

宜昌百合离体培养快繁技术研究

罗晓波¹ 齐良富² 耿研会³

(1. 四川省自然资源科学研究院, 四川 成都 610000; 2. 泸定县林业工业总公司, 四川 泸定 626101

3. 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610000)

摘要: 以宜昌百合 (*Lilium leucanthum*) 的鳞片作为外植体进行离体组织培养, 通过对宜昌百合的初代、继代和壮苗生根培养基的筛选进行研究, 建立了较为适宜的宜昌百合组织培养快繁体系。其中: 初代的最佳培养基为 MS + 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg·L⁻¹ NAA; 愈伤组织和芽的适宜增殖培养基为 MS + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg·L⁻¹ NAA; 生根培养最佳培养基为 1/2MS + IBA 0.5 mg·L⁻¹。

关键词: 宜昌百合; 离体培养; 快繁技术

中图分类号: S723.132

文献标识码: A

文章编号: 1003-5508(2015)05-0075-04

A Study of the Rapid Propagation Technology of Whiteflower Lily by the Isolated Culture

LUO Xiao-bo¹ QI Liang-fu² GENG Yan-hui³

(1. Sichuan Provincial Institute of Natural Resource Sciences, Chengdu 61000, China;

2. General Company of Forestry Industry of Luding County, Luding 626101, China;

3. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610000, Sichuan, China)

Abstract: Whiteflower lily (*Lilium leucanthum*) scales were used as explants for tissue culture in vitro. Researches were conducted on the screening of whiteflower lily primary culture medium, subculture medium and the medium of healthy seedling rooting in order to establish a suitable system of whiteflower lily tissue culture and rapid propagation. The results showed that the optimum medium of primary culture was MS + 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg·L⁻¹ NAA, the optimum proliferation medium for callus and buds was MS + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg·L⁻¹ NAA. And the appropriate medium for rooting was 1/2MS + 0.5 mg·L⁻¹ IBA.

Key words: Whiteflower lily (*Lilium leucanthum* Baker); isolated culture; rapid propagation technology

百合是著名观赏花卉, 中国是百合植物资源的自然分布中心, 全世界百合属植物约 100 种, 其中中国原产 47 种, 种类丰富, 珍稀特有种多^[1]。宜昌百合为我国特有种, 自然分布于四川北部广元及川东地区, 因模式标本由 Baker 采自湖北宜昌, 故名。其花清香怡人, 具有极高的观赏价值, 加之抗病能力强等优点, 也是很好的育种材料。2005 年, 王伟对宜昌百合进行了小鳞茎诱导的初步研究^[2]。2007 年,

熊丹、薛晓娜对宜昌百合开展了组织培养研究^[3~4]。为了加快宜昌百合的开发利用, 作者对野生宜昌百合进行了离体培养快繁技术研究, 取得了较好进展。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

野生宜昌百合 (*L. leucanthum*) 种球采自四川省

收稿日期: 2015-06-18

基金项目: 四川省科技计划项目《攀西地区干热河谷资源植物深度系统开发研究》, 计划编号: 2014SZ0176。

作者简介: 罗晓波(1971-) 男, 高级工程师, 主要从事植物地理、生物生态修复技术研究。

广元市朝天区境内,栽种于四川师范大学实验圃。

1.2 方法

1.2.1 外植体预处理

取野生宜昌野生百合内层鳞片,自来水洗净泥土与杂质,在低浓度洗衣粉溶液中浸泡10 min,流动水不断冲洗,在超净工作台上将清洗后的百合鳞片置入70%酒精溶液内,轻轻摇动30 s,无菌水冲洗3次,加入0.1%升汞溶液,浸泡消毒1 min,用无菌水清洗3次,用解剖刀将鳞片切成基部、中部、顶部3

个部分(约 1.0 cm^2),将处理好的外植体接种到初代培养基上,每瓶接种1块~2块。培养第42天统计生长情况。

1.2.2 不定芽诱导

不定芽诱导培养基为:MS添加不同浓度的6-BA、IBA和NAA(参见表1),并加入蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值为6.0。培养条件为:培养温度 26°C ,光照强度 $1\ 500\text{ lx}\sim 2\ 000\text{ lx}$,光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

表1 激素浓度及组合对野生宜昌百合鳞片愈伤组织和不定芽诱导的结果

Tab. 1 Results of hormone concentration and combination on inducing callus and adventitious buds of wild whiteflower lily scales

编号	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	接种数	愈伤组织 发生率 (%)	出芽率 (%)	生长状况
1	0.5	0.1	30	46.67	30.00	颗粒性较好,细小,直径 $<0.5\text{ mm}$,密
2	1.0	0.1	30	73.33	56.67	颗粒性较好,细小,直径 $<0.5\text{ mm}$,密
3	1.5	0.2	30	90.00	86.67	颗粒性最好,直径 $>0.5\text{ mm}$,紧密
4	2.0	0.2	30	70.00	43.33	颗粒性差,表面呈瘤状突起,每个突起直径都达 1 mm 以上
5	2.0	0.3	30	56.67	43.33	颗粒性差,表面呈瘤状突起,每个突起直径都达 1 mm 以上
6	2.0	0.5	30	70.00	33.33	颗粒性差,表面呈瘤状突起,每个突起直径都达 1 mm 以上

1.2.3 野生宜昌百合不定芽的增殖

增殖培养基为:MS添加不同浓度的6-BA和NAA(见表2),并加入蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值为6.0。培养条件为:温度 24°C ,光照强度 $1\ 500\text{ lx}\sim 2\ 000\text{ lx}$,光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

表2 激素质量浓度及组合对野生宜昌百合愈伤组织和不定芽增殖的结果

Tab. 2 Results of hormone combination and concentration on propagating wild whiteflower lily callus and adventitious buds

编号	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	接种数	增殖 倍数	不定芽生长状况
1	0.5	0.1	40	1.95	生长较壮
2	1.0	0.1	40	2.23	生长较壮
3	2.0	0.1	40	1.53	生长较弱
4	0.5	0.2	40	3.70	生长健壮
5	1.0	0.2	40	5.05	生长健壮
6	2.0	0.2	40	3.48	生长较弱
7	0.5	0.5	40	3.63	生长健壮
8	1.0	0.5	40	4.18	生长健壮
9	2.0	0.5	40	2.23	生长较弱

1.2.4 野生宜昌百合的生根培养

生根培养基为:1/2MS添加 $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭(AC)和不同浓度的NAA或6-BA(见表3),并加入蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值为6.0。培养条件为:温度 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度 $1\ 500\text{ lx}\sim 2\ 000\text{ lx}$,光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

表3 不同激素种类及浓度对野生宜昌百合生根的结果

Tab. 3 Results of different kinds and concentrations of hormone on wild whiteflower lily rooting

编号	激素种类	浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	生根率 (%)	根长平均值 (cm)	根数平均值
1	NAA	0.2	100%	1.59	4.20
2	NAA	0.5	100%	2.31	7.80
3	NAA	1.0	56.66%	1.19	3.26
4	IBA	0.2	100%	2.33	2.72
5	IBA	0.5	100%	3.68	5.07
6	IBA	1.0	83.33%	2.08	2.90

1.3 统计方法

对试验所得原始数据求其平均数,即为试验结果。采用以下公式进行计算:

不定芽诱导率/% = (分化不定芽的外植体数/接种的外植体数) $\times 100\%$,

愈伤组织诱导率/% = (分化愈伤组织的外植体数/接种的外植体数) $\times 100\%$,

不定芽增殖倍数 = 统计的不定芽数/接种的不定芽数。

生根率 = (生根的外植体数/接种的外植体数) $\times 100\%$,

根长平均值 = (所有根的总长度/根的总数) $\times 100\%$ 。

式中:接种的外植体数不包括接种后被污染的

外植体。

2 结果与分析

2.1 野生宜昌百合鳞片不定芽和愈伤组织的诱导

2.1.1 激素浓度及其组合对鳞片愈伤组织和不定芽诱导的影响

由表 1 可见,6 种培养基均能诱导野生宜昌百合鳞片产生不定芽,但不定芽诱导率存在明显差异;当 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 配合使用(3 号培养基)时,不仅不定芽诱导率最高,为 86.67% 而且,愈伤组织的发生率也最高,为 90.00%。观察发现,在 3 号培养基中,第 7 天鳞片转绿,第 11 天有小突起形成;在 6 号培养基中外植体在第 10 天时转绿。随着培养时间的延长,1、2、6 号培养基上的外植体陆续出现小突起,随后发育成不定芽。因此,在供试培养基中,以 $\text{MS} + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA(3 号培养基)最适合野生宜昌百合鳞片的芽诱导。

2.1.2 野生宜昌百合鳞片部位对不定芽诱导的影响

采用 3 号培养基,分别接种鳞片的上、中、基部切块,诱导不定芽。对于所得结果,先用体视镜观察其外部形态,再用石蜡切片技术观察其内部结构(图 1)。结果显示,鳞片分化不定芽的能力为基部 > 中部 > 上部。因此,应选择与鳞茎盘相连的基部鳞片诱导不定芽。

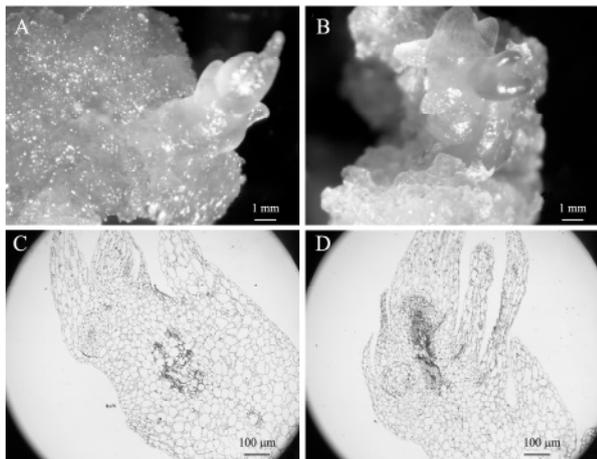


图 1 显微镜观察鳞片不同部位诱导的野生宜昌百合体细胞胚(A、C 为基部,B、D 为中部)

Fig. 1 Microscopic observation of somatic embryos in different parts of wild whiteflower lily bulb induction(A, C base, B, D as the central)

2.2 野生宜昌百合不定芽的增殖培养

以 MS 为基本培养基,附加不同激素配比,作为增殖培养基的筛选。第 30 天统计不定芽增殖情况,结果见表 2。在增殖培养基中添加的 NAA 浓度相同时,分别将 6-BA 的浓度分别设定为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,发现在添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的增殖培养基中不定芽的增殖倍数最大,且不定芽生长健壮,叶片浓绿。因此,以添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的培养基增殖效果最好。

2.3 野生宜昌百合的生根培养

野生宜昌百合初代培养、继代培养及出芽生根情况见图 2。将增殖的不定芽接种于 6 种生根培养基中,第 20 天统计生根情况,结果见表 3。从表 3 可知,在添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 或 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 的生根培养基中的生根率均为 100%。在添加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 的生根培养基中根的平均长度和根数的平均值都比较小;在添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的生根培养基中产生的根数的平均值最大,但根长平均值较小。可见,添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 的生根培养基更适合野生宜昌百合的生根培养。

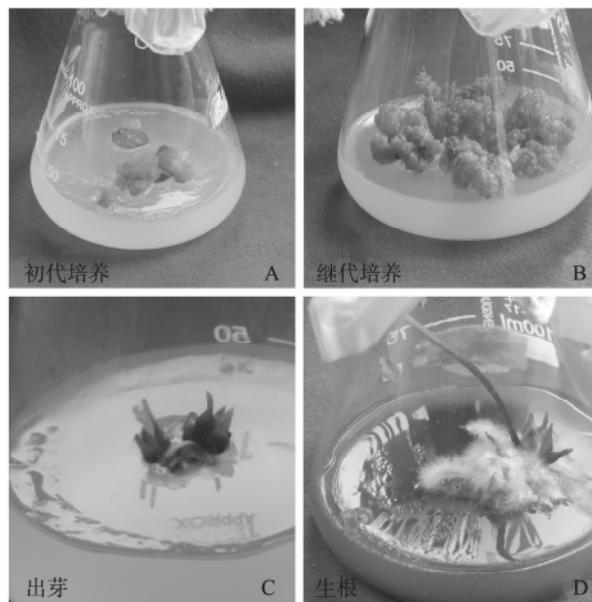


图 2 百合鳞片诱导愈伤组织的分化

Fig. 2 The differentiation of callus induction of lily scales

3 讨论

3.1 激素浓度及其组合对野生宜昌百合鳞片愈伤组织及不定芽诱导的影响

本研究结果表明,鳞片诱导愈伤组织及不定芽

的适宜培养基为 $MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 。薛晓娜^[4]等在秦岭野生宜昌百合的组织培养研究中发现鳞片诱导不定芽的适宜培养基为 $MS + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$, 叶片诱导不定芽的适宜培养基为 $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D}$, 推测两项研究结果差异的原因有二: 一是研究条件的设置不同, 二是外植体的差异。

3.2 激素浓度及其组合对野生宜昌百合愈伤组织及不定芽增殖的影响

本实验筛选的野生宜昌百合愈伤组织及不定芽增殖的最适培养基为 $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$, 对愈伤组织和芽的增殖倍数为 5.05, 结果明显高于其它组合。而且, 不定芽生长健壮。李筱帆等在几种百合组织培养及体细胞胚发生技术的研究中得出: 兰州百合鳞片最适增殖培养基为 $MS + 6\text{-BA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 芽增殖倍数为 4.04, 这与本实验结果相近。原因可能是培育两种百合的亲本具有较近的亲缘关系, 两品种的形成是繁育条件的不同所致, 但其在遗传上仍保留有一定的相似性。

3.3 激素 IBA、NAA 对野生宜昌百合生根的影响

刘静^[6]等在兰州百合快速繁殖研究中得出最佳生根培养基为 $1/2MS + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ 。王刚等人以野百合鳞茎为外植体进行愈伤组织及快速繁殖

研究, 最终得出的最佳生根培养基为 $1/2MS + 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 0.1\% \text{ 活性炭}$ 。这些与本实验结果相比较, 均有出入。根据柳玉晶^[7]等对百合愈伤组织的诱导及植株再生的研究, 可以发现同为 MS 培养基或 $1/2MS$ 培养基, 加入 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ 比不加此浓度激素时东方百合愈伤组织再生苗的生根率高, 同时得出最适生根培养基为 $MS + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ 。由此可见, 百合的品种、激素的种类、浓度及培养基的类型对百合的生根都有不同程度的影响。

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] 王祎, 杨万年. 宜昌百合小鳞茎诱导的初步研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(3): 7~8.
 - [3] 熊丹, 陈发菊, 梁宏伟, 等. 宜昌百合的组织培养研究 [J]. 福建林业科技, 2007, 34(4): 91~97.
 - [4] 薛晓娜, 张延龙, 牛立新. 秦岭野生宜昌百合的组织培养研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(6): 108~112.
 - [5] 孙安妮, 张延龙, 牛立新, 等. 宜昌百合体细胞胚诱导及植株再生 [J]. 西北农业学报, 2011, 20(8): 142~146.
 - [6] 刘静. 兰州百合快速繁殖研究 [J]. 南方农业学报, 2011, 42(8): 839~842.
 - [7] 柳玉晶, 龚束芳, 樊金萍, 等. 百合愈伤组织的诱导及植株再生 [J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(3): 352~355.
-
- (上接第 36 页)
- [8] 盛和林, 王岐山. 脊椎动物学野外实习指导 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1983, 143~187.
 - [9] 李晓娟, 周材权, 金立广. 四川南充高坪机场秋冬季节鸟类多样性与鸟撞预防 [J]. 动物学研究, 2007, 28(6): 615~625.
 - [10] 孙儒泳. 动物生态学原理(第三版) [M]. 北京: 北京师范大学出版社, 2001, 408~409.
 - [11] 吴雪, 杜杰, 李晓娟, 等. 重庆江北机场鸟类群落结构及鸟击防范 [J]. 生态学杂志, 2015, 34(7): 1~10.
 - [12] Sodhi N, Navjot S. Competition in the air: birds versus aircraft [J]. The Auk, 2002, 119(3): 587~595.
 - [13] Chilvers BL, Ryan CJ, Hickling GJ. Factors affecting pilot-reported bird-strike rates at Christchurch International Airport, New Zealand [J]. New Zealand Journal of Zoology, 1997, 24: 1~7.
 - [14] Cleary EC, Dolbeer RA. Wildlife hazard management at airports: a manual for airport operators [M]. Federal Aviation Administration, Office of Airport Safety and Standards, Washington, 2005, 348.
 - [15] DeVault TL, Reinhart BD, Brisbin JR, et al. Flight behavior of black and turkey vultures: implications for reducing bird-aircraft collisions [J]. Wildl. Manage, 2005, 69, 592~599.
 - [16] Blackwell BF, Wright SE. Collisions of red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*), Turkey (*Cathartes aura*) and black vultures (*Coragyps atratus*) with aircraft: implications for bird strike reduction [J]. J. Raptor Res., 2006, 40, 76~80.
 - [17] Rao A, Pinon A. Bird strike threat is best countered by effective wildlife control augmented by land-use management [J]. ICAO J., 1998, 53(8): 5~6, 25.
 - [18] Sodhi N S. Competition in the air: birds versus aircraft [J]. Auk, 2002, 119: 587~595.
 - [19] 蒋爱伍, 周放, 韦振海, 等. 广西大苗山“打鸟劫”趋光性鸟类调查 [J]. 动物性杂, 2006, 41(6): 127~131.
 - [20] 袁玉川, 徐家武, 张群. 2011 年南涧凤凰山夜间鸟类环志研究 [J]. 林业调查规划, 2012, 37(3): 54~58.
 - [21] 杨婷, 王紫江, 刘鲁明, 等. 云南新平哀牢山夜间捕获鸟类的多样性 [J]. 动物学研究, 2009, 30(3): 303~310.