

## 无病毒百合组培种球快速繁殖体系的建立

徐品三,刘华夏

(大连理工大学环境与生命学院,大连 116023)

**摘要:**以铁炮百合(*Lilium Longiflorum*)感病种球为材料,对热处理后的种球进行了培养基附加物和移栽基质的优化,建立了无病毒组培种球快速繁殖体系。结果表明:以MS为基本培养基,当附加植物激素NAA和KT时能促进子球再生,再生率达86%以上,在0.2 mg/L NAA和0.4 mg/L KT的培养基中平均再生子球数显著增多;附加5 mg/L多效唑培养基能促进子球增大,3 mg/L多效唑有利于子球再分化;活性炭对子球增大无明显影响,但适当浓度的活性炭能提高培养子球的品质;高浓度蔗糖能促进子球增大,但对子球再分化有抑制影响。蛭石:土、珍珠岩以及珍珠岩:土作为基质时,均能达到较高的成活率和株高,但在珍珠岩:土为3:1作为基质移栽组培球,其成活率和生长状况最佳。37℃热处理随着处理天数的增加,处理后培养鳞片的成活率和子球再生率显著下降,但处理20天子球再生率只能达40%左右,但LSV检出率明显低于未处理的种球,脱毒率达95%以上。

**关键词:**百合;热处理;病毒检测;子球快繁;户外移栽

中图分类号:S 682.2 文献标识码:A

### Establishment of *In vitro* Rapid Propagation System on Virus-free Bulblets of *Lilium* spp.

Xu Pinsan, Liu Huaxia

(School of Environmental & Biological Science & Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116023)

**Abstract:** Virus-free *in vitro* bulblet rapid propagation system was established using *Lilium Longiflorum* as experimental material. The results showed that the best medium for bulblets regeneration from bulb scales was MS+KT 0.4 mg/L+NAA0.2 mg/L. Optimum bulblet enlargement was observed in medium with Paclobutrazol 5mg/L, while Paclobutrazol in concentration 3 mg/L was propitious to bulblet formation. The quality of bulblets can be enhanced in the medium with appropriate concentration of AC. Medium with 90g/L sucrose can promote bulblet enlargement but inhibit bulblet formation. The best matrix for the highest surviving rate and best growth situation was perlite/soil(3:1). About 50% bulb scales survived and regenerated after the treatment of high temperature 37℃ for 20 days, the effectiveness of eliminating virus with the method got to more than 95%.

**Key words:** *Lilium* spp., heat treatment, virus-detection, rapid propagation, transplantation

百合(*Lilium* spp.)为百合科百合属多年生球根类花卉,是目前世界上最受欢迎的高档切花之一。近年来,随着百合在国内外鲜切花市场的走俏,百合种球和鲜切花生产逐年增加。由于百合易受病毒病侵染,不但中国繁殖的种球质量不佳,进口的种球也不能连年使用,不得不每年花掉大量外汇从荷兰等国进口。因

此培育无病毒种球,尽早实现百合种球国产化早已是中国的一项长期国策。目前在中国百合种球生产主要依靠鳞片扦插,子球培育成母球的方法获得,但该方法存在病毒感染率高、种球品质退化快、不能重复使用等缺点。近年通过组织培养快速繁殖百合种球的报道增多,但大多数研究报道主要侧重于不同外植体对百合

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目“siRNA抑制百合无症病毒(LSV)表达的研究”(30771760);大连市科技局计划项目“百合无病毒组培种球产业化生产及配套栽培技术示范体系的建立”(2006B10NC140)。

**第一作者简介:**徐品三,男,1958年出生,研究生学历,博士,研究方向为百合组织培养及分子育种,在百合种球脱毒及转基因研究中发表过多篇论文。通信地址:116023 大连市凌工路2号大连理工大学环境与生命学院, Tel:0411-84706356-606, E-mail: xupinsan@hotmail.com。

收稿日期:2008-12-29,修回日期:2009-03-30。

再生效果的研究,或是利用组培苗叶片不同部位进行快速繁殖和结鳞茎的研究<sup>[1-2]</sup>,而对无病毒百合组培子球的获得、培养外植体的再生、子球增大以及出瓶移栽等多因素的系统研究的报道几乎没有。

此研究以建立完善的无病毒百合组培种球快速繁殖体系为目标,通过热处理获得无病毒组培种球,对影响百合外植体分化、子球增大以及移栽后的生长发育等诸多影响因素进行了系统研究,为今后利用组培技术获取无病毒种球,培育优良品种,加速植株更新复壮提供技术参考,为中国百合无病毒种球产业化生产奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料铁炮百合(*Lilium Longiflorum*)‘白天堂’3年生种球(周径约12~14 cm),由大连佛伦德球根花卉有限公司提供。百合病毒检测所用 Trizol、反转录、PCR 试剂等购于大连宝生物有限公司。于2008年7月在大连理工大学环境与生命学院完成试验。

### 1.2 方法

1.2.1 种球病毒检测及热处理 采用 RT-PCR 法<sup>[3]</sup>进行百合无病毒(LSV)检测;用 Trizol 法(此实验用 1 ml),

取百合叶片(约0.1 g)提取总 RNA,将提取的 RNA 溶解于 20  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O 中。以模板 RNA 0.8  $\mu$ l、下游引物 1  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 4.2  $\mu$ l 配置引物混合液,采用 5 $\times$ M-MLV Buffer 2  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTP Mixture 1  $\mu$ l, 40 U/ $\mu$ l RNase Inhibitor 0.25  $\mu$ l, 200 U/ $\mu$ l RTase M-MLV 0.25  $\mu$ l, 加 ddH<sub>2</sub>O 补足至总体积 10  $\mu$ l。42  $^{\circ}$ C 放置 1 h, 70  $^{\circ}$ C 放置 15 min, 合成 cDNA。取 2  $\mu$ l cDNA 溶液为模板,上下游引物各 1  $\mu$ l, 变性 45 s, 扩增 60 s, 35 次循环,进行 PCR 扩增。

将感染该病毒的供试种球放入 37  $^{\circ}$ C 恒温箱中分别进行 10 天和 20 天热处理。

1.2.2 母球鳞片培养子球再生 对热处理后的母球进行如下处理和培养:首先冲洗母球,去除外层病斑或损伤的鳞片,将好的鳞片从鳞茎上剥离下来,洗涤剂浸泡、清洗后,用 75% 的酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗,再用 0.1% 升汞消毒 15 min, 无菌水冲洗 4~5 次。将灭菌后的鳞片切成方块(5 mm $\times$ 5 mm), 内侧向上接种到含有不同生长调节剂(见表 1)的 MS 基本培养基中,所有培养基均添加 30 g/L 蔗糖, 5 g/L 琼脂, pH 调到 5.8。培养条件为:温度(24 $\pm$ 1)  $^{\circ}$ C, 光照 4000 lx(16 h/天)。培养 6 周后,调查统计鳞片分化情况。

表 1 热处理及生长调节剂对铁炮百合母球鳞片再生子球的影响

热处理时间/天	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	存活率/%	子球再生率/%
0	0.5	0.1	85.9a*	76.7a
	1.0	0.2	87.3a	71.7a
10	0.5	0.1	80.9b	76.7a
	1.0	0.2	75.3bc	66.7b
20	0.5	0.1	63.4c	43.3c
	1.0	0.2	61.8cd	30.0cd

注:\*同一列不同字母代表邓肯氏分析 5% 水平差异显著。

1.2.3 子球鳞片诱导小子球扩增 以母球鳞片分化出的子球为外植体,将子球鳞片做成切口接种于含有不同生长调节剂(见表 2)的 MS 基本培养基中。其他添加物和培养条件同上。每处理设 3 个重复,每重复 10 个外植体。培养 6 周后,调查统计小子球再生情况。

1.2.4 组培子球诱导增大 挑选直径约为 0.4 cm 的再生子球为外植体接种在以下 3 组培养基中:第一组:MS+5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖+1、3、5 mg/L 多效唑(PP<sub>333</sub>);第二组:MS+5 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖+2、4、6、10 g/L 活性炭(AC);第三组:MS+5 g/L 琼脂+30、60、90 g/L 蔗糖。其他培养条件同上。每处理设 3 个重复,每重复 12 个外植体。培养 6 周后,用游标卡尺测量子球的直径,进行统计分析。

1.2.5 组培球的户外移栽 将组配苗出瓶炼苗 2 天后,洗去附着在根上的培养基,用 500 倍多菌灵浸泡 20 min 灭菌,选取子球直径为 1~1.5 cm 的组配苗,移栽于经过 30 min 高压灭菌后的四种组合基质上:①蛭石,②蛭石:土 3:1,③珍珠岩,④珍珠岩:土 3:1。将移栽后的种苗放置在设有防虫网的温室中,8 周后统计生长情况,同时进行病毒检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 热处理和生长调节剂对母球鳞片诱导子球再生的影响

母球鳞片接种到培养基上,其成活率因热处理和热处理的时间不同而有所差异,尤其热处理后的母球鳞片比未处理的鳞片降低明显,并随着处理时

间的增加成活率递减;生长调节剂的配比对热处理后的鳞片成活无显著影响(表1)。成活后的鳞片颜色逐渐由浅黄转绿,10天左右鳞片基部略膨大,15天左右开始出现浅绿色小鳞茎状突起,25天左右突起逐渐分化出小子球。由成活鳞片再生子球的能力上差异明显,处理的时间越长再生率越低,处理20天要比未处理的鳞片子球再生率低一倍左右;对于热处理后的材料,在MS培养基中添加0.5 mg/L 6-BA和0.1 mg/L NAA时,表现出有利于诱导子球再生的倾向。

### 2.2 生长调节剂不同配比对子球鳞片培养小子球分化的影响

生长素IBA和NAA对诱导子球再分化没有明显的差异,但高浓度的生长素有抑制子球分化的倾向(表2)。再分化强弱与细胞分裂素密切相关,其顺序为KT、2-ip、ZT,尤其当KT与NAA组合时,其分化率和每个外植体上形成平均子球数都最高,分化率达85%以上。当0.2 mg/L NAA与0.4 mg/L KT组合时,平均形成子球数达3.8个。ZT的添加对子球的形成和平均形成子球数明显低于其他两种细胞分裂素的作用。

表2 生长调节剂不同配比对铁炮百合子球鳞片离体分化的影响

生长调节剂/(mg/L)					分化率/%	再生子球数
IBA	NAA	2-ip	KT	ZT		
0.1	0	0.2	0	0	70.00±0.15 ab*	1.30±0.17 bc
0.1	0	0.4	0	0	70.00±0.12 ab	1.46±0.54 bc
0.2	0	0.4	0	0	66.67±0.23 c	1.54±0.42 bc
0	0.1	0.2	0	0	83.00±0.00 ab	2.67±0.43 b
0	0.1	0.4	0	0	56.67±0.22 c	2.26±0.54 b
0	0.2	0.4	0	0	73.33±0.07 ab	2.39±0.39 b
0.1	0	0	0.2	0	70.00±0.00 ab	1.37±0.09 bc
0.1	0	0	0.4	0	60.00±0.06 ab	1.23±0.07 c
0.2	0	0	0.4	0	56.67±0.24 c	1.98±0.20 bc
0	0.1	0	0.2	0	98.00±0.00 a	2.37±0.09 b
0	0.1	0	0.4	0	93.33±0.18 a	2.62±0.15 b
0	0.2	0	0.4	0	86.67±0.07 ab	3.78±0.18 a
0.1	0	0	0	0.2	76.67±0.03 ab	1.30±0.11 c
0.1	0	0	0	0.4	66.67±0.15 bc	1.45±0.12 bc
0.2	0	0	0	0.4	63.33±0.19 bc	1.18±0.25 c
0	0.1	0	0	0.2	36.67±0.12 d	1.94±0.15 bc
0	0.1	0	0	0.4	40.00±0.12 d	0.67±0.33 c
0	0.2	0	0	0.4	26.67±0.20 d	0.63±0.38 c

注:\*为平均值±标准误差;同一列不同字母代表邓肯氏分析5%水平差异显著

### 2.3 蔗糖、多效唑(Pacllobutrazol, PP<sub>333</sub>)、活性炭(Activated Charcoal, AC)对组培子球增大及分化的影响

随着蔗糖、多效唑和活性炭浓度的增加,子球直径增大倍数也随之增高(见表3)。添加5.0 PP<sub>333</sub> mg/L对子球增大效果最显著,直径增大倍数平均值为4.06,最大值为4.75,最大直径达1.9 cm;其次依次为90g/L蔗糖、10 g/L AC,增大倍数分别为3.04与2.88。在增大的同时,组培子球基部会分化出小子球,随着蔗糖、多效唑和活性炭的浓度降低,每个子球平均再分化小子球数增加,在添加1.0 mg/L PP<sub>333</sub>培养基中再生小子球数最多,平均为2.90个;当添加3.0 mg/L PP<sub>333</sub>时,子球

的分化率最高为52.8%。在添加蔗糖和多效唑的处理中,随着浓度的升高,子球的叶片与根的生长受到了明显的抑制,植株矮小,鳞片增厚。实验结果表明:多效唑对子球的增大和再分化具有明显的促进作用,即5.0 mg/L PP<sub>333</sub>适合百合组培子球增大,3.0 mg/L PP<sub>333</sub>诱导子球再生效果最好。

### 2.4 不同栽培基质对组培种球移栽后的影响及病毒检测

移栽后,蛭石加土、珍珠岩和珍珠岩加土处理均达到100%成活率,其中长势最好的是珍珠岩加土基质,组培苗生长快,植株高,根系发达(表4)。蛭石加土和珍珠岩基质虽然成活率也达到了100%,但是苗较弱,生长不够旺盛,根系少。只用蛭石为基质时不但成活

率低,而且株高明显矮小。试验结果表明:最适合百合组培苗移栽的介质是珍珠岩:土为3:1。热处理10天百合无症病毒的检出率和未经处理无太大差别,都能达

到50%的脱毒率。热处理20天的检出率要明显低于前两者,尤其是在没有添加土壤的基质中栽培的植株病毒检出率为0,说明土壤容易引起病毒再感染。

表3 培养基添加蔗糖、多效唑和活性炭对铁炮百合子球增大及再分化的影响

蔗糖/(g/L)	PP <sub>333</sub> /(mg/L)	AC/(g/L)	增大倍数	再生子球数	分化率/%
30	0	0	2.24±0.08 cd*	2.43±0.20 ab	41.7 ab
60	0	0	2.71±0.10 bc	1.83±0.08 ab	33.0 c
90	0	0	3.04±0.10 b	1.83±0.17 ab	13.9 d
30	1	0	1.83±0.06 e	2.90±0.74 a	33.3 c
30	3	0	2.42±0.10 c	1.92±0.51 ab	52.8 a
30	5	0	4.06±0.10 a	1.00±0.00 b	33.3 c
30	0	2	2.26±0.14 cd	1.00±0.00 b	17.0 d
30	0	4	2.46±0.08 c	1.57±0.30 ab	19.0 d
30	0	6	2.74±0.11 bc	2.00±0.00 ab	11.0 d
30	0	10	2.88±0.08 b	0.00±0.00 c	0.0 e

注:\*为平均值±标准误差;同一列不同字母代表邓肯氏分析5%水平差异显著。

表4 不同栽培基质对组培种球移栽后的影响及百合无症病毒检测

基质	成活率/%	根数/cm	植株高度/cm	干热处理后的LSV检出率/%		
				0天	10天	20天
蛭石	75	9.0 a*	4.9 b	40	35	0
蛭石:土 3:1	100	6.4 b	10.2 a	50	40	5
珍珠岩	100	6.2 b	10.2 a	20	20	0
珍珠岩:土 3:1	100	9.0a	9.3 a	30	25	2

注:\*为同一列不同字母代表邓肯氏分析5%水平差异显著;LSV.百合无症病毒。

### 3 讨论

高温可抑制植物病毒复制或杀死病毒已在有些植物上得到证明,但热处理的温度和时间不同植物差异很大<sup>[4]</sup>,热处理的效果如何也受处理方式、处理材料等影响<sup>[5]</sup>。一般来讲热处理温度越高脱毒效果越好,但活体植物的耐受温度是有限的,所以要在生长温度与致死温度之间找到最佳温度,才能达到最佳效果。

为了建立百合高效的再生繁殖体系,一般用组培子球鳞片诱导子球再生,不仅能提高繁殖速度,而且通过组织培养新品种选育以及获得转基因个体都必须首先建立再生体系。尽管百合鳞片培养的研究论文很多,但由于不同品种间差异<sup>[6-7]</sup>、不同外植体差异<sup>[8]</sup>以及培养条件的差异,其研究结果多种多样。通过查阅大量文献,NAA与6-BA这两种生长调节剂已被广泛应用于百合的组织培养中<sup>[9-10]</sup>,但是笔者在实际中却发现,对于铁炮百合6-BA与NAA搭配诱导出的苗不易成球,且生长缓慢,浓度过高的话,所诱导出的鳞茎多为畸形苗,也许是因为所用的母球材料当时的生理状况所致。在用子球鳞片做外植体时,也表现出低浓度

生长调节剂对诱导子球形成有一定促进作用,在NAA、IBA、2-ip、ZT、KT的不同组合中,NAA和KT虽然与其他三种相比没有表现出显著的优势,但诱导率、总芽数最多,而且容易成球,直径较大。

鳞茎是百合的营养贮藏器官,其周径大小直接影响地上部分的生长发育,百合组培球的直径大小是衡量其质量的重要指标。多效唑是一种植物生长延缓剂,能改变同化物的分配,使同化物运输到正在生长的球茎上,促进球茎的形成与生长。王爱勤等<sup>[11]</sup>研究表明:多效唑对百合根、叶生长有抑制作用,浓度越高越明显,而对鳞茎的形成及增大有明显的促进作用。笔者也得出了相同的结论,多效唑5.0 mg/L时组培子球增大效果好,多效唑3.0 mg/L时,再生效果好。一般认为活性炭能吸附培养中的有害代谢产物、调节激素配比,从而提高培养物的成活率。Loretta Bacchetta等<sup>[12]</sup>以直径为3 mm百合组培鳞茎为材料,经过1~2个月的培养,大于6 mm的鳞茎的处理均添加了0.4%的活性炭。此研究活性炭对促进组培子球的增大效果与多效唑比不明显,但培养的子球鳞片呈深绿色,说明活性炭

能改善培养基的环境,从而能提高百合子球的品质。糖的浓度对百合组培子球的生长有很大的影响,胡凤荣等<sup>[13]</sup>以东方百合‘sorbonne’‘siberia’为材料,当蔗糖浓度为 80 g/L 时,子球重和直径均达到最大。此研究随着蔗糖浓度的增加,虽然组培子球再分化能力下降,但是能促进子球直径增加而抑制鳞片叶的生长。这充分说明调节蔗糖浓度就是调节 C/N 比,增加碳水化合物在鳞茎中的累积能力是影响组培种球生长的重要因素。

由于植物病毒在植株内的分布存在不均匀性,植物茎尖培养脱毒是根据茎尖组织无病毒或浓度较低的原理。但对于百合来讲,采用该方法脱毒操作繁琐、繁殖率低,到达成球时间长,不太适合无病毒种球产业化生产。在百合无病毒种球生产上,笔者<sup>[14-15]</sup>曾做过不定芽培养、抗病毒药剂处理等研究,但又存在着无病毒种球户外栽培一段时间后出现再感染植株。实验通过热处理不仅能有效的抑制病毒,而且该方法处理简单,短期内可以得到大量无病毒种球。如果对移栽户外的无病毒种球进行科学的严格管理,定期进行病毒检测,使种球保持长时间无病毒状态是完全可能的。

#### 参考文献

- [1] ANUSHRI VARSHNEY, VIBHA DHAWAN, P.S.SRIVASTAVA. A protocol for *in vitro* mass propagation of Asiatic hybrids of lily through liquid stationary culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2000, 36:383 - 391.
- [2] 乔永旭,陈超,张永平,等.东方百合“蒙蚌”离体培养再生体系的建立. *安徽农业科学*, 2003, 35(1): 67-69.
- [3] 王关林,方宏筠.植物基因工程.2版.北京:科学出版社,2002: 750-758.
- [4] 罗丽萍,杨柏云,蔡奇英,等.龙牙百合热处理及茎尖培养技术研究. *江苏农业科学*, 2005, 1: 72-73.
- [5] Pin-san Xu, Yoshiji Niimi. Evaluation of virus-free bulblets production by antiviral and/or heat treatment in *in vitro* scale cultures of *Lilium longiflorum* ‘Georgia’ and L. X. ‘Casablanca’. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 1999, 68: 640-647.
- [6] 唐东芹,钱红妹,黄丹枫,等.百合基因转化直接分化受体系统的建立. *江苏农业科学*, 2003, 3: 48-51.
- [7] 李小玲,刘雅莉,王跃进,等.亚洲百合遗传转化受体系统的建立. *干旱地区农业研究*, 2007, 25(1): 219-224.
- [8] 周艳萍,郑红娟,贾桂霞.两个亚洲百合品种离体再生体系的建立. *北京林业大学学报*, 2007, 29(1): 123-127.
- [9] 唐东芹,黄丹枫,唐克轩,等.东方百合鳞片的组织培养. *植物生理学通讯*, 2003, 39(5): 450-452.
- [10] 李爱华,杨柳,陈慧玲,等.东方百合组培快繁及试管苗健化栽培技术研究. *湖北林业科技*, 2006, 3: 5-9.
- [11] 王爱勤,周歧伟,何龙飞,等.百合试管结鳞茎的研究. *广西农业大学学报*, 1998, 17(1): 71-75.
- [12] Loretta Bacchetta, Patrizio C. Remotti, Claudia Bernardini, et al. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult*, 2003, 74: 37 - 44.
- [13] 胡凤荣,席梦利,刘光欣,等.东方百合鳞茎快速增长的组培体系研究. *分子植物育种*, 2006, 4(6): 882-886.
- [14] 徐品三,栾雨时,刘纪文,等.百合不定芽培养脱毒种球生产的研究. *植物学通报*, 2003, 3: 313-318.
- [15] Pin-san Xu, Yoshiji Niimi, Hajime Araki. Production of virus-free bulblets from callus induced from scale cultures of *Lilium longiflorum* ‘Georgia’. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 2000, 69: 97-102.