

亚洲百合‘普瑞头’的组织培养及休眠小鳞茎获得的研究

周蕴薇, 刘艳萍, 岳莉然, 吴建慧, 刘晓东

(东北林业大学 园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:以‘普瑞头’百合为试材,研究了百合鳞片分芽及生根的最佳培养基配方,对亚洲百合休眠小鳞茎的获得进行了探讨。结果表明:鳞片分芽的最佳培养基为 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.05~0.5 mg/L,生根培养基为 1/4MS 和 1/4MS+NAA 0.5 mg/L;采用最佳配方 25℃ 组织培养‘普瑞头’百合,培养 120 d 获得深度休眠的小鳞茎。

关键词:百合;组织培养;玻璃化现象;组培小鳞茎;休眠

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)04-0146-03

‘普瑞头’百合(*Lilium* ‘Prato’)是亚洲百合杂种系(Asiatic hybrids)的一个栽培品种,花橙红色,性耐寒,在东北地区可露地栽培,是园林绿化和切花的优良材料。百合休眠现象被广大学者所承认,但国内有关百合休眠的研究主要是以商品球为材料^[1]。有关百合鳞片组培的研究报道很多^[2-4],但多集中于百合组织培养快繁体系的建立,而利用百合组培小鳞茎进行百合休眠的研究至今没有报道。因组培小鳞茎是研究百合休眠的良好体系,所以在国外,利用组织培养产生休眠小鳞茎以及利用组培小鳞茎研究百合休眠被广泛地开展起来,成为研究鳞茎休眠机理的主要手段。但国外的研究仅局限在东方百合或麝香百合,而对于亚洲百合的研究未见公开报道。该研究通过对亚洲百合品种‘普瑞头’组培体系的建立,进一步获取休眠小鳞茎,为今后利用亚洲百合组培小鳞茎研究百合休眠机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 百合‘普瑞头’快繁体系的建立

东北林业大学苗圃田间生长 1 a 的‘普瑞头’百合(*L.* ‘Prato’)球(周茎 14~16 cm)2004 年收获,贮藏在 0.5℃ 直到使用。选取休眠时期、休眠刚刚解除时期(顶芽不超过鳞茎端部 3 cm)的鳞茎和休眠早已解除(顶芽萌发,茎伸长至 10~15 cm 时的鳞茎),去掉外层鳞片,用自来水冲洗 1 h。在超净工作台上用 75% 酒精浸泡 30 s,再用饱和次氯酸钠溶液浸泡 30 s,然后用 0.1% 升汞溶液灭菌 5 min,最后用无菌水冲洗 3 次,用无菌滤纸吸干水分,将鳞片切成约 0.25 cm² 小块,以腹面朝上接

种于含不同激素配比的 MS 培养基上(30 g/L 蔗糖和 7.8 g/L 琼脂),以不加任何激素的 MS 培养基(30 g/L 蔗糖和 7.8 g/L 琼脂)作对照。30 d 后观察外植体分化情况。待诱导芽伸长并长出绿色叶片时,将其分割成单株,一部分转接到增殖培养基上,另一部分转入生根培养基上诱导生根,定期观察增殖与生根情况。培养温度是 25℃。

1.2 休眠小鳞茎的获得

2005 年 11 月从北京润博公司购买‘普瑞头’百合(*L.* ‘Prato’)球(周茎 14~16 cm)低温贮藏在 0.5℃ 直到使用。取中层鳞片,充分消毒(方法同 1.1)。将鳞片切成约 0.25 cm² 小块,以腹面朝上接种于 MS 培养基(30 g/L 蔗糖和 7.8 g/L 琼脂)和 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA。培养温度是 25℃。

休眠的测定:休眠与百合小鳞茎的形态具有一定的相关性^[5]。对培养 30 d 获得的小鳞茎每 30 d 继代培养 1 次(培养基与分芽培养基相同),继代时将萌发出的所有叶片剪掉,同时记录 30 d 内每个诱导芽萌发的叶片数量和叶片长度等。直到继代 10 d 内被剪掉叶片的小鳞茎不再产生萌发新的叶片为止,则认为该百合小鳞茎已进入休眠。

2 结果与分析

2.1 激素和外植体的生长时期对芽诱导的影响

以顶芽伸长至 10~15 cm 时的鳞茎为外植体组培快繁,无论采用何种激素配比,其分化率几乎都为零。而以处于休眠期和休眠刚刚解除的鳞茎为外植体,二者结果无差别。接种 7 d 后开始出现绿色的愈伤组织,20 d 后诱导芽生长已比较成熟。培养基中不添加 NAA 时,培养 30 d 的诱导芽在 BA 为 1.0 mg/L 的培养基上分化率和分化量都达到最高(见表 1),分别为 80.0% 和 5.50。随着 BA 浓度的增高,分化率降低,同时出现不同

第一作者简介:周蕴薇(1970-),女,博士,教授,研究方向为园林植物栽培生理与育种。E-mail:zhouyunwei@hotmail.com。

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(11523004)。

收稿日期:2010-11-19

程度的玻璃化现象,即诱导出的百合小苗较为矮粗,叶片颜色青绿呈半透明状,质地较厚而且皱缩卷曲,叶片经手轻搓易碎,诱导产生的丛生芽不能形成鳞茎。BA浓度为2.5 mg/L时玻璃化现象最为严重。由表1可知,当NAA与BA共同作用时,明显地促进了‘普瑞头’百合芽的诱导,鳞茎的分化率和分化量均明显增大,其中BA 1.0 mg/L+NAA 0.05~0.5 mg/L培养基上体现的更明显,且小苗长势良好,叶片基部膨大,突起明显,宜作鳞片分芽或增殖的培养基使用。

表1 不同激素组合和外植体的生长时期对‘普瑞头’百合芽诱导的影响

浓度/mg·L ⁻¹		接种数	不定芽分化		玻璃化比率/%
BA	NAA		分化率/%	分化量	
0	0	30	96.6	1.5	0
0.50	0	30	70.0	4.0	0
1.00	0	30	80.0	5.5	9.1
1.50	0	30	76.7	5.1	28.0
2.00	0	30	76.7	4.1	36.8
2.50	0	30	73.3	4.8	61.3
1.00	0.01	30	86.7	7.6	9.1
1.00	0.05	30	90.0	11.0	6.7
1.00	0.10	30	90.0	10.3	7.2
1.00	0.50	30	96.7	12.1	6.0
1.00	1.00	30	83.3	8.9	5.8

注:分化率指已分化形成不定芽的外植体占接种外植体的百分比;由于分化率不能表示出每个外植体分化形成不定芽的数目,因此引入分化量,分化量指每个外植体上分化形成不定芽的平均数^[6]。

2.2 激素对生根培养的影响

由表2可知,1/4MS培养基比MS和1/2MS培养基适宜‘普瑞头’百合生根培养。但生根时间缓慢,每株生根量少。1/4MS培养基中分别添加激素IBA和NAA,可大大提高生根效率和质量。生根培养14 d时,含IBA的培养基已经生出细小的根,40 d后根系发达而粗壮并带有白色毛状根。而含NAA的培养基培养14 d时,只有黄色愈伤组织形成,未浸入培养基中的部分布满白色毛状根,30 d时愈伤组织上密集分布着白色生长点,40 d时白点发育成根,每株苗上的根都呈现“爆炸式”,根短小而健壮,延长培养时间,根会继续伸长。由此可见,激素对生根培养起着重要的作用,IBA与NAA都可促进‘普瑞头’百合生根,只是含NAA培养基上的组培苗生根所需时间较长,但是每株生根量大,长势也较IBA培养基上的健壮。在添加NAA的培养基中,以1/4MS+NAA 0.5 mg/L效果好,不仅生根多,而且小苗的长势也好,而NAA含量为1.5 mg/L和3.0 mg/L时的生根较多,苗势过于纤弱。

2.3 休眠小鳞茎的形成

关于百合组培小鳞茎机理的研究很多,但是小鳞茎休眠程度逐渐加深过程中的形态没有描述。Agettaz等学者认为百合休眠存在浅休眠(低水平休眠)和深休眠,并提出百合无叶小鳞茎是深度休眠的标志。25℃条件下在‘普瑞头’的最佳繁殖培养基上组织培养120 d获得

了深度休眠的无叶小鳞茎。深度休眠的小鳞茎呈球状,鳞片抱合紧密,小鳞茎茎端(剪除老叶的位置)干黄枯萎,无萌发的新叶。在逐渐形成深度休眠小鳞茎的过程中,组培苗的叶片形态和小鳞茎形态都在逐渐发生变化(表3)。出现无叶小鳞茎可能是深度休眠的标志。由表3可看出,深休眠的小鳞茎在培养90 d以后才开始形成,到120 d也只是有0.67%,但却表明90~120 d这段时间是形成深度休眠的关键时期,小鳞茎体内控制休眠形成的主要生理生化代谢物质的积累已达到引发深度休眠的最小临界值。此时,虽然仍有新的叶片产生,并且叶片基部继续膨大,构成内层鳞片,使小鳞茎的体积增大,但是无论是新萌发的叶片数量还是叶片长度都在迅速减小,叶质也较薄,体积增大并不明显。达到深休眠后继续培养直到180 d,随着培养时间的延长,无叶小鳞茎的比例继续增加,达到15%。

表2 不同激素组合对‘普瑞头’百合鳞片生根的影响

培养基/mg·L ⁻¹			平均 每株根数	平均根长 /cm	生根率 /%
IBA	NAA				
MS	0	0	1.30	0.680	80
1/2MS	0	0	0.83	0.436	60
1/4MS	0	0	1.73	0.492	100
1/4MS	0.5	0	6.17	0.562	100
1/4MS	1.5	0	7.30	0.481	100
1/4MS	3.0	0	8.61	0.537	100
1/4MS	0	0.5	22.50	0.156	100
1/4MS	0	1.5	24.60	0.213	100
1/4MS	0	3.0	30.20	0.251	100

表3 形成休眠百合小鳞茎过程中组培苗的形态变化

培养 时间 /d	平均 叶数	平均 叶长 /cm	叶片形态	小鳞茎形态	无叶小 鳞茎率 /%
30	2.12	2.98	短宽,质厚,草绿	叶基膨大,但不抱合	0
60	4.61	3.36	长宽,质较厚,草绿	叶基膨大,开始抱合	0
90	4.58	8.59	长宽,质较薄,青绿	叶基膨大,抱合不紧	0
120	2.20	8.42	长窄,质薄,浓绿	叶基膨大,抱合较紧	0.67
150	2.00	4.25	短窄,质薄,浓绿	部分小鳞茎略呈球状	1.00
180	1.15	1.46	短宽,圆粗,浓绿	大部分小鳞茎呈球状	11.00

3 讨论

3.1 激素配比和外植体的生长时期对百合芽诱导的影响

百合不定芽诱导受培养基中外源激素配比的影响较大,最适宜的配比可大大提高繁殖系数,减少组织培养过程中的变异现象。通过对‘普瑞头’百合鳞片组培快繁的试验研究,明确了培养基中植物激素BA浓度宜在1.0~2.0 mg/L,且BA和NAA按(2~20):1的比例配合有利于芽的诱导。外植体的生长时期对组织培养芽诱导也有明显的影响,百合进入休眠至休眠解除这段时期(或休眠刚解除不久,顶芽不超过鳞茎端部3 cm)的鳞茎是较为理想的外植体。在最适培养基MS+BA 1.0

mg/L+NAA 0.05~0.5 mg/L 上鳞片分芽率高达 96.7%。对于仍在 0.5℃ 条件下低温贮藏,但休眠已解除,地上部分达 10~15 cm 时的百合种球,在最适培养基上的鳞片分芽率几乎也为零。所以采用鳞片作为繁殖材料进行离体快繁时,应选择休眠尚未解除或刚刚解除的鳞茎,其体内的营养物质还未被将要萌发的茎和叶所消耗,鳞片的活力强,分化率也高。

3.2 丛生芽诱导过程中的产生玻璃化苗的原因

玻璃化是一种生理病害,是植物组织培养中出现的特有现象。由于组织畸形,吸收与光合器官功能不全,因此玻璃化植株很难移栽成活。另外,由于分化能力降低,也很难用做继代培养、扩大繁殖的材料。产生玻璃化苗的因素与激素浓度和温湿度、通风条件有关,还受琼脂用量、离子水平、光照时间等条件的影响^[7]。已经玻璃化的试管苗,随着培养基和培养环境在培养过程中的变化也有可能逆转。该试验中出现的玻璃化现象与 BA 浓度过高有关。当将玻璃化苗转移到 BA 的浓度低于 2.0 mg/L 以下培养基中继续培养,玻璃化现象明显减轻,叶片半透明症状变得不明显,叶色由青绿变浓绿。可见适当减少细胞分裂素的浓度可以抑制玻璃化苗的产生。还可能也与容器内的湿度有关。该实验采用无透气孔的塑料膜作封口膜,培养瓶封闭较严,透气性略差,而且诱导芽过程中没有进行过任何继代操作,导致瓶内外气体交换困难,湿度过高,有害气体积聚,这些都可能是试验中玻璃化产生的原因之一。

3.3 百合组培小鳞茎的定义及组培休眠小鳞茎形成的条件

关于组培成球报道很多,但是对其形态描述和定义没有明确提出。百合组培小鳞茎的定义没有明确提出,这种情况给休眠的研究带来不便。经研究认为,百合组培小鳞茎,简称百合小鳞茎,是指在组织培养过程中,诱导芽的原基发育成叶片后,基部膨大所发育成的鳞片紧密抱合在一起形成的球状变态茎。

Aguetaz 等人的研究发现,百合小鳞茎的休眠程度与其形态存在一定的相关性^[5],认为组织培养产生的无叶小鳞茎是一种深度休眠的小鳞茎。理论上,休眠应该是一个由浅入深的过程,组织培养了一段时间还未形成

无叶小鳞茎的组培鳞茎可能也进入了休眠,Kim 等人以东方百合鳞片作外植体 20℃ 和 25℃ 条件下组织培养 11 周获得的小植株具有叶片,但是也处于休眠状态,将叶片去除,只留小鳞茎,经冷处理后休眠即可解除^[8],证实了该试验的推测。事实上,休眠的发生可以更早,Paffen 等以东方百合鳞片进行组织培养,20℃ 时培养 8 周开始表现休眠,11 周时产生低水平的休眠,高温(25℃)培养休眠发生较早,而低温(15℃)几乎不发生休眠,甚至长期培养达 26 周也不休眠^[9]。说明除了培养时间,培养温度对休眠的形成也是一个重要因素。该试验采用 25℃ 培养长达 120 d,出现无叶小鳞茎,因此会产生深度休眠的鳞茎,这也验证了 Aguetaz 等人所认为的高温既是产生无叶小鳞茎产生的条件,又是发生高度休眠的条件^[5]。同时认为,对亚洲百合 25℃ 组织培养 90 d 获得的小鳞茎虽然能萌发新的叶片但已进入休眠,是一种较低水平的休眠。当然影响休眠水平的因素还有蔗糖浓度、激素或其它未知因素的影响,是今后进一步研究百合休眠的重要内容。

参考文献

- [1] 孙红梅,李天来,李云飞. 低温解除休眠过程中兰州百合鳞茎酚类物质含量及相关酶活性变化[J]. 中国农业科学,2004,37(11):1777-1782.
- [2] 王凤兰,周厚高,黄子锋,等. 亚洲百合组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学,2005,33(5):820-821.
- [3] 李黛,谈锋. 诱导百合鳞片芽的影响因子研究[J]. 种子,2004,23(11):18-20.
- [4] 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.
- [5] Aguetaz P, Paffen A, Delvallée I, et al. The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. 1. the effects of culture conditions[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 22(3):167-172.
- [6] 刘明志,林雪艳. 激素对百合植株再生的影响[J]. 广西植物,2002,22(2):167-170.
- [7] 张东方. 植物组织培养技术[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,2004:153-155.
- [8] Kim K S, Davelaar E, Klerk G J D. Absciscic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro* [J]. Physiologia Plantarum, 1994, 90(1):59-64.
- [9] Paffen A M G, Aguetaz P, Delvallée I. The development of dormancy in lily bulblets generated *in vitro*. Acta Horticulturae, 1990, 266: 51-58.

Tissue Culture of the Asiatic Hybrids and the Dormancy of Bulblets Generated *in vitro*

ZHOU Yun-wei, LIU Yan-ping, YUE Li-ran, WU Jian-hui, LIU Xiao-dong

(College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: Taking *Lilium* 'Prato' as test material, the optimal culture medium for *Lilium* 'Prato' differentiation and rooting were studied, and made an approach to develop dormancy bulblets of the asiatic hybrids. The results showed that the optimal media for differentiating shootlet was MS+ BA 1.0 mg/L+NAA 0.05~0.5 mg/L, the media for inducing root was 1/4MS and 1/4MS+NAA 0.5 mg/L; and a high level of dormancy developed in *Lilium* 'Prato' after 120 days of culture under the optimal culture medium at 25℃.

Key words: *Lilium* spp.; tissue culture; vitrification; bulblets generated *in vitro*; dormancy