

西伯利亚百合鳞片组织培养和快速繁殖研究

姜春华

(甘肃农业职业技术学院园林工程系,甘肃兰州730020)

摘要:用西伯利亚百合的鳞片为试材,采用正交试验法,进行了最佳诱导培养基和最佳增殖培养基筛选。结果表明,西伯利亚百合鳞片最佳诱导培养基为MS+6-BA2.0mg/L+2,4-D0.1mg/L+NAA0.3mg/L;最佳增殖培养基为MS+6-BA2.0mg/L+2,4-D0.1mg/L+NAA0.5mg/L。

关键词:百合;组织培养;诱导;增殖;快速繁殖

观赏百合常规繁殖方法因存在繁殖率低、种球数量有限、再次感染病毒几率高等问题,不能满足市场需求^[1]。采用组培快繁的方法,能有效解决百合种性退化难以繁殖的问题,并且可在短时间内获得大量的优质种苗^{[2],[3]},实现种苗工厂化生产,提高百合生产水平。本试验试图通过研究西伯利亚品种鳞片的组织培养和快速繁殖的优化条件,探讨百合组培快繁的较佳方法,为百合的提纯复壮和快速繁殖优质籽球提供理论依据。

一、材料与与方法

试验选用东方百合杂种系中的切花品种西伯利亚为试材,为荷兰进口种球。选用百合的中层鳞片下部作为外植体。

(一)材料的消毒 选用健壮的西伯利亚百合种球,将种球用自来水流水冲洗干净,剪去根及有伤的鳞片,先用70%的酒精浸摇50s~60s,再用10%的磷酸三钠浸泡种球20min,并用无菌水冲洗2次~3次。然后将种球鳞片剥下,取3层~4层作为中层,用0.1%的升汞溶液消毒7min,无菌水冲洗4次~5次,用灭菌过的滤纸吸干表面水分。

(二)不同激素组合对鳞片诱导的试验 选用生长良好、大小相近的百合中层的鳞片,切去上部1/2,将下部分割成5mm~10mm左右的小鳞片,以正面朝上分别接种在9种培养基上。采用正交试验设计 $L_9(3^3)$ 进行分析,试验因子及水平见表1。以改良MS培养基为基本培养基,琼脂7g/L,蔗糖

表1. $L_9(3^3)$ 因子水平表

水平	A(mg/L)	B(mg/L)	C(mg/L)
	6-BA	2,4-D	NAA
1	0.5	0.1	0.1
2	1.0	0.3	0.3
3	2.0	0.5	0.5

30g/L,pH值为5.6~5.8。

(三)不同激素组合对不定芽增殖的试验 将在诱导培养基上生长了45d后的不定芽分割成4个~6个小芽丛块,转接于9种增殖培养基上。采用正交试验设计 $L_9(3^3)$ 进行分析,试验因子及水平见表2。以改良MS培养基为基本培养基,附加琼脂7g/L,蔗糖30g/L,pH值为5.6~5.8。

表2. $L_9(3^3)$ 因子水平表

水平	A(mg/L)	B(mg/L)	C(mg/L)
	6-BA	2,4-D	NAA
1	1.0	0.1	0.1
2	2.0	0.3	0.3
3	3.0	0.5	0.5

两个试验在组织培养室中进行光照培养,温度 $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,每天光照时间16h,光照强度2000Lx。

二、结果与分析

(一)百合鳞片在不同激素组合下的诱导分化效果

西伯利亚百合鳞片在接种后约在9d后,切片渐渐变绿,分化出一些疣状突起,并逐渐长出淡黄绿色颗粒状的愈伤组织;20d左右时,出现芽的分化;40d后形成许多绿芽丛;50d后长出小叶片,分化成苗,最迟的也在60d后出现分化并长成小苗。40d后调查的不定芽的诱导分化结果见表3。

根据表3的k值大小,得知西伯利亚百合鳞片的诱导分化中A因素以 A_3 为最佳,B因素以 $B1$ 为最佳,C因素以 C_2 为最佳。通过A、B、C各因素水平的比较,求得最优的水平组合为 $A3B1C2$,即最佳诱导培养基为MS+6-BA2.0mg/L+2,4-D0.1mg/L+NAA0.3mg/L。极差R值越大的因素对指标影响越显著,在本试验中A为主导因素,3个因子对西伯利亚百合鳞片诱导的影响程度依次为6-BA>2,4-D>NAA。

对表3数据进行方差分析的结果见表4,可以看出A因素对西伯利亚百合鳞片诱导分化有显著影响,B和C因素则对西

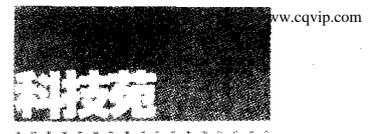


表3. 西伯利亚百合在不同诱导培养基上不定芽诱导的效果

试验号	A	B	C	e	培养天数(d)	原接种数(块)	分化数(块)	分化率(%)
1	1	1	1	1	45	120	64	53.33
2	1	2	2	2	45	120	56	46.67
3	1	3	3	3	45	120	45	37.50
4	2	1	2	3	45	120	56	46.67
5	2	2	3	1	45	120	19	15.83
6	2	3	1	2	45	120	28	23.33
7	3	1	3	2	45	120	108	90.00
8	3	2	1	3	45	120	67	55.83
9	3	3	2	1	45	120	91	75.83
K1	137.50	190.00	132.49	144.99	45	120		
K2	85.83	118.33	169.17	160.00	45	120		
K3	221.66	136.66	143.33	140.00	45	120		
k4	45.83	63.33	44.16	48.33	45	120		
k5	28.61	39.44	56.39	53.33	45	120		
k6	73.89	45.55	47.78	46.67	45	120		
R	45.28	23.89	12.23	6.66	45	120		

表4. 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F
A	3133.61	2	1566.81	43.38*
B	924.19	2	462.10	12.79
C	236.74	2	118.37	3.28
误差	72.24	2	36.12	
总和	4366.78	8		

表5. 不同激素组合对西伯利亚百合不定芽增殖的影响

试验号	A	B	C	e	原接种数(个)	增殖数(个)	增殖倍数
1	1	1	1	1	120	382	3.18
2	1	2	2	2	120	648	5.40
3	1	3	3	3	120	302	2.52
4	2	1	2	3	120	757	8.31
5	2	2	3	1	120	1118	9.32
6	2	3	1	2	120	523	4.36
7	3	1	3	2	120	738	6.15
8	3	2	2	3	120	322	2.68
9	3	3	1	1	120	163	1.36
K1	11.10	17.64	8.90	13.86			43.28
K2	21.99	17.40	16.39	15.91			
K3	10.19	8.24	17.99	13.51			
k4	3.70	5.88	2.97	4.62			
k5	7.33	5.80	5.46	5.30			
k6	3.40	2.75	6.00	4.50			
R	3.93	3.13	2.37	0.80			

伯利亚百合鳞片诱导分化无显著影响,与直观分析结论一致。

(二)百合鳞片不定芽在不同激素组合下的增殖效果

将初代培养中诱导分化出的不定芽连同基部的胚性愈伤组织块一起切下,分割成4个~5个小块芽丛,接到不同增殖的培养基上。经观察,胚性愈伤组织及不定芽培养7d~9d后原有芽继续增长,原有胚性愈伤组织块可以很快分化出新的不定芽,10d~15d后在芽基部又可以逐渐长出许多淡黄绿色的小突起,为新的胚性愈伤组织团。20d~22d后这些胚性愈伤组织团的小突起逐渐分化出不定芽,1个小芽丛块平均可以分化为4个~6个绿色的芽丛,58d~60d后可长成小苗。

不同激素组合对不定芽的增殖影响较大,45d后调查不定芽的诱导分化结果见表5。

由表5的k值的大小可得,通过A、B、C各因素个水平的比较求得最优的水平组合为A₂B₁C₃,即最佳增殖培养基为MS+6-BA2.0mg/L+2,4-D0.1mg/L+NAA0.5mg/L。极差R值越大的因素对指标影响越显著,在本试验中西伯利亚百合在继代增殖培养中A为主

导因素,3个因子的影响程度依次为6-BA>2,4-D>NAA。

表6. 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F
A	28.74	2	14.37	25.65*
B	19.15	2	9.57	17.09
C	15.70	2	7.85	14.01
误差	1.12	2	0.56	
总和	64.71	8		

从方差分析结果(表6)可以看出,A因素对西伯利亚百合不定芽的继代增殖培养有显著影响,B和C因素则对西伯利亚百合不定芽的继代增殖无显著影响,直观分析结论与统计分析结果相同。

三、结果讨论

以鳞片为外植体的离体培养研究报道较多,不同的品种其鳞茎离体培养所需要的培养基和激素都不同^{[4],[6]}。从本试验结果可以看出,随着6-BA浓度的升高,百合鳞片的分化率有升高趋势,以浓度为2.0mg/L时最有利于百合鳞片诱导分化出不定芽,且不定芽的健壮、长势好,这与杭玲等^[7]的研究结果相一致。但低浓度的2,4-D有利于启动百合外植体鳞片的诱导分化,却与阮少宁等^[8]、罗丽萍等^[9]的研究结果不同。

小鳞茎的诱导和增殖与激素浓度配比有很大的关系,合理的激素浓度配比会提高小鳞茎的诱导率和增值率,而且小鳞茎长势也比较好^[9]。据观察,在西伯利亚百合不定芽的继代增殖培养中,较高浓度的6-BA可促进不定芽从小块基部长出较多的胚性愈伤组织,这些胚性愈伤组织可进一步分化出芽,提高增殖系数;而较低浓度6-BA,不定芽从小块基部新长出的胚性愈伤组织较少,分化少,不利与增殖,这同杭玲等^[7]研究结论相一致。阮

少宁等^[9]、王爱勤等^[10]认为添加不同浓度 NAA 有利于小鳞茎的增粗培养,与本试验结论相同。

参考文献

- [1] 宁景华. 东方百合鳞片快繁及采后处理[J]. 中国花卉园艺, 2006, (10).
- [2] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [3] 赵庆芳, 曾小英, 丁兰, 等. 东方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), 2003, (1).
- [4] 杨增海, 王聚稼. 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, (1).
- [5] 王家福, 陈振光. 百合快速繁殖条件的优化[J]. 福建农业大

学学报, 1999, (2).

- [6] 李标, 胡琼华, 何显静. 紫红花滇百合的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2002, (1).
- [7] 杭玲, 苏宾, 陈丽新, 等. 龙牙百合组织快繁技术研究[J]. 广西农业科学, 2001, (4).
- [8] 阮少宁, 杨华, 梁一池, 等. 香水百合组织培养的试验研究. 福建林学院学报, 2001, (2).
- [9] 罗丽萍, 杨柏云, 章敏华, 等. 百合的组织培养[J]. 中草药, 2001, (7).
- [10] 王爱勤, 何龙飞, 温庆兰, 等. 百合组培中鳞片处理及其颜色变化与鳞茎形成的关系[J]. 园艺学报, 2004, (1).

(责任编辑 赵鹏飞)



(上接第 87 页) 3750 株/hm² 为佳。

3. 注意事项。下种后种子表面要覆盖潮湿细土, 金城 5 号等大粒种子覆土要厚些 (1.5cm 左右), 黑美人等小粒种子覆土稍薄些 (1.0cm 左右)。下种采用 1-2-1 (粒) 的挖穴错位、整行覆膜的种植方式, 或小膜覆盖的种植方式。

六、田间管理

1. 苗期管理。3 至 4 片真叶时及时放苗, 防止瓜苗徒长与烧苗。同时, 根据天气情况, 适当炼苗。在天气晴好时, 白天将薄膜或塑料盖苗, 并用小石片支起进行通风。对个别缺苗处, 及时催芽补种或育苗移栽, 并及时间苗。无籽西瓜顶土出苗时若发生子叶脱壳困难现象, 要人工辅助剥壳出苗, 以防壳卡苗。

及时防治苗期病害, 并视幼苗长势补充水养分。西瓜幼苗期枯萎病会不同程度的发生, 宜采取病害防治与水养分补充混合使用、连喷带灌的方式。一是药剂灌根法。在发病初期, 用 70% 甲基托布津可湿性粉剂 450g/hm² 或 45% 代森铵水剂 675g/hm² 根际浇灌。二是茎基部涂抹法。用 70% 敌磺钠可溶性粉剂 3000g/hm² 或 50% 多菌灵可湿性粉剂 1200g/hm² 加面粉调成糊状, 涂于病株基部; 三是药剂喷施法。用 4% 农抗 120 水剂 450ml/hm² + 有机生态肥 1200g/hm² + 225kg 水/hm² 喷施。

2. 团棵至伸蔓期管理。此阶段是西瓜营养生长最旺盛的时期, 西瓜对水养分的需求量较大, 应结合抗旱营养液 (氨基酸水溶液) 进行叶面喷施补充水分, 同时要及时中耕除草。对瓜蚜虫害要及早采取物理、生物、化学措施综合防治法, 但应以物理防治、生物防治为主。

瓜蚜物理防治方法: 悬挂银灰色地膜条带避蚜或张挂黄色诱虫板杀虫; 田间种植驱避作物驱蚜, 如在田边种植蓖麻可起到驱避蚜虫的作用; 实行人工灭杀, 需勤检查、早发现, 当个别叶

子、个别植株发生时, 人工摘除虫叶或拔除虫株集中处理。瓜蚜生物防治方法主要是利用天敌——七星瓢虫进行防治, 应在瓜蚜刚发生时适时按放一定数量的七星瓢虫, 可以起到很好的防治效果; 或在瓜田四周适当种植一些小麦、豌豆等招引瓢虫, 提供繁殖场所, 消灭蚜虫。瓜蚜化学药剂防治是用 0.3% 苦参碱水剂 750g/hm² 对喷雾防治。

3. 始坐瓜至膨瓜期的管理。西瓜开花始坐瓜期要适当补充水分, 促进坐果。当幼果 (鸡蛋大小) 坐稳至定个期时水养分需求达到高峰, 需采用叶面喷施或穴滴灌方式进行水养分的补充, 促进瓜体迅速膨大。此阶段因高温多雨, 空气湿度大, 蔓枯病、炭疽病、枯萎病发生较严重, 要早预防、早防治。蔓枯病、炭疽病、枯萎病防治方法与苗期防治方法基本相同, 但要求一种农药在同一生长周期只能使用一次。

四、包装和运输

宁夏山区西瓜多在田间销售, 不进行包装。少量进行包装的产品, 为防止运输过程中产生二次污染, 必须采用一次性新纸箱, 并对所有运输西瓜的车辆必须清扫干净。

五、记录的保持

绿色食品认证实行的全程质量控制模式, 强调从农田到餐桌整个生产过程的控制。记录作为产品质量安全水平的一种证明, 应系统、完整, 贯穿于产品形成的全过程。记录要正确、清晰、严格, 决不允许伪造、任意涂改、删除或篡改。各项记录都要在现场操作时进行, 每份记录都应该有记录人的签名和填写日期, 同时应有专人和专门的地方完整保存各项记录。

参考文献

- [1] 马爱国. 无公害农产品管理与技术 (第二版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.

(责任编辑 赵鹏飞)