

香水百合鳞片组织培养再生体系的建立

李冰华, 金晓玲, 刘雪梅

(中南林业科技大学环境艺术设计学院, 湖南长沙 410004)

摘要: 为了建立稳定的百合组织培养再生体系, 选用香水百合鳞茎的鳞片作为外植体, 对激素的种类和浓度、鳞片在鳞茎中的部位等对小鳞茎诱导的影响进行研究。结果表明, 植物激素的种类和浓度对鳞茎的诱导和生根有显著影响, 诱导鳞茎和生根的最适培养基为 $1/2MS + 2.0 \text{ mg/L } 2,4-D + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L KT}$ 。鳞片的部位对鳞茎和愈伤组织的诱导也有显著的影响, 其中内部鳞片的分化能力大于中部和外部鳞片。

关键词: 香水百合; 组织培养; 鳞片; 再生体系

中图分类号: S603.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2008)04-0083-03

香水百合 (*Lilium* spp.) 是百合科百合属东方百合杂交系统的多年生草本植物。其花色艳丽, 芳香宜人, 叶片青翠娟秀, 茎秆婷婷玉立, 是盆栽和点缀花园、庭院的名贵花卉, 也是世界各地广泛应用的切花材料。香水百合为杂交种, 有性繁殖后代易出现性状分离, 并且播种苗的生育周期较长, 通常采用分鳞茎、分珠芽、扦插的无性繁殖方法进行繁殖, 但种球易退化, 繁殖系数也比较低。利用组织培养技术既可以达到快速繁殖的目的, 又可以脱去病毒, 还可以与基因工程相结合, 为植物育种提供新方法。自 1957 年 Robb^[1] 首次发表了百合的组织培养文章后, 已经建立了 40 多种方法用于百合遗传转化受体系统^[2]。目前, 百合的许多器官和组织都已通过组织培养方法诱导成苗, 如鳞片、叶片、茎段、珠芽、花柱、子房、花丝等^[3]。其中, 以鳞片为外植体的应用最为广泛, 成功率也最高^[4-6]。本试验通过对香水百合鳞片组织培养技术的研究, 建立稳定的快速繁殖体系, 为百合的遗传转化和基因工程育种提供试验材料。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

试验用香水百合鳞茎由长沙市花卉市场购得。

1.2 外植体的消毒

从鳞茎上剥取内部清洁、完整的鳞片用流动水

冲洗 2 h, 在无菌条件下用 70% 的酒精浸泡 30 s, 蒸馏水冲洗 3 次, 然后用 0.1% 升汞浸泡 8 min, 再用无菌水冲洗 8 次。在超净工作台上把它们分别接种于不同的分化培养基上。

1.3 不定芽的诱导、分化和增殖

根据鳞片生长部位, 分外、中、内层 3 个部分剥离鳞片, 均取其下部, 凸面朝下分别接种于分化培养基上。将萌发的小鳞茎切下转入继代培养基, 进行增殖培养。

1.4 生根及移栽成苗

将直径约 1 cm 的鳞茎接种到生根培养基上, 生根苗移栽到珍珠岩与草炭土 1:1 混合的基质中。

1.5 培养条件

基本培养基均用 $1/2MS$ 固体培养基, 分别附加不同浓度的激素。培养基内加蔗糖 30 g/L, 琼脂 6.5 g/L, pH 值为 5.8 左右, 培养温度 $(24 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$, 光照强度 1 500 lx, 光照时长为 14 h/d。

2 结果与分析

2.1 外源激素对百合鳞片离体培养不定芽分化和增殖的影响

将鳞片接种在 $1/2MS$ 附加不同激素的培养基上, 12 d 后开始出现突起状小球体, 球体逐渐膨大, 15 d 左右分化出芽, 形成小鳞茎。由香水百合鳞片接种后 30 d 内在各激素培养基上的生长状况可以看出(表 1), 在细胞分裂素 6-BA 和 KT 中, 以 KT 的效果较好, KT 的质量浓度在 0.5~1.0 mg/L 之间比较合适。在生长素 2,4-D 和 NAA 中, 以 2,4-D 的效果更为明显, 2,4-D 的质量浓度在 2.0~3.0 mg/L 之间比较合适。在 $1/2MS + 3.0 \text{ mg/L } 2,4-D$

收稿日期: 2008-02-26

基金项目: 湖南省自然科学基金(编号: 05JJ40123)。

作者简介: 李冰华(1981—), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 主要从事园林植物与观赏园艺研究。E-mail: zhenxun33shan@163.com。

通讯作者: 金晓玲。E-mail: jinxiaoling@zjnu.cn。

+1.0 mg/L KT 和 1/2MS + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/LNAA + 0.5 mg/L KT 的培养基中,不定芽的分化率都达到了 100%,而且鳞茎的生长状况良好。因此,8 号和 11 号培养基都比较适合香水百合鳞片分化(图 1)。



A. 8号培养基; B. 11号培养基
图1 接种后30 d百合小鳞茎的诱导状况

将分化出的小鳞茎从基部切下接种在相应的培养基中进行继代培养,继代周期为 30 d。在继代培养中部分小鳞茎底部边缘生长出愈伤组织,嫩绿色

愈伤组织在生长过程中逐渐分化出丛生小鳞茎,结果见表 1。由表 1 可知,在不同的培养基中小鳞茎的增殖情况有较大差异。其中,在 8 号和 11 号培养基中,小鳞茎增殖的数量最多,远超过其他培养基中的鳞茎增殖数量,鳞茎可保持较高的增殖率和良好的生长状态。因此,8 号和 11 号也是比较适合香水百合鳞茎继代培养的培养基(图 2)。



A. 8号培养基; B. 11号培养基
图2 百合小鳞茎的增殖

表 1 不同激素对百合小鳞茎分化、鳞茎和愈伤组织继代培养的影响

培养基编号	激素配比(mg/L)				接种外植体数(个)	分化外植体数(个)	分化率(%)	每个外植体平均分化芽数(个)	鳞茎平均增殖系数	愈伤组织质量
	2,4-D	6-BA	NAA	KT						
1	0	0	0	0	16	2	12.5	1.2	1	无
2	0	1.0	0.1	0.5	16	10	62.5	2.3	2.7	量少,嫩绿
3	0	2.0	0.5	1.0	16	12	75.0	2.4	1.9	量少,嫩绿
4	0.2	0	0.1	1.0	16	7	43.8	2.1	1.3	量多,分化能力弱
5	0.2	1.0	0.5	0	16	5	31.3	2.0	1.5	量多,分化能力弱
6	0.2	2.0	0	0.5	16	2	12.5	1.0	1	无
7	0.2	1.0	0	0.5	16	8	50.0	2.2	2.2	量少,嫩绿
8	2.0	0	0.5	0.5	16	16	100.0	5.0	3.8	量多,嫩绿,分化能力强
9	2.0	1.0	0	1.0	16	1	6.3	1.0	1	无
10	2.0	2.0	0.1	0	16	4	25.0	1.3	1	极少
11	3.0	0	0	1.0	16	16	100.0	5.1	4	量多,嫩绿,分化能力强

2.2 鳞片在鳞茎中的位置对百合鳞片离体培养小鳞茎诱导和分化的影响

外层、中层和内层各部位的鳞片对小鳞茎诱导和分化有明显的影 响。接种后 30 d 时鳞茎内层鳞片均萌发出小鳞茎;中层鳞片有 58% 诱导出了小鳞茎;而外层的鳞片有 62% 污染,在未污染的鳞片 中仅有 50% 萌发,小鳞茎数量和质量都不及内层鳞片。

2.3 愈伤组织诱导

试验过程中观察到,香水百合有两种分化途径,即直接分化成鳞茎和经过愈伤组织再分化成鳞茎。直接分化途径是在初代培养中直接从外植体鳞片上分化出圆球体,圆球体 15 d 左右分化形成小鳞茎,期间不经愈伤组织阶段。将小鳞茎切下转接于相应的培养基中,小鳞茎可以再分化形成小鳞茎。

由表 1 还可以看出香水百合愈伤组织的生长状

况。除 1、6、9 号培养基无愈伤组织长出外,其他培养基均诱导出愈伤组织,但各培养基诱导的愈伤组织的分化能力不同。8 号和 11 号培养基中愈伤组织量多且不断分化出小鳞茎,4 号和 5 号培养基中愈伤组织很多但分化较少,小鳞茎生长也较慢,其余 2、3、7、10 号培养基中愈伤组织量均较少。

试验还发现,愈伤组织在继代培养的过程中可以分化形成小鳞茎。继代时小鳞茎的分化与其自身大小有关,如果继代的小鳞茎直径小于 0.4 cm,在培养过程中就会在鳞茎底部生长出愈伤组织,愈伤组织再不断分化小鳞茎;如果继代的小鳞茎直径大于 0.4 cm,鳞茎就会一直长大而不分化愈伤组织。

2.4 生根培养

试验过程中发现,在诱导香水百合鳞茎分化的培养基上可以诱导生根。组培过程中初代培养接种后 45 d 内,4 号、8 号和 11 号培养基中有小鳞茎生

根,生根状况见表2,其余培养基中的小鳞茎均没有生根。在继代培养中小鳞茎在生长的同时也不断生根,新根也随着鳞茎的生长而生长。继代培养30 d内直径超过0.6 cm的鳞茎生根率达94%,平均每株发根数为4.0条(图3),故而不用再设计生根培养基。

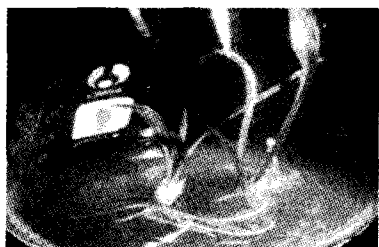


图3 小鳞茎的生根

表2 不同培养基对诱导生根的影响

培养基编号	生根时间 (d)	直径大于0.6 cm 小鳞茎生根率 (%)	平均鳞茎 发根数 (条/个)
4	42	60	1.3
8	36	90	4.2
11	25	94	4.0

2.5 移栽

将直径大于1 cm、根长超过3 cm的生根苗从瓶中取出,洗净根部琼脂后直接移栽入以珍珠岩与草炭土1:1混合的栽培基质中。移栽后的前期保持80%~90%的空气湿度,4周后从温室转移到室外常温下栽植,成活率达93.3%(图4)。第一年需保护越冬,以后可按常规方法栽植,2年后直径大于4 cm的鳞茎开始开花。



图4 小鳞茎移栽

3 讨论

香水百合鳞片组织培养过程中,从鳞片启动、愈伤组织增殖、继代培养到生根培养都可以用1/2MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L KT和1/2MS+3.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT 2种配方的培养基进行培养。在1/2MS+2.0 mg/L

2,4-D+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L KT培养基中起初鳞茎生长速度不如在1/2MS+3.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT培养基中长得快,但接种2周后前者的生长速度加快,并在接种30 d之内赶上后者的生长量。考虑到经济因素,用1/2MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L KT成本更低,更适用于工厂化生产。

鳞茎的外、中、内层鳞片均能分化出小鳞茎,但内层鳞片的分化能力最强,而且分化最早,中层鳞片的分化能力次之,外层鳞片分化能力最弱,且分化时间较晚。这与唐东芹等^[7]和李宏宇等^[8]在东方百合的组织培养中及王刚等^[9]在兰州百合的组织培养中得出的结论相反,与宋建英等^[10]在“马可”百合的组织培养中得出的结论,即鳞片的分化能力是内层>外层>中层的结论也不尽相同。说明不同的百合品种鳞片在分化能力上存在差异。

在上述2种配方的培养基中,幼嫩的组织如嫩绿色愈伤组织和直径不超过0.4 cm的小鳞茎的愈伤组织生长较快,并且持续保持分化小鳞茎的能力。直径达0.4 cm以上的小鳞茎则只增高长大而基本上不再生长愈伤组织。这说明香水百合的分化途径与组织的幼嫩程度有关。

参考文献:

- [1] Robb S M. The culture of excised tissue from bulb scales of 3 *Lilium speciosum* [J]. *J Exp Bot*, 1957, 8(3): 348-352.
- [2] 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,1991:290-297.
- [3] 蒋细旺,司怀军. 百合的组织培养技术综述[J]. *湖北农业科学*, 2004(1): 78-82.
- [4] 景艳莉,周蕴薇,张金玉,等. 精粹百合的组织培养与快速繁殖技术[J]. *东北林业大学学报*, 2006, 34(6): 46-47.
- [5] 阮少宁,杨华,梁一池,等. 香水百合组织培养的试验研究[J]. *福建林学院学报*, 2001, 21(2): 142-145.
- [6] 赵庆芳,曾小英,丁兰,等. 东方百合组织培养和快速繁殖研究[J]. *西北师范大学学报:自然科学版*, 2003, 39(1): 66-68.
- [7] 唐东芹,黄丹枫,唐克轩,等. 东方百合鳞片的组织培养[J]. *植物生理学通讯*, 2003, 39(5): 450-452.
- [8] 李宏宇,马鸿翔,雷家军,等. 东方百合鳞片结合叶片切段培养快繁技术[J]. *江苏农业科学*, 2006(3): 91-94.
- [9] 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.
- [10] 宋建英,叶建仁. “马可”百合组培技术研究[J]. *南京林业大学学报:自然科学版*, 2006, 30(4): 73-76.