

培养条件对卷丹试管鳞茎生长和膨大的影响

任亚萍^{1,2} 刘秀群¹ 陈龙清¹

1. 华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室/园艺林学学院, 武汉 430070;

2. 河南城建学院城市规划与建筑系, 平顶山 467044

摘要 以卷丹的组培苗为试验材料, 研究不同培养方式(固体培养、固-液培养、液体浅层静置培养)、蔗糖与活性炭双因素、茉莉酸甲酯等对卷丹试管内结鳞茎的生长和膨大的影响, 以期筛选出对卷丹试管鳞茎生长和膨大有利的培养条件。结果表明: 液体培养方式对卷丹试管鳞茎膨大效果较显著, 鳞茎的平均鲜质量达到 249.84 mg, 是固体培养条件下的 3 倍, 直径>8 mm 鳞茎的产率达 54.05%, 是固体培养条件下的近 5 倍; 蔗糖和活性炭双因素试验表明, 90 g/L 蔗糖+3 g/L 活性炭是最佳浓度配比, 可使鳞茎平均鲜质量达到 479.17 mg, 最大达到 870 mg; 茉莉酸甲酯的最佳浓度为 10^{-7} mol/L, 可使鳞茎平均鲜质量达 180 mg; 鳞茎移栽对比试验表明: 鳞茎越大存活率越高, 长势越好; 直径>8 mm 的卷丹试管鳞茎移栽可以获得较高的存活率及健壮的卷丹植株。

关键词 卷丹; 试管鳞茎; 生长; 膨大; 组织培养

中图分类号 S 682.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0049-05

百合的组培苗生长势弱, 根叶细长柔软, 移栽过程中成活率低, 容易重新感染病毒, 已成为我国百合种球工厂化生产中遇到的突出问题。而通过控制组织培养条件, 培养膨大的试管鳞茎, 不仅可以促进壮苗、改善试管苗质量、缩短组培苗在大田的生长周期, 提高移栽成活率, 而且有利于种球的贮藏、运输和种质保存^[1]。

目前对百合试管内结鳞茎的研究相对比较薄弱, 主要对新铁炮百合(*Lilium formolongi*)^[2]、东方百合(*L. oriental hybrids*)^[3]、亚洲百合(*L. asiatic hybrids*)和麝香百合(*L. longiflorum*)^[4]等种类的少数品种进行了研究。Anushiri 等^[5]对亚洲百合的试验表明, 相对于葡萄糖和果糖, 蔗糖对于鳞茎膨大的作用最好。东方百合杂种系‘Casablanca’在附加 2 g/L 活性炭(AC)的培养基中获得的鳞茎平均鲜质量超过 1 100 mg^[6]。在培养方式上, 液体浅层静置对试管马铃薯的诱导和增重都要好于固体培养基^[7]。Kim 等^[8]在对大蒜的研究中发现, 相对于固体培养和用筏进行培养, 液体浅层静置更能促进鳞茎鲜质量的提高。卷丹(*Lilium lancifolium*)是具有极高观赏价值和广阔市场前景的百合属植物的一

种, 但目前对卷丹的研究还不多, 特别是对卷丹试管鳞茎的生长和膨大的研究几乎处于空白, 而液体浅层静置培养方式对于百合鳞茎膨大的影响在国内也尚未报道。本研究以花丝为外植体^[9], 在获得卷丹无菌苗的基础上, 探讨不同培养方式(固体培养、固-液培养、液体浅层静置培养)、蔗糖与活性炭双因素、茉莉酸甲酯等对卷丹试管内结鳞茎的生长和膨大的影响; 同时进行试管鳞茎的移栽对比试验, 旨在为卷丹快速繁殖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料卷丹来自华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室。以花丝为外植体, 在 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L 培养基中初代培养, 在 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 的培养基中进行继代培养, 获得无菌苗。将无菌苗从芽体分割成单芽作为诱导鳞茎的外植体。

1.2 培养方式

采用 3 种培养方式: 固体培养、固-液培养及液体浅层静置培养。固体培养基即为附加 7 g/L 琼脂

收稿日期: 2010-03-18

基金项目: 湖北省科技攻关重大项目(No. 2006AA205A04)和湖北省自然科学基金项目(2009CDB015)

任亚萍, 硕士研究生。研究方向: 园林植物种质资源。E-mail: renyaping@hncj.edu.cn

通讯作者: 刘秀群, 博士, 副教授。研究方向: 园林植物种质资源与创新。E-mail: liu_xiuqun@sina.com

的基本培养基(MS),每瓶30 mL。固-液培养基,每瓶分装25 mL固体培养基,然后注入5 mL液体培养基。液体培养基,每瓶分装15 mL,1个月更换1次培养基。灭菌前将pH值调整到5.8~6.0,培养条件为(25±2)℃,光照强度为1 500~2 000 lx,每天光照12 h。

1.3 蔗糖与活性炭(AC)双因素试验

以液体培养为基础,活性炭(AC)与蔗糖组合,形成6个处理Z1~Z6(表1),每瓶分装15 mL培养基。每月更换1次培养基。观察蔗糖与活性炭双因素对卷丹试管鳞茎生长的影响。

表1 活性炭与蔗糖组合

Table 1 The combinations of different concentrations of AC and sucrose				g/L
活性炭	蔗糖	Sucrose		
Activated charcoal	30	60	90	
0	Z1	Z2	Z3	
3	Z4	Z5	Z6	

1.4 茉莉酸甲酯(Me-JA)处理

在基本培养基(MS)中分别附加浓度为0、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L的Me-JA。

除了蔗糖处理外,其他处理的蔗糖浓度都为30 g/L。每处理接12株外植体,重复3次。培养10周后(液体培养时间为8周),剪去小鳞茎的叶片和根,测量直径及鲜质量。

1.5 试管鳞茎的移栽对比试验

将处理后的卷丹试管小鳞茎按直径大小分成8 mm以上、5~8 mm、3~5 mm 3级,每级取24粒移栽,重复3次。60 d后统计小鳞茎的存活率以及生长情况。

2 结果与分析

2.1 不同培养方式对卷丹试管鳞茎生长和膨大的影响

在接种15 d后,不同培养方式的卷丹试管苗开始表现出差异,液体培养比固体培养和固-液培养的植株生长更加旺盛。20 d后液体培养的植株开始形成鳞茎。30 d后,液体培养的培养基基本上消耗殆尽,许多叶片变枯黄,有较大鳞茎;而固体及固-液培养基上的植株叶片仍鲜绿,鳞茎较小。

通过统计固体培养、固-液培养及液体浅层静置培养3种培养方式中卷丹根的数量、根长度、叶片数量和株高4个指标,发现只有在根长方面液体培养和固-液培养有显著差异,液体培养中的根较长

(表2)。不同培养方式对于卷丹鳞茎形成数量也没有显著差异;但在鳞茎增大方面,液体培养方式效果最显著(图1)。液体培养下的鳞茎平均鲜质量达到249.84 mg,是固体条件下平均鲜质量(82.46 mg)的3倍,产生直径8 mm以上的鳞茎的比例达54.05%,而固体仅为10.26%(表3)。卷丹最大鳞茎出现在液体培养上,直径达1.12 cm。

表2 不同培养方式对卷丹叶片及根生长的影响¹⁾

Table 2 Effect of different culture systems on the growth of leaf and root of *L. lancifolium*

培养方式 Culture system	叶片数目 Number of leaves each explant	株高/cm Length of leaf	侧根数目 Number of roots each explant	根长/cm Length of root
固体培养 Solid	2.2 a	5.8 a	3.8 a	1.3 ab
固-液培养 Solid-liquid	2.5 a	6.8 a	3.2 a	1.0 b
液体培养 Liquid	2.5 a	6.8 a	3.1 a	1.7 a

1)同一栏中的不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$),下同。

Values followed by the different letter differ at $P<0.05$. The same as follows.



图1 卷丹液体培养基上获得的鳞茎(左)与固体培养基(右)的对比

Fig. 1 The contrast between *L. lancifolium* bulbils obtained from liquid (left) and solid (right) culture systems

2.2 蔗糖和活性炭双因素处理对卷丹试管鳞茎生长和膨大的影响

接种20 d后,蔗糖和活性炭双因素试验6个处理(Z1~Z6)的卷丹试管苗都已形成鳞茎。添加了活性炭的处理(Z4、Z5、Z6)的鳞茎稍大于不加活性炭的处理(Z1、Z2、Z3)。接种40 d后,各个处理间试管苗的长势表现出差异,从整体来看,Z4、Z5、Z6的根要比Z1、Z2、Z3长,而叶片数目并无显著差异(表4),这种现象可能是加入活性炭的缘故。

表3 培养方式对卷丹试管鳞茎膨大的影响

Table 3 Effect of culture systems on the enlargement of bulblets *in vitro* of *L. lancifolium*

培养方式 Culture system	鳞茎数量 Numbers of bulblets each explant	鳞茎鲜质量/mg Average fresh mass of bulblets	不同直径鳞茎的产率/% Percentage of bulblets formed in different diameters size			
			<3 mm	3~5 mm	5~8 mm	>8 mm
固体培养 Solid	1.06 a	82.46 Bb	0.00	28.21	61.54	10.26
固-液培养 Solid-liquid	1.00 a	97.94 Bb	0.00	3.57	89.29	7.14
液体培养 Liquid	1.16 a	249.84 Aa	0.00	0.00	45.95	54.05

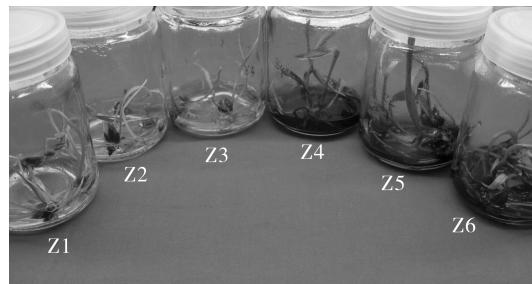


图2 Z1~Z6 处理得到的卷丹试管鳞茎

Fig. 2 Bulblets *in vitro* formed from treatmentZ1-Z6 of *L. lancifolium*

表4 蔗糖和活性炭组合对卷丹叶片及根生长的影响

Table 4 Effect of AC and sucrose combinations on the growth of leaf and root of *L. lancifolium*

处理 Treatment	叶片数目 Number of leaves each explant	株高/cm Length of leaf	侧根数目 Number of roots each explant	根长/cm Length of root
Z1	12.0 a	5.4 a	8.2 a	2.2 e
Z2	9.5 a	4.9 ab	8.8 a	3.6 cd
Z3	6.2 b	3.3 c	9.5 a	2.4 de
Z4	11.9 a	5.5 a	8.5 a	5.7 b
Z5	10.9 a	5.7 a	8.9 a	7.3 a
Z6	9.4 a	3.8 bc	6.9 a	4.7 bc

加入不同质量浓度蔗糖和活性炭的液体培养基所形成的卷丹鳞茎形态也存在差异。与Z1、Z2、Z3相比, Z4、Z5、Z6 所形成的鳞茎更大, 鳞片也更厚, 鳞

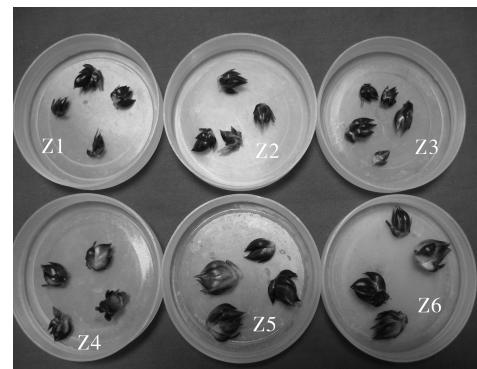


图3 剪去叶片和根后卷丹鳞茎在 Z1-Z3 与 Z4-Z6 处理上的对比

Fig. 3 The comparison of bulblets formed from treatment Z1, Z2, Z3 and Z4, Z5, Z6 after cutting the leaves and roots

茎抱合紧致(图3)。在颜色上也有不同,Z1、Z2、Z3多为紫色,Z4、Z5、Z6 多为紫红色,基部多数偏白。

加入不同质量浓度蔗糖和活性炭的液体培养基对卷丹试管鳞茎的膨大有显著作用。对于鳞茎平均鲜质量, Z5、Z6 与 Z1、Z2、Z3、Z4 差异极显著(表5), 在Z6上获得的鳞茎平均鲜质量最大, 为479.17 mg, 显著高于其他处理。卷丹获得大鳞茎较多的是Z6, 最大鳞茎直径为1.37 cm, 鲜质量达870 mg。

表5 蔗糖和活性炭组合对卷丹鳞茎生长和膨大的影响

Table 5 Effect of AC and sucrose combinations on the growth and enlargement of bulblets *in vitro* of *L. lancifolium*

处理 Treatment	鳞茎数量 Numbers of bulblets each explant	鳞茎鲜质量/mg Average fresh mass of bulblets	不同直径鳞茎比例/% Percentage of bulblets formed in different diameters size			
			<7 mm	7~10 mm	10~13 mm	>13 mm
Z1	1.13 a	211.25 Bb	38.89	38.89	22.22	0.00
Z2	1.28 a	184.06 Bb	32.35	58.82	8.82	0.00
Z3	1.09 a	222.25 Bb	37.14	51.43	11.43	0.00
Z4	1.06 a	269.94 Bb	11.76	55.88	29.41	2.95
Z5	1.22 a	409.56 Aa	12.82	30.77	48.72	7.69
Z6	1.22 a	479.17 Aa	7.69	28.21	53.85	10.25

综上所述, 双因素处理中Z6(90 g/L 蔗糖+3 g/L活性炭)的培养基是最适合卷丹鳞茎生长和膨大的。

2.3 茉莉酸甲酯(Me-JA)对卷丹试管鳞茎生长和膨大的影响

Me-JA对于卷丹植株的生长和鳞茎数目在各

表 6 Me-JA 对卷丹鳞茎生长的影响

Table 6 Effect of Me-JA concentration on the growth of bulblets *in vitro* of *L. lancifolium*

Me-JA 的浓度/(mol/L) Me-JA concentration	鳞茎数目 Numbers of bulblets each explant	鳞茎鲜质量/mg Average fresh mass of bulblets
0	1.00 a	134.06 ab
10 ⁻⁹	1.03 a	128.69 b
10 ⁻⁸	1.06 a	137.03 ab
10 ⁻⁷	1.00 a	180.00 a
10 ⁻⁶	1.16 a	173.42 ab

个处理间没有很明显的差异。 10^{-7} mol/L 的 Me-JA 处理获得了最大的卷丹平均鳞茎鲜质量, 为 180

mg, 但与对照差异并不显著(表 6)。

2.4 卷丹试管鳞茎移栽对比试验

在移栽 60 d 后调查发现, 试管鳞茎的存活率都超过了 85%。鳞茎直径 >8 mm 的生长健壮, 出苗整齐; 鳞茎直径在 5~8 mm 之间的长势稍弱; 鳞茎直径在 3~5 mm 的长势稍差。表 7 显示, 在株高、叶宽、侧根数方面, 直径 >8 mm 和直径 3~5 mm 的鳞茎差异显著; 而直径 >8 mm 的与直径 5~8 mm 的鳞茎只在叶宽方面差异显著。因此, 建议培育 8 mm 以上的卷丹试管鳞茎, 以获得较高的存活率及健壮的卷丹植株。

表 7 不同大小的卷丹鳞茎移栽后的生长情况

Table 7 The growth of bulblets of *L. lancifolium* in different diameters size

鳞茎大小 Bulblets in different size	叶片数目 Number of leaves each explant	株高/cm Length of leaf	叶宽/mm Width of leaf	侧根数目 Number of roots each explant	根长/cm Length of root
>8 mm	1.6 a	12.3 a	0.8 a	2.9 a	3.7 a
5~8 mm	1.4 a	11.5 ab	0.6 b	2.7 a	4.9 a
3~5 mm	1.7 a	9.4 b	0.5 c	1.6 b	1.3 a

3 讨 论

3 种培养方式中, 液体浅层静置促使卷丹鳞茎膨大的原因可能是由于在液体基质中, 营养更容易扩散, 更利于根对养分的吸收。此外, 液体基质每月更换 1 次, 对于补充鳞茎的营养需求和防止玻璃化苗的产生有一定作用。而固-液培养方式之所以没有明显作用, 可能是由于上部的液体基质很难扩散到下部被根部吸收。所以在鳞茎的培养过程中, 可采用液体基质为基本培养方式。

本研究中, 蔗糖和活性炭双因素处理, 对于卷丹试管鳞茎的生长和膨大的效果明显优于仅仅用蔗糖处理的效果。可能是因为活性炭对试管鳞茎的培养提供了暗环境, 刺激了根的伸长和增粗, 从而吸收更多的营养物质, 刺激叶片生长, 茂盛的叶片也会转移更多营养物质到鳞茎上。

对洋葱、大蒜等鳞茎类作物的研究中发现茉莉酸被认为是“鳞茎形成激素”^[10], 可能是由于茉莉酸类物质抑制试管苗生长, 使植株转向形成繁殖器官的结果。同时茉莉酸类物质影响碳水化合物转移, 从而促进小鳞茎的养分积累。茉莉酸甲酯诱导大蒜鳞茎形成和促进鳞茎膨大的最佳浓度为 2×10^{-6} mol/L, 诱导率可高达 97%, 鳞茎鲜质量可达 100 mg^[11]。马崇坚等^[12]发现 JA 含量与马铃薯块茎形成呈正相关, JA 的大量积累会促使块茎的大量发生。茉莉酸甲酯也可以诱导百合试管鳞茎形成和膨

大, 方少忠等^[13]发现使用茉莉酸甲酯 (5×10^{-9} mol/L) 可以获得较高的鳞茎形成率和质量。本研究中浓度为 10^{-7} mol/L 的茉莉酸甲酯最适合卷丹鳞茎增大。

本试验中尽管在移栽前因称质量统计将卷丹鳞茎根部剪掉, 但并不影响鳞茎的生长, 它很快在土壤里萌发新根并吸收养分, 维持生长。所以百合组培养中的小鳞茎不需生根也可移栽。

参 考 文 献

- [1] 张延龙, 梁建丽, 牛立新. 东方百合试管鳞茎膨大的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(6): 75-78.
- [2] 王爱琴, 周岐伟, 何飞龙, 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.
- [3] 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.
- [4] 廉美兰, 朴炫春, 孙丹. 影响百合试管鳞茎诱导及膨大的几种因素[J]. 延边大学农学学报, 2006, 28(3): 153-158.
- [5] ANUSHRI V, VIBHA D. A protocol for *in vitro* mass propagation of asitatic hybrids of lily through liquid stationary culture[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 2000, 36: 383-391.
- [6] BONG H H, BYEOUNG W Y, HEE J Y. Improvement of *in vitro* micropropagation of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates[J]. *Scientia Horticulture*, 2005, 103(3): 351-359.
- [7] 白淑霞, 安忠氏, 王静, 等. 不同培养方式对马铃薯试管苗生长与试管薯诱导的影响[J]. 中国生态农业学报, 2002, 10(2): 40-41.

- [8] KIM E K, HAHN E J, MURTHY H N, et al. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of galic in liquid cultures[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 73: 231-236.
- [9] 李晓艳, 陈莉, 辛海波, 等. 百合鳞片薄层细胞培养高效再生体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(3): 351-355.
- [10] 李春香, 周燮. Me-JA 对大蒜鳞茎膨大及内源激素含量的影响 [J]. 生命科学研究, 2002, 6(2): 183-185.
- [11] 熊正琴, 李式军, 周燮, 等. 茉莉酸甲酯和水杨酸促进大蒜试管鳞茎的形成[J]. 园艺学报, 1999, 26(6): 408-409.
- [12] 马崇坚, 谢从华, 柳俊, 等. 内源生长物质在马铃薯试管块茎形成中的作用[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(4): 389-394.
- [13] 方少忠, 蔡萱梅, 林真, 等. CEPA、ABA 和 Me-JA 对百合试管鳞茎形成的影响[J]. 江西农业学报, 2005, 17(1): 31-33.

Effect of culture condition on growth and enlargement of *Lilium lancifolium* bulblets *in vitro*

REN Ya-ping^{1,2} LIU Xiu-qun¹ CHEN Long-qing¹

1. Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education/College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Department of Urban Planning and Architecture, Henan University of Urban Construction, Pingdingshan 467044, China

Abstract To obtain the suitable culture system of bulblets growth and enlargement, the effects of different culture systems with appending sucrose, AC, Me-JA to the MS medium on the growth and enlargement of *Lilium lancifolium* bulblets *in vitro* were studied. The results showed that bulblets are significantly heavy in the liquid culture system compared with solid and solid-liquid. In the liquid culture system, *L. lancifolium* can culture bulblets with fresh mass of 249.84 mg and percentages of bulblets (diameter > 8 mm) of 54.05% on the average. The concentration of 90.0 g/L sucrose and 3.0 g/L AC was optimal to enlarge bulblets *in vitro* with the average fresh mass of 479.17 mg and the biggest of 870 mg. The concentration of 10⁻⁷ mol/L Me-JA are most favorable for enlargement of bulblets with the average fresh weight of 180 mg. The comparison trials of planting using bulblets of different diameters indicated that the survive of big bulblets were easier than that of small bulblets.

Key words *Lilium lancifolium*; bulblet *in vitro*; growth; enlargement; tissue culture

(责任编辑:张志钰)