

# 野百合试管鳞茎诱导与增殖的研究

刘红美, 令狐克勇, 方小波 (贵阳医学院医学生物技术教研室, 贵州贵阳550004)

**摘要** 以贵州野百合鳞片不同部位为外植体, 用3%次氯酸钠进行消毒, 以MS为基本培养基, 附加不同浓度的激素进行培养。结果表明, 用3%次氯酸钠对野百合鳞茎进行外植体进行消毒完全可行, 且对操作人员, 实验材料和环境都不存在不良影响, 价格低廉; 最佳的诱导培养基为MS + 6-BA 1.5 ng/L + NAA 0.3 ng/L; 最适合的外植体为百合鳞片基部。用相同的培养基进行增殖培养, 25 d后, 可获得繁殖系数高、生长势好、并有新根生成的试管鳞茎; 将直径为1~2 cm的试管鳞茎移栽培养, 成活率高于90%。该研究得出的方法可在短时间内提供大量的贵州野百合种苗。

**关键词** 野百合; 试管鳞茎; 诱导; 增殖

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)18-08928-02

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

LIU Hong mei et al (Department of Medical Biotechnology, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004)

**Abstract** To find the optimum medium for induction and multiplication of tube bulb in *Lilium brownii* and set up rapid propagation method for *Lilium brownii*, the bulb of *Lilium brownii* was used as explants and cultivated in the basal medium MS with different concentrations of hormone. The results indicated the optimum inductive medium was MS + 6-BA 1.5 ng/L + NAA 0.3 ng/L and the best explant was the basal of bulb. The same medium was used for proliferation and many grown well tube bulbs with new root were produced after 25 day culture. When tube bulbs grew in 1-2 cm, they were transplanted and 90% of plantlets can survive. The conclusion was the medium and culturing method in this study could be used for a lot of *Lilium brownii* plantlets production in short time.

**Key words** *Lilium brownii*; Tube bulb; Induction; Multiplication

贵州独特的地理环境和气候条件, 蕴育了丰富的百合资源, 其中野百合全省均有分布。野百合鳞茎富含蛋白质、脂肪、淀粉、糖及维生素B1、B2和维生素C等营养成分, 是一种很好的强身滋补品。同时, 野百合具有较强的抗逆性, 是百合育种的好材料。随着人民生活水平的提高, 市场对百合粉的需求剧增, 加之自然环境的恶化, 贵州野百合资源形势严峻。因此, 利用现代生物技术组织培养方法对野百合进行种质保存和快速繁殖研究, 对发展野百合的大规模生产及百合育种工作, 保护野生资源和生态环境有重要意义。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 采自贵阳市黔灵山生长健壮、开花性状好、无病虫害的野百合植株鳞茎。

## 1.2 方法

**1.2.1 外植体消毒。** 采集的野百合鳞茎, 用自来水冲洗后, 75%酒精浸泡30 s, 无菌水冲洗3~4次, 再加入3%次氯酸钠浸泡10 min, 间或摇动几下, 用无菌水冲洗3~4次, 再用3%次氯酸钠浸泡10 min, 后用无菌水冲洗6~7次, 然后置于铺有无菌滤纸的培养皿中切块备用。

**1.2.2 培养基和培养条件。** 采用固体培养, 以MS为基本培养基, 附加不同浓度的6-BA和NAA处理, pH值为5.8, 蔗糖浓度为3%。培养条件为培养温度23~27℃, 光照强度1500 lx, 光照时间12 h/d。

**1.2.3 最佳试管鳞茎诱导、增殖培养基的筛选。** 以MS培养基为基本培养基, 以细胞分裂素6-氨基嘌呤(6-BA)和生长素萘乙酸(NAA)进行不同浓度配比, 研究激素配比对贵州野百合试管鳞茎诱导的影响。外植体选用消毒后的鳞茎鳞片, 切成1.5 cm × 1.5 cm大小后接种, 30 d后观察并记录结果。

**1.2.4 最佳外植体的筛选。** 在其他种类百合试管鳞茎的诱导中均报道, 不同发育程度和不同部位即百合鳞茎的外层、内层以及各层的上、中、下段诱导新鳞茎的能力差异较大<sup>[1]</sup>。为证实这种差异是否也存在于贵州野百合试管鳞茎的诱导中, 以及筛选出最佳外植体, 该研究采用筛选得到的贵州野百合试管鳞茎最佳诱导培养基研究发育程度、不同部位外植体对试管鳞茎形成的影响。具体操作是接种时将消毒后的贵州野百合鳞茎外、中、内层以及上、中、下段分开接种。

## 2 结果与分析

**2.1 次氯酸钠的消毒效果** 当前, 百合试管鳞茎诱导与快速繁殖中, 外植体的消毒剂都选用0.1%的升汞<sup>[2-5]</sup>。升汞的消毒能力不可置疑, 但对实验操作人员的健康和环境的清洁却存在较大威胁, 同时对实验材料百合鳞茎也有较大的腐蚀, 易引起外植体变色和腐烂, 甚至有可能存在重金属汞残留, 而且升汞价格很贵, 不利于规模化生产。为了节省成本、保护环境, 该研究选用次氯酸钠作消毒剂来对野百合鳞茎进行消毒处理。经过多次试验得出, 用3%次氯酸钠浸泡10 min, 处理2次, 消毒效果较理想。在接种的120个三角瓶共360块外植体中, 只有4瓶6块外植体污染, 其中1瓶为细菌污染。试验结果显示, 用3%次氯酸钠对百合鳞茎外植体进行消毒完全是可行的, 而且对操作人员、实验材料和环境都不存在不良影响, 价格低廉。

**2.2 不同激素对比对试管鳞茎形成的影响** 从表1可看出, 不同浓度的激素对比对贵州野百合试管鳞茎诱导效果存在明显差异。6-BA浓度相同的条件下, 随NAA的浓度上升, 鳞片萌发试管鳞茎率相应提高, 当NAA浓度为0.5 ng/L时, 野百合试管鳞茎萌芽率平均可达80.0%以上。当NAA的浓度不变时, 6-BA的浓度为1.5 ng/L时, 野百合的鳞茎芽萌发率最大, 诱导的芽数最多, 芽长得也较壮, 并且芽基部都出现膨大, 部分鳞茎芽还长出新根。当6-BA的浓度低于1.0 ng/L时, 野百合的鳞茎芽萌发率普遍不高, 而且长出的芽生长势普遍偏弱。浓度过高, 则导致部分鳞茎芽出现玻璃化现

**基金项目** 贵州省优秀科技教育人才省长基金(S2004-17); 贵州省高层次人才科研条件特助经费(Q2005-4); 贵州医学院博士启动基金(C2005-6)。

**作者简介** 刘红美(1975-), 女, 贵州遵义人, 讲师, 从事植物生物技术研究。

**收稿日期** 2008-03-28

象,不利于增殖。可见,不管是低浓度的激素配比,还是高浓度的激素配比,都不利于贵州野百合试管鳞茎的产生。最好的激素配比为0.3 ng/L 的 NAA 和 1.5 ng/L 的 6-BA 组合,这时的鳞茎芽萌发率达90.0%,诱导的芽数也最多,平均每

块外植体带2个鳞茎芽;生长势上,鳞茎芽也较壮,没有出现变态芽和玻璃化芽,所以该激素组合比较适合用于野百合鳞茎芽的诱导。

### 2.3 不同部位外植体对试管鳞茎形成的影响 观察并记录

表1 不同激素对比对贵州野百合试管鳞茎形成的影响

Table 1 Effects of hormone combinations on tube bulb formation of *Lilium brownii*

编号 No.	激素浓度 ng/L Hormone concentration		接种数 块 Inoculation number	萌芽数 块 Germination number	萌芽率 % Germination rate	总芽数 个 Total bud number	芽生长情况 Bud growth situation
	NAA	6-BA					
1	0.1	0.5	20	8	40.0	9	弱 Weak
2	0.1	1.0	20	10	50.0	12	细 Thin
3	0.1	1.5	20	11	55.0	14	壮 Strong
4	0.1	2.0	20	10	50.0	11	壮 Strong
5	0.2	0.5	20	12	60.0	14	弱 Weak
6	0.2	1.0	20	13	65.0	15	细 Thin
7	0.2	1.5	20	15	75.0	18	壮,芽基部膨大 Strong, enlargement of blastema
8	0.2	2.0	20	14	70.0	15	壮 Strong
9	0.3	0.5	20	15	75.0	16	弱 Weak
10	0.3	1.0	20	16	80.0	16	壮 Strong
11	0.3	1.5	20	18	90.0	33	壮,芽基部膨大,部分长根 Strong, enlargement of blastema, some long roots
12	0.3	2.0	20	17	85.0	18	壮 Strong
13	0.5	0.5	20	16	80.0	16	细 Thin
14	0.5	1.0	20	17	85.0	18	壮 Strong
15	0.5	1.5	20	18	90.0	20	壮,芽基部膨大,部分长根 Strong, enlargement of blastema, some long roots
16	0.5	2.0	19	17	89.5	16	壮,有玻璃化现象 Strong, vitrification

接种数、萌芽的外植体数、萌芽率及总芽数等指标。试验发现,外层和中层都见有新鲜茎产生,而内层几乎没有新鳞茎

生成。即不同发育程度外植体诱导能力强弱依次为外层、中层、内层。不同部位对新鳞茎形成的影响见表2。

表2 不同部位对试管鳞茎生成的影响

Table 2 Effects of different positions on the tube bulb formation of *Lilium brownii*

接种外植体部位 Position of inoculated explants	接种数 块 Inoculation number	萌芽的外植体数 块 Germinated explant number	萌芽率 % Germination rate	总芽数 个 Total bud number
鳞片基部 Basal squama	40	33	82.5	120
鳞片中部 Middle squama	40	19	47.5	36
鳞片上部 Upper squama	40	10	25.0	11

表2显示,贵州野百合鳞茎不同部位诱导鳞茎芽的效果差异极大。诱导能力强弱依次为鳞片基部、鳞片中部、鳞片上部。表2中,鳞茎基部诱导鳞茎芽的萌发率可达82.5%,平均每1个鳞茎基部就可形成3~4个新鳞茎芽;而鳞茎中部和上部的鳞茎芽萌发率却相对较低,平均芽数也少,其中鳞片上部的鳞茎芽萌发率仅有25.0%,平均鳞茎芽只有1个。可见,越靠近鳞片基部,器官发生能力也越强。因此,为了获得好的实验结果和降低材料消耗,外植体选择百合鳞茎的基部最理想。

2.4 试管鳞茎的增殖和移栽 试验中,将筛选的最佳激素配比诱导培养基用于野百合鳞茎芽的增殖培养,结果在接种15 d左右,就有新的鳞茎芽生成,成丛生状。培养时间越长,芽数越多。培养25 d左右,部分鳞茎芽生出粗壮的根。当鳞茎直径达1~2 cm时,取出,种植到装有消毒基质的器皿中,

浇透定根水,覆盖保鲜膜保湿,移苗3~5 d后通风透气,待试管苗长出新叶后,除去保鲜膜。移栽成活率在90%以上。

### 3 讨论

百合试管鳞茎诱导成功是百合工厂化、规模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、消毒试剂的选择及作用时间、激素配比、蔗糖浓度、光照、培养温度等。在已报道的其他种类的百合鳞茎培养中,通常采用0.1%升汞进行消毒,这在污染环境的同时,通常还会引起外植体变色、腐烂等,不利于新鳞茎生成。该研究首次选用次氯酸钠作消毒剂,结果证明,次氯酸钠既不会造成环境污染又不影响新鳞茎生成,是一种很好的外植体消毒剂。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培养基

培养基( MS+2,4-D 2.0 ng/L+ NAA 2.0 ng/L+6-BA 1.0 ng/L) 15 d 出愈率最高, 经统计分析, 2,4-D 极差值为 59.333, 方差分析显示, 2,4-D 具有显著性, 是关键因素。

## 2.2 不同激素配比对大蒜愈伤组织继代培养的影响 由表

表2 不同激素配比对大蒜根尖和鳞茎尖愈伤组织诱导及继代培养的影响

Table 2 Callus induction of root tip and bulb tip of garlic under different hormone combinations

组合序号 Combination No.	因素水平 Factor and level			愈伤组织诱导 Callus induction		愈伤组织继代培 养成功率 % Survival rate of callus subculture
	2,4-D	NAA	6-BA	根尖15 d 出愈率 % Callus induction rate of root tip at 15 d	鳞茎尖15 d 出愈率 % Callus induction of bulb tip at 15 d	
1	1	1	1	0	0	15
2	1	2	2	8	10	70
3	1	3	3	30	25	78
4	2	1	2	15	18	40
5	2	2	3	58	61	67
6	2	3	1	64	66	86
7	3	1	3	93	70	35
8	3	2	1	75	68	56
9	3	3	2	90	75	80

## 3 讨论

生长素促进植物细胞的伸长生长, 诱导插枝生根和愈伤组织根的分化, 参与植物茎尖的向光性及根的向地性的调控, 还能诱导花的雌性化, 而细胞分裂素对植物基因的表达有显著的调节作用<sup>[4]</sup>。王秀芝等报道, 不同的植物激素配比对诱导大蒜茎尖芽的增殖及其后续生根有重要影响<sup>[5]</sup>。笔者的研究中, 提示不同种类的植物生长激素和细胞分裂素及其浓度配比对以根尖和鳞茎为外植体的大蒜愈伤组织的诱导和继代培养影响也不同。其中在以根尖为外植体的愈伤组织诱导中, MS+2,4-D 2.0 ng/L+ NAA 0.5 ng/L+6-BA 2.0 ng/L 效果最好; 而在以鳞茎尖为外植体的愈伤组织的诱导中, MS+2,4-D 2.0 ng/L+ NAA 2.0 ng/L+6-BA 1.0 ng/L 效果最好。在愈伤组织的继代培养中, MS+2,4-D 1.0 ng/L+ NAA 2.0 ng/L+6-BA 0.5 ng/L 的继代效果最好。这与张素芝报道的以大蒜茎盘为外植体诱导愈伤组织中高浓度的2,4-D 和细胞分裂素配比虽然有利于愈伤组织的诱导, 却不利于继代培养时愈伤组织的增殖能力和分化能力的长久保持相一致<sup>[6]</sup>。而郑海柔则认为, 在以大蒜叶分生组织

(上接第8929页)

上形成试管鳞茎的数量存在差异。该研究表明, 在MS添加NAA 0.3 ng/L 和6-BA 1.5 ng/L 组合的培养基上, 野百合的鳞茎萌芽率最高, 经增殖后可以得到大量健壮的试管苗。在选择部位上, 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, 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通常较高, 因此, 在野百合的繁殖过程中, 切取鳞茎的基部做外植体是很好的选择。该研究发现, 不同发育程度即外层、中层、内层的鳞片诱导试管鳞茎的能力存在差异, 具体顺序为外层> 中层> 内层。该结果与莫昭展等的研究结果不同<sup>[5]</sup>, 具体原因还有待研究。

目前贵州野百合利用完全依靠野生资源。对野生资源的过分依赖, 导致了资源总量和结构被破坏。要实现野百合

2 经统计分析得出, 在愈伤组织的继代培养中组合6( MS+2,4-D 1.0 ng/L+ NAA 2.0 ng/L+6-BA 0.5 ng/L) 培养基继代培养成功率最高, NAA 的极差值为 51.333, 方差分析显示, NAA 具有显著性, 是关键因素。

为外植体的愈伤组织的诱导中, 2,4-D 是不可缺少的<sup>[7]</sup>。可见, 利用大蒜不同部位为外植体进行愈伤组织诱导对于植物激素的种类及其浓度是有不同要求的, 这也提示了大蒜不同种类的细胞其对植物激素的利用情况是不一致的, 在采用不同的外植体进行愈伤的诱导的时候应采用不同激素配比的培养基。

## 参考文献

- [1] 陈青奇, 陈典, 张海霞. 大蒜育种研究现状[J]. 北方园艺, 2006, 30(2): 40-41.
- [2] 易诚, 宾冬梅, 杨军衡. 大蒜生理功能及开发利用[J]. 特产研究, 2002, 24(4): 59-63.
- [3] 贾敬芬, 陈刚, 郝建国. 葱属植物离体培养和遗传操作[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(2): 103-107.
- [4] 李玉珍. 植物激素的研究进展[J]. 河南科技学院学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 50-53.
- [5] 王秀芝, 孙震晓, 宋兴民. 大蒜组织培养快速繁殖的激素调节[J]. 山东师范大学学报: 自然科学版, 1996, 11(3): 118-120.
- [6] 张素芝. 植物激素配比对大蒜茎盘愈伤组织再生体系的影响[J]. 种子, 2006, 25(6): 38-40.
- [7] 郑海柔. 大蒜叶片愈伤组织诱导研究[J]. 上海农业科技, 1989, 18(6): 32-35.

资源的可持续开发利用, 运用组织培养技术对贵州野百合进行培养具有重要的经济价值<sup>[6]</sup>。该研究表明, 用成本低、无污染的次氯酸钠消毒外植体完全可行, 而诱导与增殖培养基相同, 操作简单, 节省了生根培养, 大大缩短了出苗时间。

## 参考文献

- [1] 赵庆芳, 曾小英, 丁兰, 等. 晶体百合组织培养及快速繁殖研究[J]. 甘肃科学学报, 2003, 15(1): 39-42.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 王红霞. 通江百合的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2000(2): 132-137.
- [5] 莫昭展, 符韵林, 戚萌. 野百合鳞茎芽的诱导和增殖的初步研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(31): 9890-9892.
- [6] IIUHM, IINGHUKY, FANG X B. The study on induction and proliferation of tube bulbs in *Lilium brownii* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008(1): 18-20, 53.