

宜兴百合的组织培养和快速繁殖

谢 杰, 余沛涛, 王全喜

(上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘 要: 以组织培养获得的宜兴百合小鳞茎为试验材料, 研究了不同基本培养基、NAA 与 6-BA 的配比、矮壮素(CCC)、2,4-D、活性炭、蔗糖及悬浮培养方法对小鳞茎增殖和膨大的影响。结果表明, 最佳诱导培养基为 MS 培养基, 有利于提高分化率的最佳配方为: MS + 0.15 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA, 小鳞茎膨大增重的最佳培养基为: MS + 0.15 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L CCC + 6~8% 蔗糖, 培养方式为液体振荡培养优于固体培养。

关键词: 宜兴百合; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2006)05-0076-07

宜兴百合别名虎皮百合, 学名 *Lilium lancifolium* Thunb. 是我国 3 大食用百合(兰州百合、宜兴百合、龙牙百合)之一, 原产太湖一带的湖州和宜兴^[1]。该品种属卷丹类百合, 其风味独特, 鳞茎肉质肥厚, 不仅营养丰富, 而且具有良好的药效与保健功能^[2]。据医学记载, 百合具有润肺止咳, 清心安神, 消暑止渴的功效^[3], 还有升高白细胞的作用, 对多种癌症放、化疗后白细胞降低有较好疗效^[4]。有“太湖人参”的美誉^[5]。宜兴百合生产上常采用鳞茎繁殖法, 秋播第二年收获^[6], 繁殖系数低、速度慢。种植历史较长, 范围广, 植株在不同程度上受到蚜虫侵害, 导致其种性退化, 产量、品质下降, 不能满足市场需求。同时, 研究百合组培快繁技术是培育脱毒百合的基础^[7]。有关百合的组织培养技术国内外已有不少报道, 试验材料大多数是观赏百合, 食用百合报道不多, 宜兴百合几乎未见有组织培养的报道, 快繁方法主要是增大其繁殖系数, 鳞茎膨大方面研究较少。针对这些问题, 我们选用药食兼用的宜兴百合为实验材料, 采用组织培养方法进行规模化繁殖, 并在矮壮素(2-氯乙基三甲基氯化铵, CCC)方面做了进一步研究, 既能增大其繁殖系数, 又能在重量方面有所提高。

1 材料与方法

1.1 材料

宜兴百合, 产于江苏宜兴。

1.2 实验方法

1.2.1 消毒和接种

将鳞茎球分离成鳞片, 用洗衣粉或洗洁精洗 2 遍, 用软毛刷刷净上面的泥土后用自来水冲洗 4~5h, 在超净台上用 70% 的酒精浸泡 1min, 然后投入 10% 的升汞溶液中消毒 20min 左右, 再用无菌水漂洗 4~6 次, 接种于基本培养基上。

收稿日期: 2006-05-21

作者简介: 谢杰(1981-), 女, 上海师范大学生命与环境科学学院硕士研究生; 余沛涛(1946-), 男, 上海师范大学生命与环境科学学院副教授。

1.2.2 培养条件

基本培养基用 MS 和 1/2MS,然后附加不同浓度的激素,培养基中均加 3% 的蔗糖(除 1.3.3.6 蔗糖浓度对小鳞茎增殖膨大的作用实验),0.6% 的琼脂,pH = 5.8,光照强度 2500 lx,光照时间 10h/d,温度 25 ± 2℃.

1.2.3 培养基及添加物的选取实验

- (1) 诱导鳞片增殖的基本培养基选择实验: (1) MS; (2) 1/2MS.
- (2) 继代增殖培养基中添加激素实验(单位:mg/L):基本培养基采用 MS 培养基,用 NAA 与 6-BA 进行正交实验,浓度配比设计见表 1.

表 1 基本培养基中 NAA 和 6-BA 的正交设计

6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)				
	0	0.05	0.10	0.15	0.20
0	(1)	(7)	(13)	(19)	(25)
0.1	(2)	(8)	(14)	(20)	(26)
0.5	(3)	(9)	(15)	(21)	(27)
1.0	(4)	(10)	(16)	(22)	(28)
2.0	(5)	(11)	(17)	(23)	(29)
3.0	(6)	(12)	(18)	(24)	(30)

从实验(2)中选出最佳的组合做为进一步实验的基本培养基

- (3) 矮壮素(CCC)对小鳞茎增殖膨大的作用. 基本培养基用 MS + NAA0.15 + 6-BA2.0,MS 培养基作为对照,CCC 浓度为:0,0.05,0.1,0.5,1.0,5.0(单位:mg/L).
- (4) 2,4 - D 对小鳞茎增殖膨大的作用. 基本培养基用 MS + NAA0.15 + 6-BA2.0,2,4 - D 浓度为:0,0.05,0.5,1.0,2.0(单位:mg/L).
- (5) 活性炭对小鳞茎增殖膨大的作用. 基本培养基用 MS + NAA0.15 + 6-BA2.0,活性炭的浓度为:0,400(单位:mg/L).
- (6) 蔗糖浓度对小鳞茎增殖膨大的作用. 基本培养基用 MS + NAA0.15 + 6-BA2.0,蔗糖浓度分别为:0,20,40,60,80,100,120(单位:g/L).
- (7) 液体悬浮培养对小鳞茎增殖膨大的作用. 在固态培养实验的基础上,进一步使用液体培养的方法进行比较,液体悬浮培养使用的培养基分别为:MS;MS + 6-BA2.0 + NAA0.15;MS + 6-BA2.0 + NAA0.15 + KT0.5;N6;MS + NAA0.15 + 6-BA2.0 + CCC0.1(单位:mg/L),转速:155 ± 3 转/分;温度:25 ± 2℃;光照强度:2500lx;蔗糖:70g/L;不加琼脂.

2 结果与分析

2.1 百合鳞片上小鳞茎的诱导

在宜兴百合离体培养过程中,百合鳞片诱导产生小鳞片基本是在接种 20d 左右开始,鳞片基部分化出肉眼可见的针状小突起,30d 左右发育成球状的可见鳞片的小鳞茎.小鳞茎形成较多的部位在鳞片的近轴面和鳞片中段、内质比较肥厚的部位,开始一般出现在鳞片内表面的两侧,然后内侧面中部开始生长.在 20d 左右的时候,一个发生点上可以形成 1~3 个不等的小鳞茎.在一块鳞片中,其中部的小鳞茎生长速度相对比两头分化的小鳞茎发育快,数量也较两头多.最外层鳞片由于老化,活力不强,有的有损伤,易污染,不宜用于接种;最内层鳞片太幼嫩,诱导率低,也不易产生小鳞茎;第 3~4 层鳞片肉质厚,生长势强,产生小鳞茎也较多、较快.

当小鳞茎长到直径 0.5cm 大小时,将其轻轻剥离,置入增殖培养基继续培养,把原来的鳞片又转到新鲜的诱导培养基上继续诱导小鳞茎,小鳞茎还会在其他部位产生新的小鳞茎,整个生长周期可以延续

5~6 个月.但随着培养时间增长,分化能力逐渐减弱,小鳞茎长势也比前期分化的弱.小鳞茎在继代培养 30d 左右可增殖 2~3 倍.开始是在鳞茎基部产生小鳞片,40d 左右小鳞茎长大,周围又会形成 2~3 个丛鳞茎,原来的小鳞茎慢慢抽出新芽,长出细根,然后形成小植株.

表 2 可以看出,小鳞茎的诱导基本培养基以 MS 为好,无论生长速度还是诱导率均明显优于 1/2MS,但 1/2MS 的生根数比 MS 的要多,根也较长,因此 1/2MS 适宜做生根培养基.

表 2 不同基本培养基对宜兴百合分化的作用

出现小鳞茎时间(d)		30d 记录的数据				备注
		接种数	总芽数	出芽率(%)	长根率(%)	
MS	15	12	38	317	134	出芽较多,苗长绿,粗壮,根较少
1/2MS	21	12	24	200	182	出芽较少,苗细而短,根较多且长

注:出芽率=30d 后的总出芽数/接种数×100%;长根率=30d 后的长根数/接种数×100%

2.2 不同激素浓度对比对产生小鳞茎的作用

基本培养基选用 MS.在百合组织培养中,小鳞茎的诱导和增殖与激素浓度配比有很大的关系,合理的激素浓度配比会提高小鳞茎的诱导率和增值率,而且小鳞茎长势也比较好;否则反之.从表 3 结果可见,小鳞茎的诱导以 23 号培养基(MS+0.15mg/LNAA+2.0mg/L6-BA)诱导系数最高,60d 时为 858%,且小鳞茎发生早,周期短,芽长势旺盛.其次为 9 号和 15 号培养基,诱导率分别为 761%和 755%.

表 3 不同激素浓度对比对诱导增殖百合小鳞茎的作用

序 列 号	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	接 种 数	天 数								
				20			40			60		
				出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)
1	0	0	12	138	131	112	255	227	134	567	406	207
2	0	0.1	12	155	144	120	287	244	155	585	375	224
3	0	0.5	12	202	162	134	346	317	183	612	467	240
4	0	1.0	12	184	169	160	380	331	248	534	419	306
5	0	2.0	12	173	158	141	355	348	261	500	444	354
6	0	3.0	12	140	127	140	273	216	189	425	386	226
7	0.05	0	12	165	140	121	243	200	168	511	385	234
8	0.05	0.1	12	192	158	134	358	225	204	625	346	267
9	0.05	0.5	12	275	217	157	427	358	267	761	612	311
10	0.05	1.0	12	286	250	160	434	389	300	690	486	346
11	0.05	2.0	12	242	192	204	350	233	284	627	361	297
12	0.05	3.0	12	200	167	172	250	225	242	583	349	292
13	0.1	0	12	166	137	138	248	204	185	534	260	247
14	0.1	0.1	11	156	136	169	255	200	209	627	316	310
15	0.1	0.5	11	182	146	192	333	173	242	755	300	368
16	0.1	1.0	11	155	136	227	246	164	317	636	277	400
17	0.1	2.0	11	146	127	215	236	146	310	491	258	376
18	0.1	3.0	11	136	122	186	200	200	266	446	358	348
19	0.15	0	12	186	141	108	249	154	119	500	207	141
20	0.15	0.1	12	183	150	109	311	177	130	525	233	172

(续表)

序 列 号	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	接 种 数	天 数								
				20			40			60		
				出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)
21	0.15	0.5	12	200	167	115	333	217	155	625	325	223
22	0.15	1.0	12	233	192	132	350	247	210	675	438	285
23	0.15	2.0	12	264	232	117	428	365	156	858	542	212
24	0.15	3.0	12	212	200	125	362	205	174	517	410	232
25	0.2	0	12	188	150	136	259	200	160	490	355	210
26	0.2	0.1	12	164	155	155	267	208	182	497	346	228
27	0.2	0.5	12	183	164	190	275	234	206	525	411	301
28	0.2	1.0	14	167	133	184	357	218	209	618	555	338
29	0.2	2.0	12	136	121	163	286	200	180	547	480	276
30	0.2	3.0	12	133	117	167	285	191	172	492	424	224

注: 出芽率和长根率同表 2; 出苗率 = Nd 后的出苗数/接种数 $\times 100\%$;

下面的实验均选用 23 号培养基 (MS + 0.15mg/LNAA + 2.0mg/L6-BA) 作为基本培养基。

2.3 矮壮素 (CCC) 对小鳞茎膨大的作用

室内百合快繁得到的小鳞茎数目多, 但跟野生相比, 形态较小, 每个鳞茎的质量也不如野生的好, 矮壮素能抑制植物的生长及节间长度, 在适当的浓度下既可矮化植株, 提高座果率, 促进作物长得粗而矮壮, 同时也能使叶片增厚, 叶绿素含量增加, 光合作用能力增强。因此我们在培养基中加入不同浓度的矮壮素, 探索矮壮素对小鳞茎膨大的影响。通过实验发现, 小鳞茎膨大的最佳培养基为 3 号培养基 (MS + NAA0.15 + 6-BA2.0 + CCC0.1), 2 个月后平均每个小鳞茎质量增重 28.85 克, 比野生单个小鳞茎重 12.18g。

表 4 矮壮素对小鳞茎膨大的作用

序 列 号	CCC (mg/L)	接 种 数	天 数											
			20				40				60			
			出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm
1	0	12	200	167	117	3.64	350	267	156	8.15	858	358	212	15.12
2	0.05	8	188	158	150	4.15	355	258	184	8.98	819	446	265	18.79
3	0.1	9	232	184	222	5.08	484	346	417	13.46	948	734	578	28.85
4	0.5	10	170	150	160	4.71	308	306	238	9.35	688	612	407	19.27
5	1.0	10	150	140	120	4.93	318	273	163	9.88	706	454	224	20.16
6	5.0	8	153	155	131	4.27	347	311	174	8.97	857	532	236	18.68

注: 出芽率、出苗率、长根率同表 3; $\Delta m = (Nd$ 后小鳞茎总重量 - 接种时小鳞茎总重量) / 接种数

2.4 2,4-D 对小鳞茎膨大的作用

从表 5 可以看出, 各小组重量增量差别不大, 说明 2,4-D 对小鳞茎的增重无显著作用, 但低浓度的 2,4-D 对出芽和出苗有一定的促进作用, 当 2,4-D 为 0.5mg/L 时长根较好, 根较长且须根较多。

表 5 2,4-D 对小鳞茎膨大的作用

序 列 号	2,4-D (mg/L)	接 种 数	天 数											
			20				40				60			
			出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm
1	0	12	200	167	117	3.64	350	267	156	8.15	858	358	212	15.12
2	0.05	10	275	164	117	3.92	383	275	142	8.09	874	312	204	15.68
3	0.5	10	150	150	150	3.38	217	183	167	7.56	743	298	256	14.35
4	1.0	10	156	156	122	3.44	211	133	144	7.64	717	249	197	14.49
5	2.0	10	154	146	115	3.49	215	123	131	7.73	665	202	174	14.55

注:出芽率、出苗率、长根率和 Δm 同表 4.

2.5 活性炭对小鳞茎膨大的作用

活性炭具有一定的吸附作用,可以除去培养基中的杂质,但也会在一定程度上吸附培养基中的营养物质,同时使培养基中的鳞茎所接受到的光照强度减少. 培养基中加入 400mg/L 的活性炭,结果如表 6 所示,在 60d 时,可以看出,加了活性炭的重量略微有增大,比对照组多 0.82g,出芽率和长根率都比对照组稍高,但出苗率不如对照组.

表 6 活性炭对小鳞茎膨大的作用

活性炭 (mg/L)	接 种 数	天 数											
		20				40				60			
		出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm
0	12	200	167	117	3.64	350	267	156	8.15	858	358	212	15.12
400	12	227	171	115	4.11	362	287	189	8.76	882	287	332	15.94

注:出芽率、出苗率、长根率和 Δm 同表 4.

2.6 蔗糖浓度对小鳞茎膨大的作用

从表 7 可以看出,蔗糖对小鳞茎增重有较好的作用,鳞茎增重的最适蔗糖浓度为 6%~8%,在同一状态的培养基中,蔗糖浓度对增重有促进作用,因为蔗糖是组织培养中碳素和能量的主要能源,高浓度的蔗糖能促进鳞茎的形成和鳞片的增厚,从而使鳞茎增重,但浓度过高(10%以上)会使培养基渗透压增大,对幼嫩的小鳞茎造成伤害,所以促进作用不明显.

表 7 蔗糖浓度对小鳞茎膨大的作用

序 列 号	蔗糖 (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁) (mg/L)	接 种 数	天 数											
			20				40				60			
			出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm	出芽率 (%)	出苗率 (%)	长根率 (%)	Δm
1	0	12	136	136	111	2.86	218	206	133	5.69	584	379	191	10.11
2	20	12	185	145	114	3.24	258	248	146	6.35	618	418	212	13.84
3	40	12	237	189	126	3.97	355	288	167	8.73	705	496	234	18.78
4	60	12	286	232	155	5.42	472	334	187	12.34	811	614	368	28.55
5	80	12	298	240	156	5.28	401	307	181	11.45	800	589	326	24.66
6	100	12	162	158	144	4.12	334	276	155	7.94	725	480	314	19.15
7	120	12	140	122	128	2.56	286	212	138	5.80	646	404	255	13.70

注:出芽率、出苗率、长根率和 Δm 同表 4.

2.7 液体悬浮培养对小鳞茎膨大的作用

由表 8 可以看出,在五种液体培养基中,5 号培养基(MS + NAA0.15 + 6-BA2.0 + CCC0.1)中的小鳞茎生长最快,出芽率,出苗率,长根率和重量均比其他几种培养基中的要好,芽,苗和根的长势也较好.与同样浓度的固体培养基相比,明显好于固体培养基,液体振荡培养能保证养分和气体的充分交换,对小鳞茎迅速增大十分有利.

表 8 液体悬浮培养对小鳞茎膨大的作用

序 列 号	蔗糖 (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁) (mg/L)	接 种 数	天 数											
			20				40				60			
			出 芽 率	出 苗 率	长 根 率	Δ m	出 芽 率	出 苗 率	长 根 率	Δ m	出 芽 率	出 苗 率	长 根 率	Δ m
			(%)	(%)	(%)		(%)	(%)	(%)		(%)	(%)	(%)	
1	MS	12	188	171	112	2.96	265	247	154	8.08	767	426	237	13.66
2	MS + NAA0.15 + 6-BA2.0	12	264	208	139	5.22	484	410	226	14.67	1124	577	386	23.45
3	MS + NAA0.15 + 6-BA2.0 + KT0.5	12	205	188	151	3.50	334	341	176	11.08	930	495	304	17.29
4	N6	12	234	173	162	3.88	356	328	184	12.12	960	505	334	18.00
5	MS + NAA0.15 + 6-BA2.0 + CCC0.1	12	358	346	221	8.36	684	736	355	20.36	1485	841	624	41.50

注:出芽率、出苗率、长根率和 Δm 同表 4.

通过对外植体诱导小鳞茎的基本培养基(MS,1/2MS)进行了对比分析,发现 MS 培养基比 1/2MS 培养基诱导速度快,芽,苗的长势都优于 1/2MS,但 1/2MS 的长根情况比 MS 的要好.在小鳞茎的增殖培养中,最佳浓度的培养基为 MS + 0.15mg/LNAA + 2.0mg/L6-BA,这与卢其能(2002)报道的龙牙百合^[8],赵兴兵(2001)报道的兰州百合^[9]等其他食用百合的快速繁殖在激素浓度上有所不同,可能由于不同百合品种内源激素水平不同,其分化能力有一定差异所致.在小鳞茎膨大实验中,0.1mg/LCCC 对小鳞茎增重作用明显;2,4-D 对小鳞茎膨大无明显作用,但低浓度的 2,4-D 对出芽和出苗有轻微促进作用;加入 400mg/L 活性炭后与对照组相比,小鳞茎重量有略微增大,出芽和长根都比对照组高一些,但出苗率较低;蔗糖对小鳞茎膨大的影响也较大,6%~8%的蔗糖使鳞茎重量为对照的 2.4~2.8 倍;相对于固态培养,液体振荡培养使小鳞茎更能充分的接触到培养基,养分与气体的交换也较快,繁殖最快且增重最多的液体培养基是 MS + 0.15mg/LNAA + 2.0mg/L6-BA + 0.1mg/LCCC,60d 是对照组的 3 倍,是同激素浓度固态培养基的 1.44 倍.

3 讨 论

野生宜兴百合繁殖,一般每 0.66hm² 产 600~800Kg. 本实验通过对宜兴百合试管快速繁殖的研究,2 个月平均每个小鳞茎增重 28.85g,比野生单个小鳞茎重 12.18g. 一年内单个鳞片繁殖出的鳞茎总量为 28.85×6=173.1g,平均比野生单个增重 73.1g,提高了(73.1/100)×100%=73.1%,而通过液体悬浮培养,一年内单个鳞片繁殖出的鳞茎重量为 249g,比野生的多 149g,提高了(149/100)×100%=149%,因此,通过组织培养技术,能大大提高宜兴百合的生长量. 组培百合在品质与有效成分方面是否与野生百合相同,也将成为以后研究的主要内容. 找到适合小鳞茎快速繁殖及膨大的最适激素浓度和培养条件,对宜兴百合的大规模产业化种植有着重要而深远的意义.

参考文献:

- [1] 柴春燕,胡东旭. 宜兴百合特性及高产栽培技术[J]. 广西园艺,2003(3):24-25.
- [2] 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.
- [3] 郭朝晖,蒋生祥. 中药百合的研究和应用[J]. 中医药学报,2004,32(3):27-29.
- [4] YOSHIHIRO M, YUTAKA S. Steroidal saponins and alkaloids from the bulbs of *Lilium brownii* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(7):2267-2277.
- [5] 寿南山. 亦蔬亦药话百合[J]. 山东食品科技,2004,(11):20-21.
- [6] 刘峻蓉. 食用百合栽培技术[J]. 北方园艺,2005,(1):26-27.
- [7] 席梦利,王节萍,章静娟. 宜兴百合脱毒技术[J]. 江苏农业学报,2001,17(1):49-51.
- [8] 卢其能. 龙牙百合的组织培养和快速繁殖的研究[J]. 江西农业学报,2002,14(4):43-46.
- [9] 赵兴兵,袁正仿,张苏峰. 兰州百合的离体快速繁殖研究[J]. 信阳师范学院学报,2001,14(3):319-321.

Tissue culture and rapid propagation of *Lilium lancifolium* Thunb.

XIE Jie, YU Pei-tao, WANG Quan-xi

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: The reproduction and extension of bulblets of lily was tested by the way of tissue culture. The effects of the different medium, the combination of NAA and 6-BA, the chlormequat (CCC), the 2,4-D, the active carbon, the Sucrose and the methods of Suspension culture were studied in the tests. The results showed that MS medium was the most appropriate basic medium for inducement of bulblets. The best medium for the scale of lily to reproduction and extension was MS + 0.15mg/L NAA + 0.20mg/L 6-BA, the most appropriate medium for adding weight of bulblets of lily was MS + 0.15mg/L NAA + 2.0mg/L 6-BA + 1.0mg/L CCC + 6-8% Sucrose. The method of suspension culture was better than that of solide culture.

Key words: *Lilium lancifolium* Thunb.; tissue culture; rapid propagation

(责任编辑:吴 澄)