维普资讯 http://www.cqvip.com

贵州野生淡黄花百合离体快繁研究

张文娥,潘学军,胥青青,曾家艳 (贵州大学农学院,贵州贵阳 550025)

摘要 [目的]为获得贵州野生淡黄花百合的离体快繁体系。[方法]以MS为基本培养基,研究了影响淡黄花百合珠芽不定芽诱导、小鳞茎增殖和生根培养的主要因素。[结果]在淡黄花百合初代培养过程中,生长素浓度、珠芽大小、珠芽处理方式、接种时间均能对不定芽的诱导产生影响。其中,以8月下旬采取粒径大于等于1 cm的珠芽,剥去外层鳞片后接种在附加0.1 mg/L IBA的1/2 MS培养基上的不定芽的诱导效果最好。培养基类型和继代时间对增殖培养有显著影响,以40 d内转接继代在1/2 MS+0.1 mg/L KT+0.1 mg/L IBA的培养基上的增殖效果最好,其愈伤组织诱导率达97.3%,小鳞茎诱导率高达100%,且不定芽生长健壮。在1/2 MS+0.1 mg/L IBA培养基上生长和生根情况均为良好。按照培养室炼苗、室外炼苗和移栽的程序,淡黄花百合试管苗移栽成活率在98%以上。[结论]成功实现了淡黄花百合的驯化移栽,该技术体系可以为贵州野生淡黄花百合的资源保护和资源利用提供参考。

关键词 贵州;野生;淡黄花百合;离体;快速繁殖
中图分类号 S336 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)14-05770-03

Study on *in vitro* Rapid Propagation of *Lilium sulphureum*

ZHANG Wen-e et al (Agricultural College of Guizhou University, Guiyang Guizhou 550025)

Abstract [Objective] The research aimed to acquire the rapid propagation of *Lilium sulphureum*. [Method] taking MS media as basic media, the major factors which affected inducement of adventitious buds, multiplication of bulbs and radication of adventitious buds were studied. [Result] The hormone concentration, the diameter and the treating mode of bulbils and the inoculation time all effected on the induction of adventitious buds in first culture of *Lilium sulphureum*. It was the best to the induction of adventitious buds that the explants whose diameter was bigger than 1 cm, were taken in the last ten-day of August, after shucking off the outer squamas, and the bulbils were inoculated on the 1/2 MS+0.1mg/L IBA. The media types and second culture period all affected the multiplication of *Lilium sulphureum*. It had the best effect on multiplication to take 1/2 MS+0.1mg/L KT +0.1mg/L IBA as multiplication media and second culture every 40 d. In this way, the callus induction rate was 97.3%, the percentage of bulb induction was 100%, and the adventitious buds grew vigorous. In the 1/2 MS+0.1 mg/L IBA media, the radication was well. According the process of domestication in culture room and outdoors, then transplanting the seedlings, the transplant survival percentage of seedlings was more than 98%. [Conclusion] The domestication and transplanting of seedlings were carried out. This technical system can provide reference to the conservation and use of wild *Lilium sulphureum* resouces in Guizhou province.

Key words Guizhou; Wild; *Lilium sulphureum*; *In vitro*; Rapid propagation

淡黄花百合(*Lilium sulphureum* Baker)为百合科百合属多年生球根花卉,集药用、食用和观赏于一身[1]。目前,淡黄花百合的繁殖一般采用分球繁殖法,该法繁殖系数低,繁殖速度较慢,每株百合1年仅能得到1~3个子球,且需要培育2~3年才能达到开花年龄,因此,生产成本高。在生产中,也可用鳞片扦插法进行繁殖,但扦插条件较难控制。若湿度小成活率较低,而湿度过大又易腐烂,并且长期的扦插繁殖极易导致病毒积累,严重影响百合的生长和品质[2]。组织培养技术可以解决上述问题,但目前关于淡黄花百合离体快繁方面的报道较少[1,3-5],且均以地下鳞茎片为外植体进行研究,外植体取材不仅困难,且易对老株造成破坏甚至导致死亡。为此,笔者以贵州野生淡黄花百合的珠芽为外植体,对淡黄花百合的离体快繁及其主要影响因素进行了研究,旨在达到提纯复壮和快速繁殖的目的,并为贵州野生淡黄花百合种质资源的保存及育种利用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料 以贵州野生淡黄花百合的珠芽为试材。野生百合采于贵州花溪海拔1 260 m的山坡疏林地,种植于贵州大学花卉资源圃。

1.2 方法

1.2.1 不定芽的诱导。参照王蒂的方法[6]。分别于2006年8月下旬和2006年10月上旬从生长健壮的淡黄花百合植株上剥取珠芽,按粒径大小(粒径≥1cm、粒径<1cm)分类后消毒,将消毒后的珠芽经不同方法(直接接种、剥掉外层鳞片后接种)处理后分别接种在附加0.1、0.2 mg/L IBA的1/2 MS培养基上。每瓶接种3个珠芽,每处理接种10瓶,重复3次。培养温度(26±2)℃,每日光照12 h,光强2 000 lx,7 d后陆续统计污染率、生根率、生根时间及不定芽的生长状况。生根时间为接种后到开始出现根原基的天数。污染率及生根率的计算公式分别为:

污染率=污染外植体数/接种外植体数×100%

生根率=生根外植体数/接种外植体数×100%

1.2.2 增殖培养。参照王蒂的方法[6]。将初代培养且生长正常的百合试管苗转移到增殖培养基上。增殖培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L 2,4-D (M1);MS+5.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D (M2);MS+0.2 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L NAA(M3);MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA (M4);MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA (M5);1/2MS+0.1 mg/L IBA (HM1);1/2 MS+0.2 mg/L IBA(HM2);1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+0.1 mg/L NAA (HM3);MS+0.1 mg/L KT+0.1 mg/L NAA(HM4);MS+0.1 mg/L KT+0.1 mg/L IBA(HM5)。每培养基均附加蔗糖2%,琼脂0.6%,pH值5.6~5.8。培养温度(25±1)℃,每日光照16 h,光强2 000 lx,10 d后逐渐统计数据。分别于增殖培养30、40、50、90 d后继代,继代20 d后统计数据。愈伤组织诱导率及小鳞茎分化率的计算公式分别为:

愈伤组织诱导率=产生愈伤组织的外植体数/外植体总数×100%

小鳞茎分化率=产生小鳞茎的外植体数/外植体总数×100%

基金项目 贵州省自然资金项目(黔科合J字[2007]2055号);贵州大学人才科研项目(贵大人基合字2006-700971301,贵大SRT字(20)号)。

作者简介 张文娥(1976-),女,山东沂水人,硕士,讲师,从事园艺植物生理与分子生物学方面的研究。

收稿日期 2008-01-28

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.3 生根培养。将增殖培养后的百合小鳞茎转移到 HM1 号培养基中进行生根培养，20 d 后统计结果。

1.2.4 驯化移栽。参照潘学军等的方法[7]。将生根后生长健壮的百合试管苗移栽到栽培基质（由 5 份腐叶土、3 份园土和 2 份河沙混合配制而成）中进行驯化，20 d 后统计移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导结果

2.1.1 接种时期对无菌系建立的影响。由表 1 可知，外植体在不同时期接种污染率差别较大。8 月下旬接种，污染率仅为 6.67%，而到 10 月中旬接种污染率则明显提高为70.00%，此时，建立无菌系困难较大。因此，当珠芽长到一定大小时应及时接种，以降低污染率，提高无菌系建立的成功率。

表 1　接种时期对无菌系建立的影响

Table 1　Effects of inoculating date on the establishment of aseptic strain

接种时间 Inoculating time	接种数 Inoculating number//个	污染数 Contamination number//个	污染率 Contamination rate//%
8 月下旬 Late August	90	6	6.67
10 月中旬 Middle October	90	63	70.00

2.1.2 生长素浓度对不定芽诱导的影响。培养基中的植物生长调节剂种类和浓度是组织培养能否成功的关键因素。由表 2 可知，该试验中生长素浓度对淡黄花百合不定芽诱导的影响较大，在基本培养基（1/2MS）中添加 0.1 mg/L IBA 比添加 0.2 mg/L IBA 更适合淡黄花百合生根，其生根率达到 90.00%，生根时间仅为 18 d，而添加 0.2 mg/L 的生根率仅为 70.00%，生根时间达到了 32 d；在 2 种生长素浓度下的幼苗生长势也有所不同，添加 0.1mg/L 的生长势明显强于添加 0.2 mg/L 的生长势。

表 2　生长素浓度对不定芽诱导的影响

Table 2　Effects of auxin concentration on the induction of adventitious buds

IBA 浓度 IBA concentration mg/L	生根率 Rooting rate %	生根时间 Rooting time d	不定芽生长情况 Growth status of adventitious buds
0.1	90.00	18	强 Strong
0.2	70.00	32	较强 Relatively strong

2.1.3 外植体的大小与处理方式对不定芽诱导的影响。由表 3 可知，外植体的大小和初代培养时的处理方法对不定芽诱导影响较大，在无菌系建立时，剥除外层鳞片进行初代培养不仅能显著降低污染率，还能提高生根率，缩短生根时间，但对百合幼苗的生长势影响不大。对淡黄花百合而言，从田间直接采取粒径≥1 cm 的珠芽为外植体更易建立无菌系，不仅其生根率（85%）略高于粒径<1 cm 处理（83%），且试管苗根系生长健壮，生根数也高于粒径<1 cm 处理。

表 3　外植体对不定芽诱导的影响

Table 3　Effects of explants on the induction of adventitious buds

处理方式 Treatment mode	污染率 Contamination rate %	生根率 Rooting rate %	生根时间 Rooting time d	不定芽生长情况 Growth status of adventitious buds	根的生长情况 Root growth	根数 Root number 条
直接接种 Direct inoculation	8.89	81.11	30	强	-	-
剥去外层鳞片后接种 Inoculation after	5.55	57.78	20	强	-	-
粒径≥1 cm Particle size≥1 cm	-	85.00	-	-	健壮	2~3
粒径<1 cm Particle size<1 cm	-	83.00	-	-	次健壮	1~2

注：-表示处理方式对该项指标无影响。Note: - stands for the treatment mode had no influence on the index.

2.2 增殖培养结果

2.2.1 培养基类型对淡黄花百合增殖的影响。由表 4 可知，基本培养基（MS 培养基和 1/2 MS）对淡黄花百合增殖的影响差异不大，但激素的种类和浓度却极大地影响其增殖。添加了 2,4-D 的培养基虽然愈伤组织诱导率和小鳞茎诱导率都较高，但增殖系数偏低，其不定芽生长健壮，但小鳞茎外层鳞片开裂，内部产生愈伤组织，并分化出不定芽，类似多胚产生（图 1）。而在添加了 IBA 的增殖培养基中，淡黄花百合首先产生大量根系，而后产生愈伤组织（图 2），并随着浓度和与其他激素的配比不同而变化，其中添加 IBA 的 1/2 MS 培养基上愈伤组织诱导率最低，浓度为 0.1 mg/L 时诱导率为 50.3%，浓度为 0.2 mg/L 时诱导率仅为 48.7%，但一旦产生愈伤组织，小鳞茎的诱导非常容易，其诱导率均在 90.0% 以上。在添加了 NAA 和 6-BA 的培养基上，小鳞茎可较高频率地诱导愈伤组织，诱导率均在 80.0%以上，增殖系数较高，不定芽生长健壮（图 3）。在添加了 KT 的增殖培养基上，无论是愈伤组织诱导率和小鳞茎诱导率，还是增殖系数均最高，且其不定芽生长健壮（图 4）。因此，M4 、M5 、HM3、

表 4　培养基类型对淡黄花百合增殖的影响

Table 4　Effects of culture medium types on the multiplication of *Lilium sulphureum*

培养基类型 Types of culture medium	愈伤组织诱导率 Induction rate of callus//%	小鳞茎诱导率 Induction rate of bulb//%	增殖系数 Multiplication coefficient	不定芽的生长状况 Growth status of adventitious buds
M1	80.20	93.40	较低 Lower	鳞茎基端膨大，类似多胚现象，健壮 ntumescent basal end of the bulb, similar to polyembryony, healthy
M2	89.80	95.60	较低 Lower	同上 The same as above
M3	76.60	92.20	较低 Lower	同上 The same as above
M4	90.60	98.50	高 High	健壮，绿色 Healthy, green
M5	93.20	99.30	高 High	健壮，绿色，有不定根产生 Healthy, green, appearance of adventitious root
HM1	50.30	94.30	较高 higher	不定根大量产生，不定芽绿色，健壮 Appearance of many adventitious roots, green adventitious buds, healthy
HM2	48.70	92.10	较高 Higher	同上 The same as above
HM3	80.50	95.00	高 High	健壮，绿色，有不定根产生 Healthy, green, appearance of adventitious root
HM4	94.50	100.00	极高 Highest	健壮，绿色 Healthy, green
HM5	97.30	100.00	极高 Highest	健壮，绿色，有不定根产生 Healthy, green, appearance of adventitious root

维普资讯 http://www.cqvip.com

图 1 2,4-D 对增殖培养的影响

Fig. 1 Effects of 2,4-D on multiplication culture

图 2 IBA 对增殖培养的影响

Fig. 2 Effects of IBA on multiplication culture

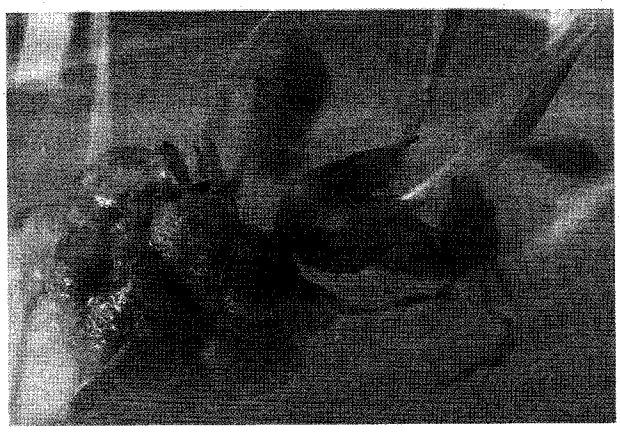

图 3 6-BA 对增殖培养的影响

Fig. 3 Effects of 6-BA on multiplication culture

图 4 KT 对增殖培养的影响

Fig. 4 Effects of KT on multiplication culture

HM4 和 HM5 培养基都较适合淡黄花百合的增殖培养，但综合增殖情况、操作简化状况及成本节约等多方面因素，以HM5 即 1/2 MS+0.1 mg/L KT+0.1 mg/L IBA 效果最好。

2.2.2 继代时间对淡黄花百合增殖的影响。由表 5 可知，继代时间对淡黄花百合的增殖具有明显的影响。随着继代时间的延长，愈伤组织活力逐渐下降，愈伤组织增殖率和鳞茎诱导率逐渐降低。淡黄花百合较适宜的最长继代间隔为 50 d，培养 90 d 后继代将极大地降低愈伤组织活力和小鳞茎诱导率。因此，综合考虑愈伤组织增殖率和鳞茎诱导率及操作时间等方面，在 40 d 时继代转接有利于淡黄花百合的增殖。

2.3 生根培养与驯化移栽结果 将增殖后的淡黄花百合小鳞茎转接到 HM1 培养基（1/2 MS+0.1 mg/L IBA ）上进行生根培养（图 5），5 d 后产生毛状根尖，生根率为 100.0%，生根培养 20 d 即可进行炼苗移栽（图 6）。按照培养室炼苗、室外炼苗和移栽的程序，以 5 份腐叶土、3 份园土和 2 份河沙混合而成的营养土为基质，移栽成活率在 98.0%以上。图 7 为移栽 20 d 后的生长情况。

表 5 继代时间对淡黄花百合增殖的影响

Table 5 Effects of subculture interval on multiplication of *Lilium sulphureum*

转接间隔 Subculture interval d	愈伤组织活力 Vigor of callus	愈伤组织增殖率 Multiplication rate of callus %	鳞茎诱导率 Induction rate of bulbs %	增殖系数 Multiplication coefficient
30	强 Strongest	100.00	100.00	高 High
40	强 Strongest	98.30	100.00	高 High
50	较强 Strong	92.40	98.00	较高 Higher
90	弱 Weak	60.00	76.60	低 Low

图 5 生根培养

Fig. 5 Rooting culture

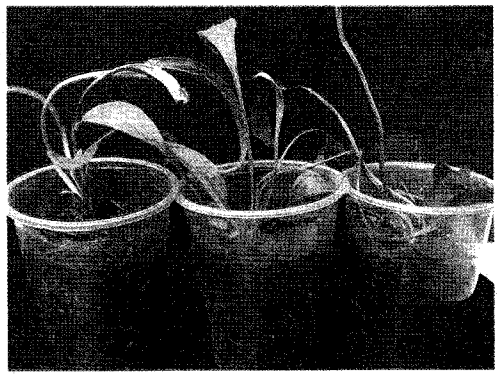

图 6 移栽前的根系生长情况

Fig. 6 Growth status of roots before transplanting

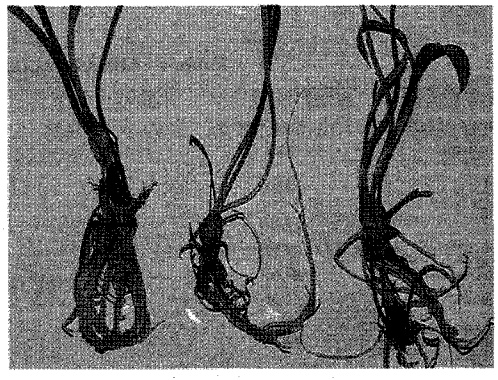

图 7 移栽 20 d 后生长情况

Fig. 7 Growth status of seedlings after transplanting for 20 d

（下转第 5827 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

为6.3 ℃和4.2 ℃,实测值为9.1 ℃和5.6 ℃。由于该次雪灾积雪厚度普遍超过20 cm,因此在降雪及积雪维持阶段积雪对越冬作物不会造成严重冻害。

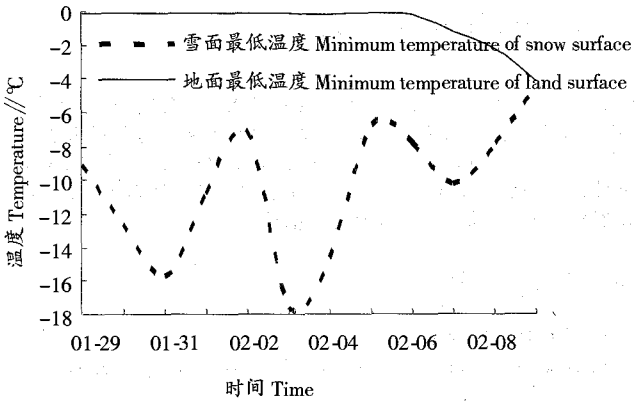

图3　合肥气象站雪灾期间雪面与地面最低温度

Fig. 3　Minimum temperature of snow surface and land surface during snow disaster in Hefei Meteorological Station

2.2　雪后期低温及其影响　天气晴好情况下地表辐射强烈,地表温度下降强烈,容易出现极端低温,反之则地表温度不容易出现强烈下降。该次雪灾在降雪期间气温日较差均比较平稳,化雪期间则显著增大。元月25~28日由于持续降雪,天空云层厚重,气温日较差为1.9~2.4 ℃;2月2日上午雪停,天空完全打开,2月3日合肥站最低气温下降到-11.2 ℃,气温日较差达14.3 ℃,同时肥东、肥西最低气温分别达-13.0 ℃和-12.3 ℃,为1991年以来的历史次低值。

雪面的强烈反射和辐射以及融雪需要的能量是造成积雪及融雪期间低温的主要原因,地表获得太阳能的多少则是影响温度高低的根本因素。进入2月中旬,太阳直射点已达11°S以北,安徽地区正午太阳高度已达45°~48°,地表获得的太阳辐射总量大幅度增加,地表能量净增加,温度开始回升。

3　结论与讨论

(1)该次雪灾过程出现在元月中旬到2月初,越冬作物已经经过低温炼苗,对低温具有较强抵抗能力,且尽管气温较低,2月3日最低气温达-11.2 ℃,创16年来最低,但由于被雪覆盖,地表温度维持在0 ℃左右,因此雪灾过程中越冬作物受冻害影响有限。

(2)由于融雪耗能增加、雪被辐射强等因素,在融雪后期地表温度与气温有短暂的极低值,2月7~10日气温全部在-5.0 ℃以下,2月10日地表最低温度也达-4.6 ℃,因此后期由于融雪等原因对越冬作物有一定不利影响,但由于已到2月中旬,地表热力状况大幅改善,在安徽不会出现灾害性冻害。根据不同作物耐寒性的不同,对冬油菜的不利影响较大,将出现不同程度的死苗,对冬小麦的直接影响很小,但在淮河以北地区可能出现轻度冻拔现象。

参考文献

[1] 夏文荣,郭平银,王凤池,等.播期量对小麦越冬死苗的耦合效应[J].安徽农业科学,2008,36(2):480,492.

(上接第5772页)

3　结论与讨论

我国是百合属植物的故乡,全世界百合属植物约有100种,中国原产约55种,是百合属植物自然分布中心之一[8]。但是,目前我国现有的百合种质资源尚未得到充分的利用,破坏和流失现象十分严重,如何保护、研究、开发、利用我国宝贵的百合种质资源和开展百合新品种选育工作,是当前我国花卉育种上亟待解决的重要课题[9]。贵州地理环境多样,野生百合资源丰富,抗性较强,目前贵州百合主要作为食品和药材,其取材完全依靠野生资源,资源压力很大[10]。该试验以贵州野生淡黄花百合的珠芽为外植体,打破淡黄花百合组织培养中以鳞茎为外植体的传统,取材方便,且外植体冲洗处理简单,污染率低。以此为外植体,通过不定芽的诱导、增殖培养、生根培养和驯化移栽,建立起了一套完整的适合野生淡黄花百合组织培养和快速繁殖的技术体系。通过试验发现,1/2 MS+ 0.1 mg/L IBA适合野生淡黄花百合珠芽不定芽诱导和增殖不定芽的生根;1/2 MS+0.1mg/L IBA + 0.1 mg/L KT最适合淡黄花百合的增殖培养,除此之外,MS+ 1.0 mg/L 6-BA + 0.1~0.3 mg/L NAA、1/2 MS+ 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L KT和1/2 MS+ 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA 3种培养基的增殖效果也较好。

在以往的组织培养中,增殖培养多以MS为基本培养基。该试验发现,淡黄花百合增殖培养中只要激素种类和浓度合适,即使利用1/2 MS培养基,其增殖率也较高,这可大大降低组织培养生产成本,提高其生产利用率。淡黄花百合试管苗的驯化移栽试验表明,按照培养室炼苗、室外炼苗和移栽的程序,以5份腐叶土、3份园土和2份河沙混合而成的营养土为基质,其移栽成活率较高。这可能与淡黄花百合本身为一种野生百合,其适应性和抗逆性均较强有关。因此,驯化移栽不会成为淡黄花百合组织培养技术在生产应用中的制约因素。

参考文献

[1] LI D,ZENG Y L,WEI F L.In vitro conservation of lilium sulphureum baker [J].Journal of Guiyang College,2006,1 (3):45-47.
[2] 包满珠.花卉学[M].北京:中国农业出版社,2003.
[3] LI D,TAN F,ZHU SH Q.Tissue culture of lilium sulphureum baker[J].Seed,2005,24(9):27-29.
[4] LI D,TAN F.Research of the factors affecting the bud induction of lilium sulphureum baker scale[J].Seed,2004,23(11):18-20.
[5] QIU N H,LUO L H,WANG Q,et al.Tissue culture and rapid propagation of lilium sulphureum baker [J].Chinese Wild Plant Resources,2004,23(2):64-65.
[6] 王蒂.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2004.
[7] PAN X J,WANG Y J,ZHANG J X,et al.Study on transplanting techniques of grape seedlings from embryo rescue [J].Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2004,24(6):1077-1082.
[8] 程金水.园林植物遗传育种学[M].北京:中国林业出版社,2000.
[9] WU ZH H,SHI J S,CHI J,et al.Research advances on resources and breeding of ornamental lily [J].Journal of Nanjing Forestry Universty,2006,30(2):113-118.
[10] SUN CH,DONG Y,HAN J Y.Study of continued development and utilization of liliaceae in Guizhou [J].Resource Development &Market,2006,22(6):552.