

宜昌百合的组织培养研究

熊 丹, 陈发菊, 梁宏伟, 王玉兵, 张德春

(三峡大学生物技术研究中心/湖北省天然产物研究与利用重点实验室, 湖北 宜昌 443002)

摘要: 试验以宜昌百合的鳞茎为外植体, 研究宜昌百合组织培养快繁的最佳方法。结果表明: 宜昌百合鳞茎的最适诱导培养基为: MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 添加 20% 的椰乳和 0.5% 的活性炭, 同时可以有效地防止宜昌百合在培养时产生褐化; 较适的生根培养基为: $1/2\text{MS} + 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + 0.5% AC。该实验结果为宜昌百合的快速繁殖及工业化生产提供了理论基础和技术支持。

关键词: 宜昌百合; 组织培养; 激素; 活性炭; 椰乳

中图分类号: S682.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7351(2007)04-0091-04

Studies on the tissue culture of *Lilium leucanthum*

XIONG Dan, CHEN Fa-ju, LIANG Hong-wei, WANG Yu-bing, ZHANG De-chun

(Biotechnology Research Center of Three Gorges University; Hubei Provincial Key Laboratory of Natural Product Research and Utility, Yichang, Hubei 443002, China)

Abstract: To develop a suitable approach for the rapid propagation of *Lilium leucanthum* by tissue culture, bulbs were tried as the explant. The result showed that the suitable medium for the bulb explant culture was MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, supplied with 20% coconut milk and 0.5% activated charcoal (AC) which prevented from browning; The suitable rooting medium was $1/2\text{MS} + 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + 0.5% AC. Tissue culture of *Lilium* can achieve its rapid propagation, resulting in the possibility for its industrial production.

Key words: *Lilium leucanthum*; tissue culture; hormone; activated carbon; coconut milk

百合(*Lilium* spp.) 是单子叶植物亚纲百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)的所有种类的总称。百合是著名观赏花卉, 还是上等的保健食品, 具有润肺滋阴、清心安神的药用功能。中国是百合植物资源的自然分布中心, 全世界百合属植物约 100 种, 其中中国原产 47 种以上, 种类丰富, 珍稀特有种多^[1]。宜昌百合(*L. leucanthum*)主要产于湖北西部, 花大美丽, 清香益人, 具有极高的观赏价值, 宜昌百合仍处于野生状态, 野生百合具有内生病毒少, 抗病能力强的优点, 也是很好的育种材料。自 Robb 首次报道了百合组织培养之后^[2], 组织培养方法已成功用于多种百合植物的大量繁殖, 并在百合育种和遗传转化中得到应用^[3,4]。宜昌百合的相关研究报道很少, 仅见王伟对宜昌百合进行了小鳞茎诱导的初步研究^[5]。本文对宜昌百合进行组织培养快速繁殖研究, 以期为该物种种质资源保护, 建立高效的离体培养体系提供资料, 对保护和合理开发利用宜昌百合资源具有非常重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料来源

宜昌百合的鳞茎采自神农架自然保护区。

1.2 实验方法

剥去外层鳞茎选择健壮、无病斑、色泽光亮的鳞片, 并按下述方法进行表面灭菌: 流水中用软刷洗去泥沙, 洗洁净液浸泡 30 min, 自来水冲洗 1 h, 蒸馏水冲洗 2~3 次, 70% 酒精表面消毒 30 s, 0.1% 升汞消毒

收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 湖北省教育厅重点项目(NO. SD200216)和宜昌市科技局重点攻关项目(NO. A06209)资助

作者简介: 熊 丹(1981-), 女, 湖北荆州人, 三峡大学硕士生, 从事生物技术研究。

通讯作者: 陈发菊, Email: chenjf616@163.com。

10 min, 无菌水冲洗 5 次, 置于带滤纸的无菌培养皿中, 使滤纸吸干鳞片表面水分, 于超净工作台上将鳞片切成 $0.5 \sim 1.0 \text{ cm}^2$ 的小块, 接种到三角瓶中。每组 10 瓶, 每瓶 6 片(3 片凸面向上, 3 片凹面向上), 置于组织培养室中培养, 培养条件为: 温度 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 光周期分别为 $24 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 黑暗或 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 光照 + $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 黑暗, 光照度为 1500 lx 。

基本培养基为 MS 培养基, 琼脂 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 通过附加不同浓度的 NAA、2, 4-D、6-BA、IBA、活性炭和椰乳设计了 18 组培养基组合。

2 结果与分析

2.1 NAA、2, 4-D 和 6-BA 不同浓度对比对宜昌百合鳞茎诱导愈伤组织和芽的影响

接种于诱导培养基上的宜昌百合鳞茎培养 5 d 后, 外植体开始增厚变绿, 形成一些淡绿色小突起, 大约 15 d 以后, 有的淡绿色小突起开始直接分化成苗; 有的膨大成无特定形态结构, 颜色为淡黄绿色, 表面呈瘤状突起的愈伤组织状。愈伤组织状结构在 35~40 d 以后, 表面形态开始发生变化, 一些瘤状突起分化为次级小鳞茎, 簇生, 形状较规则, 每个小块产生数目不同, 少的 1~2 个, 多的可达 10~15 个, 颜色有乳白色、淡黄色、浅绿色、深绿色。进一步生长, 多数可以长成苗, 少数畸形、玻璃化。60 d 时进行统计, 结果见表 1。

表 1 激素组合及浓度对百合鳞片诱导愈伤组织和芽的结果

培养基编号	BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	2, 4-D/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	出愈率/%	出芽率/%	生长状况
1	0.5	0.2	0	66.7	40	+++
2	1.0	0.2	0	50	16.7	++
3	0.5	0.5	0	66.7	33.3	+
4	1.0	0.5	0	66.7	0	-
5	0.5	1.0	0	80	50	+++
6	1.0	1.0	0	100	0	-
7	2.0	1.0	0	80	20	+
8	1.0	2.0	0	50	0	-
9	2.0	2.0	0	50	0	-
10	0.5	0	0.2	0	100	+++
11	1.0	0	0.2	66.7	16.7	+++
12	0.5	0	0.5	25	100	+++
13	1.0	0	0.5	87.5	12.5	++++
14	0.5	0	1.0	100	100	++
15	1.0	0	1.0	63.6	72.7	++++
16	2.0	0	1.0	33.3	100	++++
17	1.0	0	2.0	81.8	72.7	++++
18	2.0	0	2.0	66.7	83.3	++

*: - 为没芽生成; + 为有芽生成, 但苗很不健壮; ++ 为有芽生成, 苗生长一般; +++ 为有芽生成, 苗比较健壮; ++++ 为有芽生成, 不是很旺盛, 但苗很健壮; +++++ 为有芽生成, 生长非常旺盛, 苗很健壮。

从表 1 可以看出, 1~18 号培养基中, 较适合宜昌百合鳞茎诱导愈伤组织的激素组合是 6 号和 14 号, 其次是 13 号和 17 号 2 种激素组合; 促进宜昌百合鳞茎诱导芽效果最好的是 14 号和 16 号培养基, 其次是 15 号、17 号和 18 号 3 种激素组合; 从苗的生长情况来看, 17 号激素组合诱导生成的苗的生长非常旺盛, 没有畸形, 且大部分很健壮, 其次为 13、15、16 激素组合, 16 号激素组合诱导生成的苗的生长虽然没有 17 号激素组合诱导生成的苗生长旺盛, 但苗很健壮。从实验过程中, 观察到虽然 14 号激素组合对诱导愈伤组织和芽的频率比较高, 但诱导生成的苗生长不旺盛, 也不健壮。综合出愈率和发芽率及苗的生长情况来看, 适合宜昌百合鳞茎诱导生成愈伤组织和芽的激素配比是 17 号, 即 $\text{MS} + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 小鳞茎诱导迅速, 诱导率高, 突起明显, 生长旺盛; 其次为 15 号和 16 号激素配比, 即 $\text{MS} + 6\text{-BA}$

$1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $\text{MS} + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其中5号、6号、7号、14号和17号培养基适宜做宜昌百合鳞茎诱导生成愈伤组织的初代培养;13号、15号、16号和17号这4种培养基生长的小鳞茎或苗长势整体都很好,可以直接通过生根培养,然后移栽。

从表1还可以看出,2,4-D、NAA对诱导宜昌百合鳞茎形成愈伤组织有明显促进作用,与6-BA配合使用,愈伤组织诱导率平均都在50%以上。但可以明显看出,6-BA与NAA配合使用比6-BA与2,4-D配合使用对诱导宜昌百合鳞茎形成愈伤组织有很大的差异,6-BA与2,4-D配合使用明显优于6-BA与NAA配合使用;在诱导宜昌百合鳞茎形成芽的激素组合中,6-BA与NAA配合使用比6-BA与2,4-D配合使用更好些。可能原因是2,4-D、NAA均为生长素,对于细胞启动脱分化阶段,2,4-D的药剂活性作用最强,但是2,4-D适宜的用量范围较窄,且过量的2,4-D对百合的增殖常会有毒副效应,抑制芽的形成。因此在诱导宜昌百合鳞茎形成芽的激素组合中,6-BA与NAA配合使用好于6-BA与2,4-D配合使用。这表明不同的激素组合对百合鳞茎诱导中6-BA与NAA和2,4-D配合,以附加NAA的效果优于附加2,4-D的效果,前者分化率最高为75%,而后者最高仅为58%的,与姚连芳等^[6]观点一致。

2.2 暗培养和光培养对宜昌百合鳞茎诱导愈伤组织和芽的影响

宜昌百合鳞茎接种在诱导培养基上,黑暗培养15 d后均形成颜色淡黄、质地疏松的愈伤组织,有的也直接分化出芽。在光照和黑暗培养条件下,宜昌百合鳞茎诱导愈伤组织和芽有差异,具体情况如表2所示。在黑暗条件下愈伤组织生长的比较慢,当把在黑暗条件下培养的愈伤组织转到光照条件下培养,愈伤组织又逐渐变绿,愈伤组织的生成相对平均,较一直在光照条件培养的生成量多,生长速度较快,质地逐渐由疏松到致密;黑暗条件下诱导生成的苗较在光照条件下诱导生成的苗高,将黑暗条件下培养的苗转入光照条件下培养一段时间后,淡黄色的苗逐渐变成绿色,并且生长的比较健壮。

表2 光培养和暗培养对宜昌百合鳞茎诱导愈伤组织和芽的影响

培养方式	愈伤组织发生	愈伤组织诱导情况	再生芽萌生	芽的生长情况
光培养	++	淡绿色,质地由疏松到致密,颗粒状	+++	绿色,粗壮较短
暗培养	+++	淡黄色,质地疏松,颗粒状	++	淡黄色,纤细较长

*:++为发生率一般;+++为发生率较高。

从表2中可以看出,在黑暗条件下培养有利于宜昌百合鳞茎诱导愈伤组织的生成;在光照条件下诱导生长的愈伤组织没有在黑暗条件下诱导的多,但诱导生成的芽比较多。在实际生产过程中,对于在宜昌百合鳞茎诱导愈伤组织和芽的实验中,可以先选择在黑暗条件下培养一段时间,然后在光照条件下培养。

2.3 添加剂对宜昌百合鳞茎增殖效果的影响

将经过初代培养的宜昌百合鳞茎诱导产生的愈伤组织和不健壮的芽转入继代培养基中,继代培养基是 $\text{MS} + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,附加不同浓度的活性炭和椰乳。

2.3.1 活性炭对宜昌百合鳞茎诱导效果的影响 活性炭是一种吸附特性较强的无机吸附剂,能吸附各种微量物质和微小颗粒,粉末状的活性炭与颗粒状的活性炭相比其吸附性能更佳,因而常用来防止组织培养中细胞褐变的发生和发展^[7]。从目前大量的组织培养文献来看,活性炭的使用浓度多在0.02%~1%之间,其中尤以0.1%~0.5%更常用^[8,9]。将宜昌百合接种到 $\text{MS} + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中,附加不同浓度的活性炭,活性炭对宜昌百合鳞茎增殖影响的结果见表3。

活性炭对褐变的作用从表3可以看出,加入0.5%和0.1%的活性炭可有效地防止褐变的发生。添加活性炭培养时,愈伤组织增殖快,芽长得粗壮,褐化程度减少,根系较发达。含0.5%活性炭培养时愈伤组织增殖最快,且芽和根比较健壮。说明活性炭在宜昌百合愈伤组织培养时对其增殖、防褐化及根系发育具有明显的促进作用,但过高浓度的活性炭反而不及低浓度的活性炭对愈伤组织增殖的影响大。可能原因是活性炭的吸附特性,不仅能吸附组织中产生的酚醌类物质,有效防止褐变,同时也吸附培养基中的生长调节物质,而使其失去作用,影响愈伤组织增殖和根的生长。从表3还可以看出,在诱导生根方面,添加活性炭的外植体容易生根,生长于培养基中的根颜色比较白,露出在培养基外的根颜色深且长有根毛;对照中没加活性炭,基本上不生根或长出很少量的根,大概是因为活性炭的加入为外植体生根提供了有利的暗

环境。

2.3.2 椰乳对宜昌百合鳞茎增殖效果的影响 在宜昌百合鳞茎增殖培养阶段中,采用 4 种不同椰乳营养水平处理,结果见表 4。

椰乳含有丰富的营养和生理活性物质,广泛地应用于植物原生质体培养和离体再生研究^[5]。通过对有无椰乳促使宜昌百合鳞茎诱导增殖的观察分析(见表 4),发现添加椰乳的培养基上的百合鳞茎块褐化现象较弱,可能是因为其中含有还原性物质,从而防止愈伤组织产生的酚类物质因氧化而褐化,但效果不及活性炭好。另外,还发现鳞茎增殖的速度

有差异,添加了 20% 椰乳的培养基中鳞茎增殖速度最快,且诱导率颇高;而添加 10% 椰乳的次之,没有添加椰乳的生长最慢。可能与椰乳中含有激素,同时含有大量营养物质有关,加快了生长速度,能够达到短期快速增殖的目的。但从经济角度来说,选择椰乳浓度 15%~20% 较适宜。

2.4 试管苗的生根

将增殖所得的丛芽分割为单株,没有长根或是根系不发达的芽转入不同培养基中诱导生根。在 MS 大量减半的基本培养基中附加不同浓度的 IBA 配比的培养基中诱导生根,具体结果如表 5 所示。从表 5 可以看出,从生根时间、诱导率和根的长势上来看,其中 1/2MS+IBA 0.6 mg·L⁻¹+AC 0.5% 是比较适合宜昌百合诱导生根的培养基。

2.5 试管苗的移栽

待根长到 1~2 cm 时,开瓶炼苗 3 d 后,将试管苗上的培养基洗净后,移入消毒过的基质中(椰糠:珍珠岩:石英砂=1:1:1),保持 75% 的空气湿度,50% 自然光照,每日喷 2 次水,10 d 左右喷 1 次稀释 MS 营养液,试管苗成活率在 90% 以上。

3 讨论

在对宜昌百合鳞茎组织培养中,外源激素的作用是非常明显的,外植体愈伤组织的形成及分化与外源激素的作用密不可分,其中以适当浓度配比的生长素和细胞分裂素的作用最为重要。本实验以宜昌百合的鳞茎为外植体,通过生长素和细胞分裂素不同配比和浓度的筛选,在诱导宜昌百合鳞茎生成愈伤组织和芽较适合的培养基为 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 2.0 mg·L⁻¹,并且 6-BA 与 NAA 和 2,4-D 配合,在诱导宜昌百合鳞茎生成愈伤组织和芽以附加 NAA 的效果优于附加 2,4-D 的效果。

植物细胞培养过程中的褐变是一个严重困扰组织培养工作的难题,对于褐变的机理,目前人们仍无法得出定论。大多数研究者认为,褐变主要是细胞分泌的酚类化合物氧化成醌类物质,对细胞正常生理产生毒害造成的。培养基中添加活性炭、椰乳等物质能够防止和延缓百合培养基的褐化,缩短愈伤组织出现的时间,提高分化速度和诱导率^[10]。本实验以添加 0.5% 的活性炭对于宜昌百合鳞茎诱导愈伤组织有较好的效果。

(下转第 97 页)

表 3 活性炭对宜昌百合鳞茎诱导愈伤组织影响的结果

活性炭浓度/%	愈伤组织增殖情况	褐化程度	根生长情况	健壮度
0	+	++	+	+
0.2	+++	+	+++	++
0.5	+++	-	++++	+++
1.0	++	-	+++	++

*: - 为没芽生成; + 为有芽生成,但苗很不健壮; ++ 为有芽生成,苗生长一般; +++ 为有芽生成,苗比较健壮; ++++ 为有芽生成,不是很旺盛,但苗很健壮。

表 4 不同椰乳浓度对宜昌百合鳞茎诱导愈伤组织影响的结果

椰乳浓度/%	褐化程度	愈伤组织增殖情况	根生长情况	健壮度
0	++	+	+	+
10	+	++	++	++
20	+	+++	+++	+++

表 5 不同 IBA 浓度对百合生根影响

培养基	生根时间	诱导率/%	生长状况
1/2MS+IBA 0.2 mg·L ⁻¹ +AC 0.5%	接种后 5 d	100	白色、细长
1/2MS+IBA 0.6 mg·L ⁻¹ +AC 0.5%	接种后 3 d	100	白色、粗短
1/2MS+IBA 1.0 mg·L ⁻¹ +AC 0.5%	接种后 6 d	100	白色、细长

3 分析与讨论

1)注意嫁接过程中的各个环节,对每一个技术环节,即使是一般不被人注意的细节,都必须认真对待,因为从采穗、嫁接到接后管理的每一个环节,都直接关系到嫁接的成败。

2)影响嫁接的各种因素是互相影响的。如砧木质量会影响嫁接部位,影响愈合能力。反之,即使有粗壮的砧木,如无粗壮的接穗,也不可能达到增加切面的要求。接穗长度与保存率的关系本次未进行试验,有待进一步研究。

3)嫁接工作要靠操作者来完成,其技术熟练程度直接影响成败。所采穗条的质量和运输过程中的保鲜都会直接影响嫁接的成活和保存,而这些问题都与操作者密切相关。

4)改用嫩枝作接穗,是提高黄山松嫁接成活率的一项改进措施。嫁接采自成熟树木树冠上方的接穗,能提前开花结实,缩短种子园的投产时间。但是,目前已掌握的技术还没有达到建园一次嫁接成功(成活率90%以上)的要求,还必须做进一步的试验和改进。除研究成活与环境的关系外,还应着重研究黄山松砧木、接穗的最佳愈合生理过程,才能达到理想的嫁接成效。

参考文献:

- [1]李继华.嫁接的原理与应用[M].上海:上海科技出版社,1980.
- [2]H.T.哈特曼.植物扦插理论和技术[M].郑开文,译.北京:中国林业出版社,1988.
- [3]森下义郎.植物繁殖原理和技术[M].李云森,译.北京:中国林业出版社,1985.
- [4]杜亲亲.马尾松嫩枝切接技术的研究[J].林业科学,1983,19(2):191-194.
- [5]林德光.生物统计的数学原理[M].沈阳:辽宁人民出版社,1982.
- [6]沈熙环.林木育种学[M].北京:中国林业出版社,1992.
- [7]洪伟,吴承祯.试验设计与分析[M].北京:中国林业出版社,2004.
- [8]杨章旗,韦元荣.马尾松无性系嫁接种子园营建技术研究[J].广西林业科学,2001,30(1):56-61.

(上接第94页)

在生根培养中,一定浓度的IBA和适当浓度的活性炭有利于百合生根。移栽时以根系多、粗壮的小鳞茎移栽成活率高。

参考文献:

- [1]张云,原雅玲,刘青林.百合品种改良与生物技术研究进展[J].北京林业大学学报,2001,23(6):56-59.
- [2]Robb SM. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum*[J]. J Exp Bot, 1957(8):348-352.
- [3]Tsuchiya T, Takumi S, Shimada T. Transient expression of a reporter gene in bulb scales and immature embryos of three *Lilium* species is affected by 5' upstream sequences and culture conditions[J]. Physiologia Plantarum, 1996, 98(4):699-704.
- [4]Wadat A A, Yun D J, Matsumoto T. Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum*[J]. Plant Cell Reports, 1998(17):262-267.
- [5]王伟,杨万年.宜昌百合小鳞茎诱导的初步研究[J].氨基酸和生物资源,2005,27(3):7-8.
- [6]姚连芳,周俊国,殷桂琴,等.百合组织培养试验研究[J].贵州农业科学,1999,27(3):47-48.
- [7]刘用生,李友勇.植物组织培养中AC的作用[J].植物生理学通讯,1994,30(3):214-217.
- [8]刘用生,李秀珍,鲁学涛.活性炭与6-BA对苹果试管苗的效应[J].河北果树,1994,23(4):26-27.
- [9]韩文璞,袁明莲.活性炭在甜樱桃组织培养中的应用[J].落叶果树,2001(3):7-8.
- [10]傅向东,钱秀红,毛碧增,等.几种理化因子对建兰原球茎生长分化的影响[J].浙江农业大学学报,1997,23(5):547-550.