

蒋 瑶,陈文波,蒋炷宇. 亚洲百合不定芽的诱导及再生植株的建立[J]. 江苏农业科学,2017,45(12):35-38.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.12.008

亚洲百合不定芽的诱导及再生植株的建立

蒋 瑶,陈文波,蒋炷宇

(凯里学院环境与生命科学学院,贵州凯里 556011)

摘要:以亚洲百合鳞茎为外植体,采用不同浓度激素组合对其进行不定芽的诱导、增殖以及生根进行研究,以期建立该种亚洲百合组织培养快速繁殖体系。试验结果表明:诱导亚洲百合不定芽的最佳培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L,其出芽率为 83.33%,最适宜诱导不定芽增殖培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L,其增殖率为 92.75%,诱导生根的最佳培养基为 1/2MS + NAA 0.2 mg/L,其生根率为 92.86%。试验结果可为亚洲百合生产扩繁、脱毒复壮、基因转化等工作提供参考。

关键词:亚洲百合;不定芽诱导;增殖;鳞片;培养基

中图分类号:S682.2⁺65.04 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)12-0035-04

百合是百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)多年生草本植物,大多数品种性喜凉爽、湿润的半阴环境,较耐寒冷,具有重要的经济价值和应用价值。据调查,百合有 47 种 18 个变种,中国特有种为 36 种 15 个变种,分布遍及全国各地^[1],百合又是切花系列中主流产品,其切花主要包括 3 类:亚洲百合系列、东方百合系列、康香百合系列^[2]。亚洲百合(*Lilium asiatic* Hybrids)属百合科百合属植物,其栽培品种由卷丹、垂花、朝鲜百合等多个亚洲原种的杂交或实生选种选育而来,不耐高温,性喜凉爽湿润气候、半阴环境,具有食用、药用、提取香料等多种用途^[2]。百合以扦插、分株和分球等无性繁殖方式为主^[3],繁殖系数低,容易感染病毒,导致品种退化;目前百合鳞茎^[4-6]、叶片^[7]、茎尖^[8]、花器官^[8-9]、胚^[10]等不同组织或器官的组织培养已获得成功,建立了部分基本的组培快繁技术体系^[11-13]可在短时间内获得大量的无病毒、优质种苗^[14-16]。

近年来,国内外开展亚洲百合的研究主要集中在细胞生物学、引种栽培、组织培养、遗传育种等方面,从 2001 年开始选用亚洲百合为母本,采用 4 种授粉方法解决百合自交不亲和性和种间不亲和性^[17],亚洲百合顶级×金色号角杂交后通过胚培养技术分离发育不良的胚^[18],亚洲百合和铁炮百合采用切割花柱授粉和子房授粉结合胚培养进行正反杂交,可克服杂交障碍,从而提高获得杂种胚的概率^[19],亚洲百合种间或种内也是通过类似的方法进行杂交,提高坐果率,从而使杂交组合亲和性也提高^[20-21]。对国外各引进 11 个不同的亚洲百合品种进行相关农艺性状调查,并采用层次分析法进行评价,结果刁义维等发现 Black Out、Cheops、Navona、Mount Duckling 等 4 个新品种适宜北方地区栽种^[22],而董航等认为 Strawberry and cream、Tiger player 和 Dot. com 等 3 个新品种适宜北方地区栽种^[23],由此说明,通过引进和筛选不同亚洲百

合能够丰富其品种多样性。利用农杆菌介导法,*GsZFP1* 基因在亚洲百合耀眼小鳞片中能够表达,提高其抗寒、抗旱性^[24]。赵庆芳等^[25]采用不同种类和浓度的保鲜溶液对东方百合和亚洲百合切花后进行保鲜研究,认为蔗糖 30 mg/L + 8-HQS 200 mg/L 为最佳保鲜剂。

目前亚洲百合组织培养相关报道并不多见,其组培主要以鳞片^[26-27]为主,以及花器官的不同部位^[28-30]、叶片^[31]等为外植体进行器官发生途径进行探讨,以及后期试管苗生根移栽^[32-33]等方面的研究。由于亚洲百合优质种球大多数依靠进口,其鳞茎繁殖多代后易感病,从而引起该品种退化或种间杂交不亲和和性等问题,严重制约其市场需求,故本研究以亚洲百合(Brunello)鳞茎(从沭阳县引种种于凯里学院环境科学与生命科学学院实验地)为试验材料,采用不同浓度激素配比对其进行初代培养、继代培养、生根培养等研究,以期建立亚洲百合组织培养再生体系,进一步为亚洲百合生产扩繁、脱毒复壮、基因转化等工作奠定基础,旨在为种苗繁育及产业发展提供理论依据,以期培育更多新品种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用亚洲百合(Brunello)为试验材料,从沭阳县将亚洲百合引种于凯里学院环境科学与生命科学学院实验地,进行相关的日常管理(整地、种植、浇水、除草),选用亚洲百合健壮、无病虫害鳞茎为试验材料(图 1)。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 从实验地采集亚洲百合鳞茎(去除最外 1 层),清除表层泥土,剥开后采用自来水冲洗 2 h,选用中外层进行接种。外植体先用 70% 乙醇处理 30 s,无菌水冲洗 3 次,再用 0.1% HgCl₂ 处理 10 min,无菌水冲洗 5 次,滤纸吸干备用。

1.2.2 不定芽的诱导 不定芽诱导以 MS 为基本培养基,添加不同浓度激素配比的 6-BA 和 NAA,随机组合为 9 个处理(表 1),每个处理接种 30 个外植体,每个处理重复 3 次。随机选择鳞片下中部位并切成约 0.5 cm×0.5 cm 大小方块(形

收稿日期:2015-12-30

基金项目:贵州省自然科学基金(编号:黔科合 J 字[2014]2153 号);

凯里学院博士专项基金(编号:BS201332)。

通信作者:蒋 瑶(1982—),女,四川德阳人,博士,副教授,主要从事植物生物技术研究。E-mail:jiangyao0221@163.com。



图1 亚洲百合鳞茎鳞片

表 1 不同激素对亚洲百合形成不定芽的影响

处理号	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	污染率 (%)	出芽率 (%)
1	1.0	0.3	16.67±0.36	44.00±0.19
2	1.0	0.5	20.00±0.42	83.33±0.38
3	1.0	1.0	23.33±0.42	43.48±0.27
4	1.5	0.3	16.67±0.36	56.00±0.28
5	1.5	0.5	16.67±0.28	64.00±0.42
6	1.5	1.0	20.00±0.36	70.83±0.42
7	3.0	0.3	23.33±0.44	39.13±0.19
8	3.0	0.5	26.67±0.38	45.45±0.27
9	3.0	1.0	23.33±0.35	47.83±0.29

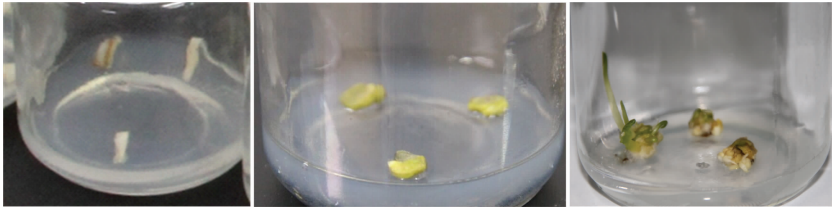
态学的上下端)接种于培养基中。

1.2.3 不定芽的增殖 剥离初代健壮培养芽接种于增殖培养基中。以 MS 为基本培养基,添加不同浓度激素配比的 6-BA 和 NAA,随机组合为 9 个处理(表 2),每个处理接种 75 个外植体,每个处理重复 3 次。

表 2 不同激素对亚洲百合不定芽增殖的影响

处理号	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	污染率 (%)	增殖率 (%)
1	0.8	0.1	4.00±0.15	73.61±0.26
2	0.8	0.2	5.33±0.16	56.34±0.32
3	0.8	0.3	4.00±0.15	52.78±0.27
4	1.0	0.1	8.00±0.20	92.75±0.35
5	1.0	0.2	2.67±0.09	65.75±0.25
6	1.0	0.3	5.33±0.21	57.75±0.25
7	1.2	0.1	6.67±0.22	55.71±0.24
8	1.2	0.2	4.00±0.15	55.56±0.24
9	1.2	0.3	5.33±0.16	54.93±0.24

1.2.4 生根培养 选用继代健壮组培苗接种于生根培养基。



A. 鳞茎刚接入培养基时

B. 接入初期鳞茎由黄转绿

C. 形成不定芽

图2 不定芽的诱导

由表 1 可知,采用不同激素浓度配比均能从鳞片诱导出不定芽,且污染率均低于 27.00%,表明不同处理间存在差异,其中 2、5、6 号 3 个处理的诱导率均高于 60.00%,而 2 号处理的诱导率最高,为 83.33%,其鳞片均有转绿,大多数均长出 不定芽且生长状况优良,5 号和 6 号处理诱导率分别为 64.00% 和 70.83%,其鳞片大多数返绿,不定芽长势较好;4

选用 1/2MS、3/4MS、MS 为基本培养基,添加 0.2 mg/L 的 IBA 和 NAA,随机组合为 9 个处理(表 3),每个处理接种 30 个外植体,每个处理重复 3 次。不定期进行观察、拍照,同时记录试验结果,并对数据进行分析,计算出芽率、增殖率、生根率以及污染率等。

出芽率 = $\frac{\text{产芽外植体数}}{\text{接种数} - \text{污染数}} \times 100\%$;

增殖率 = $\frac{\text{增殖的外植体数}}{\text{接种数} - \text{污染数}} \times 100\%$;

生根率 = $\frac{\text{生根苗数}}{\text{接种数} - \text{污染数}} \times 100\%$;

污染率 = $\frac{\text{污染数}}{\text{接种数}} \times 100\%$ 。

表 3 不同激素对亚洲百合生根的影响

处理号	MS	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	污染率 (%)	生根率 (%)
1	1/2	0.2	0	3.33±0.11	68.97±0.31
2	1/2	0	0.2	6.67±0.21	92.86±0.32
3	1/2	0.2	0.2	6.67±0.14	67.86±0.37
4	3/4	0.2	0	3.33±0.11	65.52±0.33
5	3/4	0	0.2	3.33±0.11	75.86±0.31
6	3/4	0.2	0.2	3.33±0.11	62.07±0.31
7	1	0.2	0	10.00±0.22	66.67±0.38
8	1	0	0.2	6.67±0.21	67.86±0.29
9	1	0.2	0.2	3.33±0.11	58.62±0.32

1.3 培养条件

培养温度为 25 ℃,培养时间为光照时间 16 h/d,暗培养时间 8 h/d,且光照度为 2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 不同激素对亚洲百合形成不定芽的影响

取亚洲百合鳞茎的中下部位接种于诱导不定芽的不同培养基中,其形态初始为乳白色(图 2-A),逐渐变浅黄,6~9 d 再由浅黄转绿(图 2-B),15 d 左右在绿色的鳞片块上开始出现浅绿色球状突起,呈小球状,之后继续增大,这些突起继续生长 7 d 左右突起逐渐分化成绿色小芽,部分还有不定根伸出(图 2-C)。

1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 适合该种亚洲百合不定芽的诱导,符合分裂素/生长素浓度比值高,利于诱导不定芽的规律。

2.2 不同激素对亚洲百合不定芽增殖的影响

将初代培养得到的健壮不定芽转接到不同增殖培养基中,不定芽初始相对较小,颜色较浅(图 3-A),5 d 后开始慢慢变大且颜色变绿(图 3-B),经 15 d 后,发现不同处理不定芽四周均有浅绿色的突起产生,继续生长 10 d 左右逐渐分化成绿色小芽,而后继续生长变大,同时也有部分有不定根生长(图 3-C)。结果表明,不同激素配比处理后增殖的不定芽(个数)均有所增加,且生长相对茁壮,其增殖率均高于 50%,污染率低于 8%,且不同处理间存在差异。由表 2 可知,不同处理不定芽增殖有所差异,其中 1、4、5 号等 3 个处理

的增殖率均高于 60%,且 4 号处理的增殖率最高,为 92.75%,其不定芽的长势良好;其余处理的增殖率均低于 60%,且其不定芽相对较为弱小。由此表明,1、4、5 号处理的 6-BA 浓度范围为 0.8~1.0 mg/L 时,随着 6-BA 浓度的增加,分化芽的数量依次增加,出芽数也增多,之后浓度升高后,出芽增殖数相对减少;NAA 浓度范围为 0.1~0.2 mg/L 时,随着 NAA 浓度升高,不定芽增殖数量逐渐减少,高浓度 NAA 对不定芽增殖有抑制作用。根据不同处理不定芽增殖出芽的速度以及不定芽的长势和数量,可以确定处理 4 即 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 配方的增殖率最高,达到 92.75%,其不定芽生长健壮且颜色葱绿,分裂素/生长素比例相对较高,有利于不定芽的增殖。

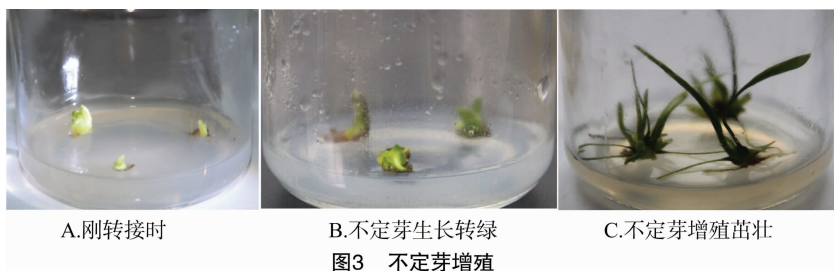


图3 不定芽增殖

2.3 不同激素对亚洲百合生根的影响

将增殖培养得到的健壮无根组培苗转入 9 种不同处理生根培养基中,5~7 d 后可见小鳞茎的基部能够长出毛状的白根,21 d 后长出的根系发达且粗壮,在不定根的四周能观察到有细小的白毛生长,约 30 d 后几乎所有的组培苗都会长出不定根(图 4)。

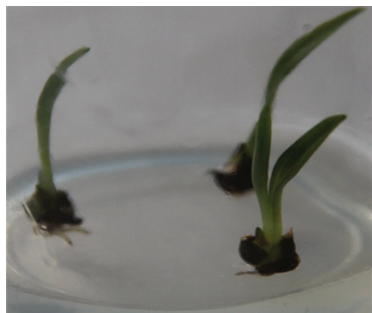


图4 生根培养

不同激素浓度对比对亚洲百合鳞茎均都能诱导不定芽生根,由表 3 可知,1~9 号处理生根率都高于 58%,且污染率相对较低,低于 11.00%,其中 2 号处理生根率最高,达 92.86%,其余处理的生根率均在 58%~76%之间,培养期间生根较慢,不定根细小且数目较少,生长一般,由此表明,随着 MS 中大量元素的升高,生根效果较差,仅有 1/2MS 为最佳培养基,添加一定的低浓度 NAA 促进生根,2 号处理即 1/2MS + NAA 0.2 mg/L 生根率最高,其不定根粗壮,根系发达,生长较快,数目较多且长势良好。由此表明,1/2MS 为生根最适培养基,而生长素 NAA 较低的浓度有利于生根培养。

3 结论与讨论

通过本次试验研究可知,亚洲百合(Brunello)诱导分化不定芽的最佳培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA

0.5 mg/L,最适宜诱导不定芽增殖的培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L,诱导不定芽生根以 1/2MS + NAA 0.2 mg/L 为最佳培养基,其诱导率、增殖率和生根率分别为 83.33%、92.75% 和 92.86%。

3.1 激素浓度对不定芽诱导的影响

选用鳞片为外植体的不同研究表明,不同亚洲百合品种诱导不定芽存在一定的差异,通过对黄百合^[34]、金百合^[34]、普瑞头^[35-36]、布耐罗^[35]、红色警报^[36]、精粹^[37]等多种亚洲百合鳞片为外植体诱导不定芽的试验比较发现,不同亚洲百合品种因材料和生长周期不同,从而导致诱导分化所需用激素浓度存在差异,6-BA 浓度在 0.5~2.0 mg/L 范围内,有利于不定芽分化和生长,超过一定范围后,会抑制不定芽的生长,NAA 在 0.1~0.5 mg/L 浓度范围内,促进不定芽生长。

本试验结果表明,该种亚洲百合选用鳞片为外植体进行不定芽诱导的最佳培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L,其诱导不定芽的出芽率为 83.33%,与周蕴薇的研究结果^[22]基本一致。

3.2 激素浓度对不定芽增殖的影响

亚洲百合增殖大多选用 MS 为基础培养基,选用 6-BA 和 NAA 不同激素浓度配比进行研究,本试验研究结果表明,最适宜诱导不定芽增殖培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L,其诱导不定芽的增殖率为 92.75%,这与孙红梅等^[30]和王晶^[7]的研究结果一致。

其他研究中以多安娜(♀)和普瑞头(♂)的杂交后代无菌苗进行不定芽诱导增殖的最适激素配比 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L^[2]。大多数亚洲百合在选用鳞片进行不定芽增殖过程中,不同品种间存在差异,黄百合和金百合^[34]、布耐罗^[35]、红色警报^[36]以及金色号角^[38]最适不定芽增殖 6-BA 浓度范围为 0.5~3.0 mg/L, NAA 浓度 0.1~1.0 mg/L,同一普瑞头^[39-40]品种诱导不定芽增殖也有所不

同,由此表明,亚洲百合增殖过程中通过 6-BA 和 NAA 不同激素浓度配比,尤其是较高浓度的 6-BA 促进不定芽增殖,较低 NAA 浓度有利于不定芽的生长和膨大。

3.3 激素浓度对生根的影响

前人研究不同亚洲百合品种生根培养过程中发现,金色号角^[38]无需添加生长素浓度则生根效果最佳,其他品种^[18,34,37]则需加入 NAA 不同浓度,其范围为 0.05 ~ 0.5 mg/L;同一品种普瑞头^[39-40]诱导生根培养的基础培养基存在差异,选用 IBA 和 NAA 等 2 种不同生长激素,但其浓度均为 0.5 mg/L,由此说明,一定浓度的生长素有利于不定芽的生根,但红色警报最佳生根培养基为 1/2MS + NAA 0.3 mg/L^[37]。

本试验主要选择 3 种不同的基础培养基,同时选用 IBA 和 NAA 等 2 种不同生长素进行试验,研究结果表明,低浓度生长素生根效果良好,其中 IBA 能够促进生根,但生根效果不如 NAA 明显,诱导生根最适基础培养基为 1/2MS,最佳激素 NAA 浓度为 0.2 mg/L,其诱导生根率为 92.86%。

参考文献:

- [1] 周欢,谢磊,郭和蓉,等. 百合科植物组织培养的研究进展[J]. 湖北农业科学,2010,49(5):1232-1237.
- [2] 张彦妮,边红琳. 6-BA 和 NAA 对亚洲百合杂种系后代组培苗鳞片不定芽诱导的影响[J]. 江苏农业科学,2012,40(7):52-54.
- [3] 杨志娟,赵光英,陈冠铭,等. 热带地区观赏百合栽培技术规程[J]. 林业科学,2015(4):156-179.
- [4] 周威. 百合的组织培养[J]. 农林科技,2011(9):248-249.
- [5] 崔祺,贾桂霞. 3 种百合组培快繁体系的优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2014,40(6):621-626.
- [6] 黄敏,梁春辉,岳海林,等. 东方百合 Sorbonne 鳞片离体培养研究[J]. 现代农业科技,2014(22):136-139.
- [7] 周春华,尤超,陈凝华. 百合组织培养研究进展[J]. 北方园艺,2013(14):193-195.
- [8] 廖晴,周斌,玛尔哈巴,等. 东方百合 OT 系列试管鳞茎的诱导与植株再生体系的建立[J]. 新疆农业科学,2012,49(5):862-867.
- [9] 徐茜,余鸿燕,徐燕,等. 重庆野生百合花蕾诱导再生植株技术研究[J]. 中国农学通报,2014,30(7):121-125.
- [10] 雷家军,阮冰洁. 大花卷丹与亚洲百合,东方百合种间杂交及胚培养研究[J]. 东北农业大学学报,2011,42(4):66-71.
- [11] 金亚征,俞凤芳,车瑞香. 药用百合组织培养快繁技术研究[J]. 经济林研究,2013,31(1):124-128.
- [12] 杨懋勋,单振菊,陈志云,等. 4 种观赏百合的组培快繁技术研究[J]. 广东农业科学,2012(2):37-39.
- [13] 吴永辉,丰锋. 百合鳞茎不定芽诱导与增殖配方优化[J]. 东南园艺,2014(1):9-12.
- [14] 阮瑶瑶,丁健,杨懋勋. 药用、食用、观赏用百合组培快繁研究进展[J]. 深圳职业技术学院学报,2011,10(1):71-75.
- [15] Pan Y Z,Zhao Y Y,Liu X L,et al. Different explants of *Lilium lancifolium* have different potential to differentiate and regenerate in tissue culture[J]. Agricultural Science and Technology,2011,12(10):1437-1440.

- [16] 杨浩,许晶晶,柳迎辉. 六盘山区百合种球大田繁育技术[J]. 宁夏农林科技,2012,53(5):41-44.
- [17] 孙晓梅,崔文山,毛洪玉,等. 不同授粉方法对两种亚洲百合杂交结实影响的研究[J]. 辽宁农业科学,2001(6):9-13.
- [18] 王晶,孙晓梅,杨宏光. 亚洲百合杂交种组培快繁的研究[J]. 辽宁农业科学,2006(1):47-48.
- [19] 杜文文,王祥宁,吴丽芳,等. 亚洲百合和铁炮百合正反杂交亲和程度的差异性分析[J]. 中国农业科学,2012,45(23):4854-4861.
- [20] 陈轶. 亚洲百合种内杂交亲和性研究[J]. 中国农学通报,2014,30(13):173-177.
- [21] 李婕,高亦珂,张启翔. 有斑百合和亚洲百合杂交亲和性的研究[J]. 中国农业大学学报,2013(2):71-78.
- [22] 刁义维,焦雪辉,吴锦娣,等. 引进亚洲百合新品种的筛选[J]. 分子植物育种,2010,8(4):758-763.
- [23] 董航,张杰,孙红梅. 亚洲百合新品种引进与筛选[J]. 沈阳农业大学学报,2013,44(6):816-819.
- [24] 张焕,郑佳,阚丹丹,等. 农杆菌介导亚洲百合转化体系的建立及转 *GsZFP1* 基因研究[J]. 生物技术通报,2014(2):91-96.
- [25] 赵庆芳,李巧峡,胡春香,等. 东方百合和亚洲百合切花后的保鲜技术研究[J]. 甘肃科学学报,2003,15(3):54-57.
- [26] 孙文艺. 亚洲百合普利安娜 ACO 基因 RNAi 载体的遗传转化和生根移栽的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2009:29.
- [27] 殷振芳. 百合(*Lilium*)离体植株再生及超低温保存研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014:28.
- [28] 杨薇红,张延龙,童斌,等. 亚洲百合花器官的组培快繁技术研究[J]. 中国农学通报,2004,20(5):193-195.
- [29] 姚绍娣,杨美纯,凌征柱. 亚洲百合花器官组织培养再生植株研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(7):3459-3460.
- [30] 孙红梅,宋胜利,申屠玥,等. 亚洲百合 Strawberry and Cream 花器官组培快繁技术研究[J]. 沈阳农业大学学报,2015,46(1):7-12.
- [31] 宋丽莉,司亮,于典司,等. 亚洲百合普瑞头叶片组织培养技术研究[J]. 北方园艺,2012(6):122-124.
- [32] 郭美,刘雅莉,王跃进,等. 亚洲百合试管苗生根移栽的研究[J]. 西北林学院学报,2010,25(2):76-79.
- [33] 刘婕,刘雅莉,贾敏,等. 亚洲百合试管苗生根的研究[J]. 中国农学通报,2011,27(28):163-166.
- [34] 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.
- [35] 周艳萍,郑红娟,贾桂霞. 两个亚洲百合品种离体再生体系的建立[J]. 北京林业大学学报,2007,29(1):123-127.
- [36] 路森. 亚洲百合红色警报组培快繁研究[J]. 现代农村科技,2013(6):53-54.
- [37] 李小玲,刘雅莉,王跃进,等. 亚洲百合遗传转化受体系统的建立[J]. 干旱地区农业研究,2007,25(1):219-224.
- [38] 林琼瑶,俞俐如,潘咪咪,等. 亚洲百合金色号角组培快繁技术研究[J]. 园艺与种苗,2013(2):15-17.
- [39] 张彦妮,李文英. 百合属普瑞头的组织培养和快速繁殖[J]. 草业科学,2012,29(7):1077-1083.
- [40] 周蕴薇,刘艳萍,岳莉然,等. 亚洲百合普瑞头的组织培养及休眠小鳞茎获得的研究[J]. 北方园艺,2011(4):146-148.