

# 野生毛百合与松叶百合组培快繁技术研究

汪 娜<sup>1</sup>, 郭太君<sup>1</sup>, 李 雪<sup>1</sup>, 陈少鹏<sup>2</sup>

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林市林科院, 吉林 吉林 132013)

**摘 要:**以毛百合与松叶百合不同部位的鳞片为外植体,研究了不同消毒方式、不同激素组合和不同部位鳞片对毛百合和松叶百合不定芽诱导和增殖的影响。结果表明:毛百合用 75%酒精 30 s+30% 84 消毒液 15 min 消毒效果最好;鳞茎的最佳诱导培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA;最佳不定芽增殖培养基 MS+0.3 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA。松叶百合鳞茎的最佳诱导培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA;芽的增殖培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L 2,4-D。外植体取样部位以鳞茎中层鳞片的基部较好。

**关键词:**毛百合;松叶百合;组织培养

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>65 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0091-04

百合(*Lilium* spp.)属单子叶植物亚纲百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)植物的总称,为多年生鳞茎草本植物,是目前国内外广泛栽培的球根花卉之一<sup>[1-2]</sup>。毛百合(*L. dauricum*)和松叶百合(*L. cernuum*)主要产于东北长白山一带部分区域,这 2 种野生百合具有极强的抗旱性、耐阴性等优点,也是很好的育种材料。但有限的资源分布与近年来人们的随意采挖,导致这 2 种百合的野生种质资源趋于枯竭,已近濒危状态,影响了生态的平衡。张淑娟等<sup>[3]</sup>、解继明<sup>[4]</sup>通过研究得出百合组织培养的最适培养基为 MS<sup>[3-4]</sup>,庞晓霞等<sup>[5]</sup>、张彦妮等<sup>[6]</sup>以及李海云等<sup>[7]</sup>以鳞片为外植体,对毛百合和松叶百合组织培养进行了研究,但并没有对鳞茎不同部位鳞片和鳞片不同部位对不定芽诱导影响进行系统的比较研究。该试验利用毛百合和松叶百合进行组织培养,快速繁育百合种苗,旨在为这 2 个物种的种质资源保护以及规模化、工厂化生产脱毒百合种苗提供技术参数和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

该试验于 2011~2012 年在吉林农业大学进行。供试毛百合(*L. dauricum*)和松叶百合(*L. cernuum*)均从长白山地区野外采集种球,栽植于吉林农业大学园林花卉

基地内。于 2011 年 8 月选取无病虫害、无机械损伤、生长健壮的毛百合及松叶百合鳞茎不同部位的鳞片为试验材料。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体灭菌 先将鳞茎在洗衣粉水中淘洗 1 遍,再在流水下冲洗 30 min,洗净灰尘泥垢。然后剥离鳞片,再用 75%酒精浸洗 30、60 s,0.1%升汞溶液灭菌 5、8、11 min,或者用 30%的 84 消毒液消毒 8、12、15 min,其间不停震荡,之后用无菌水冲洗 5~6 次。

1.2.2 培养条件 以 MS 为基本培养基。诱导和分化培养基,附加蔗糖 30 g/L;生根培养基附加蔗糖 20 g/L。培养温度为(25±2)℃,光照强度为 1 000 lx,光源为荧光灯,光照时数 12 h/d。培养基 pH 5.8~5.9。

1.2.3 诱导培养 分别取鳞茎外层、中层和内层鳞片的端部、中部和基部为外植体,将外植体切成约 5 mm 的方形小块,在无菌条件下接种到培养基上。诱导培养基选择 MS 培养基,设置 6-BA(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)、NAA(0.1、0.3、0.5 mg/L)。

1.2.4 增殖培养 将新萌发出高 2~3 cm 的不定芽接种到继代增殖培养基上,继代增殖培养基以 MS 培养基为基础,再设置浓度为 6-BA(0.2~1.5 mg/L)、NAA(0.1~0.3 mg/L)、2,4-D(0.1、0.5 mg/L)进行调配,30 d 后统计增殖芽数并记录生长状况。

1.2.5 练苗移栽 对于生长健壮、高度达到 3 cm 左右的生根苗可以进行练苗,先半开口膜放置 1 d,去掉封口膜再放置 2~3 d,取出组培苗,洗净根部的培养基后,移栽到栽培基质上。在温室中养护 30 d,观察幼苗成活情况。

**第一作者简介:**汪娜(1987-),女,硕士研究生,研究方向为园林植物种质资源。E-mail:wangnawangna19870205@126.com.

**责任作者:**郭太君(1957-),男,硕士,教授,现主要从事园林种质资源与栽培生理生态等研究工作。E-mail:guoguo5557@126.com.

**基金项目:**农业部“吉林省农业野生植物调查”资助项目;吉林市科技局资助项目。

**收稿日期:**2013-01-16

## 2 结果与分析

### 2.1 不同灭菌方式对 2 种百合不定芽诱导的影响

由表 1 可知,随 75%酒精的消毒时间的增加,2 种百合鳞茎的污染率有较明显地降低,而成活率呈现先升高后降低,这主要是由于酒精消毒过久,导致鳞茎的死亡。当 0.1%升汞和 30% 84 消毒液的消毒时间增加时,污染率也有比较明显降低。但不管是 75%酒精,

表 1 不同灭菌方式和时间对不定芽诱导影响

Table 1 Effect of different modes and time on induction of bulbs

75%酒精 /s	0.1%升汞 /min	30% 84 消毒 液/min	污染率/%		成活率/%	
			毛百合	松叶百合	毛百合	松叶百合
30	5	—	40.90a	53.12a	62.37d	53.14e
30	8	—	20.70e	20.33f	75.17b	73.17a
30	11	—	18.17f	17.50g	45.10g	48.70f
60	5	—	24.23d	20.32f	36.57j	40.13h
60	8	—	17.50f	15.57h	41.33h	42.10g
60	11	—	12.23h	13.10i	40.17i	39.87h
30	—	8	36.60b	42.13b	56.07e	55.13d
30	—	12	23.43d	37.50c	68.16c	67.03c
30	—	15	20.23e	23.13e	77.13a	68.26b
60	—	8	26.27c	26.12d	53.17f	48.23f
60	—	12	13.53g	17.47g	32.60k	30.97i
60	—	15	9.47i	10.20j	18.47l	20.27j

注:同列数据不同小写字母代表在 0.05 水平上有显著差异。

Note: Different small letters represent significant difference at 0.05 level.

表 2

不同浓度 NAA 和 6-BA 组合对鳞片诱导不定芽的影响

Table 2 Effect of different concentrations of NAA and 6-BA hormones composing on induction of bulbs

培养基编号 No.	激素浓度/mg·L <sup>-1</sup>		毛百合			松叶百合		
	6-BA	NAA	芽诱导率/%	诱导芽数/个	幼苗长势	芽诱导率/%	诱导芽数/个	幼苗长势
1	0.5	0.1	20.30j	2.0	细弱、黄绿色	23.17l	2.2	细小、黄绿色
2	0.5	0.3	45.13g	3.2	较壮、浅绿色	34.10k	2.8	稍弱、绿色
3	0.5	0.5	98.30a	6.4	较粗壮、绿色	45.07h	3.1	较细弱、绿色
4	1.0	0.1	31.73h	2.1	细弱、黄绿色	72.73b	3.8	较粗壮、绿色
5	1.0	0.3	59.87e	5.3	健壮、绿色	96.87a	4.9	粗壮、绿色
6	1.0	0.5	68.00b	5.8	细弱、黄绿色	61.32d	4.5	健壮、浅绿色
7	1.5	0.1	50.86f	3.0	较弱、浅绿色	49.30g	2.5	细弱、浅绿色
8	1.5	0.3	62.67d	4.3	细弱、黄绿色	71.33c	3.8	较弱、黄绿色
9	1.5	0.5	64.10c	5.6	细弱、黄色	60.12e	4.4	细弱、黄绿色
10	2.0	0.1	21.87i	4.2	细弱、淡黄色	41.17i	2.7	较细弱、黄色
11	2.0	0.3	32.13h	5.4	细长、浅绿色	54.16f	3.2	细弱、黄绿色
12	2.0	0.5	15.11k	4.7	细弱、浅黄绿	36.67j	2.6	细小、黄色

### 2.3 不同部位的鳞片对不定芽诱导的影响

由表 3 可知,毛百合与松叶百合鳞茎不同部位鳞片对同一鳞片不同部位芽诱导率的趋势相同,即外层的鳞片对不定芽诱导率显著高于内层和中层鳞片,如毛百合的外层鳞片分别比内层和中层鳞片不定芽诱导率提高 1.10~4.31 倍;松叶百合的外层分别比内层和中层高出 1.04~7.04 倍。同一鳞片基部的不定芽诱导率显著高于端部和中部。如毛百合的基部鳞片分别比端部和中部鳞片不定芽诱导率提高 1.73~12.64 倍;松叶百合的基部分别比端部和中部鳞片不定芽诱导率高出 1.61~17.00 倍。但随着组织培养的进行,发现污染率不断上升,到第 30 天时,外层鳞片污染率达到 31.9%,中层鳞片污染率仅为 13.3%,其原因可能为外层鳞片虽然诱导率较高,但其所携带内生细菌较多,保存率以致

还是 2 种灭菌剂消毒时间的增加,百合的污染率都会随之降低。其中毛百合消毒效果最佳的组合是 75%酒精 30 s+30% 84 消毒液 15 min,此时,污染率为 20.23%,而成活率高达 77.13%;松叶百合灭菌效果最佳组合是 75%酒精 30 s+0.1%升汞 8 min,污染率为 20.33%,成活率为 73.17%。

### 2.2 不同激素组合对鳞片分化不定芽的影响

以 2 种百合的鳞片为外植体,接种到不同激素配比的 MS 培养基上,并对培养基进行编号。当培养到第 9 天时观察到 2 种百合鳞片上皆有小球状突起的芽点,多集中出现在鳞片切口边缘,与葛蓓亭等<sup>[8]</sup>观察一致。28 d 左右分化出不定芽,培养 30 d 后观察不定芽生长情况。从表 2 可以看出,毛百合 6-BA 浓度在 0.5 mg/L 时,NAA 浓度相应增加,诱导分化不定芽率较大,最高可达 98.30%,说明毛百合最适诱导培养为 3 号培养基 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA。松叶百合随着 NAA 浓度的增加,芽诱导率并没有呈现出分化率随之增加的趋势,而是先增加后降低的趋势,在 6-BA 浓度为 1.0 mg/L,NAA 为 0.3 mg/L 时,诱导分化不定芽数最多为 4.9,分化率最大为 96.87%。可见松叶百合最适诱导培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA。

表 3 鳞茎不同部位鳞片和鳞片不同部位对不定芽诱导影响

Table 3 Effect of squama from different parts and different parts of bulbs on multi proliferation

鳞片 位置	端部/%		中部/%		基部/%	
	毛百合	松叶百合	毛百合	松叶百合	毛百合	松叶百合
外层	15.93 <sup>a</sup> <sub>c</sub>	18.10 <sup>a</sup> <sub>c</sub>	46.27 <sup>a</sup> <sub>b</sub>	47.87 <sup>a</sup> <sub>b</sub>	80.03 <sup>a</sup> <sub>a</sub>	77.07 <sup>a</sup> <sub>a</sub>
中层	7.87 <sup>b</sup> <sub>c</sub>	6.23 <sup>b</sup> <sub>c</sub>	42.17 <sup>b</sup> <sub>b</sub>	37.57 <sup>b</sup> <sub>b</sub>	70.10 <sup>b</sup> <sub>a</sub>	72.83 <sup>b</sup> <sub>a</sub>
内层	3.70 <sup>c</sup> <sub>c</sub>	2.57 <sup>c</sup> <sub>c</sub>	18.47 <sup>c</sup> <sub>b</sub>	21.63 <sup>c</sup> <sub>b</sub>	46.80 <sup>c</sup> <sub>a</sub>	43.70 <sup>c</sup> <sub>a</sub>

注:同列数据不同小写字母代表在 0.05 水平上有显著差异,上标字母表示鳞茎不同部位鳞片的显著差异,下标字母表示同一鳞片不同部位显著差异。

Note: Different small letter in the same list represent significant difference at 0.05 level; the above-letter represent significant difference parts of squama of the same bulb scales; the below-letter represent significant difference at different parts of the same bulbs.

很低,所以最好采用的诱导部位为中层鳞片的基部。

## 2.4 不同激素处理组合对百合不定芽增殖的影响

将2种百合诱导出健壮无变异的芽移入表4所列的8种不同激素组合的培养基中,培养30 d后统计并观察新增的不定芽,当培养基中6-BA浓度为0.3 mg/L时,适量增加NAA浓度,毛百合平均增殖芽数有所提高,达到最多(4.50个),且幼苗生长均健壮。但当6-BA增加到1.5 mg/L时,配合2,4-D 0.5 mg/L时芽增殖数量降低,苗长势细弱。松叶百合在6-BA 0.6、0.9 mg/L时芽增殖数量大,幼苗长势健壮。当6-BA浓度为1.0 mg/L时添加少量2,4-D 2种百合都表现为健壮,且数量较多,说明在这个激素组合培养基中也能生长良好。

表4 不同激素处理组合对百合不定芽增殖的影响

Table 4 Effect of different hormones composing on multi-proliferation

培养基编号 No.	激素浓度/mg·L <sup>-1</sup>			平均增殖芽数/个		幼苗生长情况	
	6-BA	NAA	2,4-D	毛百合	松叶百合	毛百合	松叶百合
1	0.1	0.1		2.07h	1.81h	弱	弱
2	0.3	0.1		2.37g	2.36g	弱	弱
3	0.3	0.2		4.50a	3.01e	壮	弱
4	0.3	0.3		4.37b	3.30d	壮	弱
5	0.6	0.3		3.43d	3.83c	弱	壮
6	0.9	0.3		2.73f	4.00b	弱	壮
7	1.0		0.1	4.07c	4.54a	壮	壮
8	1.5		0.5	2.80e	2.57f	弱	弱

## 2.5 试管苗的生根与移栽

将增殖后的丛生芽切成单株,毛百合的芽接种到1/2MS+1.0 mg/L NAA+1.0 g/L活性炭的培养基上,松叶百合的芽接种到1/2MS+0.5 mg/L IBA+1.0 mg/L NAA+0.5 g/L活性炭的培养基中。待无菌苗根长至2~3 cm左右时,进行移栽。成活率可达到80%以上,并且移栽后植株长势良好。

## 3 讨论

近年来,很多文献中都提到6-BA与NAA配合使用能较好地分化不定芽,但具体的最适配比则依据不同培养目的、不同品种、不同外植体等因素而设置。对于毛百合来说,以诱导不定芽为目的时,以MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L组合效果较好,这与庞晓霞等<sup>[5]</sup>、张彦妮等<sup>[6]</sup>研究一致;松叶百合诱导不定芽时以MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L效果较好,与李海云等<sup>[7]</sup>研究的有所不同。松叶百合所需6-BA浓度偏高,说明品种不同,基因型不同,需要的激素浓度也不同。但同时发现,在这2种百合较高浓度的6-BA处理,诱导的鳞茎芽很易发生变异,产生变态苗或玻璃化现象,这可能与激素的生理特性有关。

以鳞片不同部位进行诱导培养时,鳞片基部诱导率显著高于中部和端部。庞晓霞等<sup>[6]</sup>、张彦妮等<sup>[6]</sup>以及李海云等<sup>[7]</sup>以鳞片为外植体,对毛百合和松叶百合组织培养进行了研究。但有关毛百合和松叶百合鳞茎不同部位鳞片或鳞片不同部位对不定芽诱导影响,尚缺少系统的比较研究。杭玲等<sup>[9]</sup>对龙牙百合、王刚等<sup>[10]</sup>对兰州百合鳞片的组织培养研究认为,鳞片诱导芽的能力从强到弱依次为外层、中层、内层,这与该试验得出结果相似。同时,研究表明鳞片不同部位诱导芽的能力为基部>中部>端部,其原因可能由于生长素分布不均匀造成鳞片诱导率的差异较大<sup>[11]</sup>。研究还发现,以外层鳞片为外植体的诱导芽的能力最强,但随着诱导培养时间的延长污染率不断上升,到第30天时,外层鳞片污染率达到31.9%,中层鳞片污染率仅为13.3%,由此提出2种百合以鳞片为外植体进行组织培养时,以中层鳞片基部较好。导致外层鳞片污染率增加的原因,可能为所携带内生细菌较多所致,尚需进一步证实。

经试验观察2种百合10代继代培养,在第6代以前,随着代数的增加,其分化能力呈上升趋势,但到第8代开始逐渐下降。可见如若工厂化育苗应尽量避免继代次数超过6代。

## 参考文献

- [1] 龙雅宜,张金政,张兰年.百合-球根花卉之王[M].北京:金盾出版社,2004.
- [2] 汪发绩,唐进.中国植物志(第14卷)[M].北京:科学出版社,1980:116-120.
- [3] 张淑娟,刘与明.新铁炮百合鳞片培养和快速育苗[J].江苏林业科技,1998(S1):137-138.
- [4] 解继明.百合组织培养[J].植物生理学通讯,1987(3):41.
- [5] 庞晓霞,雷家军,徐莹,等.毛百合鳞片离体培养与快速繁殖研究[J].辽宁林业科技,2009(1):35-36.
- [6] 张彦妮,张艳波.毛百合鳞片组织培养再生体系的建立[J].江苏农业科学,2012,40(8):63-64.
- [7] 李海云,王中伟,刘艳芝,等.松叶百合的组织培养及其植株再生[C].中国园艺学会球根花卉分会2008年会暨球根花卉产业发展研究会论文集,2008:160-166.
- [8] 葛蓓宇,杨青杰,吴萍,等.细叶百合组织培养植株再生[J].东北林业大学学报,2010,38(5):54-59.
- [9] 杭玲,苏宾,陈丽新,等.龙牙百合组培快繁技术研究[J].广西农业科学,2001(4):183-184.
- [10] 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.
- [11] 莫昭展,符韵林,戚萌,等.野百合鳞茎芽的诱导和增殖的初步研究[J].安徽农业科学,2007,35(31):9809-9892.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Lilium dauricum* and *Lilium cernuum*WANG Na<sup>1</sup>, GUO Tai-jun<sup>1</sup>, LI Xue<sup>1</sup>, CHEN Shao-peng<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Jilin Academy of Forestry Sciences, Jilin, Jilin 132013)

# 基于 ITS 序列的蔷薇纲二十六个物种遗传多样性分析

欧立军, 孙海军

(怀化学院 生命科学系, 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室,  
民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418008)

**摘要:**利用 ITS 序列对蔷薇纲的桔梗科、唇形科、菊科、豆科和蔷薇科 5 个科的 26 个物种进行了遗传多样性分析。结果表明:26 个物种的 ITS 序列全长为 580~815 bp, G+C 含量约为 60%; 基于 ITS 序列构建的系统树表明, 科内物种优先聚类, 桔梗科和唇形科优先聚类后再与菊科聚为 1 支, 豆科和蔷薇科为另 1 支。可见, ITS 可以将不同科的物种区分开来, 但对科间关系的确定存在一定局限性。因此, ITS 序列最好结合其它如形态学、结构学和其它分子标记等多种分析手段才能更加准确地分析科间亲缘关系。

**关键词:**科; ITS; 鉴定; 亲缘关系

**中图分类号:**S 336 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0094-03

经典植物分类学根据直观且丰富的形态特征研究分类群的特性, 建立了区别数十万种植物的演化体系, Takhtajan<sup>[1]</sup>、Thorne<sup>[2]</sup>、Dahlgren<sup>[3]</sup>、Cronquist<sup>[4]</sup> 和 Melchior<sup>[5]</sup> 的系统是现行的五大被子植物系统, 但环境和发育阶段对形态影响较大, 加上不同分类系统对形态指标主观侧重不同, 因此得出的结果不同而产生了各种争议; 采用其它特征或性状如同工酶、花粉超微结构和特殊的内含物等进行分类, 又由于这些特征的标记数量有限, 其分类结果同样存在争议。吴征镒等<sup>[6]</sup>于 1998 年提出了 1 个被子植物的八纲系统的新方案, 包括木兰纲、樟纲、胡椒纲、石竹纲、百合纲、毛茛纲、金缕梅纲和蔷薇纲等 8 个纲, 但纲内的分类系统有待进一步研究。

近 20 a 来, DNA 序列已被广泛应用于植物各分类

阶元的系统学研究中, 基于各种分子数据的分析已成为植物系统学研究的常用手段。ITS (Internal transcribed spacers) 是高等植物细胞核中编码 18S、5.8S 和 26S rDNA 的 1 个转录单位, 是进化速度较快的中度保守序列, 且各重复单元间具有同步进化的特点。因此, ITS 已经成为在序列水平上探讨系统发育和进化研究的有效手段, 广泛应用于被子植物的科内如蔷薇纲的桔梗科<sup>[7]</sup>、唇形科<sup>[8]</sup>、菊科<sup>[9]</sup>、豆科<sup>[10]</sup>和蔷薇科<sup>[11]</sup>等, 但少见应用于科间关系的报道。该试验对蔷薇纲的桔梗科 5 个物种、唇形科 3 个物种、菊科 6 个物种、豆科 6 个物种和蔷薇科 6 个物种等 26 个物种的 ITS 序列进行分析, 建立其分子鉴定标记, 探讨 ITS 序列在科间关系确定的有效性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

桔梗科的 5 个物种, 唇形科的 3 个物种, 菊科的 6 个物种, 豆科的 6 个物种和蔷薇科的 6 个物种。PCR 产物纯化采用生工生物工程(上海)有限公司的 DNA 纯化

**第一作者简介:**欧立军(1976-), 男, 湖南长沙人, 博士, 副教授, 研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail: ou9572@126.com.

**基金项目:**湖南省高校科技创新团队支持计划资助项目(2010212); 湖南省“十二五”植物学重点建设学科资助项目(201142)。

**收稿日期:**2013-01-16

**Abstract:** Taking different parts of squama of the bulb scales of *Lilium dauricum* and *L. cernum* as explants, the effect of different sterilize method and different hormones composing and different parts of a squama on their adventitious bud induction and multiplication were studied. The results showed the bulb scales treated with 75% alcohol for 30 s followed by 30% 84 disinfectant for 15 min exhibited the best sterilization effect; the suitable medium for bulb induction of *L. dauricum* was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L; the optimum medium for adventitious bud proliferation was MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.2 mg/L. The suitable medium for bulb induction of *L. cernum* was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L, MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L was better for adventitious bud proliferation. The better sampling sites of explants were the base of the bulbs central scales.

**Key words:** *Lilium dauricum*; *Lilium cernum*; tissue culture