

兰州百合组织培养和高频繁殖

林贵美^{1,2}, 李小泉^{1,2}, 李朝生^{1,2}, 吴代东^{1,2}, 牟海飞^{1,2}, 张进忠^{1,2}

(1. 广西植物组培苗有限公司, 南宁 530007; 2. 广西农业科学院生物技术研究所, 南宁 530007)

摘要:采用人工低温及自然冬季萌芽两条路线进行兰州百合(*L. davidii* var. *unicolor* (Hoog) Cotton)^[1]鳞片外植体初代诱导培养, 以 MS+0.0~1.0 mg/L BA+0.0~0.1 NAA 为初代培养基, 成功实现了南方高温地区兰州百合组织培养初代诱导。低温冷藏有利于鳞芽诱导, 但不是鳞芽诱导的必要条件。采用 MS+0.0~0.5 BA+0.0~0.1 NAA 继代培养基, 高温(28~29℃)培养与丛芽继代方式实现了兰州百合高频繁殖, 其繁殖系数达 3.0~5.0, 继代周期为 16~18 d; 组培生根苗的分单株大田移栽方法提高了成活率, 降低了用苗量; 为工厂化生产其组培苗及炼苗移栽提供了技术支持。

关键词:兰州百合; 组织培养; 高频繁殖

中图分类号: S339.4⁺9

文献标识码: A

文章编号: 1008-0864(2008)02-0110-04

Studies on Tissue Culture and High Frequency Propagation of *Lilium davidii* var. *unicolor* (Hoog) Cotton

LIN Gui-mei^{1,2}, LI Xiao-quan^{1,2}, LI Chao-sheng^{1,2}, WU Dai-dong^{1,2},
MOU Hai-fei^{1,2}, ZHANG Jin-zhong^{1,2}

(1. Guangxi Plant Tissue Culture Co., Ltd, Nanning 530007;

2. Biological Technology Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: Two kinds of technology: artificial low temperature and natural winter temperature, have been adopted for primary inducement culture of bulb scale segment of *Lilium davidii* var. *unicolor* (Hoog) Cotton. The optimal culture medium for inducement is MS+0.0~1.0 mg/L BA+0.0~0.1 mg/L NAA. It shows that the cold storage is dispensable, but not necessary for inducement of bulb. The culture condition of high temperature (28~29℃), using clumpy buds for multiplication realizes the high frequency propagation of *Lilium davidii* var. *unicolor* (Hoog) Cotton, with subculture medium of MS+0.0~0.5 mg/L BA+0.0~0.1 mg/L NAA. The rate of multiplication reaches 3.0~5.0. One multiplication period only needs 16~18 days. The field transportation of single bulb seedling from tissue culture helps to improve the rate of survival and reduce the amount of seedlings used in this process. This technique can be used for mass production of tissue culture seedlings and seedling transportation as well.

Key words: *Lilium davidii* var. *unicolor* (Hoog) Cotton; tissue culture; high frequency propagation

百合属(*Lilium* L.)植物约 100 种^[1],按用途可分为观赏百合、药用百合和食用百合,在我国传统上常用于食用的有甘肃兰州百合、湖南龙牙百合、江苏宜兴百合和河南洛阳百合。近些年,百合在西南、华中、华东、华南等各地均有种植,品种各异,其中以兰州百合品质最好^[2],其鳞茎硕大,鳞片饱满洁白,品质细腻,营养丰富,香味浓郁,有很高的食用价值^[3~6]。在对食用兰州百合的研究中以组织培养、种植技术、食用营养、生理及病害

研究为主;已有多篇文献报道兰州百合组织培养技术,该技术已趋向成熟^[2, 7~10],在人工环境下能成功诱导鳞芽、无根苗、生根苗,为其工厂化育苗提供了可靠的技术参数,也有文献报道了兰州百合继代苗结鳞茎的研究^[11,12],可提高组培苗的移栽成活率。本文以常规组培快繁技术为基础,在初代诱导培养及继代培养上摸索了一套高频繁殖技术,大幅度缩短了继代周期,提高了生根苗的成活率,可为工厂化育苗技术的改进提供思路。

收稿日期:2008-02-03;修回日期:2008-03-03

作者简介:林贵美,研究员,从事植物组织培养研究。Tel:0771-3248687; E-mail:jzhang@scbg.ac.cn

1 材料与方法

1.1 材料

当年采收的兰州百合球茎,白色,直径 8 cm 左右。5℃冷藏 26 d(分为 1 月份冷藏和 8 月份冷藏)或未冷藏的兰州百合鳞茎,去除受损伤程度较大的外鳞片,将其余较完好的鳞片剥离下来,备用。

1.2 外植体处理

消毒过程:流水冲洗 10 min,移入干净的消毒瓶,无菌条件下用无菌水冲洗一次,再次将鳞片移入另一经高温消毒的消毒瓶,加入 75% 乙醇水溶液,保持 15 s,倒掉乙醇液,无菌水冲洗一次,加入 1% 升汞水溶液消毒 8~10 min,倒掉消毒液,无菌水冲洗 5 次,在超净工作台上晾干,待接种。

接种方法:鳞片凹面向上,鳞片基部处于培养基面上,让其既能接触空气又能接触营养物。

1.3 培养条件

1 月份冷藏和未冷藏处理的外植体材料,初代诱导培养和继代培养条件都为 28~29℃,1 600~1 800 Lux,12 h/d;8 月份冷藏与未冷藏的材料分别给予 20~22℃/28~29℃ 两种温度进行初代诱导培养,其继代都采用 28~29℃,其他条件不变。生根培养条件为 28~29℃,1 600~1 800 Lux、12 h/d。

1.4 培养基

初代诱导培养基,a. MS;b. MS + 1.0 mg/L BA + 0.05 mg/L NAA;c. MS + 3.0 mg/L BA。继代培养基,a. MS;d. MS + 0.5 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA。生根培养:a. MS;e. MS + 0.5 mg/L NAA + 1 g/L 活性炭。所有培养基含糖 3%,琼脂粉 3g/L,pH 5.8,每瓶 30 mL 培养基。

1.5 培养周期及移栽

初代诱导时间 25~30 d,继代周期 16~18 d,室内生根培养 15 d,移栽于大田 20 d 后统计成活率。

2 结果

2.1 各处理条件下的初代诱导

接入鳞片外植体 20 d 后,观察 1 月份冷藏与未冷藏处理的初代培养及 8 月份的冷藏处理的初

代培养(培养温度 20~22℃)情况,鳞片基部明显诱导生长出小鳞芽(图 1),鳞片边缘呈现浅绿色,较大的鳞片诱导的鳞芽也较大,部分小鳞片未诱导出鳞芽,鳞芽诱导成功率超过 60%;诱导的鳞芽经留瓶和转瓶(同样培养基)培养观察,前者生长出叶片,但生长非常缓慢,鳞芽也未见明显增大,后者鳞芽生长及叶片生长较快;目测观察,a、b、c 三种培养基的初代诱导效果在时间和诱导鳞芽数量上区别不明显,其中 c 培养基的鳞芽分化稍多(密)。冷藏的 8 月份外植体在 28~29℃ 条件下培养及未冷藏的 8 月份外植体在 20~22℃ 和 28~29℃ 两种培养温度下的培养 60 d 后发现,没有诱导出小鳞芽,但仍具有生长活性。

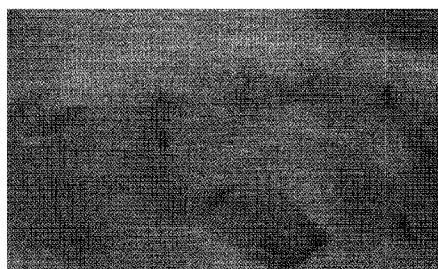


图 1 兰州百合鳞芽的诱导

Fig. 1 Induction of bulb from bulb scale segment of *L. davidii* var. *unicolor*.

2.2 各处理条件下的继代培养

经冷藏与未冷藏两种初代处理的 1 月份继代苗及冷藏处理的 8 月份继代苗(初代培养温度 20~22℃)在 28~29℃ 下能较好生长,鳞茎分化迅速,鳞芽苗生长快(图 2),繁殖系数达 3.0~5.0。在继代培养中采用了单芽与丛芽继代比较,单芽为独立的单鳞芽苗,丛芽是指带有 4~6 片独立叶片的鳞茎团(基部为待分化的愈伤块),继代时将叶片部分切除,保留至鳞茎基部约 0.5 cm,其基部带少许愈伤块,再移入培养基中。表 1 为单芽与丛芽继代培养参数比较,以单芽为继代材料不仅分化慢,而且继代周期长,生长差,不利于继代繁殖;丛芽长势较好,有明显的成型鳞茎,而且随培养时间延长,成型小鳞茎逐渐增多,继代周期大幅度缩短,有利于快速继代繁殖(高频率繁殖),丛芽继代培养较好。实验中发现 a、d 两种培养基配合轮换使用能使继代苗保持较高的鳞茎分化率,同时,也起到壮苗的作用,鳞茎成型更明显。使用 a 培养基,苗生长较高,叶片深绿,基盘愈伤

长出的叶片下部逐渐形成明显的鳞茎,且有生根现象;使用 d 培养基其基盘愈伤较大,幼苗长出的叶片多,生长不高,部分鳞茎成型明显,但低于 a 培养基上的鳞茎数比率;培养 25 d 后不进行继代转接,则 a 培养基培养会表现出叶片枯萎,而 d 培养基培养未见枯萎,但 d 中已经长至瓶顶,a、d 两种培养基的培养效果见表 2,两种培养基培养的继代苗鳞茎分化率都较高,达到了 3.8~5.1。

在继代培养中,可使用 a:d=1~2:1 的比例进行轮换培养,在生根前可连续使用 a 培养基继代两次。另外,在预备实验中,使用 MS+糖 50 g/L 培养继代苗,发现鳞茎表形明显,较大,但鳞茎分化率较低,叶片生长较快,生根丰富。



图 2 兰州百合继代培养鳞芽分化

Fig. 2 Multiplication culture of bulb seedling of *L. davidii* var. *unicolor*.

表 1 单芽与丛芽继代比较

Table 1 Differences of multiplication culture between clumpy buds and single bud.

项目 Item	总苗数(株) Total (Num)	成活数(率) Survival rate (%)	有效苗数(率) Available seedling (%)	鳞茎分化率 Multiplication rate	生长情况 Growth condition	继代周期(d) Multiplication period (d)
单芽继代 Single bud multiplication	155	119 (76.77%)	34 (22.08%)	1.0~1.5	长势弱 Growth weak	30~40
丛芽继代 Clumpy bud multiplication	181	181 (100%)	157 (86.74%)	3.0~5.0	鳞茎明显,较好 Bulb seedlings obviously, growth well	16~18

注:表中为 30 瓶培养材料的统计数据,每瓶 5~6 个材料。有效苗指小鳞茎成型且具叶片的幼苗。

Note: Statistic data for 30 bottles of samples, one bottle include 5~6 available samples. The available seedling is a bulb seedling having integrity leaf.

表 2 两种培养基继代培养比较

Table 2 Effect of different media to the multiplication culture.

培养基 Media	总苗数(株) Total (Num)	鳞茎苗数(率,%) Bulb seedling (rate, %)	单株平均生长高度(cm) Average growth height (cm)	继代周期(d) Multiplication period (d)
a	682	607 (89.00%)	8.12	16~18
d	921	613 (66.56%)	5.56	16~18

注:表中为 30 瓶培养材料的统计数据,每瓶 5~6 个材料。a 培养基是 MS,培养基是 MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA.

Note: Statistic data for 30 bottles of samples, one bottle include 5~6 available samples. a medium is MS, d is MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA.

2.3 生根及移栽

采用 a、e 培养基作为生根培养基都能很好地诱导上述各继代苗生根,但 e 培养的生根苗长势较好,小鳞茎的大小和外形均优于 a 培养基所培养的。生根培养需 15 d,在室外大棚开瓶见光炼苗(50%~70%自然光)培养 3 d,此 3 d 中,小鳞茎另外重新长出带有丰富纤维根的主根及侧根,1 cm 左右;再进行沙培 15 d,常规水分管理,此后,

苗长出丰富的根系(图 3),成活率达 95%,形成丛鳞茎生根苗(6~8 个小鳞茎)及单芽生根苗(2~3 个小鳞茎,此处与单芽继代苗对应),即可大田移栽。在大田移栽试验中,采用日平均温度为 5℃和 15℃两种移栽温度处理,结果成活率都可达 95%以上,若较长时间(>10 d)保持低于 5℃,苗叶片会枯黄,表现失活,但小鳞茎仍保持新鲜白色及丰富的根系。



图3 兰州百合生根组培苗

Fig. 3 Rooting plantlets of *L. davidii* var. *unicolor*.

3 讨论

本研究发现,兰州百合初代诱导时,其鳞片外植体在低温(5℃)储存一段时间有利于鳞芽分化,同时也能降低病菌感染,提高无菌材料的成功获得率。在自然的低温越冬季节,未低温冷藏的鳞片也能较好地诱导出鳞芽,这可能与其固有的生长周期有关。所以,兰州百合初代诱导培养有两种路线,其一,非冬季节可采用低温冷藏的方法,并且保持20~22℃的培养温度;其二,等到自然冬季进行初代培养,培养温度可在20~29℃;诱导成功便可进行高频继代繁殖,以表2的平均数为例,继代苗将以 $y = 165^{n \times 4.86}$ (n 为继代周期数, y 为继代苗数)的指数函数增长。本实验采用28~29℃高温培养以及丛芽继代,成功实现了短继代周期高分化率的培养路线,若采用单芽苗继代,除了生长差、继代周期长,在用接种刀进行单芽苗分离时也容易造成苗的损伤。在生根实验中的3 d开瓶炼苗培养,发现室内生长的根(几乎没有纤维根)慢慢失活,另外长出丰富的白色根系,同时,试验发现无根鳞茎苗和生根鳞茎苗移栽入大田20 d时,后者才保持生长活性,所以室内

生根(使用激素或其他条件)是为了让其生根的潜能表现出来,其生根本身可能发挥较小的生理作用,室外炼苗生根可充分发挥其生理作用。另外在预备生根实验中,免去沙培过程,其组培苗也表现出很好的生根生长。在移栽大田的实验中,丛芽生根苗移栽后,早期生根生长较好,但逐渐形成的小鳞茎非常集中,会引起部分小鳞茎生长缺乏营养,影响整株的生长,因此对生长1个月的丛芽生根苗进行分离处理后再种植(此处实质上已经是种植种球)具有较好的效果,其丛鳞茎中的单个鳞茎分离是其自然脱离分开,不会触及到损伤鳞茎组织。使用单芽生根苗移栽,其鳞茎不必再进行分离处理,未出现不良现象,成活率可达95%以上。大田移栽种植采用上述两种鳞茎苗都可,采用丛芽鳞茎苗,在数量上大幅度超过单芽苗,可节约用苗量,但需鳞茎分离过程。

参 考 文 献

- [1] 龙雅宜,张金政.百合属植物资源的保护与利用[J].植物资源与环境,1998,7(1):40-44.
- [2] 胡晓文,罗兆荣,喻晚之,等.食用百合的离体快繁研究[J].现代园艺,2006,12:7-8.
- [3] 马君义,赵小亮,张继,等.兰州百合的研究进展[J].塔里木大学学报,2005,17(4):53-56.
- [4] 孔宪武.兰州植物志[M].兰州:甘肃人民出版社,1958,220-221.
- [5] 郭福德.兰州百合[J].各地名产,1997,5:28.
- [6] 何纯莲,雷丽红,凌到晓.百合提取液对羧自由基的清除作用[J].光谱实验室,2003,20(1):102-104.
- [7] 陈银龙,赖小芳,王伯诚,等.食用百合的组培快繁技术[J].四川农业科技,2006,8:27-28.
- [8] 李谋智.食用百合组织培养快繁技术研究[J].北方园艺,2006,1:101-102.
- [9] 张伟华,刘清波,何欢.兰州百合的组织培养和快速繁殖[J].长春理工大学学报(高教版),2007,3(1):153-156.
- [10] 徐学军.兰州百合组培苗移栽成活率试验报告[J].甘肃科技,2005,21(5):173-174.
- [11] 王丽艳,梁国鲁,郭启高.兰州百合组培苗试管结鳞茎研究[J].北方园艺,2004,3:73.
- [12] 王丽艳,荆瑞勇.兰州百合与川百合试管苗结鳞茎研究[J].中国农村小康科技,2007,12:46-47.