

文章编号:1000-2286(2007)06-0953-04

# 龙牙百合茎尖脱毒快繁及种球培育技术

江洪如,余发新,朱 祺,高 柱,刘腾云,王碧琴,周 华,王小玲

(江西省科学院 生物资源研究所,江西 南昌 330029)

**摘要:**当龙牙百合鳞茎在 58 ℃ 下处理 10~20 min, 再在 40 ℃ 下处理 72 h; 茎尖大小为 0.2~0.4 mm 时的诱导成活率达 60%~66.7%。继代增殖培养基为 MS+1.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 时,其增殖系数是 3.36。培养基中 4.5%~5.5% 的食用糖和 60 d 的培养时间利于鳞茎数量和质量的增加。移栽后的小鳞茎培育 8 个月可达鲜重 22 g/个以上的脱毒种球。

**关键词:**龙牙百合;茎尖脱毒;快速繁殖;种球培育

中图分类号:S644.103.6 文献标识码:A

## Studies on in Vitro Virus-free Propagation by Shoot-tip and Bulb Culture of Longya Lilium

JIANG Hong-ru, YU Fa-xin, ZHU Qi, GAO Zhu, LIU Teng-yun,  
WANG Bi-qin, ZHOU Hua, WANG Xiao-ling

(Institution of Biological Resources, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330029, China)

**Abstract:** Longya lilium bullets were first treated at 58 ℃ for 10~20 minutes then at 38 ℃ for 72 h. The survival ratio with shoot-tip of 0.2~0.4 mm was 60.0%~66.7%. The repropagating coefficient of bulb was 3.36 when a medium for continual culture was MS+1.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA. The quantity and quality of bullet would be increased with a media added with 4.5%~5.5% sugar and cultured for 60 days. Each transplanted bulb could become virus-free bullet which weighed more than 22 g after 8 months' cultivation.

**Key words:** Longya lilium; virus-free by shoot-tip; in vitro propagation; bulb culture

龙牙百合(*Lilium brownii* var. *viridulum* Baker)是我国名、特、优蔬菜,并具有多种药效,是集食、药兼用的食品,深受国内外市场欢迎。龙牙百合历代以球茎进行无性繁殖,从而导致品种退化,病毒病蔓延。采用茎尖脱毒组培快繁可使品种复壮,也是目前脱去病毒病唯一有效的方法。有关龙牙百合茎尖脱毒及组培快繁<sup>[1-4]</sup>等方面的研究不少,但多是有关鳞片组织培养的报道,而有关龙牙百合茎尖脱毒组培快繁及培育达标农用种球报道少见。本文报道了龙牙百合茎尖脱毒、组培快繁及脱毒种苗移栽培育 8 个月,获得平均单个鲜重 22 g 以上的达标农用种球的技术研究,旨在为规模化繁殖脱毒龙牙百合种苗、种球生产奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

本试验以江西万载龙牙百合鳞茎为材料。

收稿日期:2007-06-26 修回日期:2007-07-12

基金项目:国家科技部农业科技成果转化资金项目(2004360120581)

作者简介:江洪如(1948-),女,研究员,主要从事生物技术研究,E-mail: jhr586@126.com。

## 1.2 试验地点

在江西省科学院植物良种研发基地(高安祥符)进行。

## 1.3 试验方法

**1.3.1 外植体处理方法** 选取龙牙百合鳞茎洗净,剥去外鳞片,使鳞茎直径为 1.5 cm 左右,于(58 ± 1) °C 温箱中分别处理 10, 20, 30 min; 再在(38 ± 1) °C 温箱中处理 72 h, 取出后,用无菌水冲洗 4 ~ 5 次; 于 φ = 70% 酒精浸泡 30 s, 无菌水冲 3 ~ 4 次; 再用 1 g/LHgCl<sub>2</sub> 处理 10 ~ 20 min, 无菌水冲洗 4 ~ 5 次; 双筒显微镜下剥离出 0.2 ~ 0.4 mm 茎尖, 并迅速接种到诱导分化培养基中。

**1.3.2 培养方法** 基本培养基为 MS, 附加不同的植物激素, 培养温度(25 ± 2) °C, 光照强度 1 500 lx, 光照时间 11 h/d。琼脂条 6 g/L, 食用蔗糖 35 ~ 75 g/L(产地: 广西柳州), 调 pH 值至 5.7 ~ 5.8, 茎尖诱导每瓶 3 个材料, 芽苗分化、生根试验平均 5 瓶 1 个处理, 每瓶 10 个材料。

**1.3.3 种苗栽培方法** 种苗移栽地每公顷施干猪粪( $m_{\text{湿}}: m_{\text{干}} = 3: 1$ ) 10 500 kg、磷肥 750 kg、复合肥 375 kg、石灰 750 kg 作基肥, 整地时将基肥与土混匀, 然后作畦、畦宽 90 cm。脱毒龙牙百合苗移栽前打开瓶盖炼苗 1 d, 洗去根上琼脂, 然后按 8 cm × 25 cm 的株行距直接移入大棚畦地, 在不同生长期间分别追施氮、磷、钾肥。

## 2 结果与分析

### 2.1 茎尖脱毒与培养

把大小为 0.1 cm 的茎尖作为脱毒材料是较安全的, 因其本身一般不带病毒, 但剥离操作及诱导培养难度大; 而茎尖在 0.2 ~ 0.4 cm 大小时较好操作, 但不够安全。由于植物组织中的病毒粒子在高于正常的温度下, 其组织中很多病毒可被部分或完全纯化, 而且热处理温度越高、时间越长、纯化效果越好, 但反过来一般又容易伤害植物组织<sup>[5]</sup>, 难以获得所需的材料(表 1)。

表 1 热处理时间对茎尖培养的影响

Tab.1 Effects of the time of heat - condiction on shoot - tip cultivation

热处理时间		茎尖接 种数/个	愈伤组 织数/块	褐化 数/个	诱导 率/%
58 °C 处理时间/min	38 °C 处理时间/h				
10	72	15	10	5	66.67
20	72	15	9	6	60.00
30	72	15	7	8	46.70

注: 培养基为表 2 中 3 号; 污染数除外。

从表 1 可以看出, 茎尖在(58 ± 1) °C 温箱中先处理 30 min, 后在 38 °C 温箱中处理 72 h, 培养时褐化程度较重, 诱导率只有 46.7%, 20 min 的处理为 60%, 在温箱中处理 10 min, 茎尖诱导率为 66.7%。可见高于正常温度的热处理, 随着处理时间的增加, 植物组织的受害程度加重。茎尖在加有不同的激素的培养基中, 15 d 开始均有浅黄色愈伤组织发生, 不同激素的诱导结果表明, 在 BA 0.2 ~ 1.0 mg/L、NAA 0.1 mg/L 时, 添加 2, 4 - D 1.0 ~ 1.5 mg/L, 对茎尖愈伤组织的诱导生长和小鳞茎的分化可起到很好的效果, 愈伤组织率均达到 100%, 并且长势较快。当愈伤组织长至 30 d 时, 表面有淡绿色小突起, 继续培养至 70 d 左右, 表面的绿色突起形成多个肉眼可见的小鳞茎, 并逐渐长大(图 1)。不加 2, 4 - D 的 1 号培养基, 浅黄色愈伤组织生长相当缓慢, 经培养 60 ~ 70 d 时, 可见芽发生, 并逐渐伸长形成芽苗(表 2)。这些由茎尖培养获得的芽苗, 经由电镜、A - 蛋白酶联免疫吸附法检测表明, 脱毒率为 100%。



图 1 茎尖诱导的愈伤组织分化芽  
Fig.1 Bud of induction by shoot-tip

### 2.2 鳞茎的继代与增殖

由表 3 可知, 当 NAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时, BA 的质量浓度升高, 繁殖系数增加; 当 BA 质量浓度升至 2 mg/L 时, 繁殖系数却下降, 同时 NAA 质量浓度增加, 对增殖也略有影响。

作为碳来源的糖的浓度对鳞茎形成有一定的影响。试验表明, 糖质量浓度增加, 增殖系数增加明显, 但

当糖质量浓度增加到 55 g/L 以上时,鳞茎增殖系数变化不明显,甚至有所下降;而鳞茎个体却随着糖质量浓度增加而增大。同时培养 60 d 的鳞茎直径日增长量均大于培养 30 d 的鳞茎增长量,这可能是鳞茎的增长对养分的吸收、贮存、转化在 30 d 以后达到较高值(表 4)。

表 2 不同激素质量浓度对茎尖培养的影响

Tab. 2 Effects of concentrations of incretion on shoot - tip cultivation

培养号	激素质量浓度/mg · L <sup>-1</sup>			接种数/个	分化形成的芽数/个	分化率/%
	BA	NAA	2,4-D			
1	0.2	0.15		15	11	73.33
2	0.2	0.1	1.0	15	21	140.0
3	1.0	0.1	1.5	15	46	306.67

表 3 不同激素质量浓度对鳞茎增殖的影响

Tab. 3 Effects of concentrations of incretion on multiplication of bulb

培养号	激素质量浓度/mg · L <sup>-1</sup>		种数/个	培养后个数/个	增殖系数/%
	BA	NAA			
1	0.5	0.1	50	87	1.74
2	1.0	0.1	50	176	3.52
3	1.0	0.25	50	146	2.92
4	2.0	0.1	50	109	2.18

表 4 不同糖质量浓度和培养时间对鳞茎形成的影响

Tab. 4 Effects of concentrations of sugar and time of cultivation on growth of bulb

糖质量浓度/g · L <sup>-1</sup>	培养时间/d	增殖系数	接种鳞茎直径/mm	培养鳞茎直径/mm	生长速率/mm · d <sup>-1</sup>
35	30	1.13	3.13	4.16	0.034
	60	2.76		5.81	0.045
45	30	1.38	3.19	4.23	0.035
	60	3.36		6.35	0.053
55	30	1.32	3.08	4.19	0.037
	60	3.10		6.62	0.059
75	30	1.07	3.27	4.64	0.046
	60	2.93		7.08	0.064

注:鳞茎直径生长速率=(培养后鳞茎直径-接种时鳞茎直径)/培养时间。

### 2.3 脱毒试管苗生根与移栽

龙牙百合试管苗生根较容易,在添加有适宜浓度生长素的培养基中均能达到 98% ~ 100% 的生根率。但笔者在比较了几种生根培养基的生根率及根的生物特点后,认为 1/2MS + NAA 0.2 ~ 0.3 mg/L 是最佳生根培养基。在此培养基中,7 ~ 10 d 始发根,20 ~ 25 d 根出齐,生根率 100%,这时根长 1 ~ 2 cm,较粗壮,黄白色,根数 4 ~ 10 根左右,非常有利于苗的移栽及成活(表 5)。

表 5 培养基成分对试管苗生根的影响

Tab. 5 Effects of different medium on the tube - shoot rooting induction

培养基/mg · L <sup>-1</sup>	生根率/%	根的特点
MS + NAA 0.5 + AC(φ=0.1%)	98	根长 3 cm 以上,根数 2 ~ 4 根,根白嫩
1/2MS + NAA 0.5 + AC(φ=0.1%)	100	根长 3 cm 以上,根数 2 ~ 4,根白嫩
1/2MS + NAA 0.2 ~ 0.3	100	根长 1 ~ 2 cm,根数 4 ~ 10 以上,较粗壮
1/2MS + IBA 0.1 ~ 0.3	100	根长 1 cm 左右,根数多,较细嫩

注:培养天数为 25 d。

将洗净根部琼脂的脱毒试管苗,接 8 cm × 25 cm 的株行距规格直接移栽于大棚土中,栽时小鳞茎离土表 1.5 ~ 2 cm 即可。栽完后,轻浇水,使苗根系与土壤结合。30 d 后,移栽苗生出新根,逐渐扎于土中,并有新叶生出(图 2)。温度对苗的移栽影响很大,试验结果表明,在自然气候条件下,从当年的 10 月至翌年的 2 月,大棚温度较利于苗的移栽,并且 1 次性移入土中,只要注意保湿、保温,成活率平均可达到 96%。



图 2 移栽的脱毒试管苗  
Fig. 2 Transplanted virus-free bullets

## 2.4 脱毒种球的培养管理

试管小鳞茎移栽土中 30 d 后,有新根生出,并且地上抽出 1~2 片新叶,这时可喷洒 2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5 kg/hm<sup>2</sup>,以促进小鳞茎的扎根;小鳞茎生长到第 3~4 个月时,叶片生长迅速、加宽加厚,分别追施 22.5 kg/hm<sup>2</sup> 复合肥 + 75 kg/hm<sup>2</sup> 尿素;第 5 个月中耕锄草、培土 1 次,并追施 300 kg/hm<sup>2</sup> 复合肥 + 腐熟饼肥 450 kg/hm<sup>2</sup>,以促进鳞茎增大。如在 5、6 月,要用灭蚜松乳剂 1 000~1 500 倍喷洒防治蚜虫,小鳞茎经过 8 个月的生长,可达到鲜重 22 g/个的重量,重的有 30~35 g/个以上,达到农用种球标准(图 3)。种球个体较高,色泽白,品质得到恢复。

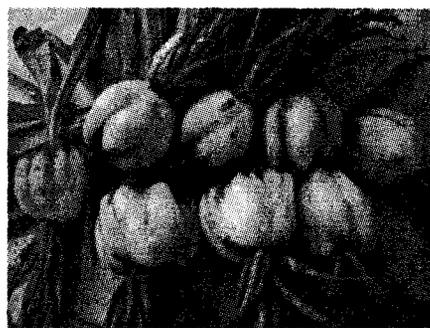


图 3 培育 8 个月的脱毒种球  
Fig.3 Virus-free bulbs cultured for 8 months

## 3 讨论与小结

(1) 茎尖生长点在 0.1 mm 时,一般不带病毒粒子,但是剥离技术要求高,而且越小也越难诱导培养。茎尖大小为 0.2~0.4 mm 时,不带或携带的病毒粒子较少,也相对较好操作与培养,同时结合热处理,使病毒粒子得到钝化<sup>[5]</sup>,提高了脱毒效果。试验证明,外植体在 58 °C 温箱中处理 10~20 min,再在 38 °C 温度下热处理 72 h,结合 0.2~0.4 mm 大小的茎尖培养,可获得完全脱去 4 种主要危害百合的病毒粒子,即:百合无症病毒、百合花叶病毒、黄瓜花叶病毒和百合斑驳病毒。

(2) 作为碳源的糖的质量浓度对鳞茎的增殖与增重影响较大。糖是鳞茎生长、贮存、转化能量的物质,随着鳞茎个体的增大,需要吸收一定的能量进行转化;但高浓度的糖,却对鳞茎的增殖不明显。甚至由于含有高浓度糖的培养基较易发生硬化,影响鳞茎吸收养分,同时使得培养基中的渗透压增高,易对分化形成的小鳞茎细胞组织产生伤害,从而影响了增殖系数。30 d 和 60 d 的培养时间对小鳞茎个体增大对比试验表明,后 30 d 的小鳞茎日生长量较大。因此,笔者认为采用 45 g/L 的食用糖、培养 60 d 可收到既增殖又增重的效果,同时还节约了糖的成本,利于规模化生产。

(3) 经过几年的摸索,试管鳞茎苗要培育成单个鲜重 22 g 以上的农用达标种球:首先,试管苗根系要健壮,鳞茎要实,而且土质应疏松,土壤颗粒要越小越好,这样利于移栽成活;其次,脱毒种球培育,肥料是关键,不仅要打好基肥基础,而且追肥不能少,尤其是苗和鳞茎生长旺盛的两个时期,一定要定量追施肥料;再次,脱毒种球最好在有防虫网的棚内进行,并严格控制防蚜。获得的原种脱毒种球经生产使用,未发现病毒病感染现象,且表现出苗率高、生长旺盛、商品鳞茎个体高、品质好等特征。但脱毒原种球经用户自行留种繁殖 2~3 代后,应进行更新换种,以保证脱毒良种的效果。

### 参考文献:

- [1] 万勇, 王凌华, 黄永萍, 等. 万载百合组织培养快速繁殖的研究[J]. 江西农业学报, 2000, 12(4): 26-29.
- [2] 罗丽萍, 杨柏云, 蔡奇英, 等. 龙牙百合的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 527-528.
- [3] 杭玲, 苏宾, 陈丽新, 等. 龙牙百合组培快繁技术研究[J]. 广西农业科学, 2001(4): 183-184.
- [4] 卢其能. 龙牙百合的组织培养和快速繁殖研究[J]. 江西农业学报, 2002, 14(4): 43-46.
- [5] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 234-235.