

巨球百合无菌播种影响因素的研究

马怡迪, 李岳, 李丹青, 任梓铭, 夏宜平*

(浙江大学农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 以剥皮、不剥皮野生巨球百合种子为材料, 采用不同激素配比的 10 种培养基进行无菌播种, 研究不同培养基处理之间的种子萌发率、诱导率、诱导芽数及形成小鳞茎数等的差异。结果表明: 巨球百合种子具有较强的生活力, 不剥皮处理的种子亦具备较高的萌发率, 剥皮处理对提高种子的萌发速度和萌发率有一定的效果; 剥皮巨球百合种子萌发的最适培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA, 萌发率为 100.0%, 诱导率为 65.0%, 平均诱导不定芽 1.28 个, 转入 MS 培养基生长 45 d 后, 平均形成小鳞茎 2.35 个, 平均生成 3.6 片叶, 平均生根达 6.7 条, 且植株生长健壮。

关键词: 巨球百合; 剥皮处理; 激素处理; 种子萌发

中图分类号: S682.2⁺9

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)03-0271-05

Study on the factors influencing sterile sowing of *Lilium brownii* F. E. Brown ex Mieliez var. *giganteum*

Ma Yidi, Li Yue, Li Danqing, Ren Ziming, Xia Yiping*

(College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Taking the MS basal medium without any hormones addition as control, the germination rate, shoot induction rate, number of inducted shoots and bulblets were measured by using the seeds of *Lilium brownii* F. E. Brown ex Mieliez var. *giganteum* as sterile sowing materials, which were sowed in different concentration of hormones mediums and treated with peeling. The results showed that seeds adopted here had higher viability, as well as those without peeling. Treatment with peeling could speed up seed germination and germination rate. The optimum culture medium for seed germination was MS medium supplemented with 1.0 mg/L 6-BA and 1.0 mg/L NAA. The germination rate, induction rate and the number of average indefinite buds were 100.0%, 65.0% and 1.28, respectively. Besides, the number of average indefinite bulblets, leaves and roots after 45 days of transferred them to MS basal medium were 2.35, 3.6 and 6.7, respectively.

Keywords: *Lilium brownii* F. E. Brown ex Mieliez var. *giganteum*; peeling treatment; hormone treatment; seeds germination

巨球百合(*Lilium brownii* F. E. Brown ex Mieliez var. *giganteum*) 是野百合(*L. brownii*)的变种。野百合鳞茎直径 2~4.5 cm, 而巨球百合在野生状态下鳞茎直径可达 10~12 cm, 鳞片 100 余枚, 花冠淡黄色, 通常有 5~8 朵花, 因其鳞茎特大, 富含矿质元素硒,

花多而美丽, 可供药用、食用及观赏, 是百合育种的优良基因材料, 具有较高的开发利用价值^[1-2]。

无菌播种获得组培苗是一种有效的保存珍稀植物的方法, 成功的离体组织培养能够在短时间内获得大批量的植物材料^[3]。有关光照、温度等因子

对百合属种子萌发的影响已有较多报道^[4-11], 而有关种子无菌播种的研究主要集中在兰科植物^[12-18], 百合属植物此方面的研究报道较少。吴昀等^[19]、崔祺等^[20]和向地英等^[21]经研究得出了药百合(*L. speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker)、淡黄花百合(*L. sulphureum* Baker)和百合杂交种子无菌播种的最适培养基配方。杜方等^[22]认为巨球百合与野百合的聚类很近。百合属植物种子无菌播种已有报道, 说明其种子无菌播种可行性强。巨球百合鳞茎资源珍稀, 不易获得种球, 属需保护的稀有野生种质资源, 因此, 其种子无菌播种的研究具有理论和实践意义。

本试验以巨球百合种子为材料, 比较不同激素配比的培养基对种子萌发的影响, 旨在找出巨球百合种子萌发的最适激素配比, 为保护巨球百合野生种质资源, 加快无性繁殖提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为 2014 年 8 月下旬于浙江省温州市海岛采集的已成熟野生巨球百合蒴果。选择饱满、胚清晰(胚长 1/2 种长)的种子为试验材料(图 1)。种子千粒重为 4.689 g。



图 1 巨球百合种子

Fig. 1 Seeds of *L. brownie* F. E. Brown ex Mieliez var. *giganteum*

试验所用基本培养基均为 MS 培养基, 并添加 9 种不同配比的 6-BA 及 NAA, 以不添加任何激素的 MS 培养基(空白培养基)为对照, 培养基的 pH 值为 5.9。培养基在 121 °C 灭菌 20 min。具体配方见表 1。

表 1 培养基配方

培养基编号	MS/(g·L ⁻¹)	蔗糖/(g·L ⁻¹)	琼脂/(g·L ⁻¹)	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)
1	4.43	30	8	0.5	0.1
2	4.43	30	8	0.5	0.5
3	4.43	30	8	0.5	1.0
4	4.43	30	8	1.0	0.1
5	4.43	30	8	1.0	0.5
6	4.43	30	8	1.0	1.0
7	4.43	30	8	2.0	0.1
8	4.43	30	8	2.0	0.5
9	4.43	30	8	2.0	1.0
10(CK)	4.43	30	8	0.0	0.0

1.2 方 法

试验于 2014 年 9 月至 2015 年 2 月在浙江大学观赏植物生长发育与分子生物学实验室进行。无菌培养室光照度约 2 000 lx, 每天光照 14 h, 温度(25±2) °C。试验参考吴昀等^[19]的药百合种子无菌播种的方法进行。将种子置于添加吐温-20 及洗洁精各 1~2 滴的水溶液中浸泡 30 min, 去除浮起的干瘪种子, 流水下冲洗 2 h, 75%乙醇消毒 30 s, 2% NaClO 振荡处理 6 min, 无菌重蒸水冲洗 5~6 次, 放滤纸上吸干水分。将经过处理的种子平均分成 2 份: 1 份作剥皮处理; 另一份种子不剥皮。之后, 分别接种于 10 个培养基(表 1)上, 每个处理接种 10 粒种子, 重复 4 次。

1.3 观察与统计方法

种子接种试验开始后每天观察 1 次, 记录种子开始萌发时间, 之后每隔 3 d 观察和统计 1 次。接种至第 45 天时统计萌发率、诱导率及诱导芽数等, 并于第 45 天时将萌发种子转入含空白培养基的柱形瓶中, 每瓶转接 5 粒, 在柱形瓶中生长 45 d 后统计小鳞茎数, 测量小鳞茎宽度及小鳞茎高度等指标, 其中, 种子萌发以胚根和幼芽突破种皮为准^[23]。

萌发率=(发芽种子数/总接种种子数)×100% ;

诱导率=(诱导出芽的种子数/总接种种子数)×100% ;

诱导芽数=诱导芽总数/分化芽的种子数。

1.4 数 据 处 理

采用 Microsoft Excel 2007 和 IBM SPSS 20 对数据进行方差分析和因素内多重比较。

2 结果与分析

2.1 剥皮处理对巨球百合种子萌发的影响

无菌播种 45 d 时统计的萌发率(表 2)表明, 10

个不同培养基处理中有 8 个剥皮处理种子的开始萌发时间早于不剥皮处理；8 个剥皮处理种子高峰期延续时间均短于不剥皮处理种子；9 个不剥皮处理种子的萌发率在 70.0% 以上，不同编号培养基之间

差异不显著，而 10 个剥皮处理种子的萌发率均在 77% 以上，且大部分剥皮处理种子的萌发率略高于不剥皮处理。综合来看，剥皮处理较不剥皮处理更有利于巨球百合种子的萌发。

表 2 不同培养基与种子剥皮与否对种子萌发的影响

Table 2 Effects of different culture mediums and peeling treatments on seed germination

培养基编号	开始萌发时间/d		萌发高峰时间/d		萌发率/%	
	不剥皮处理	剥皮处理	不剥皮处理	剥皮处理	不剥皮处理	剥皮处理
1	9	6	9~30	9~18	(88.9±4.6)cd	(100.0±0.0)e
2	9	3	9~21	3~21	(94.4±3.2)d	(97.5±2.5)de
3	9	3	9~21	6~24	(83.3±7.2)bcd	(77.5±6.3)a
4	6	6	9~33	9~21	(70.0±5.6)b	(95.0±2.9)cde
5	9	3	9~39	6~30	(80.6±5.3)bcd	(80.0±4.1)ab
6	6	3	6~21	9~21	(73.9±5.1)bc	(100.0±0.0)e
7	6	3	27~45	9~24	(47.2±1.6)a	(92.5±4.8)bcde
8	9	6	9~39	9~24	(83.3±3.2)bcd	(87.5±4.8)abcde
9	9	6	9~39	6~24	(88.9±0.0)cd	(82.5±6.3)abc
10(CK)	3	3	9~39	3~21	(83.3±7.2)bcd	(85.0±5.0)abcd

同列不同字母表示 2 组处理之间差异显著(P<0.05)。

2.2 不同激素对比对剥皮种子萌发的影响

剥皮处理种子生长 45 d 时，1 号和 6 号培养基上的种子的萌发率均达到 100%(表 3)，显著高于 3、

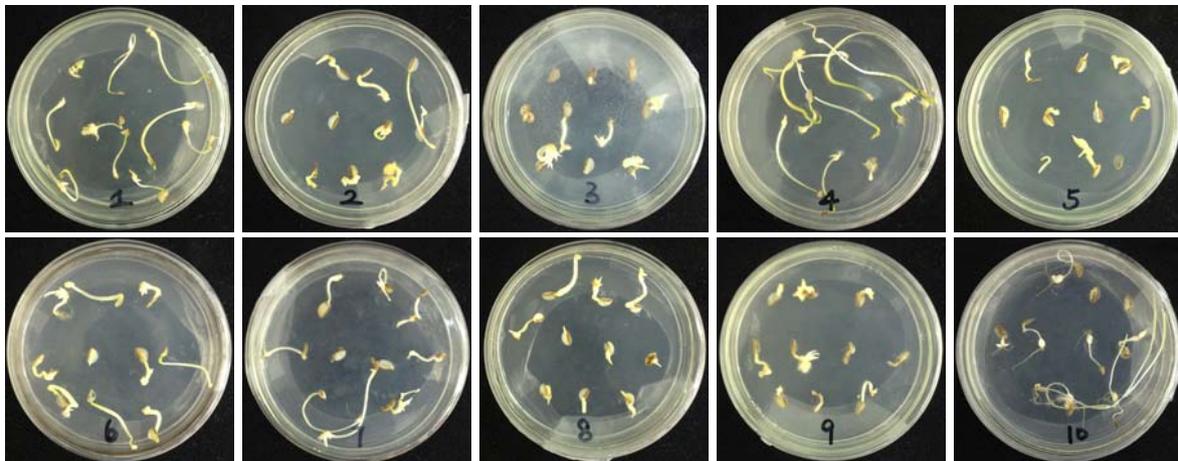
5、9、10 号培养基处理；1 号培养基上的种子诱导率达 90.0%，显著高于 2、3、5、6、7、8、9 号培养基处理，且其茎和根也较长，生长势良好(图 2)；

表 3 不同培养基对剥皮种子萌发的影响

Table 3 Effects of different culture mediums on the germination of seeds with peeling treatment

培养基编号	萌发率/%	诱导率/%	诱导芽数/个	茎长/cm	根长/cm
1	(100.0±0.0)e	(90.0±4.1)f	1.10±0.04	(1.78±0.76)bc	(1.43±0.64)b
2	(97.5±2.5)de	(47.5±11.8)bcd	1.05±0.05	(0.70±0.22)a	(0.19±0.11)a
3	(77.5±6.3)a	(32.5±7.5)ab	1.33±0.12	(0.51±0.07)a	(0.08±0.03)a
4	(95.0±2.9)cde	(67.5±10.3)def	1.08±0.08	(2.35±0.55)c	(0.18±0.05)a
5	(80.0±4.1)ab	(12.5±2.5)a	1.00±0.00	(0.71±0.08)a	(0.05±0.02)a
6	(100.0±0.0)e	(65.0±2.9)de	1.28±0.10	(1.75±0.18)bc	(0.22±0.09)a
7	(92.5±4.8)bcde	(60.0±4.1)cde	1.18±0.09	(1.21±0.21)ab	(0.11±0.02)a
8	(87.5±4.8)abcde	(35.0±8.7)ab	1.25±0.25	(0.73±0.05)a	(0.11±0.02)a
9	(82.5±6.3)abc	(37.5±12.5)bc	1.15±0.12	(0.58±0.04)a	(0.02±0.01)a
10(CK)	(85.0±5.0)abcd	(75.0±6.5)ef	1.20±0.08	(0.85±0.10)ab	(1.03±0.08)b

同列不同字母表示 2 组处理间差异显著(P<0.05)。



1~10 为培养基编号。

图 2 不同培养基上生长 45 d 的巨球百合种子(剥皮处理)

Fig.2 Seeds(with peeling treatment)after 45 days' growth on different culture mediums

对诱导芽数而言,不同编号培养基之间并无显著差异。综合分析,1号培养基激素配比更有利于巨球百合种子的萌发。

2.3 萌发种子转入 MS 培养基后生长 45 d 的情况

从表 4 和图 3 可知,不同编号培养基上的萌发种子转入 MS 培养基生长 45 d 后,在小鳞茎数、

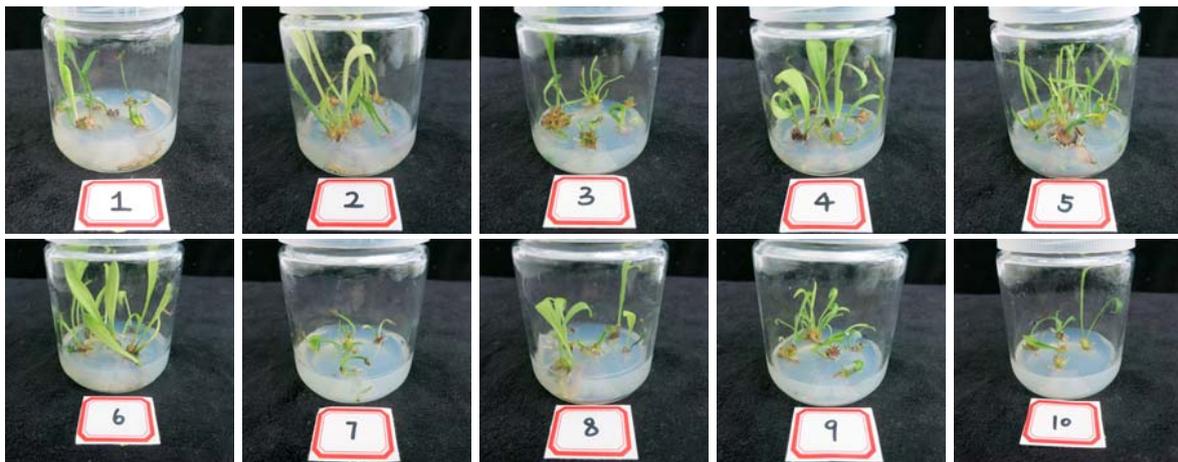
小鳞茎高度、小鳞茎宽度、叶片数以及生根数等指标上表现出了差异,其中 3 号培养基上的小鳞茎个数较多(图 4),平均达 3.57 个,显著高于其他处理,2、6 和 8 号培养基上的小鳞茎个数亦较多,显著高于对照。

表 4 萌发种子转接后生长 45 d 的各项生长指标

Table 4 The growth of germination seeds after transferred to MS basal medium for 45 days

编号	小鳞茎数/个	小鳞茎高度/cm	小鳞茎宽度/cm	叶片数/片	生根数/条
1	(1.65±0.39)ab	(0.38±0.03)b	(0.34±0.03)ab	(3.0±0.7)ab	(5.6±0.5)bc
2	(2.30±0.24)b	(0.34±0.02)ab	(0.35±0.01)ab	(3.7±0.3)bc	(4.3±0.5)b
3	(3.57±0.92)c	(0.38±0.04)bc	(0.41±0.05)bc	(5.1±1.2)cd	(5.6±1.3)bc
4	(1.80±0.18)ab	(0.40±0.03)bc	(0.40±0.03)bc	(2.5±0.2)ab	(4.9±0.7)bc
5	(1.85±0.13)ab	(0.41±0.03)bc	(0.39±0.02)bc	(5.7±0.9)d	(5.6±0.8)bc
6	(2.35±0.10)b	(0.40±0.00)bc	(0.40±0.01)bc	(3.6±0.3)bc	(6.7±0.9)c
7	(1.50±0.24)ab	(0.29±0.01)a	(0.29±0.01)a	(2.0±0.5)ab	(1.6±0.3)a
8	(2.30±0.25)b	(0.36±0.03)ab	(0.36±0.03)ab	(2.8±0.3)ab	(4.7±0.3)bc
9	(2.00±0.23)ab	(0.41±0.03)bc	(0.43±0.04)bc	(3.5±1.4)bc	(4.5±0.7)bc
10(CK)	(1.25±0.10)a	(0.48±0.03)c	(0.48±0.03)c	(1.2±0.2)a	(3.5±0.5)ab

同列不同字母表示 2 组处理之间差异显著($P < 0.05$)。



1~10 为培养基编号。

图 3 萌发种子转接后生长 45 d 的观察结果

Fig. 3 The growth of germination seeds after transferred to MS basal medium for 45 days

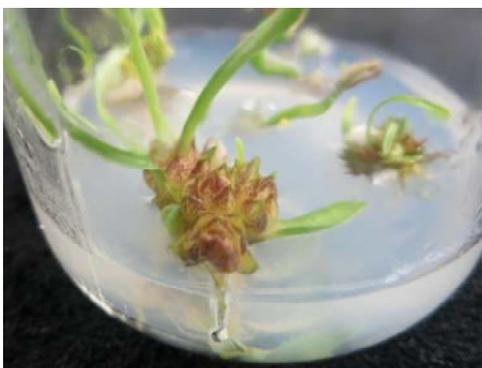


图 4 3 号培养基上的种子转入 MS 培养基 45 d 后获得的丛生小鳞茎

Fig.4 Clumping bulblets from seeds in No.3 Medium after transferred to MS basal medium for 45 days

3 结论与讨论

百合属种子具有坚厚的种皮,会对种子萌发形成较大的机械阻碍,使其不能吸收足够水分,导致生长停滞、萎缩甚至死亡^[19,24]。有研究^[19-20,24-25]表明,通过预冷、预热处理擦破种皮,或直接剥除种皮,可以显著提高种子的萌发速度和萌发率,本试验结果与其结论接近。孙叶等^[18]发现,利用 NaClO 溶液预处理兰花杂交种子,能明显提高其萌发率。在本试验中,采用 NaClO 溶液振荡处理巨球百合种子,既能对种子进行消毒,又能腐蚀种皮,同时溶解一

些种皮内含有的酸性抑制物,且在实际操作中,延长无菌水冲洗时间,可一定程度软化种皮,去除种皮表层的蜡质和油脂,增强皮透性,减轻剥皮处理难度,提高萌发率^[18-19]。

吴昀等^[19]得出药百合种子无菌播种最适培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;向地英等^[21]和周晓杰等^[25]均认为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA 为百合杂交种子无菌播种的最适培养基。综合考虑各因素,巨球百合种子萌发的最适培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA。此培养基培养巨球百合种子,种子萌发率为 100.0%,诱导率为 65.0%,平均诱导不定芽 1.28 个,转入 MS 培养基生长 45 d 后,平均形成小鳞茎 2.35 个,平均生成 3.6 片叶,生根 6.7 条,萌发种子转接后的各项生长指标均优于 1 号培养基,且植株生长比 1 号培养基的植株健壮,说明 1.0 mg/L 6-BA 的培养基较适合百合属种子萌发,这与前人的研究结果相符。当细胞分裂素与生长素的比值高时,6-BA 和 NAA 的不同配比可诱导芽的分化;比值低时,则促进根的生成^[26]。从吴昀等^[19]、向地英等^[21]、周晓杰等^[25]和本试验结果来看,最适培养基中的细胞分裂素与生长素的比值均较高,所对应的诱导芽数也较多,充分印证了这一观点。

参考文献:

- [1] 李根有,陈征海,颜福彬.产于浙江温岭的百合属一新变种——巨球百合[J].浙江林学院学报,2007(6):767-768.
- [2] 吴昀,徐康,张琳,等.巨球百合鳞茎营养成分分析[J].营养学报,2014(1):102-104.
- [3] Chang C, Chen C T, Tsai Y C, et al. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker[J]. Bot Bull Acad Sin, 2000, 41(2): 139-142.
- [4] 管康林.论种子的需光性[J].浙江林学院学报,1989(1):71-82.
- [5] 伍丹,周兰英.光照和温度对大百合种子萌发的影响[J].中国野生植物资源,2007(2):52-54.
- [6] 杨炜茹,张启翔.岷江百合种子萌发的研究[J].种子,2008(11):5-7.
- [7] 金淑梅,杨利平,张月学.百合种子萌发影响因素的探讨[J].北方园艺,2008(6):117-118.
- [8] 方晶.光照、温度等因子对卷丹百合种子萌发特性的影响[J].北方园艺,2011(4):91-92.
- [9] 杨利平,宋满珍,张晶.光照和温度对百合属 6 种植物种子萌发的影响[J].植物资源与环境学报,2000(4):14-18.
- [10] 曾宋君,陈之林,吴坤林,等.兜兰无菌播种和组织培养研究进展[J].园艺学报,2007(3):793-796.
- [11] Urbaniec-Kiepusa M, Bach A. Effect of pre-storage on *Lilium martagon* L. seed longevity following cryopreservation[J]. Cryoletters, 2014, 35(6): 462-472.
- [12] 王芬,徐步青,刘幸佳,等.春兰种子无菌播种萌发过程及其影响因素[J].浙江农林大学学报,2013(1):136-140.
- [13] 周辉明,林辉锋,尚伟,等.垂花蕙兰种子无菌播种和快速繁殖[J].福建农业学报,2013(10):981-986.
- [14] 郑君爽,宁惠娟,吕慧,等.国兰与大花蕙兰杂交育种及无菌播种研究进展[J].中国农学通报,2011(4):81-84.
- [15] 姚丽娟,徐晓薇,林绍生,等.蝴蝶兰无菌播种技术[J].北方园艺,2004(4):82-83.
- [16] 余慧琳,胡月华,朱一仪.蝴蝶兰种子无菌播种诱导增殖原球茎试验研究[J].北方园艺,2009(4):188-190.
- [17] 俞继英,郑勇平,王春,等.蝴蝶兰无菌播种与组织培养研究进展[J].林业科技开发,2010(3):5-10.
- [18] 孙叶,包建忠,刘春贵,等.影响春兰、蕙兰杂交种子无菌萌发的若干因素[J].江苏农业科学,2010(2):187-188.
- [19] 吴昀,马怡迪,张琳,等.药百合种子萌发及染色体倍性检测[J].中国农学通报,2013(13):153-157.
- [20] 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.
- [21] 向地英,陈思,王丽霞.百合杂交种子无菌播种育苗技术研究[J].安徽农业科学,2007(24):7461.
- [22] 杜方.百合不同器官转录组分析及 SSR 标记开发应用[D].杭州:浙江大学,2014.
- [23] 管康林.种子的休眠与萌发[J].热带植物研究,1981(18):39-51.
- [24] 李雪,杜捷,陈丽梅,等.克得利亚百合种子萌发及鳞茎生长的研究[J].西北师范大学学报:自然科学版,2004,40(2):69-71.
- [25] 周晓杰,樊金萍,龚束芳,等.百合远缘杂交种子快繁方法的研究[J].作物杂志,2009(3):110-113.
- [26] 刘庆昌,吴国良.植物细胞组织培养[M].北京:中国农业大学出版社,2003.

责任编辑:苏爱华

英文编辑:王 库