

网络优先数字出版时间:2015-01-14

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20150114.1035.012.html>

兰州百合组织培养及快速繁殖技术研究* Studies on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Lilium davidii* var. *Unicolor* (Hoog) Cotton

张红岩,周 兴,莫勇生,唐 峰,孙文波**

ZHANG Hong-yan, ZHOU Xing, MO Yong-sheng, TANG Feng, SUN Wen-bo

(广西科学院生物研究所,广西南宁 530007)

(Biology Institute, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:【目的】建立适于兰州百合(*Lilium davidii* var. *Unicolor* (Hoog) Cotton)的快速无性繁殖技术,为食用兰州百合试管苗规模化生产提供技术参考。【方法】以球根鳞片为外植体,采用不同消毒方法、取材部位、接种方法和植物生长调节剂及其浓度配比,筛选适合的诱导、增殖和生根培养基。【结果】球根鳞片先用75%酒精处理后,用10%的次氯酸钠与0.13%的升汞等体积混合液消毒,再用0.13%升汞消毒为最佳消毒方式;接种选择与鳞茎盘相连的下部鳞片为初代培养的最佳外植体;外植体在MS+6-BA 1.5 mg/L+GA₃ 0.8 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L的培养基中,能诱导出较多长势健壮的不定芽;在MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L的培养基中,增殖倍数达1.25;而生根培养以MS+NAA 0.6 mg/L+IBA 0.1 mg/L为最佳,生根苗生长良好,生根率达100%。【结论】获得适合兰州百合快速繁殖的培养基配方,建立了兰州百合的快速繁殖技术。

关键词:兰州百合 外植体 鳞片 离体培养

中图分类号:S339.4 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2015)01-0049-05

Abstract:【Objective】The technology of rapid clonal propagation for *Lilium davidii* var. *Unicolor* (Hoog) Cotton was established. It can be used for *Lilium davidii* var. *Unicolor* (Hoog) Cotton tube seedlings factory production.【Methods】Using the bulb scales as the explants, the effects of different sterilization method, test types, inoculation methods, and plant growth regulators with different concentration on inducement and proliferation were compared.【Results】The results showed that the optimal disinfection method was 75% alcohol treatments followed with the mixture of 10% sodium hypochlorite and 0.1% corrosive sublimate (1:1) and 0.1% corrosive sublimate. The optimal explants for primary cultured was the lower scales that connect to vittata. The best induction medium was MS+6-BA 1.5 mg/L+GA₃ 0.8 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L. It could induce more and stronger shoots. The optimal scales medium for subculture was MS with 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The optimal medium for rooting was MS+NAA 0.6 mg/L+IBA 0.1 mg/L with 100% the rooting rate.【Conclusion】The optimal rapid propagation medium for *Lilium davidii* var. *Unicolor* (Hoog) Cotton was identified. The high tissue culture and rapid propagation system of *Lilium davidii* var. *Unicolor* (Hoog) Cotton was established.

Key words: *Lilium davidii* var. *Unicolor* (Hoog) Cotton, explant, scales, isolated culture

收稿日期:2014-10-12

修回日期:2014-12-09

作者简介:张红岩(1980-),女,助理研究员,主要从事植物组织培养及转基因方面的研究。

* 广西科学院基本科研业务费资助项目(12YJ25SWS22)资助。

** 通讯作者:孙文波(1976-),男,助理研究员,主要从事生物技术方面的研究,E-mail:swbley1320@163.com。

0 引言

【研究意义】兰州百合(*Lilium davidii* var.

Unicolor (Hoog) Cotton) 是百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium*) 多年生球根作物, 属单子叶草本植物, 其鳞茎瓣厚、丰润、口感甜美, 具有很高的营养及经济价值^[1,2], 在我国的食用百合中品质最好^[3]。随着兰州百合需求量的增加, 百合种植面积不断扩大, 兰州百合种球的需求量也将大幅度上升。百合种球的繁殖方式主要为有性繁殖和无性繁殖, 有性繁殖依靠开花授粉形成的种子。种子繁殖虽能获得大量健康的幼苗, 但存在授粉不亲合及胚发育早期死亡的现象, 结实率很低, 即使获得一定量的种子, 然而这些种子发芽缓慢, 一般需栽培 5~6 年方能开花及再次结实, 周期漫长, 故在生产实践中很少采用^[4]。无性繁殖主要依靠鳞片扦插和分株小鳞茎, 前者的弊端是鳞片容易腐烂, 尤其是经过多代繁殖后, 常导致种球感染病毒, 造成品质退化快、不能重复利用^[5]; 后者的弊端是种球数量少, 不能满足生产需求。百合的组织培养具有用种量少、繁殖系数高的优点, 可解决因持续进行营养繁殖而引起的种球退化现象, 并在短时间内生产大量优质脱毒种苗, 从而为生产提供种植材料。【前人研究进展】百合的组织培养始于 20 世纪 50 年代, Robb^[6] 首先利用百合鳞片进行组织培养获得成功, 近年国内通过组织培养快速繁殖百合种苗的报道增多^[7~10], 但多数侧重于切花百合不同外植体对百合再生效果的研究, 或是百合试管内结鳞茎及小鳞茎移栽成活的研究^[11,12]。【本研究切入点】有关兰州百合鳞片的选择和消毒处理, 鳞片的切割及摆放方式, 诱导、继代及生根培养基优化等方面的研究较少。【拟解决关键问题】以建立完善的无病毒食用兰州百合快繁技术为目标, 通过优化百合鳞片的消毒处理方式获得外植体, 对影响百合鳞片萌发的鳞片切割及放置方式、鳞片继代及生根培养等诸多影响因素进行详细研究, 为食用兰州百合试管苗规模化生产提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料兰州百合根球由广西永福县农业局提供。所用试剂购自南宁市柏焱坦生物试剂经营部, 均为国产分析纯级。

所用培养基均为 MS 基本培养基中添加 4.5 g/L 琼脂粉、30 g/L 蔗糖以及不同种类的激素, pH 值为 5.8。其中, 启动培养基中加入 6-BA、2,4-D 和 GA₃; 继代培养基中加入 6-BA 和 NAA; 生根培养基中加入 NAA 和 IBA。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒

选取健康、饱满的兰州百合鳞茎, 剥去表面腐烂干枯的鳞片, 留取内部清洁、完整的鳞片, 然后放入滴加有 2 滴洗洁精的自来水中浸泡 5 min, 后流水冲洗 20 min, 转入超净台, 用 75% 酒精浸泡 30 s 后等分成 3 份, 分别采用 (1) 0.1% 升汞浸泡 8 min, 无菌水冲洗 3 次; (2) 10% 的次氯酸钠和 0.1% 升汞等体积混合, 浸泡 8 min, 无菌水冲洗 3 次; (3) 10% 的次氯酸钠和 0.1% 升汞等体积混合, 浸泡 5 min, 无菌水冲洗 1 次, 再用 0.1% 升汞浸泡 3 min, 无菌水冲洗 3 次后备用。外植体得率 = (未污染外植体/外植体总数) × 100%。

1.2.2 不同植物生长调节剂及浓度比对鳞片不定芽诱导的影响

将消毒过的鳞片边缘薄的部分切除, 然后近轴面向上接种于添加不同植物生长调节剂的培养基中进行不定芽诱导, 每个处理重复 3 次, 每个重复 50 个外植体。培养条件: 培养室温度为 26~28℃, 光强 2200 lx, 光照周期为 12 h/24 h。培养过程中统计污染率, 培养 50 d 后统计不定芽诱导率。诱导率 = (生成鳞茎的鳞片数/接种鳞片数) × 100%。

1.2.3 切割和放置方式对鳞片不定芽诱导的影响

将消毒后的鳞片随机分为 2 份, 1 份鳞片先把周边切掉, 然后横切成上、中、下 3 部分, 另 1 份鳞片纵切为左、中、右 3 部分, 每种切法的鳞片分别接种于启动培养基 (MS + BA 1.5 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L) 上, 放置方式分为近轴面向上和向下各半, 每个处理重复 3 次, 每个重复 100 个外植体。培养条件同 1.2.2 节, 培养 30 d 后统计萌发情况。

1.2.4 不同激素浓度比对鳞片不定芽增殖的影响

将外植体初代培养获得的不定芽离体后接种于不同激素浓度配比的继代培养基上 (表 4), 每个处理重复 3 次, 每个重复接种 60 个不定芽。培养条件同 1.2.2 节, 培养过程中观察不定芽的长势, 30 d 后统计增殖系数。

1.2.5 不同激素浓度比对不定芽生根的影响

将继代培养基中长势较好的鳞茎转入不同激素浓度配比的生根培养基中 (表 5), 每个处理重复 3 次, 每次重复 50 个外植体, 每瓶接种 5 个, 培养条件同 1.2.2 节, 20 d 后统计根部发育情况。生根率 =

(生根的芽数/接种的总芽数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同的消毒处理方法对鳞片萌发的影响

经过消毒处理的鳞片,如果消毒时间过长,鳞片的活力降低甚至死亡;时间过短则灭菌不彻底,导致污染率过高。经过方法(1)、(2)和(3)消毒处理后的鳞片培养大约1周之后能够确定污染率,且鳞片的颜色也会发生变化,由乳白色变为浅绿色,不同消毒方法处理过的鳞片其萌发程度不同。由表1可以看出,方法(3)处理过的鳞片得率最高为59%,且转绿时间也较短。只有转绿的鳞片最终才能诱导出芽,而且转绿时间越短,表明鳞片受到的毒害越小,同时诱导出芽的时间也越短^[13]。因此,消毒方式(3)是适用于兰州百合鳞片的消毒方式,既可以有效灭菌,又能保证较高的成活率和较短的诱导时间。

表1 不同消毒处理方法对兰州百合鳞片消毒的影响

Table 1 Effect of different disinfection treatments on bulbs from *Lilium davidii* var

消毒方式 Disinfection treatments	接种数(块) Number of explants	污染数(块) Number of pollution	得率 Yield(%)	转绿时间 Turn green time(d)
(1)	100	63	37	13
(2)	100	52	48	10
(3)	100	41	59	5

2.2 不同植物生长调节剂及浓度配比对不定芽诱导的影响

从表2可知,鳞片在不同植物生长调节剂及浓度配比的启动培养基上,其形态和颜色变化都会有明显不同,不定芽芽点出现时间及其长势都不同,其中在配方MS+6-BA 1.5 mg/L+GA₃ 0.8 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L的启动培养基上不定芽诱导效果最好,从乳白色到浅黄色再到浅紫色需要25 d左右,此时鳞片开始萌动出现芽点,接着鳞片变为绿紫色,芽点长大成为小鳞茎,且长势最好。而在其他配方的启动培养基上鳞片不定芽萌发较慢,不定芽数量少且长势弱。

2.3 外植体切割和放置方式对鳞茎形成的影响

由表3可以看出,鳞片放置和切割的方式对其增殖率有显著影响。前期实验表明:近轴面向下放置的外植体萌发慢,且系数非常低,而近轴面向上放置的萌发快,所以在中后期的实验过程中均采用近轴面向上的放置方式。而切割方式实验表明:横切的下部萌发率最高,中部次之,上部最低;纵切的中部萌发率最高,左部和右部差异不明显,但是横切的

中部萌发率又高于纵切的中部。因此,取百合鳞片横切的下部为外植体且近轴面向上放置,萌发快且萌发率高。

表2 不同植物生长调节剂及浓度配比对不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of different hormone and concentration ratio on adventitious bud induction

浓度 Concentration (mg/L)		诱导率 Induction rate(%)	生长特征 Growth status	
6-BA	2,4-D			
1.0	0.8	0	9	鳞片变化较慢,2个月后才转绿 Scales change slowly, after 2 months to turn green
1.0	0.8	0.8	27	鳞片变化较慢,10 d后转绿 Scales change slowly, after 10 days to turn green
1.5	1.0	0	33	鳞片萌发较快,7 d出现少量芽点 Scales germination faster, 7 d minor bud points
1.5	1.0	0.8	58	鳞片萌发快,5 d转绿,且边缘出现较多芽点 Scales germination faster, after 5 days to turn green and the edge appeared more buds
2.0	1.0	0.8	41	鳞片萌发快,产生膨松愈伤组织,出芽较少 Scales germination faster, but the scales generated Loose Callus and appeared less buds

表3 外植体切割和放置方式对鳞茎形成的影响

Table 3 Effect of cut and place way on bulb formation

切割方式 Cut way	放置方式 Place way	接种数(块) No. of explants	转绿率 Turn green rate(%)	分化率 Differentiation rate(%)
横切上 On the cross	近轴面向上 Adaxial side	100	90	53
	近轴面向下 The near axis oriented	100	90	36
横切中 In the cross	近轴面向上 Adaxial side	100	96	79
横切下 Under the cross	近轴面向上 Adaxial side	100	97	97
纵切左 Longitudinal left	近轴面向上 Adaxial side	100	95	81
纵切中 In the longitudinal	近轴面向上 Adaxial side	100	96	92
纵切右 Longitudinal right	近轴面向上 Adaxial side	100	94	80

2.4 不同激素浓度配比对不定芽增殖的影响

转入继代培养基中增殖培养所用的小鳞茎为初

代培养阶段所得,培养 20 d 左右,在转接的小鳞茎基部形成新的不定芽,继而长成新的小鳞茎。由表 4 可以看出,在不添加任何激素的 MS 空白培养基上,鳞茎产生小鳞茎比较少,增殖系数仅为 0.12,且生长较弱;在只添加 6-BA 的培养基上,鳞茎均能产生小鳞茎,且随着 6-BA 浓度的增加,增殖系数也提高,当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,增殖系数达到 1.05,但是当 6-BA 浓度提高到 1.2 mg/L 时,鳞茎出现变异现象;在只添加 NAA 的培养基上,增殖系数几乎为 0,并会产生较多的根。而在同时添加 6-BA 和 NAA 的培养基上,均有一定程度的增殖,当 6-BA 和 NAA 浓度分别为 1.0 mg/L 和 0.1 mg/L 时,增殖系数达到 1.25;但是当 6-BA 和 NAA 浓度分别为 1.0 mg/L 和 0.5 mg/L 时,鳞茎出现变异,且增殖系数降低。实验结果表明,MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的继代培养基增殖系数最高,继代苗生长整齐,抽生叶片较长,长势最好。

表 4 不同激素组合对兰州百合鳞茎增殖的影响

Table 4 Effects of different combinations of 6-BA and NAA on proliferation of bulbs from *Lilium davidii* var

浓度 Concentration (mg/L)		接种数(块) Number of explants	新小鳞 茎数(个) Number of induced bulb	增殖 倍数(倍) Proliferation multiple
6-BA	NAA			
0	0	60	7	0.12
0.2	0	60	12	0.2
0.4	0	59	23	0.39
0.6	0	60	38	0.63
0.8	0	58	49	0.85
1.0	0	60	63	1.05
1.2	0	60	49	0.82
0	0.1	56	2	0.04
0	0.5	57	1	0.02
1.0	0.1	59	74	1.25
1.0	0.5	60	51	0.85

2.5 不同激素浓度配比对不定芽生根的影响

转入生根培养基的兰州百合小鳞茎,在 8~15 d 之内在鳞茎底部都会产生白色的突起,然后逐渐成长为根系。由表 5 可以看出,不添加任何激素的空白培养基,根点出现的较晚,并且根较弱,条数最少,而在添加了激素的培养基上,都有较高的生根率,其中以 MS+NAA 0.6 mg/L+IBA 0.1 mg/L 表现最好,根点出现早,根粗壮且整齐,根的条数也最多,所以选为兰州百合的生根培养基。

表 5 不同激素浓度对比对不定芽生根的影响

Table 5 Effects of different hormone concentrations of NAA or IBA on rooting

浓度 Concentration (mg/L)		接种数(个) Number of explants	生根时间 Rooting time(d)	根系发育情况 Status of root growth	生根率 Rooting rate(%)
NAA	IBA				
0	0	50	25	有弱小根点出现 Weak root point- ed	17.6
1.0	0	50	8~10	过于膨大,畸形 Overly inflated, malformation	31
0.8	0	50	8~10	膨大,参差不齐 The roots dilated, uneven	31.8
0.6	0	50	9~11	根细长 Roots slender	89.3
0.6	0.1	50	11~12	根系粗壮、整齐 Roots stout, neat	100
0.4	0.1	50	12~14	较粗壮 Relatively thick	97.6
0.2	0.2	50	15~17	细短 Short and thin	96.7

3 讨论

在百合组织培养过程中,不同消毒剂对百合鳞片的消毒效果影响显著,根据消毒效果及对外植体的伤害程度筛选出适合兰州百合鳞片的最佳消毒方式:75%酒精处理后,再用 10%的次氯酸钠与 0.13%的升汞等体积混合对鳞片消毒,再用 0.13%升汞消毒。通过比较不同鳞片位置的分生能力可知:靠近鳞茎盘下部的鳞片分生能力较强,这可能是由于受极性支配,鳞片基部和近轴端表现出最大的发生潜力,所以接种时应选择与鳞茎盘相连的下部鳞片为初代培养的最佳外植体,这与王爱勤等^[11]和屈姝存等^[14]所报道的结果一致。

植物生长调节剂对离体组织的生长发育起关键作用,培养基中植物生长调节剂的种类和浓度调节对兰州百合植株的再生方式和器官分化具有重要作用,适当的激素组合能够高效诱导百合芽的分化、增殖及根的生长。本研究获得的最佳诱导培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+GA₃0.8 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L,使用该培养基能诱导出较多长势健壮的兰州百合不定芽。其中,添加一定浓度的 GA₃可以缩短诱导时间,增加诱导率,GA₃在诱导植物分化及开花方面有许多报道,但在促进兰州百合芽分化方面的研究还未见报道,有关具体作用机理还需进一步研究。

在进行兰州百合的根诱导时,NAA 浓度偏高或偏低都会降低小鳞茎生根的能力,0.6 mg/L 是促进小鳞茎生根的最佳浓度;添加 0.1 mg/L 的 IBA 能使根更健壮和整齐。所以兰州百合生根培养基以 MS+NAA 0.6 mg/L+IBA 0.1 mg/L 为最佳,生根率达 100%,生根苗生长良好,这与前人的研究^[1,4] 稍有出入,可能是基因型和外植体差异所致。

参考文献:

- [1] 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 G, Du J, Li G Y, et al. Study on tissue culture and clonal propagation of *Lilium davidii* var. Unicolor (Hoog) Cotton and *Lilium brownii* F. E. Brown ex Mieliez[J]. Journal of Northwest Normal University: Natural Science, 2002, 38(1): 69-71.
- [2] 马君义,赵小亮,张继,等.兰州百合的研究进展[J].塔里木大学学报,2005,17(4):53-56.
Ma J Y, Zhao X L, Zhang J, et al. Research progress of Lanzhou Lily[J]. Journal of Tarim University, 2005, 17(4): 53-56.
- [3] 胡晓文,罗兆荣,喻晚之,等.食用百合的离体快繁研究[J].现代园艺,2006,12:7-8.
Hu X W, Luo Z R, Yu W Z, et al. Study on *in vitro* rapid propagation of edible Lily [J]. Xiandai Horticulture, 2006, 12: 7-8.
- [4] 刘雅楠.兰州百合不同外植体培养及其优化研究[D].兰州:甘肃农业大学,2008.
Liu Y N. Lanzhou Lily of Different Explants and Optimization Research [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2008.
- [5] 金波,宋慧茹.球根花卉[M].北京:中国农业出版社,1999.
Jin B, Mo H R. Flowering Bulbs[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1999.
- [6] Robb S M. The culture of excise tissue from bulb scales of *Lilium specioum* Thun [J]. J Exp Bot, 1957(8):348-352.
- [7] 陈丽静,殷小娟,李俊岚,等.细叶百合鳞片诱导与遗传转化组培体系的建立[J].西南农业学报,2013,26(2):718-722.
Chen L J, Yin X J, Li J L, et al. Induction of *Lilium pumilum* bulb and establishment of genetic transformation's tissue culture system[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(2): 718-722.
- [8] 刘静.兰州百合快速繁殖研究[J].南方农业学报,2011,42(8):839-842.
Liu J. Study on the rapid propagation of Lanzhou Lily [J]. Southern Journal of Agricultural Sciences, 2011, 42(8): 839-842.
- [9] 韩华丽,郭成金.兰州百合的组织培养[J].天津师范大学学报:自然科学版,2009,29(3):62-65.
Han H L, Guo C J. The tissue culture method of Lanzhou Lily[J]. Journal of Tianjin Normal University: Natural Science Edition, 2009, 29(3): 62-65.
- [10] 潘佑找,柯尊涛,赵宇瑛.不同外植体对兰州百合组织培养的影响[J].安徽农学通报,2007,13(19):242-245.
Pan Y Z, Ke Z T, Zhao Y Y. The effects of *Lilium davidii* var. Unicolor of tissue culture due to different explants [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2007, 13(19): 242-245.
- [11] 王爱勤,周岐伟,何龙飞,等.百合试管内结鳞茎的研究[J].广西农业大学学报,1998,17(1):71-75
Wang A Q, Zhou Q W, He L F, et al. Study on the bulblet formation in tube of *Lilium longiflorum* L. [J]. Journal of Guangxi Agricultural University, 1998, 17(1): 71-75.
- [12] 王爱勤,何龙飞,周琼,等.百合试管苗的移栽对比试验[J].广西农业生物科学,1999,3:187-190.
Wang A Q, He L F, Zhou Q, et al. A comparative study on Lily plantlet transplanting [J]. Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science, 1999, 3: 187-190.
- [13] 郭海滨,雷家军.卷丹百合鳞片及珠芽组织培养研究[J].中国农学通报,2006,22(2):72-74.
Guo H B, Lei J J. The bulb scale and bulblet culture in vitro of *Lilium lancifolium* Thunb [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(2): 72-74.
- [14] 屈姝存,刘先明,周朴华,等.百合鳞片细胞形态发生中生理生化特性研究[J].生命科学研究,1998,2(4):288-294.
Qu S C, Liu X M, Zhou P H, et al. Study on the changes and comparison of physiology in the morphogenesis of scale explants of Lily *in vitro* [J]. Life Science Research, 1998, 2(4): 288-294.

(责任编辑:陆雁)