

大花卷丹的组织培养及限制生长保存

傅伊倩, 孔滢, 刘燕*

北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京100083

摘要: 离体保存是植物种质保存的重要手段之一, 为实现对大花卷丹的保护性利用, 本文对其组织培养体系及限制生长离体保存技术进行了研究。结果表明, 在常温(23±2)℃、光照强度约为40 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照时间14 h·d⁻¹的条件下, 大花卷丹鳞片在MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹培养基中生长情况较好, 能直接诱导芽, 且小鳞茎的生长速度较快。将诱导出的小鳞茎切割后, 接种到1/2MS+NAA 0.5 mg·L⁻¹+活性炭2 g·L⁻¹生根培养基2~3周即能生根, 生长状况良好。提高MS培养基中蔗糖达90和110 g·L⁻¹时可以抑制其生长, 能够保存大花卷丹试管苗10个月, 保存过程中生长正常, 株高生长缓慢, 但根长势较快。在蔗糖浓度90 g·L⁻¹基础上再添加30 g·L⁻¹甘露醇的培养基能进一步抑制试管苗根的生长。6个月后, 转移到正常培养基上培养均能恢复生长, 其鳞片在诱导培养基上能正常分化。因此, 采用大花卷丹鳞片组织培养可以形成种苗, 在培养基中添加高蔗糖浓度和甘露醇可以使其试管苗保存1年以上。

关键词: 大花卷丹; 组织培养; 离体保存

In vitro Propagation and Restrict Growth Preservation of *Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii* Baker

FU Yi-Qian, KONG Ying, LIU Yan*

National Engineering Research Center for Floriculture, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: *In vitro* propagation and preservation, one of the major methods for plant germplasm preservation, of *Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii* is reported. The report shows that MS basic medium supplemented with 6-BA 1.0 g·L⁻¹ and NAA 0.2 g·L⁻¹ is the optimum culture for the scale. The small bulbs grow on the 1/2MS (the concentration of macroelements halved) added NAA 0.5 mg·L⁻¹ and 2 g·L⁻¹ AC for rooting. The plantlet grew slowly on the MS medium with high concentration of sucrose to 90 and 110 g·L⁻¹ for 10-month, and grew even more slowly added 90 g·L⁻¹ sucrose and another 30 g·L⁻¹ mannitol. After 6 months, the plantlet can recover growth on normal medium and the scales can induce shoots on induction medium. *L. leichtlinii* var. *maximowiczii* plantlet introducing from scales tissue culture can be preserved in MS medium with high concentration of sucrose and mannitol at least one year.

Key words: *Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii*; *in vitro* propagation; *in vitro* preservation

大花卷丹(*Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii*)为百合科百合属植物, 花下垂, 花瓣橙红色、反卷、有紫色斑点, 原产于我国东北、华北、陕西(陈心启等1980)。大花卷丹适应性很强, 耐寒性及耐荫性强(雷家军和阮冰洁2011)。我国原产的百合种类丰富, 特有种多, 是重要的遗传育种亲本材料。但是我国自然分布区内众多百合种类现面临来自人类等多方面的威胁(龙雅宜和张金政1998)。因此在利用野生百合资源时, 应重视种质资源的多途径保护及可持续利用。

植物种质资源限制生长保存是在组织培养技术的基础上发展的种质资源离体保存新途径。通

过调整培养基配方、降低培养温度等措施来减缓保存材料的生长, 延长继代周期, 减少因频繁继代而可能产生的体细胞无性系变异(伊华林和邓秀新1999)。限制生长保存技术保存种质时间较长, 恢复生长时间较短, 该技术已在马铃薯(徐君2007)、草莓(赵密珍2005)、大蒜(王艳军2003)、生姜(周逊2004)、柑橘(张娟2008)、龙眼(林秀莲2009)、柿和君迁子(艾鹏飞和罗正荣2004)等植物中应用, 但目前对百合特别是其野生种的限制生长保存研

收稿 2011-12-21 修定 2012-02-03

* 通讯作者(E-mail: chbly@sohu.com; Tel: 010-62336062)。

究较少, 仅麝香百合(*L. longiflorum*) (李文媛2009)、淡黄花百合(*L. sulphureum*) (李黛等2006)、川百合(*L. davidii*) (李文媛2009)、兰州百合(*L. davidii* var. *unicolor*) (辛淑英和谢欣1995; 张玉芹2004; 张玉芹等2011)、卷丹(*L. tigrinum*) (陈辉2005)、*L. henryi* (Bonnier和Van Tuyl 1997) 6个原始种及‘Siberia’ (陈辉2005; 陈辉等2006)、‘Avignon’、‘Connecticut King’、‘Enchantment’、‘Esther’、‘Mont Blanc’、‘Casa Blanca’、‘Star Gazer’ (Bonnier和Van Tuyl 1997)、‘Yelloween’、‘La Mancha’ (李文媛2009) 10个品种, 对大花卷丹组织培养及离体保存研究均尚未见报道。

材料与方法

1 材料

以原产于我国辽宁省铁岭地区的大花卷丹(*Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii* Baker)鳞茎为实验材料。

2 方法

2.1 大花卷丹组织培养体系的建立

大花卷丹鳞片用自来水清洗30 min后, 在超净工作台上用75%酒精浸泡30 s, 无菌水冲洗, 然后用0.1%升汞表面灭菌15 min, 无菌水冲洗5次后, 切取不带鳞芽的鳞片中下部接种于表1所示的不同植物生长调节剂浓度配比的培养基中。每瓶接种3块鳞片, 每个处理5瓶, 重复3次。统计鳞片诱导情况, 诱导倍数=每瓶诱导出的芽总数/每瓶接种鳞片数。

诱导出的芽在母体上形成小鳞茎后, 从其切割后转移至1/2MS+NAA 0.5 mg·L⁻¹+活性炭2 g·L⁻¹的生根培养基中。

培养基中蔗糖浓度为30 g·L⁻¹, 琼脂7.5 g·L⁻¹, pH值为5.8, 经121 °C高温、高压消毒灭菌20 min (琼脂浓度, pH值及灭菌方式下同)。

2.2 大花卷丹试管苗限制生长离体保存

2.2.1 蔗糖培养基筛选 选用在生根培养基中继代60 d后的试管苗用于离体保存试验。将大小一致的试管苗鳞茎切除叶和根后, 将鳞茎接种到不同蔗糖浓度MS培养基中, 设置30 (对照)、50、70、90、110 g·L⁻¹不同梯度, 对试管苗进行保存。每隔1或2个月测量一次株高, 以观测不同蔗糖浓度对试

管苗保存的影响并统计试管苗的存活率及生长情况。每瓶接种3株试管苗, 每个处理5瓶, 重复3次。

2.2.2 甘露醇培养基筛选 在添加最适蔗糖浓度的基础上, 将大小一致的试管苗鳞茎切除叶和根后接种到含0 (对照)、10、20、30、40 g·L⁻¹的甘露醇的MS培养基中, 保存6个月后统计存活率及生长情况。每管接种1株试管苗, 每个处理5瓶, 重复3次。

2.2.3 恢复培养及再生 限制生长法保存后的百合试管苗转移至1/2MS+NAA 0.5 mg·L⁻¹+2 g·L⁻¹活性炭培养基中恢复培养。将试管苗的鳞片接种在诱导芽培养基中诱导其分化。

3 组织培养及离体保存条件

常温(23±2) °C、光照强度约为40 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照时间14 h·d⁻¹。

4 数据统计及处理

根长拍照后用图像处理软件Image-Pro Plus进行测量, 数据均通过SPSS软件分析处理。

实验结果

1 6-BA和NAA浓度对大花卷丹鳞片诱导的影响

百合鳞片组织培养需加入不同浓度的6-BA及NAA来启动诱导, 并通过生长状况及诱导率来评价植物生长调节剂配比是否合适。表1为大花卷丹鳞片诱导30 d和60 d后的生长情况及芽的诱导倍数。从表1中可知, 鳞片在2号培养基(6-BA 1.0+NAA 0.2)中直接诱导芽及小鳞茎的速度较快, 其60 d的诱导倍数为5.56。而1号、3号、4号培养基中直接诱导芽的数量均少于2号, 生长情况见图1-A、B。

2 蔗糖对大花卷丹试管苗离体保存效果

高浓度的蔗糖可提高培养基的渗透势, 使细胞吸水困难, 减弱新陈代谢活动, 从而抑制培养材料的生长。大花卷丹试管苗在不同蔗糖浓度的培养基中的生长变化见图2及表2。从图2中可见, 大花卷丹试管苗在培养基中, 随着蔗糖浓度的升高, 其株高明显降低, 抑制效果较明显; 而在保存10个月后, 90和110 g·L⁻¹蔗糖浓度的培养基中试管苗株高显著低于其他浓度。从表2中可见, 随着蔗糖浓度的升高, 试管苗的根长呈现出前期增长的趋势, 蔗糖浓度到90和110 g·L⁻¹后缓慢降低。从生长情况并结合经济角度考虑, 90 g·L⁻¹蔗糖浓度在大花

表1 大花卷丹鳞片在4种不同诱导培养基中生长状况

Table 1 *L. leichtlinii* var. *maximowiczii* scales growth on induction difference medium

编号	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	生长情况		芽的诱导 倍数(60 d)
			30 d	60 d	
1	1	0.1	芽少数, 有少量愈伤组织。	芽直接成小鳞茎, 较少。	3.44±0.51
2	1	0.2	芽多数, 几乎无愈伤组织。	大部分芽直接成小鳞茎, 有少量愈伤组织。	5.56±0.51
3	2	0.1	产生愈伤组织, 较多。	愈伤组织产生芽, 较小。	1.33±0.58
4	2	0.2	产生愈伤组织, 较少。	愈伤组织产生少量芽。	0.56±0.19

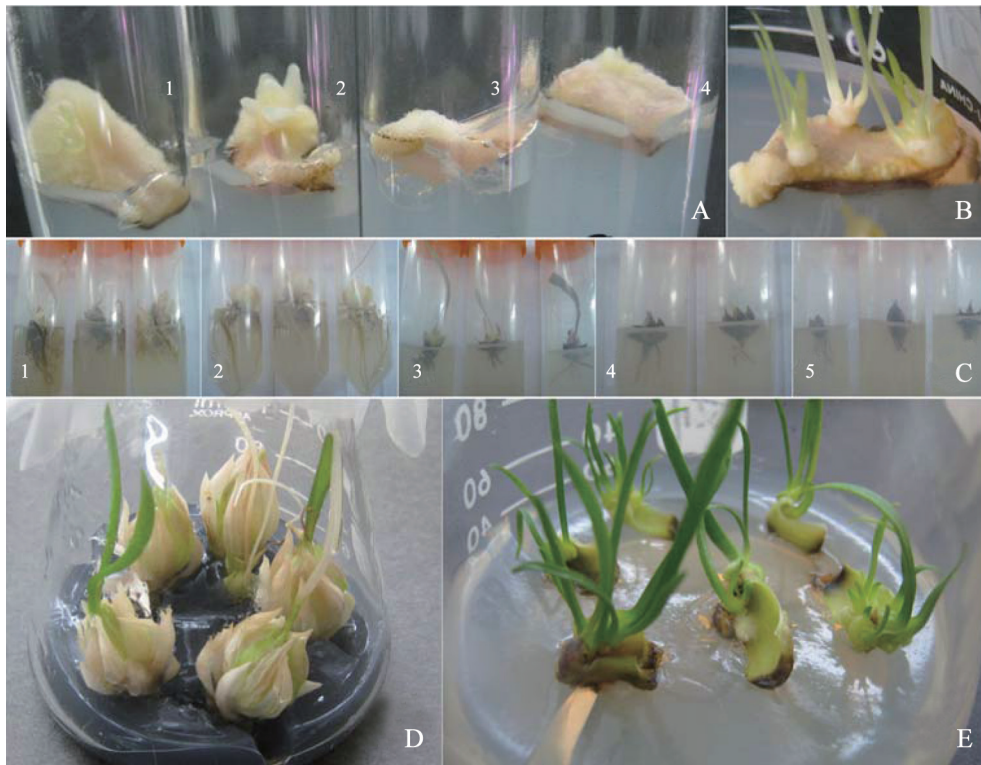


图1 大花卷丹的组织培养及限制生长保存

Fig.1 *In vitro* propagation and restrict growth preservation of *L. leichtlinii* var. *maximowiczii*

A: 大花卷丹鳞片诱导30 d后, 在编号为1~4的培养基中生长情况; B: 大花卷丹鳞片诱导60 d后, 在2号培养基中生长情况; C: 大花卷丹试管苗保存6个月在不同浓度甘露醇培养基(编号1~5)中的生长状况; D: 限制生长保存后的大花卷丹试管苗恢复生长后的状况; E: 鳞片再诱导后生长状况。

卷丹试管苗离体保存较合适。

3 甘露醇浓度对大花卷丹试管苗离体保存效果

为抑制大花卷丹在高浓度蔗糖中根的生长, 在添加90 g·L⁻¹蔗糖的培养基里继续添加甘露醇。甘露醇是常用的渗透调节剂, 因含多个羟基, 亲水性强, 造成水分逆境。大花卷丹试管苗保存在添加不同浓度甘露醇的MS培养基中6个月后的根长及株高见表3及图1-C。试管苗在未添加和添加10 g·L⁻¹甘露醇的培养基中基生叶及根生长仍然较快,

鳞茎增大明显, 且基部有小鳞茎产生。添加20 g·L⁻¹甘露醇后, 植株根长开始明显受到限制, 株高与添加10 g·L⁻¹甘露醇处理差异不显著。添加30和40 g·L⁻¹甘露醇的培养基中生长较缓慢, 植株高度及根生长量均较小, 但是在40 g·L⁻¹甘露醇的培养基中有部分试管苗已经死亡, 变黑。添加30 g·L⁻¹甘露醇的培养基中生长正常, 因此在90 g·L⁻¹蔗糖培养基中再添加30 g·L⁻¹甘露醇适合大花卷丹试管苗离体保存。

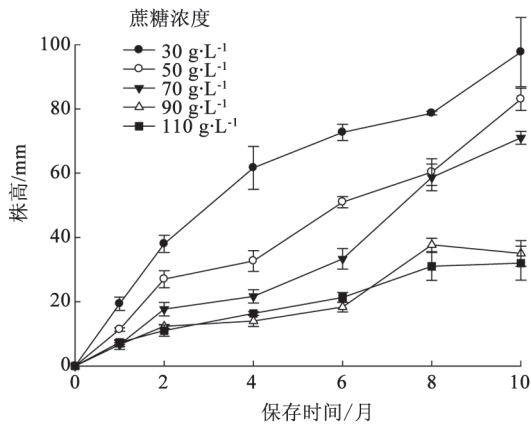


图2 大花卷丹试管苗在不同蔗糖浓度培养基中的株高变化
Fig.2 Height change of *L. leichtlinii* var. *maximowiczii* plantlet on medium with different sucrose

表2 大花卷丹在不同蔗糖浓度保存10个月后的生长情况

Table 2 Growth of *L. leichtlinii* var. *maximowiczii* plantlet on medium with different sucrose after 10 months

蔗糖浓度/g·L ⁻¹	株高/mm	根长/mm	存活率/%
30	97.67±10.69 ^a	32.24±4.55 ^d	100
50	83.00±3.46 ^b	35.00±2.90 ^{cd}	100
70	71.00±2.00 ^c	48.20±5.50 ^a	100
90	35.00±4.00 ^d	44.34±2.27 ^{ab}	100
110	32.00±5.29 ^d	40.90±2.52 ^{bc}	100

经Duncan新复极差测验,不同小写字母为差异达显著水平($P<0.05$);表3同。

4 恢复培养及再生情况

大花卷丹限制生长离体保存后,可通过对其恢复培养及再生植株的情况来检验离体保存的可行性。将试管苗转移至培养基中恢复培养,1个月后叶及根能正常生长且无异常。试管苗的鳞片接种在诱导芽培养基(2号)上能正常分化(图1-D、E)。

讨 论

目前对大花卷丹组织培养研究尚未见报道,

因此本实验中对大花卷丹鳞片诱导使用了百合属其他植物组织培养研究中(段超2009;郭海滨和雷家军2006;李景原等1995;李筱帆2009;刘冬云等2005;辛培尧和罗思宝2007;周子发2009)常用的NAA和6-BA两种激素。从文献中可知百合鳞片的诱导过程大致为:初代培养时,使用诱导培养基诱导产生不定芽;继代培养时,使用增殖培养基将不定芽切割成单芽诱导形成丛生芽,将丛生芽再继代后形成小鳞茎球,并诱导生根。在本实验的预实验中发现大花卷丹并不适合上述多次继代方法,因诱导产生的丛生芽并不能形成正常的小鳞茎球,且周期较长,多次继代过程中增加了污染的可能性。本实验中一步形成小鳞茎球的方法,较适用于大花卷丹的快速繁殖,且能保证试管苗早期正常成球。但实验中芽增殖倍数较低,有待进一步研究。

高浓度的蔗糖可通过提高培养基的渗透势负值,使细胞吸水困难,减弱新陈代谢活动,从而抑制培养材料的生长,是在限制生长离体保存时常用的添加物。而蔗糖本身是植物组织培养中最常用且效果较好的生长发育的碳源及能源,大多数植物细胞对蔗糖的需求范围是10~50 g·L⁻¹(潘瑞焱2003)。在本实验中添加30 g·L⁻¹、50 g·L⁻¹甚至70 g·L⁻¹蔗糖的培养基中,株高都有较明显的增长,说明在此浓度范围内对百合生长起到促进的作用。抑制株高生长主要出现在添加90 g·L⁻¹和110 g·L⁻¹蔗糖的培养基中,这与大部分的百合限制生长离体实验结果一致(Bonnier和Van Tuyt 1997;陈辉2005;陈辉等2006;张玉芹2004)。但在实验中发现,高浓度的蔗糖对株高抑制的同时,在一定的浓度范围内促进了根的生长。这可能与百合作为球根花卉,其鳞茎中淀粉含量比较高有关,而在有些文献(胡凤荣等2006;任亚萍等2011;张延龙等2006)中也曾使用高浓度的蔗糖来促进百合试管鳞

表3 大花卷丹试管苗在添加不同浓度甘露醇培养基中保存6个月后的生长状况

Table 3 Growth of *L. leichtlinii* var. *maximowiczii* plantlet on medium with different mannitol after 6 months

编号	甘露醇浓度/g·L ⁻¹	株高/mm	根长/mm	存活率/%	备注
1	0	44.33±2.08 ^a	55.33±5.03 ^a	100	有子球产生
2	10	37.33±6.43 ^{ab}	38.33±6.50 ^b	100	-
3	20	31.67±7.64 ^b	15.00±2.00 ^c	100	-
4	30	5.33±2.08 ^c	12.67±2.51 ^c	100	-
5	40	2.33±0.58 ^c	10.33±1.52 ^c	87	出现死株

茎生长和膨大,从而达到壮苗的作用。因此,单独使用蔗糖对百合的离体保存的可行性需要进一步的研究。

甘露醇为渗透性化合物,是在限制生长离体保存时常用的添加物。为抑制在添加 $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的培养基中根的生长,进一步实验中添加了甘露醇。大花卷丹试管苗株高及根长抑制更加明显,尤其是添加 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇的培养基,与对食用兰州百合(辛淑英和谢欣1995;张玉芹等2011)和淡黄花百合(李黛等2006)单独使用甘露醇限制生长离体保存结果一致,存活率均达90%以上。然而陈辉等(2006)对‘西伯利亚’百合研究发现,添加 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇的培养基中试管苗生长较缓慢,但是试管苗基部有愈伤组织生成,而且植株明显玻璃化,认为添加甘露醇保存百合试管苗的效果不理想。本实验中没有出现试管苗玻璃化,但是也发现 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇的培养基中有部分试管苗已经死亡,变黑。由于甘露醇能进一步控制植株株高且能抑制根的生长,因此认为甘露醇可用于百合限制生长离体保存,但使用时需控制其浓度。

参考文献

- 艾鹏飞, 罗正荣(2004). 柿和君迁子试管苗缓慢生长法保存及其遗传稳定性研究. 园艺学报, 31 (4): 441~446
- 陈辉(2005). 百合种质离体保存技术研究[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学
- 陈辉, 陈晓玲, 陈龙清, 卢新雄(2006). 百合种质资源限制生长法保存研究. 园艺学报, 33 (4): 789~793
- 陈心启, 许介眉, 梁松筠, 吉占和, 郎楷永, 毛祖美, 徐朗然(1980). 中国植物志(第十四卷-百合科). 北京: 科学出版社, 145~147
- 段超(2009). 几种百合组织培养及多倍体育种技术的研究[硕士论文]. 北京: 北京林业大学
- 郭海滨, 雷家军(2006). 卷丹百合鳞片及珠芽组织培养研究. 中国农学通报, 22 (2): 72~74
- 胡凤荣, 席梦利, 刘光欣, 王鹏凯, 张睿婧, 池坚, 施季森(2006). 东方百合鳞茎快速增长的组培体系研究. 分子植物育种, 4 (6): 882~886
- 雷家军, 阮冰洁(2011). 大花卷丹与亚洲百合、东方百合种间杂交及胚培养研究. 东北农业大学学报, 42 (4): 66~71
- 李黛, 曾艳玲, 魏福伦(2006). 淡黄花百合的离体保存. 贵阳学院学报(自然科学版), 1 (3): 45~47
- 李景原, 李大卫, 毛健民(1995). 山丹的组织培养和再生鳞茎的形态解剖学研究. 河南师范大学学报(自然科学版), 23 (1): 102~104
- 李文媛(2009). 部分百合资源收集、保存和评价研究[硕士论文]. 北京: 北京林业大学
- 李筱帆(2009). 几种百合组织培养及体细胞胚发生技术的研究[硕士论文]. 北京: 北京林业大学
- 林秀莲(2009). 龙眼胚性愈伤组织限制生长保存及其生理与遗传机理的研究[硕士论文]. 福州: 福建农林大学
- 刘冬云, 梁海永, 史宝胜, 张彦广, 杨敏生(2005). 野生山丹的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 41 (5): 641
- 龙雅宜, 张金政(1998). 百合属植物资源的保护与利用. 植物资源与环境, 7 (1): 40~44
- 潘瑞焯(2003). 植物组织培养(第3版). 广州: 广东高等教育出版社
- 任亚萍, 刘秀群, 陈龙清(2011). 培养条件对卷丹试管鳞茎生长和膨大的影响. 华中农业大学学报, 30 (1): 49~53
- 王艳军(2003). 大蒜离体保存技术初步研究[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学
- 辛培尧, 罗思宝(2007). 岷江百合组织培养和快速繁殖. 亚热带植物科学, 36 (4): 57
- 辛淑英, 谢欣(1995). 甘露醇浓度对百合种质离体保存的影响. 作物品种资源, (3): 50~52
- 徐君(2007). 马铃薯种质资源慢生长保存研究[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学
- 伊华林, 邓秀新(1999). 植物种质离体保存技术研究进展. 植物学通报, 16 (5): 574~581
- 张娟(2008). 柑橘试管苗种质保存及其内源激素变化研究[硕士论文]. 福州: 福建农林大学
- 张延龙, 梁建丽, 牛立新(2006). 东方百合试管鳞茎膨大的研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 34 (6): 75~78
- 张玉芹(2004). 食用百合种质资源离体保存技术初步研究[硕士论文]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学
- 张玉芹, 李锡香, 王海平(2011). 食用百合种质资源离体保存技术研究. 北方园艺, (2): 149~151
- 赵密珍(2005). 草莓茎尖离体保存研究[硕士论文]. 南京: 南京农业大学
- 周逊(2004). 生姜组织培养快繁及离体保存技术研究[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学
- 周子发(2009). 秦巴山区野生百合组培特性及其耐热性研究[硕士论文]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学
- Bonnier FJM, Van Tuyl JM (1997). Long term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. Plant Cell Tiss Org Cult, 49: 81~87