

文章编号:1000-2642(2006)06-0945-05

东方百合 Tiber 多倍体诱导及其快繁研究

何林,张洁,郭启高,梁国鲁*

(西南大学 园艺园林学院,重庆 400716)

摘要:在离体培养条件下,比较了不同浓度、不同处理时间的秋水仙素对东方百合的诱变效果。结果表明:浸泡法以 0.02% 的秋水仙素处理 15 h 的诱变效果最佳,变异率达到 13.3%。混培法以添加 0.05% 的秋水仙素处理 15 d 效果最佳,变异率达到 6.7%。对多倍体植株进行组织快繁,最佳增殖培养基为 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L,增殖倍数达到 1.5,生根培养基 1/2 MS + IAA 0.2 mg/L,生根率为 100%。

关键词:东方百合;离体培养;多倍体**中图分类号:**S 335.1;S 682.29**文献标识码:**APOLYPOIDY INDUCTION AND RAPID PROLIFERATION
IN TIBER OF *LILIIUM ORIENTAL*

HE Lin, ZHANG Jie, GUO Qi-gao, LIANG Guo-lu

(College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: In *in vitro* culture, *Lilium oriental* was treated with colchicines at different concentrations and time duration. The highest mutation rate (13.3%) was achieved in the treatment of immersing the shoot tips in colchicine solution at 0.02% for 15 h. In mixed culture, the highest mutation rate (6.7%) was achieved when the explants were cultured in a medium containing colchicine at 0.05% for 15 d. In rapid propagation of the polyploid plantlets, the optimum multiplication medium was MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, the coefficient of multiplication being 1.5, and the optimum rooting medium was 1/2MS + IAA 0.2 mg/L, the rooting rate being 100%.

Key words: *Lilium oriental*; *in vitro* culture; polyploid

东方百合(*Lilium oriental*)为单子叶植物亚纲百合科(Liliaceae)百合属多年生球根花卉,花色鲜艳,花姿雅致,是一种高品位、高档次的切花,具有较高的观赏价值和经济价值。现广泛应用于各种庆典、节日和人们的日常生活中,倍受消费者的青睐,已成为鲜花市场的主要品种^[1]。目前,国际上百合育种主要以荷兰、日本、北美为首,研究方向集中在栽培与观赏性状的改良、育种策略及技术的创新与完善等方面,在种质资源的收集保存及濒危稀有物种的保护等方面也有一些研究^[2-3]。中国百合育种工作还处在起步阶段,20世纪80年代初,黄济明率先进行百合的

杂交育种工作^[4],在杂交育种方面,要把抗性育种摆在突出的地位。充分利用我国特有的种质资源,如适应性极好的自然三倍体卷丹,抗病性强的岷江百合,耐寒耐旱的毛百合和耐热淡黄花百合等,将现代育种技术如原生质体融合、多倍体育种等与传统的育种方法相结合,选育抗寒、抗旱、抗病等的百合品种^[5]。育种学家 Schenk(1987)在开发新的东方百合和亚洲百合方面开展了许多研究,他发现四倍体,特别是正常遗传的四倍体,通常植株较大,具有更多的开花物质。用 *Shikayama* × *L. henryi*, *L. speciosum* 与东方百合杂交种 *Allegra* 和 *Journeys End* 之间的杂交,已经产

收稿日期:2006-09-11

作者简介:何林(1982-),女,贵州遵义人,西南大学硕士研究生,从事植物细胞遗传学研究。

* 为通讯作者

生三倍体杂交种。近年来, Straathof 等^[6]调查发现东方百合抗病性较差, 而多倍体是植物进化的途径之一, 多倍体因其巨大性、低孕性、抗逆性及克服远缘杂交的不育性等特点而被园艺育种家所青睐^[7-8]。经过染色体加倍的多倍体百合植株具有植株健壮、抗性增强、鳞片肥厚、高产优质等特点。本实验采用多倍体育种技术, 成功地诱导培育得到了东方百合四倍体新种质资源, 提供观赏百合新品种, 并对多倍体植株进行组织快繁, 以期尽快将多倍体植株用于生产。

1 材料与方法

本试验以取自重庆南岸的东方百合栽培品种蒂伯(Tiber)为试验材料。

1.1 试验方法

1.1.1 二倍体的获得

将鳞片用洗涤剂浸泡 10 min, 自来水冲洗 30 min, 75% 的乙醇消毒 60 s, 0.1% 的升汞消毒 12 min (升汞中滴加 1~2 滴 2% 的吐温-20), 经漂洗后将其接种于培养基上, 接种后 15 d 左右鳞片基部周围陆续出现白色小点, 20 d 后陆续有芽产生, 30 d 后得到生长健壮的试管苗。

1.1.2 多倍体的诱导

1.1.2.1 浸泡法

将获得的无菌试管苗上部的叶片切掉, 剩约 1 cm 左右, 将其转移到已灭过菌的浓度分别为 0.02%, 0.05%, 0.1% 的秋水仙素溶液中, 处理时间有 15, 20, 25, 30 h 4 个处理, 共计 12 个处理组合, 每种组合处理 30 株, 放于摇床上振荡培养, 处理完毕后再接种

到培养基上, 待得到完整植株后, 用根尖进行染色体倍性鉴定^[9-10] (图 3 和图 4)。

1.1.2.2 混培法

将获得的无菌试管苗转接到添加有浓度为 0.02%, 0.05%, 0.1% 的秋水仙素溶液的培养基上, 处理时间有 10, 15, 20, 25 d 4 个处理, 共 12 个处理组合, 每种组合处理 30 株, 处理完毕后转入到不含有秋水仙素的继代培养基上继续培养, 待长势恢复良好后进行生根培养, 利用根尖进行染色体倍性鉴定。

1.1.3 四倍体百合芽的继代增殖培养

以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 BA 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L 和 NAA 0.1, 0.2, 0.5 mg/L。培养 50 d 后, 观察并统计其增殖情况, 筛选出最适的继代增殖培养基。

1.1.4 四倍体百合试管苗生根

以试管内的组培苗为材料, 将生长健壮, 高约 4~6 cm 的试管苗, 转移到生根培养基上诱导不定根的产生。生根培养基采用 1/2 MS 附加不同种类和浓度的 IBA, IAA 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L, 20 d 后统计生根率, 筛选出最佳生根培养基。

2 结果与分析

2.1 百合多倍体的诱导

2.1.1 秋水仙素浸泡法

将百合的芽浸泡在秋水仙素溶液中, 处理完后接种在培养基上, 生根后检测其倍性, 并利用 SPSS 12.0 软件包, 对变异率进行方差分析 (表 1 和图 1)。

表 1 秋水仙素溶液浸泡法对多倍体诱导的影响

Table 1 Effects of immersing shoot-tips in colchicines solution on inducing polyploids of Tiber

秋水仙素浓度/%	浸泡时间/h	处理数/个	死亡数/个	死亡率/%	获得多倍体数/株	变异率/%
0.02	15	30	5	16.7	4	13.3 a
	20	30	8	26.7	1	3.3 c
	25	30	17	56.7	0	0.0 d
	30	30	28	93.3	0	0.0 d
0.05	15	30	4	13.3	1	3.3 c
	20	30	6	20.0	2	6.7 b
	25	30	20	66.7	0	0.0 d
	30	30	28	93.3	1	3.3 c
0.1	15	30	15	50.0	1	3.3 c
	20	30	17	56.7	0	0.0 d
	25	30	30	100	0	0.0 d
	30	30	30	100	0	0.0 d

由表 1 和图 1 可见:随着秋水仙素处理浓度的提高,材料的伤害加重,芽出现了不同程度的“烂心现象”(图 1)。相同浓度下,处理时间与其受伤害程度也呈正相关。高浓度的秋水仙素处理下,随着处理时间的延长,伤害程度加重,其变异率反而下降。经方

差分析表明不同浓度秋水仙素和处理时间对变异率差异显著。根据研究结果,认为 0.02% 秋水仙素处理 15 h 效果好,获得的纯合四倍体植株(图 2)最多,变异率也最高,达到了 13.3%。

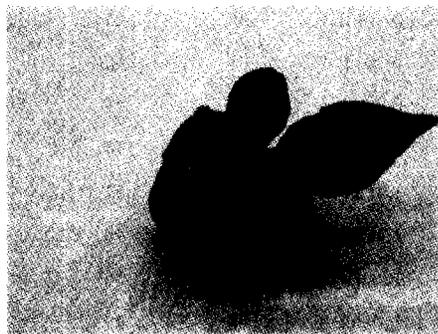


图 1 秋水仙素诱导 Tiber 后的“烂心现象”

Fig 1 Tiber had rot after inducing by colchicines



图 2 Tiber 四倍体植株

Fig 2 The tetraploid plants of Tiber



图 3 百合二倍体染色体数目($2n=2 \times =24$)

Fig 3 The chromosome number of diploid lily($2n=2 \times =24$)



图 4 百合四倍体染色体数目($2n=4 \times =48$)

Fig 4 The chromosome number of tetraploid lily($2n=4 \times =48$)

表 2 秋水仙素掺入培养基对百合多倍体诱导的影响

Table 2 Effects of shoot-tips cultured in colchicines medium inducing polyploids of Tiber

秋水仙素浓度/%	处理时间/d	处理数/个	死亡数/个	死亡率/%	获得多倍体数/株	变异率/%
0.02	10	30	0	0	0	0
	15	30	0	0	0	3.3
	20	30	0	0	0	3.3
	25	30	6	20	1	3.3
0.05	10	30	0	0	0	0
	15	30	1	3.3	2	6.7
	20	30	3	10	0	0.0
0.1	25	30	7	23.3	0	0.0
	10	30	2	6.7	0	0.0
	15	30	4	13.3	1	3.3
	20	30	9	30.0	2	6.7
	25	30	15	50.0	1	3.3

2.1.2 秋水仙素混培法

秋水仙素掺入培养基的混培法也是进行诱导多倍体较为常见的一种方式。本研究也采用了此种方式进行多倍体诱导,其结果见表2。

可见,百合多倍体的变异率随处理时间,秋水仙素浓度的不同诱导效果均有不同。加倍率随着时间和浓度的变化而变化,处理时间越短,秋水仙素浓度越低,加倍率越低;处理时间延长,秋水仙素浓度增加,加倍率随之增加,但增加到一定浓度加倍率反而降低。因此要获得较高的加倍率,处理时间和秋水仙素浓度是非常重要的。长时间的处理也会造成毒害使百合烂心死掉,受伤程度随着浓度的提高和时间的延长而加强。由表2可见,添加0.05%的秋水仙素处理15 d效果最佳,可获得最多的纯合四倍体,而且变异率最高,达到了6.7%。对于百合的多倍体诱导,混培法效果不如浸泡法。

2.2 不同激素比对四倍体百合继代增殖培养的影响

将获得的四倍体植株接种到含有不同细胞分裂素和生长素组合的MS培养基上培养50 d左右,观察统计芽的增殖和生长情况。

激素是诱导芽增殖的关键物质,适宜的激素组合可以使芽的增殖倍数达到最高。对Tiber来说,处理10增殖倍数达到最高为1.7,但芽有不同程度的玻璃化现象。处理4增殖倍数为1.5,但苗长势良好,且较健壮。综合考虑后选择芽的继代增殖最佳培养基

为处理4。

表3 不同激素比对芽继代增殖培养的影响

Table 3 Effect of different hormones combinations on subculture multiplication

处理号	BA+NAA /(mg·L ⁻¹)	接种芽数 /个	增殖后芽数 /个	芽增殖 倍数
1	0.5+0.1	30	45	0.5
2	0.5+0.2	30	60	1.0
3	0.5+0.5	30	48	0.6
4	1.0+0.1	30	75	1.5
5	1.0+0.2	30	57	0.9
6	1.0+0.5	30	48	0.6
7	1.5+0.1	30	66	1.2
8	1.5+0.2	30	69	1.3
9	1.5+0.5	30	57	0.9
10	2.0+0.1	30	81	1.7
11	2.0+0.2	30	78	1.6
12	2.0+0.5	30	51	0.7

注:芽增殖倍数=(增殖后芽总数-增殖前芽个数)/增殖前芽个数。

Note: multiplication coefficient = (total number of buds - inoculate number of buds)/inoculate number of buds.

2.3 生长素浓度对根诱导的影响

以1/2 MS为基本培养基,附加不同种类不同浓度的生长素,将用来生根的健壮的四倍体组培苗接种其上,培养15~20 d后统计生根情况(表4)。

表4 IBA IAA 对根诱导的影响

Table 4 Effects of IBA IAA on roots formation

材料名称	培养基/(mg·L ⁻¹)	接种数/株	诱导成功量/株	平均每株根数/条	生根率/%
Tiber	1/2 MS + IBA 0.2	30	28	8.1	93.3
	1/2 MS + IBA 0.5	30	29	7.3	96.7
	1/2 MS + IBA 1.0	30	30	7.8	100
	1/2 MS + IBA 1.5	30	30	8.0	100
	1/2 MS + IBA 2.0	30	30	6.7	100
	1/2 MS + IAA 0.2	30	30	7.6	100
	1/2 MS + IAA 0.5	30	28	7.4	93.3
	1/2 MS + IAA 1.0	30	28	6.8	93.3
	1/2 MS + IAA 1.5	30	25	6.7	83.3
	1/2 MS + IAA 2.0	30	28	7.9	93.3

从表 4 可知,生长素的种类和浓度对百合的生根起到关键的作用。Tiber 的最佳生根组合为 1/2 MS + IAA 0.2 mg/L,生根率达到 100%,根多且粗壮,使用 IBA 也能得到较多的生根数,生根率也高,但根系相对使用 IAA 得到的根系,长势较弱,根纤细一些。所选择的生长素的种类和浓度,虽然生根效果有所不同,但是所有的组合都有根长出,并且生根率均达到 80% 以上。

3 讨 论

3.1 人工诱导多倍体百合的探讨

本实验中的材料是一种对秋水仙素溶液很敏感的植物,秋水仙素人工诱导关键在于秋水仙素的浓度和处理时间组合的筛选。一般浓度低,处理时间长;浓度高,处理时间短。从文献报道来看多数人倾向于高浓度,短时间的处理。但针对本实验来说,从权衡诱导效果与受伤程度之间的平衡来看,低浓度短时间的秋水仙素处理更利于诱导获得多倍体百合。

3.2 多倍体百合组织快繁的探讨

四倍体百合芽的增殖时间较长,试验中发现芽接种到分化培养基上 25 d 后基部才陆续出现白色小点,30 d 后才有芽长出。这是因为由于遗传物质的增加,多倍体生理相应发生很多变化,多倍体在所有的生长发育阶段上都表现缓慢,致使生育期延长。

四倍体百合增殖阶段,以较低浓度的 BA 为佳,浓度过高虽增殖倍数高但有的已经出现了玻璃化现象。芽苗长势也不好,所以选择了 BA 浓度在 1.0 mg/L 以下为好。NAA 也起着不可忽视的作用。当 BA 与 NAA 的比例越高时,增殖倍数就越高,BA 与 NAA 的比例越低时,增殖倍数就越低。所以实验中选择了处理 4 的比例为佳。

四倍体百合生根较容易,对 Tiber 这个品种来说,选择了 IAA 为最佳的生根激素。但生长素浓度

也不可过高,当 IAA 浓度达到 1.5 mg/L 时,根多但短,且长到 0.5 cm 长时根尖有的已变成褐色,不利于后面的移栽。所以实验中选择了 IAA 0.2 mg/L。

参考文献:

- [1] 赵祥云,王树栋. 鲜切花百合生产原理及实用技术[M]. 北京:中国林业出版社,2005:7.
- [2] VAN DE KASTEEL F S C S. Conservation of wild *Lilium* species[J]. *Biological Conservation*, 1974, 6(1): 26 - 31.
- [3] STANILOVA M I, ILCHEVA V P, ZAGORSKA N A. Morphogenetic potential and in vitro micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip[J]. *Plant Cell Reports*, 1994(13): 451 - 453.
- [4] 黄济明,赵晓艺,张国民,等. 玫红百合为亲本育成百合种间杂种[J]. *园艺学报*, 1990, 17(2): 153 - 157.
- [5] 李守丽,石雷. 百合育种研究进展[J]. *园艺学报*, 2006, 33(1): 203 - 210.
- [6] LOFTIER H J M, MEIJER H, STRAATHOF TH P, et al. Segregation of *Fusarium* resistance in an interspecific cross between *Lilium longiflorum* and *Lilium dauricum*[J]. *Acta Hort*, 1996(414): 203 - 208.
- [7] 沈显生. 浅析植物多倍体现象[J]. *生物学杂志*, 1995(5): 8 - 11.
- [8] 连雪斌. 兰州百合多倍体诱导试验报告[J]. *甘肃农业科技*, 1995(6): 14 - 15.
- [9] 李懋学,张赞平. 作物染色体研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [10] 魏爱民,杜胜利. 植物细胞染色体倍性鉴定方法[J]. *天津农业科技*, 2001, 7(2): 41 - 43.

责任编辑:欧 宾