

# 野生湖北百合不定芽诱导及再生植株的建立

蒋 瑶<sup>1</sup>, 陈文波<sup>1</sup>, 周朝伟<sup>1</sup>, 陈其兵<sup>2</sup>

(1. 凯里学院 环境与生命科学学院, 贵州 凯里 556011; 2. 四川农业大学 风景园林学院, 四川 成都 611130)

**摘要:** 为了加强野生湖北百合资源保存与利用, 选用黔东南州野生湖北百合为材料, 鳞茎及茎段为外植体, 探讨不同浓度激素配比对其不定芽诱导、增殖及生根的影响。结果表明: 诱导不定芽的最佳培养基为 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 但茎段诱导不定芽高于鳞片, 出芽率分别为 66.67% 和 59.63%, 单块外植体出芽个数分别为 2 和 1, 且茎段污染率比鳞片的污染率低。茎段诱导最佳增殖培养基为 MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 增殖率为 83.33%, 平均增殖系数为 2.11, 其生长状况良好, 为最佳增殖培养基。茎段诱导最佳生根培养基为 1/2MS+0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 诱导生根率高达 93.33%, 平均生根数为 3.18。

**关键词:** 湖北百合; 鳞片; 茎段; 组织培养

**中图分类号:** S682.2; Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2016)09-0011-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.09.0011

湖北百合 (*Liliumhenryi* Baker) 为百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium*) 多年生草本植物, 是黔东南特有的野生植物资源之一, 同时也是园艺上重要的育种材料。原产于中国湖北、贵州等地, 生长于山坡、石缝, 海拔 700~1 000 m。

湖北百合鳞茎近球形, 鳞片矩圆形, 茎紫色, 高 1~2 m, 叶为矩圆状披针状, 可作为药用植物<sup>[1]</sup>, 也可食用, 尤其是花极具观赏价值<sup>[2]</sup>。但也出现常规的分球、分株芽、鳞片扦插、鳞片包埋等过度的无性繁殖导致品种退化, 如病害严重、产量降低、品质下降等<sup>[3]</sup>。近年来, 有关湖北百合研究主要集中在对其资源调查与评价<sup>[4]</sup>、遗传多样性研究<sup>[5]</sup>、抗病基因鉴定<sup>[6]</sup>、染色体细胞学<sup>[7]</sup> 研究等方面, 鲜见有关茎段组织培养的报道。

因此, 利用组织培养技术, 以黔东南州野生湖北百合鳞片和茎段为外植体, 探讨不同激素浓度配比对其影响, 以期当地湖北百合的组培体系建立积累相关的资料, 从而有效解决其退化现象, 为种质资源保存提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 外植体 野生湖北百合采自凯里学院艺

术楼后山, 选择生长健壮、无病虫害的湖北百合植株的鳞茎和幼嫩的茎段, 避光保湿带回实验室备用。

1.1.2 试剂 70% 乙醇 (AR, 重庆川东化工), 0.1% HgCl<sub>2</sub>, 6-BA, NAA, MS 培养基, 试剂均为分析纯 (AR), 其产地为天津科密欧 (乙醇除外)。

1.1.3 仪器与设备 立式压力蒸汽灭菌锅 (XQ-LS-75s II, 上海博讯)、电热鼓风干燥箱 (101 型, 北京科伟)、净化工作台 (JH-1, 北京科伟)、电热蒸馏水器 (YN-ZD-2, 上海博讯)、电子天平 (BSA124S, 赛多利斯) 等。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒 选取鳞片的中外层, 将其泥土洗净, 在流水条件下冲洗 1 h, 采用 75% 乙醇消毒 30 s, 无菌水处理 2~3 次, 再采用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min, 无菌水处理 3~5 次。茎段用 75% 乙醇消毒 20 s, 无菌水洗 3 次, 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 8 min, 用无菌水洗 3~5 次, 备用。

1.2.2 不定芽的诱导培养 将消毒后的野生湖北百合鳞片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 且周围都形成创口面; 将其茎段切成 1 cm 左右, 接种到 4 种不同的 MS 培养基: (1) MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA; (2) MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA; (3) MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA; (4) MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 加入蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>, 琼脂粉 7 g·L<sup>-1</sup>, pH5.8。暗培养 3 d 后, 再进行光照培养, 其光照强度 2 000 lx, 培养温度为 (25±1) °C,

收稿日期: 2016-07-28

基金项目: 贵州省科技厅资助项目 (黔科合 J 字 [2014] 2153 号); 凯里学院博士启动基金资助项目 (BS201332)

第一作者简介: 蒋瑶 (1982-), 女, 四川省罗江县人, 博士, 副教授, 从事植物生物技术研究。E-mail: jiangyao0221@163.com。

培养湿度为 $(80\pm 2)\%$ ,观察不同激素浓度组合对不定芽的诱导情况,并计算污染率、诱导率。

1.2.3 不定芽的增殖培养 不定芽转入4种不同的增殖培养基:(1)MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA;(2)MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA;(3)MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA;(4)MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA,加入蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂粉 7 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.8。观察其不定芽增殖情况,培养 30 d 后,并计算增殖率和增殖系数。

1.2.4 生根培养 将增殖所得健壮的不定芽接种于5种不同的生根培养基:(1)1/2MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA;(2)1/2MS+0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA;(3)1/2MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA;(4)1/2MS+0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA;(5)MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA,加入活性炭 1.0 mg·L<sup>-1</sup>,蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂粉 7 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.8。转接 7 d 后开始观察其生根情况,在培养 30 d 后统计生根数,在此过程中对其进行拍照,计算其生根率。

1.2.5 数据统计及分析 利用 SPSS19.0 进行相关统计分析,每个处理重复 3 次,每个重复测定 3 次。

$$\text{污染率}(\%) = \frac{\text{污染的外植体数}}{\text{接种外植体总数}} \times 100;$$

$$\text{芽诱导率}(\%) = \frac{\text{诱导出不定芽的外植体数}}{\text{成活接种外植体总数}} \times 100;$$

$$\text{增殖率}(\%) = \frac{\text{新诱导不定芽数}}{\text{成活接种不定芽数}} \times 100;$$

$$\text{增殖系数} = \frac{\text{增殖后不定芽数}}{\text{增殖前不定芽数}};$$

$$\text{生根率}(\%) = \frac{\text{生根幼苗数量}}{\text{接种幼苗数量}} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 不同外植体对野生湖北百合形成不定芽的影响

分别取鳞茎的中下端和茎段的上端,按照形态学的上下端将不同的外植体分别接入诱导不定芽的培养基中。培养一段时间后发现,鳞片和茎段均能诱导出不定芽,但鳞片诱导的不定芽长势一般,且不定芽相对较小(见图 1A),茎段诱导的不定芽长势良好,不定芽较为粗壮且基部出现膨大的现象(见图 1B)。

由表 1 可看出,不同培养基对野生湖北百合诱导不定芽的污染率存在差异,且污染率 $\leq 40\%$ ,选用茎段的污染率为 16.67%~25.00%,鳞茎的

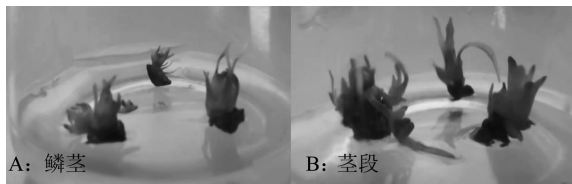


图 1 不同外植体诱导不定芽比较

Fig.1 Adventitious buds induction of the different explants

污染率为 20%~40%,且处理 3 污染率最低,由此说明,同一培养基条件下,茎段均比鳞茎诱导的污染率低,可能地上部分所带病原菌比地下部分少,且采摘较为方便。处理 1 至处理 4 通过鳞茎或茎段诱导均能产出不定芽,但诱导效果却不同,依次为处理 1>处理 3>处理 4>处理 2,鳞茎诱导除处理 1 和处理 3 外,其余处理间达到 5%水平差异,而茎段诱导处理间均达到 5%差异显著水平,说明 6-BA<2.0 mg·L<sup>-1</sup>,NAA $\leq 1.0$  mg·L<sup>-1</sup>有利于不定芽的诱导。处理 1 诱导不定芽效果最佳,且鳞茎和茎段诱导出芽率分别为 59.57%和 66.67%。野生湖北百合鳞茎和茎段在 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA 培养基上的诱导效果最好,为最佳诱导培养基。在同一诱导不定芽培养基和培养条件下,不同外植体诱导不定芽的能力不同,同种外植体在不同培养基中的芽诱导能力也不同,不同培养基对湖北百合不同外植体诱导不定芽的效果不同。

### 2.2 不同培养基对野生湖北百合不定芽增殖的影响

将初代培养得到的不定芽切成单芽转入增殖培养基中诱导小鳞茎,不同类型的不定芽生长状况有所不同,鳞茎诱导的不定芽增殖相对较慢,分化不定芽的数量较少,芽细弱翠绿色(见图 2A),茎段诱导的不定芽增殖相对较快,芽增殖的数量相对较多,芽粗壮绿色(见图 2B)。

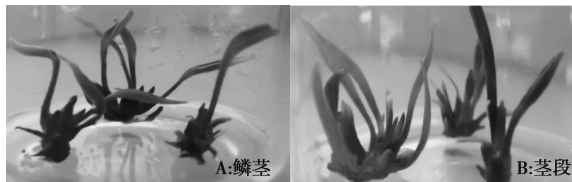


图 2 野生湖北百合茎段诱导不定芽增殖情况

Fig.2 The proliferation of adventitious buds induction from the stem of wild *Lilium henryi* Baker

由表 2 可知,处理 1 至处理 4 均能使不定芽进行增殖,平均增殖率不低于 62.5%,平均增殖系数高于 1.5,各处理不定芽增殖率在 62.50%~83.33%,其中处理 3 增殖效果差,6-BA 浓度高达

2 mg·L<sup>-1</sup>,抑制不定芽的增殖;处理 4 增殖效果最好,增殖率高达 83.33%,且增殖系数为 2.11,茎段诱导不定芽增殖率处理 1 和处理 4 差异不显著,与处理 2 和 3 差异显著且达到 1%水平;增殖系数处理 2 和 4 无差异显著性,但与处理 1 和 3 存在差异显著性且达到 1%。说明高浓度的 NAA,低浓度的 6-BA 更有利于不定芽的增殖,综合考虑,湖北百合在 MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA 培养基上为适宜的不定芽增殖培养基。

表 1 不同外植体对野生湖北百合诱导不定芽的影响

Table 1 The effect of the different explants on adventitious buds induction from wild *Liliumhenryi Baker*

处理 Treatments	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	污染率/%		不定芽诱导率/%	
			The rate of contamination		The induction rate of adventitious buds	
			鳞茎 Bulb	茎段 Stem	鳞茎 Bulb	茎段 Stem
1	1.0	0.5	33.80 bcBC	25.00 aA	59.57 aA	66.67 aA
2	2.0	1.0	34.29 bB	22.22 aAB	47.83 cC	42.86 dB
3	0.1	1.0	20.00 dD	16.67 bB	58.33 aAB	63.33 bA
4	1.0	1.0	40.00 aA	25.00 aA	55.56 bB	48.15 cC

同列数据后不同大、小写字母表示 1%、5%水平差异显著。下同。  
Different capital letters and lowercases after column data mean significant difference at 0.01 and 0.05 level. The same below.

表 2 不同激素对野生湖北百合茎段诱导不定芽增殖的影响

Table 2 The effect of different hormone on proliferation of adventitious buds induction from stem of wild *Liliumhenryi Baker*

处理 Treatments	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	增殖率/%	增殖系数
			The rate of proliferation	The coefficient of proliferation
1	1.0	0.5	80.56 aA	1.60 bB
2	1.0	0.2	66.67 bB	1.95 aA
3	2.0	1.0	62.50 cBC	1.53 bB
4	0.1	1.0	83.33 aA	2.11 aA

2.3 不同培养基对野生湖北百合生根培养的影响

将分成单株的小苗转入含有活性炭的 5 种生根培养基中,转接 30 d 后观察生根情况,从正面可看出长势良好(见图 3A),瓶底可以看出根数量较多,根系较为发达(见图 3B)。

由表 3 表明,当基本培养基为 1/2 MS,添加

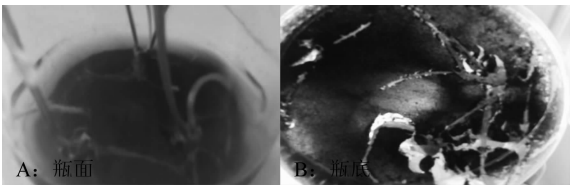


图 3 野生湖北百合生根培养  
Fig. 3 The rooting of wild *Lilium henryi Baker*

表 3 不同培养基对野生湖北百合生根培养的影响

Table 3 The effect of the different cultures on rooting of wild *Liliumhenryi Baker*

处理序号 Code	培养基 Culture	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	生根率/%	生根数
				The rooting percentage	The number of rooting
1	1/2MS	0.0	0.5	88.89 bA	2.38 bB
2	1/2MS	0.0	0.2	79.17 dC	1.68 cC
3	1/2MS	0.2	1.0	77.78 dC	2.14 bB
4	1/2MS	0.0	0.3	93.33 aA	3.18 aA
5	MS	0.0	0.2	83.33 cB	2.08 bBC

NAA 浓度为  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 生根率高达 93.33%, 单株生根数达到 3 以上, 生根效果最好, 当 NAA 浓度高达  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 生根率为 77.78%, 与处理 2 差异不显著, 其它生根率不同处理间达到 5% 差异显著性, 生根数处理 1、处理 3、处理 5 差异不显著, 与其它处理间均达到 5% 水平差异显著性。由此看出,  $1/2\text{MS} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 为最佳生根培养基。 $1/2\text{MS}$  培养基对生根培养有一定的促进作用, 添加低浓度的 NAA 对生根有促进作用, 高浓度的 NAA 对生根有抑制作用。

### 3 结论与讨论

湖北百合不定芽诱导选用的外植体多为鳞片和花器官, 但本试验采用鳞片和茎段为材料, 对其不定芽的诱导、增殖和生根进行研究, 而茎段取材方便、消毒容易, 且易切割, 可满足生产上种苗的需要, 也为其组织培养研究奠定技术基础, 并完善了湖北百合组培体系。不定芽诱导所采用的激素多为 6-BA 和 NAA, 6-BA 主要是促进细胞的分裂与扩大, 使细胞数目增多, 同时促进芽的分化, 抑制衰老。适量 6-BA 促进不定芽的分化和生长, 但超过一定浓度时, 促进效果减弱。在培养过程中, 发现 6-BA 在湖北百合组培的各个环节中都有一定的影响, 低浓度诱导效果不佳, 较高的浓度可促进组织分化和生长, 但浓度过高则会抑制生长, 6-BA 对湖北百合不定芽诱导过程的最佳浓度都为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; NAA 促进细胞伸长和生长, 促进植物产生愈伤组织, 适合生根。

NAA 对小鳞茎增殖效果明显, 随着其浓度的不断增大其增殖系数不断升高, 但超过一定浓度时趋于不变, 因此, 要根据材料选择添加适当的浓度, 根据前人研究结果, NAA 浓度一般在  $0.2 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA 对湖北百合的小鳞茎增

殖的最佳浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 鳞茎增殖系数随 6-BA 浓度的增加而减小, 说明在  $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 6-BA 有利于促进小鳞茎的增殖。

$1/2\text{MS}$  培养基更适宜生根, MS 反而会抑制根的生长。因材料和生长时期的不同, 功效有所差异。NAA 对湖北百合的生根有促进作用, 本试验设计了 3 个浓度梯度  $0.2$ 、 $0.3$  和  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 结果显示, 小鳞茎的生根数随 NAA 浓度的升高而增多, 但达到一定浓度则对生根起抑制作用, 由此看来,  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 为促进生根效果最佳的浓度。

试验表明, 适合湖北百合鳞茎和茎段不定芽诱导的最佳培养基为  $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA, 但不同外植体对不定芽诱导能力不同, 茎段诱导不定芽成功率高于鳞片, 出芽率分别为 66.67% 和 59.63%, 且出芽个数分别为 2 和 1, 茎段诱导污染率低于鳞片诱导污染率, 茎段诱导不定芽最适增殖培养基为  $\text{MS} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA, 最适生根培养基为  $1/2\text{MS} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA。

### 参考文献:

- [1] 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(1): 71-75.
- [2] 杜英祥, 吉海军, 商万有. 百合的开发价值研究[J]. 吉林农业, 2011(5): 316.
- [3] 丰先红. 大百合鳞片组织培养细胞分化及生理机制研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.
- [4] 吴学尉, 李树发, 熊丽, 等. 云南野生百合资源分布现状及保护利用[J]. 植物遗传资源学报, 2006(3): 3327-3330.
- [5] 杨敏. 长江中游地区百合属种质资源遗传多样性的 SSR 分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [6] 杜运鹏. 我国百合属植物资源评价及抗病基因同源序列(RGA)的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- [7] 王斐, 胡凤荣. 百合染色体细胞学研究进展[J]. 分子植物育种, 2012(5): 620-627.

## Study on Adventitious Buds Induction and Plant Regeneration of Wild *Liliumhenryi*

JIANG Yao<sup>1</sup>, CHEN Wen-bo<sup>1</sup>, ZHOU Chao-wei<sup>1</sup>, CHEN Qi-bing<sup>2</sup>

(1. College of Environment and Life Science, Kaili University, Kaili, Guizhou 556011; 2. College of Landscape Architecture, Sichuan Agriculture University, Chengdu, Sichuan 611130)

**Abstract:** In order to strengthen the preservation and utilization of wild lily resources in Hubei province, using bulb and stem of wild *Liliumhenryi* explant, the effect of different hormone combination on adventitious buds induction, bud proliferation and rooting were studied. The results showed that the optimal medium for adventitious buds induction was  $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA. The induction rate of stem was higher than bulbs. The rate of induction was 66.67% and 59.63%. The bud from single explant was 2 and 1, the rate of contamination from stem was lower than bulb. The best proliferation medium was  $\text{MS} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA. The rate of proliferation was 83.33%, the average of coefficient of proliferation was 2.11 and the growth was the better. The medium for rooting was  $1/2\text{MS} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA. The rate of rooting was as high as 93.33%, the average number of rooting was 3.18.

**Keywords:** *Liliumhenryi*; bulb; stem; tissue culture