

百合愈伤组织的诱导及植株再生

柳玉晶, 龚束芳, 樊金萍, 王金刚, 车代弟*

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 试验以东方百合(*Oriental hybrids*)“bernini”的花柱、花丝、花瓣为外植体, 利用组织培养技术, 探讨不同外植体愈伤组织的诱导、胚状体发生及植株的再生状况。结果表明, 三种外植体均能诱导愈伤组织, 花柱和花瓣诱导的愈伤组织为绿色致密的非胚性组织, 而花丝诱导的愈伤组织为黄色疏松的胚性组织, 将胚性愈伤组织继续培养一个月可发生胚状体。花丝愈伤组织诱导率、分化率以及分化速度均高于花柱和花瓣。诱导愈伤组织的最佳培养基为改良 MS(盐酸硫胺素的浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)+2,4-D $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +水解乳蛋白 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 最佳分化培养基为 MS+KT $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 最佳生根培养基为 MS+IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 东方百合; 组织培养; 愈伤组织; 植株再生

中图分类号: Q949.71*8.23; Q943.1

文献标识码: A

百合是百合科(*Liliaceae*)百合属(*Lilium*)多年生球根花卉, 是世界著名的切花之一。因其花型花色多样, 切花装饰精美, 在鲜切花生产及消费中占有重要地位。生产上, 百合主要采用常规分球、分珠芽、鳞片扦插、鳞片包埋等传统的繁殖方法进行繁殖。但繁殖系数较低, 特别是经过多代繁殖以后, 常造成种性退化, 病毒积累, 影响百合的产量和质量^[1]。本试验以东方百合(*Oriental hybrids*)“bernini”的花柱、花丝、花瓣为外植体, 应用组织培养技术诱导愈伤组织形成、分化幼苗, 建立高效植株再生体系, 为东方百合快速繁殖奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以东方百合(*Oriental hybrids*)“bernini”花蕾(长度 10~12 cm)为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 外植体表面灭菌条件的筛选

摘取新鲜的花蕾用自来水冲洗后, 用 75%的

酒精浸泡 30 s, 再用 2%的次氯酸钠分别消毒 3, 5, 8, 10 min, 然后用无菌水冲洗 5~6 次。

1.2.2 愈伤组织诱导及分化

撕开消毒后的花蕾, 将花丝、花柱约 1 cm 长、花瓣 1 cm^2 大小的试材接种在以改良 MS 为基本培养基(盐酸硫胺素的浓度提高为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[2-3], 添加 3%蔗糖, $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉, 及不同浓度激素的诱导愈伤组织形成的培养基上, 30 d 后观察分化情况。

将培养 40 d 后的花丝愈伤组织、花瓣愈伤组织和花柱愈伤组织分别接种到分化培养基上, 20 d 后愈伤组织开始分化, 30 d 后观察 3 种外植体愈伤组织芽分化情况。

1.2.3 生根及驯化移栽

将分化培养基上分化的苗高为 3~5 cm 健壮小芽从基部切下, 接种到添加不同 IBA 浓度的生根培养基上, 20 d 后观察生根情况。

生根培养 30 d 后, 将再生苗打开封口膜炼苗 7 d。然后移栽到经过高温灭菌的基质中, 每 2 周浇 1 次营养液, 移栽 1 个月后观察成活率。

2 结果与分析

2.1 外植体表面灭菌条件

试验结果表明, 使用 75%酒精浸泡 30 s, 再用

收稿日期: 2006-03-09

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目(GC04B115)

作者简介: 柳玉晶(1980-), 女, 黑龙江人, 硕士, 研究方向为园林植物组培。

* 通讯作者 E-mail: daidiche@yahoo.com.cn

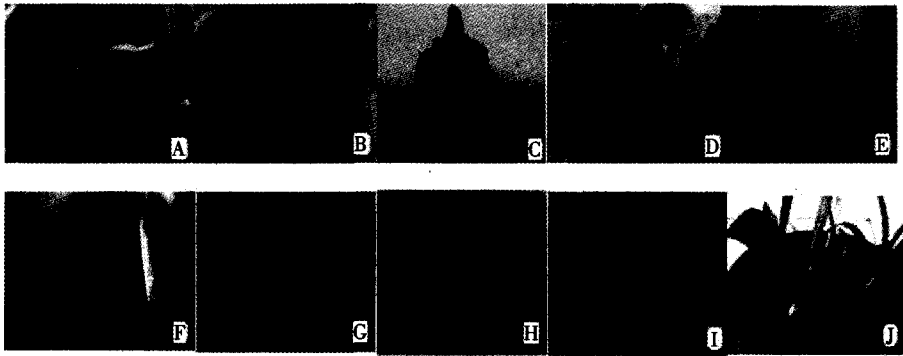
2%次氯酸钠浸泡 5 min，最后用无菌水冲洗 5~6 次，可以达到最佳效果，并且污染率最低，无褐化现象产生。

2.2 愈伤组织的诱导及胚状体发生
培养 20 d 后，发现大部分外植体膨大，40 d 后可形成愈伤组织(见表 1)。

表 1 不同培养基对愈伤组织诱导率的影响
Table 1 Effect of different medium on ratio of induction callus

培养基 No. of medium	植物激素(mg·L ⁻¹) Phytohormone combination	外植体数 No. of explant	花瓣愈伤组织 诱导率(%) Ratio of peyal induction callus	花丝愈伤组织 诱导率(%) Ratio of filament induction callus	花柱愈伤组织 诱导率(%) Ratio of style induction callus
1	2,4-D1.0+BA0+LH100	90	29.9Ed	33.6E	30.7Ff
2	2,4-D 1.0+BA0.05+LH200	90	39.5Dc	46.8Dde	41.6Dd
3	2,4-D 1.0+BA0.1+LH300	90	48.1Cb	54.3Cc	49.3Cc
4	2,4-D 2.0+BA0+LH300	90	59.5Aa	68.4Aa	66.5Aa
5	2,4-D 2.0+BA0.05+LH100	90	56.3ABa	61.7Bb	63.2Bb
6	2,4-D 2.0+BA0.1+LH200	90	47.7Cb	47.7Dd	48.2Cc
7	2,4-D 3.0+BA0+LH200	90	51.2BCb	58.6BCb	57.9Bb
8	2,4-D3.0+BA0.05+LH300	90	38.2Dc	43.4De	35.8Ee
9	2,4-D 3.0+BA0.1+LH100	90	37.4Dc	44.5Dde	39.8DEd

注：* 三次重复总苗数。进行 Duncan's 新复极差检验，具不同字母表示差异显著，大写字母表示 0.01 水平上的差异显著水平，小写字母表示 0.05 水平上的差异显著水平。
Note: * Total No. of three repeats, Significant test by SSR, different letters are significantly different, capital letters are significantly different at 0.01 level, small letter are significantly different at 0.05 level.



A-花瓣形成的绿色致密愈伤组织；B-花柱形成的绿色愈伤组织；C-花丝形成的黄色胚性愈伤组织；D-E-胚状体的发生；F-花丝愈伤组织分化；G-花柱愈伤组织分化；H-花瓣愈伤组织分化；I-准备移栽的再生苗；J-移栽后一个月，蛭石中试管苗的生长情况
A-Green pykno-callus of petal; B-Green Callus of style; C-Yellow and embryo callus of filament; D-E-Embryoid genesis; F-Differentiation of filament callus; G-Differentiation of style callus; H-Differentiation of petal callus; I-Transplanted plantlet; J-After transplanted one month, effect of plantlet grow in vermiculite

图版 I 百合愈伤组织的分化及移栽驯化
Plate I Callus differentiation and plantlet transplanation of *Lilium*

结果表明，三种外植体形成的愈伤组织类型不同，花柱和花瓣诱导的愈伤组织为绿色的致密的非胚性愈伤组织，而花丝诱导的愈伤组织为黄色疏松的胚性愈伤组织(图版 I-A, B, C)。不同的植物激素组合对愈伤组织的诱导率都有很大的影响，高浓度的 2, 4-D 有利于愈伤组织的形成及胚状体发生，当 2, 4-D 浓度为 2 mg·L⁻¹ 时愈伤组织诱导率最高，其中花丝诱导的胚性愈伤组织继续培养一个

月后,可观察到胚状体的发生(图版 I-D, E)。

2.3 愈伤组织分化与植株再生

将培养 40 d 后形成的愈伤组织块接种于 MS+

BA0.5 mg·L⁻¹+KT 0.1mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹ 的分化培养基中,20 d 后愈伤组织开始分化,形成大量丛生芽点(见表 2)。

表 2 愈伤组织分化与植株再生

Table 2 Differentiation and plantlet regeneration of callus

重复 Repetition	花丝愈伤组织分化 Differentiation of filament callus			花瓣愈伤组织分化 Differentiation of petal callus			花柱愈伤组织分化 Differentiation of style callus		
	外植体数 Explantets	分化率 Perc. of differ-	平均 分化苗数 Mean No. of	外植体数 Explantets	分化率 Perc. of differ-	平均 分化苗数 Mean No. of	外植体数 Explantets	分化率 Perc. of differ-	平均 分化苗数 Mean No. of
		tiations	plantlets		tiations	plantlets		tiations	plantlets
重复 1 Rep. 1	30	93.3	11.3	30	36.7	3.1	30	83.3	8.7
重复 2 Rep. 2	30	96.7	12.0	30	16.7	2.7	30	86.7	7.5
重复 3 Rep. 3	30	93.3	9.8	30	26.7	2.9	30	90.0	8.9

花丝、花柱和花瓣愈伤组织分化的再生苗在形态上存在一定的差异,由花瓣愈伤组织分化的再生苗呈玻璃化现象,生根率低,培养一段时间后死亡(图版 I-F, G, H)。

2.4 生根与驯化移栽

接种在不同处理培养基 10 d 后大部分再生苗开始生根,20 d 后形成大量的根系。不同生根培养基

对再生苗生根的影响不同,其中 2 号培养基生根率最高,达 98.7%,并且根系生长粗壮(见表 3)。

将炼苗后的再生苗栽植到配制好的基质中,结果表明,以蛭石为基质的再生苗成活率最高,高达 95.6%,而且生长健壮,其他三种基质中再生苗成活率较低,成活率仅为 60%左右(见表 4,图版 I-I, J)。

表 3 不同培养基对再生苗生根的影响

Table 3 Effect of different medium on rooting of plantlet

编号 Number	培养基(mg·L ⁻¹) Medium	外植体数 No. of explants	生根率(%) Ratio of rooting	每株最多根数(个) No. of roots
1	MS	60	76.5	5
2	MS+IBA0.5	60	98.7	11
3	1/2MS+IBA0.5	60	92.3	18
4	1/2MS	60	81.6	8

表 4 不同基质对再生苗移栽的影响

Table 4 Effect of different medium on transplant

基质类型 Type of media	移栽株数 No. of transplants			成活株数 No. of survived plants			成活总株数 No. of total plant	成活率(%) Ratio of survival
	1	2	3	1	2	3		
蛭石 Vermiculite	30	30	30	30	28	28	86	95.6
土壤:蛭石=1:1 S:V=1:1	30	30	30	18	22	17	66	63.3
砂 Sand	30	30	30	19	20	20	67	65.6
土壤 Soil	30	30	30	15	13	17	62	52.2

3 讨 论

试验结果表明,愈伤组织的诱导与取材部位有密切的关系。本研究中只有花丝可以产生大量优质的胚性愈伤组织,将花丝愈伤组织经过继续培养可发生胚状体,建立了植株的另一个再生途径;花丝愈伤组织诱导率、分化率以及分化速度均高于花柱和花瓣,每块愈伤组织可以分化十几个芽,这为百合快速繁殖奠定了基础。本试验只考虑以花器官为外植体,此最佳愈伤组织诱导培养基是否适用于其它外植体还有待于进一步研究。

试验中对 2, 4-D 浓度, BA 浓度, LH 浓度进行了 3 因素 3 水平的 $L_9(3)^4$ 正交试验^[4], 对试验结果进行级差分析, 结果表明, 2, 4-D 在愈伤组织诱导中占有重要的地位, 对愈伤组织的诱导影响显著; LH 和 BA 的影响效果存在一定的差异, 花丝诱导愈伤组织中, LH 的作用优于 BA, 而花瓣和花柱愈伤组织诱导中, BA 的作用分别优于和等于 LH;

花瓣愈伤组织诱导中加入 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 有利于愈伤组织的形成, 而花丝和花柱的愈伤组织不需要 BA 的参与的就能形成。由于试验工作量大, 没有采用常规浓度梯度试验, 但采用正交试验也获得了愈伤组织最佳培养基配方, 是否存在差异还有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Arzate-Fernández A M, Nakazaki T, Okumoto Y. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.)[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16: 836-840.
- [2] 贾敬芬, 谷祝平, 郑国锴. 百合花丝组织培养及细胞学观察[J]. 植物学报, 1981, 23(1): 17-21.
- [3] 谷祝平, 郑国锴. 百合未授粉子房的培养及其胚胎学观察[J]. 植物学报, 1983, 25(1): 24-27.
- [4] 徐中儒. 农业试验最优回归设计[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1988: 62-76.

Embryoidgenesis and plant regeneration of *Lilium* spp

LIU Yujing, GONG Shufang, FAN Jinping, WANG Jingang, CHE Daidi

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: We used style, filament and petal from eastern lily "beinini" as explants to study callus induction, embryoidgenesis and plant regeneration in the experiment. The result indicated that three explants can induced callus, but type of callus was different. Callus of style and petal were no-embryonic with green color and compact structure, callus of filament was embryonic callus with yellow color. Callus of filament could generate embryoid when continued culture one month. Filament ratio of callus induction, differentiation and rate of differentiation were all higher than style and petal. The best medium for callus induction was improvement of MS with $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D and $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Lactalbumin hydrolysate (LH). The best medium for differentiation was MS+KT0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +BA0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The best root media was MS+IBA0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: Oriental hybrids; tissue culture; callus; plant regeneration