

野生细叶百合组织培养体系的建立

张悦, 王健鹏, 王秀峰, 程英魁, 马艺莽, 于永辉

(吉林省蔬菜花卉科学研究院, 吉林 长春 130033)

摘要:以细叶百合为试材,采用组织培养的方法,研究细叶百合不同部位、不同激素配比及不同发生途径对获得细叶百合再生植株的影响。结果表明:以鳞茎为外植体,通过器官发生途径获得再生植株,其最佳分化及增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;以花器官、幼嫩叶片为外植体通过体细胞发生途径获得再生植株,其愈伤组织诱导培养基为 MS+2,4-D 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L,不定芽诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L,最佳增殖培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,生根培养基为 1/2MS+NAA 0.1 mg/L。

关键词:细叶百合;器官发生;体细胞发生

中图分类号:S 682.2⁺65 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)11-0095-03

细叶百合(*Lilium pumilum*)别名山丹,主要生长在东北高寒地区^[1]。其营养价值丰富^[2],除含有大量蛋白质、脂肪、还原糖、淀粉、钙、磷、铁、维生素 B、维生素 C 等营养素外,还含有多种生物碱,对白细胞减少症有预防作用,能升高血细胞,对化疗及放射性治疗后细胞减少症有治疗作用,是药、食兼用的百合品种^[3];细叶百合对镰刀菌、叶枯病、干旱、盐碱等具有较强的抗性,是百合抗性育种的重要亲本^[4]。目前,由于自然生态环境遭到破坏,细叶百合的自然分布量锐减^[5],因此,野生细叶百合种质资源的保存和繁殖显得更为重要。该研究通过建立不同发生方式的细叶百合再生体系,实现对细叶百合种质资源的保存,以期为百合种质资源创新打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

细叶百合引种于吉林省柳河县,定植于吉林省蔬菜花卉科学研究院资源保存圃。

1.2 试验方法

1.2.1 鳞片器官发生途径再生体系的建立 无菌鳞茎的制备^[6]:取细叶百合鳞茎 4℃处理 30 d,从外到内分成外层、中层、内层,洗净,流水冲洗 0.5 h,用 75%酒精浸泡消毒 1 min 后,随后用 1% NaClO 溶液浸泡消毒 15~20 min,无菌水冲洗 3~5 次以清除残余的 NaClO。不同

部位对鳞茎分化率的影响:将灭菌后的鳞茎每部分按端部、中部、基部分割成 3 份,去除边缘后切成 0.5 cm×0.5 cm 大小的鳞茎块,延鳞茎生长方向,接种于含有 6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基中,其中蔗糖浓度为 3%,琼脂浓度为 0.65%,pH 5.8。20℃暗培养 5~7 d,转至 1 500 lx 光下培养。记录生长状况。分化率=(分化外植体数/接种外植体数)×100%。增殖培养基的筛选:分别将外层鳞茎基部分化的不定芽接种于不同激素配比(表 2)的增殖培养基中,调查不定芽增殖情况。

1.2.2 体细胞再生体系的建立 无菌花器官、幼嫩叶片的制备^[7]:取 6—7 月细叶百合的幼嫩花蕾、幼嫩叶片,洗净,流水冲洗 0.5 h,用 75%酒精浸泡消毒 30 s 后,无菌水冲洗 3~4 次,随后用 1% NaClO 溶液浸泡消毒 5~10 min,无菌水冲洗 3~5 次以清除残余的 NaClO。将花托、花瓣、花丝分开备用。不同器官的愈伤组织诱导率:将花瓣切成 0.5 cm×0.5 cm 大小,外侧向上接种于不同培养基上(表 3);花丝切成 1 cm 大小,接种于不同培养基上(表 3);花托倒置接种于不同培养基上(表 3);叶片剪切 0.5 cm×0.5 cm 大小,叶面向下接种于不同的培养基上(表 3)。培养基中蔗糖浓度为 3%,琼脂浓度为 0.55%,pH 5.8。20℃暗培养 3~4 d,转至 1 500 lx 光下培养。记录生长状况。愈伤组织诱导率=(发生愈伤组织的外植体数/外植体总数)×100%。不定芽的诱导:将由花托诱导出的愈伤组织切割成 0.8 cm×0.8 cm 的愈伤组织块,分别接种于不同激素配方的 MS 培养基中(表 4)。记录不定芽的分化率。不定芽分化率=(不定芽总数/愈伤组织接种总数)×100%。不定芽的增殖:将分化的不定芽接种于不同激素配比(表 5)的增殖培养

第一作者简介:张悦(1983-),女,硕士,助理研究员,现主要从事园艺作物组织培养等研究工作。E-mail:55757703@qq.com。

基金项目:吉林省科技厅资助项目(20120262)。

收稿日期:2015-01-19

基中,调查不定芽增殖情况,计算增殖系数。增殖系数=继代后不定芽数/继代前不定芽数。

1.2.3 诱导生根获得再生植株 将通过不同途径获得的不定芽接种在含有 NAA 0.1 mg/L 的 1/2MS 培养基中,诱导生根,最终获得细叶百合的再生植株。

2 结果与分析

2.1 鳞茎不同部位及不同激素对器官发生途径的影响

2.1.1 鳞茎不同部位对器官发生途径的影响 以细叶百合鳞茎的不同部位作为外植体进行不定芽的诱导,其分化率存在显著差异,由表 1 可以看出,以外层、中层鳞茎作为外植体进行诱导,其分化率明显高于内层。外层分化率略高于中层,远高于内层;鳞茎基部的分化能力强于中部,远强于端部。由此可见,细叶百合鳞茎的分化能力同其它百合品种相似^[7],存在位置效应,分析其原因可能与其鳞茎中所含有的内源激素的含量有关。

表 1 鳞茎不同部位分化率

鳞片位置	接种部位	接种数	分化数	分化率/%
外层	端部	40	20	50.0
	中部	40	34	85.0
	基部	40	40	100.0
	端部	40	18	45.0
中层	中部	40	32	80.0
	基部	40	38	95.0
	端部	40	10	25.0
内层	中部	40	27	67.5
	基部	40	38	95.0

注:以上数据是在培养 28 d 时统计。

2.1.2 不同激素对器官发生途径的影响 不同激素种类对于鳞茎的诱导效果不同,由表 2 可知,不定芽的诱导作用效果,6-BA、NAA 组明显高于 KT、NAA 的组合,使用 KT 诱导的鳞茎多产生愈伤组织,而芽的分化率明显低于 6-BA,同时产生的不定芽较为细、弱。而 6-BA、NAA 的组合浓度过高、过低均不利于不定芽的诱导,由

表 2 不同激素对器官发生途径的影响

外植体	激素配比/(mg·L ⁻¹)			接种数 /块	分化数 /块	分化率 /%
	KT	6-BA	NAA			
外层鳞茎 基部诱导 的不定芽		2.0	0.1	40	26	65.0
		2.0	1.0	40	20	50.0
		1.0	0.1	40	40	100.0
		1.0	1.0	40	29	72.5
		0.5	0.1	40	30	75.0
		0.5	1.0	40	22	55.0
	2.0		0.1	40	10	25.0
	2.0		1.0	40	5	12.5
	1.0		0.1	40	13	32.5
	1.0		1.0	40	8	20.0
	0.5		0.1	40	20	50.0
	0.5		1.0	40	9	22.5

注:以上数据是在培养 28 d 时统计。

此可知,在以外层鳞茎基部为外植体的最佳分化培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

2.2 花器官、叶片愈伤组织及不定芽的诱导

2.2.1 不同激素对花器官、叶片愈伤组织诱导的影响

以不同的花器官和叶片为外植体诱导愈伤组织,其对激素的敏感度不同,但总体而言,6-BA、NAA 组合不利于诱导愈伤组织,但其诱导出的愈伤组织颜色翠绿、质地紧实,有利于进一步进行不定芽的诱导;KT、NAA 组合与 2,4-D、NAA 组合对愈伤组织的诱导效果相差不大,但 KT 组合诱导的愈伤组织相对松散,褐化严重,不利于不定芽的诱导。由表 3 可以看出,以花托作为外植体,在 MS+2,4-D 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L 组合中愈伤组织诱导效率最大,可达到 83.3%,且愈伤组织形态有利于不定芽的生成。

表 3 不同激素对花器官、叶片愈伤组织诱导的影响

外植体	激素配比/(mg·L ⁻¹)				接种数	诱导数	诱导率 /%
	6-BA	NAA	2,4-D	KT			
叶片	2.0	1.5			30	11	36.7
	1.0	1.0			30	8	26.7
		1.5	2.0		30	21	70.0
		1.0	1.0		30	20	66.7
		1.5		2.0	30	21	70.0
		1.0		1.0	30	17	56.7
	2.0	1.5			30	15	50.0
	1.0	1.0			30	9	30.0
		1.5	2.0		30	25	83.3
		1.0	1.0		30	20	66.7
花瓣		1.5		2.0	30	22	73.3
		1.0		1.0	30	19	63.3
	2.0	1.5			30	3	10.0
	1.0	1.0			30	5	16.7
		1.5	2.0		30	16	53.3
		1.0	1.0		30	13	43.3
		1.5		2.0	30	15	50.0
		1.0		1.0	30	13	43.3
	2.0	1.5			30	0	0
	1.0	1.0			30	2	7.0
花丝		1.5	2.0		30	8	26.7
		1.0	1.0		30	7	23.3
		1.5		2.0	30	9	30.0
		1.0		1.0	30	7	23.3

注:以上数据是在培养 45 d 时统计。

2.2.2 不同激素浓度对不定芽的诱导 由表 4 可知,6-BA、IAA 组合有利于不定芽的分化,随着 6-BA 浓度的提高,不定芽的分化率逐渐提高,产生不定芽的数量也随之增加,但是随着 6-BA 浓度的提高所产生的不定芽生长形态逐渐向细弱方向发展,不利于后期不定芽的增殖,所以从不定芽的生长形态及分化率 2 个方面综合考虑得出,不定芽的最佳分化培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L。

表4 不同激素浓度对不定芽的诱导

外植体	激素配比/(mg·L ⁻¹)		接种数	分化率 /%	平均不定芽数 /个
	6-BA	IAA			
由花托诱导产生的愈伤组织	2.0	0.1	20	95 (19/20)	3.5
	2.0	1.0	20	40 (8/20)	2.8
	1.0	0.1	20	90 (18/20)	3.0
	1.0	1.0	20	20 (4/20)	1.4
	0.5	0.1	20	70 (14/20)	2.2
	0.5	1.0	20	10 (2/20)	1.3

注:以上数据是在培养 28 d 时统计。

2.3 不定芽的增殖

6-BA 对不定芽的增殖也有明显效果,不定芽的增殖系数与其浓度成正比,但随 6-BA 浓度的增加,增殖的不定芽生长状态不佳,常伴有玻璃化现象的发生,增殖的不定芽成活率受到一定影响,因此,综合考虑不定芽的最佳增殖培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L,增殖系数可达 3.2。

表5 不同激素浓度对不定芽增殖的影响

外植体	激素配比/(mg·L ⁻¹)		继代前不定芽数 /(个·瓶 ⁻¹)	继代后不定芽数 /(个·瓶 ⁻¹)	增殖 系数
	6-BA	NAA			
不定芽个体	2.0	0.1	5	20	4.0
	1.0	0.1	5	18	3.6
	0.5	0.1	5	16	3.2

注:以上数据是在培养 42 d 时统计。

3 结论与讨论

细叶百合主要的繁殖器官—鳞茎部分,能够解毒消肿、活血祛瘀。治痢疽肿毒、疔疮、吐衄、跌打损伤等,且营养价值较高,有止咳平喘的功效,是药、食兼用的作物资源。近年来,市场对其需求量逐年递增,仅靠野生资源难以满足市场的需求,同时由于对野生细叶百合资源的过度开发,导致细叶百合的自然分布量逐年减少,其野生资源濒临灭绝。细叶百合以无性繁殖为主,但是繁

殖系数较小,且受环境条件的制约,难以满足目前的需求。利用组织培养技术可以不受地区和气候的影响,在短时间内获得大量的再生植株,实现细叶百合的快速繁殖^[8],从而满足市场的需求。该试验通过器官发生途径及体细胞发生途径分别建立细叶百合再生体系,获得细叶百合的再生植株。以鳞茎为外植体可以通过器官发生途径快速获得再生植株,其中以外层鳞茎基部为外植体,最高可获得 100% 分化率,经生根培养直接成苗;以花器官、幼嫩叶片为外植体可以通过体细胞发生途径先诱导愈伤组织,再通过丛生芽的诱导、不定芽诱导生根等步骤最终获得再生植株,其中以花托为外植体能够获得较高的愈伤组织诱导率。野生细叶百合再生体系的建立不仅为细叶百合的快速繁育提供了技术支持,还为细叶百合种质资源的保存及创新奠定了基础。

(该文作者还有刘井莉,单位同第一作者。)

参考文献

- [1] 葛蓓宇,杨青杰,吴萍,等. 细叶百合组织培养植株再生[J]. 东北林业大学学报,2010,38(5):54-59.
- [2] 吴若著,阮少宁. 百合胚状体形成途径及植株的再生研究[J]. 福建林学院学报,2003,23(4):322-325.
- [3] 万勇,毛凌华,黄永萍,等. 万载百合组织培养快速繁殖的研究[J]. 江西农业学报,2000,12(4):26-29.
- [4] 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.
- [5] 王元忠,沙本才. 南川百合的组织培养和快速繁殖[J]. 亚热带植物科学,2008,37(3):69-70.
- [6] 张艺萍,屈云慧,吴学尉,等. 大理百合的组织培养和快速繁殖[J]. 北方园艺,2007(8):189-190.
- [7] 周祖富,艾素云,杨美纯. 火百合花丝组织培养器官形成的细胞组织学研究[J]. 亚热带植物科学,2006,41(3):1-15.
- [8] 刘菊华,金志强,徐碧玉,等. 龙牙百合的植株再生与遗传转化[J]. 分子植物育种,2003,4(1):465-474.

Establishment of Wild Lilium Tissue Culture System

ZHANG Yue, WANG Jian-li, WANG Xiu-feng, CHENG Ying-kui, MA Yi-qiao, YU Yong-hui, LIU Jing-li
(Jilin Research Institute of Vegetables and Flowers, Changchun, Jilin 130033)

Abstract: Taking *Lilium pumilum* as experimental material, using tissue culture method, effects of different parts of *Lilium pumilum*, different hormone combinations and different ways of plant regeneration on *Lilium pumilum* were studied. The results showed that with the bulb as explants, the organ regeneration plants were obtained, the best medium for differentiation and proliferation was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; in flower organ, the young leaves as explants via somatic embryo genesis regeneration plants were obtained, and the callus induction medium was MS+2,4-D 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L, adventitious bud induction medium was MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L, the optimal proliferation medium was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L. Rooting culture medium was 1/2MS+NAA 0.1 mg/L.

Keywords: *Lilium pumilum*; organogenesis; somatic embryogenesis