

兰州百合花瓣高频再生体系研究

刘 芬

(甘肃省农科院果树研究所, 兰州 730070)

摘 要:以兰州百合为试材, 研究总结出了利用花瓣建立外植体的高频再生体系: 用花瓣建立外植体时, 灭菌时间控制在 15min 效果较佳, 污染率、失活率均低; 适宜诱导花瓣愈伤组织的培养基为 MS+BA0.5mg/L+2,4-D 0.5mg/L, 诱导率达到 90%; 适宜芽分化培养基为 MS+BA 1.5mg/L+NAA0.1mg/L, 分化率为 75%; 适宜继代和增殖的培养基为 MS+BA 1.5mg/L+IBA 0.5mg/L, 增殖倍数可达 5.8; 生根培养基以 GS+NAA0.25mg/L 最佳, 生根率高达 100%, 试管苗生长势强, 且根系发达; 用草炭作移栽基质, 成活率高, 为 89.6%。

关键词: 兰州百合; 花瓣; 诱导; 继代; 生根; 基质

中图分类号: S 644.1(242) **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)06-0210-03

兰州百合 (*Lilium davidii unicolor* Cotton) 瓣大肉厚, 风味甘甜, 营养丰富, 富含百合多糖类及一些特殊生物活性物质、多种维生素等, 名列食用百合之首, 无论作为名菜佳肴、入药健身, 都具有很高的价值, 在国内外市场倍受青睐, 著名植物学家孔宪武教授称赞兰州百合“品质之佳, 堪称世界第一”。其常规繁殖方法有茎生子球、鳞片扦插等, 繁殖速度有限, 不能满足生产需求。该试验以兰州百合花瓣为外植体, 通过愈伤组织的诱导, 系统地进行不定芽的诱导、增殖、生根和移栽研究, 在短期内生产出大量均匀一致的健壮种苗从而建立高频再生体系, 丰富以往仅采用叶片、茎尖、鳞片等作为外植体

的研究¹⁻³, 为兰州百合无性快速繁殖和生产转基因植株提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 外植体建立及诱导培养

将兰州百合含苞待放的花蕾用中性洗涤剂处理后, 用流水冲洗 20min, 在无菌条件下用 75% 的酒精消毒 1min, 再用 0.2% 的 HgCl₂ 溶液分 6、9、12、15、18、20min 共 6 个处理灭菌, 最后用无菌水冲洗 6~8 次, 再用消毒滤纸吸干表面水分, 用镊子夹开花瓣, 将花瓣切成 8×8mm² 的方块接种于附加不同浓度的 2,4-D、BA 及 NAA 的 MS 培养基上。培养基中蔗糖均为 40g/L, 琼脂为 4.7g/L, pH5.8~6.2。将培养 5 周左右的愈伤组织, 转接到芽诱导分化培养基上培养。

1.2 芽的继代增殖培养

将诱导出的约 0.8~1mm 不定芽, 在无菌条件下转接到 MS 附加 BA、2,4-D、NAA 及 IBA 等不同激素及浓

作者简介: 刘芬(1972-), 女, 硕士, 助理研究员, 一直从事植物生物技术研究工作, E-mail: gswzw@163.com。

基金项目: 甘肃省科技攻关资助项目 (QS022-C31-47)。

收稿日期: 2007-03-28

Rapid Propagation of *Chrysanthemum*

Jiao De-zhi¹, Li Bo¹, Wei Ming-li², Ma Qiu-yan¹, Sun Qi¹

(1. College of Life Science and Technology, Qiqihaer University, Heilongjiang 161006; 2. Seed Station of Qiqihaer, Heilongjiang 161000)

Abstract: The stem segments of chrysanthemum with terminal buds were used as explants and inoculated into the medium (MS+0.2mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA) which could induce the growth of lateral buds. The explants were induced to be buds after 25 days. Then the buds were subcultured into the callus-inducing medium (MS+0.1mg/L NAA+3.0mg/L 6-BA). At last the callus were inoculated into the root-inducing medium (1/2MS+0.1mg/L NAA). The roots were induced in the following 15 days. The average rate of rooting was up to 100% during 30~35 days. The plantlets of chrysanthemum were domesticated in culture bottles without covers, then transplanted. The survival rate of them was above 95%.

Key words: *Chrysanthemum*; Tissue culture; Rapid propagation

度的分化培养基上增殖培养。培养基中蔗糖浓度均为 40g/L, 琼脂为 4.7g/L, pH5.8~6.2。

1.3 诱导生根培养

从在继代培养基上分化出的苗上剪取丛生芽苗, 并剪去上部叶, 将 1~2cm 高的芽苗分别转入以 1/2MS、B₆、GS 及 GS 附加不同浓度 NAA 激素的 6 种培养基上。蔗糖浓度为 20g/L, 琼脂均为 4.7g/L, pH5.8~6.2。

1.4 移栽基质筛选

即先闭瓶强光练苗 2~3 周时间, 再开口练苗 2~3d, 将经过练苗的试管苗进行不同的移栽处理, 设草炭、草炭:园土=2:1、蛭石、细沙 4 种移栽基质, 栽植试管苗 500 株, 移栽 30d 后, 调查成活率。

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对花瓣外植体污染率及活性的影响

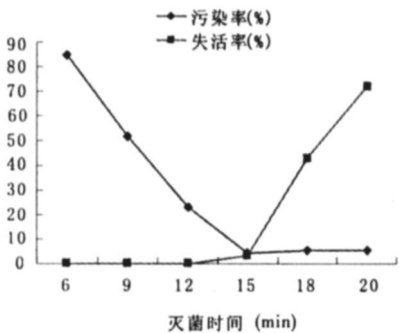


图1 灭菌时间对花瓣外植体污染率及活性的影响

接种 4 周后统计结果(见图 1), 在各灭菌时间处理中, 随着灭菌时间的延长, 花瓣外植体的污染率呈下降趋势, 当灭菌时间达 15min 时, 外植体污染率降低到最低, 灭菌时间超过 15min, 延长灭菌时间, 对外植体污染率的影响不明显。从灭菌时间对外植体活性的影响来看, 灭菌时间少于 12min 时, 花瓣外植体基本不会失活, 灭菌时间为 15 min 时, 外植体失活率为 3%, 当灭菌时间长于 15 min 时, 随着灭菌时间的延长, 花瓣外植体的失活率急剧增大, 当灭菌时间达 20min 时, 花瓣外植体的失活率在 70%以上。灭菌 6~12min, 花瓣外植体基本不失活, 但污染率偏高, 在 23%~85%之间; 灭菌 18~20min, 污染率小于 10%, 但失活率高达 43%~72%, 严重影响再生。综合以上分析, 花瓣外植体适宜的灭菌时间控制在 15min 即可, 既降低了污染率, 失活率又维持在较低水平。

2.2 花瓣不定芽的诱导

从表 1 可知, 兰州百合花瓣在附加 2, 4-D0.5mg/L 和 BA0.25~1mg/L 的培养基上, 对愈伤组织诱导都有效, 但产生愈伤组织的高低有差异, 其中以 BA0.5mg/L 浓度愈伤组织诱导率最高, 为 90%; 高于或低于 0.5mg/L 愈伤组织的诱导率均有所下降, 但仍在 70%以上; 而在附加 BA0.5mg/L 和 NAA0.1~1.5mg/L 的培养基上, 愈伤组织的诱导率明显较低, 仅为 24%~58%。

这一结果表明 BA 与 2, 4-D 组合更适合诱导产生愈伤组织, 在相同浓度的 BA 下, 2, 4-D 对愈伤组织的诱导力较 NAA 强。以 BA0.5mg/L+2, 4-D 0.5mg/L 培养基的诱导率最高, 达到 90%, 生长点分化早, 15d 后开始分化。

表 1 附加不同浓度激素组合对愈伤组织诱导的影响

激素及浓度 (mg/L)	接种外植体 块数(个)	形成愈伤 组织数(个)	愈伤组织 诱导率(%)	生长点开始分化 所需时间(d)
BA0.25+2, 4-D0.5	50	41	82	18
BA0.5+2, 4-D0.5	50	45	90	15
BA1+2, 4-D0.5	50	37	74	15
BA0.5+NAA0.1	50	20	40	22
BA0.5+NAA0.5	50	29	58	20
BA0.5+NAA1	50	27	54	20
BA0.5+NAA1.5	50	12	24	25

愈伤组织在附加不同浓度的 BA+NAA 培养基上均易分化出不定芽, 分化率为 55%~75%。在附加不同浓度 BA+2, 4-D 的培养基上, 不定芽分化率较低, 为 35%~40%。说明与 BA 组合, NAA 比 2, 4-D 更有利于促进不定芽的分化(见表 2)。

表 2 不同激素组合与浓度对芽的分化与生长的影响

激素及浓度 (mg/L)	接种愈伤组织数 (个)	形成不定芽的愈伤 组织数(个)	分化率 (%)
BA1+NAA0.1	20	11	55
BA1.5+NAA0.1	20	15	75
BA1+2, 4-D0.25	20	8	40
BA1.5+2, 4-D0.25	20	7	35

2.3 芽的继代增殖培养

由表 3 可见, 6 种不同培养基 芽的增殖情况差异较大, 增殖倍数在 2.1~5.8 之间。当 BA0.5mg/L 分别与相同浓度的 2, 4-D、NAA 及 IBA 组合时, 以 BA+IBA 的组合较有利于增殖培养, 增殖倍数达 4.3, BA 与 2, 4-D 或 NAA 组合, 芽的增殖倍数较低, 分别为 2.1 和 2.9; 当 IBA 浓度为 0.5mg/L, 而 BA 浓度在 0.25~1.5mg/L 时, 利于芽的增殖, 增殖倍数在 3.6~5.8 之间, 以 BA 1.0mg/L 最大。因此, 适宜芽增殖的培养基是 MS+BA 1.0mg/L+IBA0.5mg/L。

表 3 激素浓度及配比对分化苗增殖的影响

激素浓度(mg/L)				接种数	诱导数	增殖倍数
BA	2, 4-D	NAA	IBA			
0.5	0.5			48	101	2.1
0.5		0.5		50	145	2.9
0.5			0.5	49	211	4.3
0.25			0.5	48	173	3.6
1			0.5	50	290	5.8
1.5			0.5	47	216	4.6

2.4 激素对生根培养的影响

从表 4 可以看出, 6 种培养基均能诱导生根, 但生根效果不同。接种于①~③3 种基本培养基上, 生根率在 GS 培养基上诱导率高, 为 86.7%; 以 GS 为基本培养基, 附加 0.125~0.5mg/L 的 NAA 时, 生根率可达 93.0%~100.0%; 以 GS+NAA0.25mg/L 培养基最适

宜生根,生根率达 100.0%,其平均生根数达 6.5 条,且苗活力强,根粗壮,适于移栽;GS+NAA0.5mg/L 培养基虽然生根率也达到 100%,平均生根数达 6.2 条,但其根肉质化,移栽不易成活。

表 4 不同培养基对芽生根的影响

培养基 编号	基本 培养基	NAA 激素 浓度(mg/L)	接种苗数 (个)	生根苗数 (个)	生根率 (%)	平均生根 数(条)	根长 (cm)
①	1/2MS		58	46	79.3	3.9	1~3
②	B ₅		58	48	82.8	4.2	1~2
③	GS		60	52	86.7	4.9	1~2
④	GS	0.125	57	53	93.0	5.7	2~4
⑤	GS	0.25	59	59	100.0	6.5	2~4
⑥	GS	0.50	57	57	100.0	6.2	2~4

注 接种 4 周后调查生根情况

2.5 不同移栽基质对试管苗移栽成活率的影响

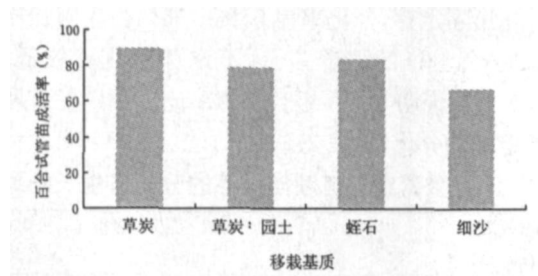


图 2 不同移栽基质对兰州百合试管苗成活率的影响

对兰州百合移栽基质的筛选试验结果表明(见图 2):用草炭作为百合移栽基质,试管苗的成活率较高,达到 89.6%,而且缓苗时间短,发新根快,小鳞茎种球的生长量也大,可在生产中采用;草炭:园土(2:1)的移栽基质成活率也较高,为 78.4%,虽缓苗时间较长,发根较慢,但成本较完全使用草炭低,也可在生产中采用;细沙做移栽基质,移栽成活率低于 70%,因保水、保肥性差,易造成试管苗失水萎蔫死亡和植株营养缺乏,苗色发黄,不宜在生产中采用;蛭石作移栽基质,虽然移栽成活率可达 83.2%,但由于蛭石保水能力强,透气性差,生长季高温易导致试管苗根部腐烂死亡,也不宜采用。

3 小结

用花瓣建立外植体时,最佳灭菌时间为 15min,此时

失活率仅为 3%,污染率为 4%。

适宜花瓣诱导愈伤组织的培养基以 MS+BA 0.5mg/L+2,4-D0.5mg/L 培养基诱导率效果佳,达 90%,生长点分化早,15d 后开始分化。愈伤组织在 MS+BA1.5mg/L+NAA0.1mg/L 培养基上易分化出不定芽,分化率为 75%。

获得的脱毒原种苗,适宜的继代增殖培养基为 MS+BA1.0mg/L+IBA0.5mg/L,增殖倍数达 5.8;适宜的生根培养基为 GS+NAA0.25mg/L,生根率为 100.0%,试管苗长势强壮。

用草炭作为百合试管苗移栽基质,成活率达 89.6%,试管苗缓苗快,苗色绿,长势旺。

兰州百合花瓣高频再生体系:综合试验研究结果总结出了兰州百合花瓣高频再生体系及关键技术(见图 3)。

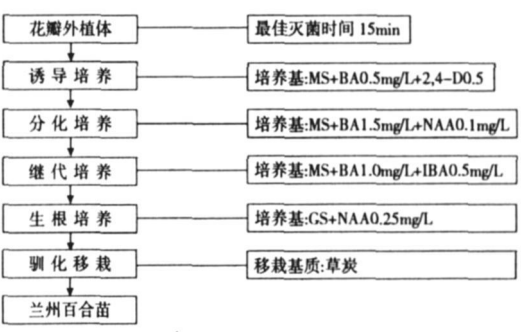


图 3 兰州百合花瓣高频再生体系

参考文献

[1] 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1996 3-7.
[2] 刘选明,周朴华,屈妹存,等.百合鳞片离体诱导形成不定芽和体细胞胚[J].园艺学报,1997,24(4):353-358.
[3] 许智宏,朱本明.组织培养技术与植物病毒病[J].自然杂志,1984,7(3):205-207.
[4] 王丽艳,梁国鲁,郭启高.兰州百合组培苗试管结鳞茎研究[J].北方园艺,2004(3):73.
[5] 杨增海,王聚瀛.植物生长调节剂对百合组织培养繁殖的效应[J].西北农业大学学报,1987(2):72-78.

Research on Micropropagation from Petals of Lanzhou Lily

LIU Fen

(Pomology Institute of Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730070)

Abstract: The technique of micropropagation from petals of Lanzhou Lily was built. The results showed that 15 minutes explants sterilized time had better effect on lower contamination rate, MS+BA0.5mg/L+2,4-D 0.5mg/L was suitable for petal callus induction, MS+BA1.5mg/L+NAA 0.1mg/L was suitable for adventitious shoot formation, the optimum medium for subculture was MS+BA1.5mg/L+IBA0.5mg/L, and the best medium for root regeneration was GS+NAA0.25mg/L with 100% root generation rate and vigorous roots. The living rate of transplanted seedling on pasteurized peat was 89.6%.

Key words: Lanzhou Lily; Petal induction; Subculture; Root regeneration; Medium