

麝香百合子房离体培养的研究

赵珺¹, 宋阳², 雷家军¹

(1. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁林业职业技术学院园林系, 辽宁 沈阳 110101)

摘要:以麝香百合杂种系品种罗瑞拉(Lorina)的子房为试材,研究了外植体不同消毒方式、不同激素种类及其浓度、黑暗条件对离体培养的影响。结果表明:由于花瓣的包被,对花蕾不消毒也可达到百合子房离体培养的有效消毒效果。最佳愈伤组织诱导培养基为MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,最佳分化培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L。黑暗条件下培养180 d后转入光照条件下培养可提高愈伤组织诱导率与分化率,并可有效防止外植体的褐化。

关键词:麝香百合;子房;组织培养

中图分类号:S682.2

文献标识码:A

麝香百合(*Lilium longiflorum*)又名铁炮百合,是三大栽培百合杂交系之一,生产上常采用分球和鳞片扦插繁殖,具有速度较慢、品种易退化等缺点^[1]。植物组织培养方法既可以达到快速繁殖的目的,又可以脱去病毒,还可以与基因工程相结合,为植物育种提供新方法。目前,百合的许多器官和组织都已用组织培养方法诱导成苗,如花柱、叶片、珠芽、鳞片、鳞茎盘等^[2~4]。谷祝平等(1982)以兰州地区的大卫百合未授粉子房为外植体,诱导出了植株,并发现了单倍体,认为是一种比花药培养诱导单倍体更有效的方法^[5]。日本学者(1990)选用授粉20 d后的子房进行培养得到了杂交后代,可见子房培养还可以辅助杂交育种^[6]。许宝辉(2003)以岷江百合的子房为材料诱导出了大量植株,认为是一种很好的快繁方法^[7]。本试验于2005~2006年对麝香百合的子房进行离体培养研究,旨在探讨麝香百合子房离体培养条件下影响愈伤组织诱导与分化的各种因素,为麝香百合子房离体培养诱导成苗寻找有效方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验以沈阳农业大学观赏园艺试验基地的麝香百合品种罗瑞拉(*Lilium longiflorum* cv. *lorina*)为试材,采用卡宝品红染色鉴定花粉发育时期,选用小孢子发育单核期的子房进行离体培养。

1.2 试验方法

采取处于小孢子单核期的未授粉百合花蕾,自来水冲洗0.5 h。用三种消毒方法:(1)用70%酒精擦洗花蕾表面;(2)用70%酒精浸泡30 s,再用0.1%升汞消毒7 min,无菌水冲洗5遍;(3)不进行消毒处理作为对照(CK)。去除花瓣、花药、花丝、花柱,将子房接种于附加不同浓度BA、2,4-D的MS培养基进行诱导,分化培养基中附加不

同浓度的BA、2,4-D和NAA。蔗糖3%,琼脂0.65%,pH 5.8。用三种培养条件:(1)光培养,光照16 h/d,光强2 000~3 000 lx;(2)暗培养,完全不加光照;(3)先暗培养180 d后转入光下培养,光照16 h/d,光强2 000~3 000 lx。培养室温度均为24~26℃。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法对麝香百合子房培养污染的影响

本试验对麝香百合花蕾采用了3种方法消毒并比较其对子房培养污染率的影响。从表1中可以看出,花蕾在70%酒精中浸泡30 s后用0.1%升汞消毒7 min的消毒方法最好,污染率仅为8.3%,但不消毒与只用70%酒精擦洗花蕾表面的两种方法污染率也不高,且与第一种消毒效果差异不显著。所以,从方便高效的角度考虑,麝香百合花蕾不消毒也可同样达到子房离体培养有效的消毒效果。

2.2 不同种类和浓度的生长激素对麝香百合子房培养愈伤组织诱导与分化的影响

2.2.1 不同种类和浓度的生长激素对愈伤组织诱导的影响

百合子房离体培养7 d后开始膨大,49 d后开始出现愈伤组织。从表2中可以看出,不同种类和浓度的生长激素对子房离体培养诱导愈伤组织的影响不同,MS+2,4-D 0.5+BA 1.0培养基上愈伤组织诱导率最高,达92.9%,MS+2,4-D 0.5+BA 2.0的培养基愈伤组织诱导率最低为55.6%。

2.2.2 不同激素种类及浓度对愈伤组织分化的影响

麝香百合子房离体培养210 d后,愈伤组织上开始有深绿色的芽点出现,转入分化培养基中培养60 d后,芽点处分化出苗。从表3中可以看出,愈伤组织分化率因生长激素的种类和浓度不同而不同,MS+NAA 0.3+BA

1.5培养基上愈伤组织分化率高达 33.3%,而 MS+2,4-D 1.0+BA 1.0 上仅为 13.3%。

2.3 暗培养对麝香百合子房培养的影响

2.3.1 暗培养对子房培养愈伤组织诱导与分化的影响

暗培养使膨大的子房与诱导出的愈伤组织发白,并且对子房愈伤组织产生速率有降低的作用。采用 MS+2,4-D 0.5+BA 1.0 培养基进行对比试验,将暗培养 180 d 的子房转入光下培养,发现原来发白的愈伤组织迅速转绿并分化出芽,未出愈的发白子房在转绿的同时也迅速长出愈伤组织。从表 4 中还可以看出,这种培养方法的愈伤组织诱导率高达 94.4%,而持续暗培养与光培养的愈伤组织诱导率仅为 66.7%和 74.0%,可见暗培养可降低子房离体培养愈伤组织的诱导与分化速率。

麝香百合子房离体培养诱导出的愈伤组织在持续暗

培养中分化率很低,为 1.4%,并且苗发白、水浸状,并在培养 60 d 后死亡。而光培养的愈伤组织虽然不断增殖,但分化率仅为 16.7,而暗培养 180 d 后又置于光下培养的愈伤组织不仅增殖的速度快且分化率高达 65.0%(表 5)。

2.3.2 黑暗培养对子房培养褐化的影响

虽然暗培养能降低子房培养愈伤组织的诱导与分化速率,但同时也可降低离体培养下子房的褐化率,当将暗培养 180 d 后的麝香百合子房转置光下培养后,发白的愈伤组织会迅速变绿,没有产生愈伤组织的子房也开始转绿并长出愈伤组织。而持续暗培养的子房与愈伤组织继续发白,水浸状,直至死亡。光培养的子房褐化率最高,为 26.0%,持续暗培养的褐化率虽然为 0,但是子房的成活率也为 0。相比之下,将暗培养 180 d 后的子房转入光下培养褐化率最低,并且成活率也最高(表 6)。

表 1 不同消毒方法对污染的影响
Table 1 Effect of different sterilization ways on contamination

消毒方法 Ways of sterilization	接种子房个数(个) No. of ovaries inoculated	污染子房个数(个) No. of ovaries contaminated	污染率(%) Percentage of contamination
70%酒精擦洗花蕾表面	35	3	8.6
70%酒精 30 s+0.1%升汞 7 min	48	4	8.3
不消毒(CK)	22	2	9.1

表 2 不同激素种类及浓度对愈伤组织诱导的影响
Table 2 Effect of different kinds and concentrations of hormones on callus induction

激素种类和浓度(mg/L) Kinds and concentration of hormones(mg/L)	接种子房个数(个) No. of ovaries inoculated	产生愈伤组织子房数(个) No. of calli induced	愈伤组织诱导率(%) Percentage of induction
2,4-D0.5+BA1.0	42	39	92.9
2,4-D1.0+BA1.0	36	24	66.7
2,4-D0.5+BA2.0	36	20	55.6
2,4-D1.0+BA2.0	39	33	84.6

表 3 不同种类和浓度的生长激素对愈伤组织分化率的影响
Table 3 Effect of different kinds and concentrations of hormones on callus differentiation

激素种类和浓度(mg/L) Kinds and concentration of hormones(mg/L)	接种愈伤组织数(块) No. of calli inoculated	分化愈伤组织数(块) No. of calli differentiated	愈伤组织分化率(%) Percentage of differentiation
2,4-D0.5+BA1.0	78	13	16.7
2,4-D1.0+BA1.0	60	8	13.3
2,4-D0.5+BA2.0	55	8	14.5
2,4-D1.0+BA2.0	42	4	9.5
NAA0.5+BA0.5	100	18	18.0
NAA0.4+BA1.0	135	23	17.0
NAA0.3+BA1.5	90	30	33.3
NAA0.2+BA0.5	90	16	17.8

表 4 暗培养对愈伤组织诱导的影响
Table 4 Effect of dark on callus induction

培养条件 Condition of culture	接种子房数(个) No. of ovaries inoculated	产生愈伤组织子房数(个) No. of calli produced	愈伤组织诱导率(%) Percentage of induction
光培养	50	37	74.0
暗培养	21	14	66.7
暗培养 180 d 后转入光培养	18	17	94.4

表5 暗培养对愈伤组织分化的影响
Table 5 Effect of dark on callus differentiation

培养条件 Condition of culture	接种愈伤组织数(块) No. of calli inoculated	分化愈伤组织数(块) No. of calli differentiated	愈伤组织分化率(%) Percentage of differentiation
光培养	78	13	16.7
暗培养	42	6	1.4
暗培养 180 d 后转入光培养	40	26	65.0

表6 暗培养对子房褐化的影响
Table 6 Effect of dark on callus browning

培养条件 Condition of culture	接种子房数(个) No. of ovaries inoculated	褐化子房数(个) No. of ovaries browning	褐化率(%) Percentage of browning	成活率(%) Percentage of survival
光培养	50	13	26.0	74.0
暗培养	21	0	0.0	0.0
暗培养 180 d 后转入光培养	18	1	5.6	94.4

3 讨论

3.1 关于子房培养的选材与外植体消毒

20 世纪 80 年代初,国内外学者进行了大量的植物未受精子房的组织培养研究,在小麦和烟草(祝仲纯,1979)^[8]、水稻(周嫦,1980)^[9]、玉米(敖光明,1982)^[10]、百合和青稞(谷祝平,1982,1984)^[5,11]都选用花粉发育在单核晚期的子房进行培养并都首次获得了单倍体植株。本试验也选用了麝香百合花粉发育单核期的子房进行培养,从诱导出的植株形态上观察,发现有很多与正常二倍体植株不同的植株,但是否有单倍体植株有待于进一步研究。

在对外植体的消毒方面,消毒剂的种类和消毒时间对外植体的接种成功有明显的影响,本试验中,对麝香百合的花蕾消毒与否对污染率的影响并不大,可能是百合花蕾在小孢子单核期时花蕾还未开裂,这样花蕾内部的花药与子房都未接触到外界带菌介质,所以即使不对材料消毒,只要在接种时小心拨开花蕾取出子房,就能做到污染率很低,并且这种方法还可以大大提高工作效率。

3.2 关于子房培养的诱导与分化

麝香百合子房培养的成苗时间比较长,基本需要一年的时间才能从幼小的子房培育成正常的植株,不同种类和浓度的生长激素对子房离体培养愈伤组织的诱导与分化影响不同,2,4-D 与 BA 的适宜组合可提高愈伤组织的诱导率,而 NAA 与 BA 的搭配组合比 2,4-D 与 BA 的搭配对促进愈伤组织的分化效果更好。子房诱导出的愈伤组织大多不紧实,松软黄绿色,且长时间不分化,所以即使愈伤

组织诱导率很高(92.9%),但分化率却很低(33.3%)。黑暗条件可有效的降低麝香百合子房的褐化,使愈伤组织变紧实,但持续黑暗培养可导致愈伤组织发白水浸状而不分化成苗,所以要及时将黑暗培养的愈伤组织移至光下培养,可大大提高愈伤组织分化率。

参考文献:

- [1] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1997.290~297.
- [2] 杨增海.园艺植物组织培养[M].北京:农业出版社,1987.
- [3] 徐文兴,金国良,潘荷娟.百合组织培养两次成苗[J].植物生理学通讯,1988,(3):57.
- [4] 王爱勤,周歧伟,何龙飞,等.百合试管结鳞茎的研究[J].广西农业生物科学,1998,17(1):71~75.
- [5] 谷祝平,郑国钊.百合未传粉子房的培养及其胚胎学观察[J].植物学报,1983,25(1):24~28.
- [6] 李思义.百合子房培养胚培养及杂种鉴定[J].上海蔬菜,1996,(2):35~37.
- [7] 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.
- [8] 祝仲纯,吴海珊.从未授粉的小麦及烟草子房培养出单倍体植株[J].遗传学报,1979,6(2):181~182.
- [9] 周嫦,杨弘远.从水稻未授粉的幼嫩子房培养出单倍体小植株[J].遗传学报,1980,7(3):287~288.
- [10] 敖光明,赵世绪,李广华.从未授粉的玉米子房培养出单倍体植株[J].遗传学报,1982,9(4):281~282.
- [11] 谷祝平,郑国钊.从未授粉的青稞子房培养出单倍体植株[J].植物学报,1984,26(5):549~551.

Study on Ovary Culture in vitro of *Lilium longiflorum*

ZHAO Jun¹, SONG Yang², LEI Jia-jun¹

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University Shenyang, Liaoning 110161; 2. Department of landscape gardening, Liaoning Forestry Vocation-technical College, Shenyang, Liaoning 110101)

Abstract: The ovaries of *Lilium longiflorum* cv. *Lorina* were used to study the effects of the different sterilization ways, different kinds and concentration of hormones, and dark condition on culture in vitro. As the results, not sterilizing also could achieve the effective sterilization effect. The optimum medium of callus induction was MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L, and the optimum medium of differentiation was MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L. After the ovaries were cultured in dark for 180 days and followed by in light, the callus induction and differentiation could be enhanced, and the browning of explants could be reduced effectively.

Key words: *Lilium longiflorum*; Ovary; Tissue culture