

百合的组织培养

罗丽萍,杨柏云,章敏华,蔡奇英*

(南昌大学生命科学与食品工程学院,江西 南昌 330047)

摘要:目的 研究百合组培快繁的最佳途径 方法 在 MS培养基上添加不同的激素配比;采用鳞叶不同部位作为外植体;改变培养方式 结果 确定了外植体产生小鳞茎的最佳培养基为 MS+ NAA 0.5 mg/L+ GA₃ 2.0 mg/L;鳞叶的下部小块分化率最高,为 92.5%;小鳞茎叶脱分化形成愈伤组织后再分化可获得多而健壮的次级小鳞茎;次级小鳞茎采用液体振荡培养可快速增重 结论 采用组织培养方式可进行百合的快速繁殖,使百合种球的工厂化生产成为可能

关键词: 百合;组织培养;愈伤组织;液体振荡培养

中图分类号: R282.13 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)07-0640-03

Studies on tissue culture of *Lilium brownii* var. *viridulum*

LUO Li-ping, YANG Bai-yun, ZHANG Min-hua, CAI Qi-ying

(College of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang Jiangxi 330047, China)

Abstract **Object** To develop a best approach for the rapid propagation of *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker by tissue culture. **Methods** Different parts of the bulb were tried as the explant and cultured on different culture media with the additon of different portions of various hormones at various cultural conditions. **Results** The best medium for the culture of explant bulb was MS+ NAA 0.5 mg/L and GA₃ 2.0 mg/L and the highest induction rate was at the lowest part of the scale leaves, which attained 92.5%. The small bud can further differentiate to form secondary small buds. By liquid-quivering culturing, the weight increase can be accelerated. **Conclusion** Tissue culture of *L. brownii* var. *viridulum* can achieve its rapid propagation, resulting in the possibility for its industrial production.

Key words *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker; tissue culture; callus; liquid-quivering culture

百合 *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker为百合科百合属多年生草本植物,原产亚洲 其药用部分是干燥肉质鳞叶,具有润肺、健胃、止咳、促进血液循环等功效 百合的来源除野生外,也进行人工栽培

百合为秋植,次年夏季采收,生产中一直存在繁殖周期长、系数低、种球供应困难且价格贵,造成生产成本过高、市场风险大等问题,极大地阻碍了百合的大面积推广 采用组织培养方法,可快速获得大批量遗传稳定的种球,实现种苗工厂化生产,提高百合生产水平

1 实验材料

百合鳞茎由江西万载县提供

2 实验方法

2.1 鳞叶诱导小鳞茎的实验:取贮藏在冰箱中的鳞

茎,去泥沙和腐烂部位,自来水充分冲洗,分取鳞叶,洗衣粉浸泡 2 h,流水冲洗 1 h,75%酒精浸泡 1 min,0.1%升汞处理 10 min,无菌水冲洗 4次待用

在超净工作台上,将鳞叶切成 0.5~1.0 cm²的小块,然后随机接种于试管内,每组 20支,每支 1块 置于组织培养室中培养,培养条件为:温度 (25±2)℃,光照强度 3 000 lx,光周期 12 h/d光照+ 12 h/d黑暗(下同)

本实验以 MS为基本培养基,通过附加不同浓度的 NAA、GA₃和 6-BA设计了 10组培养基 具体编号、成分及实验结果见表 1

2.2 鳞叶的不同部位诱导小鳞茎能力的实验:本实验按培养材料来源不同设 3个处理,将百合鳞叶依照上述方法消毒后,将同一鳞叶按上、中、下 3个部位切割,分别接种,每一处理 10瓶,每瓶接 5片 统一采用

* 收稿日期: 2000-08-02

基金项目:江西省一级重点研究项目

作者简介:罗丽萍(1972-),女,讲师,四川宜宾人 1995-09~1998-07就学于南昌大学植物学专业,获理学硕士学位 一直从事植物组织培养方面的研究

MS+ NAA 0.5 mg /L+ GA₃ 2.0 mg /L培养基
2.3 小鳞茎叶直接分化出次级小鳞茎的实验: 将上述实验诱导出的小鳞茎在无菌条件下分取鳞叶,所得为小鳞茎叶(诱导小鳞茎叶分化形成的鳞茎为次级小鳞茎)^[2]。小鳞茎叶不经切割,直接随机接种。

本实验以 MS为基本培养基,选择 5种不同的 6-BA GA₃和 NAA浓度配比(见表 2),每种培养基接 10瓶,每瓶 5片。

2.4 小鳞茎叶经愈伤组织途径分化次级小鳞茎的实验: 采用 MS固体培养基, 6-BA都定为 1.0 mg /L,通过改变 2, 4-D浓度来研究小鳞茎叶产生愈伤组织的最佳培养基, 2, 4-D浓度依次为 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 mg /L。接种方法同 2.3

2.5 培养基状态对次级小鳞茎增殖作用的实验: 选择固体和液体二种状态作为次级小鳞茎的增殖培养基,培养基成分: MS+ BA 1.0 mg /L+ 2, 4-D 0.5 mg /L+ NAA 0.2 mg /L,蔗糖加至 8%,用 100 mL锥形瓶分装,每瓶 25 mL(液体)和 30 mL(固体)。每

表 1 几组从鳞叶诱导小鳞茎的培养基及诱导结果

编号	NAA (mg /L)	GA ₃ (mg /L)	6-BA (mg /L)	接种数	污染数	诱导数	诱导率 (%)	分化鳞叶上的平均小鳞茎数
1	0	0	0	20	4	3	18.75	1.3
2	0.5	0	0	20	3	5	29.41	1.8
3	0.5	0.5	0	20	5	5	33.33	2.1
4	0.5	1.0	0	20	2	8	44.44	2.8
5	0.5	2.0	0	20	3	11	64.70	3.5
6	0.5	3.0	0	20	6	9	64.28	3.2
7	0.5	0	0.5	20	2	5	27.78	1.7
8	0.5	0	1.0	20	3	7	41.78	2.3
9	0.5	0	2.0	20	4	9	56.25	3.3
10	0.5	0	3.0	20	5	8	53.33	3.0

小,诱导率仅为 18. 0%,且产生小鳞茎数少;当培养基中存在 NAA 6-BA和 GA₃时,诱导作用明显加强,小鳞茎数目增加。当 NAA固定为 0.5 mg /L, GA₃浓度逐步提高时,诱导率和小鳞茎数逐渐升高,但当 GA₃达 2.0 mg /L后,其升高幅度开始趋缓, GA₃为 2.0, 3.0 mg /L时,诱导效果没有明显差异。固定 NAA, 6-BA逐渐提高时也呈现相似趋势, 6-BA为 2.0 mg /L时,诱导作用趋于稳定。诱导率和小鳞茎数的最高值都出现在 GA₃为 2.0 mg /L的处理中。因此认为,加入激素对小鳞茎的诱导是必要的,在一定范围内,高的激素浓度促进鳞叶分化,但过高时,促进作用减弱,且有可能造成遗传变异。所以选择促进百合鳞叶诱导小鳞茎的最佳培养基为: MS+ NAA 0.5 mg /L+ GA₃ 2.0 mg /L。

3.2 鳞叶不同部位对小鳞茎诱导的影响: 培养 60d后统计,结果见表 2

一处理 10瓶,每瓶接 5个初始状态一致的次级小鳞茎。液体振荡培养光照、温度同上,转速 100 r /min培养 30 d后,电子天平称重和统计数目,按下列公式进行统计分析。

$$\Delta \overline{W} = \Delta W / n = (EW_2 - EW_1) / n$$

其中: $\Delta \overline{W}$ 为平均每瓶增重; ΔW 为总增重; EW_1 为接种后的初始重总和; EW_2 为培养 30 d后的重量总和; n 为参与统计瓶数(即: 接种瓶数与污染瓶数之差)。

3 实验结果与讨论

3.1 NAA GA₃和 6-BA不同浓度对比对鳞叶诱导小鳞茎的影响: 培养 8 d后,从外植体近轴面基部出现启动迹象,形成一些淡绿色小突起;随着培养时间延长,小突起增大为鳞茎样,进一步膨大成小鳞茎,为绿色带褐斑,簇生,形状较规则,每个小块产生数目不一,少的 1~ 2个,多的可达 5~ 6个。第 60天进行统计,结果见表 1。

由表 1可知,无激素的 MS培养基诱导作用最

表 2 鳞叶不同部位的诱导率

部位	接种数	污染数	诱导数	诱导率 (%)
上	50	5	3	6.0
中	50	10	8	20.0
下	50	10	37	92.5

从表 2可知,同样在最佳培养基上,鳞叶不同部位的诱导率差异极大,其中鳞叶下部诱导率最高,为 92. 5%,中部次之,为 20. 0%,上部最小,为 6. 0%,这和鳞叶扦插时小鳞茎发生都集中在鳞叶近轴面基部是一致的^[3]。分析原因有可能是同一鳞叶不同部位细胞的内源激素水平不同,或是不同部位细胞的生理特性不同^[4]或是不同部位细胞所含的营养物质不同。处于鳞叶下部的细胞内源激素水平高,贮藏的营养物质丰富,在同样条件下,更易诱导出小鳞茎。由于上部材料诱导率太低,造成人力、培养基和空间的浪费,建议在以后大量生产时,鳞叶上部不

用,或不与中部分离,以较大块材料接种,以充分利用其贮藏营养。

3.3 不同激素组合与浓度对次级小鳞茎诱导与生长

表 3 5种培养基上次级小鳞茎的诱导与生长状态

编号	6-BA (mg /L)	G A ₃ (mg /L)	N A A (mg /L)	接种数	污染数	诱导数	诱导率 (%)	平均次级小鳞茎数
A	2.0	1.0	0	50	2	16	33.3	1.30
B	2.0	2.0	0	50	4	22	47.8	2.41
C	2.0	3.0	0	50	4	30	65.2	2.97
D	2.0	0	0.5	50	2	27	56.2	3.33
E	2.0	0	1.0	50	2	28	58.3	3.05

从表 3可知,小鳞茎叶的诱导率以 C最高,为 65.2%,所以最适分化培养基为 MS+ 6-BA 2.0 mg/L+ GA₃ 3.0 mg/L。从小鳞茎叶分化成淡绿色的次级小鳞茎约需 40~ 45 d。D培养基上诱导率为 56.2%,但长势很好,次级小鳞茎数目也多于其他,且生长最快。说明小鳞茎叶最适分化条件和生长条件稍有差异,D的诱导率不及 C,但长势优于 C,所以在生产中,应根据培养目的和实际情况选择培养基类型。

由于小鳞茎叶是直接分瓣,未经切割,所以它的次级小鳞茎实际上全部来自鳞叶下部。本实验中,小鳞茎叶的最高诱导率为 65.2%,这与表 2中最高诱导率为 95.2%相差很大。这可能是由于经外植体分化来的小鳞茎细胞内源激素水平下降,分化能力减弱造成的;也可能是小鳞茎内所含的贮藏物质减少所致,可对这方面进一步进行探讨。

3.4 2,4-D对小鳞茎叶产生愈伤组织的影响:小鳞茎叶接种后,基部出现淡黄色突起,有的直接分化成次生小鳞茎;有的膨大成无特定形态结构。颜色为淡黄绿色、表面呈瘤状突起的愈伤组织状。愈伤组织状结构在 35~ 40 d以后,表面形态开始发生变化,一些瘤状突起分化为次级小鳞茎,一般可出现 3~ 5个,多的可达 10个,其中仅 2~ 3个较健壮,其余都较弱小。75 d后统计,结果见表 4。

表 4 2,4-D对小鳞茎叶愈伤组织的诱导

2,4-D浓度 (mg /L)	接种数	污染数	产生愈伤组织 的小鳞茎叶	愈伤组织 诱导率 (%)
0	50	0	0	0
0.5	50	2	0	0
1.0	50	1	0	0
1.5	50	1	5	10.2
2.0	50	0	14	28.0
3.0	50	3	31	65.9
4.0	50	2	30	62.5

从上可知,百合愈伤组织只有在 2,4-D浓度大于 1.5 mg/L才发生,随 2,4-D浓度增加,愈伤组织

的影响:小鳞茎叶在 5种培养基上培养 7 d,在部分小鳞茎叶近轴面基部能诱导出多个淡黄色小突起,小突起可发育为次级小鳞茎;50 d后统计,结果见表 3。

诱导率升高,当 2,4-D达 3.0 mg/L时,诱导效果趋于稳定,所以以 MS+ 6-BA 1.0 mg/L+ 2,4-D 3.0 mg/L较好。与其他植物相比,百合愈伤组织诱导要求的外源激素水平较高。观察其生长动态类似兰花的原球茎发生,经该途径再生次级小鳞茎的繁殖系数一般为 5,高于表 3中的 3.33,且所得鳞茎更大,如果对其它弱小者经液体振荡培养能快速增殖,则这种类原茎球途径是百合快繁的一种较佳途径。

2.5 培养基状态对次级小鳞茎增殖的影响:培养 30 d后统计,结果见表 5。

表 5 培养基状态对次级小鳞茎增殖的影响 (g)

培养基状态	E W ₁	E W ₂	△ W	n(瓶)	△ W
固体	603.9	612.0	8.1	9	0.9
液体	422.1	449.9	27.8	7	3.97

从表 5可知,液体振荡培养对次级小鳞茎的增殖效果明显优于固体培养,平均每瓶增重 3.97 g,是固体培养基上的 4.4倍。分析原因是:1)液体培养时,培养基处于流动状态,养分可以充分利用,而固体培养基的养分交换缓慢,利用率相对较低;2)振荡培养使培养物分泌的一些物质能迅速地分散到培养基中,而不是集中在培养物的四周,使细胞代谢更活跃,分裂速度比固体培养基上更快。但液体振荡培养污染率为 30%,高于固体培养的 10%,且多为细菌性污染,重复一次后,污染情况未改观。原因主要是:百合鳞茎长期生活在土壤中,体内存在内生菌,一般情况下不表现,而当细胞代谢活跃,养分供应充分时,内生菌被激活,造成细菌性污染。所以,采用液体振荡培养应注意筛选无菌系,也可以考虑用抗生素来加以控制。

参考文献:

[1] 吴国芳,冯志坚,马炜梁,等.植物学[M].北京:高等教育出版社,1994.
[2] 俞新大,张国富,李建萍,等.细胞工程[M].北京:科学普及出版社,1988.
[3] 哈特曼,D.E凯斯特.植物繁殖原理与技术[M].北京:中国林业出版社,1981.
[4] 屈姝存,刘选明,周朴华,等.百合鳞片细胞形态发生中生理生化特性研究[J].生命科学研究,1988,2(4): 288-294.