

有斑百合的组织培养及无性系建立的研究

姜雨,刘佳,孙超,邹翠霞,姜长阳

(辽宁师范大学生命科学学院,辽宁大连 116029)

摘要:以有斑百合嫩茎为材料,进行了愈伤组织培养的诱导、愈伤组织及不定芽的分化、试管苗的生根、移栽、扦插和移植的研究,建立起有斑百合的无性系。结果证明:MS + BA 0.4 mg/L + 2,4-D 1.6 mg/L 是诱导嫩茎形成具有分化能力愈伤组织的理想培养基;1/2 MS + AgNO₃ 0.4 mg/L + BA 0.5 mg/L 是嫩茎愈伤组织和不定芽分化培养的理想培养基;1/2 MS + IAA 0.8 mg/L 是生根培养的理想培养基;炉灰渣是试管苗移栽和扦插的理想基质;移植到山坡上的试管苗具有生长旺盛、根系发达的特点。

关键词:有斑百合;无性系;快速繁殖

中图分类号:S682.2⁺9;Q943.1

文献标识码:B

有斑百合(*Lilium concolor* var. *buschianum*)属于百合科百合属多年生草本植物^[1,2],鳞茎含淀粉,既可食用又可酿酒^[2],鳞茎具有滋补强壮、止咳等功效^[3]。同时,由于有斑百合的花朵非常美丽,也是很多人非常喜欢的野生花卉。因有斑百合用途广泛,而野生种的分布和数量却很少,所以,近年来人们试图对有斑百合进行人工栽培。但是由于在野生的条件下有斑百合形成的种子很少,并且形成的种子难以采集,于是有人就直接在山上采挖野生植株作为栽培的种苗。这使得本来就很有有限的野生资源又遭到了破坏。

为了满足人们的需要,保护有斑百合野生资源,我们对有斑百合进行了组织培养及无性系建立的研究。现将研究结果报道如下:

1 材料与方法

1.1 材料处理

把从庄河市山坡上采集的生长旺盛的有斑百合嫩茎放到500 ml的广口瓶中,流水冲洗30 min左右,用0.05%安利洗涤液振荡洗涤约20 min,移至超净工作台上,用无菌水洗涤2次,倒入70%乙醇灭菌约10 s,迅速用无菌水洗涤2次,再用0.05% HgCl₂ 溶液振荡灭菌14 min,接着用无菌水洗涤6次,再将无菌嫩茎切成厚0.2 cm左右的茎段,接种到相应的固体培养基上,进行观察培养。

1.2 培养条件

培养基以MS和1/2MS为基本培养基,附加不同浓度的细胞分裂素和生长素。以MS为基本培养基时,加蔗糖30 g/L;以1/2 MS为基本培养基时,加蔗糖15 g/L。培养基胂力强度为180 g/cm²^[4],pH 5.8~6.0,培养温度19~26℃,光照12 h/d,光照强度2 000 lx。

1.3 试验内容

1.3.1 激素对愈伤组织诱导的影响

将无菌嫩茎剪成0.2 cm左右的嫩茎段后,接种到以MS为基本培养基,附加不同浓度植物激素的培养基上,进行愈伤组织诱导培养。60 d后观察统计结果。

1.3.2 激素对分化培养的影响

把上述培养的颗粒状愈伤组织接种到以1/2 MS + AgNO₃ 0.4 mg/L为基本培养基,附加不同浓度BA、IAA和NAA的培养基上,进行愈伤组织的分化培养。

1.3.3 生根培养及生根继代培养

将在1/2MS + Ag(NO₃)20.4 mg/L + BA 0.5 mg/L培养基上由愈伤组织诱导培养和不定芽分化培养的高0.5 cm以上的不定苗从基部剪下,接种到以MS或1/2MS为基本培养基,附加浓度为0 mg/L、0.1 mg/L、0.4 mg/L、0.8 mg/L、1.2 mg/L、1.6 mg/L的IAA培养基上进行生根培养。30 d后观察统计。

1.3.4 试管苗的移栽与扦插

将生根试管苗培养瓶打开瓶塞,在温度20℃左右、光照约4 000 lx的条件下炼苗4 d后取出,再用清水洗去基部的培养基,一部分移栽到园土、黄土、河沙和炉灰渣四种不同的基质中,另一部分剪成高2 cm左右、上端有芽有叶的茎段,扦插到与移栽苗相同的基质中。25 d后统计观察统计。

2 结果与分析

2.1 不同浓度激素对愈伤组织诱导的影响

试验结果表明,在不加生长素和只加浓度分别为0.4 mg/L、0.8 mg/L、1.2 mg/L和1.6 mg/L的BA培养基上,有斑百合的嫩茎不能诱导形成愈伤组织。而在含上述浓

度 BA 培养基上,再分别加入 1.6 mg/L 的 NAA 或 2,4-D,有斑百合的嫩茎几乎都能诱导形成愈伤组织,愈伤组织的诱导率为 72%~98%。但是,若从外观上看,在 BA 浓度为 0.4 mg/L、2,4-D 的浓度均为 1.6 mg/L 的培养基上,诱导的愈伤组织不仅颜色嫩绿,而且呈直径为 0.1 cm 左右的颗粒状。经过 3 次重复试验的观察统计还证明,在这培养基上一段长约 0.2 cm 的嫩茎,经过 60 d 的培养,平均可形成 51 个直径为 0.1 cm 左右的浅绿色的愈伤组织颗粒。这样的愈伤组织为具有分化能力的愈伤组织^[5,6]。对在这一培养基上诱导的愈伤组织,进行继代增殖培养,连续继代 18 代,所形成的愈伤组织不仅外观上保持不变,并且每继代增殖培养一代(40 d)一个颗粒平均可形成 63 个基本一致的颗粒。这说明 MS + BA 0.4 mg/L + 2,4-D 1.6 mg/L 是诱导有斑百合嫩茎形成具有分化能力愈伤组织的理想培养基。

2.2 不同浓度激素对分化培养的影响

结果证明,培养 20 d 左右可见分化出芽点,60 d 后可见形成大量的丛生不定芽。由表 1 可见,由嫩茎培养的颗粒状愈伤组织,在同时含有生长素 NAA 或 IAA 和细胞分裂素 BA 的培养基上愈伤组织不能分化,而在不含任何激素的培养基上和只含 BA 的培养基上,愈伤组织可以分化。在 2 号培养基上的分化率达 98%。观察还表明,在这一培养基上,不仅分化率高,而且分化的不定芽呈丛生状、高 1 cm 左右、长势好。把在这一培养基上分化培养的不定芽从基部剪下,接种到相同的培养基上进行不定芽的分化培养。经过 4 次试验和连续 8 代的继代培养证明,1 个不定芽经过 50 d 的培养平均可分化为 5.8 个高 1 cm 左右的不定芽。上述说明 1/2MS + AgNO₃ 0.4 mg/L + BA 0.5 mg/L 这一培养基是有斑百合嫩茎愈伤组织和不定芽分化培养的理想培养基。

2.3 不定苗的生根及试管苗生根继代培养

结果表明,以 1/2MS 为基本培养基的生根效果好于 MS 培养基。在 1/2MS + IAA 0.8 mg/L 的培养基上不仅平均生根数为 5.3 条/株,生根率达 96%,而且植株生长旺盛,生长速度快,株高为 5 cm 左右;由此说明 1/2MS + IAA 0.8 mg/L 这一培养基是有斑百合生根培养的理想培养基。把生根苗剪成长 1~2 cm、具有 1 个生长点和 1 片正常叶子的茎段(每株生根苗可以剪成 3~4 个茎段)后,接种到相同的生根培养上,进行生根继代培养。培养 30 d 又能长成株高 5 cm 左右的旺盛试管苗。在进行生根继代培养时,被剪段的生根试管苗下部保留 1 个生长点和 1 片正常的叶片,继续进行培养,若不污染,一次接种培养的生根试管苗,80 d 可以培养 3 代生长旺盛的有效试管苗,平均 30 d 繁殖系数为 3.8;并且用这种生根继代的方法所繁殖试管苗生长旺盛,几乎没有无效苗。因此,采用这种试管苗生根继代培养的方法,是快速繁殖有斑百合试管苗的有效方法。

2.4 试管苗的移栽、扦插与移植

移栽和扦插试验的结果证明:以炉灰渣为基质,移栽成活率为 96%,扦插苗的成活率为 93%。扦插苗除了初期植株长得较小外,后期植株的各种性状及长势与移栽苗一致。这种试管苗扦插的方法又能使繁殖速度提高 2 倍左右。这说明炉灰渣是有斑百合试管苗移栽和扦插的理想基质。

把移栽成活的试管苗移植到山坡上,经过 3 次小批量试验证明,移栽和扦插的有斑百合试管苗与野生苗相比,具有植株生长非常整齐旺盛、抗寒性强、根系量比实生苗增加 1 倍左右的特点。

表 1 不同浓度的激素对嫩茎愈伤组织分化的影响

编号	浓度(mg/L)			接种颗粒数量	分化不定芽数	分化率 (%)	长势
	BA	NAA	IAA				
0	0	0	0	80	18	24	++
1	0.1	0	0	80	53	66	++
2	0.5	0	0	80	78	98	+++
3	1.0	0	0	80	27	34	+
4	2.0	0	0	80	20	25	+
5	0.1	0.5	0	80	0	0	
6	0.5	0.5	0	80	0	0	
7	1.0	0.5	0	80	0	0	
8	0.1	0	0.5	80	0	0	
9	0.5	0	0.5	80	0	0	
10	1.0	0	0.5	80	0	0	

注:+++为长势好;++为长势较好;+为长势一般

3 讨论

虽然目前已有许多百合科百合属植物组织培养的报道^[7-11],但迄今未见有斑百合组织培养及非分生组织嫩茎无性系建立的报道。本研究以有斑百合的嫩茎为材料,进行了组织培养研究,建立起有斑百合嫩茎的无性系,不仅可以为满足生产需要提供生长非常整齐旺盛、抗寒性强、根系发达有斑百合种苗,而且也为此种野生植物种质保护提供了可行途径,同时还证明,有斑百合非分生组织和细胞也具有全能性。

有斑百合愈伤组织继代增殖培养40 d可增殖63倍,按照这种增殖速度计算,一年可增殖数639株;用生根继代的方法进行增殖培养,30 d繁殖系数为3.8,按照这个速度,每年繁殖数为3.812株。这说明不论采用哪种方法进行繁殖,其繁殖速度都可以满足生产上大量种苗的需要。但是,由于由愈伤组织诱导分化不定苗长势较弱,无效苗的比率高,并且还需要经过生根阶段才能用于生产。因此,生产上应采用生根继代的方法进行快速繁殖为宜。

有斑百合嫩茎诱导的颗粒状愈伤组织分化率98%,这不仅为满足生产上对大量种苗需求提供了可能,而且也可以把这种愈伤组织作为转基因研究材料。

移植后有斑百合试管苗生长旺盛的原因一方面与试验材料是选择了生长非常旺盛的优良植株有关,另一方面还与有斑百合试管苗的根系非常发达有关。在试验中,移栽、扦插和移植后的有斑百合试管苗的根系非常发达可能与以下原因有关:一是我们所选择长势非常旺盛

的植株这种试材,本身就具有促进根系非常发达的遗传性;另一方面与在生根培养过程中,培养基中加入了IAA, IAA的后效作用也促进了试管苗根系的生长。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第十四卷)[M]. 北京:科学出版社,1980. 133.
- [2] 李书心主编. 辽宁植物志(下册)[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社. 1991. 703.
- [3] 江苏新医学院编. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海人民出版社. 1979. 856~858.
- [4] 姜长阳. 培养基琼脂用量的商榷[J]. 上海:植物生理学通讯,1992,28(2):155.
- [5] 安利佳,姜长阳. 植物组织培养导论[M]. 大连:辽宁师范大学出版社,1996:68~72.
- [6] 胡尚连,王丹. 植物生物技术[M]. 西安:西安交通大学出版社,2004:35~40.
- [7] 黄敏玲,陈诗林. 透百合离体快速繁殖[J]. 上海:植物生理学通讯,1993,29(6):437.
- [8] 陈小兰,胡琼华. 金百合离体快速繁殖[J]. 上海:植物生理学通讯,2000,36(4):334.
- [9] 万勇,毛凌华. 万载百合组织培养快速繁殖的研究[J]. 南昌:江西农业学报,2000,12(4):26~29.
- [10] 赵祥云,程廉. 百合株芽组培及脱毒研究[J]. 北京:园艺学报. 1993,20(3):284~288.
- [11] 王家福,陈振光. 百合快速繁殖条件的优化[J]. 福州:福建农业大学学报. 1999,28(2):152~156.

Study of Tissue Culture and Establishment of Asexual System of *Lilium concolor* var. *buschianum*

JIANG Yu, LIU Jia, SUN Chao, ZOU Cui-xia, JIANG Chang-yang

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029)

Abstract: A study was conducted on the induction and differentiation of callus, bud differentiation, rooting, transplanting, cuttage of test tube seedling for *Lilium concolor* var. *buschianum*. The results indicated that the ideal medium for induction of callus from young stem was MS + BA 0.4 mg/L + 2,4-D 1.6 mg/L and MS + BA 0.4 mg/L + NAA 0.2 mg/L was ideal medium for differentiation of callus and adventitious bud. The medium of 1/3MS + IAA 0.4 mg/L was suitable for root growth. The test tube seedling transplanted has the character with exuberant growth and the developed root system.

Key words: *Lilium concolor* var. *buschianum*; Clone; Rapid propagation