

两个百合商业品种的组培快繁技术研究

吴青青¹, 窦云², 张朝君¹, 石乐娟¹, 胡小京²

(1. 贵州省园艺研究所, 贵州 贵阳 550006; 2. 贵州大学 园艺学院, 贵州 贵阳 550006)

摘要:以东方百合商业品种‘Sorbonne’、‘Corvara’的球茎鳞片为试材,采用MS培养基为基础培养基,研究不同浓度的植物生长调节剂及蔗糖对百合组培苗生长的影响,筛选最合适用配方。结果表明:最适外植体灭菌时间为10 min。‘Sorbonne’最佳不定芽诱导培养基配方为MS+30 g/L蔗糖+0.8%琼脂+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.1 g/L,增殖培养基配方为MS+30 g/L蔗糖+0.8%琼脂+6-BA 0.8 mg/L。‘Corvara’最佳不定芽诱导培养基配方为MS+30 g/L蔗糖+0.8%琼脂+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 g/L,增殖培养基配方为MS+30 g/L蔗糖+0.8%琼脂+6-BA 0.6 mg/L,使用高浓度蔗糖代替激素进行增殖,最佳培养基配方为MS+蔗糖 60 g/L+0.8%琼脂,最佳生根培养基配方为MS+30 g/L蔗糖+0.8%琼脂+NAA 0.1 g/L。

关键词:百合;外植体;组织培养

中图分类号:S 682.2⁺65 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)12-0096-04

百合(*Lilium* spp.)属百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)多年生草本球根花卉^[1],其花姿优美,花色丰富,不仅能作切花、盆花、捧花等,在园林绿地中也有应用,一直以来倍受人们的喜爱,市场前景广阔。目前我国的百合种球主要依靠进口,面临着成本高、携带异国病毒等问题。20世纪,国内很多单位已开始进行百合组培快繁技术研究^[2-3],实践证明组织培养是生产百合种球的有效途径^[4-6],只是目前生产中还有许多问题亟待解决。

该试验在前人工作基础上,选用东方百合‘Sorbonne’、‘Corvara’2个品种为试材,通过比较不同激素组合^[4-10]、不同糖浓度的培养基在组培苗生长过程中的效果差异,进而优化各环节技术,提高种球质量,降低生产耗时,以期为百合种球繁育及工厂化生产积累经验。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从‘Sorbonne’和‘Corvara’2个品种的种球中,选取

无病虫害、无机械损伤的鳞茎作为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的灭菌 剥去鳞茎表面的鳞片,选取里层的干净鳞片,用水冲洗约1 h,放于超净工作台,用75%的乙醇浸洗30 s后,0.1%的升汞溶液浸泡,处理时间分别为8、10、14、18 min,之后用无菌水浸洗3次后,接种在MS+30 g/L蔗糖+0.8%琼脂+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 g/L,pH 5.8的培养基上,4周后统计效果。

1.2.2 不定芽的诱导 将已经灭菌好的鳞片分别接种于不同浓度激素组合的培养基上,置于温度为20~25℃、光照为24 h条件下培养6周(以下所有处理所处培养环境均同)。不定芽诱导培养基配方为:MS+30 g/L蔗糖+0.8%琼脂+6-BA(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/L)+NAA 0.1 g/L,pH 5.8。

1.2.3 不定芽的增殖培养 初代培养所获得的不定芽,剥成单片后,转接到以下培养基中进行增殖,5周后统计结果。培养基分别为MS+30 g/L蔗糖+0.8%琼脂+6-BA(0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L)和MS+蔗糖(30、60、90、120 g/L)+0.8%琼脂,pH 5.8。

1.2.4 生根培养 选择生长健壮的百合小苗,接种于附加有NAA(0.1、0.2、0.3 mg/L)的MS+30 g/L蔗糖+0.8%琼脂的培养基中,30~35 d后观察并统计结果。

1.2.5 移栽 经90 d低温冷藏后,将小苗移栽到基质上,统计成活率。

第一作者简介:吴青青(1982-),男,硕士,助理研究员,研究方向为百合育种与种球繁育。E-mail:2899697856@qq.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160176);贵州省科技厅资助项目(黔科合J字[2010]2090号,黔科合NY字[2011]3074号);贵州省农学院专项资助项目(黔农科院院专项[2008]032号)。

收稿日期:2015-01-30

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对外植体污染率的影响

由表 1 可知,灭菌时间为 8 min 时,外植体的污染情况相对严重,‘Sorbonne’ 外植体污染率为 58.1%, ‘Corvara’ 污染率为 50.2%;灭菌时间为 10、14、18 min 时,污染率明显降低,随着浸泡时间的延长,灭菌效果增强。但是,在后续的观察中发现,18 min 处理组的鳞片都没有得到不定芽,10 min 组鳞片基部较早的长出了大量不定芽,诱导效果明显优于 14 min 组,综合各方面来看,75%乙醇浸洗 30 s 后用 0.1% 的升汞溶液浸泡 10 min 的灭菌方法较适于百合鳞片灭菌。

表 1 不同灭菌时间对‘Sorbonne’ 和 ‘Corvara’ 外植体污染率的影响

Table 1 Effect of different sterilizing time on the contamination rate of ‘Sorbonne’ and ‘Corvara’ explants

| 灭菌时间 Sterilization time/min | ‘Sorbonne’ 污染率 Contamination rate/% | ‘Corvara’ 污染率 Contamination rate/% |
|--------------------------------|--|---------------------------------------|
| 8 | 58.1a | 50.2a |
| 10 | 32.9b | 24.5b |
| 14 | 19.4c | 20.6b |
| 18 | 17.1c | 18.4b |

注:不同小写字母表示 5% 显著水平,下同。

Note: Different lowercase letters show significant difference at 0.05 level. The same below.

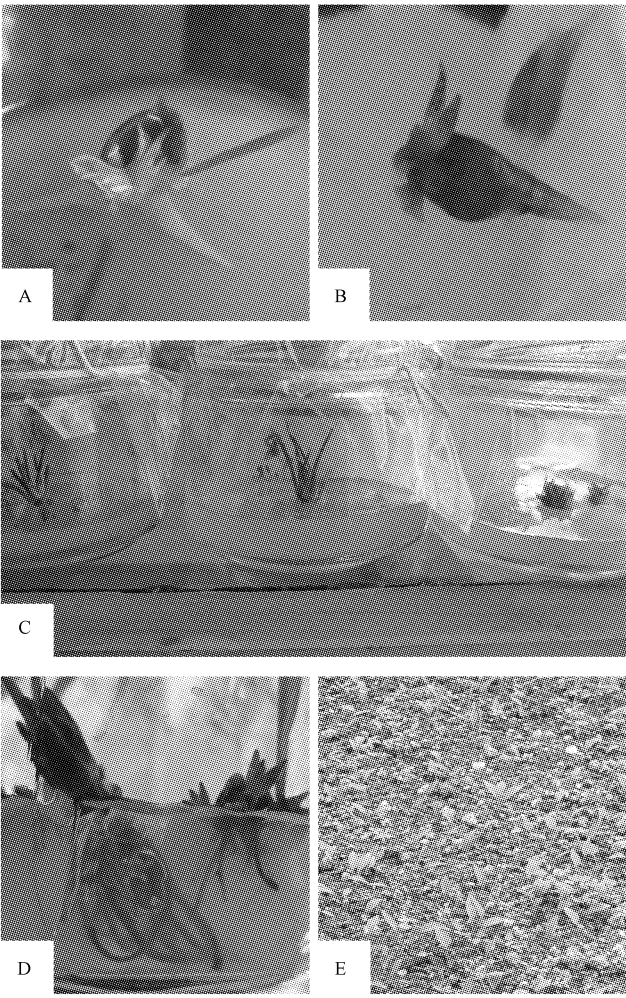
2.2 不同激素配比的培养基对不定芽分化率的影响

从表 2 可以看出,当 6-BA 浓度为 0.8 mg/L、NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,‘Sorbonne’ 不定芽的分化率最高,为 60.4%,与其它处理存在显著差异。在这个配方的培养基上最先分化出了不定芽,且不定芽生长势强,相比之下,其它配方的培养基在诱导效果上要差一些。另外,随着观察时间的增长,在 3 个月以后,基本所有的鳞片上都能生长出不定芽(图 1A),培养基在诱导效果上的差异,主要表现在时间先后上。试验结果表明,‘Sorbonne’ 不定芽诱导的合适培养基为:MS+30 g/L 蔗糖+0.8% 琼脂+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

表 2 不同激素配比的培养基对不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of different hormone compositions on the adventitious bud induction

| 激素配比 Hormone combination/(mg · L ⁻¹) | | ‘Sorbonne’ 平均诱导率 Rate of average induction /% | ‘Corvara’ 平均诱导率 Rate of average induction /% |
|---|-----|--|---|
| 6-BA | NAA | | |
| 0.2 | 0.1 | 34.5b | 98.6a |
| 0.4 | 0.1 | 26.7b | 63.9b |
| 0.6 | 0.1 | 41.1b | 34.1c |
| 0.8 | 0.1 | 60.4a | 28.1c |
| 1.0 | 0.1 | 25.2b | 36.1c |
| 1.2 | 0.1 | 27.7b | 36.8c |
| 1.4 | 0.1 | 33.1b | 41.3c |



注:A. 不定芽,B. 不定芽增殖,C. 图左为 60 g/L 培养基生长情况,中间为 90 g/L 培养基生长情况,图右为 120 g/L 培养基生长情况,D. 生根苗,E. 田间移栽苗。

Note: A. Adventitious buds, B. Value of adventitious buds, C. The left-hand figure presents the growth of 60 g/L medium, the figure in the middle presents the growth of 90 g/L medium and the right-hand figure presents the growth of 120 g/L medium. D. Rooting, E. Field transplanting seedlings.

图 1 ‘Sorbonne’ 的生长过程

Fig. 1 ‘Sorbonne’ growth process

琼脂+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

当 6-BA 浓度为 0.2 mg/L、NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,‘Corvara’ 不定芽的分化率最高,达到 98.6%,不定芽不仅长得最快,且生长势强。故‘Corvara’ 的不定芽分化合适培养基为:MS+30 g/L 蔗糖+0.8% 琼脂+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

2.3 不同激素对比对不定芽增殖的影响

该试验主要从增值率和新生不定芽的生长速度 2 方面来判断一个配方是否有效。从表 3 可以看出,随着 6-BA 浓度的逐渐升高,增值率也逐渐上升。不过从不定芽的生长情况来看,6-BA 浓度并不是越高越好,‘Sor-

bonne' 不定芽在 1.0 mg/L 浓度的培养基上,虽然增殖率高,但是不定芽普遍生长纤细(图 1B),长势不如 0.8 mg/L 旺盛,综合 2 个方面来看,增殖率略低的 6-BA 0.8 mg/L 配方为最优。同样的情况也出现在 'Corvara'

上。故 'Sorbonne' 适宜的增殖培养基为 MS+30 g/L 蔗糖+0.8%琼脂+6-BA 0.8 mg/L, 'Corvara' 为 MS+30 g/L 蔗糖+0.8%琼脂+6-BA 0.6 mg/L。

表 3 不同激素配比对不定芽增殖的影响

Table 3 Effect of different hormone compositions on the adventitious bud proliferation

| 6-BA / (mg · L ⁻¹) | 'Sorbonne' 平均增殖个数 Average number of proliferation/个 | 生长状况 Growth status | 'Corvara' 平均增殖个数 Average number of proliferation/个 | 生长状况 Growth status |
|--------------------------------|--|-----------------------|---|-----------------------|
| 0.4 | 2.1c | 良好,生长较慢 | 3.2b | 长势一般 |
| 0.6 | 2.4c | 生长良好 | 3.8ab | 长势较好,芽健壮整齐 |
| 0.8 | 3.7b | 生长良好,且比较健壮整齐 | 4.0ab | 生长良好 |
| 1.0 | 4.5a | 相对长得纤细 | 4.6a | 长势一般,且部分叶尖出现枯黄 |

2.4 不同蔗糖浓度对小苗生长的影响

由表 4 可知,浓度 30 g/L 和 60 g/L 的培养基增殖效果处于同一水平上,二者主要差异在不定芽的生长势上,60 g/L 要明显优于 30 g/L,且新生不定芽很多长出了鳞叶,整体小苗高度达到了 3 cm 左右;在蔗糖浓度 90 g/L 的培养基上,不定芽生长势最强,明显优于 60 g/L 的生

长效果,鳞片长出后生长迅速,鳞叶深绿,不过这个配方的新生不定芽平均数量反而较少,增殖效果不如前 2 种培养基;蔗糖 120 g/L 的培养基在增殖和不定芽生长方面表现最差,鳞片变短粗,尖端枯萎,畸形化明显,没有鳞叶,完全不适合作为增殖培养基。培养 8 周后观察,效果差异更加明显(图 1C)。

表 4 不同糖浓度对 'Sorbonne' 不定芽增殖的影响

Table 4 Effect of different sucrose concentrations on the adventitious bud proliferation of 'Sorbonne'

| 蔗糖浓度 Sucrose concentration/(g · L ⁻¹) | 平均增殖个数 Average number of proliferation/个 | 生长状况 Growth status |
|--|---|---|
| 30 | 2.2a | 新生不定芽幼嫩,高度 0.5 cm 左右,少数长出鳞叶 |
| 60 | 2.2a | 新生不定芽长势一般,高度为 0.5~1.0 cm,长出鳞叶较多,少量畸形 |
| 90 | 1.7b | 新生不定芽健壮整齐,数量偏少,高度为 1.0 cm 左右,鳞茎膨大,叶色浓绿,部分畸形 |
| 120 | 1.4b | 新生不定芽高度为 0.5 cm 左右,形态短粗,鳞叶消失,畸形严重 |

综合来看,采用 60 g/L 的蔗糖浓度在增殖和生长 2 个方面做到了均衡;而 90 g/L 的培养基上组培苗生长旺盛,但是增殖效果略差,30 g/L 的培养基则生长势较差,因为在组织培养中,蔗糖提供能量和碳源,30 g/L 的浓度可能无法满足植株生长的需求,故这 2 个浓度的配方都不合适。试验结果表明,使用高浓度的蔗糖不能很好的代替激素的增殖效果,却可以在不定芽的生长上进行调节,高浓度的蔗糖能够促进鳞茎的生长,但浓度过高,又会阻碍生长,这可能是渗透压的问题。

2.5 不同浓度 NAA 对苗生根的影响

由表 5 可知,随 NAA 浓度的增加, 'Sorbonne' 生根率逐渐下降,添加 NAA 0.1 mg/L 的培养基生根率最高,达到了 100.0%,小苗叶茂盛,根健壮。当 NAA 浓度为 0.3 mg/L 时,组培苗呈现根短小,部分叶尖枯黄等特征。从表 6 可以看出, 'Corvara' 与 'Sorbonne' 的变化

趋势基本相同,生长等特征也类似,可认为较高浓度的 NAA 对这 2 个品种根的分化和生长有抑制作用,故 2 种百合的最适生根培养基为 MS+30 g/L 蔗糖+0.8%琼脂+NAA 0.1 mg/L。

表 5 不同浓度 NAA 对 'Sorbonne' 苗生根的影响

Table 5 Effect of different NNA concentrations on the rooting of 'Sorbonne'

| NAA /(mg · L ⁻¹) | 生根率 Rooting rate/% | 生长状况 Growth status |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| 0.1 | 100.0a | 长势茂盛,叶长 5~6 cm,根健壮,长度 2~3 cm |
| 0.2 | 80.1b | 长势一般,叶长 3~4 cm,根长 1~2 cm |
| 0.3 | 70.1c | 长势较差,叶长 2~3 cm,部分叶尖微黄,根短小稀疏 |

2.6 移栽

将 2 个品种组培得到的小苗,经低温储存 90 d 打破休眠后移栽到田间,成活率在 80% 以上。

表 6

不同浓度 NAA 对‘Corvara’苗生根的影响

Table 6

Effect of different NNA concentrations on the rooting of ‘Corvara’

| NAA/(mg·L ⁻¹) | 生根率 Rooting rate/% | 生长状况 Growth status |
|---------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| 0.1 | 100.0a | 叶片长势茂盛,叶长 6 cm 左右,根长且健壮,长度 3~4 cm |
| 0.2 | 77.4b | 叶片长势一般,叶长 4~5 cm,根长长度 2~3 cm |
| 0.3 | 68.4b | 根短且根数少,叶片短小,长 2 cm 左右,部分叶片叶尖枯萎 |

3 讨论

在百合外植体培养中,材料选用以鳞片最为常见,是百合离体培养的最佳外植体。但是有些情况下,例如,一些百合的种球比较缺少,或者在新品种选育中,恰好优良的植株只有 1 株,这种情况下,考虑到风险问题,不应该选用种球作为外植体,可以选择子房等作为诱导材料,后续研究中将着重进行一些品种的子房外植体培养。

另外,百合组培苗的休眠问题也是影响成活的重要因素,东方百合在 20℃ 以上及高糖浓度情况下容易休眠,如果此时直接将小苗移栽到田中,大多数会腐烂死亡。通常的做法是通过低温储存来打破休眠^[11-12],一般来说,东方百合需要 2~3 个月的时间才能充分打破休眠,考虑到不同品种的差异,后续还需进一步的研究低温储存的合适时间长度。

参考文献

[1] 包满珠. 花卉学[M]. 北京:中国农业出版社,2003.

- [2] 彭东辉. 东方百合种球复壮技术研究[J]. 中国林副特产,2006,4(2):6-8.
- [3] 黄春辉,夏宜平,潘菊明,等. 浙江省山地繁育东方百合种球栽培技术[J]. 浙江农业科学,2006(1):34-36.
- [4] 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,2003,23(5):450-452.
- [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.
- [6] 丁兰,刘国安,田卫东,等. 新铁炮百合组织培养和快速繁殖研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版),2001,37(1):80-82.
- [7] 乔永旭,陈超,张永平,等. 东方百合“索邦”离体培养再生体系的建立[J]. 安徽农业科学,2007,24(12):2350-2354.
- [8] 解继明. 百合组织培养[J]. 植物生理学通讯,1987(3):41.
- [9] 王延秀,张金文,师桂英. 东方百合鳞片组织培养研究[J]. 甘肃农业科技,2009(2):8-11.
- [10] 杨增海,王聚瀛. 植物生长调节剂对百合组织培养繁殖的效应[J]. 西北农业大学学报,1987,15(3):72-77.
- [11] 宁云芬,龙明华,陶劲,等. 新铁炮百合鳞茎低温解除休眠过程中的形态和生理变化[J]. 广西农业生物科学,2008,27(1):66-69.
- [12] 管毕财,杨柏云,罗丽萍,等. 低温解除龙牙百合休眠过程中糖类物质的转化[J]. 南昌大学学报(理科版),2005,29(1):92-95.

Research on Rapid Propagation Technology of Two Lily Commercial Varieties

WU Qing-qing¹, DOU Yun², ZHANG Chao-jun¹, SHI Le-juan¹, HU Xiao-jing²

(1. Horticulture Research Institute of Guizhou, Guiyang, Guizhou 550006; 2. College of Horticulture, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550006)

Abstract: Taking the bulb scales of lily commercial oriental varieties of ‘Sorbonne’ and ‘Corvara’ as the test materials and MS medium as the minimal medium, the experimental effect and screen the optimal formula with addition of plant growth regulator and sucrose of different concentrations was compared to lily tissue cultured seedling. The results showed that the optimal sterilizing time of explant was 10 min. The optimal formula for the inducing medium of adventitious buds of ‘Sorbonne’ was MS+sucrose 30 g/L+0.8% agar+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.1 g/L, the suitable proliferation medium was MS+sucrose 30 g/L+0.8% agar+6-BA 0.8 mg/L. The optimal formula for the inducing medium of adventitious buds of ‘Corvara’ was MS+sucrose 30 g/L+0.8% agar+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 g/L, the suitable proliferation medium was MS+sucrose 30 g/L+0.8% agar+6-BA 0.6 mg/L. High concentration sucrose was adopted as replacement of hormone for proliferation in the proliferation test of adventitious buds and the optimal formula of medium was MS+sucrose 60 g/L+0.8% agar. The optimal rooting medium was MS+sucrose 30 g/L+0.8% agar+NAA 0.1 g/L.

Keywords: lily; explant; tissue culture