

青岛百合组织培养研究

齐春敏,王奎玲,刘庆超,刘庆华
(青岛农业大学环境艺术学院,青岛266109)

摘要:以青岛百合叶片为外植体,研究了消毒时间、培养基、生长调节物质对青岛百合叶片不定芽发生、增殖和生根的影响。结果表明:用0.1%氯化汞对青岛百合叶片消毒5 min时效果最好,污染率为31%,萌动率为79%,诱导率为65.2%。青岛百合最佳叶片不定芽分化培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;最佳不定芽增殖培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;最佳生根的培养基为1/2MS+NAA 0.2 mg/L,形成了较为完善的组织培养再生体系。

关键词:青岛百合;叶片;组织培养;增殖;生根

中图分类号:S682.2 **文献标识码:**A

Research on Tissue Culture of *Lilium tsingtauense* Gilg.

Qi Chunmin, Wang Kuiling, Liu Qingchao, Liu Qinghua

(College of Landscape Architecture and Art, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

Abstract: The leaf of *Lilium tsingtauense* Gilg. were used as experimental materials. And the effect of different sterilized time, kinds of hormone and its combination on adventitious buds proliferation, plant regeneration and root regeneration were studied in this paper. The results showed that explant sterilized in 0.1% aqueous mercuric chloride for 5 min had better effect, and the contamination rate was 31%, the germinating rate was 79%, inducement rate was 65.2%. MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L was suitable for adventitious buds proliferation from the leaf. The optimum medium was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L. The best medium for rooting was 1/2MS+NAA 0.2 mg/L. The comparatively perfect tissue culture regeneration system was formed.

Key words: *Lilium tsingtauense* Gilg., leaf, tissue culture, proliferation, rooting

青岛百合 (*Lilium tsingtauense* Gilg.), 又名崂山百合, 山百合等, 百合科百合属多年生草本植物。主产于青岛崂山, 集中分布地位于崂山北九水以南海拔400~1 000 m的区域内。青岛百合为虫媒介导的异花传粉植物, 其重要繁殖体为种子。外部生存环境压力 and 变化给青岛百合繁育造成很大影响, 而且在生殖过程中存在败育和畸形花现象, 这也是导致青岛百合种群逐渐减少的原因之一。青岛百合鳞茎更新能力较弱, 寿命较短, 适应性亦较差, 分布范围狭窄, 对生长条件要

求高, 现已逐渐稀少, 已被列入国家第二批稀有濒危植物名录^[1]。青岛百合如靠鳞茎繁殖, 一年一次, 时间长、繁殖数小。利用组织培养的方法对青岛百合叶片进行培养, 可在这些外植体上形成小鳞茎, 对其小鳞茎进行生根诱导, 形成完整植株, 可快速获得大量种球, 实现种苗工厂化生产, 具有较高的经济价值和开发潜力。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于2007年3月-2008年1月在青岛农业大

基金项目: 山东省农业良种工程重大项目 (鲁科农字[2005]99号)。

第一作者简介: 齐春敏, 1980年出生, 女, 山东泗水人, 硕士, 研究方向为园林植物应用。通信地址: 266109 山东省青岛市城阳区长城路700号青岛农业大学环境艺术学院05级研。E-mail: qichunmin@126.com。

通讯作者: 王奎玲, 1963年出生, 女, 山东莱阳人, 教授, 研究方向为园林植物应用。通信地址: 266109 山东省青岛市城阳区长城路700号青岛农业大学环境艺术学院。Tel: 0532-86080498; E-mail: lqh6205@163.com。

收稿日期: 2008-02-26; 修回日期: 2008-03-04。

学园林组培室进行。

1.2 材料

试验材料: 青岛农业大学日光温室栽培的青岛百合的叶片。

试剂: 75%酒精, 0.1%的氯化汞溶液。培养基中启动培养和增殖培养以 MS 培养基为基本培养基, 附加不同浓度的 6-苄基氨基嘌呤(6-BA)和萘乙酸(NAA)生根培养基以 1/2MS 为基础培养基, 附加不同浓度的 NAA, 分别为 0.05 mg/L, 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L。以上所有的培养基中均添加蔗糖 30 g/L, 琼脂 6 g/L, pH=5.8。

仪器: 剪刀, 镊子, 组培瓶, 培养皿, 滤纸, 高压灭菌锅。

1.3 方法

1.3.1 消毒时间的选择 将青岛百合叶片从叶柄处剪下, 先在流水下冲洗 1~2 h, 自叶片基部留叶片长 1.5~2 cm, 剪去以上大部分叶片, 然后用棉花蘸 75%的酒精擦洗叶片表面, 再用 0.1%的氯化汞溶液消毒 3~9 min, 用无菌水冲洗 4~6 遍, 将叶片放在滤纸上吸干水分后切成 0.5cm×0.5cm 大小的方块, 远轴面朝上平放于培养基上, 叶柄剪成长约 1cm 的小段, 同样置于培养基表面。每个处理接 5 瓶, 每瓶 5 块, 3 次重复。置于组织培养室中培养。3 周后统计污染率。污染率=(污染外植体数/接种外植体总数)×100%

1.3.2 启动培养 以 MS 培养基为基本培养基, 以 6-BA 和 NAA 为参数因素(见表 1), 设计 6 种起始培养基, 每种培养基接种 50 片叶。20 d 后统计愈伤组织及不定芽诱导情况。

表 1 启动培养分化培养基设计方案

试验序号	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)
M1	1.0	0.1
M2	1.0	0.2
M3	1.0	0.5
M4	2.0	0.1
M5	2.0	0.2
M6	2.0	0.5

1.3.3 增殖培养 设计 6 种增殖培养基, 在 6 种不同培养基上培养看不定芽增殖的效果。以 MS 培养基为基本培养基, 不同培养基成分见表 2。约 20 d 观察不同培养基上不定芽增殖情况, 30 d 后统计增殖不定芽数量。

表 2 不定芽增殖培养基设计方案

试验序号	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)
Z1	1.5	0.2
Z2	1.5	0.5
Z3	1.0	0.5
Z4	1.0	0.2
Z5	0.5	0.2
Z6	0.5	0.5

1.3.4 生根培养 生根培养基以 1/2MS 为基础培养基, 采用 NAA 0.05 mg/L, 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L 单因子诱导, 选出最佳浓度。当叶片、叶柄分化小鳞芽生长处 3~4 片叶时, 切取伸长的植株转接到不同浓度的 NAA 生根培养基上培养。约 20 d 观察不同培养基上不定芽生根情况, 28 d 后统计不定芽生根情况以及生根数量。

培养室内温度为 20℃, 光照时间为 12 h, 光强为 2200lx。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对青岛百合叶片再生的影响

用 0.1%氯化汞对青岛百合叶片消毒 5 min 时获得较好效果, 其污染率为 31%, 萌动率为 79%, 诱导率为 65.2%。当消毒时间为 3 min 时, 污染率较高, 为 83%。当消毒时间为 7 min 时, 污染率较低, 为 17%, 但由于消毒时间较长, 不仅杀死了微生物, 同时也导致外植体损伤, 使萌动率、诱导率降低, 而消毒 9 min 时, 则全部外植体褐化死亡。

2.2 不同培养基对青岛百合叶片再生的影响

接种后, 在适宜的培养基上, 20 d 左右可见叶片基部膨大隆起, 继而长出黄绿色愈伤组织, 28 d 后生出绿色芽点分化出芽, 50 d 后可长至 2~3 cm, 统计愈伤组织及不定芽诱导情况见表 3。

表 3 不同培养基对青岛百合叶片再生植株的影响

试验序号	小鳞芽再生率 / %		
	叶片	叶柄	叶片带叶柄
M1	0	0	0
M2	12.7	6.3	13.5
M3	15.4	14.7	26.3
M4	6.1	5.9	9.4
M5	34.5	26.7	40.9
M6	21.2	20.9	25.8

2.3 不同培养基对不定芽增殖的影响

接种 20 d 后观察效果, 增殖效果见表 4。从表 4 可

表4 不同增殖培养基对青岛百合叶片增殖的影响

试验序号	接种数(个)	分化不定芽数(个)	增值率(倍)	小苗长势
Z1	50	176	3.32	苗矮小
Z2	50	153	3.08	苗矮小
Z3	50	98	1.96	苗矮小,有根生出
Z4	50	112	2.06	高度适中,有根生出
Z5	50	197	3.94	高度适中,苗壮,整齐
Z6	50	163	3.03	苗较高,较整齐

表5 不同生根培养基对组培苗生根的影响

浓度(mg/L)	接种苗数(个)	生根苗数(个)	生根率(%)	平均生根数	生根情况
0.05	50	38	76	2.6	根较弱
0.1	50	50	100	3.9	根数较多,芽较短
0.2	50	50	100	4.8	根数、根长适中,芽壮
0.5	50	50	100	5.4	根较长,细弱,芽较小

以看出,Z5培养基条件下不定芽增殖效果最好,增殖倍数达3.94,植株高度适中,较整齐,苗壮。Z3培养基的增殖效果最差,增值率为1.96。植株矮小,生长势弱。Z1培养基条件下,增殖倍数达3.32,但植株矮小,生长势不如Z5培养条件下的生长势。Z6培养基条件下,植株较高,有根生出。

2.4 不同生根培养基对青岛百合叶片生根的影响

当植株长至2~3 cm时,将其转接到不同浓度的NAA生根培养基上培养。结果表明(表3),14 d左右芽基部开始生根,并逐渐生长,21 d后根可长至1.5~2 cm。28 d后S2、S3、S4培养基中再生植株的生根率均为100%,其中S3培养基生根效果最佳,平均每株生根4.8条,根系粗壮,伴随根系的生长,再生植株的鳞茎也明显膨大,生根效果理想,没有愈伤组织形成。虽然S4培养基平均每株生根为5.4条大于S3培养基,但S4培养基条件下的根细弱,芽较小。而在S1培养基中,根系生长缓慢,根系数量少,小鳞茎下部容易形成愈伤组织。因此,S3培养基是适合青岛百合叶片再生植株的生根。

3 讨论

青岛百合是山东省特有的野生花卉资源,具有很高的观赏价值,然而长期以来,由于旅游业的过度发展,破坏了其自然的生长环境,加上游客的肆意采挖,青岛百合面临着人为的严重威胁,已经濒临灭绝,导致其资源数量有限,很难进行资源保存和育种工作。另外,鳞茎繁殖,一年一次,时间长、繁殖数量少。所以采用叶片作为外植体是很好的选择,其优点是取材容易,

繁殖周期短,节省培养基。

在对百合叶片组织培养中,外源激素的作用是非常明显的,外植体愈伤组织的形成及分化与外源激素的作用密不可分,其中尤以适当浓度配比的生长素和细胞分裂素的作用最为重要^[2]。相关的试验结果表明,6-BA与NAA配合使用有利于百合叶片直接形成小鳞茎突起,随后基部长出叶片,进一步形成不定芽^[3]。青岛百合不定芽的产生受6-BA和NAA的影响,当6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L时,最适宜诱导青岛百合不定芽的产生,6-BA的影响较NAA大,这与其他植物组织培养相同^[4-7]。

氯化汞是植物组织培养中常用的一种外植体消毒剂,其使用浓度和消毒时间对外植体产生的萌动有很大的影响。灭菌是组织培养中关键的一步,不同的外植体所要求的灭菌时间不同^[8]。本试验以0.1%的氯化汞溶液对青岛百合的叶片进行消毒,以消毒时间5 min为最佳。消毒时间过短,达不到抑菌效果;消毒时间过长,又会对外植体产生一定的伤害,从而使萌动率降低。

试验结果表明,叶片基部带少许茎段材料,可以极大地提高诱导率和诱导质量。接种材料完全为叶片时,诱导率较低,效果较差。叶片、叶柄相互间组织结构和生理特性的差异也造成离体再生难易的不同。研究发现,青岛百合叶片、叶柄不同部位的分化能力是不同的。叶片一般以中下部为宜,而形成的小鳞芽均在叶脉处,叶柄以基部为宜,且叶柄基部的分化能力较强,形成的小鳞芽较大,叶片和叶柄愈幼嫩,分化能力愈强。

在青岛百合叶片的组织培养中,叶片诱导的小鳞芽数目少、鳞茎小,成苗速度快;而叶柄基部诱导的小鳞芽数目多、鳞茎较大,但成苗速度较慢。

本研究筛选出了适宜的青岛百合增殖和生根的培养基,这对青岛百合优良株系的快繁和百合资源的保存具有重要意义。

参考文献

- [1] 刘成程.青岛百合(*Lilium tsingtauense*)生殖生态学和生长动态初步研究[M].山东大学硕士论文,2003,05:1-2.
- [2] 马纯艳.有斑百合叶片的组织培养[J].沈阳师范学院学报,2002,20(3):219-221.
- [3] 王月芳,莫元龄,陆维忠,等.兰州百合体细胞组织培养的培养基成分[J].江西农业科学,1987,3(2): 18-23.
- [4] 胡国富,李凤兰,袁强.北青兰(*Dracocephalum argunense*)叶片组织培养的研究[J].东北农业大学学报,2004,35(2):195-198.
- [5] 臧运祥,张松,郑伟尉.垂吊型矮牵牛叶片培养不定芽发生和微繁殖研究[J].核农学报,2004,18(1):18-21.
- [6] 卢其能.龙牙百合的组织培养和快速繁殖研究[J].江西农业科学,2002,14(4):43-46.
- [7] 王磊,李红双,蔺娜.悬铃木叶片再生体系的建立 [J]. 林业科学,2004,40(1):58-63.
- [8] 李俊明.植物组织培养教程[M].北京:北京农业大学出版社,1992: 77-96.