

doi:10.11937/bfyy.20170245

油点花的组织培养与快速繁殖

贾慧梅, 李康, 康思璐, 蔡艳妮, 李会宁

(陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723001)

摘要:以油点花 *Ledebouria socialis* (Baker) Jessop 的叶片、叶柄和假鳞茎为外植体, 经表面消毒处理, 接种于不同激素配比的 MS 培养基中, 探讨油点花外植体诱导愈伤组织、丛生芽、不定根培养的最适培养基和培养条件, 以获得大量种苗, 为其人工种植及商业化水平发展提供参考依据。结果表明:不同外植体均能诱导愈伤组织的产生, 且叶片外植体最易诱导; 适合油点花愈伤组织诱导的最适培养基为 MS+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导率为 96.3%~98.8%; 而 MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 适宜于芽诱导培养, 诱导率为 91.1%; 培养基 MS+NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 适宜生根及壮苗培养, 生根率 89.5%; 练苗移栽, 其平均成活率达 86.7% 以上。

关键词:油点花; 外植体; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号:S 682.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)21-0104-05

油点花(*Ledebouria socialis* (Baker) Jessop) 属百合科油点百合属多年生草本^[1], 又名红点草、油点百合, 其主要观赏点除有斑点的叶片外, 还有肥短的紫红色假鳞茎, 是一种令人喜爱的小型肉质类观赏植物。油点花为外来小品盆栽观赏植物, 主要利用分株的方式进行繁殖, 但由于其生长缓慢, 自然繁殖系数低, 影响其经济价值。目前, 有关百合属^[2]、百合科^[3-15]植物组织培养研究有较多报道, 而尚鲜见关于油点百合属油点花的组织培养方面的研究。该试验以油点花的地上部分为外植体, 开展植株再生与快繁技术研究, 筛选其试管微繁的最适培养条件, 以期为其规模化人工种植产业的发展提供参考依据。

第一作者简介:贾慧梅(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物生物技术。E-mail: happygo21@126.com.

责任作者:李会宁(1962-), 女, 本科, 高级实验师, 研究方向为植物生物技术。E-mail: lhn@snut.edu.cn.

基金项目:陕西省教育厅基金资助项目(12JS026); 陕西省“13115”工程中心资助项目(2010ZDGC-23)。

收稿日期:2017-04-24

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试油点花引自云南昆明盆栽种苗, 于 2014 年 10 月移植于陕西理工大学生物科学与工程学院实验室, 取油点花的叶片、叶柄和假鳞茎为外植体(图 1-1)。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒处理

取油点花外植体, 置于烧杯中, 自来水冲洗 6~8 h; 无菌水冲洗 1 次; 经 75% 乙醇消毒 10~15 s, 无菌水冲洗 1 次; 再经 0.1% 升汞消毒 8~10 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 备用。将无菌处理后的叶片、叶柄和假鳞茎外植体, 分割为约 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 切块, 分别接种于添加不同激素配比的 MS 培养基中。

1.2.2 培养基设计

以 MS 为基本培养基, 添加 6-BA、NAA 激素, 组成不同的培养基配方; 添加白砂糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 5.6~5.8。

经初步筛选, 愈伤组织诱导的培养基激素组

合为 6-BA (1.0、2.0、3.0 mg · L⁻¹) 与 NAA (0.1、0.5 mg · L⁻¹);不定芽诱导培养基组合为 6-BA(0.5、1.0、2.0 mg · L⁻¹) 与 NAA(0.1、0.5 mg · L⁻¹);生根培养基设计为 6-BA(0.0、0.5、1.0 mg · L⁻¹)与 NAA(0.1、0.2、0.3 mg · L⁻¹)。

1.2.3 培养与移栽条件

每批次接种量为诱导愈伤组织 70~90 瓶、分化培养 30~50 瓶,每瓶接种 1~2 个外植体。培养温度为(24±2)℃,相对湿度 70%~85%,光照 12 h · d⁻¹,光照强度为 40 μmol · m⁻² · s⁻¹。练苗后的试管苗植株于网购栽培土基质中定植;保持空气湿度在 65%~90%,温度 23~26 ℃。每处理设 3 次重复。

1.3 项目测定

接种培养 1 周后,分批调查统计不同培养基中愈伤组织形成及诱导率、不定芽的诱导率、生根数和生根率等;接种数为有效外植体数,即除去污染数统计。愈伤组织诱导率(%)=形成愈伤组织的外植体数/接种数×100;芽的诱导率(%)=分化芽外植体数/接种数×100;生根率(%)=生根苗/接种数×100。

1.4 数据分析

去除污染结果后,统计其平均值;采用 Micro Excel 2010 软件进行分析。

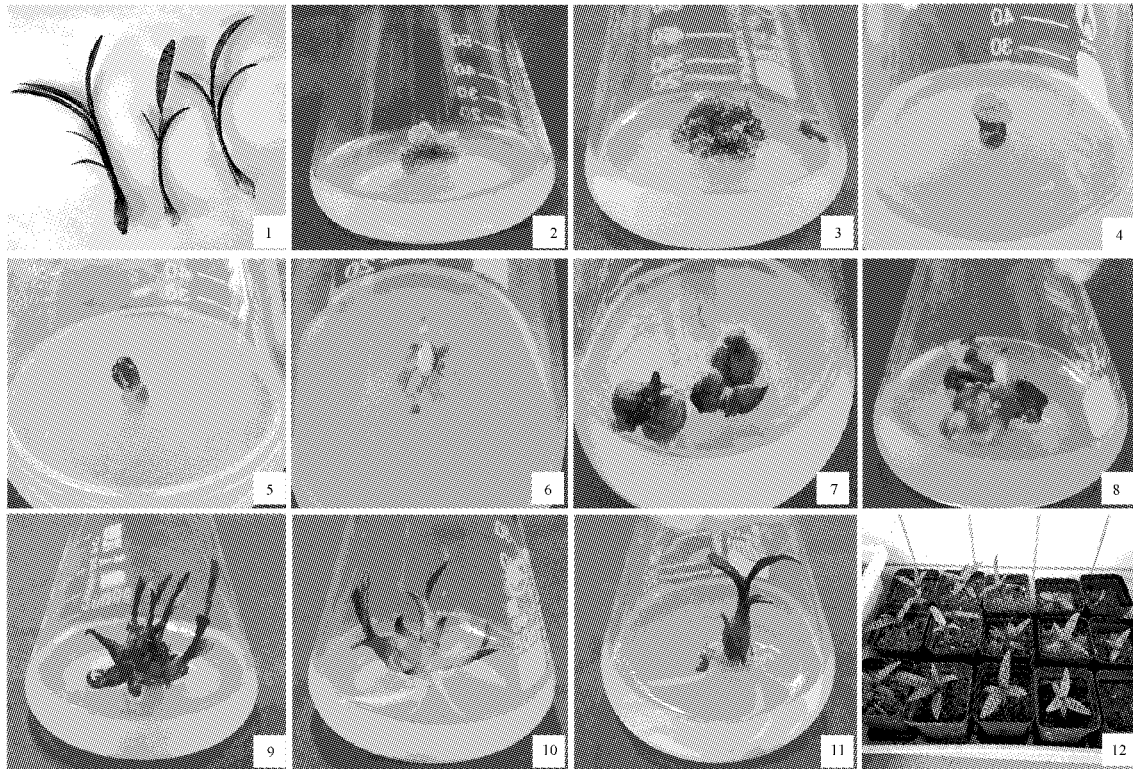
2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

愈伤组织的诱导共采用了 6 种培养基组合,接种培养 21 d 后观察统计。由表 1、图 1 可知,6 种培养基中外植体均能诱导愈伤组织发生,但不同外植体和培养基,其愈伤组织诱导和生长也有一定的差异。其中,叶片外植体出现卷曲,在切口处出现大量致密淡绿色愈伤组织;而假鳞茎外植体则出现较为疏松的愈伤组织,或较为致密愈伤组织;在同一培养基中,叶柄、假鳞茎外植体的表现也有差异,叶柄愈伤组织诱导启动较慢。比较不同培养基,其中以 MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.5 mg · L⁻¹培养基对外植体呈现出了较好的愈伤诱导效应,外植体均出现较大的变化,切口处出现大量的致密淡绿色愈伤组织,增殖较快。其余培养基表现为个别外植体有加厚,或表现为部分外植体明显增大、切口处产生少量愈伤组织。

表 1 不同培养基对油点花外植体愈伤组织诱导的影响(21 d)
Table 1 Effects of plant growth regulators on callus induction of explants from *L. socialis* (21 days)

培养基 Medium/(mg · L ⁻¹)	外植体 Explant	接种数 No. of inoculation/个	获愈伤组织数 No. of forming callus	诱导率 Induced rate/%	愈伤组织特征 Callus feature
MS+6-BA 1.0+NAA 0.1	叶片	79	72	91.1	易诱导,致密,增殖迅速
	叶柄	75	66	88.0	较易诱导启动,致密
	假鳞茎	82	75	91.5	易诱导,疏松,增殖迅速
MS+6-BA 1.0+NAA 0.5	叶片	74	65	87.8	诱导较慢,致密
	叶柄	66	55	83.3	诱导启动慢,疏松,增殖慢
	假鳞茎	71	64	90.1	较易诱导,疏松,增殖较快
MS+6-BA 2.0+NAA 0.1	叶片	73	59	80.8	诱导较慢,较致密,增殖慢
	叶柄	67	50	74.6	诱导启动慢,比较疏松
	假鳞茎	72	57	79.2	诱导较慢,疏松,增殖慢
MS+6-BA 2.0+NAA 0.5	叶片	77	75	97.4	易诱导,致密,增殖快
	叶柄	81	78	96.3	易诱导,致密,增殖较快
	假鳞茎	83	82	98.8	易诱导,疏松,增殖迅速
MS+6-BA 3.0+NAA 0.1	叶片	74	54	73.0	诱导较慢,较致密,增殖慢
	叶柄	69	48	69.6	启动缓慢,疏松,增殖慢
	假鳞茎	75	56	74.7	诱导较慢,疏松,增殖较慢
MS+6-BA 3.0+NAA 0.5	叶片	75	71	94.7	易诱导,致密,增殖快
	叶柄	79	73	92.4	较易诱导,致密,增殖较快
	假鳞茎	80	75	93.8	易诱导,疏松,增殖迅速



注:1. 示外植体;2. 假鳞茎外植体产生的疏松愈伤组织,15 d;3. 假鳞茎、叶柄外植体产生愈伤组织差异,21 d;4. 示叶柄外植体,10 d;5. 示顶芽外植体,10 d;6. 示假鳞茎外植体产生的致密愈伤组织,21 d;7. 示叶片外植体产生的致密愈伤组织,30 d;8. 示愈伤组织分化,产生不定芽原基,35 d;9. 示丛生芽生长,60 d;10. 示生根培养,10 d;11. 示再生植株,25 d;12. 示移栽成活的油点百合组培苗。

Note: 1, showing explants from *Ledebouria socialis*; 2, the loose callus produced by the bulbous, 15 days; 3, the callus differences between the bulbous and petiole explants, 21 days; 4, dedifferentiation of the petiole explant, 10 days; 5, dedifferentiation of the apical bud explant, 10 days; 6, the compact callus produced by the bulbous explants, 21 days; 7, the compact callus produced by the leaf blade, 30 days; 8, adventitious bud primordium produced by the callus differentiation, 35 days; 9, the buds growth, 60 days; 10, the rooting culture, 10 days; 11, the regenerated plants, 25 days; 12, showing the growth of transplanted shoots.

图1 油点花的组织培养

Fig. 1 Tissue culture of *Ledebouria socialis* (Liliaceae)

2.2 不定芽诱导

将培养基 MS+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 MS+6-BA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中诱导培养的愈伤组织, 切分成体积约为 0.5 cm^3 的小块, 转接到 6 种芽诱导培养基中进行培养, 16 d 后观察结果显示, 由表 2、图 1 可知, 6 种培养基中, 不同外植体来源的愈伤组织均能诱导出不定芽, 且诱导率较高; 培养基 MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 易于诱导油点花愈伤组织产生丛生芽, 其平均诱导率达 91.1%。外植体愈伤组织诱导不定芽可单个发生或成簇发生。单个不定芽芽原基直接从愈伤表面形成, 多呈“锥状”, 少数“开花状”; 成簇发生的不

定芽直接从愈伤组织表面形成, 产生绿色或紫绿色不定芽原基, 或者在愈伤组织表面“团块化”形成大量密集的圆球状芽原基突起, 肥厚的芽原基生长为丛生芽。

2.3 生根及壮苗培养

将诱导培养的油点花丛生芽, 在无菌条件下切分后, 转接到生根及壮苗培养基中培养。培养 20 d 后, 培养基中试管苗产生 2~3 条不定根, 根长约 3 cm。由表 3 可知, 6 种组合的培养基均能诱导苗外植体产生不定根, 不同浓度的 6-BA 与 NAA 对油点花生根诱导影响有一定差异, 少量的 6-BA 能诱导易生根的丛生苗, 1/2MS 不及 MS 培养的苗壮; 培养基 MS+NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 易于

表 2 不同培养基对油点花不定芽分化的影响(16 d)

Table 2 Effects of different media on differentiation of adventitious buds from callus (16 days)

培养基 Medium/(mg · L ⁻¹)	接种外植体数 No. of inoculation explants/个	生芽外植体数 No. of explants forming bud/个	诱导率 Induction rate/%
MS+6-BA 0.5+NAA 0.1	42	36	85.7
MS+6-BA 0.5+NAA 0.5	44	37	84.1
MS+6-BA 1.0+NAA 0.1	45	41	91.1
MS+6-BA 1.0+NAA 0.5	42	37	88.1
MS+6-BA 2.0+NAA 0.1	47	41	87.2
MS+6-BA 2.0+NAA 0.5	40	34	85.0

表 3 不同培养基对油点花生根培养的影响(20 d)

Table 3 Effects of different media on rooting induction (20 days)

培养基 Medium/(mg · L ⁻¹)	接种外植体数 No. of inoculation explants/个	生根外植体数 No. of rooting explants/个	诱导率 Induction rate/%	备注 Note
MS+6-BA 0.5+NAA 0.1	33	28	84.8	易于增殖与生根
MS+6-BA 1.0+NAA 0.1	35	26	74.3	丛生芽增生,有少许根产生
MS+NAA 0.2	38	34	89.5	易生根,苗壮
MS+NAA 0.3	37	31	83.8	较易生根,苗壮
1/2MS+NAA 0.1	38	30	78.9	易生根
1/2MS+NAA 0.2	36	29	80.6	较易生根

诱导不定根产生和试管苗生长。

2.4 练苗与移栽

当试管苗生长至高 4~5 cm,根系发达且根部有膨大的假鳞茎时移栽效果好。先解开封口膜扎绳,1~2 d 后松开封口膜,但不完全移去;再过 1~2 d 去掉封口膜,练苗 3~5 d 后即可移栽。

选用小号育苗花盆或植苗盘,覆好基质,浇足水。移苗基质为 1:1 混合的杀菌处理的栽培土和壤土。移栽时,从培养瓶中取出试管苗,清水洗去根部培养基,避免损伤根系;用工具在基质上扎出小穴,将苗植入,覆好基质。前期定期适量洒水,保持湿度;30 d 后转入常规管理。练苗移栽,3 组平均成活率 86.7% 以上。此外,用 1/5MS 溶液进行叶面喷洒,可促进苗的健壮生长。

3 讨论

百合科植物因重要的食用、药用及观赏价值而倍受关注,关于百合科植物组织培养及快速繁殖研究已有不少报道。报道显示,百合科不同种类或不同外植体的诱导与分化能力也不同^[3,16-17];基本培养基 MS 优于 N₆、B₅、SH 或 White 等^[3,18];刘银花等^[11]研究华重楼组培时,也充分探讨了多种激素或添加物的效应;而 BA+

NAA 为常用组合^[3-13]。崔祺等^[10]报道百合鳞片分化以 2 种方式进行,一是先形成愈伤组织,然后从愈伤组织上产生不定芽;二是不经愈伤直接产生不定芽。该课题组对油点花不同外植体愈伤组织诱导的研究发现,叶片外植体易于形成可分化的愈伤组织,且常形成肥厚的芽原基;此外,油点花的叶片、叶柄和假鳞茎外植体均能诱导出愈伤组织,但叶片愈伤组织比较致密,假鳞茎诱导出的愈伤组织比较疏松,生长快。MS 培养基中添加 6-BA 与 NAA 不同质量组合条件对油点花的不定芽和根的诱导存在差异。该试验结果与董艳芳等^[19]、赵和文等^[20]的观点不同之处,在于低浓度 NAA 更利于芽分化和继代培养,且不易产生变异,6-BA 不利于生根。LAN 等^[14]研究发现,高浓度的 2,4-D 有利于诱导 *Drimiopsis kirkii* Baker 体细胞胚和愈伤组织的发生,但在培养基中添加 NAA 则大幅减少胚胎发芽,并且激动素(KT)可以提高 2,4-D 在体细胞胚发生的诱导效率。HAQUE 等^[15]研究发现,苯基噻二唑脲(TDZ)和 2,4-D 相比较而言,TDZ 更适合诱导 *Drimiopsis kirkii* Baker 体细胞胚的分化。关于 KT、2,4-D、TDZ 对油点花愈伤组织诱导与体细胞胚发生的作用,有待下一步研究。

迄今,有关油点百合属和豹叶百合属植物的

研究报道很少。以 MS+6-BA+NAA 的组合对油点花组培研究结果,弥补了油点百合属在该领域的空白,为油点花提供了一种简单、有效、低成本快速繁殖技术,有助于其规模化人工种植及商业化水平发展。

参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国自然标本馆 CFH 2.0[EB/OL]. (2010-04-18)[2016-03-05]. www.cfh.ac.cn/50496.spage.
- [2] 李金鹏,郑春雨,刘井莉. 百合属植物的研究进展[J]. 北方园艺,2013(7):197-200.
- [3] 周欢,谢磊,郭和蓉,等. 百合科植物组织培养的研究进展[J]. 湖北农业科学,2010,49(5):1232-1237.
- [4] 杨培君,李会宁,赵桦. 独尾草的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯,2006,42(2):253-254.
- [5] 杨丽云,陈翠,吕丽芬,等. 云南重楼的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯,2008,44(5):947-948.
- [6] 宁慧,杨培君. 玉竹的组织培养与快速繁殖[J]. 西北植物学报,2009,29(11):2339-2344.
- [7] 李莺,罗明志,罗雯,等. 黄精的组织培养与植株再生[J]. 西北农业学报,2011,20(8):159-162.
- [8] 张丽英,朱萍,郭相,等. 竹叶菜的组织培养研究[J]. 中国野生植物资源,2013,32(1):24-28.
- [9] 黄素华,肖惠匀,洪燕萍. 水晶掌组织培养与快速繁殖[J]. 福建师范大学学报(自然科学版),2014,30(5):98-100.
- [10] 崔祺,贾桂霞. 3种百合组培快繁体系的优化[J]. 湖南农业大学学报,2014,40(6):621-626.
- [11] 刘银花,王跃华,唐旭,等. 华重楼植株的快速繁殖研究[J]. 中草药,2015,46(19):2925-2931.
- [12] 周新华,厉月桥,王丽云,等. 多花黄精根茎芽高效组培增殖和生根体系研究[J]. 经济林研究,2016,34(1):51-56.
- [13] 郭生虎,朱永兴,关雅静. 百合科十二卷属玉露的组培快繁关键技术研究[J]. 中国农学通报,2016,32(34):85-89.
- [14] LAN T H, HONG P I, HUANG C C, et al. High-frequency direct somatic embryogenesis from leaf tissues of *Drimiopsis kirkii* Baker[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2009, 45:44-47.
- [15] HAQUE M S, GHOSH B. Somatic embryogenesis and synthetic seed production—a biotechnological approach for true-to-type propagation and *in vitro* conservation of an ornamental bulbaceous plant *Drimiopsis kirkii* Baker[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172:4013-4024.
- [16] 张红岩,周兴,莫勇生,等. 兰州百合组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 广西科学院学报,2015,30(1):49-53.
- [17] 孙红梅,宋胜利,申屠玥,等. 亚洲百合 Strawberry and Cream 花器官组培快繁技术研究[J]. 沈阳农业大学学报,2015, 46(1):7-12.
- [18] 卢其能. 龙牙百合的组织培养和快速繁殖研究[J]. 江西农业学报,2002,14(4):43-46.
- [19] 董艳芳,郭彩霞,周媛,等. 2种德国鸢尾组织培养体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2014, 42(2): 107-112.
- [20] 赵和文,陈峥,崔金腾,等. 菠萝百合组织培养技术研究[J]. 北京农学院学报,2015,30(2):71-75.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Ledebouria socialis* (Liliaceae)

JIA Huimei, LI Kang, KANG Silu, CAI Yanni, LI Huining

(College of Biological Science and Engineering, Shaanxi Sci-Tech University/Shaanxi Province Key Laboratory of Bio-resources, Hanzhong, Shaanxi 723001)

Abstract: The leaf blade, petiole and bulbaceous from *Ledebouria socialis* (Baker) Jessop were used as explants, which were cultured on MS media supplemented with different hormones to establish a rapid propagation system. The results confirmed a reliable method, which could be used for mass propagation of *L. socialis* at the commercial level. The results showed that different explants could induce callus, while those from leaf blades were rather successful. The optimal medium for callus induction was MS+6-BA $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the induction percentage was 96.3%—98.8%; MS+6-BA $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ were suitable for differentiation of adventitious buds, and with 91.1% in induction percentage. The medium MS+NAA $0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was proper for forming roots, and rooting rate could be up to 89.5%. Transplanting experiment showed that the tissue cultured seedling grew with more than 86.7% survival rate.

Keywords: *Ledebouria socialis* (Baker) Jessop; explants; tissue culture; rapid propagation