维普资讯 http://www.cqvip.com

第34卷第6期 东北林业大学学报 Vol.34 No.6
2006年11月 JOURNAL OF NORTHEAST FORESTRY UNIVERSITY Nov. 2006

精粹百合的组织培养与快速繁殖技术[1)]

景艳莉 周蕴薇 张金玉 郑 岩
(东北林业大学,哈尔滨,150040)

摘 要 以鳞片为外植体,以MS为基本培养基,研究了精粹百合的组培快繁技术。结果表明:精粹百合的最佳诱导培养基为MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.05 mg/L;最适增殖培养基为MS+6-BA0.5 mg/L+NAA0.2 mg/L;以1/2MS为基本培养基,NAA浓度0.3~0.5 mg/L时,生根率可达97%以上。室内移栽充分炼苗后再定植到大田,利于提高成活率。

关键词 精粹百合;组织培养;快速繁殖
分类号 S682.29

Techniques for Rapid Propagation of Lily 'Elite' by Tissue Culture/Jing Yanli, Zhou Yunwei, Zhang Jinyu, Zheng Yan(Northeast Forestry University, Harbin 150040, P. R. China)//Journal of Northeast Forestry University. -2006,34(6). -46~47

An experiment was conducted to study the techniques for rapid propagation of lily 'Elite' by tissue culture using bulbscale segment as explant and MS as basic medium. Result showed that the optimal medium for induction and bud differentiation of 'Elite' was found to be MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.05 mg/L, and MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA0.2 mg/L was proved to be most suitable for proliferation. 1/2MS+NAA 0.3~0.5 mg/L is the suitable rooting medium resulting in a rooting rate more than 97%. The survival rate of the transplants in the field could be improved by training plantlets effectively indoors.

Key words Lily 'Elite'; Tissue culture; Rapid propagation

百合(*Lilium* spp.)是百合科百合属的一类多年生球根花卉,也是世界著名的鲜切花之一。近年来国内切花百合生产发展很快,但种源仍主要依赖于进口种球。其传统繁殖方法的繁殖系数低,且多代分殖后,常造成种性退化、病毒积累。因此百合的组培快繁技术受到了重视。对麝香百合[1]、东方百合[2]、亚洲百合[3]、毛百合[4]等生产中流行的百合品种及一些野生种的组培快繁技术的研究表明,不同的百合杂种系、不同的品种及野生种,其最适的组培条件有所差别。对于不同百合品种的组培快繁技术,只有经过系统的实验研究后方可投入到实际生产中应用。为此,笔者以精粹百合的鳞片为外植体,系统地探讨了精粹百合的组培快繁技术,以期为探索发展北方百合种球业和工厂化生产打下基础。精粹百合('Elite')是亚洲百合杂种系(The Asiatic hybrids)的一个品种,也是现今流行的切花百合品种之一。其花色橙红,抗寒性强,在哈尔滨等北方寒冷地区可露地越冬,因此也作为宿根花卉露地栽培欣赏。此外,黑龙江省气候冷凉,土地肥沃,发展百合的种球生产具有很大的潜力。

1 材料与方法

试验材料:东北林业大学实验田自繁、秋季采收后经低温沙藏4个月的精粹百合鳞片。

外殖体消毒处理:剥取鳞茎中、内层(2层以内)无病、无机械损伤的鳞片,洗衣粉液洗净后于流水下冲洗2~3 h,于超净工作台上进行处理。先用质量分数为75%乙醇浸洗30 s,用无菌水浸洗3次;再用漂白粉饱和上清液处理5 min,无菌水浸洗3次;最后用质量分数0.2%的升汞处理3 min,无菌水浸洗4~6次后,于无菌滤纸上吸干多余水分备用。

外植体的诱导、继代和生根培养:剪去无菌外植体上部1/4及两侧边缘,余下部分剪成0.5~0.8 cm见方的小块,以背面朝下接入诱导培养基。当诱导芽体长至2~4 cm时,分成单体并剪叶后接入继代培养基。继代培养后,剪去叶片接入生根培养基进行生根培养。

培养条件:诱导分化培养基均用MS固体培养基,生根培养基选用1/2MS固体培养基,分别附加不同浓度的6-BA和NAA。培养基内加琼脂9 g/L,蔗糖30 g/L,pH值为5.8左右,培养温度(25±1)℃,光照时间14 h/d,光照强度2 500 lx。

2 结果与分析

2.1 外植体的诱导分化

表1 不同激素配比对精粹百合鳞片诱导分化的影响

激素配比/mg·L^{-1}		接种外植体数/个	分化外植体数/个	分化率%
6-BA	+NAA			
0.5	0.05	22	1	4.5
0.6	0.20	23	2	8.6
1.0	0.05	21	20	95.2
1.0	0.20	24	12	50.0
1.0	0.50	21	17	81.0
1.5	0.05	20	9	45.0
1.5	0.20	24	5	20.8
1.5	0.50	26	9	34.6
2.0	0.05	23	1	4.3
2.0	0.20	26	18	69.2
2.0	0.50	24	16	66.7
3.0	0.05	20	15	75.0
3.0	0.20	22	16	81.8
3.0	0.50	22	4	18.2

外植体接入一周后,鳞片逐渐转绿并陆续发生分化。不定芽的分化形式主要有两种:一种在外植体腹面近切口处或于切口处先形成不规则的黄绿色或绿色愈伤组织,再分化出乳白至嫩黄色半透明或不透明的小突起;另一种不形成愈伤组织,在鳞片腹面直接分化出小突起。小突起两周左右可继续分化为带叶的不定芽。其中,6-BA浓度较高(2.0~3.0 mg/L)的诱导培养基,外植体分化时间发生较早,10~20 d为分化高发期;6-BA浓度较低(0.5~1.0 mg/L)的培养基,外植体分化时间相对晚,20~30 d为分化高峰期。表1示诱导35 d时不同激素配比的诱导培养基上鳞片分化的结果。由表1可见,MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.05 mg/L为最适诱导分化培养基,分化率可达95.2%;其次为6-BA1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L和6-BA3.0 mg/L+NAA0.2 mg/L,分化率均超过80%。

1)国家林业局"948"项目;教育部留学回国人员科研启动项目;哈尔滨市留学回国人员基金项目。

第一作者简介:景艳莉,女,1974年3月生,黑龙江八一农垦大学植物科技学院,讲师。现东北林业大学园林学院,硕士研究生。
通讯作者:周蕴薇,东北林业大学园林学院,副教授。

收稿日期:2005年12月5日。
责任编辑:张建华。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 继代增殖培养

继代接种2周后,从组培苗基部生出新增殖的苗。表2示不同继代培养基继代接种40 d时组培苗的增殖情况。由表2可见,低浓度的6-BA(0.5 mg/L)更利于组培苗的继代增殖。其中:MS+6-BA0.5 mg/L+NAA0.2 mg/L为最佳继代增殖培养基,增殖系数达5.4,且苗生长健壮,叶色浓绿;其次为6-BA0.5 mg/L+NAA0.1 mg/L和6-BA1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L的培养基,增殖系数分别为3.9和3.5。试验中还发现,当6-BA浓度超过1.0 mg/L时,各培养基中的部分幼苗均出现了不同程度的枯尖现象。

表2 不同培养基对精粹百合继代增殖的影响

6-BA/mg·L^{-1}	NAA/mg·L^{-1}	接种芽数/个	增殖芽数/个	增殖系数	苗生长状况
0.5	0.1	31	121	3.9	健壮
0.5	0.2	32	174	5.4	健壮
1.0	0.1	32	68	2.2	健壮
1.0	0.5	35	124	3.5	部分叶尖干枯
2.0	0.1	33	76	2.3	部分叶尖干枯
2.0	0.5	32	97	3.0	部分叶尖干枯
3.0	0.1	32	84	2.6	部分叶尖干枯
3.0	0.5	33	63	1.9	部分叶尖干枯

2.3 组培苗的生根和移栽

组培苗在继代培养过程中,已有个别苗出现生根现象,但是根数很少。生根培养20 d左右可生出白色或淡绿色的根。

表3 不同培养基对生根的影响

NAA浓度/mg·L^{-1}	生根率%	平均根数/条	苗数	生长状况
0.1	92.9	4.6	2.0	苗壮、根较少
0.3	100	7.6	2.8	苗壮、根整齐
0.5	97.4	8.1	2.8	苗壮、根整齐
0.7	100	7.1	2.9	苗抽叶少,较矮

注:培养基为1/2MS,以上为25 d时的统计结果。

由表3可见,NAA浓度为0.1~0.7 mg/L时均可使组培苗生根率达90%以上,且组培苗均有不同程度的增殖。但是以1/2MS+NAA0.3~0.5 mg/L生根效果最好,根量多,发根整齐,基部小鳞茎膨大明显,苗健壮。NAA浓度为0.7 mg/L时根量也很多,生根率高,但苗抽叶少,且矮小。生根后开瓶炼苗一周,洗净根部培养基,以沙为基质,移栽到盆内或筐内,浇透水,并喷施一次营养液,于室内再炼苗一周,并逐渐转移到通风透光之处。炼苗结束后,再定植到室外大田,可使组培苗的成活率达95%以上,有效地提高了组培苗的成活率。

3 小结与讨论

培养基中不同激素的种类与浓度配比对百合鳞片的诱导和增殖影响很大,是百合组培快繁技术的核心。试验表明,以MS为基本培养基,用6-BA和NAA两种激素完全可以实现快速繁殖。试验中,诱导培养基的6-BA浓度以1.0~3.0 mg/L较适合,6-BA低于1.0 mg/L时诱导率均很低。继代培养过程中发现,低浓度的6-BA(0.5 mg/L)更利于精粹百合的数量增殖和生长,这与王凤兰[3]的试验结果(6-BA2.0 mg/L)不一致,其原因是否与诱导培养基激素浓度的不同及百合的生理状态有关,需进一步验证。试验表明,最佳诱导培养基为MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.05 mg/L;最适继代增殖培养基为MS+6-BA0.5 mg/L+NAA0.2 mg/L;适合的生根培养基为1/2MS+NAA0.3~0.5 mg/L。

培育壮苗、充分炼苗、方法得当、适时移栽是提高组培苗移栽成活率的重要保证。组培苗生根后,开瓶炼苗5 d左右,洗净基部残留的培养基,移栽于箱或盆内于室内再炼苗一周,注意保湿,并喷一次营养液,逐渐转移到阳光充足、空气流通之处,再定植于大田中,可使组培苗的成活率达95%以上。

从提高组培快繁技术的效率和降低成本来看,组培苗诱导分化10~30 d为高峰期,40 d后分化率基本达到最大,且组培苗生长趋缓,因此,在此之前应及时进行继代培养。在实际生产中,当诱导苗长达2~4 cm时,可随时进行继代。在试验中,笔者以琼脂条代替琼脂粉,以食用白砂糖代替蔗糖,这对于生产中降低成本具有实际意义。

参 考 文 献

[1] 张君,武丽敏,王雷,等.麝香百合组培快繁技术初步研究[J].吉林农业大学学报,2002,24(1):53-54,81.
[2] 刘雅莉,张剑侠,潘学军.东方百合"索邦"的花器官培养与快速繁殖[J].西北植物学报,2004,24(12):2350-2354.
[3] 王凤兰,周厚高,黄子锋,等.亚洲百合组培快繁技术研究[J].安徽农业科学,2005,33(5):820-821.
[4] 吴旭红.毛百合的组织培养和快速繁殖[J].生物学杂志,2003,20(6):47.

(上接45页)表明部分卷瓣组与钟花组百合之间存在着基因交流。

国内把卷瓣组、钟花组分为两个明显的组,不存在交叉[10];但Michael在百合进化树图中把钟花组的毛百合、渥丹与卷瓣组的卷丹、条叶百合、山丹及垂花百合画在一个进化树的分支上,说明国外学者从形态学上已注意到卷瓣组与钟花组的交流[11]。本研究从分子水平上进一步验证了此种观点。

聚类分析把野百合(秦岭种源)也划在了IVc亚类,但同工酶及扩增片段长度多态性(AFLP)试验并没有把它归类到卷瓣组,形态上野百合与卷瓣组百合差异也较大。野百合的上述聚类结果同经典分类相驳,可能有如下两种原因:①与取样的稀疏有关——野生百合分布中国14个省份,此次实验仅有陕西秦岭种源1份种质,用以代表野百合全部种质会产生偏差;②RAPD分析种间关系有一定局限性[12]——尽管采用RAPD分析属间、种间及种内亲缘关系均有许多成功的例子,但在用于分析某些种间亲缘关系时出现了一定程度的偏差,如Thormann采用RAPD技术研究十字花植物的种间亲缘关系时发现,迁移率一致的谱带有时并不同源,而分析种内亲缘关系时却无此种情况[13]。因而一般采用RAPD分析种间亲缘关系时,最好同时采用AFLP进行验证,课题组已做了这方面的工作,试验结果将另文发表。

参 考 文 献

[1] 彭隆金.百合资源与栽培[M].昆明:云南民族出版社,2002:10-16.
[2] 贾月慧,张克中,王葳蕤,等.几种中国野生百合的过氧化物酶同工酶[J].东北林业大学学报,2005,33(2):15-17.
[3] 张克中.百合种质扩繁、亲缘关系及雄性不育诱导研究[D].北京:北京林业大学园林学院,2003:73-81.
[4] 赵祥云,陈新露,方海,等.用RAPD标记评价百合品种间遗传关系[J].北京农学院学报,1995,10(2):58-63.
[5] Wen C S, Hsiao J Y. Altitudinal genetic differentiation and diversity of Taiwan lily (*Lilium longiflorum* var. *formosanum*; Liliaceae) using RAPD markers and morphological characters[J]. International Journal of Plant Sciences,2001,162(2):287-295.
[6] Haruki K, Hosoki T, Nako Y. RAPD analysis of *Lilium japonicum* Thunb. Native to Shimane and other Prefectures[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science,1998,67(5):785-791.
[7] Yamagishi M. Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) makers in Lilium[J]. Theor Appl Genet,1995,91(6-7):830-835.
[8] 左志锐,穆鼎,高俊平,等.百合遗传多样性及亲缘关系的RAPD分析[J].园艺学报,2005,32(3):468-472.
[9] 张鲁刚,王鸣,陈杭,等.白菜RAPD反应条件的优化[J].西北农业大学学报,2000,28(2):1-7.
[10] 梁松筠.百合科百合属[M]//陈心启,许介眉,梁松筠,等.中国植物志:第14卷.北京:科学出版社,1980:116-157.
[11] Michael J B, Harris H. The gardener's guide to growing lilies [M]. Portland, Oregon: Timber press,1995:60-93.
[12] 汪小全,邹喻苹,张大明,等.RAPD应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J].植物学报,1996,38(12):954-962.
[13] Thormann C E, Ferreira M E, Camargo L E, et al. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species[J]. Theor Appl Genet,1994,88(8):973-980.