

向地英,薛木易,邹丽红.铁炮百合离体再生体系的建立[J].江苏农业科学,2015,43(2):55-57.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.016

# 铁炮百合离体再生体系的建立

向地英,薛木易,邹丽红

(河北农业大学园艺学院,河北保定 071000)

**摘要:**以铁炮百合无菌苗的叶片、鳞片为外植体,进行铁炮百合再生体系的研究。结果表明:鳞片的诱导分化能力高于叶片,鳞片分化培养基( $MS + 0.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L NAA}$ 、 $MS + 1.0 \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L NAA}$ )的分化率高达 90.98%。用叶片为外植体,不同部位对不定芽的诱导影响较大,以叶片中部分化能力最强,上部次之,下部最差。叶片分化培养基为  $MS + 1.0 \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L NAA}$ ,分化率为 85.36%。 $2,4-D$  浓度对愈伤组织的诱导影响显著,愈伤诱导培养基以  $MS + 0.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L } 2,4-D$  为佳,愈伤率达 80% 以上。

**关键词:**铁炮百合;离体再生;鳞片

**中图分类号:** S682.2<sup>+</sup>65.04<sup>+</sup>3;Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0055-03

铁炮百合(*Lilium longiflorum*)原产于我国台湾,是重要的切花材料,其花朵极香,含有芳香油,可作香料,具有极高的观赏价值、经济价值<sup>[1-2]</sup>。传统杂交育种技术因周期长,短期内无法培育出新的品种以满足需求。植物的转基因育种技术通过抑制内源基因或导入外源基因而定向改造植物性状,突破了物种间的界限,创造出新种质,大大缩短育种进程。高效离体再生是转基因的基础环节。近年来,很多学者选用珠芽、幼茎段、叶片、鳞片等不同外植体尝试百合的组织培养<sup>[3-5]</sup>。关于铁炮百合的高效再生报道较少。本试验以铁炮百合组培苗叶片为材料,对不同外植体、不同激素配比进行研究,选出诱导愈伤、分化不定芽能力高的培养基类型,建立铁炮百合高效离体再生体系,旨在为铁炮百合遗传转化体系的建立奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为铁炮百合无菌苗。

### 1.2 方法

**1.2.1 不定芽的增殖** 取长 3~5 cm 的不定芽接种于继代培养基  $MS + 0.7 \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L NAA}$  中,附加蔗糖 3%、琼脂 0.6%,pH 值为 5.8。培养条件为温度( $25 \pm 1$ )℃,光照周期 12 h/d,光照度 2 000 lx(约 1 个月继代 1 次)。

**1.2.2 再生苗小鳞片、叶片诱导分化培养基的预筛选** 取再生小植株小鳞茎上的外层鳞片及叶片,接种在不同浓度激素组合的分化培养基中,培养基为  $MS + 6-BA$  (0、0.5、1.0) mg/L +  $NAA$  0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L、 $MS + 6-BA$  (0.5、1.0) mg/L +  $NAA$  0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L、 $MS + 6-BA$  1.0 mg/L +  $NAA$  1.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L。培养条件为温度( $25 \pm 1$ )℃,光照周期

12 h/d,光照度 2 000 lx,30 d 后统计愈伤分化情况。

**1.2.3 叶片不同部位的诱导能力** 切取叶片上、中、下 3 段,在相同培养基类型及相同环境条件下培养,培养基类型为  $MS + 1.0 \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L NAA}$ 、 $MS + 0.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.5 \text{ mg/L NAA}$ ,黑暗条件下培养,定期观察其生长情况。

**1.2.4 再生苗鳞片的分化能力** 将再生植株苗上的小鳞片放在  $MS + (0.5、1.0、2、5、10) \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L NAA} +$  蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L 培养基内培养。培养条件为温度( $25 \pm 1$ )℃,光照周期 12 h/d,光照度 2 000 lx,定期观察其生长情况。

**1.2.5 不同浓度 2,4-D 对叶片基部诱导分化能力的影响** 切取叶片的基部接种于  $MS + 0.5 \text{ mg/L } 6-BA + (0.2、3.0) \text{ mg/L } 2,4-D$ 、 $MS + (0、1.0) \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L } 2,4-D$ 、 $MS + 3.0 \text{ mg/L } 2,4-D$  培养基内暗培养,定期观察其生长情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 鳞片、叶片诱导分化培养基预筛选

以分化率、诱导率、生长势为指标筛选出适宜的培养基,比较鳞片与叶片的诱导分化能力。鳞片的诱导分化能力明显高于叶片。鳞片以  $MS + 1.0 \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L NAA}$ 、 $MS + 0.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L NAA}$  培养基为佳,叶片以  $MS + 1.0 \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L NAA}$ 、 $MS + 0.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.5 \text{ mg/L NAA}$  培养基为佳。

### 2.2 叶片不同部位诱导分化能力比较

叶片在培养基上培养一段时间后,叶片边缘出现少量愈伤组织,20 d 后愈伤组织表面出现白色芽点,再经过一段时间,芽点处形成大小、长短不一的不定芽,不定芽均为白色(图 1)。叶片不同部位分化能力不同,叶片中部分化率最高,上部次之,下部分化率最低(表 1)。 $MS + 1.0 \text{ mg/L } 6-BA + 0.2 \text{ mg/L NAA}$  比  $MS + 0.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.5 \text{ mg/L NAA}$  培养基对叶片诱导分化能力强。

### 2.3 不同激素比对鳞片分化的影响

以分化率、丛芽数及芽生长势为指标,调整 6-BA、NAA

收稿日期:2014-10-13

基金项目:河北省保定市科技项目(编号:12ZF073)。

作者简介:向地英(1978—),女,重庆云阳人,博士,讲师,主要从事观赏植物抗逆生理研究。E-mail:43823526@qq.com。



图1 暗培养得到的不定芽

的比例,筛选出最适合诱导不定芽的培养基,鳞片在培养基上培养一段时间后,鳞片基部膨大,15 d 后,可见嫩绿色的芽点,25 d 后,芽点处形成大小、长短不一的不定芽或丛芽。5.0、10 mg/L 6-BA 培养基中外植体变化缓慢,其中以 10 mg/L 6-BA 最慢,30 d 后仍只见鳞片基部膨大,60 d 后其芽分化量少且矮。综合不定芽生长情况可知,0.5、1.0 mg/L 6-BA 等 2 种培养基较适宜(表 2、图 2)。

2.4 2,4-D 浓度对叶片分化能力的影响

2,4-D 既可以诱导植物体细胞胚的发生,也可以抑制体细胞胚的发育。本试验中,在仅有 2,4-D 作为诱导分化激素的培养基中,诱导率都不高。培养 75 d 后,除了 2,4-D

表 1 60 d 铁炮百合不同部位叶片分化能力

6-BA + NAA (mg/L)	叶片部位	愈伤诱导率 (%)	分化率 (%)	不定芽数 (个)	褐化率 (%)	芽粗 (cm)	芽高 (cm)
1.0 + 0.2	上	5.00	77.50	1.74	5.00	0.31	0.76
	中	9.80	85.36	1.57	11.81	0.33	0.75
	下	21.82	54.09	1.24	39.21	0.28	0.51
0.5 + 0.5	上	5.00	70.00	1.58	10.00	0.32	1.63
	中	14.00	76.00	1.39	0.08	0.36	1.19
	下	26.41	43.40	1.26	28.30	0.28	0.55

注:愈伤诱导率=产生愈伤的叶片数/总叶片数×100%;分化率=分化不定芽的叶片数/总叶片数×100%;褐化率=褐化的叶片数/总叶片数×100%;不定芽数=分化的总芽数/外植体数×100%。下表同。

表 2 60 d 不同激素对比对铁炮百合鳞片诱导分化能力的影响

6-BA + NAA (mg/L)	愈伤诱导率 (%)	分化率 (%)	不定芽数 (个)	褐化率 (%)	苗粗 (cm)	苗高 (cm)	叶数 (张)
0.5 + 0.2	9.02	90.98	1.73	1.82	0.28	1.94	2.96
1.0 + 0.2	9.09	90.91	1.66	1.82	0.29	1.56	2.90
2.0 + 0.2	10.91	87.27	4.46	0	0.26	1.74	2.83
5.0 + 0.2	7.14	91.07	5.90	3.57	0.22	0.84	2.52
10.0 + 0.2	17.86	60.71	2.82	19.64	0.24	0.70	1.69



图2 诱导出的不定芽

0.2 mg/L + 6-BA 0 mg/L 培养基上有分化外,其余 4 种培养基均不分化不定芽(表 3)。培养 10 d 后,基部叶片略微膨大,20 d 后其上出现少量的愈伤组织,愈伤组织数量逐渐增多,愈伤组织块逐渐增大(图 3、图 4)。

2.5 暗培养与光培养对叶片分化能力的影响

光培养、暗培养对铁炮百合叶片的分化有明显影响。在相同的培养基中,暗培养的不定芽分化率显著高于光培养,且暗培养比光照条件下培养叶片分化丛芽数多,芽也更健壮。所以,暗环境比光照环境更有利于叶片分化不定芽。

表 3 75 d 不同浓度 2,4-D 对铁炮百合叶片基部诱导分化能力的影响

2,4-D + 6-BA (mg/L)	诱导率 (%)	分化率 (%)	愈伤组织长 (cm)	愈伤组织宽 (cm)
0.2 + 0	25.29	1.15	0.75	0.52
3.0 + 0	41.11	0	0.75	0.52
0.2 + 0.5	80.32	0	0.61	0.33
3.0 + 0.5	48.68	0	0.46	0.32
0.2 + 1.0	59.39	0	0.62	0.36



图3 高浓度 2,4-D 诱导的愈伤组织



图4 2,4-D 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L培养基上的愈伤组织

3 结论与讨论

有研究表明,NAA 与 6-BA 组合对很多百合品种的不定芽诱导效果较好<sup>[6-7]</sup>。较高浓度的分裂素与较低的生长素可以促进不定芽的分化<sup>[8]</sup>。本试验结果表明,低浓度 6-BA 下鳞片分化率显著高于 10 mg/L 6-BA 鳞片的分化率,10 mg/L 6-BA 培养基诱导的不定芽数少,诱导率低,且长势较弱,可能是因为过高的 6-BA 抑制了不定芽的分化。以往铁炮百合组织培养中,多数学者采用鳞片作为外植体,但由于鳞茎长期生长在土壤中,导致病原菌多,以致外植体很难彻底消毒。以叶片或花部等组织作为外植体可以大大降低污染率。本试

表 4 30 d 暗培养与光培养对铁炮百合叶片诱导能力的影响

培养条件	愈伤诱导率 (%)	不定芽分化率 (%)	不定芽数量 (个)	褐化率 (%)	芽高 (cm)	根数 (条)
1-光	36.15	19.23	1.16	12.31	0.81	0.01
1-暗	13.74	84.50	2.56	18.99	0.69	0.12
2-光	35.59	22.03	1.15	0	0.52	0.03
2-暗	11.81	87.80	2.44	15.43	1.13	0.50

注:1 代表 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 培养基;2 代表 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 培养基。

验结果还表明,叶片不同位置的再生率不同,中部分化不定芽的能力最强,达 85.36%,这与王杰等的结论<sup>[9]</sup>类似。光照条件对外植体分化有很大影响。曹孜义等认为,有的材料适合暗培养,有的适合光培养,暗光更有利于愈伤组织的诱导形成<sup>[10]</sup>。王杰等认为,光培养对麝香百合胚性愈伤组织长势、体积增长、增殖系数有显著的促进作用。本试验中,暗培养比光照条件更有利于铁炮百合叶片诱导不定芽。2,4-D 常用于诱导愈伤组织与促进其生长<sup>[11]</sup>。在 2,4-D 对叶片分化的诱导试验中,2,4-D 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 培养基中,愈伤组织诱导率达 80%,远高于其他浓度组合。本试验利用 2,4-D 诱导的叶片形成愈伤组织,不能分化不定芽,可能由于 2,4-D 抑制体细胞胚的发育所致<sup>[12]</sup>。综上所述,铁炮百合鳞片的诱导分化能力高于叶片,鳞片分化培养基以 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA、MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 为宜。叶片分化培养基以 MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 为宜。叶片的不同部位对不定芽的诱导影响较大,以叶片中部分化能力最强,分化率为 82.36%,上部次之,下部最差。2,4-D 浓度对愈伤组织的诱导具有显著影响,愈伤诱导培养基以 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 为佳,愈伤率达 80% 以上。

参考文献:

[1] 彭昌操,赵小兰. 麝香百合离体繁殖与移栽技术研究[J]. 湖北民

族学院学报:自然科学版,2000,18(4):7-9.  
[2] 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,1991.  
[3] 余桂红,马鸿翔,周森平,等. 百合农杆菌介导的遗传转化受体系统的建立[J]. 江西农业学报,2004,16(2):15-19.  
[4] 刘菊华,金志强,徐碧玉,等. 龙牙百合的植株再生与遗传转化[J]. 分子植物育种,2003,1(4):465-474.  
[5] Hoshi Y, Kondo M, Mori S, et al. Production of transgenic lily plants by agrobacterium-mediated transformation[J]. Plant Cell Rep, 2004,22:359-364.  
[6] 张延龙,徐炎,王洁纯,等. 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.  
[7] 张艺萍,屈云慧,熊丽,等. 百合叶片离体不定芽发生和快繁技术研究[J]. 西北农业学报,2006,19(4):751-754.  
[8] 许洁婷,王月,唐克轩. 麝香百合花部组织离体培养与植株再生[J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2008,26(1):13-16.  
[9] 王杰,刘国锋,包满珠. 麝香百合胚性愈伤组织状态的调整与植株再生[J]. 园艺学报,2008,35(12):1795-1802.  
[10] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,2002:238.  
[11] 王冬梅,黄学林,黄上志. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学通讯,1996,32(5):373-377.  
[12] 曾泉,徐子勤. 几种匍匐剪股颖成熟胚愈伤组织诱导及植株再生[J]. 西北植物学报,2006,26(10):2033-2038.