

长白山百合的离体快繁技术研究

冯 健¹, 苏丽娜²

(1. 延边大学 农学院科研处, 吉林 龙井 133400; 2. 秦皇岛外国语职业学院, 河北 秦皇岛 066311)

摘 要:为明确长白山百合离体组织培养及植株的再生能力,对长白山百合不同部位的组织进行了离体培养,并进行了不同培养激素的对比试验。结果表明:长白山百合外中部鳞片小鳞茎形成率明显高于内部,再生小鳞茎的出现部位主要位于鳞片基部;在附加不同激素水平及其配比的MS培养基上培养,长白山百合以MS(植物组织培养基本培养基)+0.5mg/L BA(细胞分裂素)+0.1 mg/L NAA(萘乙酸)+3%蔗糖和MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+3%蔗糖等2个培养基生长最好。

关键词:长白山百合;小鳞茎;快繁技术

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)04-0059-03

百合为百合科百合属(*Lilium*.L)多年生宿根草本植物,该属有80多种,原产我国的有35种^[1-2]。百合是世界著名切花之一,某些品种还具有药用和食用价值。目前,关于百合试管鳞茎的文献报道较少,且在培养过程中存在鳞茎形成所需时间长、鳞茎形成率低、鳞茎直径小等问题,严重制约了组织培养快速繁殖及工厂化生产的发展。百合常规繁殖方法为分植小鳞茎,但此方法繁殖系数低,易引起病毒感染的积累,影响产量和品质,而直接用试管苗移栽,则存活率低,难以与大田生长季节相衔接。采用试管小鳞茎则便于储藏、运输、易于与大田生长季节相衔接,也有利于种质保存,因此这一方法可用于大规模的脱毒种球的生产^[3]。此外,百合试管鳞茎对于研究贮藏器官的产生和发育及营养物质的积累也是一个很好的试验体系。

1 材料和方法

1.1 试验材料

长白山百合采自长白山区;BA(细胞分裂素)、NAA(萘乙酸)、蔗糖等为Promega公司产品;琼脂、活性炭、升汞、酒精等为华美生物工程公司产品。

1.2 方法

1.2.1 MS培养基的制备 加入2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)10 mg、萘乙酸(NAA)10 mg、6-苄基嘌呤(6-BA)10 mg,将2,4-D和NAA用少量(1 mL)无水乙醇预溶,将6-BA用少量(1 mL)的物质的量浓度为0.1 mol/L的NaOH溶液溶解,溶解过程需要水浴加热,最后分别定容至100 mL,制得质量浓度为0.1 mg/mL的母液。溶

化琼脂,用粗天平分别称取琼脂9 g、蔗糖30 g,放入1 000 mL的搪瓷量杯中,再加入蒸馏水750 mL,用电炉加热,边加热边用玻璃棒搅拌,直到液体呈半透明状。然后再将配好的混合培养液加入到煮沸的琼脂中,最后加蒸馏水定容至1 000 mL,搅拌均匀。用滴管吸取物质的量浓度为1 mol/L的NaOH溶液,逐滴滴入溶化的培养基中,边滴边搅拌,并随时用精密的pH试纸(5.4~7.0)测培养基的pH,一直到培养基的pH为5.8为止(培养基的pH必须严格控制在5.8)。

1.2.2 鳞片不同部位的小鳞茎诱导试验 将各部位鳞茎的鳞片分别用清水洗净,然后用0.1%升汞溶液消毒10 min,再用无菌水漂洗4次,即可无菌接种于MS基本培养基+3%蔗糖+0.8%琼脂固体培养基上,激素为0.5 mg/L BA、0.5 mg/L NAA。经40 d培养后,分别统计观察鳞片的不同部位(基部、中部、远基部)形成小鳞茎的情况。

1.2.3 不同激素及其不同配比处理鳞片试验 鳞片经0.1%升汞液消毒10 min,再用无菌水冲洗4次,接种在3%蔗糖溶液里,通过7 d的预培养,然后选取未见污染的鳞片接入各处理的培养基上。该试验共设7个处理,其中对照(CK)不加激素,每个处理接种鳞片15块,共接种鳞片105块。培养50 d后检查统计形成小鳞茎数目及其根苗生长情况。培养温度(24±1)℃,光强1 000 lx,光照10 h。基本培养基为MS,pH 5.8。不同激素及其配比如下: A: MS+3%蔗糖+0.8%琼脂+0.5 mg/L BA; B: MS+3%蔗糖+0.8%琼脂+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA; C: MS+3%蔗糖+0.8%琼脂+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L IBA; D: MS+3%蔗糖+0.8%琼脂+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA; E: MS+3%蔗糖+0.8%琼脂+0.1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA; F:

第一作者简介:冯健(1980-),男,助教,现主要从事组织培养学研究工作,E-mail: fengjian@ybu.edu.cn

收稿日期:2008-10-20

MS+3%蔗糖+0.8%琼脂+0.1 mg/L BA+0.5 mg/L IBA;G:MS+3%蔗糖+0.8%琼脂。

1.2.4 百合小鳞茎的形态结构观察 鳞片再生小鳞茎发育过程的观察。鳞片,厚度 8~10 μm,用铁矾—苏木精染色,用于小鳞茎发育过程的外部形态的观察。标本用 FAA 固定液固定,制各石蜡切片显微镜观察。采用解剖镜进行小鳞茎发育过程的外部形态观察。

2 结果

2.1 不同部位小鳞茎形成的差异

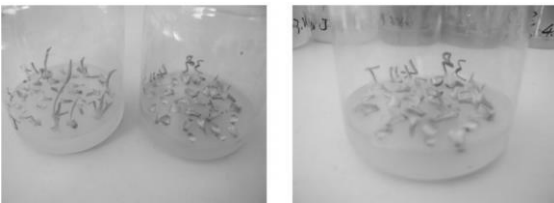


图 1 左:小鳞茎基部 右:小鳞茎中部 图 2 小鳞茎远基部

Fig. 1 L: the base of small bulb; R: the central of small bulb

Fig. 2 Far from the base of small bulb

通过不同部位的组织培养,选育最适合长白山百合快速繁殖的组培器官。结果见表 1 和图 1、图 2。

表 1 百合鳞片不同部位小鳞茎形成能力的差异

Table 1 The differences of small bulb forming ability in different parts of lily scales

项目/部位 Project/ parts	基部 Base	中部 Central	远基部 Far from the base
培养基片数 Number of medium	23	23	23
形成小鳞茎鳞片数 Scales number of small bulb	10	4	4
小鳞茎形成率 Small bulb fomabion rate/ %	43.5	17.4	17.4

2.2 MS 培养基中不同激素及其比对百合鳞片形成小鳞茎的影响

培养基的激素配比以 MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 的诱导率最高、平均每块鳞片形成小鳞茎的数目可达 4.73 个,鳞片形成小鳞茎的百分率达 93.3%。其次为 MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA、平均每块鳞片形成小鳞茎数为 4.15,形成小鳞茎的百分率亦达 93.3%。其余的 MS 培养基分别添加 0.5 mg/L BA、0.5 mg/L BA+0.1 mg/L IBA、0.1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA、0.1 mg/L BA+0.5 mg/L IBA 的处理,小鳞茎诱导率均高于不加激素的对照(见表 2)。

表 2 不同激素及其比对长白山百合鳞片形成小鳞茎的影响

Table 2 The impact of small bulb forming of different hormones and their ratio on changbai mountain lily scales

培养基 Medium /mg·L ⁻¹	培养鳞片数 Scales number	平均每块小鳞茎数 Average number of each small bulb	形成小鳞茎鳞片数 Scales number of small bulb	诱导率 Induction rate/ %	根苗生长情况 Growth of root seedling
MS+0.5BA	12	3.42±2.35	10	83.3	苗无根及无苗小鳞茎
MS+0.5BA+0.1NAA	15	4.73±2.02	14	93.3	苗无根或少根及无苗小鳞茎
MS+0.5BA+0.5NAA	15	4.20±1.82	14	93.3	苗无根或少根及无苗小鳞茎
MS+0.5BA+0.1IBA	14	3.93±1.89	13	92.9	苗无根或少根及无苗小鳞茎
MS+0.1BA+0.5NAA	13	4.15±1.86	12	92.3	根苗完整植株及无苗小鳞茎
MS+0.1BA+0.5IBA	14	3.64±1.98	12	85.7	根苗完整植株及无苗小鳞茎
MS(CK)	14	2.86±2.14	11	78.6	苗有少量根及无苗小鳞茎

外植体(鳞片)的再生小鳞茎形成后,再继续培养即可从小鳞茎的小鳞片生长成叶,小鳞茎的基部可长出根。小鳞茎的根苗生长与培养基不同激素的配比有着密切的关系,激素在 0.1~0.5 mg/L 的范围内,外植体(鳞片)在 BA 浓度高, NAA(或 IBA)浓度低的培养基里,所形成的小鳞茎继续培养可生长出无根苗(图 3)。与此相反,在 BA 浓度低, NAA(或 IBA)浓度高的培养基里,所形成的小鳞茎继续培养可生长出根苗完整的植株(图 4)。

2.3 百合小鳞茎的形成膨大过程及其形态结构

百合鳞片接种后培养 10~40 d 观察,看到鳞片基部的边缘上诱导出淡黄色和淡白色的小点,呈圆点状和环状突起(图 5),开始发生时每块鳞片有 1~5 个突起物随着培养时间的增加,突起物增多,有的鳞片多达 6~10 个。突起物在继续培养时生长增大就成为小鳞茎(图 6)。根据显微镜切片观察,鳞片上的突起物形成时,鳞

片表皮下先脱分化出一群类似于分生组织的细胞,该群细胞小,细胞核大,细胞排列紧密,这团细胞进而分化成不定芽的结构(图 7),不定芽的芽原基外边的叶原基发育成白色、肥厚的小鳞片,形成了小鳞茎,然后由小鳞茎内部的鳞片叶伸长发育成普通叶片而小鳞茎的基部可长出根,继而成长为幼苗(图 8)。



图 3 无根苗

Fig. 3 Non rooted seedling



图 4 根苗完整植株

Fig. 4 Complete rooted plants



图5 诱导后的淡黄色突起
Fig. 5 Yellow neurite after the induction

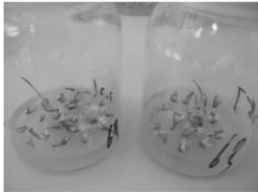


图6 小鳞茎
Fig. 6 Isolated small bulb

3 讨论

长白山百合基部贮藏的营养成分比中部和远基部的多,更有利于小鳞茎形成。试验结果表明鳞茎外中部鳞片小鳞茎形成率明显高于内部。这与外部鳞片贮藏较多的营养物质如淀粉粒,而内部鳞片的淀粉粒较少有关。



图7 细胞进化的不定芽
Fig. 7 Adventitious buds of cell evolution



图8 培养形成的幼苗
Fig. 8 Forming seedlings through nurturing

不同激素配比对百合鳞片诱导分化小鳞茎的能力有不同的影响,生长素和细胞分裂素以BA与NAA配

合较好^[4]。细胞分裂素影响细胞分裂、顶端优势的变化和茎的分化等。它能促进细胞分裂和由愈伤组织或器官上分化不定芽^[5-9]。该试验结果表明BA也促进百合鳞片器官分化,从而形成小鳞茎,NAA有促进成苗、植株长高和生根的作用,但过多NAA会使其生根增多,不利于小苗生长。

通过对百合小鳞茎形成膨大过程的观察发现,该试验采用的培养基配比(MS+0.1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA)对长白山百合小鳞茎的形成效果相当显著,并明显好于国内同期其他百合品种组培所用的培养基。导致这种现象的可能因素应为,不同百合品种对培养基及其营养成分的需求不同;仪器、营养物质纯度、MS培养基母液成分及配比不同。

该试验为长白山百合组培快繁在生产中的应用提供了理论基础;肯定了试管苗技术在长白山百合快繁中的实用性;为吉林省特产蔬菜的发展创汇提供了科学依据。

参考文献

[1] 中国科学院上海植物生理研究所细胞室(编译). 植物组织和细胞培养[M]. 上海科学技术出版社. 2005: 180-188.
[2] 李扬汉. 植物学[M]. 北京: 高等教育出版社. 2006: 351.
[3] 王爱勤 周歧伟. 何飞龙, 等. 百合试管结鳞茎的研究[J]. 广西农业大学学报. 1998, 17(1): 71-75.
[4] 王富民 薛应龙. 百合小鳞茎离体发生过程中内源多胺活性的变化[J]. 植物生理学报. 1998, 14(4): 350.
[5] 陈为民. 百合离体培养再生植株[J]. 植物生理学通讯. 1993(3): 46.
[6] 赵祥云 程廉 邢尤美 等. 百合珠芽组培及脱毒研究[J]. 园艺学报. 1993, 20(3): 284-288.

Research on Rapid Propagation Technique of Lily in Changbai Mountain

FENG Jian¹, SU Li-na²

(1. Scientific Research Center, Agricultural Institute, Yanbian University, Longjing, Jilin 133400, China; 2. Tourism Department of Hebei Vocational and Foreign Language College, Qinhuangdao, Hebei 066311, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to study Lily vitro tissue and plant regeneration, for a small lily bulb *in vitro* production of providing a scientific basis. This passage studied the impaction small scales from the bulb occurred and formed small plantlets bulb factors and the same species, different parts of the bulb formation of the small bulbs of different capacities. This test proved that foreign central flake small bulb formation rate was higher than internal, the renewable small lily bulbs the emergence mainly lie in the basis of scales. Training different hormone comparative testing, the final screening of Changbai Mountain Lily was suitable for the tissue culture medium. Added with different hormone levels and the ratio of MS medium culture, Changbai Mountain Lily will grow prosperously with the following formula: MS (plant tissue culture medium) + 0.5 mg/L BA (CTK) + 0.1 mg/L NAA (NAA) + 3% sucrose and MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+3% sucrose medium.

Key words: Lily; Isolated small bulb; Rapid propagation