

# 百合远缘杂交种组培诱导及增大鳞茎的研究

孙晓梅, 孙华凯, 杨宏光, 王亚斌

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**以东方百合‘Siberia’与新铁炮百合‘Sayaka’远缘杂交种的组培苗为试材,用正交实验方法筛选出最适合该组培苗诱导鳞茎培养基,并进一步研究不同浓度的JA、ABA对鳞茎增大的影响。结果表明:MS+0.2 mg/L 6-BA+0.06 mg/L NAA+85 g/L 蔗糖为该远缘杂交种组培苗诱导成鳞茎的最适培养基,鳞茎平均直径达到10 mm;0.1 mg/L JA最有利于鳞茎的增大;0.5 mg/L ABA最适合鳞茎增大培养,ABA浓度越高鳞茎休眠越深。

**关键词:**百合;远缘杂交种;诱导鳞茎;培养基;鳞茎增大

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)22-0128-04

百合(*Lilium* spp.)在生产上主要采用分球、分株芽的繁殖方式,这些常规繁殖方法系数低,繁殖周期长,而且经多代繁殖以后,常造成种性退化,难以满足生产的需要<sup>[1]</sup>。利用组培技术是快速繁殖百合鳞茎的好方法,但是组织培养诱导鳞茎的试验所选的外植体大多为鳞片、叶片和茎段<sup>[2]</sup>。要培育远缘杂交种,用以上方法是不可行的。而以往杂交种的育成都是通过幼胚抢救后,在组培环境下生根然后再移栽,但是这种方法苗成活率低,且从移栽成活到形成商品球的时间长,而该研究以自己培育的远缘杂交种的组培苗为研究对象,通过组培诱导鳞茎的途径克服了上述方法的缺点。鳞茎的诱导和生长受很多因素的影响,它是在多因子间相互作用下形成的。大量研究表明,外植体来源、培养基成分、温度、光照和激素等与小鳞茎的形成有着密切的关系<sup>[3]</sup>。而对不同的百合品种,诱导其外植体产生鳞茎的培养基成分也不同,通过试验寻找更加合理的培养基成分是关键重要的。在组培环境下诱导出的鳞茎比较瘦弱,即使种植后能成活,但直到形成商品球也要几年的时间,通过组培方法,使鳞茎增大,不但可缩短形成商品球的年限,也有利于工厂化生产。

因此,该研究旨在寻找能缩短鳞茎形成的时间和使鳞茎增大的方法,为远缘杂交种百合试管生小鳞茎在生产上的应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于2009年5月至2010年1月,在沈阳农业大学林学院组培实验室进行,供试材料为东方百合‘Siberia’与新铁炮百合‘Sayaka’杂交种的继代组培苗。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 杂种组培苗诱导鳞茎最适培养基筛选试验** 选择整齐一致的组培苗,将丛生苗分成单株,剪去苗的上部,保留基部2 cm左右,将其接种在以MS为基本培养基,附加不同浓度的蔗糖、6-BA、NAA的9种培养基上,9种培养基通过正交实验 $L_9(3^4)$ 设计而得(表1),每种培养基接种10瓶,每瓶接种4株,3次重复,经过50 d的培养后观察测量每一种培养基所生鳞茎直径的大小。

**1.2.2 茉莉酸(JA)对鳞茎增大的影响** 将诱导所生的鳞茎接种在MS+85 g/L蔗糖+0~0.2 mg/L JA培养基上,JA浓度梯度为0(CK)、0.05、0.1、0.15、0.2 mg/L,每种培养基接种10瓶,每瓶接种3个鳞茎,3次重复。接种前去除鳞茎所生的根与鳞片叶,用游标卡尺测量鳞茎的直径,用电子天平称量鳞茎鲜重,经40 d培养后,去除鳞茎所生的根与鳞片叶,再次测量鳞茎的直径与鲜重,并计算鳞茎的增大倍数。

**1.2.3 脱落酸(ABA)对鳞茎增大的影响** 将诱导所生的鳞茎接种在MS+85 g/L蔗糖+0~1 mg/L ABA培养基上,ABA浓度梯度为0(CK)、0.05、0.1、0.5、1.0 mg/L,每种培养基接种10瓶,每瓶接种3个鳞茎,3次重复。接种前去除鳞茎所生的根与鳞茎叶,然后用游标卡尺测量鳞茎的直径,用电子天平称量鳞茎鲜重,经40 d培养后,去除鳞茎所生的根与鳞茎叶,再次测量鳞茎的直径与鲜重,并计算直径差与鲜重差及鳞茎的相对质量。

**第一作者简介:**孙晓梅(1970-),女,山东昌邑人,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事园林植物遗传与育种研究工作。E-mail: xiaomei7280@126.com。

**基金项目:**沈阳市科技攻关资助项目(10Y1104-3-00)。

**收稿日期:**2010-08-17

1.2.4 脱落酸(ABA)对鳞茎休眠的影响 选择鲜重在1 g 以上,直径超过10 mm 的鳞茎,将其接种在MS+30 g/L 蔗糖为基本培养基,附加不同浓度的ABA,ABA 浓度梯度为0.05 (CK)、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L,每瓶接种3 个鳞茎,每个处理接20 瓶,培养40 d后,把鳞茎从培养基中取出,洗净培养基,用多菌灵(2 g/L)浸泡30 min,种植于草炭:泥沙:珍珠岩=1:1:1 的基质中,放入(20±2)℃的玻璃温室中正常管理。每个处理20 个,3 次重复。10 周后以鳞茎的萌发率作为休眠判断标准,萌发率越高休眠程度越浅,反之则越深<sup>[4]</sup>。

1.2.5 数据统计分析方法 鳞茎的增大倍数=培养后的鲜重(直径)/培养前的鲜重(直径);鲜重差=处理前鳞茎的鲜重-处理后鳞茎的鲜重;直径差=处理前鳞茎的直径-处理后鳞茎的直径;鳞茎相对质量(%)=鳞茎鲜重/(鳞茎鲜重+鳞茎叶鲜重)×100%。采用DPS 软件处理数据,数据通过方差分析法进行显著检验,邓肯氏新复极差分析多重比较。

表 1 正交实验结果及其极差分析与多重差异比较

因素 试验号	A 6-苄基腺嘌呤 /mg·L <sup>-1</sup>	B 蔗糖 /g·L <sup>-1</sup>	C α-萘乙酸 /mg·L <sup>-1</sup>	D 空白	试验结果 鳞茎直径/mm
1	0.1	70	0.02	0	5.10 gG
2	0.1	85	0.06	0	8.50 bB
3	0.1	100	0.1	0	4.10 iI
4	0.2	70	0.06	0	7.80 cC
5	0.2	85	0.1	0	9.10 aA
6	0.2	100	0.02	0	7.00 eE
7	0.3	70	0.1	0	6.30 fF
8	0.3	85	0.02	0	7.30 dD
9	0.3	100	0.06	0	4.50 hH
K <sub>1</sub>	5.900	6.389	6.467		
K <sub>2</sub>	7.956	8.300	9.222		ƒ=59.7
K <sub>3</sub>	6.033	5.200	6.500		
R	2.0556	3.1	0.4556		

注:不同大写字母表示差异极显著(P<0.01),不同小写字母代表差异显著(P<0.05),下表同。

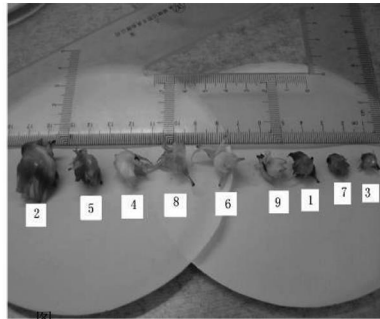


图 1 正交实验各组诱导鳞茎的结果

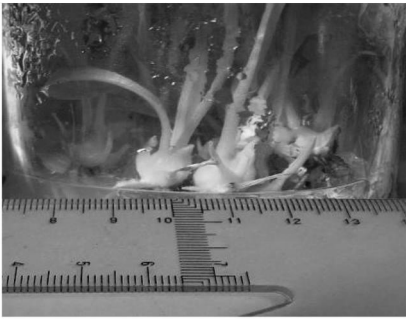


图 2 最适培养基诱导鳞茎的结果

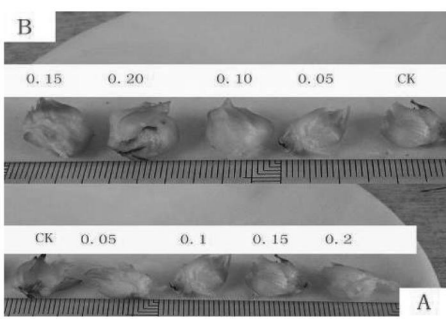


图 3 添加 JA 后的鳞茎变化情况

注:A 为培养前的鳞茎;B 为加入JA 培养后的鳞茎。

著的差异。由表2 可知,经0.1 mg/L JA 处理过的鳞茎直径增大倍数与0.15 mg/L JA 处理过的差异不显著,

2 结果与分析

2.1 鳞茎诱导最适培养基的筛选

接种后10 d 组培苗开始生根,35 d 后基部开始膨大并出现小鳞茎,以后快速膨大,50 d 后膨大生长不再明显,试验结果见表1 及图1。

由表1 中的极差值R 可看出,蔗糖的R 值最大为3.1,说明在诱导鳞茎的过程中蔗糖的影响效应最大,6-BA 影响效应次之,NAA 最小,即影响因素主次顺序为:B>A>C;由各个水平的K<sub>i</sub> 值可确定各因素的优劣顺序A<sub>2</sub>>A<sub>3</sub>>A<sub>1</sub>,B<sub>2</sub>>B<sub>1</sub>>B<sub>3</sub>,C<sub>2</sub>>C<sub>3</sub>>C<sub>1</sub>,最佳组合水平是A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>。由多重差异比较分析可知,第5 组处理结果与其它几组有极显著差异,为9 组处理中最佳培养基。经再次试验证明,诱导鳞茎产生的最佳培养基为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即MS+0.2 mg/L 6-BA+0.06 mg/L NAA+85 g/L 蔗糖,鳞茎平均直径达到10 mm(图2),比第5 组试验诱导产生的鳞茎大0.9 mm。

2.2 茉莉酸(JA)对鳞茎增大的影响

从表2 可看出,培养后所有处理组(含CK)的鳞茎直径与鲜重都有所增加,鳞茎直径增加最多的是JA 浓度为0.15 mg/L 的培养基,直径是原来的1.51 倍;而鳞茎鲜重增加最多的是JA 浓度为0.1 mg/L 的培养基,为原来的1.5 倍(图3)。

表 2 不同浓度 JA 诱导鳞茎结果

茉莉酸浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	培养前鳞茎 直径/mm	培养前鳞茎 鲜重/g	培养后鳞茎 直径/mm	培养后鳞茎 鲜重/g	鳞茎的增大倍数 直径比	鳞茎的增大倍数 鲜重比
0(CK)	7.2	0.78	8.0	0.83	1.11cC	1.06cC
0.05	7.0	0.75	9.7	1.10	1.39bB	1.46aAB
0.10	7.5	0.80	11.1	1.20	1.48aA	1.50aA
0.15	8.0	0.85	12.0	1.27	1.50aA	1.49abAB
0.20	8.2	0.90	11.4	1.15	1.39bB	1.28bB

对直径比、鲜重比进行方差分析可知,百合鳞茎在不同浓度JA 的处理下,其直径、鲜重增大倍数都有极显

著差异。由表2 可知,经0.1 mg/L JA 处理过的鳞茎直径增大倍数与0.15 mg/L JA 处理过的差异不显著,

增大倍数差异显著,与 0.15 mg/L JA 处理过的鳞茎增大倍数在  $P=0.05$ 、 $P=0.01$  水平上都有一定差异,与其它处理组(含 CK)有极显著差异。因此,JA 最佳处理浓度为 0.1 mg/L。

2.3 脱落酸(ABA)对鳞茎增大的影响

从表 3 可看出,鲜重差值与直径差值最大为 0.5 mg/L ABA 的处理,鳞茎相对质量最大的为 1.0 mg/L ABA 的处理。CK 组鳞茎质量有所增加,但由于所生鳞片叶较多,造成鳞茎的相对质量较低(图 4-A);当 ABA 浓度为 0.05 mg/L 时,鳞片叶长势较弱且叶片较薄,鳞茎相对质量增大(图 4-B);当 ABA 浓度为 0.1 mg/L 时,鳞片叶有少量出现,但很快就枯黄,鳞茎相对质量增大(图 4-C);当 ABA 浓度大于等于 0.5 mg/L 时,鳞片叶基本被抑制,鳞茎相对质量达到最高(图 4-D、E)。经方差分析可知,鲜重差与直径差都有极显著差异。对鲜重差与直径差进行多重差异比较分析可知,0.5 mg/L 处理与 0.1 mg/L 处理差异显著,与其它组差异极显著。因此,0.5 mg/L ABA 对鳞茎增大最为有利。ABA 达到 1.0 mg/L 时,对鳞茎的增大产生抑制。

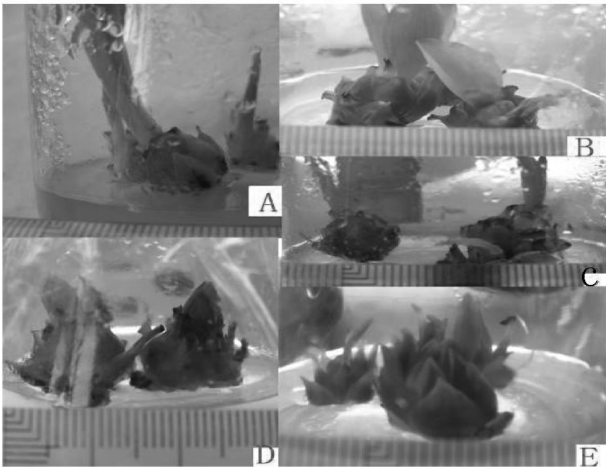


图 4 加入 ABA 培养后的鳞茎

注 A 为 CK;B 为 0.05 mg/L;C 为 0.1 mg/L;D 为 0.5 mg/L;E 为 1.0 mg/L。

表 3 不同浓度 ABA 诱导鳞茎的结果

ABA 浓度 /mg · L <sup>-1</sup>	鲜重差 /g	直径差 /mm	鳞茎相对质量 /%
0(CK)	0.32eC	3.4cC	68.63
0.05	0.44cB	4.0bB	76.46
0.1	0.48bAB	6.0aA	97.10
0.5	0.51aA	6.1aA	97.64
1.0	0.35dC	3.5dBC	99.89

2.4 脱落酸(ABA)对鳞茎休眠的影响

从表 4 可看出,培养基加入 ABA 后,随着 ABA 浓

度的增大,鳞茎的萌发率明显降低,浓度达到 1.5 mg/L 时萌发率为 0,0.05 mg/L(CK)处理组萌发率最高为 90%,但长势较弱,0.5 mg/L 处理组萌发率为 72%,但长势最好,说明 ABA 能够促进百合鳞茎休眠,且浓度越高,鳞茎的休眠程度越深(图 5)。休眠过深则会延长种球的生产周期。

表 4 ABA 对鳞茎休眠的影响

ABA 浓度/mg · L <sup>-1</sup>	鳞茎萌发率/%
0.05(CK)	90
0.5	72
1.0	21
1.5	0
2.0	0

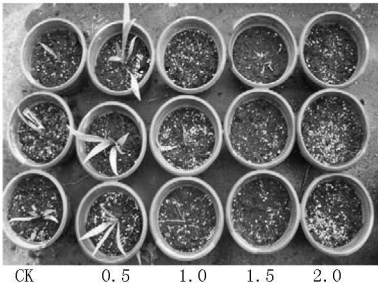


图 5 ABA 对鳞茎休眠的影响情况

3 讨论

该试验研究了蔗糖、6-BA、NAA 对百合远缘杂交种组培苗诱导鳞茎影响。结果表明,蔗糖是诱导鳞茎形成的主要因素,直接影响鳞茎形成和直径的大小,鳞茎的直径随着蔗糖浓度增大先是变大然后变小,这与王爱勤<sup>[3]</sup>等人的发现相一致。蔗糖浓度高时,有利于鳞茎的形成和增厚,但过高则进入休眠阶段<sup>[9]</sup>,其机理需要进一步试验。

激素 6-BA 是影响百合远缘杂交种组培苗形成鳞茎的第 2 个重要因素,但是对于不同的百合品种,不同的外植体而言,其诱导鳞茎产生的最佳浓度也不同,该研究选 6-BA 的最适浓度为 0.2 mg/L,而 Juon<sup>[7]</sup>等发现在 Casa Blanca 和 Tigrimum 百合品种中以 MS+0.5 mg/L BA 培养基对小鳞茎的形成效果最好。Nhut 认为 1.0 mg/L 6-BA 可促使百合茎节段形成较多的百合小鳞茎,究其原因可能是该试验所选的外植体自身所含的 6-BA 量较高,从而所选的 6-BA 浓度较低。

NAA 虽然在试验中对鳞茎的诱导作用不明显,但仍不可忽略。有报道,生长素 NAA 会影响试管鳞茎的形成和膨大。据 Pstimar D S<sup>[8]</sup>报道,基本培养基中附加 NAA 有助于鳞茎的生长;罗丽萍<sup>[9]</sup>等研究发现采用百合鳞茎做外植体,产生小鳞茎的最佳培养基为 MS+

0.5 mg/L NAA+2.0 mg/L GA。刘红美<sup>[10]</sup> 等发现湖北百合(产于贵州)鳞茎诱导的最佳培养基是 MS+0.3 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA。

JA 作为一种生长调节剂,参与植物多种形态发生(块茎形成、块根形成、鳞茎形成、卷须盘绕等)<sup>[11]</sup>,但是对它们在植物形态发生中的作用机制了解的不多。该研究中 JA 对鳞茎的增大起了显著的作用,以 0.1 mg/L 为最佳,这与邓柳红<sup>[3]</sup> 所研究的组培苗小鳞茎形成和膨大 JA 的最佳浓度在同一范围。推测其机制可能是茉莉酸类物质通过调节细胞分裂及细胞增大的方向来促进植物的形态发生。

低浓度的 ABA 可促进鳞茎增大,抑制鳞片叶产生,其机理可能是 ABA 能促使鳞茎休眠从而抑制了鳞片叶的产生,浓度为 1.0 mg/L 的 ABA 对鳞茎增大起了明显的抑制作用,这与赵海涛等<sup>[12]</sup> 对东方百合‘Siberia’试管结鳞茎的研究结果一致;而近些年来国外一些研究也表明,脱落酸(ABA)在百合试管鳞茎发育及休眠过程中具有重要作用<sup>[13-15]</sup>,高浓度的 ABA 不仅能促使鳞茎休眠,同时能抑制鳞茎的速度增大。因此,在百合鳞茎增大的过程中,选择适宜浓度的 ABA 是非常重要的,对休眠的鳞茎可低温处理打破其休眠。

参考文献

[1] 潘立军.百合组织培养成球的方法.中国 1903018A [P]. 2007-01-31.  
[2] 董志渊,郑思乡.百合的组织培养及在其育种中的应用[J].西部林业科学,2004,33(2):64-67.  
[3] 邓柳红.百合离体鳞茎形成的研究[D].海南:华南热带农业大学,2001.

[4] Kim K, Davelaar E, DeKlerk G J. Absciscic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro* [J]. Physiol Plant, 1994, 90: 59-64.  
[5] 王爱勤,周歧伟,何龙飞,等.百合试管结鳞茎的研究[J].广西农业大学学报,1998,17(1):71-75.  
[6] 梁建丽.东方百合试管鳞茎生长特性及移栽技术的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2006.  
[7] Joung H Y, Sung M S. In vitro Propagation of *L. oriental* hybrid ‘Casablanca’, and *L. leichthlinii* var. *tigrim* as influenced by growth regulators and cultural explant [J]. RDA Journal of Agricultural Science Horticulture, 1995, 37(1): 378-383.  
[8] Dennis P S, Peter D A, Harold F W. Over coming dormancy in *L. longiflorum* bulblets produced in tissue culture [J]. J. Amer Soc. Hort. Sci., 1982, 107(6): 1004-1007.  
[9] 罗丽萍,杨柏云,章敏华,等.百合的组织培养[J].中草药,2001,32(7):640-642.  
[10] 刘红美,令狐克勇,方小波.野百合试管鳞茎诱导与增殖的研究[J].农业科学与技术(英文版),2008(1):8928-8929.  
[11] Koda Y. Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events [J]. Physiologia Plantarum, 1997, 100: 639-646.  
[12] 赵海涛,刘春,明军,等.ABA 对‘西伯利亚’百合试管鳞茎发育及休眠的影响[J].园艺学报,2010,37(3):428-434.  
[13] Delvalle Paffen A, DeKlerk G J. The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. [J]. The effect of temperature. Physiol Plant, 1990, 80: 431-436.  
[14] Kim K, Davelaar E, DeKlerk G J. Absciscic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro* [J]. Physiol Plant, 1994, 90: 59-64.  
[15] Langens-Gerrits M, Nashimoto M S, Croesand A F, et al. Development of dormancy in different lily generated *in vitro* [J]. Plant Growth Regulation, 2001, 34: 215-222.

Study on the Bulblets Induced and Enlarged of Distant Hybrid of Lily by Tissue Culture

SUN Xiao-mei, SUN Hua-kai, YANG Hong-guang, WANG Ya-bin  
(Forestry College, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

**Abstract:** Distant hybrid of oriental lily ‘Siberia’ and *Lilium*×*formolongi* ‘Sayaka’ was cultured to find the best culture medium which can induce bulblets from tissue culture seedling of lily by means of orthogonal test method and further study different concentration of JA influence on the bulblets enlarged. The results showed that the MS+0.2 mg/L 6-BA+0.06 mg/L NAA+85 g/L Sucrose was the best culture medium for inducing bulblets. Average bulblets diameter was 10 mm. The best concentration of JA for bulblets enlarged was 0.1 mg/L; The best concentration of ABA for bulblets enlarged was 0.5 mg/L and the ABA concentrations higher, and the dormancy deeper of bulb.

**Key words:** Lily; distant hybrid; bulblets induced; culture medium; bulblets enlarged