

野百合鳞茎芽的诱导和增殖的初步研究

莫昭展, 符韵林, 戚萌 (1. 玉林师范学院, 广西玉林 537000; 2. 广西大学林学院, 广西南宁 530004)

摘要 以野生百合的鳞茎为外植体, 研究鳞茎的最佳消毒时间、诱导鳞茎芽的最佳部位、影响鳞茎芽诱导的最佳激素组合以及不同激素对鳞茎芽增殖的影响。结果表明: 用75%酒精30 s + 0.1% $HgCl_2$ 5 min 消毒效果最好。鳞茎芽的诱导能力依次是: 内层 > 中层 > 外层; 基部 > 中部 > 上部。MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L 对鳞茎芽的诱导比较好, MS + 6-BA 0.8 mg/L + NAA 0.05 mg/L 对鳞茎芽的增殖比较好。

关键词 野百合; 鳞茎芽; 诱导; 增殖

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)31-09890-03

Primary Study on the Induction and Multiplication of Bulb Bud in *Lilium brownii*

MO Zhao zhan et al (Yulin Normal College, Yulin, Guangxi 537000)

Abstract With bulb bud in *Lilium brownii* as explants, the optimum disinfection time, the optimum part of inducing bulb bud, the optimum hormone combination of affecting the induction of bulb bud and the effects of different hormones on the multiplication of bulb buds were studied. The results showed that disinfecting with 75% alcohol for 30 s and 0.1% $HgCl_2$ for 5 min had the best disinfection effect. The inducing abilities of bulb bud were in turn: the internal layer > the middle layer > the external layer; the basal part > the middle part > the top part. MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L was better for the induction of bulb bud and MS + 6-BA 0.8 mg/L + NAA 0.05 mg/L was better for the multiplication of bulb bud.

Key words *Lilium brownii*; Bulb bud; Induction; Multiplication

野百合(*Lilium brownii* F.E. Brown ex Mellez) 为百合科百合属的一个种, 是我国的原产特有种^[1-2], 分布于我国南部, 香港、广东省、广西省等地^[3]。野百合为园艺观赏价值极高的鲜切花材料, 也是一种常用的杂交亲源, 为现代奥林匹克(Olympic) 系的重要亲本^[4], 是亚洲百合杂种群(Asiatic hybrids) 的主要亲本之一^[5], 具有较强的抗逆性^[6], 对其开展广泛的研究对我国百合属植物的育种工作将会有很大的促进作用。目前仅有很少对原种野百合的组织培养研究报道^[7]。笔者以野百合鳞茎为材料, 利用不同种类、不同浓度的激素进行丛生芽诱导并增殖的研究, 成功地诱导出大量的丛生芽, 对发展野生百合的大规模生产, 保护野生资源和生态环境有重要的意义。

1 材料与方

1.1 材料来源 试验材料来自广西防城港市, 采集生长健壮、开花性状好、无病虫害的野百合植株的鳞茎。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒及接种方法。 取野百合的盘茎剥出鳞片, 自来水冲洗净后用皂液浸泡10~20 min, 然后流水冲洗3~5 h, 最后又放入500 ng/L 的安素菌毒清试剂中消毒5 min。在超净工作台上用75%酒精浸泡一定时间(浸泡消毒时间按试验设计安排而定), 然后用无菌水冲洗3~4次; 投入0.1%升汞消毒一定时间(消毒时间按试验设计安排而定, 0.1%升汞滴加2~3滴吐温-80), 期间更换1次升汞消毒液, 然后用无菌水冲洗6~7次后备用。接种时按试验要求而定, 部分整片接种, 部分按上部、中部和基部分开接种。

1.2.2 不定芽的增殖培养的接种方法。 取出丛生芽后, 用解剖刀小心的把初代培养时留下的老鳞茎和少数的已经长出来的根去掉, 然后每3~4芽为一组, 接种到增殖培养基上培养。

1.3 培养基及培养条件 初代培养采用MS基本培养基,

附加不同浓度的6-BA和NAA处理。增殖培养采用MS培养基, 附加不同浓度的6-BA和NAA处理。以上培养基蔗糖浓度均为2.5%, pH值为5.4~5.8, 在1.2 kg/cm²压力下灭菌20 min。接种后置于温度(25±1)℃, 光照1000~1500 lx, 光照周期为12 h/d的培养室内培养。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对野百合鳞茎的影响 由于品种上的差异, 其他品种鳞茎的消毒最佳时间不一定适合野百合。为此, 对野百合鳞茎的最佳消毒时间做了部分试验, 结果如表1。从表1可知, 随75%酒精的消毒时间的增加, 鳞茎的污染率明显地降低, 而成活率则是先升高后降低, 这主要是由于酒精消毒过久, 导致鳞茎的死亡。0.1% $HgCl_2$ 的消毒时间增加时, 污染率也明显降低, 而成活率稍有增大, 但变化幅度较小。但不管是75%酒精, 还是0.1% $HgCl_2$ 消毒时间的增加, 野百合的污染率都降低。当75%酒精和0.1% $HgCl_2$ 消毒时间最长时, 污染率最低, 达12%, 但是成活率也较低, 同时鳞茎转绿时间也较长。试验结果显示, 野百合鳞茎的消毒效果最好的组合是75%酒精30 s + 0.1% $HgCl_2$ 5 min, 此时, 污染率只有20%, 而成活率则高达73.4%, 鳞茎转绿时间也仅需要5 d。因此, 用75%酒精30 s + 0.1% $HgCl_2$ 5 min 消毒效果最好, 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。其他组合则不是因为消毒过度伤害了鳞茎, 就是污染严重导致野百合鳞茎的成活率过低。

表1 不同消毒时间对野百合鳞茎的影响

75%酒精 s	0.1% $HgCl_2$ min	接种数 个	污染数 个	污染率 %	成活数 个	成活率 %	鳞茎转绿时间 d
10	5	22	15	68.2	4	18.2	5
10	7	25	13	52.0	9	36.0	6
10	9	20	10	50.0	9	45.0	9
20	5	29	14	48.3	14	48.3	8
20	7	20	7	35.0	11	55.0	7
20	9	19	5	26.3	10	52.6	10
30	5	30	6	20.0	22	73.4	5
30	7	30	5	16.7	17	56.7	6
30	9	25	3	12.0	10	40.0	9

基金项目 广西教育厅科技项目; 玉林师范学院青年项目。

作者简介 莫昭展(1974-), 男, 广西玉林人, 博士, 副教授, 从事植物种质资源利用的教学与研究工作。

收稿日期 2007-05-26

2.2 不同接种方法对野百合鳞茎芽诱导的影响

2.2.1 不同发育程度鳞茎对鳞茎芽形成的影响。从表2可知,不同发育程度的百合鳞片形成小鳞茎的能力有很大的差异,其差异明显表现在接种后鳞片受腐烂的程度大小不同上。外层鳞片受腐烂最严重,达46.9%,平均芽每片萌芽数最低;中层鳞片腐烂率降低,为18.9%;内层鳞片腐烂率最低,为5.8%。鳞片的转绿率按高低排列为内层>中层>外层。因此,在百合鳞片繁殖时,为节省物力财力,宜采用中、内层的鳞片作为外植体。

表2 不同发育程度的鳞茎对鳞茎芽的影响

位置	接种数 个	腐烂数 个	未腐烂 个	腐烂率 %	转绿数 个	转绿率 %	总芽数 个	平均芽 数 个
外层	32	15	17	46.9	10	58.8	35	2.1
中层	53	10	43	18.9	38	88.4	125	2.9
内层	52	3	49	5.8	49	100.0	152	3.1

2.2.2 不同的部位对小鳞茎形成的影响。野百合也像其他品种的百合一样,鳞茎的不同部位诱导鳞茎芽的效果差异极大。从表3可知,鳞茎下部是形成鳞茎芽能力最强的部位,其鳞茎芽的萌发率可达77.5%,平均每一个鳞茎基部就形成3个鳞茎芽。整个鳞茎次之,其鳞茎芽的萌发率达74.0%,但平均鳞茎芽数比基部的稍微高。而鳞茎的中部和上部的鳞茎芽萌发率却比较低,平均芽数也少。上部的鳞茎芽萌发率仅有22.5%,平均鳞茎芽只有1个而已。越靠近鳞茎的基部表现出的器官生发能力越强,表明野百合鳞茎的诱导受极性的支配。因此,为了加强试验研究的科学性,减少试验材料的浪费,试验选择百合鳞茎的基部是最理想的。

表3 不同的部位对小鳞茎形成的影响

接种方式	接种数 个	萌芽的鳞片 数 个	萌芽率 %	总芽数 个	平均芽 数 个
整个鳞片	50	37	74.0	122	3.3
鳞片上部	40	9	22.5	9	1.0
鳞片中部	40	19	47.5	29	1.5
鳞片基部	40	31	77.5	93	3.0

2.3 不同激素对野百合鳞茎诱导的影响 接种时去掉鳞茎的中上部,统一留下鳞茎基部,接种后6 d,没有被污染的大部分开始转绿,10 d后全部转绿,部分鳞茎芽开始萌动,40 d大部分的鳞茎芽都已经有了1~2 cm。由表4可知,不同浓度的激素组合对野百合鳞茎芽诱导效果明显不同。NAA的浓度上升时,鳞茎芽的萌芽率增加,到0.5 ng/L时可达91.3%,此时的芽都比较壮;当浓度继续增加后,虽然鳞茎芽都比较壮,但萌芽率却有所降低。当NAA的浓度不变时,6-BA的浓度在1.5 ng/L时野百合的鳞茎芽萌发率达最大,平均芽数较多,芽也较壮。以此浓度为标准,再升高或降低6-BA的浓度,野百合的鳞茎芽萌发率都有所减低。浓度过低,鳞茎芽则比较弱小;浓度过高,则导致部分鳞茎芽产生变异,形成变态芽,都不利于增殖。不管是低浓度的激素组合,还是高浓度的激素组合,都不利于野百合鳞茎芽的产生。试验中最好的激素组合则是NAA 0.5 ng/L + 6-BA 1.5 ng/L,此时的鳞茎芽萌发率达91.3%,平均芽数最多,鳞茎芽也较壮,没有出现变态芽,所以此激素组合比较适合用于野百合鳞茎芽的诱导。

表4 不同激素对野百合鳞茎芽诱导的影响

编号	调节因子 ng/L		接种数 个	萌芽的 鳞茎数 个	萌芽率 %	总芽数 个	平均芽 数 个	芽的生长情况
	NAA	6-BA						
1	0.1	0.5	20	8	40.0	9	1.1	弱
2	0.1	1.0	20	10	50.0	10	1.0	纤细
3	0.1	1.5	21	14	66.7	23	1.6	壮
4	0.1	2.0	19	12	63.2	16	1.3	壮
5	0.3	0.5	20	12	60.0	12	1.0	弱
6	0.3	1.0	19	14	73.7	16	1.1	壮
7	0.3	1.5	19	15	78.9	35	2.3	壮
8	0.3	2.0	20	14	70.0	27	1.9	壮,有变态芽
9	0.5	0.5	20	13	65.0	16	1.2	纤细
10	0.5	1.0	20	18	90.0	50	2.8	粗壮
11	0.5	1.5	23	21	91.3	71	3.4	壮,芽基部膨大
12	0.5	2.0	20	17	85.0	37	2.2	壮,有变态芽
13	1	0.5	21	12	57.1	13	1.1	纤细
14	1	1.0	20	14	70.0	28	2.0	壮
15	1	1.5	20	15	75.0	44	2.9	壮,芽基部膨大
16	1	2.0	19	14	73.7	35	2.5	壮,芽基部膨大

2.4 不同激素组合对丛生芽增殖的影响 将鳞茎诱导出健壮的、无变异的鳞茎芽,分别接入不同浓度激素组合的MS培养基中,每个激素组合浓度接种10瓶,每瓶接种3~4个芽,15 d后芽的基部出现新生小芽,逐渐形成芽丛,有些芽基部逐渐膨大形成小盘茎,30 d后统计。从表3可知,2、5、9号培养基的平均每个芽的新增芽都达到3.2以上,其中9号培养基的平均每个芽的新增芽达4.9,此时,苗比较健壮、叶的颜色呈绿色,产生的不定根也较少。在2、5号培养基上,虽然平均每个芽的新增芽也较高,但新增的丛生芽都比较矮小,叶子的颜色也较差,而且产生的不定根也比较多。在6号培养基上统计时发现产生的不定根是最多的。在10、11号培养基上,不仅平均每个芽的新增芽也较少,苗矮小,还出现变异现象,产生畸形苗,这可能是由于激素的过高浓度导致的。

表5 不同激素组合对丛生芽增殖的影响

编号	调节因子 ng/L		平均新增 芽数 个	丛生芽长势	不定根发 达程度
	NAA	6-BA			
1		0.05	1.6	苗矮小、叶呈黄褐色	+
2		0.04	3.4	苗矮小、叶呈黄褐色	++++
3	0.1	0.05	2.1	苗矮小、叶呈淡绿色	++
4	0.1	0.30	3.2	苗纤弱、叶呈淡绿色	++
5	0.1	0.80	1.0	苗纤弱、叶呈绿色	+++
6	0.4	0.05	1.2	苗矮壮、叶呈淡绿色	+++++
7	0.4	0.30	1.8	苗矮壮、叶呈淡绿色	++
8	0.4	0.80	1.2	苗矮壮、叶呈绿色	++
9	0.8	0.05	4.9	苗健壮、叶呈绿色	+
10	0.8	0.30	1.7	苗纤弱、出现少许畸形苗	++
11	0.8	0.80	0.9	苗纤弱、出现较多畸形苗	++

注: + 多表示不定根相对发达。

3 讨论

(1) 百合试管内结鳞茎是百合种球工厂化生产的一个关键步骤,影响百合试管鳞茎形成和膨大的因素是多方面的,如外植体来源、激素种类及其质量浓度、蔗糖浓度、大量元素浓度、光照、温度等^[8-10]。试验仅对少量的因素进行研究,并不忽略其他因素的影响。野百合鳞茎培养中,不同层位鳞片的污染程度不同,外层鳞片污染严重,中层次之,内层较轻。赵晖等^[11]认为百合组织培养中出现的污染与外植体的种类、取材季节、部位、运输过程、预处理及消毒方法等密切相关,此外,由于鳞片长期在土壤中容易带菌(这种自

身所带的细菌所造成的污染,称为内生菌污染),造成表面消毒时间不易掌握所引起的。因此,对材料的选择也要仔细。为防止内生细菌的滋生,试验将外植体用洗衣粉清洗后,又放入500 ng/L的安素菌毒清试剂中消毒5 min。这种措施在一定程度上抑制了内生细菌的滋生,减少了后期污染。

(2) 试验发现野百合鳞茎接种方位对诱导培养有较大影响,诱导能力依次是:内层>中层>外层,外层鳞片积累营养多,但出苗时间迟缓,可能与其处于休眠状态有关^[12]。内层的诱导能力较强,主要是由于内层存在更多的分生组织。而杭玲等(2001)^[13]对在龙牙百合的组织培养的研究和王刚等(2002)^[14]对兰州百合鳞片的组织培养研究认为,鳞片诱导芽的能力从强到弱依次为外层、中层、内层,这刚好与野百合的相反,可能是由于品种差异导致的。在研究不同的部位对鳞茎芽形成的影响时发现,不同部位鳞茎芽的形成差异很大,其鳞茎芽的形成能力依次是:基部>中部>上部,这与Robb(1957)^[15]发现鹿子百合的鳞片基部最易结鳞茎、中部较难分化及结鳞茎而上部不能结鳞茎的结论类似。同一鳞片的不同部位增殖系数不同,带基部的鳞片增殖系数最高,这可能是由于鳞片的分生组织在基部,分裂的细胞经伸长,分化直至成熟,由基部向后推进,距离基部愈远愈成熟。此外,整片的鳞茎有完好的基部,其形成鳞茎芽的能力也较大,因此,在野百合的繁殖过程中,整片或切取鳞茎的基部效果都差不多,但选取基部浪费的材料较少。

(3) 试验结果表明,培养基的激素成分和配比也是影响野百合鳞茎芽形成的重要因素,野生百合在含有不同激素的培养基上形成不定芽的数量存在着差异。在MS添加6-BA 1.5 mg/L和NAA 0.5 mg/L组合的培养基上,其鳞茎的萌芽率最高,可以得到大量健壮的野生百合试管苗,是诱导野百合鳞茎芽较好的激素组合。在高浓度的激素组合中,发现诱导的鳞茎芽容易发生变异,产生变态苗,这可能与激素的生理特性有关。

(4) 鳞茎芽的继代增殖培养的激素组合中,6-BA 0.8 mg/L + NAA 0.05 mg/L比较好,虽然在单独使用NAA时,浓度在0.04 mg/L时繁殖系数也很高,但生长的苗比较矮小,

叶子的颜色呈黄褐色,同时也有大量的不定根产生。从苗的质量和增殖倍数两个方面考虑,以MS + BA 0.8 mg/L + NAA 0.05 mg/L作为继代培养基较好。在野百合的工厂化生产中,应适当控制激素的浓度,太高影响苗木质量,部分出现有轻微玻璃化现象和畸形苗;过低则影响繁殖系数。

参考文献

- [1] 王红霞. 通江百合的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2000(2): 132 - 137.
- [2] MARINANGELI P A, HERNANDEZ L F, PELLEGRIN C P, et al. Bulb differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum* [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2003, 128(3): 324 - 329.
- [3] HARUKI K, YAMADA K, HOSOKI T, et al. Effects of sugar and temperature on the growth of miniature bulbs of *Lilium japonicum* Thunb cultured on a rotary shaker [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1996, 65(2): 363 - 371.
- [4] 龙雅宜, 张金政, 张兰年, 等. 百合——球根花卉之王[M]. 北京: 金盾出版社, 1999.
- [5] 张延龙, 徐炎, 李峰, 等. 秦岭野百合鳞片植株再生体系的建立[J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1315 - 1318.
- [6] 龙雅宜. 观赏植物种质资源与品种改良. 中国花卉科技二十年[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [7] 余朝秀, 关文灵. 野百合组织培养的研究[J]. 西部林业科学, 2005, 34(2): 76 - 78.
- [8] HIRA S, SEONJ H, PAEK K Y, et al. Development of pilot scale process for mass production of *Lilium* bulblet in vitro [J]. *Acta Hort*, 1998, 461: 237 - 241.
- [9] 黄家福, 陈振光. 百合快速繁殖条件的优化[J]. 福建农业大学学报, 1999, 28(2): 152 - 156.
- [10] 阮少宁, 杨华, 梁一池, 等. 香水百合组织培养的试验研究[J]. 福建林学院学报, 2001, 21(2): 142 - 145.
- [11] 赵蓬晖, 张江涛, 马红卫. 植物组织培养中的几个常见问题与对策[J]. 河南林业科技, 2001(2): 27 - 28.
- [12] 盛玉萍, 周琼, 何龙飞, 等. 百合试管苗的移栽对比试验[J]. 广西农业生物科学, 1999, 18(3): 187 - 189.
- [13] 杭玲, 苏宾, 陈丽新, 等. 龙牙百合组培快繁技术研究[J]. 广西农业科学, 2001(4): 183 - 184.
- [14] 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.
- [15] ROBB S M. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* [J]. *Thun J Exp Bot*, 1957, 8: 348 - 352.