·实验研究·

一种崂山百合的离体快速繁殖技术*

韩 怡[1] 任 强[2] 郭道森[1] 刘 毓[3] 李荣贵[1△]

(1 青岛大学生物系 山东 青岛 266071;2 山东师范大学生命科学学院 山东 济南 250014;
3 济南市花卉苗木开发中心 山东 济南 250103)

摘要:以崂山百合的鳞茎为外植体,通过植物组织培养技术成功获得了再生植株,建立了该植物的快速无性繁殖体系。整个组织培养过程分为芽的诱导、根的诱导和移栽三个阶段。适合芽诱导的最佳外植体是:鳞茎基部,最适培养基是:1/2 MS + 0.5 mg/L NAA + 0.8 mg/L KT + 3 %蔗糖。用于生根的最佳培养基是:1/2 MS + 0.4 mg/L IBA + 3 %蔗糖。最适培养温度为 25 ℃.不同基质对组培苗移栽的成活率有一定影响,其中在珍珠岩上的移栽成活率为 98 %。

关键词:崂山百合;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S567.239 Q944. 6 **文献标识码**:B **文章编号**:1673-6273(2011)18-3453-05

A rapid propagation method for Lilium tsingtauense Gilg*

HAN Yi[1], REN Qiang[2], GUO Dao-sen[1], LIU Yu[3], LI Rong-gui[1△]

(1 Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2 College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 25001,China; 3 Jinan Development Centre of Floriplant, Jinan 250103, China)

ABSTRACT: Different parts of bulb from Lilium tsingtauense Gilg were used as explants to regenerate seedlings by tissue culture., and a rapid propagation method was established. The culture process could be constituted of three stages, which were induction of buds, induction of roots and transplant. The optimal medium for induction of buds was 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA + 0.8 mg/L KT + 3 %sucrose, while the optimal medium for induction of roots was 1/2 MS + 0.4 mg/L IBA + 3 %sucrose. The best culturing temperature was 25 ℃. Different transplant mediums had some effects on the survival rate of regenerated seedlings, and the survival rate of regenerated seedlings on perlite was 98%.

Key words: Lilium tsingtauense Gilg; Tissue culture; Propagation

Chinese Library Classification(CLC): S567.239,Q944. 6 Document code: B

Article ID:1673-6273(2011)18-3453-05

前言

百合以其"百年好合"的吉祥、团结、美满寓意,深为中国人民所喜爱。崂山百合又名青岛百合(Lilium tsingtauense Gilg),是一稀有物种,属百合科、百合属,为多年生单子叶草本植物。崂山百合株形独特,叶片轮生,颜色碧绿,花大而鲜艳,花瓣橙黄色或橙红色,上面有许多红色斑点,极具观赏价值;其鳞茎富含淀粉和氨基酸,为食用佳品之一;另外,崂山百合又常当作百合药用,具清心安神、润肺止咳的功效有润肺止咳、安神等功效。侯贵传等对崂山百合的生药特性进行了研究,结果发现,崂山百合药材比目前使用的百合商品药材鳞片小,颜色稍深。在其粉末的显微特征中,淀粉粒最为普遍,并常见梯纹增厚的导管碎片和薄壁组织碎片,表皮细胞碎片少见。从鳞茎中检测出 17 种氨基酸,其中 7 种氨基酸是人体必需的[1]。因此,崂山百合是一种开发利用价值很高的经济植物。目前,崂山百合只集中分布在青岛的崂山风景区一带,是崂山的一种特有植物。因其分布范围狭窄,对生长条件要求高,现已逐渐稀少,已被列入国家第二批稀有濒危植物名录。在自然条件下,青岛百合的结实率不高,种群的数量很难增长。近年来随着旅游资源的开发,崂山的植被逐渐遭到较大程度的破坏,使青岛百合的生境逐渐丧失,加之游客的肆意采摘和当地群众的过度采挖,从而使原来生长在这里的青岛百合数量迅速下降,面临绝迹的危险,亟待保护。

人工快速繁殖是目前保护濒危植物的行之有效的措施之一,赵宇等以野生的青岛百合鳞茎为扦插材料,在温度为 25℃,珍珠岩基质中,内层鳞片扦插效果最好[2]。近年来,用先进的组织培养方法来繁殖百合已经成为一种行之有效的方法。目前,国内外对崂山百合人工繁殖的研究较少。据报道,崂山百合栽培中存在着分球繁殖,数量有限;鳞片扦插易腐烂,成活率低,且易造成退化等问题[3]。本试验选用崂山百合的鳞片作为外植体进行组织培养,分别研究了不同植物生长调节剂、不同温度和 pH 值对外植体不定芽诱导、分化生根以及不同基质对移栽定植的影响,旨在寻找出一种崂山百合快速繁殖技术,为扩大崂山百合种群分布范围,保护其种质资源,合理开发和利用崂

* 基金项目:济科合字 2008D07061;山东省科技攻关项目(2010GG0020937)

作者简介:韩怡(1990-),女,生物技术专业在读本科

△通讯作者:李荣贵,E-mail: lrg@qdu.edu.cn

(收稿日期:2011-03-24 接受日期:2011-04-18)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

山百合提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

崂山百合于 2006 年 7 月 15 日采自崂山风景区潮音瀑景点附近的林下，带土移栽到实验室，室温，自然光照培养。实验时取出其鳞茎用于外植体。

1.2 实验方法

取崂山百合鳞片切块，自来水冲洗干净后，用 1%洗衣粉溶液浸泡 60-80 min，然后用自来水小流水冲洗 3-5 h，在超净工作台上用 75%酒精浸泡 1 min，投入 0.1 % 升汞溶液中消毒 10 min，其间不断摇晃，最后用无菌水冲洗 6-7 次，用无菌刀片将鳞片切成约 3× 3 mm 的小块进行接种。

1.3 培养条件

1.3.1 基本培养条件 所用固体培养基为添加了 30 g/L 蔗糖、0.7 %琼脂和不同种类不同浓度植物生长调节剂的改良 1/2 MS 培养基，115 ℃灭菌 20 min。接种外植体后置于光照培养箱内在合适温度下进行培养，光照强度约为 1000 Lux。

1.3.2 培养基 pH 值对外植体出芽的影响 配制添加了 0.5 mg/L NAA 和 1.0 mg/L BA 的 1/2MS 培养基, 用 0.1 mol/L NaOH 或 HCl 调节培养基的 pH，使 pH 分别为 4.5、5.5、6.5、7.5 和 8.5。在鳞茎的中部切块，接种。25℃，光照培养 30 d，统计出芽的外植体数量。

1.3.3 诱导芽分化的培养基的筛选 分别将外植体接种于含 0.5 mg/L NAA 与不同浓度 KT 或 BA(0.2~1.6 mg/L)的 1/2 MS 固体培养基，于光照培养箱内，25 ℃，培养 30 d，观察外植体上出芽情况，统计出芽率，出芽率 = 生长出芽的外植体数量 / 接种的外植体数量。

1.3.4 鳞茎不同部位作为外植体对芽诱导的影响 将崂山百合鳞片的顶部、中部或基部的外植体接种到含 0.5 mg/L NAA 与 0.8 mg/L KT 的 1/2 MS 固体培养基，pH 5.5，25 ℃，光照培养 30 d 后，统计出芽外植体的数量。

1.3.5 不同温度对芽形成的影响 将鳞茎基部外植体接种于含 0.5 mg/L NAA 与 0.8 mg/L KT 的 1/2MS 固体培养基，pH 5.5，分别在 15、20、25、30 和 35 ℃的光照培养箱内，光照培养若干天后，记录形成明显小芽的天数，统计出芽外植体的数量。

1.3.6 诱导根分化的培养基的筛选 将来源于鳞茎基部的外植体接种于含 0.2-0.8 mg/L IBA 或 2,4-D 的 1/2 MS 固体培养基，pH 5.5，在 25 ℃的光照培养箱内，光照培养 20d 后，统计生根外植体的数量，计算出根率。

1.3.7 不同基质对组培苗移栽成活率的影响 当组培苗的根生长到约 1.5-2 cm 时，即可打开封口膜，于室温、自然光条件下进行炼苗 5 d，然后取出组培苗，用自来水轻轻洗去根部的固体培养基，分别移栽到珍珠岩、细沙、园土或蛭石中，每种基质移栽 50 株，室温、自然散射光条件下培养，每天浇不含蔗糖和植物生长调节剂的 1/2 MS 培养基一次，30 d 后统计成活率。

2 结果

2.1 不同培养基 pH 值对外植体出芽的影响

崂山百合鳞茎切块在培养基上培养 2 周后，可见边缘有愈伤组织的形成，继续培养一周，在愈伤组织上长出了浅色的小芽。培养基的 pH 值对外植体成芽影响较大，在 pH 5.5 的培养基上出芽率最高，接种的 20 个外植体上，有 18 个出现小芽，出芽率达 90 % (图 1)，继续培养一周，小芽逐渐长大 (图 2A、图 2B) 。酸性条件对外植体的出芽较为有利，当 pH 为 8.5 时，出芽率迅速降低。

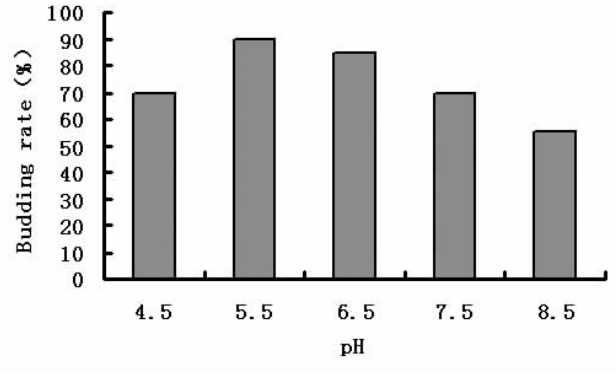

图 1 培养基 pH 对外植体出芽率的影响

Fig.1 Effect of pH on budding rate

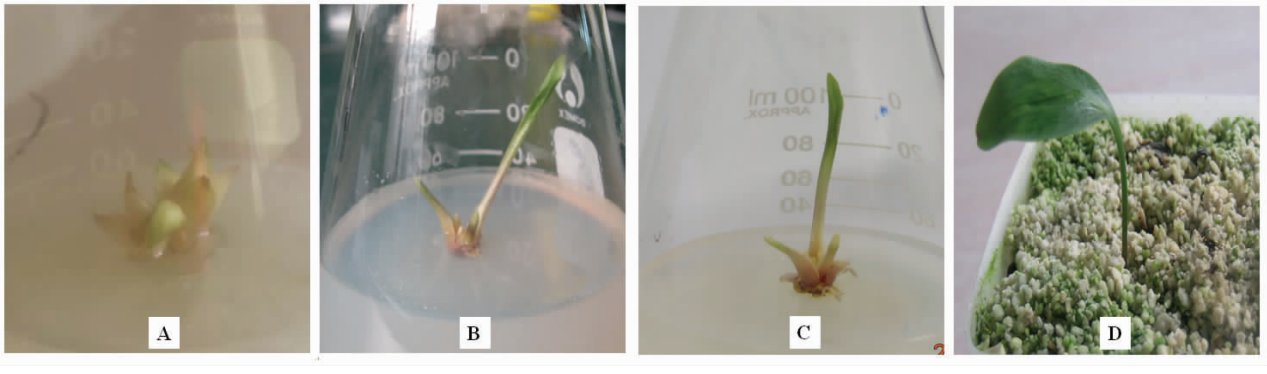

图 2 崂山百合组织培养不同阶段的形态

A,不定芽的诱导；B,不定芽继续生长；C,不定根的诱导；D, 移栽的组培苗

Fig.2 Different stages of tissue culture of Lilium tsingtauense Gilg

A, Budding induction; B, Growth of buding; C, Root induction; D,Transplanted seedling

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 鳞茎不同部位对芽诱导的影响

由于崂山百合的鳞茎较大，其顶部、中部和基部的厚度也不同，因此选取不同部位作为外植体可能会影响到不定芽的诱导。本实验的结果表明，来源于鳞茎三个不同部位的外植体在相同的培养基和相同的培养条件下，出芽率明显不同，其中以厚度大的基部作为外植体的出芽率最高，供实验的 20 个外植体上有 18 个长出小芽，出芽率达 90 % (表 1) 。

表 1 鳞茎不同部对外植体出芽率影响

Table 1 Effect of different parts of bulb on budding rate

鳞茎部位 Part of bulb	外植体数 Number of explant	出芽外植体数 Number of budding explant	出芽率 (%) Budding rate
顶部 Top	20	12	60
中部 Middle	20	15	75
基部 Base	20	18	90

2.3 不同培养基对外植体出芽率的影响

通过向培养基中添加不同的细胞分裂素 KT 或 BA 可影响外植体的出芽率。虽然这两种植物生长调节剂均可诱导出不定芽，但以添加 0.8 mg/L KT 的培养基的不定芽诱导率最高，最高达 95 %。虽然添加 BA 的培养基的外植体出芽率也可达到 85 %，但需要的浓度需达到 1.2 mg/L。因此，综合各方面考虑，本实验确定不定芽诱导的最适培养基为：1/2 MS + 0.5 mg/L NAA + 0.8 mg/L KT + 3 %蔗糖 (表 2) 。

表 2 不同培养基对外植体芽诱导的影响

Table 2 Effect of different mediums of bulb on budding rate

培养基编号 Number of medium	植物生长调节剂 (mg/L) Plant growth regulator (mg/L)			外植体数 Number of explant	出芽外植体数 Number of budding explant	出芽率 (%) Budding rate
	NAA	KT	BA			
1	0.5	0.4	-	20	15	75
2	0.5	0.8	-	20	19	95
3	0.5	1.2	-	20	12	60
4	0.5	1.6	-	20	12	60
5	0.5	-	0.4	20	11	55
6	0.5	-	0.8	20	14	70
7	0.5	-	1.2	20	17	85
8	0.5	-	1.6	20	15	75

2.4 不同培养温度对外植体出芽的影响

培养温度对外植体形成芽的速度和效率影响很大。实验结果表明，当温度低于 25 ℃时，随着培养温度的升高，形成芽的时间越短，出芽率也越高；这时进一步提高培养温度，形成芽的速度更快，但出芽率明显降低，部分外植体变褐萎缩。25 ℃时，外植体形成明显小芽需要 25 d，外植体的出芽率可达 100 % (表 3) 。

表 3 培养温度对外植体不定芽形成的影响

Table 3 Effect of different temperatures of bulb on budding rate

培养温度 (℃) Temperature (℃)	外植体数 Number of explant	出芽外植体数 Number of budding explant	出芽率 (%) Budding rate(%)	成芽时间 (d) Budding Time (d)
15	20	14	70	47
20	20	16	80	36
25	20	20	100	25
30	20	17	85	20
35	20	12	60	18

2.5 不同培养基对不定根形成的影响

当外植体周围的芽生长到 1 cm 左右时，转接到生根培养基上，培养 2 周后在芽的底部生长出白色的不定根 (图 2C) 。在考察 IBA 和 2,4-D 对不定根生成的影响时，结果表明，不定芽

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在添加了这两种植物生长调节剂的培养基上都可获得超过 90 %的生根率,但 IBA 的效果更好一些,本实验因此确定最适的生根培养基为:1/2 MS + 0.4 mg/L IBA + 3 %蔗糖(表 4)。

表 4 不同培养基对不定根诱导的影响

Table 4 Effect of different mediums of bulb on induction of root

培养基编号 Number of medium	植物生长调节(mg/L) Plant growth regulator (mg/L)		不定芽数 Number of bud	生根芽数 Number of root	生根率(%) Rooting rate(%)
	IBA	2,4-D			
1	0.2	-	20	19	95
2	0.4	-	20	20	100
3	0.6	-	20	20	100
4	0.8	-	20	19	95
5	-	0.2	20	18	90
6	-	0.4	20	20	95
7	-	0.6	20	18	90
8	-	0.8	20	18	90

2.6 不同基质对组培苗移栽成活率的影响

本实验研究了珍珠岩、细沙、园土和蛭石四种常见基质对崂山百合组培苗移栽成活率的影响。结果表明,移栽到珍珠岩、细沙和蛭石中的再生苗取得了较高的成活率,分别为 98 %、96 %和 96 %(图 2D),而移栽到园土中幼苗的成活率较低,仅有 84 %(图 3),死亡的组培苗基本都在根部发生了腐烂,可能由于固体培养基没有完全去除干净,而园土内又含有大量细菌引起的。

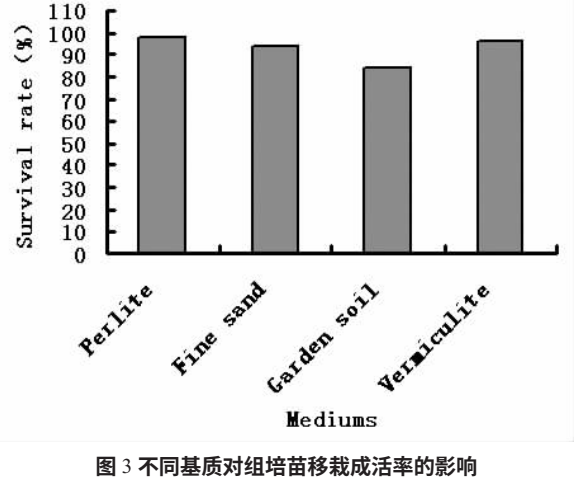

图 3 不同基质对组培苗移栽成活率的影响

Fig.3 Effect of different mediums on survival rate of transplanted seedlings

3 讨论

利用植物组织培养技术,目前已经建立了多种百合的快速繁育方法。赵祥云等将带有烟草斑病毒(TRSV) 的淡黄花百合(L. suphureum) 珠芽生长点进行脱毒,他认为用 0.3-0.8 mm 长的珠芽外植体诱导成愈伤组织的最适培养基为 MS,附加 BA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.25 mg/L 诱导率为 92.8 %;适合幼芽分化的培养基为 MS, 附加 BA 1.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L,分化率为 71.4 %[4]。王刚等报道,对于兰州百合,BA 浓度在 0.7-1.0 mg/L 之间,NAA 浓度相对应地在 0.07 和 0.20 mg/L 时有较好的芽诱导率可达 75%;对于野百合, BA 浓度在 0.4-0.6 mg/L,NAA 浓度相应地在 0.1-0.5 mg/L 有较高的芽诱导率[5]。一般的生根培养选用 1/2MS 培养基,并附加 0.5-1.0 mg/L 的 NAA 或附加 1.0mg/L 的 IAA[6]。据袁芳亭研究麝香百合时发现,在生根培养基中再添加 10.0 mg/L 的多效唑有促进生根和壮苗的作用;同时他们认为当试管苗根长 1 cm 时移栽至珍珠岩基质中易成活[7]。罗凤霞等认为,以不附加任何激素的 MS 培养基为新铁炮百合的最佳生根培养基[8]。

对于崂山百合的组织培养技术,国内研究的很少。赵秀芳研究了 5 种芽诱导培养基、5 种根诱导培养基对崂山百合组培苗的影响,筛选出了不定芽诱导的最佳培养基为 MS + BA 1.0-1.5 mg/L + NAA 0.2-0.4 mg/L;最佳生根培养基为 1/2 MS + NAA 0.3 mg/L 蛭石 1 份 + 珍珠岩 1 份 + 园土 1 份是崂山百合试管苗最佳的驯化移栽基质,在该基质中生根苗移栽成活率达 89 %[3]。赵强等也开展了崂山百合的组培技术研究,不定芽诱导的最适培养基为 MS + NAA 0.3 mg/L + BA 1.5 mg/L;以再生苗切段为外植体诱导不定芽的最适培养基为 MS + NAA 0.1 mg/L +BA 1.5 mg/L;最适生根培养基为 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L,但外植体的出芽率不高,仅有 80 %[9]。齐春敏等以崂山百合的叶片为外植体,通过组织培养得到了再生植株[10]。张俊芳等以青岛百合试管苗为试验材料,采用浸泡法用秋水仙素处理,获得了崂山百合的四倍体植株,四倍体植株叶片变大,根系粗壮,气孔显著增大而单位面积气孔数减少[8]。本实验在前人工作的基础上,对芽诱导和根诱导培养基进行了优化研究,得到的芽诱导最适培养基是:1/2 MS+ NAA 0.5 mg/L + KT 0.8 mg/L +3 %蔗糖;根诱导最适培养基是:1/2 MS + 0.4 mg/L IBA + 3 % 蔗糖,出芽率高达 95 %,生根率达 100 %,与以前的培养方法比,成本更低,操作也更简便。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献(References)

[1] 侯贵传,徐立,陈惠云,等. 青岛百合生药学特性的研究 [J]. 莱阳农学院学报,1991,8(2):143-146
Hou Gui-chuan, Xu Li, Chen Hui-yun, et al. A study on the pharmacognosical characteristics of Tsingtau Lily [J]. Journal of Laiyang Agricultural College, 1991,8(2):143-146

[2] 赵宇,刘庆华,王奎玲,等. 青岛百合扦插繁殖技术的研究 [J]. 山东林业科技,2007,(3):16-18
Zhao Yu, Liu Qing-hua, Wang Kui-ling, et al. Selection of cutting propagation of Llilium Tsingtauense [J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2007, (3):16-18

[3] 赵秀芳. 青岛百合组培快繁技术研究 [J]. 安徽农业科学,2005,33(2):254,341
Zhao xiu-fang. Research on rapid propagation by tissue culture of Lilium Tsingtauense [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 33(2): 254,341

[4] 赵祥云,程谦,邢尤美,等. 百合珠芽组培及脱毒研究 [J].园艺学报,1993,20 (3):284-288
Zhao Xiang-yun, Cheng Lian, Xing You-mei, et al. Studies on bulblet culture and devirus of Lilium sulphureum Baker [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1993,20 (3):284-288

[5] 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(自然科学版),2002,38(1):69-71
Wang Gang, Du Jie, Li Gui-ying, et al. Study on tissue culture and clonal propagation of Lilium davidii var.Unicolor (Hoog)Cotton and Lilium brownii F.E.Brown ex Miellez [J]. Journal of Northwest Normal University(Natural Science Edition), 2002, 38(1):69-71

[6] 崔德才,徐培文.植物组织培养与工厂化育苗 [M].北京:化学工业出版社,2003
Cui De-cai, Xu Pei-wen. Plant tissue culture and industralized breeding [M]. Beijing: Chemical Industry Press,2003

[7] 袁芳亭,陈龙清.麝香百合的叶片离体培养及植株再生 [J].湖北农业科学,2001,(3):50-51
Yuan fang-ting,Chen long-qing. Tissue culturing from leaves of Lilium longiflorum Thunb and plant regeneration [J]. Hubei Agriculture Sciences, 2001, (3):50-51

[8] 罗凤霞,徐桂华,金丽丽,等.新铁炮百合微繁的研究 [J].沈阳农业大学学报,2000,31(3):254-257
Luo Feng-xia; Xu Gui-hua; Jin Li-li, et al. Studies on the rapid propagation of Lilium longiflorum [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2000, 31(3):254-257

[9] 赵强, 李庆典, 赵玉岭.青岛百合的组织培养技术研究 [J].北方园艺,2007,(6):213-214
Zhao Qiang, Li Qing-dian, Zhao Yu-ling. Studies on tissue culture of Lilium tsingtauense Gilg [J]. Northern Horticulture, 2007, (6): 213-214

[10] 齐春敏,王奎玲,刘庆超,等. 青岛百合组织培养研究 [J]. 中国农学通报,2008,24(4):85-88
Qi Chun-min, Wang Kui-ling; Liu Qing-chao, et al. Research on tissue culture of Lilium tsingtauense Gilg [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(4):85-88

[11] 张俊芳,刘庆华,王奎玲,等. 秋水仙素诱导青岛百合四倍体研究 [J]. 核农学报,2009,23(3): 454-457
Zhang Jun-fang, Liu Qing-hua, Wang Kui-ling, et al. Tetraploid induction of Lilium tsingtauense by colchicines [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 23(3): 454-457

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net