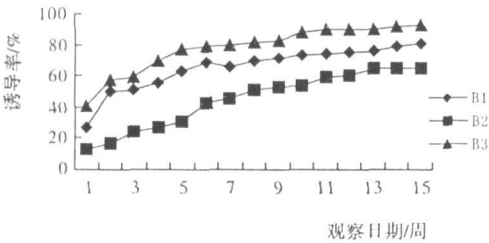


图 1 不同培养基上的愈伤组织诱导率变化

表 2 培养基对分段花丝愈伤诱导及芽分化影响的差异显著性比较

培养基	愈伤诱导率/%	差异显著性		芽分化率/%	差异显著性	
		0.05	0.01		0.05	0.01
B3	92.7	a	A	72.9	a	A
B1	80.9	b	B	50.1	b	B
B2	64.9	c	C	41.2	b	B

SE=0.28 SE=1.76

在 3 种培养基上,各段花丝的不定芽分化都是从第 4 周开始,都表现出在 4~8 周分化速度较慢,8 周以后分化速度明显加快,且一直保持快速分化的态势。在整个分化过程中培养基 B3 上的分化速度明显高于其他 2 种培养基上的分化速度。由表 2 看出,B3 培养基上的不定芽分化率最高,与其它 2 种培养基有极显著差异($P<0.01$),培养基 B2 上不定芽再分化率最低。

2.3 分段花丝各部位对愈伤诱导及芽分化的影响

由图 2 和表 2 可看出,基部、中部和顶部花丝都从接种 1 周后产生愈伤组织,基部花丝在前期愈伤率高于中部和顶部花丝,且增加速度快,一直到第 7 周愈伤率达到 80.8%,此后愈伤化基本停止。中部花丝从接种后第 4 周愈伤化速度明显增加,并一直保持快速增长,最终愈伤率达 97.4%,高于其他 2 个部位的愈伤率;顶部

花丝的愈伤诱导变化趋势与中部花丝相似,只是其愈伤率始终低于其他 2 个部位,最终愈伤率为 64%。方差分析表明,3 部分花丝的愈伤组织诱导率之间差异极显著。由此得出,花丝中部是诱导愈伤组织分化的最佳部位。

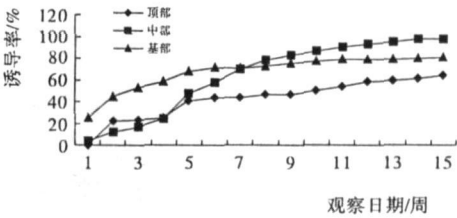


图 2 分段花丝各部位愈伤组织诱导率的变化

表 3 分段花丝各部位愈伤组织诱导及芽分化的差异显著性比较

培养基	愈伤诱导率/%	差异显著性		芽分化率/%	差异显著性	
		0.05	0.01		0.05	0.01
A2	97.4	a	A	70.9	a	A
A1	80.8	b	B	57.8	b	B
A3	64.0	c	C	28.8	c	C

SE=0.28 SE=1.76

表 4 培养基及花丝部位互作对分段花丝愈伤诱导及芽分化影响的差异显著性比较

部位+培养基	愈伤率/%	差异显著性		部位+培养基	芽分化率/%	差异显著性	
		0.05	0.01			0.05	0.01
A2B3	100.0	a	A	A2B3	100.0	a	A
A2B1	97.2	b	B	A3B3	88.6	b	B
A2B2	95.1	c	C	A2B2	65.9	c	C
A3B3	93.2	c	C	A2B1	46.5	cd	C
A1B3	87.1	d	D	A1B3	45.9	cd	C
A3B1	83.9	e	E	A3B1	43.6	de	CD
A3B2	65.2	f	F	A3B2	41.3	e	D
A1B1	56.4	g	G	A1B2	29.5	e	D
A1B2	48.7	h	H	A1B1	10.9	e	D

SE=0.49 SE=3.05

3 个部位花丝的芽分化启动是发生在接种后第 4~7 周,在这一阶段以基部花丝启动最早,其次是中部花丝,顶部花丝启动最迟。第 7 周后,3 个部位花丝同时进入不定芽快速分化阶段,中部花丝一直保持很强的分化态势,其次是基部,顶部花丝分化态势较弱。由表 3 看出,中部花丝的不定芽再分化率最高,为 70.9%,顶部花丝的不定芽再分化率最低,只有 28.8%,3 部分花丝的不定芽再分化率之间差异极显著。

2.4 培养基及花丝部位互作对分段花丝愈伤组织诱导及芽分化的影响

通过对培养基及花丝部位互作对分段花丝愈伤诱导及芽分化影响的差异显著性比较(表 4),结果可知,处理为 A2B3(中部花丝×培养基)时,愈伤组织诱导率和不定芽再分化率都达到 100%,与其他处理组合有极显著差异。因此在 Sorbonne 的花丝离体培养中应该选用

花丝中部作外植体, MS+NAA 1.0+BA 0.2 作为诱导培养基。

3 结论与讨论

试验表明, 索蚌 2~3 cm 的花蕾上的花萼、花瓣和整条花丝之间的愈伤组织诱导能力有差异, 大小顺序为: 花萼>花瓣>花丝, 这与不定芽再分化能力大小顺序相同。试验花萼和花瓣分化能力大小与刘雅莉等(2004)^[9]的研究结果相同, 她认为造成花萼分化能力比花瓣分化能力强的原因是, 花萼厚, 细胞层数多, 输导组织发达易诱导产生不定芽, 而花瓣薄, 细胞层数少, 输导组织不发达, 有 1/3 的花瓣切块接种后干枯。试验中无论是花萼还是花瓣均未出现干枯现象, 这可能与取材大小以及外植体接种块大小有关, 处于旺盛生长期的外植体具有较强的存活力和较高的分化率。刘雅莉等(2004)将花萼和花瓣切成 0.5 cm² 大小接种, 柯昉等(2005)^[9]所取花蕾时期为即将开花期, 而试验采用花萼、花瓣整块接种, 取材时期为花蕾 2~3 cm, 诱导率(花萼 90%、花瓣 83%)均高于刘雅莉等(2004)(花萼 90%、花瓣 43.5%)和柯昉等(2005)(花瓣 72%)的结果, 除了培养基的影响因素外, 与取材时期和接种方式有一定关系。因此, 通过试验可得出结论: 索蚌花萼、花瓣离体培养应以现蕾期早期, 即花蕾约 2~3 cm 时取材为宜; 接种方式以整块接种较好。

索蚌花丝的顶部、中部和基部 3 部分的分化能力不同, 其大小顺序为: 中部>基部>顶部, 并且三者间存在极显著差异。关于花丝的组织培养, 大多数都是关于花丝诱导小鳞茎和再生完整植株的研究^[7,12], 也有花丝培养器官形成的细胞组织学研究^[13-14], 这些都未涉及到花丝不同部位的差异研究, 试验首次进行了花丝顶、中、基 3 部分愈伤组织诱导能力及不定芽再分化能力的研究。通过对花丝部位和培养基配方互作对花丝愈伤组织诱

导率和不定芽再分化率影响的分析得出结论, 中部花丝在培养基 MS+NAA 1.0 mg/L+BA 0.2 mg/L 上的愈伤诱导率和不定芽再分化率均达到 100%, 且与其他处理组合有极显著差异。

参考文献

- [1] 赵祥云, 王树栋, 陈新露, 等. 百合[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [2] 王继华, 唐开学, 张仲凯, 等. 百合病毒及脱毒检测进展[J]. 北方园艺, 2004(6): 73-75.
- [3] Niimi Y, Han D S, Mori S, Kobayashi H. Detection of cucumber mosaic virus, lily symptomless virus and lily mottle virus in Lilium species by RT-PCR technique[J]. Scientia Horticulturae, 2003, 97(1): 57-63.
- [4] Sato H, Hagiwara K, Nakamura S et al. A comparison of sensitive and specific methods for the detection of Lily mottle virus in lily plant[J]. Journal of Phytopathology, 2002, 150(1): 20-24.
- [5] 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.
- [6] 柯昉, 陈华, 黄宇翔, 等. 东方百合花器离体培养和快速繁殖研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(1): 14-17.
- [7] 唐道城, 孟明, 梁玉文. 东方百合杂种系愈伤组织分化小鳞茎的研究[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2005, 9, 23(5): 1-4.
- [8] 刘金郎, 张占军, 李登绚. 东方百合生殖器官诱导鳞茎的繁殖技术研究[J]. 中国种业, 2006(8): 27-28.
- [9] 蔡宣梅, 郑伟文, 黄建华, 等. 百合花丝组织培养试验[J]. 福建农业科技, 2001(6): 13-14.
- [10] 刘芬, 王发林. 兰州百合花丝组培诱导完整植株的研究[J]. 甘肃农业科技, 2001(6): 29-30.
- [11] 罗凤霞, 徐桂华, 金丽丽, 等. 新铁炮百合微繁的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(3): 254-257.
- [12] Arzate-Fernandez A M, Nakazaki T, Okumoto Y, et al. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in Lily (Lilium longiflorum Thunb.) [J]. Plant Cell Reports, 1997, 16 (12): 836-840.
- [13] 周祖富, 艾素云, 杨美纯, 等. 火百合花丝组织培养器官形成的细胞组织学研究[J]. 亚热带植物科学, 2006, 35(2): 5-8.
- [14] 贾敬芬. 百合花丝组织培养及其细胞学研究[J]. 植物学报, 1981, 23 (1): 17-21.

Study on Floral Organ Culture of Oriental Lily

ZHAO De-ping, TANG Dao-cheng, LIU Mi-hui, GUO Zhi

(Plateau Flower Research Center of Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: The calyxes, petals and filaments of Sorbonne were explanted respectively on best medium which had selected to compare the frequency of callus initiation and buds regeneration, the filament was divided up three sections to select their preferable initiation medium and preferable position of filament. The results showed that, the calyx had high frequency of callus initiation and bud regeneration, with 92.0% and 89% respectively, petal was in second place and filament was the last one. The best callus initiation medium for divided filament culture was MS+NAA1.0 mg/L+BA0.2 mg/L; The callus initiation of different filament sections was different, the sequence was central section>basal section>top section; the frequency of callus initiation and bud regeneration of central section filament explanted on MS+NAA 1.0 mg/L+BA 0.2 mg/L was 100% either.

Key words: Oriental Lily; Tissue Culture; Calyxes; Petals; Filaments