

秦岭野生宜昌百合的组织培养研究

薛晓娜,张延龙,牛立新

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了有效地保存、扩繁秦岭野生宜昌百合资源,以秦岭野生宜昌百合为材料,研究了鳞片和叶片不同部位,以及不同激素配比对不定芽诱导、增殖及生根的影响。结果表明,鳞片诱导不定芽的适宜培养基为 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA,鳞片分化不定芽的能力为基部 > 中部 > 上部,三者之间差异极显著;叶片诱导不定芽的适宜培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L 2,4-D,叶片不定芽的诱导率为基部高,中部和尖部低,且基部与中部和尖部差异极显著;不定芽增殖的适宜培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA;适宜生根的培养基为 1/2MS + 0.4 mg/L NAA + 1.0 g/L 活性炭(AC)。以上结果表明,鳞片和叶片分化不定芽存在明显的位置效应,6-BA 和 NAA 配合对不定芽增殖有良好的效果,NAA 和 AC 配合适宜生根。

[关键词] 秦岭野生宜昌百合;鳞片;叶片;组织培养

[中图分类号] S682.2⁺9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0108-05

Tissue culture of wild 'Qinling Yichang lily

XUE Xiao-na, ZHANG Yan-long, NIU Li-xin

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract : With wild 'Qinling Yichang lily as materials, effects of parts of scales and leaves on inducing adventitious buds, and effects of hormone combination on inducing adventitious buds, propagating buds and rooting were studied in order to preserve and propagate the wild lily resources. The results showed that the appropriate medium of the adventitious buds induced directly from scales was MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA. The ability of scales inducing adventitious buds was down > middle > upper; the suitable medium of the buds induced from leaves was MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L 2,4-D. The induction rates of adventitious bud were down was high, middle and upper were low; the optimum proliferation medium for adventitious buds was MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA. The appropriate medium for rooting was 1/2MS + 0.4 mg/L NAA + 1.0 g/L AC. The above study showed that there was obvious rule about inducing adventitious buds with different parts of scales and leaves, the combination of 6-BA and NAA had good effects on propagating buds, and the combination of NAA and AC was suitable for rooting.

Key words : wild 'Qinling Yichang lily; scale; leaf; tissue culture

中国是百合属植物的自然分布中心,起源于我国的百合有 47 个种、18 个变种,占世界百合属植物的 50%。我国百合种类多,生态习性各异,分布广泛^[1]。宜昌百合 (*L. leucanthum* (Baker) Baker) 是

我国特有野生种,它不仅具有较高的观赏价值,而且有重要的药用价值^[2],也是百合新品种培育的重要材料之一。宜昌百合在野生状态下繁殖系数低,不易产生小籽球。由于野生资源的数量少,为了有效

†收稿日期: 2006-11-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571523)

[作者简介] 薛晓娜(1982-),女,陕西韩城人,在读硕士,主要从事园林植物种质资源与遗传育种研究。

[通讯作者] 张延龙(1964-),女,陕西延安人,副教授,主要从事花卉育种及花卉应用研究。E-mail: zylnyz@sohu.com

保存、扩繁这一野生资源,利用组织培养方法,以秦岭野生宜昌百合的鳞片、叶片为外植体进行试验,研究其快繁技术显得尤为重要。

目前,关于百合组织培养的报道很多,但主要是针对百合栽培品种,如唐道城等^[3]对东方百合杂种系愈伤组织分化小鳞茎的研究,李睿^[4]对麝香百合组织培养的研究,杨薇红等^[5]对亚洲百合花器官组培快繁技术的研究,及Joung等^[6]对Casa Blanca百合品种组织培养的研究。而有关野生百合的研究很少,特别是未见对陕西秦岭山区的野生百合的研究。为此,本研究以秦岭野生宜昌百合为材料,研究鳞片和叶片不同部位,以及不同激素配比对不定芽诱导、增殖及生根的影响,以期通过组织培养方法保存秦岭野生宜昌百合,及进一步利用百合野生资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

秦岭野生宜昌百合(*L. leucanthum* (Baker) Baker)种球采自陕西秦岭山区太白县境内,栽种于西北农林科技大学园艺场。

1.2 方法

1.2.1 秦岭野生宜昌百合外植体的采集与处理

取秦岭野生宜昌百合鳞茎的外部鳞片,洗去表面泥土后在自来水下流水冲洗12 h。在超净台上用体积分数70%乙醇消毒30 s,再投入1 g/L升汞溶液中消毒13 min,然后用无菌水冲洗5~6次,将鳞片分上、中、基3部分切成0.5 cm×0.5 cm方块,接种于培养基1~6中,培养第30天统计百合生长情况。4月中旬采集植株上部的幼嫩叶片,在自来水下流水冲洗1 h,用体积分数70%酒精消毒10 s,然后用1 g/L升汞消毒5 min,最后用无菌水冲洗5~6次。将叶片分尖、中、基3部分切成0.5 cm×0.5 cm方块,接种于培养基A~F中,培养第45天统计百合生长情况。

1.2.2 秦岭野生宜昌百合不定芽的诱导 不定芽诱导培养基为:MS添加不同质量浓度的6-BA、KT、IBA、NAA和2,4-D,并加入蔗糖30 g/L,琼脂6 g/L,pH为5.8。培养条件为:培养温度(25±1),光照强度1 500~2 000 lx,光照时间13.5 h/d,以叶片为外植体需2周暗培养,温度23,以鳞片为外植体时不需进行暗培养。

1.2.3 秦岭野生宜昌百合不定芽的增殖 增殖培

养基为:MS添加不同质量浓度的6-BA和NAA,并加入蔗糖30 g/L,琼脂6 g/L,pH为5.8。培养条件为:温度(25±1),光照强度1 500~2 000 lx,光照时间13.5 h/d。

1.2.4 秦岭野生宜昌百合的生根培养 生根培养基为:1/2MS添加1 g/L活性炭(AC)和不同质量浓度的NAA,并加入蔗糖30 g/L,琼脂6 g/L,pH为5.8。培养条件为:温度(25±1),光照强度1 500~2 000 lx,光照时间13 h/d。

1.3 统计方法

对试验所得原始数据,剔除 $\bar{x} \pm 2\sigma$ 以外的数据再求其平均数,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)×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)×100%,

增殖倍数=统计的不定芽数/接种的不定芽数。

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 秦岭野生宜昌百合鳞片不定芽的诱导

2.1.1 激素质量浓度及其组合对鳞片不定芽诱导的影响 由表1可见,6种培养基均能诱导秦岭野生宜昌百合鳞片产生不定芽,但不定芽诱导率存在极显著差异;单独使用细胞分裂素或生长素的不定芽诱导率低,当2.0 mg/L 6-BA和0.05 mg/L NAA配合使用(6号培养基)时,不定芽诱导率最高,为63.3%,与其他培养基差异极显著。观察发现,在6号培养基中,第7天鳞片转绿,第11天有小突起形成;在5号培养基中外植体在第11天时转绿。随着培养时间的延长,4,1,2,3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MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA(6号培养基)最适合秦岭野生宜昌百合鳞片的诱导。

2.1.2 鳞片部位对不定芽诱导的影响 采用6号培养基,分别接种鳞片的上、中、基部切块,诱导不定芽,结果见表2。从表2可见,鳞片分化不定芽的能力为基部>中部>上部,且三者之间差异极显著。因此,应选择与鳞茎盘相连的基部鳞片诱导不定芽。

表 1 激素质量浓度及其组合对秦岭野生宜昌百合鳞片不定芽诱导的效果

Table 1 Effects of hormone concentration and combination on inducing adventitious buds of wild' Qinling Yichang lily scales

培养基编号 Code of medium	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	IBA/ (mg · L ⁻¹)	接种数 No. of inoculated scale	不定芽数 No. of adventitious bud	不定芽诱导率/ % Induction rate of adventitious bud	不定芽生长 状况 Growth status
1	1.0	-	-	45	16	24.5 dD	较壮 Strong
2	2.0	-	-	45	15	11.1 eE	较弱 Weak
3	-	-	0.4	45	13	8.9 fF	较弱 Weak
4	-	-	0.8	45	24	44.5 cC	健壮 Stronger
5	1.0	0.1	-	45	39	57.8 bB	健壮 Stronger
6	2.0	0.05	-	90	79	63.3 aA	健壮 Stronger

注:同列数据后标不同大写字母者表示差异极显著 ($P < 0.01$),标不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。
Note :Different capital letters in the same line indicate remarkably significant difference ($P < 0.01$), different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

表 2 秦岭野生宜昌百合鳞片部位对不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of parts of wild' Qinling Yichang lily scale on inducing adventitious buds

部 位 Part	接种数 No. of inoculated scale	不定芽数 No. of adventitious bud	不定芽 诱导率/ % Induction rate of adventitious bud
上部 Upper	30	10	36.7 cC
中部 Middle	30	19	63.4 bB
基部 Down	30	50	90.0 aA

2.2 秦岭野生宜昌百合叶片不定芽的诱导

2.2.1 激素质量浓度及其组合对叶片愈伤组织及不定芽的影响 由表 3 可见,除培养基 E 外,其余 5 种培养基均能诱导秦岭野生宜昌百合产生愈伤组织。培养第 30 天时培养基 B、C、D 上的叶片均在切口处产生愈伤组织。培养第 45 天时,培养基 A 上的叶片外植体在切口和叶脉处直接分化不定芽,且不定芽生长健壮,但数量少;培养基 B、C 上产生的

愈伤组织数量较多,但诱导不定芽数量少,且长势一般;培养基 D 产生的愈伤组织最多,不定芽诱导率也最高,且与其他 5 种培养基达到极显著差异,同时不定芽长势健壮;培养基 E、F 在愈伤组织诱导和不定芽的分化上均表现不理想。由此得出,培养基 D (1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L 2,4-D) 为秦岭野生宜昌百合叶片培养的适宜诱导培养基。

2.2.2 叶片部位对愈伤组织及不定芽诱导的影响

接种后第 30 天,对秦岭野生宜昌百合叶片不同部位在培养基 D 上的生长情况进行统计,结果发现叶片的 3 个部位均产生愈伤组织,且数目差异不大。培养第 45 天时,叶片不同部位的愈伤组织诱导率和不定芽诱导率见表 4。表 4 结果表明,叶片不定芽诱导率为基部高,中部和尖部低,且基部与中部和尖部的差异极显著。因此,应选择叶片基部进行不定芽的诱导。

表 3 激素质量浓度及其组合对秦岭野生宜昌百合叶片愈伤组织及不定芽诱导的影响

Table 3 Effects of hormone concentration and combination on inducing callus and adventitious buds of wild' Qinling Yichang lily leaves

培养基编号 Code of medium	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	2,4-D/ (mg · L ⁻¹)	KT/ (mg · L ⁻¹)	接种数 No. of inoculated scale	愈伤组织 诱导率/ % Induction rate of callus	不定芽数 No. of adventitious bud	不定芽诱导率/ % Induction rate of adventitious bud	不定芽生长 状况 Growth status
A	2.0	0.2	-	-	90	1.1 dD	8	5.6 cC	健壮 Stronger
B	2.0	-	2.0	-	90	81.1 cC	10	6.7 bB	较壮 Strong
C	1.0	-	2.0	-	90	87.8 bB	7	5.6 cC	较壮 Strong
D	1.0	0.1	2.0	-	90	96.7 aA	35	24.4 aA	健壮 Stronger
E	1.0	1.0	-	0.1	90	0 dD	0	0 dD	较弱 Weak
F	0.5	1.0	-	0.1	90	1.1 dD	0	0 dD	-

表 4 秦岭野生宜昌百合叶片部位对愈伤组织及不定芽诱导的影响

Table 4 Effects of parts of wild' Qinling Yichang lily leaf on inducing callus and adventitious buds

部位 Part	接种数 No. of inoculated leaf	形成愈伤组织数 No. of callus	愈伤组织诱导率/ % Induction rate of callus	诱导的不定芽数 No. of adventitious bud	不定芽诱导率/ % Induction rate of adventitious bud
尖部 Upper	30	28	93.3	5	10.0 bB
中部 Middle	30	29	96.7	6	13.3 bB
基部 Down	30	30	100	24	50.0 aA

2.3 秦岭野生宜昌百合不定芽的增殖培养

将诱导的不定芽转入 2 种增殖培养基中,第 30 天统计不定芽增殖情况,结果见表 5。由表 5 可知,在添加 2.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 的增殖培养基中,不定芽生长健壮,叶片绿,但增殖倍数较小,不适合大规模繁殖;在添加 1.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 的增殖培养基中,不定芽增殖的数量多,增殖倍数是前者的 2.7 倍,且不定芽生长健壮,叶片绿。因此,以添加 1.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 的培养基增殖效果更好。

表 5 激素质量浓度及其组合对秦岭野生宜昌百合不定芽增殖的影响

Table 5 Effects of hormone concentration and combination on propagating wild' Qinling Yichang lily adventitious buds

6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	增殖倍数 Multiple of propagation	不定芽生长状况 Growth status
2.0	0.05	2.1	健壮 Strong
1.0	0.05	5.6	健壮 Strong

2.4 秦岭野生宜昌百合的生根培养

将增殖的不定芽接种于 2 种生根培养基中,第 20 天统计生根情况,结果见表 6。从表 6 可知,2 种生根培养基的生根率均为 100 %,在添加 0.4 mg/L NAA 的生根培养基中根细、短,颜色嫩白健壮,数目多,植株生长迅速;在添加 0.8 mg/L NAA 的生根培养基中产生的根粗大,但数量较少,并伴有明显的木质化现象,根颜色发黄,有淡褐色纹,且产生部分气生根,植株生长较慢。可见,添加 0.4 mg/L NAA 的生根培养基更适合秦岭野生宜昌百合的生根培养。

表 6 不同质量浓度 NAA 对秦岭野生宜昌百合生根的影响

Table 6 Effects of different NAA concentration on wild' Qinling Yichang lily rooting

NAA/ (mg · L ⁻¹)	生根率/ % Rooting rate	根粗/ mm Diameter of root	根数 No. of root	根长/ mm Length of root
0.4	100	0.98	13	7.32
0.8	100	2.26	8	12.72

3 讨 论

3.1 秦岭野生宜昌百合不定芽诱导存在明显的位置效应

本试验中不定芽诱导率为:鳞片>叶片;鳞片基部>中部>上部;叶片基部>中部和尖部。这与狄翠霞等^[7]、唐东芹等^[8]、王刚等^[9]在西伯利亚百合、

东方百合、兰州百合和野百合组织培养的研究结果一致。金淑梅等^[10]应用 ELISA 证明,细叶百合外层鳞片下部的 IAA 和 GA 含量最高,ABA 含量最低。由此推测,百合产生不定芽的位置效应可能与内源激素含量有关。

3.2 激素质量浓度及其组合对秦岭野生宜昌百合鳞片不定芽诱导的影响

本研究结果表明,当培养基中 6-BA 和 NAA 的用量分别为 2.0 mg/L 和 0.05 mg/L 时,秦岭野生宜昌百合鳞片的 不定芽诱导率达 63.3 %;当二者的用量分别为 1.0 mg/L 和 0.1 mg/L 时,不定芽诱导率为 57.8 %,前者显著优于后者及其他培养基。唐东芹等^[8]在东方百合鳞片组织培养研究中表明,不定芽诱导的最佳培养基需添加 2,4-D 1.0 mg/L,这与本研究结果不尽一致,这可能是由于基因型差异所导致的。

3.3 激素质量浓度及其组合对秦岭野生宜昌百合叶片不定芽诱导的影响

许宝辉^[11]、王刚等^[9]分别以兰州百合和岷江百合的叶片为外植体进行诱导培养,但随后叶片逐渐失绿、枯死。本研究结果显示:当 6-BA 和 NAA 配合使用时,秦岭野生宜昌百合叶片能直接分化不定芽,但诱导率低;2,4-D 的添加对愈伤组织的诱导有显著效果,诱导率均达到 80 %以上,同时配合使用 6-BA 和 NAA,则可提高不定芽的诱导率,达到 24.4 %。张延龙等^[12]对东方百合叶片的组织培养研究表明,不添加 2,4-D 仍然有大量愈伤组织形成,这与本研究结果有较大出入,这可能是由于百合的基因型存在差异所致。

3.4 激素质量浓度及其组合对秦岭野生宜昌百合不定芽增殖的影响

本试验结果表明,秦岭野生宜昌百合不定芽增殖的适宜培养为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA。刘雅莉等^[13]在东方百合“索邦”的花器官培养与快速繁殖研究中得出,不定芽增殖的最佳培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA,这与本研究稍有出入,其原因有二:一是百合的基因型差异;二是外植体的差异。

3.5 不同质量浓度 NAA 对秦岭野生宜昌百合生根的影响

本试验筛选的秦岭野生宜昌百合适宜生根的培养基为 1/2MS + 0.4 mg/L NAA + 1.0 g/L 活性炭。张延龙等^[12]研究东方百合试管苗生根时认为,培养基 1/2 MS + 0.3 mg/L IBA 适宜生根。这与本

试验结果有差异,对于不同激素生根效果的差异还需要进一步研究。

[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] 傅书遐.湖北植物志[M].武汉:湖北科学技术出版社,2002:544.
- [3] 唐道城,孟明,梁文玉.东方百合杂种系愈伤组织分化小鳞茎的研究[J].青海大学学报:自然科学版,2005,23(5):1-4.
- [4] 李睿.麝香百合的组织培养与快速繁殖[J].甘肃林业科技,2003,28(2):13-14.
- [5] 杨薇红,张延龙,童斌,等.亚洲百合花器官的组培快繁技术研究[J].中国农学通报,2004,20(5):193-195.
- [6] Joung H Y, Sung M. *In vitro* propagation of *L. oriental* hybrid 'Casa Blanca' and *L. leichtlinii* var. *tigrinum* as influenced by growth regulators and cultural explant[J]. Journal of Agriculture Science, 1995, 37(1):378-383.
- [7] 狄翠霞,安黎哲,张满效,等.西伯利亚百合器官离体培养及结鳞茎的研究[J].西北植物学报,2005,25(10):1931-1936.
- [8] 唐东芹,黄丹枫,唐克轩,等.东方百合鳞片的组织培养[J].植物生理学通讯,2003,39(5):450-452.
- [9] 王刚,杜捷,李桂英,等.兰州百合和野百合组织培养及快速繁殖研究[J].西北师范大学学报,2002,38(1):69-71.
- [10] 金淑梅,杨利平,吕品,等.细叶百合中内源激素的变化[J].东北林业大学学报,2005,33(1):20-22.
- [11] 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.
- [12] 张延龙,徐炎,王洁纯.东方百合叶片组织培养研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(1):47-50.
- [13] 刘雅莉,张剑侠,潘学军.东方百合"索邦"的花器官培养与快速繁殖[J].西北植物学报,2004,24(12):2350-2354.

(上接第 107 页)

[参考文献]

- [1] 许申鸿,杭瑚,赫晓丽.葡萄籽化学成分分析及其抗氧化性质的研究[J].食品工业科技,2000,21(2):18-19.
- [2] 张爱军,沈继红,马小兵,等.葡萄籽的开发与利用[J].中国油脂,2004,29(3):55-57.
- [3] 裴凌鹏,惠伯棣.葡萄籽生物活性物质的制备技术及其生理功能的研究[J].首都师范大学学报:自然科学版,2004,25:57-60.
- [4] 王敬勉,穆德胜.葡萄籽油的特性及食疗价值研究[J].食品科学,1995,16:11-13.
- [5] 宁宏双,郝爱民.超微粉碎技术在中药生产中的应用[J].天津药学,2005,17:64-66.
- [6] 沈洁.葡萄籽超微粉碎[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2005.
- [7] 罗贵川,张红映,赵建勇.磷酸二铵产品的结块及防治[J].磷肥与复肥,2003,18(2):23-24.
- [8] 王泽南,范方宇,王莹,等.草莓粉非酶褐变的抑制及抗结块性研究[J].食品研究与开发,2006,27(7):118-120.
- [9] 林弘通(日).乳粉制造工程[M].北京:轻工业出版社,1987:89.
- [10] GB 2760-1996 食品添加剂使用卫生标准[S].北京:中华人民共和国卫生部,1997.
- [11] 李里特.食品物性学[M].北京:中国农业出版社,1998:281-283.
- [12] 黄英雄,华聘聘.抗结剂在粉末油脂制品中的应用[J].中国油脂,2002,27(2):63-66.
- [13] Peleg M, Hollenbach A M. Flow conditioners and anti-caking agents[J]. Food Technology, 1984(3):93-102.
- [14] Hollenbach A M, Peleg M, Rufner R. Effect of four anti-caking agents on the bulk characteristics of ground sugar[J]. Journal of Food Science, 1982, 47:538-544.