

# 兰州百合器官离体培养外植体位置效应观察\*

龙春林<sup>1</sup>, 程治英<sup>1</sup>, 王俐<sup>2</sup>, 左太春<sup>2</sup>

(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201)

**摘要:** 探讨兰州百合 (*Lilium davidii* var. *unicolor*) 鳞茎鳞片、叶片和根的不同切段的培养效应。结果表明: 其切段不定芽的分化速度和数量是下段 > 中段 > 上段。芽的诱导和增殖的最适外植体为鳞茎鳞片, 兰州百合离体培养中鳞片不定芽诱导和快速繁殖的培养基为 MS + BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L, 增殖培养基与诱导培养基相同, 3 周左右不定芽开始分化。叶和根不同部位中不定芽的发育能力大体与鳞茎鳞片一致, 但低于鳞片, 较适宜的培养基为 MS + BA 2 mg/L + NAA 0.4 mg/L, 生根培养基为 1/2 MS + NAA 0.3 mg/L, 约 15 d 生根, 生根率大于 95%。月增殖率为 1:4, 整个繁殖周期约需 3 个月。

**关键词:** 兰州百合; 离体培养; 外植体位置效应

中图分类号: Q 945 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2004)02-0221-05

## Position Effect on the Propagation *in vitro* of Different Explants from *Lilium davidii* var. *unicolor*

LONG Chun-Lin<sup>1</sup>, CHENG Zhi-Ying<sup>1</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, ZUO Tai-Chun<sup>2</sup>

(1 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

2 School of Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** The propagation *in vitro* of *Lilium davidii* var. *unicolor* were conducted with different parts of scales, leaves and roots respectively as explants. The results revealed that the proliferation speed and differentiation quantity of adventitious shoots were as follows: lower part > median part > upper part. The most suitable explants for multiple shoot differentiation and rapid growth *in vitro* propagation of lily is bulb-scale, on the media of MS + BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L. Media for proliferation of leaf and root was the same as for shoot bulb-scale, and differentiation occurred in three weeks. The developmental potentialities of adventitious shoots in different parts of leaf and root are in accordance with bulb-scale, though they are lower than that of bulb-scale. Roots were induced from buds on the media of 1/2 MS + NAA 0.3 mg/L. The rooting rate could be over 95%. The proliferation rate reached 1:4 per month. The whole propagation cycle was about three months.

**Key words:** *Lilium davidii* var. *unicolor*; Tissue culture; Position effect of explants

\* 基金项目: 国家科技部 (Ministry of Science and Technology of China, 2001DEA 10009) 国家基金 (National Science Foundation of China, 30170102) 云南省项目 (Yunnan Province, 2001C0058M & 2001PY017)

收稿日期: 2003-07-10, 2003-10-05 接受发表

作者简介: 龙春林 (1964-) 男, 湖南人, 理学博士, 研究员, 从事植物资源学和生物多样性研究。

兰州百合 ( *Lilium davidii* var. *unicolor* ) 又称大王百合、甜百合和平陆百合等。它除具有观赏价值外, 还可药用和食用。兰州百合品质优 ( 个大、肉厚、纯白、甘甜 ) , 抗病性强和产量高 ( 每公顷 22 500 kg , 单个鳞茎最重者达 0.5 kg ) , 比其它食用百合如龙牙百合、宜兴百合更适宜在云南种植 ( 和毓光, 1988 ) 。但兰州百合的子球长成商品球, 在昆明地区约需 3 至 4 年, 以鳞茎为主的常规无性繁殖, 繁殖速度慢, 浪费商品球, 病毒在鳞茎逐年种植中积累, 造成品质和优良性状的退化。采用组织培养方法对兰州百合进行快速繁殖, 可望在短时间内生产大量优质种苗, 提供给云南广阔山区种植。

运用组织培养方法, 对兰州百合开展的研究工作报告较多, 如多倍体育种 ( 黄济明, 1983 ) , 花药培养 ( 谷祝平等, 1982a ) , 未授粉子房培养 ( 谷祝平等, 1982b ) , 花丝的组培及其细胞学观察 ( 贾敬芬等, 1981 ) , 鳞片离体培养与培养基、光和温度的关系 ( 王月芬, 1987 ; 王月芬等, 1991 ) , 兰州百合花粉低温贮存及精细胞的制备 ( 陈仲颖等, 1995 ) , 兰州百合离体鳞片不同位置小鳞茎的分化状况与激素调节关系 ( 王季林, 1987 ; 杨成德等, 1988 ) , 以及与兰州百合小鳞茎形成过程中的生理生化变化的关系 ( 张正方等, 1985 ) 等。

在兰州百合根和叶的组培实验中, 不同部位切段的不定芽 ( 或小鳞茎 ) 在分化上是否也存在差异? 我们有针对性地进行了实验和观察。

1 材料与方法

1.1 材料

兰州百合鳞茎鳞片、试管苗叶和根的切段。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 兰州百合鳞片, 用自来水冲洗干净后, 用 75% 酒精溶液处理 30 s , 0.1% 升汞水溶液消毒 15 min , 无菌水冲洗 4 至 5 次, 每次 5 min , 用无菌纸吸干材料上所带的水分。在鳞片切口处去掉 2 ~ 3 mm 后, 切为上、中、下 3 段, 接入含不同植物激素的培养基中。

1.2.2 培养条件 鳞片不定芽的诱导和快繁培养基为 MS + BA 2 mg/L ( 单位下同 ) + NAA 0.2 ( pH 为 5.8 ) , MS + BA 2 + NAA 0.4 为根、叶诱导和繁殖培养基, 试管苗生根培养基为 1/2 MS + NAA 0.3。培养条件为温度 27 ± 2℃ , 光照强度 2000 lx , 光照时间 12 h/d。

1.2.3 种植炼苗基质 栽苗基质用挖地基时深处污染少的黄土一份与过筛腐叶土两份均匀混合, 经 1/20 甲醛溶液消毒, 密封 24 h , 打开周边覆盖塑料薄膜, 约 6 d 后装袋使用。

2 结果

2.1 鳞茎鳞片不定芽的诱导繁殖

鳞片接种在 MS + BA 2 + NAA 0.2 培养基上, 两周左右的鳞茎鳞片颜色由白变绿, 约 3 周时鳞茎鳞片腹面膨胀, 鳞片切口处出现单个或排列成数个的白色小突起 ( 新产生不定芽 ) , 这些产生不定芽的鳞片可切割、置于 MS + BA 2 + NAA 0.2 培养基上增殖。影响因素有植物激素种类、组合与数量 ( 表 1 ) 以及鳞片不同切段在鳞片中的位置 ( 表 2 ) 。结果表明, 以 BA ( 2 mg/L ) 和 0.2 mg/L NAA 对鳞片分化不定芽作用最好, 在鳞片下部产生的不定芽数量最多。

2.2 根段不定芽的诱导

取试管苗长约 2 ~ 5 cm 的根切为 2 ~ 3 段, 即根尖、中部和基部。在 MS + BA 2 + NAA

0.4 的培养基上培养，约 37 d 根基部切口处开始产生不定芽，分化率为 30%；约 40 d 根尖部分才出现不定芽，分化率仅为 10%（根中段，因污染数目达不到 30 个样本数的统计标准，故不列入）。长约 2 cm 的完整根段，培养在 MS + BA 2 + NAA 0.2 的培养基上，28 d 分化不定芽，芽分化率达 30%，而在 MS + BA 2 + NAA 0.4 的培养基上，完整根段 20 d 分化出芽，分化率达 50%。由此可以看出：MS + BA 2 + NAA 0.4 的培养基，在试验范围内更适宜根切段不定芽的分化。

表 1 植物激素对鳞茎鳞片不定芽分化的影响  
Table 1 Impact of plant hormone on differentiation of adventitious shoot from scale

培养基/mgL <sup>-1</sup>	分化不定芽所需天数	分化率/%（接种 90 d 后统计）
BA 2 + NAA 0.2	16 d 开始分化不定芽	98
BA 2 + NAA 0.4	30 d 开始分化不定芽	50
BA 2	28 d 开始分化不定芽	80
NAA 0.2	90 d 开始分化不定芽	67

表 2 鳞片不同部位对不定芽分化的影响  
Table 2 Impact of different parts on differentiation of adventitious shoot from scale

鳞片部位	不定芽分化天数/d	分化率/%	分化芽数/外植体
上部	53	1.5	2
中部	22	36	4
下部	20	91	10
完整鳞片	18	95	7

注：每处理试验鳞片总数为 30 片；培养基为 MS + BA 2 + NAA 0.2。培养 90 d 后统计分化率。

不定芽发生部位多在根切口处，根中部也有不定芽分化，并伴随着愈伤组织产生。将 2~3 cm 长的根切为 2 段，一般根基部的分化率大于根尖部分（表 3）。

表 3 培养基对根切段不同部位芽分化的影响  
Table 3 Impact of media on differentiation of adventitious shoot from root

培养基/mgL <sup>-1</sup>	根尖部分	根基部	完整根
BA 2 + NAA 0.4	40 d 初芽，分化率 10%	37 d 初芽，分化率 30%	20 d 初芽，分化率 50%
BA 2 + NAA 0.2			28 d 初芽，分化率 30%

2.3 叶段不定芽的诱导

将试管苗长 3 cm 左右的叶片，按长度等分为叶尖、中部和叶基部，分别接种在 MS + BA 2 + NAA 0.2 的培养基上，经过 37 d 培养，叶尖部约 10% 的外植体分化出芽，叶中段约 20% 分化率，而叶基部分化率达 50%，长约 2 cm 的完整的叶切段在 MS + BA 2 + NAA 0.2 和 MS + BA 2 + NAA 0.4 上培养，两种培养基上叶段均 28 d 始产生不定芽，且芽分化率均达 50%，但在后面的培养基上叶段产生的不定芽数是前面培养基上培养叶段产生芽数的 1 倍，达 10 个（表 4）。

2.4 生根培养

兰州百合产生的不定芽，在继代培养中增殖，不定芽长至 5 cm 左右时切割下来，接在 1/2 MS NAA 0.3 的培养基上培养，15 d 左右，便可生根，生根率大于 95%。

表 4 培养基对叶切段不同部位芽分化的影响

Table 4 Impact of media on differentiations of adventitious shoot from leaf

培养基/mgL <sup>-1</sup>	叶尖部分	叶基部	叶中部	全叶
BA 2 + NAA 0.2				28 d 初芽, 50% 分化
BA 2 + NAA 0.4	37d 初芽, 10% 分化	37d 初芽, 50% 分化	37d 初芽, 20% 分化	28d 初芽, 50% 分化, 但 出芽率为上面的 2 倍

2.5 移栽

生根后的试管苗长至高约 3 ~ 5 cm 时, 便可移入已消毒过的基质中, 细心管理不伤试管苗的叶片和根尖, 以防伤口染菌, 用塑料薄膜覆盖, 每天 11 时至 14 时, 视苗生长状况进行通风, 随着试管苗对外环境的适应, 逐渐加长通风时间, 待试管苗长出新叶后, 可揭膜粗放管理, 移苗成活率大于 95%。

2.6 讨论

Robb (1957) 指出, 百合鳞片培养产生的细胞形态建成类型和频率, 依赖于发生外植体原有的部位。以鳞片下部形成小鳞茎的能力最强, 中部次之, 上部无能力分化小鳞茎。这一结果后来得到许多实验的证实。张正芳等 (1985) 证实: 百合鳞片无论什么部位, 都能诱导出小鳞茎, 只是部位不同产生小鳞茎的频率和诱导小鳞茎发生的时间有先后之分。我们的实验结果与张正芳等的结果一致。

在兰州百合的离体培养中, 不仅鳞片表现出位置效应, 其根段和叶段在培养中也存在位置效应, 即根段和叶的基部分化能力最强, 中段其次, 上段最差, 显示出与鳞片培养类似规律。

对兰州百合鳞片培养中表现的位置效应, 杨成德等 (1988) 认为是鳞片不同位置其切块的内源激素差异造成的。他们的实验结果显示: 鳞片内脱落酸 (ABA) 含量高低为: 下段 < 中段 < 上段, 为 9.7 μg/100 个切块 (单位下同) < 15.94 < 42.67; 细胞分裂素 (CTK) 的含量高低为: 下段 > 中段 > 上段, 即为 1.94 > 1.37 > 1.12; 赤霉素 (GA) 含量也分别为: 27.1 > 20.8 > 2.2。不同部位小鳞茎分化能力差异的原因之一, 可能与其生长促进物质与生长抑制物质的相对含量有关, 受两类激素的平衡所控制。

我们对兰州百合根段和叶段培养中, 表现出类似鳞茎鳞片培养中的位置效应。推测为是否兰州百合根和叶中的内源植物激素 (ABA, CTK 和 GA 等), 也存在类似的浓度梯度分布问题, 待进一步证实。

国内外大量研究表明, 单子叶植物的薄壁细胞一般不容易回复到分生组织状态。但百合科植物例外, 以兰州百合鳞茎鳞片、根和叶片等外植体组培进行脱分化时, 均具有获得初生分生组织的趋势。这为兰州百合各种组织、器官等诱导与分化, 以及规模化生产提供了可能。采用兰州百合根段和叶段培养, 大大增加了外植体来源 (约增加 10 倍以上)。

兰州百合的鳞茎、根和叶片等外植体, 可以切割为 2 至 3 段培养, 均能诱导与分化不定芽。但它们所处位置不同, 不定芽分化能力的大小也不同, 从不定芽出现时间早晚和诱导丛芽数来看, 鳞片为基部 > 中部 > 上部, 根部为基部 > 根尖, 叶片为基部 > 中部 > 叶尖。我们认为不同外源激素对百合鳞片分化小鳞茎有一定作用, 但不能改变鳞片上、中、下三部份分化能力的内在差异。造成这种现象的原因, 我们认为与外植体营养状况有关。

因为百合器官原茎的形态发生过程是细胞内旺盛的能量代谢过程。例如鳞片培养中，外围肥厚鳞片分化不定芽的能力比内部较小而薄的鳞片强，一片鳞茎鳞片的厚度也是基部 > 中部 > 上部。另外鳞片分化能力与外加植物激素种类和浓度关系也很大。李宝平等（1992）认为，百合的鳞茎是贮藏器官，同时又是无性繁殖器官，从植株的整体情况来讲，它位于中间偏下部位，从遗传学的角度出发，这种情况应全息于每个鳞片即鳞片中偏下，对小鳞茎发生有较强的遗传势，小鳞茎发生能力中下部最强，顶部差，符合生物全息率的遗传优势理论。

### 〔参 考 文 献〕

- Chen ZY (陈仲颖), Zhu GL (朱广廉), Tsao ZX (曹宗巽), 1995. Isolation and purification of viable sperm cells from spored bicellular pollen of *Lilium davidii* Duch [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **37** (8): 589—593
- He YG (和毓光), 1988. Report of introducing *Lilium davidii* Duch. var. *unicolor* [J]. *Yunnan Forest Sci Tech* (云南林业科技), (1): 33—37
- Huang JM (黄济明), 1982. Breeding of a hybrid between *Lilium regele* and *Lilium davidii* var. *willmottiae* [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), **9** (3): 51—56
- Huang JM (黄济明), 1983. Tissue culture of lily and its polyploidy experiment *in vitro* [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), **10** (2): 125—127
- Gu ZP (谷祝平), Cheng KC (郑国桴), 1982a. Studies on induction of pollen plantlets from the anther cultures of lily [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **24** (1): 28—32
- Gu ZP (谷祝平), Cheng KC (郑国桴), 1982b. *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of lily and its embryological observations [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **25** (1): 24—27
- Jia JF (贾敬芬), Gu ZP (谷祝平), Cheng KC (郑国桴), 1981. Tissue culture of lily filament and its cytological observation [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **23** (1): 17—21
- Li BP (李宝平), Hao JP (郝建平), 1992. Report on developmental environment of bulblets and clone ratio from bulb squama of *Lilium davidii*. by tissue culture [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **9** (suppl.): 30
- Robb SM, 1957. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* [J]. *J Exp Bot*, **8**: 348—352
- Wang JL (王季林), 1987. Observation on propagation coefficient of different parts of lily bulb sepals [J]. *J Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), **3** (1): 30
- Wang YF (王月芬), 1987. Media constituents for tissue culture of *Lilium davidii* [J]. *J Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), **3** (2): 18—23
- Wang YF (王月芬), Lu WZ (陆维忠), 1991. Impact of light and temperature on somatic tissue culture of *Lilium davidii* [J]. *J Jiangsu Agricultural Sci* (江苏农业科学), **7** (5): 53—54
- Yang DC (杨成德), Chong K (种康), 1988. Impact of plant hormone on differentiation of bulblet from different parts of *Lilium davidii* bulb squama [J]. *J Lanzhou Univ* (兰州大学学报), **24** (3): 95—99
- Zhang ZF (张正芳), Ni X (倪祥), Wang SM (王守民), *et al*, 1985. Bulblet induction of lily through *in vitro* culture from bulb squama [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), **3** (2): 177—180