

白天堂百合的组织培养和离体快繁技术

李巧峡, 李 凯, 文 龙, 赵庆芳

(西北师范大学 生命科学学院 甘肃 兰州 730070)

摘 要:以白天堂百合的鳞茎为外植体,研究了培养基中激素配比对芽诱导、增殖及生根的影响,成功建立了快速无性繁殖系。白天堂百合的最佳芽诱导培养基是MS+0.2~0.5 mg/L NAA+0.2~0.8 mg/L BA(或0.2~2.0 mg/L的KT);芽的最佳增殖培养基为MS+0.5 mg/L IAA+0.1 mg/L KT;根的最佳诱导培养基为MS+0.5 mg/L的NAA+0.2 mg/L的KT。

关键词:白天堂百合;组织培养;无性繁殖系;激素

中图分类号:S 682.2⁺ 9; S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)06-0087-03

百合(*Lilium* spp.)属百合科(Liliaceae)多年生草本,许多种类具有非常重要的经济价值,从其用途可分为药用百合、食用百合、观赏百合三大类。对其研究报道涉及到离体快繁、脱毒复壮、单倍体培养、孢粉学及品种资源研究等诸多方面^[1-9]。白天堂(*Lilium white heaven*, 商品名 White Heaven)属铁炮系百合,呈白色,端庄飘逸,开花期香气怡人,是近年来非常受欢迎的鲜切花。目前国内主要通过进口种球进行繁殖,为了降低成本,用组织培养技术建立无性繁殖体系,短期内可提供大量种苗及鳞茎。该试验以白天堂百合的鳞片为外植体,成功建立了快速无性繁殖系,对其芽的诱导、增殖、生根及移栽进行了较深入的研究,选择了最佳诱导、增殖及生根培养基,为铁炮系百合的种苗大规模生产及品种复壮提供可靠的技术路线和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

白天堂百合(White Heaven)由甘肃新兴花卉公司提供。

1.2 试验方法

取百合鳞片用洗洁精洗干净后,再流水冲洗4~8 h。在超净工作台上用75%酒精消毒30~60 s,投入0.1%升汞溶液消毒7~15 min(滴加2~3滴吐温),其间更换1次升汞消毒液,然后用无菌水冲洗6~7次。将

鳞片分切为中、下二段约0.8 cm×0.8 cm方块接种。

1.3 培养条件

基本培养基用MS,附加不同种类和浓度的调节因子,培养基pH 5.80,含蔗糖30 g/L,均用0.75%~0.80%琼脂固化,光照强度2 000 lx,培养温度(22±2)℃。

2 结果与分析

2.1 调节因子对鳞片产生芽的影响

将鳞茎中部3~4层鳞片下部、中部^[1-3]接种于表1所列培养基中,5 d后白色鳞片的表面开始变绿,13 d后鳞片凹面出现白色突起,25 d后突起开始发育为小芽。

鳞片接种30 d和60 d后统计结果(表1)。当NAA浓度在0.2 mg/L时,BA与此相对应浓度在0.2~1.2 mg/L,KT浓度在0.2~2.0 mg/L对鳞片的诱导效果较好,诱导率均为100%,平均每个外植体上可诱导出3个以上的小芽;当NAA浓度在0.5 mg/L时,BA与此相对应浓度在0.2~0.8 mg/L,KT浓度在0.2~0.8 mg/L对鳞片的诱导效果较好,诱导率为100%,平均每个外植体上可诱导出5个以上的小芽。其中3号与7号培养基最理想,不但诱导率高,平均每个外植体的新增芽数也多,诱导产生的小芽分别为7.67个和7.00个;4、11号培养基诱导产生的小芽虽然分别只有5.74个和5.00个,但是其诱导产生的小鳞茎和丛芽长势在所有培养基中是最好的,而且根比较发达。12号培养基尽管诱导率较高,芽平均数也很高,但是小鳞茎与丛芽生长弱。NAA浓度较高时,较高浓度BA(1.2 mg/L)和KT(1.2 mg/L和2.0 mg/L)可使白天堂鳞片诱导所得的部分芽出现变态迹象,表现为,鳞茎基部膨大,表面光亮,丛芽生长弱如6号、13号和14号培养基。

2.2 激素对芽增殖的影响

将初代培养基中诱导产生的2.0~4.0 cm小芽分别移入表2所列的培养基中,18 d后小鳞茎上开始有小芽产生,60 d后统计结果(表2)。当KT浓度在0.1~

第一作者简介:李巧峡(1980-),女,甘肃秦安人,硕士,实验师,现主要从事植物生理生态学研究。E-mail: liqiaoxia8024@163.com。

通讯作者:赵庆芳(1962-),女,山东省莱芜市人,博士,教授,现主要从事植物生理生态及细胞遗传学方面的研究工作。

基金项目:甘肃省科技攻关资助项目(XGS042-A41-001-11);兰州市科技局资助项目(06-2-19)。

收稿日期:2008-12-27

0.2 mg/L 之间, IAA 浓度在 0.5~1.5 mg/L 之间芽增殖较好, 增殖所得的小鳞茎与丛芽生长健壮。1、3、6 号培养基是较好的芽增殖培养基。

表 1 调节因子对鳞片诱导芽的影响							
培养基 编号	调节因子/ mg ° L ⁻¹			外植体平均芽数/ 个		芽诱导率	生长情况
	BA	NAA	KT	30 d 左右	60 d 左右	/ %	
1	0.2	0.2	—	2.72	5.56	100	小鳞茎较壮 丛芽生长好 有根
2	0.8	0.2	—	4.67	5.67	100	小鳞茎较壮 丛芽生长好 有根
3	1.2	0.2	—	5.41	7.67	100	小鳞茎一般 丛芽生长好 无根
4	0.2	0.5	—	4.17	5.74	100	小鳞茎壮 丛芽生长好 叶宽 有根
5	0.8	0.5	—	3.84	6.74	100	小鳞茎较壮 丛芽生长好 叶宽 无根
6	1.2	0.5	—	6.42	8.38	75	小鳞茎基部膨大 丛芽生长一般 无根
7	—	0.2	0.2	3.50	7.00	100	小鳞茎壮 丛芽稀少 有根
8	—	0.2	0.8	3.25	4.25	100	小鳞茎很壮 无丛芽 有根
9	—	0.2	1.5	3.50	3.75	100	小鳞茎壮 丛芽稀少 有根
10	—	0.2	2.0	3.74	3.84	100	小鳞茎壮 丛芽稀少 有根
11	—	0.5	0.2	4.25	5.00	100	小鳞茎很壮 丛芽生长好 叶宽 根发达
12	—	0.5	0.8	7.50	8.00	100	小鳞茎一般 丛芽生长弱 有根
13	—	0.5	1.2	4.00	4.00	100	小鳞茎基部膨大 丛芽生长弱 无根
14	—	0.5	2.0	4.50	6.83	83.4	小鳞茎基部膨大 丛芽生长弱 无根

表 2 调节因子对芽增殖的影响					
培养基 编号	调节因子/ mg ° L ⁻¹		平均新增	生长情况	
	KT	IAA	芽数		
1	0.1	0.5	3.64	小鳞茎壮 丛芽生长好 无根	
2	0.1	1.0	1.75	小鳞茎壮 丛芽生长一般 有根	
3	0.1	1.5	2.62	小鳞茎壮 丛芽生长一般 有根	
4	0.2	0.05	1.58	小鳞茎较壮 无丛芽 无根	
5	0.2	0.1	1.75	小鳞茎一般 无丛芽 无根	
6	0.2	0.8	2.46	小鳞茎壮 丛芽生长一般 无根	
7	0.05	0.1	1.42	小鳞茎一般 丛芽生长一般 无根	
8	0.8	0.1	1.62	小鳞茎壮 丛芽生长一般 无根	
9	0.5	0.2	1.91	小鳞茎较壮 丛芽生长好 无根	
10	1.5	0.2	1.85	小鳞茎一般 丛芽生长一般 无根	

2.3 生根培养与移栽

将增殖培养基中已长至 4 cm 以上的丛芽切离成单芽后移入表 3 所列培养基中, 15 d 后观察记录小芽的生根情况, 60 d 后统计结果(表 3)。结果表明, 1~6 号培养基均对根有较好的诱导率(100%)。其中以 4、5 号培养基生根效果最好, 其生根平均数达到 7~8 条。待根长到 1~2 cm 时, 开瓶练苗 3~5 d, 分别移入腐殖质土和珍珠岩之比为 1:1 的土中, 保持 75% 的湿度, 50% 的自然光, 每日喷 2 次水, 20 d 左右定期喷 1 次稀释的 MS 营养液, 成活率均可达 100%。

表 3 激素对白天堂百合芽丛生根的影响					
培养基 编号	调节因子/ mg ° L ⁻¹			生根率	生根平均数
	NAA	KT	IAA	/ %	/ 个
1	0.2	0.8		100	4.00
2	0.2	1.5		100	1.83
3	0.2	2.0		100	3.20
4	0.5	0.2		100	8.00
5		0.1	1.0	100	7.47
6		0.1	1.5	100	2.00

3 讨论与结论

该试验以白天堂百合的鳞茎为材料, 较成功的建立了快速无性繁殖系。在初代培养中, 当 BA 浓度低于 1.2 mg/L, KT 浓度低于 1.5 mg/L 时, 均有较壮的小鳞

茎生成, 小鳞茎的生成数目随着 BA 浓度的升高而增多, 随着 KT 浓度的升高而减少, 其中最佳芽诱导培养基是 MS+0.2~0.5 mg/L NAA+0.2~0.8 mg/L BA (或 0.2~2.0 mg/L 的 KT)。培养过程中, BA 有利于丛生芽的诱导, KT 则有利于其小鳞茎的生成, 而且大部分培养基诱导产生的小芽基部有白色小根, 可 1 次成苗。NAA 较高时, 较高浓度 BA (1.2 mg/L)和 KT (1.2 mg/L 和 2.0 mg/L)可使白天堂百合鳞片诱导所得的部分芽出现变态迹象。

在继代培养中, 随着培养时间的加长, 小鳞茎的数目也随之增加。KT 和 IAA 配合使用时, 增殖所得芽生长健壮, 未出现明显的变态。芽的最佳增殖培养基为 MS+0.5 mg/L IAA+0.1 mg/L KT。在根诱导培养中, 较高浓度 NAA 和较低浓度 KT 的搭配有利于根的诱导, 其根的最佳诱导培养基为 MS+0.5 mg/L NAA+0.2 KT mg/L。

参考文献

[1] 丁兰, 赵庆芳, 刘瑞梅. 马可波罗百合的组织培养和离体快繁[J]. 广西植物, 2004, 24(1): 37-39.

[2] 李巧峡, 赵庆芳, 李海亮, 娜托百合的组织培养和离体快繁[J]. 西北师范大学学报, 2004, 40(4): 74-76.

[3] 赵庆芳, 曾小英, 丁兰, 等. 晶体百合组织培养及快速繁殖研究[J]. 甘肃科学学报, 2003, 15(1): 39-42.

[4] 曾小英, 赵庆芳, 汪会荣. 百合品种花粉形态学研究[J]. 西北师范大学学报, 2004, 40(2): 69-71.

[5] 赵庆芳, 马世荣, 曾小英, 等. 百合栽培品种资源的 RAPD 分析[J]. 兰州大学学报, 2005, 41(2): 30-33.

[6] 丁兰, 刘国安, 杨红. 新铁炮百合组织培养和快速繁殖研究[J]. 西北师范大学学报, 2002, 37(1): 80-82.

[7] Gu Z P, Zheng G C. Studies on induction of pollen plantlets from the anther cultures of lily [J]. Acta Botanica Sinica, 1982, 24: 28-32.

[8] Gu Z P, Zheng G C. In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of lily and its embryological observations [J]. Acta Botanica Sinica, 1983, 25: 24-30.

天竺葵基因组 DNA 五种提取方法的比较

杨柯金, 鲁云凤, 张 静

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061)

摘 要:以天竺葵为试材,比较分析了 CTAB 法、简单法、高盐低 pH 值法、CTAB-SDS 法、SDS 法对天竺葵叶基因组 DNA 提取的效果。结果表明:5 种方法提取的天竺葵总 DNA 在纯度上有很大的差别。所得到的 DNA 提取纯度依次为简单法、CTAB-SDS 法、CTAB 法、高盐低 pH 法、SDS 法。酶切结果为简单法、CTAB 法效果最好,其次 SDS 法,高盐低 pH 法、CTAB-SDS 法不能被 EcoRI 酶完全消化。经综合的比较分析,认为简单法是最佳的提取方法。因其步骤简单、快捷,得到的基因组 DNA 降解少、杂质含量少,能获得高质量的 DNA 模板,可以用于分子生物学试验研究。

关键词:天竺葵;基因组;DNA 提取

中图分类号:S 682.1⁺9 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2009)06-0089-03

植物组织含有蛋白质、多糖、多酚硅以及其他代谢产物如酯、萜等。由于这些物质的存在,导致提取高质量的 DNA 比较困难。不同的植物材料因其细胞中次生代谢产物的种类、含量不同,适合的提取方法也不同。天竺葵叶片因为含有丰富多糖、多酚等次生代谢物质,在 DNA 的提取过程中,由于酚类物质自动被氧化而与 DNA 形成不可逆结合,干扰 DNA 的絮状结构,明显加大了 DNA 提取难度,从而影响 DNA 的纯度。因此寻找一种简便有效的天竺葵基因组 DNA 的方法成为研究者

的共识。该试验比较研究 5 种 DNA 的提取法对天竺葵基因组 DNA 提取效果,筛选适合于天竺葵 DNA 的提取方法,为进一步开展天竺葵分子生物学方向的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料:天竺葵 取自南阳师范学院花房。

仪器:SP-2000UV 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),DYCP-31B 型电泳槽(北京市六一仪器厂),TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),WD-9403C 型紫外透射反射仪(北京市六一仪器厂)、DYY-III 2 稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 药品与试剂

CTAB(分析纯)购自中国医学(集团)上海化学试剂公司、PVP K30 购自上海源聚生物科技有限公司、β 巯基

第一作者简介:杨柯金(1979-),女,讲师,研究方向为分子细胞生物学。E-mail:kejinyang@yahoo.com.

基金项目:南阳师范学院高层次引进人才专项基金资助项目(ny-tc2006069)。

收稿日期:2008-12-27

[9] 雷家军,荣立苹,郑洋,等.百合品种离体培养的研究[J].北方园艺,2008(7):224-226.

Study on Tissue Culture and Propagation of White Heaven *in Vitro*

LI Qiao-xia, LI Kai, DING Wen-long, ZHAO Qing-fang

(College of Life Sciences Northwest Normal University, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: With the scales of *Lilium* White Heaven as explants, the effects of hormone combination on shoots induction, proliferation and roots induction were studied in the experiment, and the clonal propagation system was established successfully. Better induction medium of shoots were MS+0.2~0.5 mg/L NAA+0.2~0.8 mg/L BA (or 0.2~2.0 mg/L KT). Proliferation medium of shoots were MS+0.5 mg/L IAA+0.1 mg/L KT. Induction of roots were better in medium of MS+0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L KT.

Key words: White Heaven; Tissue culture; Clonal propagation; Hormone