

利用百合花器官诱导试管苗快繁技术研究

夏九成^{1,2}, 郑毅^{1,2}, 吕会¹, 伍隆霞¹

(1. 攀枝花学院 生化系, 四川 攀枝花 617000; 2. 攀枝花市干热河谷特色生物资源工程技术中心, 四川 攀枝花 617000)

摘 要:以百合的花器官为外植体,以 MS 为基本培养基,对其组培快繁技术进行了研究。结果表明:最佳的不定芽诱导培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+90 g/L 蔗糖;最佳的生根培养基为 1/2MS+0.2 mg/L NAA。花托具有较强的诱导能力,而花丝和花柱则没有明显的分化能力。该研究结果可为百合优良品种的生产提供重要的技术支撑和资源保证。

关键词:百合;试管苗;快繁;花器官

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)01-0102-03

百合(*Lilium brownii* var. *viridulum*)属百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)植物,花姿雅致,叶片青翠娟秀,茎干亭亭玉立,历来是名贵的切花品种。此外由于百合球根含有淀粉、皂苷以及多糖等生物活性成分,因而具有较高的食用和药用价值^[1-2]。百合的传统繁殖技术主要有分球、分珠芽鳞片扦插和鳞片包埋等;但传统繁殖技术由于繁殖系数小、品种易退化和易被病毒感染等原因,因而难以适应规模化种植和满足市场需要。而通过组织培养,则可以解决上述问题。目前,百合组织培养通常使用种球的鳞片作为外植体,但种球资源有限,一些优质品种的种球甚至需要进口^[3-6]。根据植物器官的全能性,理论上其它部位的器官甚至是细胞均可以诱导出新的植株^[7-11],因此该试验拟探讨以百合的花器官作为外植体进行植株再生的可能性,以此来克服种球资源的限制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于四川省攀枝花市鲜花市场上购买新鲜的荷兰百合(*Lilium hybrids*)花束若干,带回实验室备用。

1.2 试验方法

1.2.1 不定芽诱导 切取(5±1)cm 的新鲜百合花蕾若干,用自来水淋洗 2.5~3.0 h,于无菌接种台上进行消毒灭菌。具体操作如下:将切下的百合花蕾放入无菌烧杯中,用 70%乙醇消毒 26 s 左右,无菌水淋洗 5 次,用 0.5%次氯酸钠溶液浸泡(15±0.5) min,之后用无菌水

淋洗 12 次,再用干燥的无菌滤纸吸干材料上的残余水分。消毒工作完成后,在无菌条件下,将花托、花柱和花丝分别从花蕾剥离。花托用无菌解剖刀纵剖为大小相近的 2 个部分,花柱则切分为上、下等长的 2 段,花丝则去除顶端花药后切成等长的片段备用。将处理好的无菌材料按每个试验 3 块外植体的方式接入预先分装有(20±5) mL 培养基的无菌三角瓶(50 mL)内。其中外植体的接种方式以及培养基的分装方式按照表 1 的 4 因素 3 水平 L₉(3⁴)正交实验进行,4 个因素分别为蔗糖浓度、6-BA(6-苄基嘌呤)浓度、NAA(α-萘乙酸)浓度和花器官类型,每个试验均安排 3 次重复。

表 1 百合不定芽诱导正交实验设计

Table 1 Orthogonal test of induce adventitious buds of lily

水平 Level	因素 Factor			花器官 Floral organ
	萘乙酸 NAA /mg · L ⁻¹	6-苄基嘌呤 6-BA/mg · L ⁻¹	蔗糖 Sucrose /g · L ⁻¹	
	A	B	C	D
1	0.1	0.5	30	花托
2	0.3	1.0	60	花丝
3	0.5	2.0	90	花柱

1.2.2 根诱导培养 将成功诱导出不定芽的组织在无菌条件下切成数块接种于不同生根培养基上(表 2)进行生根培养,每个生根培养瓶均接种 3 个大小相近的不定芽块进行培养,每组试验 3 次重复,以研究其生根情况和试管苗的诱导情况。

表 2 生根试验方案

Table 2 Experiment of roots induction

试验号 Test number	1	2	3	4	5	6	7
基础培养基	1/2MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS	1/2MS
萘乙酸/mg · L ⁻¹	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4

1.2.3 培养条件 诱导不定芽和诱导不定根时所采用的培养条件相同,即将接种好外植体的培养瓶置于培养室的普通培养架上,在温度(24±2)℃,光照时间 11 h/d,

第一作者简介:夏九成(1976-),男,博士,副教授,现主要从事生物学的教学与科研工作。E-mail:xjch04@yahoo.com.cn.

基金项目:攀枝花市市级应用技术与开发资助项目(2009TX-3)。

收稿日期:2012-09-10

光照强度为 1 100 lx 条件下培养。

2 结果与分析

2.1 不定芽诱导正交实验结果与分析

经过 42 d 的培养观察后,花托已充分诱导分化出不定芽,而花柱和花丝则没有不定芽出现(图 1)。观察并统计各三角瓶中的不定芽数目并对试验结果做极差分析^[12](表 3)。由表 3 可知,各因素主次顺序为 D>C>B=A,即花器官类型对百合不定芽的诱导起关键作用,其次是蔗糖浓度,然后是细胞分裂素和生长素的浓度。因素间的最优水平组合为:A₂B₂C₃D₁,即:花托为诱导不定芽的最适花器官类型,而诱导不定芽的最佳培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+90 g/L 蔗糖。

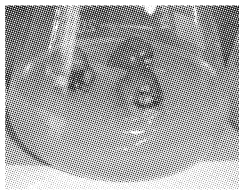


图 1 由花托诱导出的不定芽组织

Fig. 1 Adventitious buds of lily from receptacle

表 3 L₉(3⁴)百合不定芽诱导正交实验的极差分析

Table 3 Range analysis of L₉(3⁴) orthogonal experiment of lily adventitious buds induction

序号 Number	因素 Factors				不定芽数目 Number of adventitious bud/个		
	A(萘乙酸 NAA)	B(6-苄氨基嘌呤 6-BA)	C(蔗糖 Sucrose)	D (花器官 Floral organ)	I	II	III
	/mg·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	/g·L ⁻¹				
1	0.1	0.5	30	花托	20	5	20
2	0.1	1.0	60	花丝	0	0	0
3	0.1	2.0	90	花柱	0	0	0
4	0.3	0.5	60	花柱	0	0	0
5	0.3	1.0	90	花托	25	18	25
6	0.3	2.0	30	花丝	0	0	0
7	0.5	0.5	90	花丝	0	0	0
8	0.5	1.0	60	花柱	0	0	0
9	0.5	2.0	30	花托	9	5	0
K _{1j}	45	45	59	127			
K _{2j}	68	68	0	0			
K _{3j}	14	14	68	0			
K _{1j} ²	2 025	2 025	3 481	16 129			
K _{2j} ²	4 624	4 624	0	0			
K _{3j} ²	196	196	4 624	0			
k ₁	15	15	20	42			
k ₂	23	23	0	0			
k ₃	5	5	23	0			
极差	18	18	23	42			
次序	D>C>B=A						
最优组合	A ₂ B ₂ C ₃ D ₁						

注:K_{1j}、K_{2j}、K_{3j}为每个因素各水平之和;K_{1j}²、K_{2j}²、K_{3j}²为每个因素各水平之和的平方;k₁、k₂、k₃为每因素各水平的平均值;I、II、III代表 3 次重复试验。

Note: K_{1j}, K_{2j}, K_{3j} indicate the total of each factor with each level; K_{1j}², K_{2j}², K_{3j}² indicate the square of the total of each factor with each level; k₁, k₂, k₃ indicate the average of each factor with each level; I, II, III: Repeats.

2.2 根诱导试验结果与分析

生根培养基接种无菌的不定芽块后,放入培养箱中按预定的培养条件培养。20 d 后芽变绿,30 d 后芽下部长出乳白色绒毛状根状组织(图 2),随后根不断变粗,并形成试管苗。40 d 后观察结果,并统计每组试验成活的试管苗数。由表 4 可知,最佳的根诱导培养基为 1/2MS+0.2 mg/L NAA。由单因素方差分析^[12]表 5 可知,萘乙酸 NAA 的浓度对诱导不定芽形成试管苗和根状组织具有显著作用,而重复对试验的影响却不具有统计学上的显著作用。

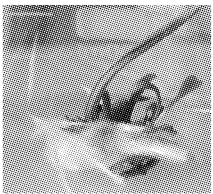


图 2 由百合不定芽诱导出的试管苗及根状组织

Fig. 2 Seedling and tissue like root in test tube from adventitious buds

表 4 萘乙酸诱导试管苗形成的试验结果

Table 4 The result of inducing seedling in test tube with NAA

试验组号 Test number	基础培养基 Basic culture	萘乙酸 NAA /mg·L ⁻¹	成活的试管苗总数 Total number of seedling in test tube				
			重复 1	重复 2	重复 3	总数	位次
1	1/2 MS	0.1	3	2	2	7	2
2	1/2 MS	0.15	2	1	2	5	3
3	1/2 MS	0.2	3	3	3	9	1
4	1/2 MS	0.25	2	2	1	5	3
5	1/2 MS	0.3	1	1	2	4	4
6	1/2 MS	0.35	1	0	1	2	5
7	1/2 MS	0.4	1	1	0	2	5

表 5 萘乙酸诱导根形成的单因素方差分析

Table 5 Analysis of variance of single factor of NAA for root induction

变异来源 Variance source	自由度 DF Degree freedom	平方和 SS Sum square	均方 MS Mean square	方差检验 F	F _{0.05}	F _{0.01}
重复 Repeat test number	2	0.66	0.33	3.00	3.88	6.93
试验组号 Repeat test number	6	12.95	2.16	19.64 **	3.00	4.82
试验误差 Error	12	1.34	0.11			
总变异 Total	20	14.95				

3 讨论

百合快繁通常使用种球的鳞片作为外植体,但其资源十分有限,特别是一些优质品种的种球更是需要进口^[3-6,13-14]。为了改变该现状,以不同的花器官(花柱、花托、花丝)作为外植体来代替鳞片组织,结果表明,花托能顺利地诱导出不定芽块,花柱和花丝则无法产生类似组织。另外由花托诱导出的不定芽组织在恰当的生根培养基中可以进一步成功诱导出试管苗,说明利用花托来代替鳞片是完全可行的。此外,该研究还通过相关的数据分析确定了诱导花托形成不定芽的最佳培养条件为

MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+90 g/L 蔗糖。并进一步确定了最佳的根诱导培养条件是 1/2MS+0.2 mg/L NAA。这些试验参数的获得将为百合的快繁生产,尤其是优良品种的生产提供重要的技术支撑。

参考文献

- [1] 吴晓斌,任凤莲,邱昌桂,等.百合皂苷的提取、纯化及其对自由基的清除作用[J].天然产物研究与开发,2005,17(6):777-780.
- [2] 胡敏敏,蔡宝昌,张志杰,等.百合多糖的药效学研究[J].中药新药与临床药理,2007,18(2):107-109.
- [3] 陆美莲,许新萍,周厚高,等.均匀正交设计在百合组织培养中的应用[J].西南农业大学学报(自然科学版),2004,26(6):699-702.
- [4] 张延龙,徐炎,李峰,等.秦岭百合鳞片植株再生体系的建立[J].西北植物学报,2004,24(7):1315-1318.
- [5] 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.
- [6] 蔡宣梅,方少忠,林真.药用百合组织培养与试管苗假植技术研究[J].西北农业学报,2004,13(4):152-155.
- [7] Tanaka I, Kitazume C, Ito M. The isolation and culture of lily pollen

protoplasts[J]. Plant Science, 1987, 50(3): 205-211.

- [8] Arzate-Fernández A M, Nakazaki T, Tanisaka T. Production of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium concolor* and *L. longiflorum* by *in vitro* ovary slice culture[J]. Plant Breeding, 1998, 117(5): 479-484.
- [9] Han D S, Niimi Y, Nakano M. Regeneration of haploid plants from anther cultures of the Asiatic hybrid lily 'Connecticut King'[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 47(2): 153-158.
- [10] Pelkonen V P, Kauppi A. The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis[J]. Int J Plant Sci, 1999, 160(3): 483-490.
- [11] Nhut D T. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulb culture[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 913-916.
- [12] 李春喜,王志和,王文林.生物统计学[M].北京:科学出版社,2002.
- [13] 李筱帆,张启翔.百合组织培养和植株再生的研究进展[J].安徽农业科学,2009,37(4):1479-1482.
- [14] 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.

The Rapid Propagation of Lily by Inducing Seedling in Test Tube with Floral Organ

XIA Jiu-cheng^{1,2}, ZHENG Yi^{1,2}, LV Hui¹, WU Long-xia¹

(1. Department of Biology and Chemistry, Panzhihua College, Panzhihua, Sichuan 617000; 2. Technology Center of Characteristic Biology Resource of Dry Heat River Valley, Panzhihua, Sichuan 617000)

Abstract: With different floral organs as explants and MS as basic medium, tissue culture and rapid propagation of lily were studied. The results showed that the best optimal medium for inducing adventitious buds was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+90 g/L sucrose and the best optimal medium for inducing root was 1/2MS+0.2 mg/L. Through comparing the potential of inducing adventitious buds with receptacle, filament and style, it showed the receptacle had strong potential to induce adventitious buds but the two others did not. So the results of this article could offer important technical and resources supporting for producing elite cultivar of lily.

Key words: lily; seedling in test tube; rapid propagation; floral organ

《北方园艺》征订启事

《北方园艺》是由黑龙江省农业科学院主管,黑龙江省园艺学会和黑龙江省农业科学院主办的以科学研究和技术普及相结合的园艺类综合性中文核心期刊。国内外公开发行。

中国标准连续出版物号:ISSN 1001-0009/CN23-1247/S;半月刊,每月15日、30日出版,大16开本,200页内文。每册定价7.0元。

国内邮发代号:14-150,国外邮发代号 SM5011。

本刊现辟有试验研究、研究简报、设施园艺、栽培技术、园林花卉、生物技术、植物保护、贮藏保鲜加工、食用菌、中草药、新品种选育、土壤与肥料、产业论坛、专题综述、经验交流、农业经纬等栏目。适合大专院校师生、科研单位技术人员、农技推广人员、园艺作物种植者、农产品经销商等人员参阅。有需要者可从邮局订阅或直接汇款至编辑部订阅。

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《北方园艺》编辑部
电话:0451-86674276

邮编:150086
投稿邮箱:bfiybjb@163.com