

马可波罗百合的组织培养和离体快繁

丁 兰, 赵庆芳, 刘瑞梅

(西北师范大学生命科学学院, 甘肃兰州 730070)

摘 要: 以马可波罗百合的鳞片、茎段和茎尖为外植体, 成功建立了快速无性繁殖系。诱导鳞片产生丛芽的最佳培养基为: MS+0.3~0.8 mg/L BA+0.05 mg/L NAA; 茎尖的最佳诱导培养基为: MS+2 mg/L BA+0.05 mg/L NAA; 茎段的最佳诱导培养基为: MS+0.8 mg/L BA+0.1 mg/L NAA。丛芽增殖培养基: MS+0.2 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 和 MS+0.2 mg/L BA+0.1 mg/L IAA。生根诱导最佳培养基为 1/2 MS+0.2 mg/L KT+0.05~0.5 mg/L NAA。

关键词: 马可波罗百合; 组织培养; 无性繁殖系; 激素

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)01-0037-03

Study on tissue culture and propagation of Maroco polo *in vitro*

DING Lan, ZHAO Qing-fang, LIU Rui-mei

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The clone propagation of Maroco polo is developed through culture of scales and stems *in vitro*. Induction medium of shoots are MS+0.3~0.8 mg/L BA+0.05 mg/L NAA, MS+0.8 mg/L BA+0.1 mg/L NAA and MS+2 mg/L BA+0.05 mg/L NAA. Proliferation medium are MS+0.2 mg/L BA+0.1 mg/L NAA and MS+0.2 mg/L BA+0.1 mg/L IAA. Induction of roots are better in medium of 1/2 MS+0.2 mg/L KT+0.05~0.5 mg/L NAA active charcoal.

Key words: Maroco polo; tissue culture; clonal; phytohormone

百合(*Lilium*)为百合科(Liliaceae)的多年生草本植物, 根据用途可分为药用百合、食用百合和观赏百合, 对其研究报道涉及到离体快繁、脱毒复壮、单倍体培养、细胞遗传研究等诸多方面(丁兰等, 2002; 王红霞等, 2000; 陈小兰等, 2000; 黄敏玲等, 1988, 1993; 杨承德等, 1988; 谷祝平等, 1982, 1983; 贾敬芬等, 1981)。

本研究选用马可波罗百合, 属东方百合系, 由天香百合(*L. auratum* Lindl.)、药用百合(*L. speciosum* Thunb.)百合品种杂交获得的著名百合品系, 花硕大, 白色, 花香幽雅。目前国内主要通过进口种球进

行繁殖, 由于分株繁殖系数低, 不能满足市场需要。加之进口百合种球由于长期营养繁殖, 已有病毒积累, 引种两年后, 品质开始下降, 花色变淡, 花冠变小, 不形成花蕾或形成畸形花蕾, 影响其观赏价值和经济价值。通过组织培养技术的手段, 可有效解决以上问题, 不但在短期内能获得大量种苗, 还可以通过茎尖脱毒技术得到品质优良的脱毒苗。

本实验以马可波罗百合鳞片、茎段、茎尖为材料, 成功建立了快速无性系, 对其芽的诱导、增殖、生根及移栽进行了较深入的研究。探讨了不同激素浓度、培养基等因素对芽的生长、增殖及生根的影响,

收稿日期: 2002-12-31 修订日期: 2003-04-15

基金项目: 国家星火计划资助(2001A86005); 甘肃省计划委员会基金项目资助(5002/126)。

作者简介: 丁兰(1964-), 女, 四川德阳人, 博士生, 副教授, 主要从事植物细胞工程及天然产物研究。

为马可波罗百合种苗大规模生产及品种复壮提供了可靠的技术路线和理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

马可波罗百合(商品名:Maroco polo)由甘肃临洮新兴花卉公司提供。

1.2 实验方法

将百合的鳞片和茎段分离,挑选无病斑的材料,在洗涤剂水中用刷将材料上的泥土刷净。流水冲洗10~12 h后,在超净台上用75%乙醇消毒30~60 min,投入0.1%升汞溶液(滴加2~3滴吐温)中消毒14~17 min(大约5 min更换1次消毒液),最后用无菌水冲洗5~6次。将消毒好的鳞片横切成上、中、下三部分,约0.8 cm×0.8 cm方块,茎段切成长约1 cm小段,并将0.8~1 mm的茎尖分离出,接种于MS附加不同种类和浓度激素的培养基中进行初代培养。

1.3 培养条件

以MS培养基为基本培养,培养基的pH5.6,均用0.9%的琼脂固化。光照强度为2 000 lx;光照时间为12 h/d。培养温度为(23±2)℃。每组7~10个处理。

2 实验结果及讨论

2.1 鳞茎培养

2.1.1 鳞片不同部位的培养 将每个鳞片分切成上、中、下三段,接种培养基见表1。10 d后鳞片开始变绿,18 d后鳞片凹面出现白色突起,30 d后突起形成小芽或根。小芽长大后形成鳞茎,部分小芽基部有白根长出,并具有丰富的根毛。

实验结果表明,鳞片产生芽的能力从强到弱顺序为:鳞片基部(95%)、中部(36%)、上部(0)。其结果与杨成德等(1988)对兰州百合的实验结果一致,因此,鳞片基部近基盘处是初代进行芽诱导培养的最好外植体。

2.1.2 激素对鳞片产芽的影响 鳞片接种45 d后统计实验结果(表1),BA浓度在0.3~0.8 mg/L之间,NAA浓度与此相对应在0.05~1.0 mg/L之间对鳞片的诱导效果较好,诱导率为60%~66.7%,平均每个外植体上可诱导出4个以上的小芽;BA

浓度低于0.3 mg/L时,芽的诱导率不高,且每个外植体上新生芽数少;BA浓度在1.2 mg/L以上时,尽管诱导率较高,芽平均数也不低,但通过近5个月的观察表明,随着BA浓度的升高,芽的生长受到了抑制,表现为后期的小鳞茎数增多但芽的形态呈矮胖状,不长高。因此,3~8号培养基是较好的初代培养基,其中7号培养基最理想,不但诱导率高,而且平均每个外植体的新增芽数也多,诱导产生的小芽数也多,为11.5个。当NAA浓度比BA浓度高时,如3、4号培养基,诱导产生小芽的基部有2~5个白色小根,可一次成苗。

表 1 激素对鳞片产生芽的影响
Table 1 Effects of different phytohormone compositions on the buds formation

培养基号 No.	激素组合(mL/L) Phytohormone		芽诱导率 Inducing percentage (%)	新生芽平均数(个) The number of buds	生长状况 Growth status
	BA	NAA			
1	0.1	—	35	2	好,无根
2	0.1	0.1	45	2	好,无根
3	0.3	0.5	60	4.5	好,有根
4	0.3	1.0	65	5.0	好,有根
5	0.8	0.1	61	4.5	好,无根
6	0.8	0.05	67	5.0	好,无根
7	0.8	0.2	67	11.5	好,无根
8	0.8	0.5	67	5.5	好,无根
9	1.2	0.1	63	6.0	芽丛生生长慢
10	2.0	0.05	64	5	芽丛生生长慢

2.1.3 激素对芽增殖的影响 将初代培养基中诱导产生的2.0~4.0 cm小芽分别移入表2所列的培养基中,20 d后在芽的基部出现新生小芽,逐渐形成芽丛。60 d后统计实验结果(表2)。

表 2 激素对芽增殖的影响
Table 2 Effects of different phytohormone compositions on propagation of buds

培养基号 No.	激素(mL/L) Phytohormone			新增芽平均数 The number of buds(个)	生长状况 Growth status
	BA	NAA	IAA		
1	0.2	0.1	—	3.6	好
2	0.2	—	0.1	4.5	好
3	0.2	0.5	—	2.5	有根长出
4	0.5	0.05	—	2.2	好
5	0.5	0.5	—	1.8	有根长出
6	0.5	—	0.5	3.0	好
7	1.0	0.05	—	2.0	好
8	1.0	0.5	—	1.6	好

从初代可知,BA浓度过高将抑制芽的正常生

长,在继代培养中,我们选择了较低的浓度配比。表 2 的实验结果表明,在相同浓度的条件下 IAA 比 NAA 更利于芽的增殖,较高浓度的 NAA 利于根的生长。1、2、6 号培养基是较好的芽增殖培养基。观察表明,随 BA 浓度的增高,丛芽矮化明显。BA 浓度保持不变时,NAA 浓度增高,芽的增殖率降低,当 NAA 的相对浓度高于 BA 浓度时,丛芽基部出现了异常粗壮的根,当 BA 浓度达到 1.0 或高于 1.0 时,丛芽基部出现大量愈伤组织。由此可知,1、2 和

6 号培养基是较好的丛芽增殖培养基。
另外,观察发现低于 2.0 cm 或高于 5.0 cm 的芽移入继代培养基中,生长迟缓,不产生新芽,而芽高为 2.0~4 cm 的芽生长旺盛,产生丛芽数多,为较好的继代培养材料。
2.1.4 生根培养 将增殖培养基中已长至 5 cm 以上的丛芽切离成单芽后移入表 3 所列培养基中,15 d 后观察记录小芽的生根情况,新增小芽平均数为 60 d 后统计结果(表 3)。

表 3 激素对芽丛生根的影响
Table 3 Effect of different phytohormone composition on rooting of shoots

培养基号 No.	激素(mL/L)Phytohormone			生根率(%) Inducing percentage	生根平均数(个) The number of roots	新增小芽平均数(个) The number of buds
	KT	NAA	IAA			
1	0.2	0.05	—	100	12	3.0
2	0.2	0.5	—	100	9.3	2.3
3	0.5	0.5	—	100	8.0	1.0
4	1.0	0.5	—	100	8.0	1.0
5	—	0.1	0.1	100	3.0	0
6	—	1.0	1.0	100	2.0	0

实验结果表明,1~6 号培养基均对根有较好的诱导率(100%)。其中以 1~4 号培养基生根效果最好,其生根平均数达到 8~12 条,尤其是 1 号和 2 号,在生根培养的同时,生根苗基部可新增出带根的小鳞茎,平均芽数可达 3.0,可一次性成苗。简化培养步骤,降低培养成本。

另外,当 KT 浓度为 0.2 mg/L 时,百合小植株生长良好,形态与自然生长态一致,但随 KT 浓度逐渐增高,出现植株矮化及鳞片叶化的现象。因而 1、2 号为较理想的增殖及生根培养基,尽管增殖率较低(3 倍),但一次成苗既缩短了培养时间,又简化了培养程序、降低了成本。

2.2 茎尖培养

茎尖是进行脱毒的最佳首选材料。在解剖镜下分离出带 2 个叶原基的茎尖,接种于表 1 所列的培养基中,每瓶一个茎尖,8 周后统计实验结果。

实验表明,仅在 MS+2.0 mg/L BA+0.05 mg/L NAA 培养基上的茎尖有丛芽形成,诱导率 100%,芽丛平均数为 9.5 个。1~3 号培养基上的茎尖存活 4 周后死亡,4~8 号培养基中的茎尖只有膨大无分化。可见较高浓度的细胞分裂素利于茎尖的分化诱导及丛芽的形成。

将茎尖产生的丛芽分离,分别移入表 2 的 1~2 号培养基中;MS+0.2 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 和 MS+0.2 mg/L BA+0.1 mg/L IAA,增殖效果

理想。
将增殖培养基中已长至 5 cm 以上的丛芽切离后移入表 3 的 1~2 号培养基中;MS+0.2 mg/L KT+0.05 mg/L NAA 和 MS+0.2 mg/L KT+0.5 mg/L NAA,生根效果同样好。

2.3 茎段培养

将切成 1 cm 的带芽茎段接种于表 1 所列的培养基中,仅 MS+0.8 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 培养基上的茎段诱导成功,其它培养基中的茎段褐化严重。6 周后统计结果:诱导率为 66.7%,每个茎段可诱导出 5 个以上的芽,诱导出的芽在 MS+0.2 mg/L BA+0.1 mg/L IAA 培养基中增殖后,分离并移入培养基 MS+0.2 mg/L KT+0.05 mg/L NAA 和 MS+0.2 mg/L KT+0.5 mg/L NAA 中进行生根,其结果同茎尖培养。

2.4 试管苗移栽

在生根培养基中,待根长至 2~3 cm 时,开瓶炼苗 3 天后移入腐殖质土和珍珠岩之比为 1:1 的土中,保持 75%的湿度,50%的自然光,移栽成活率达 100%。

3 小 结

本实验以马可波罗百合的鳞茎、茎尖和茎段为
(下转第 80 页 Continue on page 80)

- Kong XS(孔祥生), Guo XP(郭秀璞), Zhang MX(张妙霞). 1999. Effect of cadmium stress on seedling growth and physiology chemistry of maize(镉胁迫对玉米幼苗生长及生理生化的影响)[J]. 华中农业大学学报, 18(2): 111—113.
- Lin DH(刘东华), Jiang WS(蒋梧生). 1995. Toxic effects of aluminium on plants(铝对植物的毒害)[J]. Chinese Bulletin of Botany(植物学通报), 12(1): 24—32.
- Luo GH(罗广华), Wang AG(王爱国), Shao CB(邵从本), et al. 1989. The damage to rice seedling under high concentration oxygen and protective enzymes of active oxygen(高浓度氧对水稻幼苗的伤害与活性氧的防御酶)[J]. Acta Botanica Austro Sinica(中国科学院华南植物研究所集刊), 4: 169—176.
- Peng JG(彭嘉桂), Chen CR(陈成榕), Lu HD(卢和顶). 1995. Preliminary studies on Al stress of maize(玉米铝胁迫研究初报)[J]. Tropical and Subtropical Soil Science(热带亚热带土壤科学), 4(2): 97—101.
- Qin RJ(秦瑞君), Chen FX(陈福兴). 1999. The aluminium toxicity of some crop seedlings in red soil of southern hunan(湘南红壤作物苗期铝中毒的研究)[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science(植物营养与肥料学报), 5(1): 50—55.
- Van Assche F, Clijsters H. 1990. Effects of metal on enzyme activity in plants[J]. Plant Cell Environ, 13: 195—206.
- Xu QS(徐勤松), Shi GX(施国新), Du KH(杜开和). 2002. Effects of Cr(VI) on physiological and ultrastructural changes in leaves of ottelia alismoides(L.) pers(六价铬污染对水车前叶片生理生化及细胞超微结构的影响)[J]. Guihaia(广西植物), 22(1): 92—96.
- Yang Q(杨庆), Jin HB(金华斌). 2000. The effect of aluminium stress on N. P. and Ca absorption of peanut varieties(铝胁迫对花生吸收氮、磷、钙的影响)[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences(中国油料作物学报), 22(2): 68—73.

(上接第 39 页 Continue from page 39)

材料,较成功的建立了快速的无性繁殖系。在初代和继代培养中,使用较高 BA 浓度,尽管有较高的小芽增殖率,但小植株矮化明显,表现为植株矮胖,与自然百合生长状态相比,鳞片叶化,生长受到明显的抑制,有时芽基部还产生大量的愈伤组织。另外,BA 的诱导活性明显高于 KT,但在含有 BA 的培养基中,几乎所有的小植株的鳞片叶化,而 KT 培养基中的小植株生长健壮,鳞茎呈紫色与自然生长的植株一致,尽管增殖率较低,但能一次成苗,简化了培养程序,降低了成本,而且可保持较低的变异率,对品种优良性状的保持有利。

有关百合组织培养的文章很多,但以东方百合系为材料的组织培养尚未见报道,不同于其它百合组织培养,在实验中,我们分别选择了鳞片、茎尖及茎段为初代培养材料,筛选了继代增殖培养基,建立了 2 种简单有效的无性繁殖途径:

茎段 }
鳞片 } 诱导 芽或芽丛 增殖 芽丛 生根 完整植株
茎尖 }

鳞片 诱导 再生植株 增殖 丛生小苗

参考文献:

- 丁兰, 刘国安, 杨红. 2002. 新铁炮百合组织培养和快速繁殖研究 [J]. 西北师范大学学报, 37(1): 80—82.
- 王红霞, 等. 2000. 通江百合的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 36(2): 132.
- 陈小兰, 等. 2000. 金百合的离体快速繁殖 [J]. 离体快速繁殖, 36(4): 334.
- 杨承德, 等. 1988. 百合鳞茎不同部位的小鳞茎分化与激素调节研究 [J]. 兰州大学学报, 28(3): 95—99.
- Gu ZP(谷祝平), Zheng GC(郑国昌). 1982. Studies on induction of pollen plantlets from the anther cultures of lily(从百合花药诱导花粉植株的研究) [J]. Acta Botanica Sinica(植物学报), 24: 28—32.
- Gu ZP(谷祝平), Zheng GC(郑国昌). 1983. In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of lily and its exbryological observations(百合未授粉子房的组织培养及胚胎学观察) [J]. Acta Botanica Sinica(植物学报), 25: 24—30.