Botanical Research 植物学研究, 2015, 4, 8-15
Published Online January 2015 in Hans. http://www.hanspub.org/journal/br
http://dx.doi.org/10.12677/br.2015.41002

Research on Tissue Culture of *Lilium taliense* Franch.

Ning Shu, Wenjing Zhan, Yanni Liu, Guofeng Liu*

Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan Hubei
Email: *gfliu@mail.hzau.edu.cn

Received: Dec. 17th, 2014; accepted: Jan. 6th, 2015; published: Jan. 20th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Open Access

Abstract

Rapid propagation protocol of *Lilium taliense* Franch. by *in vitro* tissue culture was investigated. The results indicated that plant regeneration can be obtained from the bulb scales of *L. taliense* and a rapid propagation system was established efficiently. Among the media investigated, MS + 2.0 mg/L6-BA + 0.5 mg/LNAA + 3% sucrose is suitable for induction of adventitious bud and callus while MS + 0.5 mg/L6-BA + 0.1 mg/LNAA + 3% sucrose is better for induction of adventitious buds. The medium MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 3% sucrose is proper for adventitious bud multiplication; MS + 1.0 mg/L NAA + 3% sucrose is optimum for bulblet formation from the adventitious buds, while 1/2MS + NAA 0.3 mg/L + IBA0.1 mg/L + 12% sucrose is suitable for the growth of bulblets.

Keywords

***Lilium taliense* Franch., Tissue Culture, Rapid Propagation, Wild Lily**

大理百合的组织培养研究

舒　宁，詹文静，刘燕妮，刘国锋*

华中农业大学园艺林学学院，园艺植物生物学教育部重点实验室，湖北　武汉
Email: *gfliu@mail.hzau.edu.cn

收稿日期：2014年12月17日；录用日期：2015年1月6日；发布日期：2015年1月20日

*通讯作者。

摘　要

采用离体组织培养的方法对大理百合的快速繁殖进行了研究，结果表明：以大理百合的鳞片为外植体进行离体培养，可获得再生植株，并初步建立了其快速繁殖体系。由试验结果可知，适宜大理百合鳞片诱导不定芽和愈伤组织的培养基为MS + 2.0 mg/L6-BA + 0.5 mg/L NAA + 3%蔗糖；而MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 3%蔗糖更有利于不定芽的诱导；不定芽增殖的培养基以MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 3%蔗糖效果较好；不定芽形成小鳞茎的培养基以MS + 1.0 mg/LNAA + 3%蔗糖效果较好；小鳞茎膨大的培养基以1/2MS + 0.3 mg/L NAA + 0.1 mg/L IBA + 12%蔗糖效果较好。

关键词

大理百合，组织培养，快速繁殖，野生百合

1. 引言

百合(*Lilium* spp.)为百合科(Liliaceae)百合属多年生草本植物，具有广阔的分布区和多样性。我国是百合的起源中心，约有百合 55 种，但是大部分百合原种仍处于野生状态，其分布主要集中在林缘、山坡、岩石缝、草坡地等[1]。百合因为具有较高的观赏价值、药用价值和食用价值，而被大量采挖。近年调查发现，许多我国特有的野生百合已经濒临灭绝，而大理百合(*L. taliense*)便是其中之一。大理百合花朵下垂，花被反卷，色白而具紫色斑点，极富观赏价值。一般百合花顶生成总状花序，通常 1~4 朵，大理百合单株着花量多达 13~20 朵，在百合中表现突出。同时，大理百合还具有药用价值，含有多种活性糖，具有镇静、消炎、抗疲劳、改善呼吸、增强机体免疫力等多种功能[2]。其主要产于湖北、四川、重庆、贵州、云南海拔 2600 m~3600 m 的山坡草地和林中[3]。百合的传统繁殖方法有种子繁殖和无性繁殖，生产上一般以无性繁殖(鳞片扦插或小鳞茎分球法)为主。播种繁殖的缺点为种质易发生变异；鳞片扦插繁殖易使鳞片腐烂，不能满足市场的需求[4]；小鳞茎分球繁殖方式在生产中应用较广，但这种方式用种量大，繁殖系数低，病毒在鳞茎中逐年积累，造成品种退化[5]。随着生物技术的发展，植物组织培养技术被用于百合的离体培养和快速繁殖，极大地提高了百合的繁殖系数，促进了百合商品种球的生产。本研究旨在探索大理百合的离体快繁技术，在提高其繁殖系数，利于其种质资源的保存和开发利用的同时，还可将部分种球送到原产地种植，挽救大理百合的濒危局势，也为后期育种工作提供基础材料。

2. 实验材料及方法

2.1. 实验材料

供试材料为采自云南的野生大理百合(*Lilium taliense* Franch.)鳞茎。

2.2. 实验方法

2.2.1. 初代培养

选取健康、无病虫害的大理百合鳞茎，在自来水下洗净表面泥污之后，剥成单个鳞片，用 0.3%(质量体积分数)的洗衣粉水浸泡 20 min~30min，流水冲洗 1~2 h。在超净工作台内，用 75%酒精浸泡 30 s 后，0.1%升汞溶液处理 10 min，无菌水漂洗 4~5 次。用滤纸将鳞片表面水分吸干，去除边缘坏死组织，将鳞片切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块，远轴面朝下接种在诱导培养基上，10 d 记录污染情况，50 d 后统计其分化情况。

2.2.2. 不定芽的诱导

将初代培养获得的不定芽进行增殖得到一定数量的组培苗，利用组培苗的鳞片、叶片、叶柄及整个鳞茎做外植体继续进行不定芽和愈伤组织的诱导，30 d 后统计结果。诱导率(%) = 产生分化的外植体数/接种的外植体数。

2.2.3. 不定芽的增殖

将诱导出的不定芽接种到几种增殖培养基中，40 d 后统计不定芽的增殖结果，并比较不同培养基的增殖效果。通过比较不定芽增殖倍数和芽苗生长状况来衡量增殖效果。增殖倍数 = 增殖总芽数/接种总芽数。

2.2.4. 小鳞茎的诱导

将增殖出来的不定芽丛分割成单芽，接入小鳞茎诱导培养基中。30 d 后，记录不同培养基中芽苗形成小鳞茎的个数，并用直尺测量小鳞茎的直径。不定芽平均形成鳞茎数 = 不定芽形成的鳞茎总数/接种的不定芽总数；鳞茎平均直径(cm) = 所有鳞茎直径之和/鳞茎数。

2.2.5. 小鳞茎膨大及生根

将前一环节培养形成的小鳞茎按大小进行分类，选取大小一致的小鳞茎接入不同培养基，每瓶接入 5 个，重复 3 次。30 d 后统计结果。测量培养前后鳞茎的直径，计算小鳞茎的膨大倍数，并观察记录鳞茎生长情况。鳞茎膨大倍数 = (膨大后直径 − 膨大前直径)/膨大前直径。

2.3. 培养条件

以 MS 培养基为基本培养基，添加不同组合的激素，蔗糖浓度范围为 3%~12%，加入 0.72%琼脂进行固化，调节 pH 6.0~6.5，培养基编号和具体配方见表 1。组培室温度为(25 ± 1)℃，每天光照 12 h，光照强度 1500 Lx~2000 Lx，光源为日光灯。试验时间为 2012 年 11 月到 2014 年 5 月。

Table 1. Medium component
表 1. 培养基成分

编号	MS	6-BA/mg·L^{-1}	NAA/mg·L^{-1}	IBA/mg·L^{-1}	蔗糖/g·L^{-1}	琼脂/g·L^{-1}
MS	1	0	0	0	30	7.2
Y1	1	1.0	0.3	0	30	7.2
Y2	1	0.5	0.1	0	30	7.2
S1	1	0.5	0.5	0	30	7.2
S2	1	1.0	0.5	0	30	7.2
S3	1	2.0	0.5	0	30	7.2
S4	1	1.0	0.1	0	30	7.2
N1	1	0	1.0	0	30	7.2
N2	1	0	0.5	0	30	7.2
L1	1/2	0	0.3	0.1	120	7.2
L2	1/2	0	0.3	0	120	7.2
L3	1/2	0	0.3	0	90	7.2

3. 结果与分析

3.1. 外植体的消毒效果

接种之后持续观察，一周之后发现小鳞片由白色渐渐变为黄绿色，一个月后一部分鳞片边缘出现肿大，呈淡黄色，切口处出现单个或数个乳白色的小突起。鳞片在培养过程中，颜色会出现明显变化，与王爱勤等[6]报道的研究结果一致。50 d 后统计其分化情况，得到表 2 结果。

从表 2 可以看出，经过表面消毒后，虽然鳞片的污染率不高，但是成活率也很低，诱导出来的不定芽和愈伤数目都很少，说明大理百合的分化能力较差，也可能是由于初代培养的时间为 11 月中旬，此时鳞茎进入休眠状态，生理活性较低而不易诱导较多不定芽。

3.2. 不同外植体在不同激素组合培养基上的分化效果

取大理百合组培苗，分成不同部分，进行对比实验。30 d 后统计实验结果，如表 3 所示。

实验结果表明：大理百合鳞茎在 MS 培养基上生长困难，叶片细弱，仅有 33%左右能够存活。Y2 培养基诱导大理百合鳞片直接产生不定芽效果较好，平均每个鳞片可诱导 2~3 个不定芽；但诱导叶片的效果很差，基本无存活，而 S1 培养基诱导大理百合叶柄产生愈伤的效果较好，整体诱导率达到 27.6%。

鳞茎在 Y2 培养基上生长总体正常，叶片粗壮，但偶尔出现畸形，同时鳞茎诱导产生愈伤比例为 50%，而不定芽较少，因此如果想较快获得大量不定芽，应该把鳞片分开进行诱导。

使用鳞片进行愈伤诱导，Y2 的诱导率为 33.3%，S3 为 64%，S3 培养基有利于大理百合鳞片诱导愈

Table 2. The results of primary culture
表 2. 初代培养结果

培养基	接种数	污染数	存活数	分化不定芽数	诱导愈伤数
S1	20	5	3	4	0
S3	40	6	4	6	3

Table 3. The effects of various explants and media on shoot regeneration
表 3. 不同外植体在不同培养基中的诱导效果

培养基	器官	接种数	存活数	出芽数	诱导愈伤数
MS	鳞片	5	0	0	0
MS	愈伤	7	0	0	0
MS	鳞茎	15	5	6	0
Y1	鳞片	9	2	7	0
Y2	鳞片	21	15	33	5
Y2	鳞茎	20	19	2	10
Y2	叶片	34	1	0	1
S1	叶片	30	1	0	1
S1	叶柄	76	21	0	21
S1	愈伤	6	4	7	/
S3	愈伤	18	13	14	/
S3	鳞片	30	25	18	16

伤组织，且愈伤呈淡黄色，致密而干燥。

对于愈伤组织的诱导，叶柄的效果比叶片好，在 S1 培养基上前者诱导率为 27.6%，后者为 3.3%。

3.3. 不定芽在不同激素组合培养基上的增殖效果

将诱导出来的不定芽接种在增殖培养基 S1、S2、S4 中，50 d 后统计结果。不同种类激素及其浓度组合的培养基对不定芽的增殖效果有明显不同，芽苗的生长状态也存在明显差异。具体结果见表 4。

S4 培养基中的不定芽培养 20 d 左右，丛生芽比较多，基部出现淡黄色愈伤组织。50 d 后，S4 培养基中，不定芽的增殖系数最高，达到 6.11，该配方中 6-BA 与 NAA 的比值也最大。

3.4. 不同激素组合对不定芽形成小鳞茎的影响

将不定芽接入合适的培养基可促进小鳞茎的形成，从而缩短培养周期。本实验采用两种培养基进行小鳞茎的诱导，从不定芽接入培养基后持续观测，发现 10 d 左右，N1 培养基中芽苗高度比 N2 中高 1~2 cm，而且长势整齐。一个月后，N1 和 N2 中芽苗均形成小鳞茎，但 N1 中有的不定芽可产生 3~4 个小鳞茎，而 N2 中最多形成 2 个。且在 N1 中鳞茎产生较多侧根和根毛，N2 中小鳞茎根毛较少，个别瓶内不定芽死亡。具体数据见表 5。

由此可知，N1 培养基更适合用作大理百合不定芽诱导小鳞茎，不仅增殖系数大，而且有利于移栽成活。

3.5. 不同激素及蔗糖组合对鳞茎膨大的影响

本研究采用三种培养基进行鳞茎膨大实验，结果(表 6)显示，L1 中的鳞茎生长最健壮，鳞片包裹比较紧，叶片较少而整齐，最早长出根；L2 中的鳞茎颜色黄绿，鳞片包裹不紧，有的鳞片出现畸形，叶片

Table 4. The effects of hormone combination on adventitious bud proliferation of *Lilium taliense*
表 4. 不同激素组合对大理百合不定芽增殖的影响

培养基编号	接种总芽数	增殖总芽数	增殖倍数
S1	25	56	2.24
S2	25	95	3.80
S4	26	159	6.11

Table 5. The effects of hormone combination on bulb formation from adventitious bud of *Lilium taliense*
表 5. 不同激素组合对大理百合不定芽形成小鳞茎的影响

培养基编号	接种数	不定芽平均形成鳞茎数	鳞茎平均直径/cm	生长状况
N1	50	2.8	0.7	叶片健壮，浓绿，根毛多
N2	50	1.3	0.5	叶片黄绿，根毛较少

Table 6. The effects of hormone combination on bulb growth of *Lilium taliense*
表 6. 不同激素组合对大理百合鳞茎膨大的影响

培养基编号	鳞茎膨大倍数	鳞茎生长状态
L1	1.14	健壮，鳞片包裹紧，根多
L2	1.0	部分鳞片出现畸形，根少
L3	0.57	鳞片散开，畸形，根少

黄绿，根较少；L3 中的鳞茎颜色发黄，鳞片散开，较多鳞片出现畸形，叶片较少。L1 和 L2 比较可知，IBA 有利于鳞茎的正常形态建成。L2 和 L3 比较可知，鳞茎在高浓度的蔗糖条件下，膨大速度比较快。徐洪星等人[7]在其实验范围内得出蔗糖浓度最高时(60 g/L)鳞茎膨大系数最大，本实验也得到蔗糖含量最高时(120 g/L)，鳞茎膨大系数最大，说明蔗糖在鳞茎膨大过程中起重要作用。

4. 讨论

大理百合生长于西南边陲，自然条件下繁殖缓慢，加上人为的破坏进一步加剧了其生存危机。有研究表明，对于百合的组织培养，杂种品种分化能力大于野生种；低海拔种大于高海拔种[8]。在实验中发现，大理百合作为高海拔的野生种，相比其他野生百合来说，组培难度较大。原因可能有如下几点：1) 试验中初代培养的时间在 11 月份，此时大理百合已进入休眠状态，生理活性较低；2) 试验所用大理百合种球为前一年夏天采自云南迪庆州，采集回来后先在冰箱贮藏了半年，于第二年春季种于基地进行驯化保存，经过较长时间的不适宜环境栽培后鳞片营养物质有所减少，内源激素水平可能降低；3) 百合鳞片不同部位的分化能力不同，一般鳞片下部 > 鳞片中部 > 鳞片上部，且外层鳞片分化能力高于内层鳞片。本次初代培养由于材料数量所限，并没有严格区分。今后试验中，可进一步摸索从野外采集材料后立即进行培养的效果，并将试验设计进一步细化。同时还可以尝试鳞片薄片培养，以增大单位质量鳞片的繁殖系数。此外，外植体灭菌后可将边缘部分切掉 3~5 mm，以利于不定芽更快地诱导出来。

本试验在前人研究的基础上，选用了比较常用而且效果比较好的 6-BA 和 NAA 激素组合，探索了大理百合的离体培养和快速繁殖，初步建立了其无菌繁殖体系。但要注意以后进行初代培养时，尽可能在鳞茎活力比较强的时候进行，以期得到更好结果。另外，从 Askari 等人[9]的研究中，我们知道初代培养时，外植体的大量污染可能来自两方面：1) 鳞片从母球上剥离时，菌体从伤口进入外植体；2) 用无菌水漂洗时，可造成交叉污染。这种情况可通过 0.03%的 NaClO 溶液代替无菌水进行浸泡和冲洗。在今后的试验中可以尝试。

从本实验结果可知，大理百合组培苗不同部位在同种培养基中的诱导差异较大，而且同样部位在不同培养基中的诱导效果也不一样。大理百合诱导率低，鳞茎在纯 MS 培养基上生长困难，在添加 6-BA 和 NAA 之后，培养结果得到改善。综合整个实验，可得到如下结论：1) 大理百合不定芽增殖的培养基以 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 3%蔗糖效果较好，这与张艺萍等[10]的研究结果相符；2) 不定芽形成小鳞茎的培养基以 MS + 1.0 mg/L NAA + 3%蔗糖效果较好；3) 小鳞茎膨大的培养基以 1/2MS + 0.3 mg/L NAA + 0.1 mg/LIBA + 12%蔗糖效果较好。

利用组织培养可快速繁殖百合种球，且不受季节限制。本实验初步得到了大理百合的快繁体系，但增殖系数和时间相比其他野生百合来说都不够理想，因此还需进一步研究和优化。

致　谢

本研究受公益性行业(农业)科研项目“国家重点保护野生花卉人工驯化繁殖及栽培技术研究与示范”(项目编号 201203071)资助，同时得到华中农业大学大学生科技创新基金(SRF)项目“几种云南野生珍稀濒危百合组织快繁技术研究”支持，特此感谢！

参考文献 (References)

[1] 王仁睿, 刘军, 卢昌泰 (2007) 我国百合种质资源的研究与创新. *四川林业科技*, **3**, 34-38.

[2] 周静华, 李芬, 汪祖芳 (2006) 大理百合中多糖的提取与总糖含量的测定. *临床和实验医学杂志*, **6**, 735.

[3] 中国科学院昆明植物研究所 (1997) 云南植物志, 第七卷. 科学出版社, 北京.

[4] 宁景华 (2006) 东方百合鳞片快繁及采后处理. *中国花卉园艺*, **10**, 16-20.

[5] 桑林, 林卫东, 谢庆华 (2006) 激素对百合鳞片扦插繁殖的影响研究. *西南农业学报*, **3**, 473-475.

[6] 王爱勤, 何龙飞, 温庆兰, 林鉴钊 (2004) 百合组培中鳞片处理及其颜色变化与鳞茎形成的关系. *园艺学报*, **1**, 117-119.

[7] 徐洪星, 秦华, 眭顺照, 皮伟, 李名扬, 李先源 (2008) 大理百合的离体快繁研究. *西南师范大学学报*(*自然科学版*), **1**, 58-61.

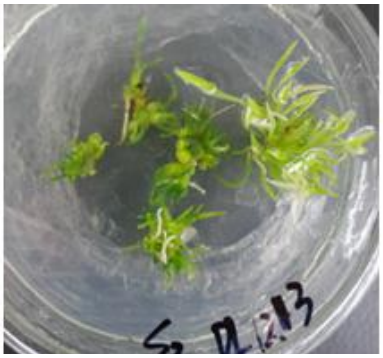
[8] 王家福 (2006) 花卉组织培养与快繁技术. 中国林业出版社, 北京.

[9] Askari, N., Wang, Y.G. and de Klerk, G.J. (2014) In tissue culture of *Lilium* explants may become heavily contaminated by the standard initiation procedure. *Propagation of Ornamental Plants*, **14**, 49-56.

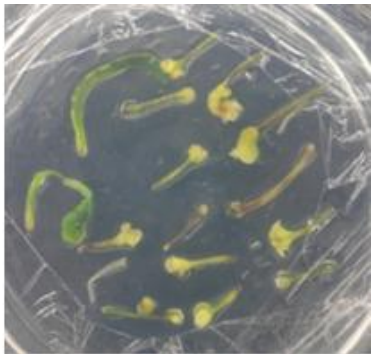
[10] 张艺萍, 屈云慧, 吴学尉, 熊丽 (2007) 大理百合组织培养和快速繁殖. *北方园艺*, **8**, 189-190.

附图

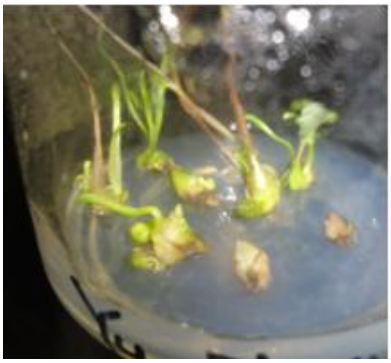
1



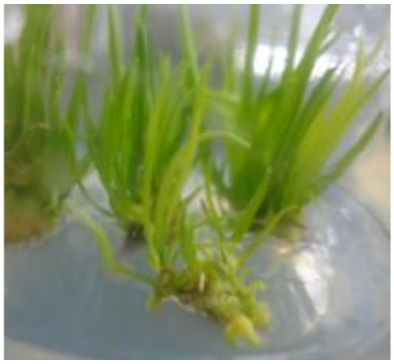
2



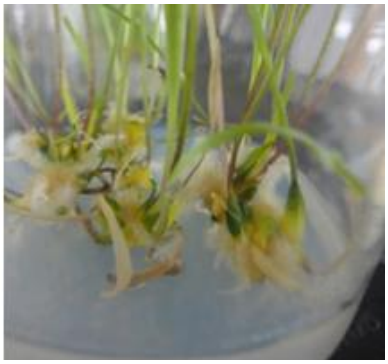
3



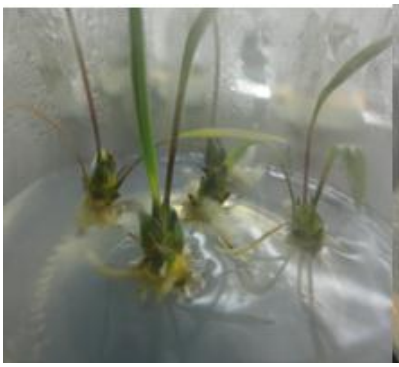
4



5

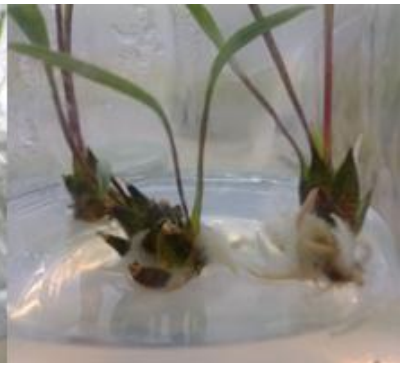


6



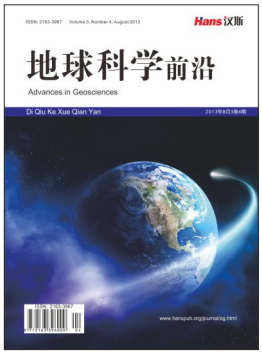
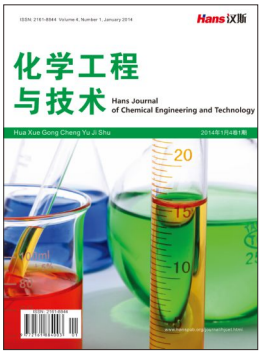
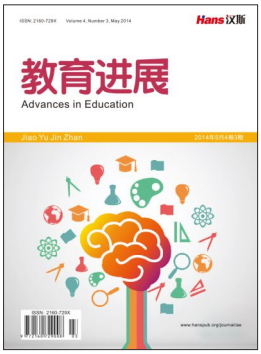
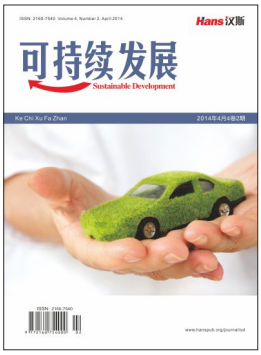
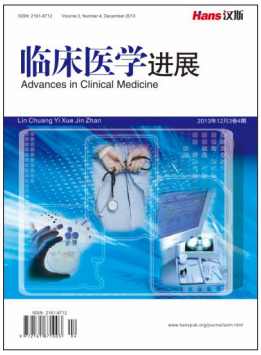
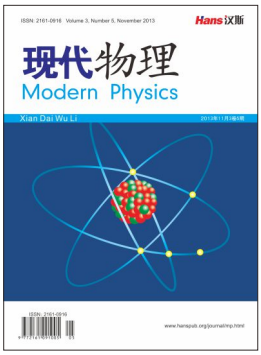
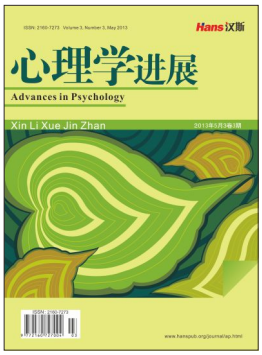
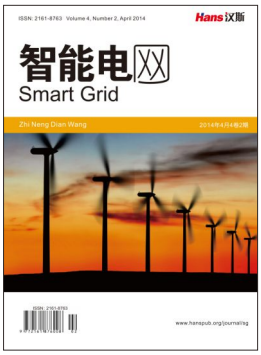
7

8



9

图版说明：1—外植体初代培养消毒效果，2—大理百合愈伤和不定芽的分化，3—叶柄的诱导效果，4—鳞片不定芽的诱导，5—不定芽的增殖，6—不定芽形成小鳞茎，7—生长健壮的鳞茎，8—鳞茎形成不定根和大量根毛，9—鳞茎膨大的效果。

汉斯出版社为全球科研工作者搭建开放的网络学术中文交流平台。自2011年创办以来，汉斯一直保持着稳健快速发展。随着国内外知名高校学者的陆续加入，汉斯电子期刊已被450多所大中华地区高校图书馆的电子资源采用，并被中国知网全文收录，被学术界广为认同。

汉斯出版社是国内开源（Open Access）电子期刊模式的先行者，其创办的所有期刊全部开放阅读，即读者可以通过互联网免费获取期刊内容，在非商业性使用的前提下，读者不支付任何费用就可引用、复制、传播期刊的部分或全部内容。