

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.11.003

南川百合资源现状及组培快繁技术研究^①

任明波, 杨毅, 刘杰, 刘春雷, 刘燕琴

重庆市药物种植研究所/特色生物资源研究与利用 川渝共建重点实验室, 重庆 南川 408435

摘要: 研究发现, 近年南川百合资源呈明显下降趋势, 评估为易危(VU)等级. 以鳞茎为外植体进行芽的诱导、增殖培养, 筛选出培养配方: MS+6-BA 1.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+白糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L, pH=5.8; 壮苗、生根培养基: MS+NAA 0.3 mg/L+香蕉泥 15 g/L+活性炭 0.1%+白糖 40 g/L, pH=5.8; 可以实现南川百合快繁和资源保护.

关键词: 南川百合; 资源; 组培; 丛生芽诱导; 壮苗培养

中图分类号: Q949.71⁺8.23

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)11-0019-06

南川百合(*Lilium rosthornii* Diels)为百合科百合属多年生草本植物, 是百合科生物多样性的的重要资源, 亦是园艺上重要的育种材料^[1]. 因具有较高的食用价值, 南川百合的开发和利用前景好. 但是, 目前人类活动已严重破坏南川百合生境和资源, 导致现存资源呈逐年下降趋势; 同时, 南川百合种子败育, 鳞茎繁殖数量有限, 严重阻碍了南川百合的繁殖发展^[2-4]. 组培快繁技术在其他观赏百合中运用较为成熟^[5], 而目前有关南川百合组培快繁技术的研究报道甚少. 所以开展南川百合资源及组培快繁技术研究意义明显.

1 研究材料

以重庆地区南川百合主要分布点的野生南川百合为研究对象, 所采集的材料经重庆市药物种植研究所研究员刘正宇鉴定.

2 研究方法

2.1 资源研究的方法

在查阅相关文献资料^[6-7]和野生资源调查的基础上, 选取南川、武隆、巫山、江津和石柱等地, 采用线路调查法并结合走访当地居民的形式, 自 2015—2017 年定期、定点考察南川百合资源的分布区、数量和生境等情况, 收集整理相关信息.

资源受威胁现状评估方法: 依据 IUCN 物种红色名录濒危等级和标准(3.1 版)和 IUCN 物种红色名录标准在地区水平的应用指南(3.0 版)^[8]进行评估. 本次评估主要引用了 IUCN 物种红色名录标准 B, 对重庆地区南川百合资源分布区和种群大小进行了评估, 并征集了本地植物区系专家的意见.

2.2 组培快繁方法

2.2.1 培养条件

试验选用的基本培养基均为 MS 培养基, 附加不同质量浓度的 6-BA 和 NAA 激素组合, 筛选丛生芽诱

① 收稿日期: 2018-05-10

基金项目: 重庆市科委基本科研业务费计划项目(2016cstc-jbky-01315).

作者简介: 任明波(1973—), 男, 中药技师, 主要从事植物资源和药用植物园管理的研究.

导和增殖培养基,并进一步筛选壮苗、生根培养基配方,附加蔗糖或白糖,琼脂(质量浓度为 7 g/L),pH 值为 5.8.所有培养基均在 121 ℃饱和蒸汽压下灭菌.接种后置于光照强度为 1 500~2 000 lx、光照时间为 10~12 h/d、温度为(25±2) ℃的光照培养室内培养.

2.2.2 鳞片的消毒和培养

取南川百合生长健壮、无病虫害的鳞茎,去掉外层鳞片,根系切除,然后将鳞片剥下,放入洗衣粉溶液中浸泡 15~20 min,在自来水下冲洗 2 h,置于超净工作台上进行灭菌.灭菌采用 75%乙醇浸泡 70 s 后转入无菌水中清洗 2 遍,然后转入 0.1%氯化汞溶液中浸泡 15 min,之后用无菌水清洗 5~6 次,每次清洗时间 2~3 min.然后将灭菌后的鳞片放置在干净无菌的滤纸上吸干表面的水分备用.灭菌过程中要不断晃动以便灭菌充分.将每块鳞片的中、下部分别切成 0.5 cm×0.5 cm,凹面朝上接种到 MS 培养基(无激素添加)上培养(培养 15 d 左右),从而获得无菌材料.

2.2.3 芽诱导、增殖培养基筛选

芽的诱导,以 MS 为基本培养基,添加 6-BA(0.8,1.0,1.2,1.4,1.6,1.8,2.0,2.2 mg/L)和 NAA(0.1,0.2,0.5 mg/L)组合,白糖(质量浓度为 30 g/L),琼脂(质量浓度为 7 g/L),pH=5.8,研究鳞茎的诱导芽;每瓶接种 3 个芽,每个处理接种 50 瓶,重复 3 次,30 d 后统计芽的诱导情况.

芽的增殖培养,待丛生芽长至 1~2 cm 高时,将丛生芽切分成单芽接种于增殖培养基上,每瓶接种 3 个芽;并以本试验筛选出的诱导培养基为增殖培养.

2.2.4 壮苗、生根培养

将高 1~2 cm 芽,转接入 MS 培养基上,添加蔗糖和白糖(质量浓度为 20,30,40,50,60 g/L),添加香蕉泥(质量浓度为 15 g/L),活性炭(质量浓度为 0.1%),NAA(质量浓度为 0.3 mg/L),筛选壮苗培养基.每瓶接种 10 个芽,每个处理接种 50 瓶,重复 3 次,30 d 后统计.

3 研究结果

3.1 南川百合资源研究结果

从表 1 可以看出,南川百合在重庆分布较广,主要生长在林缘、崖壁、沟谷和溪边等较湿润、潮湿的环境,呈群体性、岛屿性分布;受威胁严重.

从表 2 可以发现,南川百合的开花植株受人为影响较大,由于采挖、生境破坏等原因,开花植株数量呈逐年下降趋势,这必将影响南川百合种群的发展,所以急需进行资源的保护(图 1).

表 1 2015 年南川百合野生资源调查及评估

分布地点	地理位置	海拔/m	生 境	种群大小/株	种群动态	受威胁等级和标准
巫山五里坡	E 109°37' N 31°16'	500~1 200	林缘、沟谷、崖壁	1 000~3 000	受威胁较严重	
武隆白马山	E 107°33' N 29°16'	600~900	灌丛、溪边	2 000~3 000	受威胁较严重	
南川金佛山	E 107°07' N 29°03'	580~960	灌丛、溪边	1 000~2 000	受威胁较严重	易危 VUB2ab(ii)
江津四面山	E 106°4' N 28°6'	580~1000	灌丛、溪边	1 000~2 000	受威胁较严重	
石柱黄水镇	E 108°26' N 30°12'	990~1300	灌丛、溪边	1 000~2 000	受威胁较严重	

表 2 2015—2017 年南川百合开花植株数量变化

调查点	2015 年开花植株/株	2016 年开花植株/株	2017 年开花植株/株
巫山五里坡	600~800	500~600	300~400
武隆白马山	900~1 200	600~800	500~600
南川金佛山	700~900	500~600	300~400
江津四面山	400~500	300~400	200~300
石柱黄水镇	600~700	500~600	300~400



图 1 生境及资源图

3.2 组培快繁结果

3.2.1 芽诱导培养基筛选结果

将 6-BA 与 NAA 进行不同质量浓度的组合, 在培养过程中观察并记录其启动时间, 统计其平均出芽数 (培养 30 d), 计算其平均诱导率, 结果见表 3.

表 3 芽的诱导培养

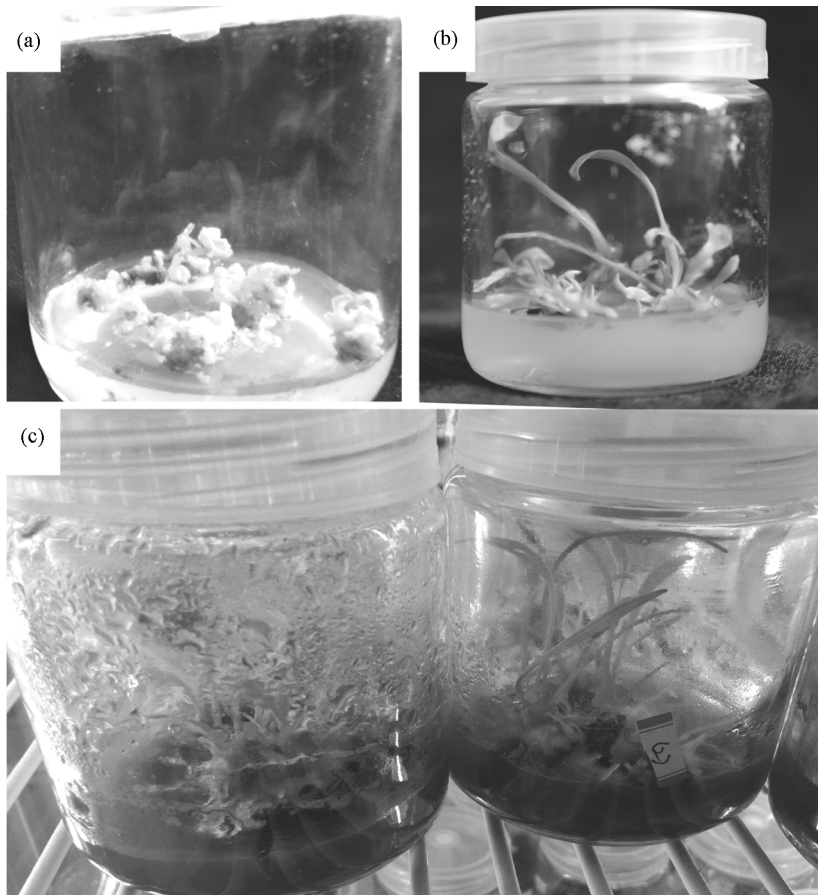
处理	激素配比 $c(6\text{-BA}) : c(\text{NAA})$	外植体块数/ 块	启动时间/ d	平均每块出芽数/ 个	芽长势情况 (愈伤生长)
A1	0.8 : 0.1	150	28	1.2	--
A2	0.8 : 0.2	150	28	1.1	--
A3	0.8 : 0.5	150	28	1.1	--
A4	1.0 : 0.1	150	25	1.3	--
A5	1.0 : 0.2	150	25	1.2	--
A6	1.0 : 0.5	150	25	1.1	--
A7	1.2 : 0.1	150	18	1.3	-
A8	1.2 : 0.2	150	18	1.3	-
A9	1.2 : 0.5	150	18	1.1	-
A10	1.4 : 0.1	150	16	3.8	+
A11	1.4 : 0.2	150	16	6.5	+++
A12	1.4 : 0.5	150	17	4.0	+
A13	1.6 : 0.1	150	18	4.2	+
A14	1.6 : 0.2	150	18	4.5	+
A15	1.6 : 0.5	150	18	3.0	+
A16	1.8 : 0.1	150	16	4.5	++
A17	1.8 : 0.2	150	16	4.6	++

续表 3

处理	激素配比 $c(6\text{-BA}) : c(\text{NAA})$	外植体块数/ 块	启动时间/ d	平均每块出芽数/ 个	芽长势情况 (愈伤生长)
A18	1.8 : 0.5	150	16	4.3	+
A19	2.0 : 0.1	150	14	3.5	+; 愈伤生长++
A20	2.0 : 0.2	150	14	4.0	+; 愈伤生长+
A21	2.0 : 0.5	150	14	4.2	+; 愈伤生长+
A22	2.2 : 0.1	150	12	3.0	+; 愈伤生长++
A23	2.2 : 0.2	150	12	3.2	-; 愈伤生长++
A24	2.2 : 0.5	150	12	3.5	-; 愈伤生长+

注：“-”表示效果差，“+”表示效果好。

从表 3 可以看出, 6-BA 对南川百合芽的分化有较大的作用, 但随着 6-BA 质量浓度的增加, 其芽的分化先升高后降低, 愈伤的分化随质量浓度增加呈明显上升趋势; 其中, 以 MS+6-BA1.4 mg/L+NAA0.2 mg/L+白糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L, pH=5.8, 其芽的平均分化数最多, 生长势较好; 该培养基也是继代培养基(图 2)。



(a) A 22 愈伤培养; (b) A 17 培养基; (c) A 11 芽培养基。

图 2 不同质量浓度 6-BA 和 NAA 对南川百合组培诱导情况

3.2.2 壮苗、生根培养基的筛选结果

研究不同质量浓度的蔗糖和白糖对南川百合壮苗、促鳞茎生长的作用, 在附加不同质量浓度的蔗糖和白糖的条件下培养 30 d, 研究其鳞茎的大小及株高. 研究结果见表 4.

表 4 不同质量浓度的蔗糖和白糖对南川百合植株生长的影响

糖类	质量浓度/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	培养瓶数/ 瓶	30 d 鳞茎平均直径/ mm	平均株高/ cm	长势情况
蔗糖	20	150	2.5	4.6	—
	30	150	4.8	5.0	++
	40	150	6.9	7.5	++++
	50	150	4.3	4.8	+
	60	150	3.9	4.1	--
白糖	20	150	2.6	4.5	—
	30	150	4.9	5.1	++
	40	150	6.9	7.7	++++
	50	150	3.8	4.8	+
	60	150	3.0	4.2	--

注：“—”表示效果差，“+”表示效果好。

从表 4 可以发现, 随着糖质量浓度的增大, 南川百合的鳞茎直径、株高呈先增加而后降低的趋势, 而蔗糖、白糖对南川百合鳞茎生长的作用相似(提供碳源), 但白糖价格更便宜(可以降低生产成本)。所以综合各种因素, 选择南川百合壮苗、生根合适培养基, MS+NAA 0.3 mg/L+香蕉泥 15 g/L+活性炭 0.1%+白糖 40 g/L, pH=5.8。

4 讨 论

本研究发现, 近年来南川百合资源急剧下降, 为保护和发展南川百合, 以南川百合内侧鳞茎片为外植体, 经丛生芽诱导培养、继代培养、壮苗生根培养, 可以实现快繁, 从而为进一步保护和开发南川百合提供技术参考。

4.1 南川百合资源呈易危状态的原因

南川百合主要生长在沟谷、溪边等湿度较大的地方, 其特点是分布地区呈狭窄的岛屿状分布^[9]; 花期在 9—10 月, 花色艳丽, 极易被发现、采挖, 生境容易受破坏; 而同时其种子结实率、萌发率低^[10], 这可能是野生资源呈易危的主要原因。

同时南川百合鳞茎可以食用, 生长适宜较好(耐湿度), 所以是难得的育种材料^[11], 这也是导致其容易被人采挖的原因之一。

4.2 南川百合快繁研究

目前已有不少白糖代替蔗糖为组培糖源的研究, 如吴瑕等研究发现白糖可以代替蔗糖并可以降低生产成本^[12]; 再如李新江等^[13]研究发现, 草莓组培苗增殖培养中用白糖代替蔗糖培养效果差异不显著; 又如王航等^[14]研究发现, 常规 MS 培养基进行改良, 用白糖代替蔗糖质量浓度为 30 g/L 和 60 g/L 时, 组培苗成活率高。所以, 在一定的条件下, 组培的糖源可以用白糖代替蔗糖。

通过提高糖质量浓度促进根茎生长的方法在其他植物试验中也有报道, 如赵海涛研究东方百合试管鳞茎发育过程中发现在不含糖的培养基中无鳞茎形成, 在一定范围内提高糖质量浓度可以促进鳞茎的快速长大^[15]; 而本试验研究发现, 南川百合在壮苗生根培养阶段, 以 MS 为基本培养基, 添加质量浓度为 40 g/L 的白糖, 可以有效促进南川百合鳞茎生长。

参考文献:

- [1] 王瑞波, 何平, 胡世俊, 等. 南川百合与泸定百合种群格局关联维数的比较研究 [J]. 重庆林业科技, 2008(1): 26-34.

- [2] 刘燕琴, 胡开治, 肖波, 等. 南川百合组织培养研究 [J]. 中国现代中药, 2006, 8(9): 32-33.
- [3] 王瑞波, 张燕平, 胡世俊, 等. 两种百合种群空间分布格局对高温干旱气候的响应 [J]. 林业科学研究, 2009, 22(2): 249-255.
- [4] 林茂祥, 刘正宇, 任明波, 等. 金佛山野生百合属植物资源及开发利用 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(14): 201-203.
- [5] 陈香秀. 百合的研究进展 [J]. 福建热作科技, 2010, 35(2): 45-48.
- [6] 荣立苹, 雷家军. 东北地区野生百合数量分类研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 99-102.
- [7] 唐艳平, 刘秀群, 傅强, 等. 长江中游地区野生百合资源调查及利用前景 [J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(6): 18-22.
- [8] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录——第一卷 红色名录 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [9] 马洪菊, 何平, 陈建民, 等. 重庆市珍稀濒危植物的现状与保护对策 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2002, 27(6): 932-938.
- [10] 金淑梅, 杨利平, 张月学. 百合种子萌发影响因素的探讨 [J]. 北方园艺, 2008(6): 117-118.
- [11] 钟雁, 朱立, 周艳, 等. 贵州野生百合属植物保护与开发利用研究 [J]. 种子, 2010, 29(7): 68-69.
- [12] 吴瑕, 张涛, 杨凤军, 等. 不同碳源及浓度对草原樱桃组培苗繁育的影响 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19(5): 26-29.
- [13] 李新江, 郑永春, 迟丽华. 草莓组培苗继代培养基筛选试验 [J]. 吉林农业科学, 2013, 38(4): 63-65.
- [14] 王航, 赵亮. MS 培养基中白砂糖浓度对马铃薯脱毒苗的影响 [J]. 新疆农垦科技, 2015, 38(11): 42-43.
- [15] 赵海涛. 东方百合 'Siberia' 试管鳞茎发育及休眠研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.

Study of the Resource Status of *Lilium rosthornii* Diels and Its Rapid Propagation Through Tissue Culture

REN Ming-bo, YANG Yi, LIU Jie,
LIU Chun-lei, LIU Yan-qin

Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation / Bio-resource Research and Utilization Joint
Key laboratory of Sichuan and Chongqing, Nanchuan Chongqing 408435, China

Abstract: It was found in a study reported in this paper that the resources of *Lilium rosthornii* Diels showed a significant downward trend in recent years and was evaluated as of the vulnerable grade (VU). Then, the bulbs of *L. rosthornii* were used as explants in tissue culture for bud induction and proliferation, and the best medium selected was MS+6-BA 1.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+sugar 30 g/L+agar 7.0 g/L at a pH of 5.8. The optimum medium for rooting was MS+NAA 0.3 mg/L+mashed banana 15 g/L+active carbon 0.1%+sugar 40 g/L at pH 5.8. With these methods, *L. rosthornii* rapid propagation and resource conservation can be realized.

Key words: *Lilium rosthornii* Diels; resource; tissue culture; clumped bud induction; best seed cultivation