宜兴百合组培快繁体系的建立

席梦利 胡凤荣 刘光欣 吴祝华 施季森

(国家林业局林木遗传和基因工程重点实验室(南京林业大学))

摘要:以宜兴百合鳞片为外植体进行试管培养,经试验筛选出各培养阶段适宜的培养基为:(1)小鳞茎诱导,MS + 6-BA 0.5mg/L + NAA 1mg/L + KT 0.2mg/L;(2)分化及继代,MS + 6-BA 0.2mg/L + NAA 0.5mg/L;(3)生根,MS + PP₃₃₃ 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L。

关键词:宜兴百合;组织培养;快速繁殖

宜兴百合为卷丹百合(*Lilium lancifolium* Thunb.),亦称“虎皮百合”、“苦百合”或“药百合”,是我国传统的土特产品种^[1]。宜兴百合靠鳞茎无性繁殖,致使病毒在植株体内代代累积,植株感病相当严重。在江苏宜兴、大丰百合产区,发病率100%。感病植株生长势弱且早衰,鳞茎小并出现褐色病斑,严重影响其产量和品质。笔者对宜兴百合的脱毒技术进行了研究,并获得了一定数量的脱毒试管苗^[2],本文系统研究了不同植物激素对宜兴百合小鳞茎诱导、继代培养及生根培养的影响,旨在建立高效的宜兴百合组培快繁体系,为工厂化生产宜兴百合脱毒苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以宜兴百合当年收获的健康鳞茎的鳞片为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 消毒与接种

取宜兴百合地下鳞茎,剥取鳞片作为外植体。鳞片自来水冲洗后,用肥皂水浸泡15 min,70%酒精30 s,0.1%的升汞浸泡10~15 min,无菌水冲洗3~5次,用解剖刀将鳞片切成上、中、下3个切块,以远轴面接触培养基,水平放置于预先配制好的诱导培养基上。

1.2.2 培养基

成熟鳞茎的鳞片诱导小鳞茎的培养基:MS基本培养基附加6-BA 0.3 mg/L, NAA 0.1 mg/L,蔗糖3%,琼脂粉0.6%,pH 5.8。

小鳞茎继代与壮苗培养基:MS基本培养基附加

6-BA 0.2 mg/L, NAA 0.5 mg/L,蔗糖4%,琼脂粉0.6%,pH 5.8。

试管苗小鳞茎的鳞片诱导小鳞茎发生的培养基:MS基本培养基附加6-BA 0.1~1.0 mg/L, NAA 0.1~1.5 mg/L,KT 0~0.2 mg/L,蔗糖4%,琼脂粉0.6%,pH 5.8。

生根培养基:MS基本培养基附加NAA 0~0.1 mg/L, PP₃₃₃ 0~10 mg/L,蔗糖3%,琼脂粉0.6%,pH 5.8。

1.2.3 培养条件

采用光照培养,光照(2 000lx)14 h/d,培养温度23~28℃。

2 结果与分析

2.1 成熟鳞茎的鳞片诱导小鳞茎

鳞片切块接入诱导培养基,7 d后,未污染的鳞片变成紫红色,13 d后可观察到鳞片近轴面的基部或切口处首先开始出现小突起,随后近轴面的上部出现小突起,该突起为不定芽原基。继续培养25~30 d,小突起逐渐长大而发育成基部有一小鳞茎,上端抽生2~3片叶子的小百合。观察发现,鳞片不同部位,小鳞茎的诱导频率差异显著,下部诱导频率最高,中部其次,上部最低(表1)。

表1 鳞片不同部位诱导小鳞茎的差异

鳞片部位	接种数量	诱导频率/%	平均小鳞茎数/个
上	50	20	2.1
中	50	70	3.2
下	50	100	6.8

2.2 小鳞茎的继代与壮苗培养

鳞片切块上诱导出的小鳞茎,转接入继代与壮苗培养基,10 d后即可观察到小鳞茎明显增大,25 d后多数小鳞茎直径可达0.5 cm。

2.3 小鳞茎增殖

剥离小鳞茎外侧的小鳞片,近轴面朝上接种于添

收稿日期:2006-07-26

基金项目:上海科技兴农重点攻关项目。

第一作者简介:席梦利(1970-),女,讲师,博士,从事林木基因工程与生物技术研究。通讯作者:施季林(1952-),男,教授。

技术开发

加不同浓度 6-BA、NAA、KT 的 MS 培养基上,8 d 后,鳞片近轴面基部开始出现小突起,继续培养 15 d,小突起长大分化为小鳞茎。观察发现,小鳞茎在小鳞片上的发生部位具有明显的极性,小鳞茎多数发生在小鳞片近轴面的基部。接种 30d 后统计分析结果(表 2)表明,6-BA 浓度的变化,对小鳞茎的诱导影响不明显,而 KT 的配合使用可明显缩短。

表 2 不同浓度 6-BA、NAA 及 KT 对试管苗小鳞片诱导小鳞茎的影响

6-BA/ mg·L ⁻¹	NAA/ mg·L ⁻¹	KT/ mg·L ⁻¹	接种 数量	诱导所 需时间/d	诱导 频率/%	平均小 鳞茎数
0.2	0.1	0	50	19	100	2.1
0.5	0.1	0	50	21	100	2.8
1.0	0.1	0	50	20	100	2.6
0.2	0.5	0	50	17	100	3.1
0.5	0.5	0	50	18	100	3.3
1.0	0.5	0	50	17	100	3.2
0.2	1.0	0	50	18	100	3.6
0.5	1.0	0	50	18	100	3.5
1.0	1.0	0	50	19	100	3.0
0.2	1.5	0	50	19	100	2.9
0.5	1.5	0	50	18	100	3.5
1.0	1.5	0	50	17	100	3.1
0.2	1.0	0.2	50	15	100	4.1
0.5	1.0	0.2	50	14	100	4.5
1.0	1.0	0.2	50	14	100	4.0

注:诱导小鳞茎所需的时间。对各种培养基配方进行分析比较和优化组合,筛选出培养基 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 1 mg/L + KT 0.2 mg/L,对小鳞茎诱导最合适。

2.4 生根诱导

将继代培养基中的试管苗剪去上部叶子,接入生根培养基,10 d 后开始有不定根突起,从表 3 可以看出,低浓度的多效唑可促进宜兴百合生根,高浓度的多效唑则抑制生根。观察发现,随着多效唑浓度的升高,植株高度迅速下降,抽叶数减少,甚至不抽叶,叶片展开变宽,出根率下降且根变短、变黄、变粗,这与观赏百合所得结果类似。通过比较,筛选出 MS + PP₃₃₃ 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 为最适生根培养基,生根率 100%,每个试管苗平均根数达 5.66 条,且根色洁白。

表 3 不同浓度 NAA 与 PP₃₃₃ 对生根的影响

NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	PP ₃₃₃ 浓度 /mg·L ⁻¹	接种 数量	生根率 /%	平均根数	移栽成 活率/%
0	1	100	77	1.47	69
0	5	100	56	1.13	40
0	10	100	44	0.85	21
0.1	1	100	100	5.66	95
0.1	5	100	88	3.52	81
0.1	10	100	64	1.56	45

2.5 生根试管苗的移栽

将生根培养 20 d 左右的生根试管苗移入炼苗间炼苗 3~5 d,然后打开瓶盖,使其适应外界的光照、温度和湿度。3 d 后洗净附着在根上的培养基进行移栽。移栽基质为疏松的园土,移栽前将基质浇湿,移栽时应避免栽入基质过深,以小鳞茎顶部露出土面为宜。最初 10~15 d 用地膜保持空气湿度 60%~80%,避免阳光直射。相对湿度及温度过高时,试管苗易腐烂。移栽 3 周后植株长出新叶,以后进行常规管理。移栽 1 个月后统计,成活率达 95%。

3 讨论

百合试管苗可通过两种方式增殖:一种是通过芽繁芽的途径^[3,4],这是多数观赏百合采用的繁殖方式,这种繁殖方式增殖系数较低,一般为 3 左右,获得的试管苗鳞茎较小,移栽成活率相对较低。第 2 种是试管苗小鳞片繁殖小鳞茎的途径^[5-7],这种繁殖途径效率很高,一般可达 20 左右。以本研究为例,小鳞茎经过大约 25 d 的培养,1 个小鳞茎可以剥离出 5~6 个小鳞片,小鳞片接入诱导培养基,25~30 d 后,每个小鳞片基部可诱导出 3~5 个小鳞茎。1 个试管苗 50~60 d 后大约可培养出 23 个小鳞茎。其繁殖量的公式为: $P = M \times (23)^{n/2}$ (P 为繁殖量、M 为试管苗基数、n 为月数),几个月内就可以获得上百万的复壮优质种苗。

参考文献

- [1] 周权军. 百合种植技术[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1984.
- [2] 席梦利,王节萍,章静娟,等. 宜兴百合脱毒技术[J]. 江苏农业学报,2001,17(1):49-51.
- [3] 刘选明,周朴华,屈殊存,等. 百合鳞片叶离体诱导形成不定芽和体细胞胚[J]. 园艺学报,1997,24(4):353-358.
- [4] 袁芳亭,陈龙清. 麝香百合的叶片离体培养及植株再生[J]. 湖北农业科学,2001(3):50-51.
- [5] 庄志鸿,刘建. 试管内形成东方百合鳞茎的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2002,38(2):149.
- [6] 王爱勤,周歧伟,何龙飞,等. 百合试管结鳞茎的研究[J]. 广西农业大学学报,1998,17(1):71-75.
- [7] 罗丽萍,杨柏云,蔡奇英,等. 龙牙百合的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2001,37(6):527.

(通讯地址:210037,南京市龙蟠路 159 号)