文章编号: 1008-3464 (2007) 02-0168-03

木门百合子房组织培养研究

潘正波, 陈丽梅, 李昆志, 王跃, 宋中邦
(昆明理工大学 生物技术研究中心, 云南 昆明 650224)

摘要: 以百合新品种木门 (Conca D'or) 的子房为材料, 开展组织培养研究。结果表明, 诱导愈伤组织的最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 其诱导率为76%; 芽分化最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 其分化率达到82.5%; 生根培养基为 MS, 生根率达100%。

关键词: OT型百合; 子房; 组织培养

中图分类号: S682.2 **文献标识码:** A

Studies on tissue culture with ovary of lily Conca D'or

PAN Zheng-bo, CHEN Li-mei, LI Kun-zhi, WANG Yue, SONG Zhong-bang
(Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract: The tissue culture for Conca D'or, a new species of lily, was conducted with its ovary. The results showed that the best medium for callus formation was MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L and the inducing rate for callus was 76%. The best medium for bud initiation was MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L and the inducing rate was 82.5%. The best medium for root formation was MS, and the rooting rate reached 100%.

Key words: Conca D'or; ovary; tissue culture

百合系百合科百合属 (*Lilium* L.) 的多年生草本植物, 地下具鳞茎, 是一种应用广泛的鲜切花材料。“木门”又称“绝代双骄”, 英文名为 Conca D'or, 属 OT 型百合, 是由东方百合与喇叭百合杂交 (Oriental×Trumpet, 简称 OT) 获得的新品种。木门百合容易栽种, 花色金黄, 叶片健壮, 呈深绿色。据报道, 百合许多部分的器官和组织都可通过组织培养方法诱导成苗, 如花柱、叶片、珠芽、鳞片、鳞茎盘等, 但以子房为材料进行组培的报道较少^[1]。木门百合系近年新出的鲜切花品种, 具有花大、浓郁的特点, 至今未见有相关组织培养的报道。本研究选取木门百合的子房为外植体进行离体培养, 研究不同浓度激素配比的培养基对芽的诱导、增殖及生根的影响, 为木门百合的快速繁殖及下一步的转基因研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选用木门百合 (Conca D'or) 为研究材料, 取其鲜切花的雌蕊子房、叶片为外植体。

收稿日期: 2006-08-14; 修回日期: 2006-10-17。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30670163); 教育部留学回国人员科研启动基金 (2005-55); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养计划 (2004PY01-5); 昆明理工大学科研项目。

作者简介: 潘正波 (1975-), 男, 云南昭通人, 硕士研究生; E-mail: pzbkm@sohu.com。

通讯作者: 陈丽梅, 教授; E-mail: chenlimeikm@yahoo.com.cn。

1.2 外植体的消毒

将外植体在自来水下冲洗10 min后,用75%酒精(加3~5滴土温)浸泡30 s,转入经过灭菌的培养瓶里,加0.1%的升汞(HgCl₂)消毒液灭菌3 min,最后用无菌水清洗5~6次。其间需不断摇晃,以确保溶液浸润材料的每一部分。

1.3 培养基的配制

以MS培养基为基本培养基,按培养目的不同添加不同种类和浓度水平的外源激素,琼脂的用量为0.8%。诱导和分化培养基附加蔗糖30.0 g/L,生根培养基附加蔗糖20.0 g/L,培养基pH 5.8左右。

1.4 外植体的培养

将外植体切成长0.5~1.0 cm小块,接种到愈伤组织诱导培养基上,在温度(25 ± 2) °C,光照强度800~1 200 lx,24 h光照条件下培养,20 d左右继代一次。芽和根的诱导及生长均在相同的条件下进行。

2 结果与分析

2.1 子房的培养

2.1.1 激素对愈伤组织形成的作用 将长0.5~1.0 cm的子房切段,分别接种于不同激素水平的诱导培养基(表1)上。培养10 d左右,子房开始膨大,子房壁变绿增厚。两周后胚珠均发生显著的膨大,但未能诱导出愈伤组织。培养30 d后,胚珠开始发黄,然后发生褐变死亡,而在培养25~50 d后,子房壁于切口处开始产生淡黄色愈伤组织。由表1可见,7号培养基培养的外植体最先出现愈伤组织,愈伤组织诱导率为56%,45 d后,愈伤组织变绿;1号培养基诱导率最高(76%),诱导形成的愈伤组织为淡黄色,质地疏松,以后愈伤组织逐渐长大变绿,但也有一些外植体不能产生愈伤组织;4号培养基愈伤组织出现最迟。说明1号培养基最适合诱导愈伤组织,愈伤组织质地疏松,几乎没有褐变现象。

试验过程中还观察到在各种培养基上培养的外植体均有褐变致死的现象,其中以7号培养基最严重,1号培养基最轻微。在自然状况下生长的百合大多带菌,且体内含有较多的酚类物质,致使外植体容易褐变、坏死。因此,防止褐变是离体快繁中的重要问题。

表1 激素配比对木门百合子房愈伤组织的诱导反应

Tab. 1 Induced reaction of various hormone on inducing rate of callus

培养基编号 Medium No.	附加激素及浓度/mg · L ⁻¹ Concentration of hormone	接种数 Explant number	产生愈伤组织数 Callus number	愈伤组织诱导率/% Inducing rate of callus	诱导时间/d Days for callus appearance
1	6-BA 1.0 + NAA 0.5	25	19	76	30
2	6-BA 1.0 + NAA 1.0	25	16	64	39
3	6-BA 0.5 + NAA 0.5	25	10	40	45
4	6-BA 0.5 + NAA 1.0	25	11	44	50
5	KT1.0 + 2,4-D 1.0	25	15	60	29
6	KT2.0 + 2,4-D 2.0	25	18	72	28
7	KT4.0 + 2,4-D 4.0	25	14	56	25

2.1.2 激素配比与芽分化的关系 将形成的愈伤组织移入分化培养基(表2)中培养10~15 d后,表面形成许多绿色球状突起,35~45 d后发展成不定芽(45 d统计发芽率),同时,在很多愈伤组织上有不定根生成。在1号培养基上的愈伤组织分化的芽最多,形成的小苗壮实,伴有少量根形成。在其他的培养基上生长的愈伤组织褐变现象较严重,诱导芽的数量较少,小苗长势较弱。在2号培养基中愈伤组织生长困难,芽分化少,同时伴有较多的根生成。3号培养基上易发生褐化,苗生长较弱,愈伤组织生长缓慢。在4号培养基上的愈伤组织生长最旺盛,但分化的芽最少。在5号培养基中愈伤组织最先诱导出芽,芽的分化率较高,形成的根也最多,苗生长最壮,但褐变致死率也最高。说明1号培养基最适合诱导芽的分化。

表2 激素配比对木门百合子房壁愈伤组织诱导出芽的影响
Tab. 2 Influence of various hormone on inducing rate of Conca D'or callu

培养基编号 Medium No.	附加激素及浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration of hormone	接种愈伤组织数 Callus number	愈伤组织出芽数 Bud number	出芽率/% Inducing rate
1	6-BA 1.0 + NAA 0.1	40	33	82.5
2	6-BA 1.0 + NAA 0.5	40	26	65.0
3	6-BA 0.5 + IAA 0.5	40	8	20.0
4	6-BA 0.5 + 2,4-D 1.0	40	5	12.5
5	KT4.0 + 2,4-D 4.0	40	30	75.0

2.1.3 生根培养 苗生长到2~3 cm高时,将无根苗从基部切下,转入MS与1/2 MS培养基中进行生根培养,结果都能诱导生根,培养10 d后观察发现,以MS培养基的生根效果最佳,生根率达到100%,且根粗壮,根毛多,活力强,苗生长壮实。20 d后,在1/2MS培养基上也能诱导生根,生根率达92%,但1/2 MS培养基上诱导生根的苗长势比MS培养基的稍弱。

2.2 叶片培养

鲜切花枝的幼嫩叶片经消毒灭菌后,切成0.5 cm×0.5 cm见方的小块,分别接种到表1所列的诱导培养基上。培养10 d左右,所接种的叶块逐渐失绿、萎蔫,继代培养也不能诱导出愈伤组织,但用诱导出再生苗的无菌嫩叶接种在MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L的培养基上,10 d后,切口处膨大并产生淡黄色愈伤组织,一个月左右可形成大量黄色愈伤组织,诱导率可达70%以上,继代培养基不变,20~30 d继代培养一次,40 d可分化出幼芽,个别外植体在形成幼芽的同时有根生成,继续培养可形成大量幼苗,等幼苗长到2~4 cm高时,可转入生根培养基中进行生根培养。

2.3 移栽

待幼苗的根长到1~2 cm,取出小苗,洗去根部的培养基,移到珍珠岩和腐殖土(1:1)混合的基质中栽培,覆盖保鲜膜一周后掀开,置于温度15~25℃、相对湿度15%左右、自然光照50%的温室中培养,成活率可达90%以上。

3 讨论

本研究用木门百合子房作外植体,成功地诱导愈伤组织的形成和芽的分化。组织培养的成功将为该品种的快速繁殖和开展相关的转基因操作奠定了良好的研究基础。杨薇红等^[5]认为,花器官最佳诱导分化的培养基为MS+6-BA 1.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L,使用6-BA 1.0 mg/L配合低浓度(0.1 mg/L)的NAA对芽的增殖最佳,增殖的苗长势强健、整齐度高。本研究的结果表明,影响子房愈伤组织诱导的因素中,细胞分裂素的活性及其与生长素的配比、浓度高低均对愈伤组织的形成有极大影响。MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L的培养基最适于诱导愈伤组织,所形成的愈伤组织较易诱导成苗,同时外植体也不易发生褐变。使用具有高细胞分裂素活性的KT有利于启动子房的脱分化,但外植体的枯死率上升。用2,4-D诱导愈伤组织的效果优于NAA诱导的效果,但却不利于随后芽的分化。

在实验中还观察到,大于0.5 cm的子房切段作外植体不易枯死,接种前切除子房内的胚珠有利于缩短愈伤组织形成所需时间。此外,用子房壁培养得到的无菌嫩叶比用鲜切花枝上的幼嫩叶片更容易诱导愈伤组织,可能是一方面无菌嫩叶具有更强的分化能力,另一方面灭菌过程中对鲜切花幼嫩叶片的毒害作用也影响愈伤组织的诱导。在同等条件下,使用鲜切花嫩叶基本不能诱导愈伤组织,而子房则能诱导出大量愈伤组织。

致谢 实验所用木门百合鲜切花由云南理工大学的殷飞同学提供,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] 许宝辉. 百合子房组织培养研究 [J]. 西南科技大学学报, 2003, 18 (3): 65-67.
[2] 杨薇红, 张延龙, 童斌, 等. 亚洲百合花器官的组培快繁技术研究 [J]. 中国农学通报, 2004, 20 (5): 193-195.

(责任编辑 裴润梅)