

应用生物反应器扩繁 ‘Casa Blanca’ 百合鳞茎

廉美兰¹ 朴炫春¹ 白基烨^{2*}

(¹ 延边大学农学院园艺系, 龙井 133400; ² 忠北大学尖端园艺技术开发研究中心, 韩国 清洲 361-763)

摘要: 在生物反应器内 ‘Casa Blanca’ 百合鳞茎的生长显著优于在固体培养基培养, 培养 16 周后鳞茎鲜样质量为培养初期的 22.4 倍, 但固体培养只达到 16.5 倍; 5 L 气球型生物反应器内接入 400 个小鳞茎时, 可获得 295 个 > 1.1 g 以上的鳞茎, 多于其它培养密度; 生物反应器内生产的鳞茎地上茎发生率高于在固体培养基上培养的鳞茎, 1.1 g 以上的达到 90%, 但在固体培养基培养的鳞茎, 2.1 g 以上的也只达到 65%。

关键词: 百合; 生物反应器; 组织培养; 脱毒

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 04-0479-03

1 目的、材料与方法

脱毒百合常规组织培养由于具有成本高、规模小等问题, 不能进行大量生产。生物反应器的应用可以使目前组织培养体系由小规模转向大规模, 同时降低生产成本。因此, 确立脱毒百合鳞茎在生物反应器内的大量繁殖体系, 对百合生产有着重要意义。

试验采用通过茎尖培养得到的约 2 g 大小的 ‘Casa Blanca’ 百合鳞茎, 剥去 1~2 张外鳞片, 将中部生长旺盛的鳞片切成长 1.0 cm、宽 0.5 cm 的小块, 平放于直径 9 cm、高 5 cm 的容器内, 其培养基为 MS + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 60 g/L + gelrite (凝固剂) 2.4 g/L, pH 5.8。培养温度 (25 ± 2) °C, 每天光照 16 h, 光照强度 1600 lx。培养 8 周后, 当鳞片上诱导出的小鳞茎膨大生长至约 100 mg 时, 将其切下作为材料。①在固体培养基培养: 将 6 个上述 100 mg 大小的小鳞茎接入装有 MS + 蔗糖 90 g/L + gelrite 2.4 g/L、pH 为 5.8 培养基的容器 (直径 9 cm, 高 5 cm) 内, 培养 8 周后小鳞茎质量约为 700 mg 时, 切去鳞茎的根和鳞片叶, 用上述培养基和方法, 重新继代培养 8 周。②液态培养基生物反应器培养: 将 300 个 100 mg 大小的小鳞茎接入 5 L 气球型生物反应器内, 所用培养基的成分同①, 但不加凝固剂。培养开始时加入 3 L 培养基, 培养 8 周后用 4 L 新培养基更换, 再培养 8 周。③生物反应器内培养密度: 分别在 5 L 气球型生物反应器内接入 100、200、300、400 个 100 mg 的小鳞茎, 其培养基成分及培养基更换方法与上述一致。①、②、③的培养温度 (25 ± 2) °C、黑暗培养。④把在生物反应器和固体培养基上培养 16 周后得到的鳞茎去掉根和鳞片叶, 用水冲洗后与 5 L 泥碳藓 (含水量 20%) 混合, 放入编织袋, 4 °C 冷藏。12 周后, 将已打破休眠的鳞茎按来源 (生物反应器和固体培养基培养) 分为两类, 按 ≤ 1 g、1.1~2 g、≥ 2.1 g 分成 3 类, 每个处理各取 50 个鳞茎, 种植在 20 cm × 40 cm × 10 cm 的箱子里 (珍珠岩: 泥碳藓 = 1:1), 温度 (24 ± 2) °C, 每天光照 16 h, 光照强度 1600 lx, 每周浇水 1 次。

2 结果与分析

2.1 液态培养基生物反应器和固体培养基培养对百合鳞茎生长的影响

对 6 个接入固体培养基和 300 个接入 5 L 气球型反应器内的小鳞茎, 培养 16 周后的生长状态进行调查 (表 1), 结果表明, 在生物反应器内培养的鳞茎平均鲜样质量和干样质量显著优于在固体培养

收稿日期: 2002-08-01; 修回日期: 2003-02-21

* 通讯作者

基培养的鳞茎, 鲜样质量增长率是后者的 1.4 倍。但干样质量占鲜样质量的百分率无显著性差异, 这可能是在液态培养过程中鳞茎长久处于浸泡状态, 鳞片含水量增加, 干样质量增加受到影响的结果。已有报道, 马铃薯、菊花、葡萄等植物的液态培养也优于固体培养, 这是因为液态培养时培养体可以与培养基充分接触, 营养物质快速移动到培养体表面, 从而使吸收养分的速度快于固体培养^[1-4]。

表 1 培养方法对 'Casa Blanca' 百合鳞茎生长的影响

Table 1 Effect of culture methods on bulblet growth of *Lilium* 'Casa Blanca'

培养方法 Culture methods	质量 Mass (mg/bulblet)		干样质量占鲜样质量百分率 Dry matter (%)	鲜样质量增长率 Growth rate (folds/bulblet)
	鲜样 Fresh	干样 Dry		
固体培养 Solid culture	1.7 b*	579.7 b	34.1 a	16.5
生物反应器培养 Bioreactor culture	2.3 a	752.3 a	32.7 a	22.4

注: 为 0.05 显著水平的多重比较结果。

Note: Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$.

2.2 生物反应器内培养密度对鳞茎生长的影响

将 100、200、300、400 个小鳞茎分别接入 5 L 气球型生物反应器内, 培养 16 周。由图 1 可看出, 培养密度为 200 时, 平均鳞茎鲜样质量为 2.6 g, 优于其它培养密度, 但由于鳞茎总数量少, 经济效益不高。培养密度为 100~300 时, ≥ 2.1 g 的大鳞茎所占比例最大; 密度为 400 时, 1.1~2.0 g 中等大小的鳞茎最多。

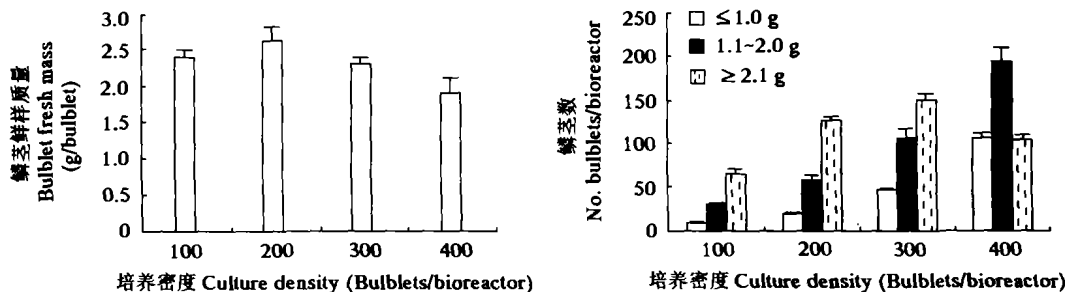


图 1 在生物反应器内培养密度对 'Casa Blanca' 百合鳞茎生长的影响

Fig. 1 Effect of culture density on bulblet growth of *Lilium* 'Casa Blanca' in bioreactor

2.3 生物反应器和固体培养基培养的鳞茎移植后的发芽

对已打破休眠鳞茎的鳞片叶和地上茎发生率进行调查 (图 2) 发现: ①所有鳞茎从移植 1 周起鳞片叶就开始产生, 移植 6 周后鳞片叶发生率都近 100%。但鳞片叶的发生对田间鳞茎的膨大并不起作用, 因为鳞片叶不久就死亡, 而发生的地上茎上长出大量叶片, 进行光合作用, 促进地下部鳞茎的膨大。所以, 地上茎的发生率非常重要。②地上茎比鳞片叶发生晚, 移植 2 周起开始产生。此时, 在生物反应器内培养的鳞茎越大则地上茎发生率越高。移植 3 周时, 鳞茎小于 1 g 的地上茎发生率没有大的变化, 但鳞茎大于 1.1 g 的地上茎发生率急剧增加, 达到 80% 以上。6 周时, 鳞茎 1.1~2.0 g 和大于 2.1 g 的都达到 90%, 而鳞茎小于 1 g 的仅为 59%。这表明在生物反应器内液体培养的鳞茎只要达到 1 g 以上, 移植后就能保证 90% 以上的地上茎发生。相比之下在固体培养基上培养的鳞茎地上茎发生率比较低, 移植 6 周后鳞茎 1.1~2.0 g 的地上茎发生率仅为 45%, 鳞茎大于 2.1 g 的也只达到 65%。笔者认为百合鳞茎在 5 L 气球型生物反应器内培养密度为 400 时, 鳞茎大于 1.1 g 的数量比其它培养密度多, 而这一大小的鳞茎移植后, 地上茎发生率能达到 90%, 是最佳的密度。而百合固体培养的鳞茎, 达到 3 g 时的地上茎发生率为 95%, 1.4 g 时仅为 30%^[5], 在本试验中鳞茎大于 2.1 g 的也只达到 65%。从这一点来看, 利用生物反应器内生产百合鳞茎, 只要求达到 1.1 g 以上即可, 而在固体培养基上培养时则要求达到 3 g 以上, 要达到这一指标必须增加培养日数, 从而造成生产成本的提高。所以利用生物反应器生产百合鳞茎, 是一

种既可达到大量生产的目的, 又可以提高经济效益的可行方法。

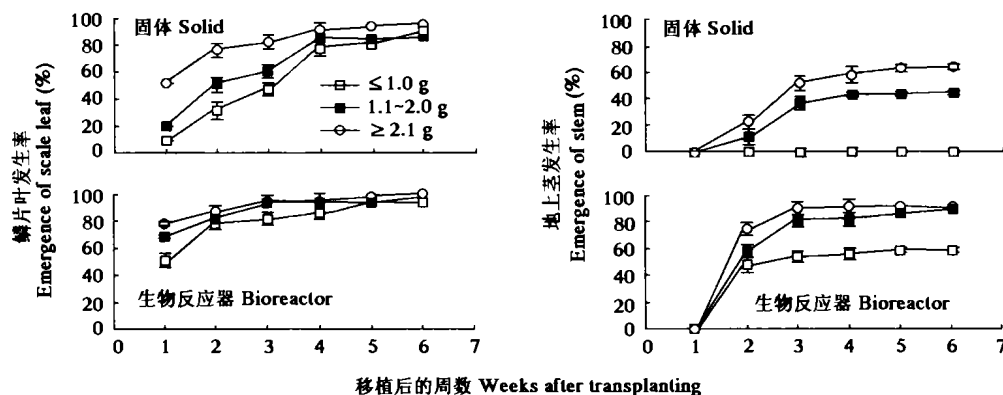


图2 'Casa Blanca' 百合鳞茎的培养方法和鳞茎大小对移植后鳞片叶及地上茎发生率的影响

Fig. 2 Emergence of scale leaf and stem in *Lilium* 'Casa Blanca' as affected by bulblet size and in vitro culture method after transplanting bulblet into soil

参考文献:

- 1 Avila A, Pereyra S M, Arguello J A. Nitrogen concentration and proportion of $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ affect potato cultivar response in solid and liquid media. HortScience, 1998, 33: 336 ~ 338
- 2 Kim S J. Effects of environmental conditions on growth and quality of *Chrysanthemum* plantlets in bioreactor culture: [Thesis]. Cheongju: Chungbuk National University, Korea, 2001. 13
- 3 Monette P L. Influence of size of culture vessel on in vitro proliferation of grape in liquid medium. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 1986, 2: 327 ~ 332
- 4 Takayama S, Akita M. The types of bioreactor used for shoots and embryos. Plant Cell Physiol., 1994, 22: 261 ~ 467
- 5 Yae B W, Han B H, Goo D H. Dormancy breaking and in vivo growth of in vitro bulblets in *Lilium* Oriental hybrid 'Casa Blanca'. J. Kor. Soc. Hort. Sci., 2001, 42: 99 ~ 102

Propagation of Bulblets in *Lilium* 'Casa Blanca' Using Bioreactor

Lian Meilan¹, Piao Xuanchun¹, and Paek Kee Yoeup^{2*}

(¹Department of Horticulture, Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, China; ²Research Center for The Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Abstract: To investigate possibility of bulblet production of *Lilium* 'Casa Blanca' in bioreactors, bioreactor and solid culture methods were studied. Increased bulblet growth was observed in bioreactor culture than solid cultures. Bulblet growth was 16.5 fold in solid culture and it was 22.4 fold in bioreactor culture. Culture density in bioreactor culture was studied and 400 bulblets were suitable for 5 L bioreactor and from these cultures we obtained 295 bulblets of size ≥ 1.1 g. Stem emergence of bulblets obtained from both cultures showed that 90% of bulblets (≥ 1.1 g) from bioreactor culture and 65% from solid cultures (≥ 2.1 g) developed stem respectively.

Key words: *Lilium* 'Casa Blanca'; Bioreactor; Tissue culture; Virus-free

欢迎订阅 2004 年《中国园林》

《中国园林》是建设部中国风景园林学会主办, 建设部城市建设管理司协办的学术刊物, 及时报道风景园林界新政策、新动态, 提供百家争鸣的学术园地, 奉献给读者丰富的园林专业知识, 是城建、园林系统领导干部, 企、事业单位管理人员, 科研、设计人员及大专院校师生的理想读物。2004 年内文彩页增至 32 页。每期定价 15.00 元, 全年 180.00 元。国内外公开发行, 全国各地邮局订阅。国内邮发代号 82-217, 国外发行由中国国际图书贸易总公司承办, 代号 BM-4577。也可直接汇款到本社订阅。地址: 北京市海淀区百万庄建设部北配楼 337 号《中国园林》杂志社; 邮政编码: 100835; 电话: (010) 68348041; 传真: (010) 68339217; 联系人: 冷捷; 电子信箱: ZGYL@CHINA.COM