

陕北野生山丹丹组培快繁技术研究

齐向英, 陈宗礼, 薛 皓, 王延峰, 刘 维, 杨 鹏

(延安大学 生命学院, 陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心, 陕西 延安 716000)

摘 要:以陕北地区野生的山丹丹鳞片为试材, 采用单因子和正交设计研究了不同浓度 IBA 和 NAA 及其组合对山丹丹组培快繁的影响。结果表明: 适合山丹丹初代培养的培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L, 芽诱导率达到 100%; 继代培养为 MS+6-BA 2.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L, 繁殖系数达到 9.8; 生根培养为 1/2MS+IBA 0.3 mg/L, 生根率达到 100%。

关键词:野生; 山丹丹; 快繁

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)22-0115-03

山丹丹(*Lilium pumilum* DC.)为百合科百合属多年生草本植物^[1]。其花色红、娇艳, 钟状花形美观, 植株矮小、紧凑, 非常惹人喜爱, 是北方地区极其珍贵的园林绿化、生活美化的植物。在陕北地区山丹丹主要分布在向阳山坡和林缘疏林下, 长期以来由于其生存环境破坏严重, 陕北地区的山丹丹数量极为稀少。同时陕北的山丹丹在我国红色文化中象征着可以燎原的星星之火, 随着退耕还林和红色旅游的兴起, 陕北地区以山丹丹为主题的山体美化、城市园林绿化越来越

受到人们的喜爱; 此外山丹丹还具有一定的食用和药用价值。该研究通过组培快繁的方式建立了山丹丹快繁和植株再生系统, 为山丹丹快速繁殖打下了良好的基础, 并为进一步山丹丹试管内育种提供了试验依据和试验材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为采自崂山山区的野生山丹丹, 组培用材料为山丹丹鳞片。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌材料的获得 将去掉外层土的鳞片放入洗衣粉水中泡洗 30 min, 然后用滤纸吸干表面的水分, 转入超净工作台备用。在超净工作台内先用 75% 乙醇灭菌 30 s, 用无菌水清洗 1 次; 再用 0.1% HgCl₂ + 1 滴吐温 20, 震荡 6 min, 无菌水清洗 3~5 次, 每次 2 min。用镊子剥去鳞茎外层的鳞片, 将内层鳞片接种在初代培养基上。避光培养 1 周后转入光下培养。

1.2.2 培养条件 培养温度 (24±2)℃。光照时间 12 h/d。光照强度约为 32~35 μmol·m⁻²·s⁻¹。相对湿度 60%~75%。

第一作者简介:齐向英(1980-), 男, 陕西宝鸡人, 硕士, 讲师, 研究方向为植物生物技术与植物遗传育种。E-mail: yd_qixiangying@163.com。

责任作者:陈宗礼(1954-), 男, 陕西扶风人, 本科, 教授, 硕士生导师, 研究方向为植物遗传育种。E-mail: zongli_chen@yahoo.com.cn。

基金项目:国家大学生文化素质基地资助项目(YDWH10-16); 陕西省自然科学基金资助项目(2009JM3001-3); 延安市科技计划资助项目(2009kn-26); 延安大学科技创新资助项目(D2010-158)。

收稿日期:2011-08-03

The Effects of Different Concentration of KT on Culture Multiplication of *Lilium*

WANG Guo-xian¹, YANG Chun-mei¹, QU Yun-hui¹, CAO Hua¹, LI Jin-ze¹, MENG Jin-gui²

(1. Institute of Flower, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Yunnan Flower Breeding, Kunming, Yunnan 650205;

2. College of Garden and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract: With continues the generation to raise 3 times of lily bottles seedling for explant, take MS as the basic culture medium, studied the effects of different concentration of KT to 'Tiber', 'Siberia' two lily variety multiplication. The results showed that different lily variety had different demands of KT. When take KT as 1.0 mg/L the multiplication of 'Tiber' was the best, the bottle cultivate seedling multiplication multiple to be highest, for 3.0 times, multiplication seedling grows normally; when take KT as 1.5 mg/L the multiplication of 'Siberia' was the best, the bottle cultivate seedling multiplication multiple to be highest, for 3.4 times, multiplication seedling grows normally.

Key words: 'Tiber'; 'Siberia'; tissue culture; KT; multiplication

1.2.3 试验设计^[2] 初代培养按单因子试验设计为 6-BA (0.1、0.5、1.0、1.5 mg/L) 4 个水平, 每种培养基中添加 NAA 0.01 mg/L。继代培养按二因素四水平正交实验设计 6-BA (1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L) 和 IBA (0.05、0.1、0.15、0.2 mg/L)。生根培养按单因子试验设计 IBA (0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L)。上述初代和继代培养基以 MS 为基本培养基并分别添加蔗糖 30 g/L, 琼脂 5.5 g/L。生根培养基以 1/2MS 为基本培养基并添加蔗糖 20 g/L。试验数据采用 Excel 2003 软件分析^[3]。

2 结果与分析

2.1 外源激素对初代培养的影响

由表 1 可知, 在鳞片初代培养基上 10 d 左右鳞片开始由白色逐渐转化成绿色, 15 d 左右边缘开始出现颗粒状凸起, 约 22 d 凸起部位开始分化出叶片(图 1)。随后不断地分化出叶片, 并且随着培养时间的增长, 每个叶片下面均出现 1 个鳞片, 这种分化过程一直持续到培养结束。在不同 6-BA 含量的培养基中, 鳞片的分化过程存在差异。6-BA 含量为 0.1 mg/L 的培养基中有 81.08% 的鳞片转化成绿色, 有 48.65% 分化出芽体, 同时有 24.32% 形成愈伤组织。6-BA 含量为 0.5 mg/L 的培养基中有 81.25% 的鳞片转化成绿色, 有 34.38% 分化出芽体, 53.13% 形成愈伤组织。6-BA 含量为 1.0 mg/L 的培养基中有 65.79% 的鳞片转化成绿色, 有 50.0% 分化出芽体。6-BA 含量为 1.5 mg/L 的培养基中所有鳞片均转化成绿色并且全部出芽, 在初代培养中明显优于其它 3 种培养基组合。

表 1 初代培养结果

6-BA /mg · L ⁻¹	接种 鳞片数	成活数	转绿数	转绿率/%	出芽 鳞片数	出芽率 /%	出愈率 /%
0.1	74	74	60	81.08	36	48.65	24.32
0.5	64	64	52	81.25	22	34.38	53.13
1.0	76	76	50	65.79	38	50.0	
1.5	66	66	66	100.0	66	100.0	

2.2 外源激素对继代培养的影响

2.2.1 外源激素组合对继代的影响 将初代培养中分化出的芽体接种到继代培养基上进行分化培养, 约 15 d 接种的材料均不同程度分化出含有鳞片的叶(图 2)。由表 2 可知, 在 16 种不同激素组合中 F₁₂ 的繁殖系数为 9.8, 在所有组合中最高; 其次是 F₁₁ 繁殖系数为 7.03; 最低的为 F₁₃, 繁殖系数为 0.2。不同激素组合分化出新鳞片数量的能力不同, 其中 F₁₂ 共分化出新鳞片 294 个, F₁₁ 分出 211 个; F₁₃ 最少只有 6 个。

2.2.2 不同激素种类对继代培养的影响 在培养基中随 6-BA 含量的增加, 繁殖系数和分化出鳞片的能力均表现出先增加后降低的趋势。其中在 2.5 水平繁殖系数达到最大值为 26.00。在 IBA 中表现为一直增加, 其中在含量为 0.2 水平中分化率达到最大, 为 13.92。2 种外源激素对山丹丹继代培养的方差分析表明, 6-BA 的 F 值为 14.23 (表 3), 临界值 $F_{0.05} =$

9.28, 其影响达到显著水平。IBA 的 F 值为 1.02。对 6-BA 含量各水平的显著性比较分析(表 4), 临界值 $LSD_{0.05} = 3.92$, $LSD_{0.01} = 7.20$; 6-BA 最终比较值为 17.02, 达到了极显著水平。因此最终激素组合为 6-BA 2.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L。

表 2 继代培养结果

处理	因素水平		A×B	繁殖系数	新生鳞片数
	6-BA/ mg · L ⁻¹	IBA/ mg · L ⁻¹			
F ₁	1.5	0.05	1	1.20	36
F ₂	1.5	0.1	2	1.10	33
F ₃	1.5	0.15	3	1.00	30
F ₄	1.5	0.2	4	0.70	21
F ₅	2	0.05	2	1.80	54
F ₆	2	0.1	1	2.60	78
F ₇	2	0.15	4	2.33	70
F ₈	2	0.2	3	2.25	68
F ₉	2.5	0.05	3	3.93	118
F ₁₀	2.5	0.1	4	5.23	157
F ₁₁	2.5	0.15	1	7.03	211
F ₁₂	2.5	0.2	2	9.80	294
F ₁₃	3	0.05	4	0.20	6
F ₁₄	3	0.1	3	0.43	13
F ₁₅	3	0.15	2	0.90	27
F ₁₆	3	0.2	1	1.17	35
T ₁	4.00	7.13	12.00	Σ=41.68	
T ₂	8.98	9.37	13.60		
T ₃	26.00	11.27	7.62		
T ₄	2.70	13.92	8.47		
\bar{x}_1	1.00	1.78			
\bar{x}_2	2.25	2.34			
\bar{x}_3	6.50	2.82			
\bar{x}_4	0.68	3.48			
R	5.83	1.70	1.50		

表 3 不同激素含量的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	临界值
6-BA	86.40	3	28.80	14.23 *	$F_{0.05} = 9.28$
IBA	6.21	3	2.07	1.02	$F_{0.01} = 29.46$
误差	6.07	3	2.02		(3, 3)
总和	106.17	15			

表 4 6-BA 各水平差异显著性比较

6-BA 含量/mg · L ⁻¹	平均数	差异显著性		
		$\bar{x}-2.70$	$\bar{x}-4.00$	$\bar{x}-8.98$
2.5	26.00 **	23.30 **	22.0 **	17.02 **
2.0	8.98 **	6.28 *	4.98 *	
1.5	4.00 *	1.30		
3.0	2.70			
$LSD_{0.05}$	3.92			
$LSD_{0.01}$	7.20			

2.3 IBA 含量对生根培养的影响

将获得的丛生芽接种在含不同 IBA 浓度的生根培养基上, 10 d 左右在鳞片和培养基接触的基部开始形成乳白色颗粒状的愈伤组织, 随后开始分化出根(图 3)。25 d 左右根分化率达到 100%。在分化根的同时露在培养基外面的鳞片进一步增大(图 4)。不同 IBA 含量对生根率、根长、平均生根条数和根的形态均有影响(表 5)。在所有含 IBA 的培养基中均有鳞片形成根。其中 IBA 0.3 水平生根率为 100%、平均根长为

3.35 cm、平均根数为 6.5 条,均优于其它 3 个水平,根的形态为基部膨大、端部细长。

表 5 生根培养结果

IBA/ mg · L ⁻¹	生根率 %	平均根长/cm	平均根数/条	根形态
0.1	55	2.8	1.9	细长
0.2	90	2.67	2.2	细长
0.3	100	3.35	6.5	基部膨大、端部细长
0.4	41	2.22	4.1	粗短、基部膨大



图 1 鳞片初代培养



图 2 继代培养



图 3 生根培养



图 4 生根培养
(鳞片增大)

3 讨论与结论

野生山丹丹的引种栽培报道较早。姚连芳等^[4]认为,挖取肥壮的鳞茎一般移栽后当年就可以开花,燕玲等^[5]引种研究表明,室内栽培次年无法开花,室外栽培次年能开花。并且在土壤中萌发率高于沙培和水培。杜润锁等^[6]对山丹丹的开发和繁殖技术做了综述,认

为山丹丹的开发和利用前景十分广泛。马永红^[7]对山丹丹快繁研究认为,外植体分化能力为种子>鳞片>幼嫩茎段>叶片;MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L 诱导的不定芽迅速形成小鳞茎以继代培养 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L 繁殖效果最佳,生根培养 MS+IBA 0.5 mg/L,生根率为 80%。刘冬云等^[8-11]的研究结果表明,诱导培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L;增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;经过在 MS+6-BA 1.0 mg/L+PP₃₃₃ 4.0 mg/L 壮苗培养后在 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 培养基中生根率可达到 100%。该研究以山丹丹的鳞片为材料筛选的继代培养基为 MS+6-BA 2.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L,繁殖系数达到 9.8;生根培养为 1/2MS+IBA 0.3 mg/L,生根率达到 100%。以上参考文献的报道和该研究之间的差异极有可能是由材料的生态类型引起的,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 吴国芳,冯志坚,周秀佳,等.植物学.下册[M].2版.北京:高等教育出版社,2005.
- [2] 杜荣骞.生物统计学[M].北京:高等教育出版社,2009.
- [3] 吴权威,吕琳琳.Excel统计应用实务[M].北京:中国水利水电出版社,2004.
- [4] 姚连芳,刘荷芬.野生观赏植物山丹丹及其引种栽培[J].中国野生植物资源,2004,23(5):63-65.
- [5] 燕玲,李红,宋述芹.干旱区五种野生观赏植物的引种栽培试验[J].干旱区资源与环境,2004,18(6):159-163.
- [6] 杜润锁,郭中,李保卫,等.山丹丹的开发利用价值及繁殖方法[J].内蒙古林业科技,2002(2):43-45.
- [7] 马永红.野生山丹丹组培快繁的研究[J].园林科技,2007,103(1):11-14.
- [8] 刘冬云,杜鸿云,王进茂,等.野生山丹丹启动培养研究[J].河北林果研究,2005,20(3):289-292.
- [9] 刘冬云,梁海永,史宝胜,等.野生山丹丹的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2005,4(5):641.
- [10] 刘冬云,史宝胜,李银华,等.不同碳源及 PP₃₃₃、GA₃对山丹丹组培苗鳞茎增大的影响[J].河北农业大学学报,2005,28(2):32-37.

Study on the Tissue Culture and Rapid Regeneration of Northern Shaanxi Wild Plant *Lilium pumilum* DC.

QI Xiang-ying, CHEN Zong-li, XUE Hao, WANG Yan-feng, LIU Wei, YANG Peng

(College of Life Sciences, Yan'an University, Shaanxi Engineering and Technological Research Center of Conservation and Utilization of Biological Resources, Yan'an, Shaanxi 716000)

Abstract: Taking Shaanxi wild Plant *Lilium pumilum* DC. pellet flake material, using single factor and orthogonal design, to study the effect of different concentration of IAA, NAA on the tissue culture and rapid propagation of *Lilium pumilum* DC. process. The results showed that MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L suitable for primary culture, the bud induction rate was 100%. MS+6-BA 2.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L was for subculture, propagation coefficient was 9.8. Rooting was 1/2MS+IBA 0.3 mg/L, rooting rate of 100%.

Key words: wild; *Lilium pumilum* DC.; rapid propagation