

百合的组织培养技术研究

李 劼

(杨凌职业技术学院, 陕西 杨凌 712100)

提 要: 对百合组织培养技术进行了简单综述, 包括百合外植体的准备、百合的快速繁殖技术等, 且选用了 6 个百合品种的部分部位进行组培技术研究, 以改良 MS + BA0.8mg/l + NAA0.3mg/l + KT0.2mg/l 的培养基诱导效果最好, 其诱导率为 74.3%, 各器官都能够进行组织培养。组培苗在 MS + BA0.5mg/l 或 IBA0.5mg/l 的培养基中较易生根, 生根率为 98%, 生根时间为 1 个月。百合组培苗移栽以春秋季节较高, 分别为 91.6% 和 78.2%, 冬夏季较差。

关键词: 百合; 鳞片; 组织培养; 育种

百合 (*Lilium* . spp) 是当前著名的观赏花卉之一, 也是应用最广泛的切花之一。我国是世界百合种质资源的分布中心, 约有 47 个种、18 个变种, 占世界百合属总数的一半以上。其中 36 个种、15 个变种是我国特有的珍稀种类^[1]。百合除具有观赏价值外, 大多数可以食用、药用, 是上等的滋补佳品。但由于人类、非人类的影响, 使一些分布地区窄或生态适应性弱的百合种的生存受到严重威胁。传统的百合繁殖方法主要采用常规分球、分珠芽鳞片扦插、鳞片包埋等。但采用这些方法繁殖, 繁殖系数较小, 特别是经多代分殖以后, 常造成种性退化, 甚至病毒积累, 影响百合的产量和质量。利用组织培养技术, 能够迅速去除病毒和更新品种, 加快了百合的快速繁殖速度, 缩短了百合的生育周期。在百合杂交育种中也存在着基因库贫乏、种间杂交不亲和等局限性, 而组织培养中的胚培养、花药培养等技术则可克服这些弊端。因此, 利用组织培养百合是一种很有前途的方法。

1 外植体的准备

1.1 外植体的选择

百合的鳞片、鳞茎盘、珠芽、叶片、茎段、花器官各部位都能作外植体。用百合鳞片作外植体比较多, 但不同部位的鳞片对分化有差异, 不同外植体诱导分化的能力也不同, 罗凤霞等^[2] 研究认为, 新铁炮百合诱导分化的能力依次为种子 > 鳞片 > 花丝 > 花瓣 > 叶片。切割成 8mm 左右的小块或切段。

1.2 外植体灭菌

常用的药剂有乙醇、升汞、次氯酸钠及漂白粉等。将洗净的材料, 先用 70% 的酒精浸泡 10—60

s, 然后用饱和漂白粉上清液消毒 5 min 后, 再用 0.125% 升汞溶液消毒 5—10 min, 经无菌水漂洗 1 次后, 再用饱和漂白粉上清液消毒 10—20 min, 无菌水冲洗 6—7 次^[3,4], 即可按无菌操作切块(段)接种。

1.3 培养条件

温度 25 ± 2 ℃, 光照 800—1 200 lx, 每天 12 h 照明, 培养基 pH5.8 左右。

1.4 培养基

用琼脂固体培养基, 琼脂 7 g/L, 以改良 MS 培养基为基本培养基, 按培养目的不同添加不同浓度水平的各种植物激素。诱导和分化培养基, 附加白糖 30 g/L, 生根培养基附加白糖 20 g/L。

2 结果与分析

2.1 外植体诱导

2.1.1 不同激素及激素水平对鳞片诱导的影响

以改良 MS 为基本培养基, 再加不同量的 BA、NAA 及 KT, 配制成 5 种培养基(表 1)。选用 3 个不同品种的生长良好、长势相近的百合鳞茎球中层鳞片下下部, 经消毒切块接入 5 种培养基中, 观察其诱导情况, 并在 1 个月后统计。经观察各水平约 10d 鳞片切块上逐渐长出淡黄色颗粒状的愈伤组织, 20 d 后形成小鳞茎状的芽, 2—6 个芽聚生在一起形成芽丛, 30 d 后伸出绿叶分化成苗。从表 1 也可看出, 在高 NAA 低 BA 的培养基中, 易直接形成具根小鳞茎苗, 而不易分化不定芽; 在高 BA 低 NAA 的培养基中, 能形成大量颗粒状突起, 从中分化的芽多而无根, 可见 BA 有利于分化不定芽。同时, 适当增加一定量的 KT, 可以促进鳞片分化不定芽或小鳞茎的数量。比较 5

种培养基,可选用改良 MS+BA0.8 mg/l+NAA 0.3 mg/l+KT0.2 mg/l 培养基作为百合快速繁殖的诱导培养基,以培养大量具有分化能力的不定芽,其诱导率为 74.3 %。

表 1 不同激素成分对鳞片诱导的影响

培养基				平均每鳞片 分化芽数(个)	诱导率 (%)	根生长
MS	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	KT (mg/l)			
改良	0.5	0.3		3.91	52.8	少量毛状根
改良	0.5	0.8		3.25	42.1	毛状根较粗壮
改良	1.0	0.3		4.72	67.7	无
改良	0.8	0.3		4.68	65.2	无
改良	0.8	0.3	0.2	5.21	74.3	无

2.1.2 百合不同器官的诱导情况 选用 2 个优良品种和 1 个本地品种种球的鳞片、珠芽、鳞茎盘,以及其当年种植的未开花的茎段、花器官,在改良 MS+BA0.1—1mg/ l+NAA0.3 mg/l 的培养基上分别诱导,1 个月后观察其平均外殖体诱导率和平均分化芽数(表 2)。

表 2 百合不同器官的诱导分化情况

百合部位	平均诱导率 (%)	平均分化芽数 (个)
鳞片	60.4	4.4
茎段	79.6	6.1
花器官	82.5	5.6
鳞茎盘	23.1	5.8
珠芽	87.9	2.1

结果表明,百合各部位均可诱导分化,但其诱导率各不同,茎段、花器官及珠芽诱导率较高,而

鳞茎盘由于杂菌多,剥离鳞片后创口大,易使外殖体消毒杀菌不够而污染,或消毒药品遗害而失去生理活性,造成诱导率较低。从表 2 也可看出,茎段、花器官、鳞茎盘诱导分化的芽数较多,而且其分化能力较强。因此,在百合快速繁殖中,除百合种球是组培繁殖体系建立的最大来源外,百合茎段、花器官也是快速繁殖的一大繁殖母本。同时,由于百合花柱细长,不易自然授粉,通过人工授粉后的花器官组培和未授粉的花器官培养对产生百合新品种及保持母本优良特性有重大研究意义。

2.1.3 小鳞茎培养时间与继代培养增殖倍数比较 表 3 试验表明,继代培养以 30—45 d 为宜,太长时间,增殖倍数不仅不增加,切口反而变黑,影响进一步分化。而且培养物的分泌代谢物使培养基颜色变深,也进一步阻碍植物生长。

表 3 小鳞茎培养时间与继代培养增殖倍数比较

编号	接种数 (个)	培养时间 (d)	增殖倍数 (倍)	生长状况	培养基颜色
1	10	15	2.1	小鳞茎状突起	洁白
2	10	20	2.5	小鳞茎状突起	洁白
3	15	25	2.8	小鳞茎芽	洁白
4	10	30	3.2	小鳞茎芽	洁白
5	15	35	3.5	丛状小鳞茎芽	洁白
6	10	40	3.7	丛状小鳞茎芽、叶大	洁白
7	15	45	3.8	叶变黄	浅黄
8	10	50	3.8	叶变黄且芽基部有点黑	较黄

2.2 生根培养及移栽

2.2.1 生根培养 继代培养所分化的小鳞茎,接种在 MS+NAA0.5 mg/L 或 IBA0.5 mg/L 的培养基中,约 20 d 就可生根,35 d 后根生长完全,生根率达 98%。据袁芳亭^[9]研究麝香百合时发现,在生根培养基中再添加 10.0 mg/l 的多效唑有促进生根和壮苗的作用;同时他们认为当试管苗根长 1 cm 时移栽至珍珠岩基质中易成活。罗凤霞等^[2]认为,以不附加任何激素的 MS 培养基为新铁炮百合的最佳生根培养基,移栽基质以细河沙:草炭(2:1)为最好。

2.2.2 有菌条件下移栽生根 为了减少组培苗

培养程序,降低生产成本,选用 3 个品种,各 30 个无根绿豆大小的小鳞茎球移栽,约 20 d 后陆续生根,生根率 70%。同时,经实验观察,在移栽前的一次继代培养基中适当减少 BA 浓度,增加 NAA 浓度,有利于小鳞茎的生长,有菌条件下移栽生根成活率可提高至 82%。

2.2.3 不同季节百合移栽成活率 百合组培苗生根后,在 1 年中不同季节移栽在黄心土:沙=6:4 的基质上,3 个月后统计成活率,发现春季移栽成活率最高为 91.6%;秋季移栽成活率次之,为 78.2%;冬季则为 50.7%;而夏季移栽成活率最低为 35.4%。

3 百合种质资源离体保存

百合离体保存包括冷冻保存和低温贮藏两种方法。中国农业科学院作物品种资源所将诱导出的1.5—2.0 cm高的组培苗转入16—18℃、光照1 000 lx、8 h的低温种质库冷冻保存,结果表明附加2%甘露醇的MS培养基离体保存百合种质效果最好,一年后的存活率高达92.9%^[10]。CPRO—DLO(荷兰农科院植物育种繁殖研究中心)将百合活体在-2℃条件下贮存了3 a,仍未丧失活力^[11]。

4 百合组织培养技术与育种

4.1 胚培养与杂交育种

在百合杂交育种工作中,由于百合不同种之间的杂交为远缘杂交,常有杂种胚发育不良或中途败育现象,为防止杂交胚与母体胚乳间的不亲和性,克服受精后的障碍,可以利用百合幼胚进行离体培养。在百合幼胚离体培养中,6-BA对胚真叶的分化有抑制作用^[5]。王亚斌等^[12]利用百合品种间杂交获得的胚龄为30—50 d的种胚进行组织培养研究发现,pH值对百合幼胚的萌发及成苗有一定的影响,以pH值5.0为最好;培养基中加入氨基酸的幼胚萌发率及苗生长情况均比对照好,排列顺序为:谷氨酰胺>肌醇>谷氨酸>水解酪蛋白>水解乳蛋白>对照,其中加入肌醇的培养基萌发率为93.75%,加入谷氨酰胺的培养基苗分生好,苗生长状况最好。加入维生素类物质和加入活性炭对胚的影响不大。授粉后35 d胚龄的铁炮百合幼胚,当培养基中蔗糖含量为6%—8%时,最有利于它的胚性生长;在其愈伤组织的诱导中,2,4-D、NAA、BA都可以诱导愈伤组织的产生,但以0.1 mg/l NAA和1.0 mg/l的BA单独或混合使用,诱导的愈伤组织分化不定芽的频率较高^[8]。黄济明等^[13]将开红花的矮生玫红百合(*L. amoenum*)与王百合(*L. regale*)、麝香百合进行杂交后,用幼胚离体培养法获得了王百合×玫红百合杂种F₁和麝香百合×玫红百合杂种F₁。通过染色体组型分析确认了杂种的真实性,前者杂种F₁花朵为粉红色、株矮,可供盆栽,花粉不育。后者杂种F₁花色淡粉红,诱导成多倍体后花粉可育。

4.2 花药培养与单倍体育种

在百合的花药培养方面,最早获得成功的是Sharp等^[6],他们用麝香百合的花药培养获得了单倍体植株,在N6培养基上,冷处理过的麝香百

合早、中期单核小孢子经过暗培养均产生了愈伤组织,其中单倍体和二倍体细胞均有。在亚洲百合杂种系‘Connecticut King’的花粉培养中,17.6%的中、晚期单核小孢子也产生了愈伤组织,根尖染色体鉴定表明有5/11为单倍体植株。为了得到纯粹的配子体起源的愈伤组织,CPRO—DLO离体培养亚洲百合杂种系品种‘Whiloto’的花粉粒,诱导出了多核小孢子的雄核发育^[14]。但在百合花药愈伤组织诱导中存在着基因型差异,这在褚云霞等用4个亚洲百合杂种系品种、1个麝香百合杂种系品种、1个东方百合杂种系品种的研究中得到了证实^[7]。经过多年的研究,百合的组织培养技术已较成熟,并开始在百合育种、遗传转化中广泛使用。目前正在开展百合的转基因研究,将抗干旱、抗盐碱基因导入百合,旨在获得抗干旱、抗盐碱的转基因百合。

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]罗凤霞,徐桂华,金丽丽,等.新铁炮百合微繁的研究[J].沈阳农业大学学报,2000,31(3):254-257.
- [3]卢其能.龙牙百合的组织培养和快速繁殖研究[J].江西农业学报,2002,14(4):43-46.
- [4]赵祥云,程谦,邢尤美,等.百合珠芽组培及脱毒研究[J].
- [5]张方,马宪红,丁冰,等.毛百合的胚培养[J].东北林业大学学报,1997,25(1):26-28.
- [6]SHARP W R, RASHIN R S, SOMMER H E. Haploid in *L. ili2um*[J]. *Phytomorphology*, 1971, (21): 331-337.
- [7]褚云霞,张永春,杨红娟,等.百合花药愈伤组织诱导中的基因型差异[J].上海农业学报,2002,18(3):17-20.
- [8]于晓英,吴铁明,倪沛,等.百合幼胚的离体培养和植株再生[J].湖南农业大学学报,2000,26(4):286-288.
- [9]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.
- [10]辛淑英,谢欣.甘露醇浓度对百合种质离体保存的影响[J].作物品种资源,1995,(3):50-52.
- [11]VAN TU YL J M, VAN HOLSTEIJN H C M. Lily breeding research in the Netherlands[J]. *Acta Hort*. 1996, 414:35-45.
- [12]王亚斌,杨国锋,安俊学,等.百合幼胚离体培养的研究[J].沈阳农业大学学报,2002,33(4):249-251.
- [13]黄济明,赵晓艺,张国民,等.玫红百合为亲本育成百合种间杂种[J].园艺学报,1990,17(2):153-156.
- [14]VAN DEN BUL K R W, VAN TU YL J M. DON S J J M. For2mation of multinucleate lily microspores in culture [J]. *Acta Hort*. 1992,325:649-654.