

# 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, 选用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)10-0013-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.10.0013

湖北百合 (*Liliumhenryi* Baker) 为百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium*) 多年生草本植物, 也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, 未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, 以期在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 30g·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)℃, 培养湿度为 (80±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。

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。

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:(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)。

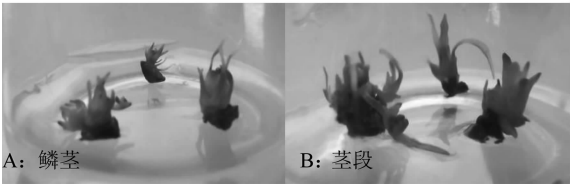


图1 不同外植体诱导不定芽  
Fig.1 Adventitious buds induction on the different explants

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≤40%,选用茎段的污染率为16.67%~25.00%,鳞茎的污染率为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~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≤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。

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 ofadventitious buds induction on the different explants from wild Lilium henryi Baker			污染率/%		不定芽诱导率/%	
处理 Code	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	The rate of contamination		The rate of adventitious buds induction	
			鳞茎 Bulb	茎段 Sections of stems	鳞茎 Bulb	茎段 Sections of stems
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 0.01 和 0.05 水平差异显著性。下同。  
The different capital letter and lowercase within the same line mean significant difference at 0.01 and 0.05 level. The same below.

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),

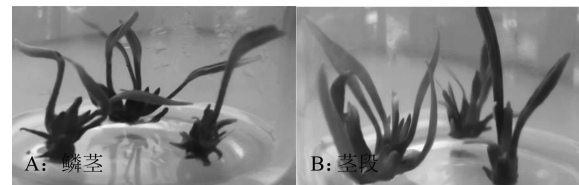


图 2 野生湖北百合茎段诱导不定芽增殖  
Fig. 2 The proliferation of adventitious buds induction from the stem of wild *Lilium henryi* Baker

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 the proliferation of adventitious buds induction from stem of wild <i>Lilium henryi</i> Baker				
处理 Code	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	增殖率/% The rate of proliferation	增殖系数 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 NAA 浓度为 0.3 mg·L<sup>-1</sup>,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

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)。

由表 2 可知,处理 1~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处理 1 和 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。

浓度高达 1.0 mg·L<sup>-1</sup>,生根率为 77.78%,生根率不同处理间达到 5%差异显著性,生根系数除处理 1 和 5 外,其余不同处理间均达到 5%水平差

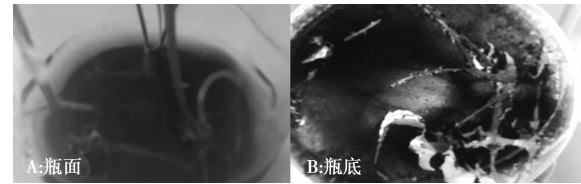


图 3 野生湖北百合生根培养  
Fig. 3 The rootingcultivation of wild *Lilium henryi* Baker

表 3 不同培养基对野生湖北百合生根培养的影响

Table 3 The effecton rooting of wild <i>Lilium henryi</i> Baker of the different media					
处理序号 Code	培养基 Media	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	生根率/% The rooting percentage	生根数 The number of rooting
1	1/2MS	0	0.5	88.89 bA	2.38 bB
2	1/2MS	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	0.3	93.33 aA	3.18 aA
5	MS	0	0.2	83.33 cB	2.08 bBC

异显著性。由此看出,  $1/2MS+0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 为最佳生根培养基。 $1/2MS$  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 and 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, 一方面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。一定浓度的 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  $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\sim 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 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。

$1/2MS$  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  $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  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  $MS+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 最适生根培养基为  $1/2MS+0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  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.

## Adventitious Buds Induction and Plant Regeneration of Wild *Lilium henryi*

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 resources of wild *Lilium henryias*, the effects of different hormone combination on adventitious buds induction, bud proliferation and rooting were explored by using bulb and stem of wild *Lilium henryias* as explant. The results showed that the optimal medium for adventitious buds induction was  $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  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 number from single explant was 2 and 1, the rate of contamination from stem was lower than from bulb. The best proliferation medium was  $MS+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  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 better. The medium for rooting was  $1/2MS+0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA. The rate of rooting was as high as  $93.33\%$ , the average number of rooting was 3.18. The theoretical base is the germplasm resource of wild *Lilium henryi* for breeding and conserving.

**Keywords:** *Lilium henryi*; bulb; stem; tissue culture