

粉红色索尔邦百合的组培快繁技术研究

张伟丽^{1,2}, 金欣庆¹

(1. 南京大学生命科学学院, 江苏南京 210093; 2. 仲恺农业技术学院生命科学院, 广东广州 510225)

摘要:研究了以索尔邦百合(*Lilium Sorbonne*)的鳞片叶为外植体的组培和植株离体再生技术, 培养基采用 MS 基本培养基, 附加不同的激素组合。分别获得诱导的愈伤组织、芽及根, 并选出最佳激素组合, 以确立索尔邦百合组织培养再生系统。试验结果表明适合的诱导培养基是 MS+BA0.5mg/L+NAA 0.2mg/L; 继代培养基为 MS+2,4-D 1.0mg/L 和 MS+BA 0.5mg/L+NAA0.2mg/L; 生根培养基是 1/2MS+IBA0.2mg/L 和 1/2MS+NAA0.2mg/L。该方法最大增殖倍数达到 5.74。

关键词:索尔邦百合; 组织培养; 快繁

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)04-0212-03

百合(*Lilium tenuifolium* Fisch)是百合科(*Liliaceae*)百合属(*Lilium*)植物的统称, 是世界著名的观赏花卉, 索尔邦百合(*Sorbonne*)属于东方百合杂种系(*The*

Oriental Hybrids), 为百合中的名贵品种群, 由于其花色艳丽、花形奇特、芳香宜人而深受人们的喜爱, 成为近年国内外市场热销的花卉种类之一。东方百合是通过杂交育种选育出来的, 种子高度败育, 常采用传统的鳞茎球繁殖方法, 繁殖速度缓慢, 在短期内难以满足市场需求, 目前国内主要通过进口种球进行生产, 为了降低生产成本, 实现种球的自主繁育, 进行组织培养与快速繁殖已十分必要, 并且在百合的优良品种快速繁殖、脱毒复壮、新品种培育以及应用生物技术进行分子育种中, 组织培养都是比较合宜的方法, 百合许多器官和组织都

第一作者简介:张伟丽(1969-), 女, 讲师, 理学博士, 主要从事花卉生物技术及遗传工程研究、植物与病原物互作抗病机理的研究, 曾在南京大学做博士后研究工作, 现在仲恺农业技术学院生命科学院工作, 发表文章 7 篇, E-mail: zhangweili7218@163.com。

基金项目:江苏省博士后基金资助项目(0208003402)。

收稿日期:2007-01-07

[4] 曹政义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 山东: 科学技术出版社, 1996.

[5] 黄莺, 范燕萍. 石竹愈伤组织诱导及植株再生[J]. 华南农业大学学报, 2003, 2(1): 50-52.

[6] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997. 60-65.

[7] 王关林, 方宏筠, 那杰. 高活性细胞激动素 TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 植物学通报, 1997, 14(3): 47-53.

[8] 诸葛强, 王婕琛, 黄敏仁, 等. 新疆杨植株再生受体系统的建立[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(6): 1-4.

[9] 张卫芳, 段新玲. 香石竹组织快速繁殖技术初探[J]. 塔里木农垦大学学报, 2000, 12(2): 28-31.

[10] 杨其简, 周禾, 孙彦, 等. 紫花苜蓿愈伤组织诱导以及组织培养[J]. 北京农学院学报, 2004, 14(2): 28-30.

[11] 张明丽, 李青. 木本观赏植物组织培养以及植株再生的研究进展[J]. 河北林业科技, 2004, 23(4): 23-26.

The Establishment System of Tissue Culture and Plant Regeneration of *Dianthus spiculifolius*

LIANG Yan-ping¹, SUN Yan¹, YANG Qing-chuan², HAN Jian-guo¹, DAI Zhong-xian³

(1. The Institute of Grassland Science of China Agricultural University, Beijing 100094; 2. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094; 3. Beijing Liangxianglvjing Planting Center of Seedling and Wood, Beijing 100042)

Abstract: The regeneration system from stem of *Dianthus spiculifolius* was established by using different cytokinins combining with other phytohormones. The results indicated that the optional medium for inducing callus was MS+1.0mg/L 2,4-D+0.5mg/L 6-BA, the optional medium for differentiation was MS+0.2mg/L 6-BA+4mg/L KT+0.02 mg/L IAA, and 1/2MS+1.0mg/L IBA+0.01mg/L NAA for the rooting of adventitious buds. The result are suitable for screening gene-transformed *Dianthus spiculifolius* plants.

Key words: *Dianthus spiculifolius*; Stem; Tissue Culture

可进行组织培养诱导成苗。

许多科研工作者利用百合野生种和栽培种的不同品种、不同部位的外植体如花器^[1,2]、茎尖^[3]、叶片^[4]、鳞片^[5,6]、鳞茎^[4]、鳞芽^[7]、小鳞茎^[8]、珠芽^[9]以及带腋芽的茎段^[10]等诱导愈伤组织并获得再生植株。

索尔邦百合采用花丝、花托、子房等花器官进行离体培养的研究有报导,但采用鳞茎球快繁的研究未见报导。花器官作外植体取材易受开花期的限制,不能常年进行组培生产,而鳞茎球却不受此制约,可连年取材进行组培生产。这种索尔邦百合是东方百合中热销的品种,具有良好的观赏和经济价值,因此其快繁方法有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

百合从中国芊卉种苗公司购买的国外进口的百合鳞茎球,开粉红色花的索尔邦百合(*Lilium oriental hybrid Sorbonne*)。

1.2 百合无菌鳞茎球外植体的处理

取百合鳞茎球,先经自来水流水冲洗 2h 后,用细软毛刷刷去泥土冲洗干净,把鳞茎球中的鳞片叶剥下后,剔出病残者,挑选靠近鳞茎盘基部的幼嫩鳞片叶,用刀修整,剔除菌斑及瑕疵,放入培养皿中待用。在超净工作台上,用 75% 酒精浸泡 30 s,用无菌水漂洗后再放入 0.1% HgCl₂ (0.02% 吐温) 中浸泡 5~8min,用无菌水漂洗 5 次后,放入无菌的培养皿中用灭菌的滤纸吸干水分,切成 3mm×3mm 的小块作外植体备用。

1.3 百合组培的培养基及培养条件

包括基本培养基附加不同激素组合,适用于不同组培阶段的培养基组成,基本培养基选用 MS 培养基或 1/2MS 培养基,以上培养基均加入 0.55% 琼脂,3% 蔗糖, pH 5.8, 培养温度 22℃~26℃, 光照度 2 000~2 200Lx, 光照 12h/d; 诱导培养基、分增殖培养基、生根培养基分别是基本培养基附加不同的激素组成,其中生根培养基的基本培养基为 1/2MS 培养基。在组织培养室培养期间注意观察,随时剔除污染的材料,以免交叉感染。

1.4 统计记录

接种后每天观察隔 7d 做 1 次记录,并记录启动情况,出愈伤及生芽情况,继代后的增殖情况,生根后的生根数及生根率。愈伤和芽数每次都统计截止当天的愈伤情况及可见芽数做记录。启动是指外植体有生长迹象,如现绿,表现皱缩卷曲,不同程度的加厚及伸长,启动率:表现皱缩加厚的外植体数占接种的外植体总数百分率;出芽率(外植体出芽频率):出现芽或芽丛的外植体数占接种的外植体总数的百分率。出芽数(出芽指数):发生芽的外植体上的平均出芽数。

2 结果与分析

2.1 百合鳞片不定芽的诱导

鳞片块接入培养基在组织培养室中先暗培养 7d,约 15d 左右鳞片颜色由白变成绿色,20d 时鳞片表面及切口处出现白色及浅绿色突起,每个鳞片上有数个这种突起,35~40d 时突起上长出很密的绿色的芽丛同时鳞片基部出现的愈伤组织并增大,至 50d(约 7 周)其中的 4 个诱导培养基诱导的芽的分化率都大于 40%。50d 时已出的芽丛继续长高,而基部愈伤在生长的同时又出现新的芽点及芽丛,诱导培养情况见表 1。芽丛在诱导培养基上能正常生长说明诱导培养基也能继续培养愈伤与芽丛的共生体(见图 1A),培养至 90d(约 13 周)结果如表 2 所示。综合了启动率,出芽频率及出芽指数,并结合生长状态。诱导培养基中 MS+BA0.5mg/L+NAA0.2mg/L(单位下同)的效果最好。

表 1 不同激素含量培养基 50d 诱导启动情况

激素(mg/L)			启动百分率	褐化率
2,4-D	BA	NAA	(%)	(%)
2.0	0.2		0	100
1.5	0.2		6.25	31.25
1.0	0.2		18.18	81.82
2.0			42.50	35.00
1.5			40.20	23.35
1.0			43.34	33.32
	0.5	0.2	48.67	28.34

表 2 诱导培养基上生长 90d 时芽的生长情况

激素(mg/L)			外植体出芽频率	出芽指数
2,4-D	BA	NAA	(%)	
2.0	0.2		0	0
1.5	0.2		13.33	3.45
1.0	0.2		14.29	4.00
2.0			67.25	5.16
1.5			72.54	5.65
1.0			76.00	6.86
	0.5	0.2	82.52	7.38

2.2 继代增殖

将高度为大于 4~5cm 并且基部鳞茎球已形成的苗接入生根培养基,其余的愈伤和小芽丛切成小块,接入不同的芽增殖培养基中继代增殖,培养约 40d 后,便又形成新的丛生芽,同时愈伤还在继续增大,同时芽在长大过程中鳞茎球也在形成、生长,继代芽的增殖倍数如表 3 所示。继代增殖过程中其中 MS+2,4-D 1.0 和 MS+BA0.5+NAA0.2 的增殖倍数分别为 4.3 和 5.74,同时苗也很健壮,因此二者是适宜的继代培养基。

2.3 生根

表 3 不同激素含量培养基继代增殖结果

激素(mg/L)			芽增殖倍数	芽高度	生长势
2,4-D	BA	NAA		(cm)	
1.5			3.86	5.03	健壮
1.0			4.3	4.06	健壮
	0.5	0.2	5.74	3.11	强健壮

表4 不同激素含量生根培养基继代增殖结果

激素(mg/L)		平均生根数	平均根长度 (cm)	生长势
NAA	IBA			
0.1		0.56	0.776	健
0.2		3.80	1.428	健
0.3		1.50	0.842	中等健
	0.1	2.34	0.245	弱
	0.2	5.00	1.63	健

将苗高达5cm以上且基部鳞茎球达到直径3mm的无菌苗移入生根培养基中,经40d后,生根情况见表4、图1B,其中的效果较好的培养基为1/2MS+NAA0.2和1/2MS+IBA0.2。



A 索尔邦百合在诱导培养基中的芽与愈伤
B 索尔邦百合在生根培养基中

图1 索尔邦百合的组培过程

2.4 练苗及移栽

移入生根培养基中的苗15d开始生根,经40~50d生长出大量根系,并且苗基部的鳞茎球发育至直径达3mm,就可敞开瓶口在培养室中练苗。一周后,用流动水清洗干净根系上的培养基,移入事先喷洒过0.2%达克宁的基质(沙:花肥:椰糠比为1:1:1)中,放入培养箱中,温度为25℃,平均光照强度2000Lx,每日光照12h。每隔2d浇水管理,15d后再移入花盆或大田中生长。

3 讨论与结论

该培养经初代培养中短暂愈伤阶段很快就进入芽丛阶段,可以说愈伤与芽丛是共生的,MS+2,4-D 1.0~1.5培养基诱导愈伤效果很好,诱导芽密度大,但苗的健壮程度比在MS+BA 0.5+NAA0.2诱导的差。而在MS+BA 0.5+NAA0.2继代培养的芽密度中等,增殖

倍数较好芽更健壮。因此若为转基因培养时愈伤增殖用MS+2,4-D 1.0~1.5继代最好,而为获得无菌组培苗可选用MS+BA 0.5+NAA0.2继代最好。经诱导培养后每隔30~40d进行继代增殖,达到每个外植体新生芽约6株,其中愈伤增殖倍数也达到了3~4倍。

在诱导培养基中的诱导并不是随着2,4-D分裂素浓度的增加而效果更好,以MS+2,4-D 1.0的诱导效果好于MS+2,4-D 1.5,可能是继代过程中激素含量低的累加效应低反而效果好。

利用该方法,建立了百合组培苗的快速繁殖途径。获得了百合的无菌苗可用作转基因研究中的转化受体,该方法可达到接种无菌率75%,存活率60%以上。

该方法克服传统的鳞茎球繁殖方法繁殖速度缓慢的缺点,使索尔邦百合的工厂化生产成为可能,也为转基因等生物工程方面的研究提供无菌小苗或愈伤。

参考文献:

- [1] 汉晓红. 百合种球组培快繁技术[J]. 甘肃农业科技, 2000, 11: 42-42.
- [2] Arzate-Fernandez A. M, Nakazaki T, Okumoto Y, and Tanisaka T. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily[J]. Plant Cell Report, 1977, 16: 836-840.
- [3] 黄敏玲, 陈诗林. 透百合离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(6): 437-437.
- [4] 李云侠, 王建华. 兰州百合快速繁殖的研究[J]. 国土与自然资源, 1993, (3): 68-69.
- [5] 刘选明. 百合鳞片叶离体诱导形成不定芽和体细胞胚[J]. 园艺学报, 2000, 24(4): 351-357.
- [6] Wickremesinhe E R M, Holcomb E J, and Artega R N. A practical method for the production of flowering Easter lilies from callus cultures[J]. Science Horticulture, 1994, 60: 143-152.
- [7] 姚连芳, 周俊国, 殷桂琴, 等. 百合组织培养试验研究[J]. 贵州农业科学, 1999, 27(3): 47-48.
- [8] 王家福, 陈振光. 百合快速繁殖条件的优化[J]. 福建农业大学学报, 1999, 28(2): 152-156.
- [9] 赵祥云, 程廉. 百合珠芽组培及脱毒研究[J]. 园艺学报, 1993, 20(3): 284-288.
- [10] 陈小兰, 胡琼华, 王红霞. 金百合的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(4): 334-334.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Lilium oriental* hybrid 'Sorbonne'

ZHANG Wei-Li^{1,2}, JIN Xin-Qing¹

(1. College of Life Sciences, Nanjing University, Jiangsu 210093; 2. School of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225)

Abstract: The organogenesis and plant regeneration of *Lilium Sorbonne* was studied by using the segments of bulb as initial explants. The calli, sprouts and roots were induced respectively on the various media got by adding different hormone to MS basic medium. The optimum hormone combinations were selected and plant regeneration system was established. The results showed the optimal medium for explant induction was MS+BA0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, optimal medium for proliferating clump sprouts was MS+2,4-D 1.0 mg/L or MS+BA 0.5 mg/L+NAA0.2 mg/L, and the optimal medium for the plantlet rooting was 1/2MS+NAA0.2 mg/L or 1/2MS+IBA0.2 mg/L. The result showed that the propagation coefficient reached 5.74.

Key words: *Lilium Sorbonne*; Tissue culture; Rapid propagation