

卷丹百合鳞片及珠芽组织培养研究

郭海滨, 雷家军

(沈阳农业大学园艺学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要:以卷丹百合(*Lilium lancifolium* Thunb.)的鳞片及珠芽作为外植体,比较各种消毒时间和接种方法的效果和不同激素浓度对鳞片及珠芽的诱导增殖效果。结果表明,鳞片消毒以70%酒精20s再用0.1% HgCl_2 12min效果最佳,珠芽消毒以70%酒精20s再用0.1% HgCl_2 10min效果最佳;百合鳞片的分化能力外层好于中层,中层好于内层;近轴面向上的鳞片诱导效果好于远轴面向上。卷丹百合鳞片及珠芽的最佳诱导培养基为MS+6-BA 1.5mg/L+NAA 0.2mg/L,诱导出生长势较强、数量较多的不定芽。最适合的增殖培养基为MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.2mg/L,增殖系数达8.0,组培苗长势良好。

关键词:卷丹百合;鳞片;珠芽;组织培养

中图分类号:S682.203 **文献标识码:**A

The Bulb Scale and Bulblet Culture *in vitro* of *Lilium lancifolium* Thunb.

Guo Haibin, Lei Jiajun

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract: The bulb scales and bulblets culture *in vitro* of *Lilium lancifolium* Thunb were studied. The sterilization time, inoculation methods and the effect of plant hormones on inducement and proliferation were compared. The results showed 70% alcohol with 20s and 0.1% HgCl_2 with 12min was the best for the bulb scales sterilization and 70% alcohol with 20s, 0.1% HgCl_2 with 10min for bulblets. The regeneration ability of external scales was better than the middle ones, which was better than the internal ones. MS+6-BA 1.5mg/L +NAA 0.2mg/L could induce more and stronger shoots. The best proliferation medium was MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.2mg/L. The multiplication coefficient was 8.0 with strong plantlets.

Key words: *Lilium lancifolium* Thunb, Bulb Scales, Bulblets, Tissue Culture

卷丹 (*Lilium lancifolium* Thunb.) 为百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium*) 的多年生球根类花卉。国内许多研究者对百合的组织培养进行过研究,但以栽培种居多^[1-4],而对于野生种的研究却很少^[5],尤其关于卷丹百合组织培养的研究。卷丹是在中国分布范围最广的百合属植物,分布于中国17个省区,花大色艳,抗性强,鳞茎既可食用又可药用,同时也是少见的三倍体种。生产上常采用鳞茎进行繁殖,但无性繁殖存在着繁殖系数小、种性退化等弊端。因此,运用组织培养方法既可大量快速繁殖,又可获得高质量种球,还可为其分子水平的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2003年10月,试材来自沈阳农业大学花卉基地三倍体野生种卷丹百合 (*Lilium lancifolium* Thunb),采集生长健壮、开花性状好、无病虫害的卷丹百合植株的鳞茎和珠芽。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 剥取健壮、无病斑、光亮的完整鳞片及珠芽作为外植体,鳞片分成外层(最外两层)、中层(外数三至六层)、内层(其余),在流水条件下冲洗3~5h,然后分别把内、中、外层鳞片置于70%的酒精中

基金项目:辽宁省教育厅项目“百合种间杂交及染色体加倍研究”(202053092),2002.9—2004.9]。

第一作者简介:郭海滨,女,1980年出生,沈阳农业大学硕士研究生,从事百合染色体加倍技术研究。通信地址:110161 辽宁省沈阳市沈阳农业大学园艺学院 雷家军(收)。Tel: 024-88493383, E-mail: guohaibin2005@163.com。

通讯作者:雷家军。

收稿日期:2005-09-29。修回日期:2005-10-09。

消毒 10~30s、0.1% HgCl_2 中消毒 8~15min, 把整个珠芽置于 70% 的酒精中消毒 20s、0.1% HgCl_2 5~12min 进行深层消毒, 后用无菌水冲洗 5~6 次。

1.2.2 不定芽和愈伤组织的诱导 将鳞片分成外层、中层、内层, 切成 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 、 $1.0\text{cm} \times 1.0\text{cm}$ 和 $1.2\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ 的小块; 将卷丹珠芽分为整体、单瓣两部分, 单瓣珠芽又分成纵切、横切两种方式。观察不同处理方式及不同激素浓度组合对不定芽及愈伤组织

诱导的影响。

1.2.3 不定芽的增殖培养 把不定芽转入增殖培养基 30d 后, 观察其生长情况, 并计算增殖系数。

1.2.4 培养基 诱导培养基 MS+6-BA0.5~2.0mg/L+NAA0.2~0.5mg/L, 共 4 组。增殖培养基 MS+6-BA0.5~2.0mg/L+NAA 0.05~0.5mg/L, 共 5 组。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对卷丹鳞片及珠芽消毒效果的影响

表 1 不同消毒时间对卷丹百合鳞片消毒效果的影响

70%酒精 (s)	0.1% HgCl_2 (min)	接种数 (个)	污染数 (个)	污染率 (%)	成活数 (个)	成活率 (%)	鳞片转绿时间 (d)
10	10	20	13	65.0	5	25.0	6
10	12	45	21	46.7	19	42.2	8
10	15	45	16	35.6	25	55.6	12
20	12	40	11	27.5	25	62.5	8
20	15	30	8	26.7	13	43.3	13
30	12	35	8	22.9	13	37.1	10
30	15	40	6	15.0	10	25.0	12

响

2.1.1 不同消毒时间对卷丹鳞片消毒效果的影响 用酒精 30s、0.1% HgCl_2 15min 处理, 污染率最低, 仅为 15.0%, 但鳞片的成活率也较低。酒精 20s、0.1% HgCl_2 12min 时, 虽然污染率有所上升 (27.5%), 但鳞片的成活率却达到最高 62.5%, 并且鳞片转绿时间也较短 (8d)。只有转绿的鳞片最终才能诱导出芽, 而且转绿的时间越短, 表明鳞片受到的毒害最用越小, 同时诱导出芽的时间也越短。因此, 用酒精 20s、0.1% HgCl_2

12min 消毒效果最好, 既可以有效灭菌, 又能保证较高的成活率和较短的诱导时间 (表 1)。

2.1.2 不同消毒时间对卷丹珠芽消毒效果的影响 酒精处理 20s、0.1% HgCl_2 处理 12min 时污染率最低, 为 17.5%, 但成活率较低, 仅为 35.0%; 酒精处理 20s、0.1% HgCl_2 处理 10min 时, 虽然污染率有所上升, 但其成活率明显高于其它处理, 为较适合珠芽的消毒时间 (表 2)。

2.2 不同接种方法对卷丹鳞片及珠芽诱导培养的影响

表 2 不同消毒时间对卷丹珠芽消毒效果的影响

70%酒精 (s)	0.1% HgCl_2 (min)	接种数 (个)	污染数 (个)	污染率 (%)	成活数 (个)	成活率 (%)
20	5	41	17	41.5	21	51.2
20	8	40	14	32.5	21	52.5
20	10	38	8	21.1	23	60.5
20	12	40	7	17.5	14	35.0

响

2.2.1 不同接种方法对卷丹鳞片诱导培养的影响 外层鳞片转绿时间在 6~10d 左右, 诱导出的不定芽和愈伤颗粒数目明显多于中层和外层鳞片, 观察发现, 鳞片基部形成不定芽的能力最强, 中部其次, 鳞片上部

0.5~1.0cm 几乎不能诱导出不定芽 (表 3)。虽然外层鳞片诱导率最高, 但是外层鳞片损伤严重、带菌多、失水较重, 且数量少, 故污染率也高, 一般采用卷丹百合中层鳞片的中、内部作为外植体的主要来源。将鳞片切割成不同大小进行培养分化能力也有差别:

表 3 卷丹鳞片不同部位对诱导不定芽及愈伤颗粒的影响

鳞片	长度 (cm)	宽度 (cm)	0.1% HgCl_2 (min)	转绿天数 (d)	不定芽数 (个/块)	愈伤颗粒数 (个/块)
外层	4.0~5.5	2.0~2.5	15	6~10	4.7	6.0
中层	3.5~4.0	1.5~2.0	12	12~20	2.5	4.5
内层	1.0~3.0	0.5~1.5	10	—	0.4	1.6

$0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 过小, 不利于成活; $1.0\text{cm} \times 1.0\text{cm}$ 和 $1.2\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ 大小适宜, 成活率高。

2.2.2 不同接种方法对卷丹珠芽诱导培养的影响 将卷丹珠芽以近轴面向上的方式置于培养基中进行诱导培养。珠芽整体培养的诱导率明显高于单瓣培养, 但整体培养诱导出不定芽的数量却少于单瓣培养。单瓣纵切、单瓣横切基部的诱导率和诱导出不定芽的数量差距较小, 但单瓣珠芽横切上部无诱导能力, 不能诱导出苗, 而基部的诱导能力较强, 诱导率达到

77.5%, 这与鳞片的诱导情况相似 (表 4)。综合分析诱导率、诱导芽数及为了节省培养基, 一般都采用卷丹百合单瓣珠芽的基部作为外植体的主要来源, 珠芽的上部可以切除不用。

2.3 不同激素浓度对卷丹鳞片及珠芽诱导培养的影响

鳞片由白色逐渐转变成紫色, 最后转变成绿色, 在转色的同时鳞片也有明显增厚的现象。在变成绿色的鳞片上, 一部分不久会出现较大的颗粒状突起, 该颗粒

表 4 卷丹珠芽不同接种方式对诱导不定芽的影响

接种方式	接种数 (个)	诱导出苗数 (个)	诱导率 (%)	不定芽数 (个)
整个珠芽	20	18	90.0	1.0
单瓣珠芽	50	37	74.0	3.3
单瓣纵切	40	29	36.3	1.5
单瓣横切基部	40	31	77.5	3.0
单瓣横切上部	40	0	0.0	0.0

状突起直接诱导出绿色的不定芽,而卷丹百合的不定芽会直接长成绿色小鳞茎;没有变色的鳞片最后没有分化出愈伤颗粒和不定芽,逐渐死亡;而珠芽由紫黑色逐渐转变成绿色,而后长出不定芽,没有变色的珠芽最后没有分化出不定芽。培养基 MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.2mg/L 诱导出不定芽和愈伤颗粒的时间最短,但数量较少。培养基 MS+6-BA0.5mg/L+NAA 0.5mg/L 不仅所用时间最长,而且数量最少,生长势弱,效果差。培养基 MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.2 mg/L 诱导不定芽和愈伤组织数量较多,生长势强,为卷丹百合鳞片及珠芽的最佳诱导培养基(表 5)。

2.4 不同激素浓度对不定芽增殖的影响

将分化出的不定芽,接入不同的增殖培养基中,培

表 5 不同激素浓度对卷丹鳞片及珠芽

诱导不定芽及愈伤颗粒的影响

培养基 (mg/L)	胚状体 出现时 间(d)	不定芽 (个/块)	愈伤颗 粒出现 时间(d)	愈伤颗粒 数(个/块)
BA1.0+NAA0.2	7	3	14	4
BA1.5+NAA0.2	12	5	20	7
BA2.0+NAA0.2	16	3	20	5
BA0.5+NAA0.5	18	2	30	3

养 30d 后可形成丛生芽。用 5 种增殖培养基进行培养,发现 MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.2mg/L 效果最好,增殖系数达 8.0,生长势最强,叶片粗壮短宽,平均苗高

表 6 不同激素浓度对不定芽增殖情况的影响

培养基 (mg/L)	增殖系数	叶数 (片/丛)	株高 (cm)	根数 (条/丛)	根长(cm)	生长势
BA1.0+NAA0.05	1.8	3.0	4.5	0	-	最弱
BA1.0+NAA0.1	2.0	3.0	5.0	0	-	较弱
BA1.0+NAA0.2	8.0	3.9	5.4	7.5	2.5	最强
BA1.5+NAA0.5	4.0	11.0	6.2	5.3	3.1	较强
BA2.0+NAA0.2	3.0	5.2	6.9	9.0	1.9	中等

硬,本身所带菌量较少,不易受到损伤,污染率也较低,在继代培养时很少出现内生细菌滋生的现象,王红霞等^[4](2000)以通江百合珠芽为外植体进行组织培养及脱毒研究。因此,利用珠芽再生培养具有很多优点。

参考文献

- 1 黄惠英. 东方百合的离体培养 [J]. 甘肃农业大学学报, 2000, 35(4): 450-453
- 2 高敏. 香水百合的组织培养快繁[J]. 广西农业科学, 2002, (3): 120-121
- 3 丁兰, 刘国安, 田卫东, 景雪峰, 张延红. 新铁炮百合组织培养和快速繁殖研究. 西北师范大学学报(自然科学版)[J], 2001, 37(1): 80-82
- 4 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

5.4cm, 且生根条数最多, 可达 7.5 条(表 6)。

3 讨论

3.1 卷丹百合鳞片外植体的内生菌问题

虽然百合鳞片作为外植体易于诱导, 但容易产生内生菌。经过多次继代培养, 培养物的组织内部出现向外污染的现象是由内生细菌滋生造成的。为防止内生细菌的滋生, 试验将外植体用洗衣粉清洗后, 又放入 500mg/L 的安素菌毒清试剂中消毒 5min。此外, 针对试验过程中出现的内生细菌, 采取了二次消毒的措施, 即把污染的组培苗放置于 70% 的酒精 20s, 0.1% 的升汞 12min 中进行消毒, 再转接到新的继代培养基中培养。这两种措施在一定程度上抑制了内生细菌的滋生, 减少了后期污染。

3.2 卷丹百合鳞片接种方位对诱导培养的影响

试验发现卷丹百合鳞片接种方位对诱导培养有较大影响。诱导能力依次是: 外层>中层>内层, 这与杭玲等(2001)^[6]在龙牙百合的组织培养过程中得到的结论类似, 王刚等(2002)^[7]对兰州百合鳞片的组织培养研究中发现鳞片诱导芽的能力从强到弱依次为外层、中层、内层。另外, 近轴面向上放置于培养基上时, 所形成的不定芽数目较多, 芽长势较好、利于成活; 而远轴面向上时, 虽然也产生芽, 但数量很少、长势较差, 芽诱导时间变长。此外, 诱导出的不定芽一般都在鳞片基部紧靠鳞茎盘的部位出现, 沿边缘不规则排列。

3.3 卷丹百合的珠芽作为外植体的意义

在百合的组织培养中, 多采用鳞片作为外植体, 但是卷丹百合珠芽的数量远远多于其它百合, 采集非常方便, 而且由于珠芽着生在植株的地上部分, 外表坚

通讯, 2002, 38(2): 149

- 5 王刚, 杜捷, 李桂英, 梁万福, 李亨泰. 兰州百合和野百合组织培养及快速繁殖研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2002, 38(1): 69-71
- 6 杭玲, 苏宾, 陈丽新, 苏国秀, 程汤, 黄卓忠. 龙牙百合组培快繁技术研究[J]. 广西农业科学, 2001, (4): 183-184
- 7 王刚, 杜捷, 李桂英, 等. 兰州百合和野百合组织培养及快速繁殖研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2002, 38(1): 69-71.
- 8 王红霞, 胡琼华, 陈小兰. 通江百合的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(2): 132

(责任编辑: 陶冶之)