

百合组织培养研究进展

周春华¹, 尤超¹, 陈凝华²

(1. 扬州大学 园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009; 2. 如皋花木大世界有限公司, 江苏 如皋 226553)

摘要:利用组织培养进行繁育是百合无毒化、商品化和产业化发展的必然趋势。现从外植体选择与处理、再生体系途径(愈伤组织途径、不定芽途径、小鳞茎途径、体细胞胚途径)、目前组织培养中存在的问题(主要是污染、褐化和玻璃化)等方面综述了百合组织培养研究现状,并对今后的发展进行了展望,旨在为百合无毒种苗的工厂化繁育提供理论依据。

关键词:百合;组织培养;外植体;再生途径

中图分类号:S 682.2⁺65 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)14-0193-03

百合(*Lilium brownie*)属百合科百合属多年生草本植物,自古以来,其观赏、食用或药用价值为我国、日本以及欧洲一些国家所熟悉^[1]。百合的传统繁殖主要有珠芽繁殖、小子球繁殖、鳞片繁殖3种方式,其中通过鳞片繁殖获得的百合品质最佳。组织培养由于繁殖系数高而成为百合重要的繁殖方式之一,通过组织培养快速得到大量百合种苗、增加产出是世界百合产业的一大趋势。而要使百合组织培养与生产衔接,关键是要针对不同品种制订与之相匹配的组培快繁方案^[2]。百合是重要的切花、盆花和庭院用植物材料,传统的百合繁殖方法如分球、分珠芽或鳞片扦插、鳞片包埋等,存在繁殖系数较小,多代繁殖常造成退化以及种间杂交不亲和等问题。采用组织培养进行百合的快速繁殖和脱毒复壮,可促进百合商品种球的生产和百合新品种的培育^[3]。利用组织培养技术进行百合的快繁,既能去除病毒,又能加快百合繁殖速度,缩短其生育周期,具有很好的应用价值、经济价值和开发潜力。现针对百合组织培养研究现状进行综述,并对其今后的发展方向进行展望,旨在为百合种苗的繁育和百合产业的持续发展提供重要理论依据。

1 外植体的选择和处理

1.1 外植体的选择

百合属花丝、叶片、鳞片、茎段、根是目前百合属组

织培养中普遍采用的外植体。另外,用鳞茎盘、种子、花瓣作外植体的也都有相关研究。张立等^[4]对香水百合的组织培养主要以鳞茎为外植体诱导再生植株,另外还对叶片、花柄、花托、子房、花丝等外植体进行了研究。潘佑找等^[5]以兰州百合的鳞片、叶片、根的不同部位为外植体进行再生植株的培养,发现不同外植体不同部位分化能力存在差异,其差异由强到弱为:鳞片>根>叶片,同时鳞片不同部位的分化能力由强到弱为:下>中>上,叶片不同部位的分化能力由强到弱为:叶片基部>中部>叶尖,根的不同部位分化能力由强到弱为:根基部>根尖>根中部。付娜等^[6]以龙牙百合珠芽为外植体进行组织培养,发现不同珠芽处理方式对不定芽诱导及成活率有影响,以整个珠芽为外植体时,成活率最高,但诱导的不定芽数量较少,单瓣珠芽基部诱导的不定芽数量最多。

1.2 外植体的灭菌

百合组织培养所用最多的外植体为鳞茎,由于鳞茎生长在地下,带菌较多,灭菌较困难,污染率较高,灭菌过程要相对复杂。朱旭东等^[7]在研究东方百合“索邦”、“元帅”、“西伯利亚”的茎尖组培时,先剥掉种球外部已坏死或病菌感染严重的鳞片,然后取种球外面几层鳞片,用洗衣粉加水搅动洗涤10 min,流水条件下冲洗2 h,晾干后放置备用。将清洗好的鳞片置于75%的酒精溶液中消毒0.5 min,用无菌水冲洗1次,再用0.1%升汞溶液消毒10 min,无菌水冲洗5次,用灭菌滤纸吸干水分备用。潘理云等^[8]以宜兴百合鳞茎为外植体时,剥取中层(约第3~4层)鳞片,用自来水彻底洗去泥土后,再用纯净水冲洗2~3次。将鳞片晾干后依次用75%酒精浸泡15 s,0.1%氯化汞消毒10 min,最后用灭菌水冲洗3~4次。相对于鳞茎来说,采用珠芽、花苞(花蕾)为外植体,由于污染较少,灭菌过程要相对简单。付娜等^[6]研

第一作者简介:周春华(1974-),男,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事园艺植物资源综合利用及果实品质与生物活性物质等研究工作。E-mail:chzhou@yzu.edu.cn.

基金项目:江苏省科技支撑计划(农业)资助项目(BE2012468);江苏省科技基础设施建设计划(科技公共服务平台)资助项目(BM2010590)。

收稿日期:2013-03-25

究表明珠芽生长在植株的叶腋处,带菌较少,以龙牙百合珠芽为外植体诱导不定芽时,75%酒精浸泡 20 s 后用 0.1% HgCl_2 处理 12 min 消毒效果最好,外植体污染率较低,成活率较高。张立等^[4]将香水百合花苞流水冲洗 30 min,在超净工作台用 75%酒精和 0.1%升汞分别消毒(75%酒精消毒 3 min,0.1%升汞消毒 10 min),无菌水漂洗 4~5 次,然后分瓣,切割成 0.5 cm×0.5 cm 的小块进行组培。刘芬等^[9]以兰州百合含苞待放的花蕾作为组织培养的外植体,6 月份将从田间采集的花蕾用中性洗涤剂漂洗后,用流水冲洗 30 min,然后将其置于超净工作台上,用 75%酒精消毒 1 min,接着放入浓度为 2.0 g/kg 的 HgCl_2 溶液中震荡灭菌 15~20 min,再用消毒滤纸吸干表面水分,用镊子夹开花瓣,剥离花丝,将剥离的花丝整段转接到 MS 基本培养基附加不同浓度生长素的培养基。

2 百合再生体系的器官发生途径

2.1 愈伤组织途径

用花丝诱导兰州百合愈伤组织时,在 MS 基本培养基中添加 BA 与 2,4-D 组合比 BA 与 IBA 组合的诱导率高,而由愈伤组织直接分化成植株时添加 BA 与 IBA 组合的分化率高,因此培养基 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 是诱导兰州百合花丝愈伤组织形成和植株分化的理想培养基,适宜的继代和增殖培养基为 MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.3~0.5 mg/L,生根培养基以 B_5 + IAA 0.2 mg/L 最佳^[9]。以“西伯利亚”百合花托为外植体进行组织培养,适合愈伤组织诱导和分化的培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L,最佳增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,最佳生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L^[10]。

2.2 不定芽途径

潘理云等^[8]以宜兴百合鳞茎为外植体,采用组织培养的方法进行扩大繁殖时,不定芽诱导的最佳培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,继代培养的最佳培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,生根培养的最佳培养基为 1/2MS+0.5 mg/L IBA。杨懋勋等^[11]以观赏百合“莫娜”、“黄天霸”、“巴巴拉”、“索邦”4 个品种的鳞片为材料进行不定芽诱导、增殖和生根研究,表明 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 为最佳诱导培养基;MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 为最佳增殖培养基;MS+IBA 0.5 mg/L 为最佳生根培养基;蛭石:黄心土=1:1 为最佳移栽基质。

2.3 小鳞茎途径

张立等^[4]以香水百合花瓣为外植体进行组织培养诱导再生植株产生时,诱导小鳞茎产生的合适部位为花瓣下端,最适培养基以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L

NAA 较好。将诱导出的小鳞茎从基部切下,接种至 4 组生根培养基中,采用 1/2 MS 为基本培养基,添加不同浓度的 NAA 诱导生根,最佳生根培养基为 1/2 MS+0.05 mg/L NAA。孙龙生等^[12]以新铁炮百合鳞片为外植体,进行组织培养再生研究,结果表明不同继代培养基对新铁炮百合离体快繁有显著影响。选用 MS 做为基本培养基,附加不同浓度的 BA 和 NAA 配合成 10 个组合,并进行随机区组试验,结果表明 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 继代繁殖效果最佳。不同生根培养基对新铁炮继代苗生根影响差异显著,其中以 MS 不附加任何激素为最佳,生根率为 99%,平均每株苗生粗根 6.9 条。

2.4 体细胞胚状体途径

吴若菁等^[13]利用百合的花托、花柱、花丝、柱头、茎段、鳞片进行组织培养并获得再生植株,发现百合不同外植体以及鳞片不同部位的材料分化形成小植株的能力存在较大差异。百合组培中有 4 条途径形成胚状体,一是在外植体表面形成大量愈伤组织,而后在愈伤组织表面产生球形胚;二是在外植体已分化的组织中,由少数薄壁细胞转变成分生组织中心,从而形成胚状体;三是胚状体起源于外植体表面已分化的细胞;四是在愈伤组织内部产生 1 个或多个分生组织中心,在此中心产生胚性细胞,胚性细胞团的形态和发育阶段皆不相同,从而形成 1 个或多个不同时期的胚状体,然后胚状体周围的细胞退化溶解,胚状体长大突出于外植体表面,最后形成的芽原基。2,4-D 对胚状体形成具双重效应,它既能启动胚状体发生中胚胎蛋白合成的早期反应,又能阻止胚状体发育成熟过程中的必需蛋白质的进一步合成。

3 移栽

当组培苗的根长至 1~2 cm 后即可进行驯化移栽。移栽前先开瓶练苗,练苗结束后洗净根上的培养基,然后移栽至不同基质中。移栽初期必须给予小苗充足的光照和适宜的空气湿度,让小苗慢慢适应外界环境,移栽后期对小苗的管理切忌大旱大涝。不同移栽介质对百合组培苗的成活率有明显影响,以蛭石:黄心土=1:1 作为基质时,移栽成活率最高,达 90%以上^[11]。对新铁炮生根苗移栽研究表明,以细河沙:草炭=2:1 作为移栽基质最佳,移栽成活率可达 92%^[12]。

4 组织培养中存在的问题

4.1 污染及其防治

将百合鳞茎块接种到培养瓶的第 2 天很少出现污染,反而是培养到一段时间后,才相继出现污染,这些污染可能是由于百合自带的细菌引起的。百合鳞茎中不同层位鳞片的污染程度不同,外层鳞片的污染最严重,中层次之,内层较轻。百合组织培养中出现的污染与外

植物的种类、取材季节、部位、运输过程、预处理及消毒方法等密切相关^[8]。因此,为了减少百合组培中污染的发生,通过消毒减少百合自带微生物的影响最为关键,其次是培养基的灭菌,此外还要严格遵守组培操作程序。

4.2 褐化及其防治

在植物的愈伤组织培养过程中,褐化现象也是常见的问题,尤其是在愈伤组织的继代培养中,褐变现象特别严重^[14]。引起褐变的原因是外植体在培养过程中体内的多酚氧化酶被激活,细胞里的酚类物质氧化成棕褐色的醌类物质,这种致死性的褐化物不但向外扩散致使培养基逐渐变成褐色,而且还会抑制其它酶的活性,严重影响外植体的脱分化和器官分化,最后变褐而死亡。预防百合组培褐化的措施,一是选择适宜的外植体及最佳培养基;二是及时继代转移(2周);三是采用暗培养,或者在培养基中添加活性炭、抗坏血酸、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和牛血清白蛋白等成分。

4.3 玻璃化及其防治

植物试管苗玻璃化是指试管苗呈半透明状,外观形态往往异常的现象。由于玻璃苗的生理功能异常,难以移栽成活^[15]。东方百合试管正常苗和玻璃苗叶都为等面叶,其表皮均由单层细胞构成,气孔突出,且叶肉中通气组织发达。与试管正常苗相比,玻璃苗的叶片厚;叶肉组织无细胞的分化;气孔突出明显,表皮细胞、叶肉细胞体积膨大;有的叶肉细胞壁发育不全,在某些区域出现空洞,壁的形态呈现不完整现象;玻璃苗叶片的维管组织呈现退化的现象^[16]。玻璃化问题实质上是适应性问题,即不同种类植物不同个体的适应性差异的问题,因此必须根据具体引起玻璃化的培养基和培养条件不适宜、不平衡等原因,采取相应的措施来预防。

5 展望

近年来,国内外科研机构对百合组织培养和植株再生途径的研究广泛开展,涉及的种类日益增多。百合组织培养不仅可以对优良种植资源进行无病毒扩繁,而且在百合杂交育种、诱变育种、多倍体育种和分子育种中

具有广阔的应用前景。不管是食用百合还是观赏百合品种的利用,都必须通过组织快繁技术来缓解品种退化问题,以实现我国百合的规模化生产。此外,百合组织培养可以为新品种选育提供很好的中间材料,在培养具有自主知识产权的百合新品种及种质资源创新和保存的研究中发挥着不可取代的作用。

参考文献

- [1] 李玉萍,龚妍春,吴光杰,等.百合属植物资源的分布、利用价值及其开发前景展望[J].安徽农业科学,2010,38(7):3395-3396,3399.
- [2] 袁丽丽,刘青林.从第二届国际百合属研讨会看世界百合研究趋势[J].中国花卉园艺,2010(22):13-15.
- [3] 杨春起,李邱华.东方百合和亚洲百合鳞片组培试验[J].中国花卉园艺,2007(12):40-41.
- [4] 张立,王日明.香水百合花瓣组织培养[J].现代农业科技,2011(10):191-194.
- [5] 潘佑找,柯尊涛,赵宇璞.不同外植体对兰州百合组织培养的影响[J].安徽农业通报,2007,13(19):242-244.
- [6] 付娜,白志川,刘世尧,等.龙牙百合珠芽组织培养研究[J].安徽农业科学,2010,38(34):19258-19259.
- [7] 朱旭东,田松青,成海钟,等.东方百合茎尖组培技术研究[J].安徽农业科学,2009,37(5):1922-1923,1962.
- [8] 潘理云,张海洋.宜兴百合组培快繁技术的研究[J].安徽农业科学,2012,40(10):5748-5750.
- [9] 刘芬,王发林.兰州百合花丝组培诱导完整植株的研究[J].甘肃农业科技,2001(6):29-30.
- [10] 申玉华,段永平,李超,等.西伯利亚百合花托的组织培养与离体快繁[J].江苏农业科学,2009(2):79-80,87.
- [11] 杨懋勋,单振菊,陈志云,等.4种观赏百合的组培快繁技术研究[J].广东农业科学,2012(2):37-39.
- [12] 孙龙生,金丽丽.新铁炮百合的组培快繁研究[J].辽宁农业科学,2011(6):9-12.
- [13] 吴若菁,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(4):322-325.
- [14] 司晶星,赵文甲,任丽丽.植物组织培养中褐化问题的研究[J].科技信息,2009(19):30.
- [15] 李胜,李唯,杨德龙,等.植物试管苗玻璃化现象研究进展[J].甘肃农业大学学报,2003,38(1):1-16.
- [16] 韦梅琴,郑江伟.东方百合试管正常苗与玻璃苗叶片解剖结构的比较[J].北方园艺,2007(12):203-205.

Research Advances on Tissue Culture of *Lilium brownie*

ZHOU Chun-hua¹, YOU Chao¹, CHEN Ning-hua²

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009; 2. Rugao Flowers World Co. Ltd., Rugao, Jiangsu 226553)

Abstract: It is an inevitable trend to use tissue culture for non-toxic propagation, commercialization and industrialization of *Lilium brownie*. The research status of its tissue culture were reviewed from aspects of the explants selection and processing, regeneration system pathway (callus, adventitious bud, bulblet, and somatic embryo) and the main problems existed at present (mainly pollution, browning and vitrification), and the future development was prospected. All above information can provide theoretical basis for the non-toxic seedling propagation of *Lilium brownie* on a factory scale.

Key words: *Lilium brownie*; tissue culture; explants; regeneration pathway