

野生山丹组培快繁的研究

马永红

(石家庄市植物园 050000)

摘要:以山丹的叶片、鳞片、幼嫩茎段、种子为外植体,进行组织培养研究。结果表明:不同外植体诱导分化能力不同,其中种子>鳞片>幼嫩茎段>叶片;不同浓度激素组合对比对山丹外植体鳞片诱导不定芽也有显著差异,其中以 MS+6-BA2.0mg/l+NAA0.1mg/l 诱导的不定芽迅速形成小鳞茎;而且不同部位百合鳞片分化小鳞茎能力不同,分化能力大小为基部>中部>上部;不同继代培养基对山丹鳞茎增殖有显著影响,以 MS+6-BA1.0mg/l+NAA0.1mg/l 继代繁殖效果最佳;不同生根培养基对山丹继代苗生根影响差异显著,以 MS+IBA0.5mg/l 为佳,生根率为 80%,平均每棵苗生根 8.1 条;不同移栽基质对山丹生根苗移栽成活率影响不同,以泥炭土为佳,移栽成活率可达 100%。

关键词:野生山丹; 组织培养; 外植体

山丹(*Lilium Pumilum*)为百合科百合属的多年生球根类花卉,其生性强健,耐寒耐旱,且花色鲜艳,适宜疏林、草坪中种植,也可用于花坛、花境或盆栽观赏,是北方难得的园林绿化、美化材料。

山丹常规繁殖方法为分植小鳞茎,但数量有限,难于在短时间达到批量生产。虽可用鳞片扦插繁殖,但往往易腐烂。因此采用组织培养对山丹进行快速繁殖,去毒复壮。本试验拟对山丹进行组织培养快繁研究,以期在短时间内繁殖出大量的山丹百合苗,并在园林中推广应用。

1 材料和方法

1.1 植物名称

山丹(*Lilium Pumilum*)

1.2 材料类别

山丹叶片、鳞片、幼嫩茎段、种子。

1.3 培养条件

以 MS 为培养基,附加琼脂 0.6%,蔗糖含量为 3%,添加不同浓度组合的外源激素,pH 值调整到 5.8,培养条件为 25±2℃,光照强度为 1500~2000lux,每天光照/黑暗 16/8h。

1.4 方法

1.4.1 材料处理

取山丹球茎外植体,在流水条件下将外植体的泥土冲洗干净,将鳞片一片片剥下,由外向内每两片为一组进行编号,依次为 1,2,3...经洗涤剂浸泡

10min,用自来水冲洗干净,在超净台用 75%酒精处理 30s,再用 0.1%升汞灭菌作不同处理,分别为 5 min、10 min、15 min、20min,之后用无菌水淋洗 3~4 次。

对即将成熟的蒴果用 0.1%升汞消毒 10min;叶片、幼嫩茎段的消毒,用 75%酒精处理 30s,0.1%升汞灭菌 7~8min,用无菌水淋洗 3~4 次。观察不同处理对鳞片污染的影响。

1.4.2 起始培养

取上述经过消毒的外植体鳞片分成上、中、下 3 段(根据鳞片大小也可分成上下 2 段),切割成 0.5cm²左右的小块,接种在附加不同浓度激素的 MS 培养基上。将生长素 NAA 定为 0.1mg/l,对细胞分裂素 6-BA 的浓度进行筛选,将 6-BA 的浓度定为 0.1mg/l、0.5 mg/l、1.0 mg/l、2.0 mg/l 4 个水平。

将叶片、幼嫩茎段(切分成 0.5~1.0cm)、种子分别接种在 MS+6-BA2.0mg/l+NAA0.1mg/l 培养基上。研究不同外植体对诱导愈伤组织及不定芽分化的影响及鳞片不同部位、不同激素组合对不定芽发生频率的影响。

1.4.3 增殖培养

将诱导出的不定芽切成单株接种到不同增殖培养基上,采用以下配方:MS+6-BA0.1mg/l、MS+6-BA0.5mg/l、MS+6-BA1.0mg/l、MS+6-BA2.0mg/l、MS+6-BA3.0mg/l、MS+6-BA4.0mg/l、MS+6-BA1.0mg/l+2-4D0.1mg/l、MS+6-BA1.0mg/l+2-4D0.2mg/l、MS+6-BA1.0mg/l+NAA0.1mg/l、MS+6-BA2.0mg/l+NAA0.1mg/l。

研究不同激素组合对鳞茎增殖的影响。

1.4.4 生根培养

将诱导分化的未生根的小鳞茎转入不同的生根培养基中,即 MS、1/2MS、MS+IBA0.1mg/l、MS+IBA0.5mg/l、MS+6-BA0.1mg/l+IBA1.0mg/l、MS+6-BA0.1mg/l+IBA2.0mg/l。统计在不同培养基上的生根情况。

1.4.5 试管苗的移栽

选择小鳞茎直径在 1cm 以上,叶 2 片以上,生根条数 3 条以上的健壮试管苗,将其放置在荫棚中,进行 3d 的闭瓶炼苗,随后移栽上盆,盆栽基质分别为:50%泥炭土+50%珍珠岩、泥炭土、普通培养土(腐叶土 1/3+园土 1/3+河沙 1/3)3 种,苗床温度为 22~28℃,空气相对湿度 85~90%,基质湿度 30~40%。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对鳞片污染率的影响

用无菌的吸水纸吸干鳞片表面的水分,将鳞片切分成上、中、下 3 组接种于培养基上,每瓶一片,经过一段时间后的观察,不同处理鳞片污染率不同(见表 1)。

表 1 不同消毒处理对鳞片污染率的影响

处理	接种瓶数	污染瓶数	污染率(%)
1	25	9	35
2	24	4	16.7
3	24	1	4.2
4	25	1	4.0

注:1、0.1%升汞灭菌 5min 2、0.1%升汞灭菌 10min 3、0.1%升汞灭菌 15min 4、0.1%升汞灭菌 20min

结果发现:污染率 1>2>3>4,因此试验过程中为降低组培苗的污染率,在对外植体灭菌过程中应采用 0.1%升汞灭菌 15~20min。

2.2 不同外植体对诱导愈伤组织及不定芽分化的影响

以鳞片、幼嫩茎段、种子、叶片为外植体,把它们分别接种在 MS+6-BA2.0mg/l+NAA0.1mg/l 的培养基中(见表 2)。

表 2 不同外植体对诱导愈伤组织及不定芽能力比较

材料	接种数	成芽数	形成愈伤组织数	诱导率(%)
鳞片	95	44	55	67.4
幼嫩茎段	9	1	3	33.3
种子	36	31	0	86.1
叶片	90	0	2	2.2

从表 2 中可以看出,不同外植体诱导分化能力

依次为种子>鳞片>幼嫩茎段>叶片。种子接种后经 3 周左右开始萌动、发芽,再经 3~4 周幼苗可长至 2cm 高,茎粗约 1mm 且诱导率非常高。鳞片接种 25d 左右陆续开始分化,部分鳞片先形成愈伤组织,然后分化出球状突起,随后长出不定芽,并迅速形成小鳞茎。但有部分鳞片没有明显愈伤组织形成,而且直接形成球状突起,最后形成小鳞茎。幼嫩茎段分节处出现淡黄色颗粒状突起。叶片基部先变为黄绿色,然后膨大成愈伤组织,但其诱导率极低。

2.3 外植体鳞片对诱导不定芽的影响

外植体接种后,大部分鳞片切块由白色变为淡紫红色,7d 后,鳞片变为绿色。以后进一步观察发现,没有变色的鳞片极少分化小鳞茎。25d 左右,部分鳞片腹面生理学基部出现黄绿色球状突起,再过 7d 左右球状突起长出不定芽,不定芽迅速形成小鳞茎。观察发现,小鳞茎基本上发生在鳞片腹面,而且多集中在生理学基部,生理学上部很少分化小鳞茎。还发现由于鳞片切块与培养基接触部位不同,产生不同现象,鳞片腹、背面接触培养基,大部分鳞片切口部位先变褐,20d 左右部分鳞片与培养基接触部位膨大,产生淡黄色不规则团状愈伤组织,10d 左右鳞片背部分化出黄绿色球状突起。若鳞片切块侧插入培养基中,则发现大部分鳞片腹面生理学基部先分化出小鳞茎。

2.3.1 不同激素组合对山丹鳞片分化小鳞茎的影响

为了测定外植体鳞片不定芽的诱导情况,主要应用的植物激素为细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA。细胞分裂素的生理作用是促进细胞的分裂和扩大,诱导芽的分化,促进侧芽的萌发生长,抑制衰老。生长素的生理作用是促进细胞伸长和细胞分裂,诱导受伤的组织表面一至数层细胞恢复分裂能力,形成愈伤组织,它还能配合一定的细胞分裂素共同诱导不定芽的分化。

将所选择的外植体鳞片接入 4 种不同激素组合的诱导培养基中进行培养。一般说来,激素浓度在一定范围内百合鳞片都能分化小鳞茎,要求并不严格,但激素配比不同,鳞片分化率和小鳞茎数量等方面存在一定差异(见表 3)。

从表 3 可见,4 种激素组合均可诱导百合鳞片分化小鳞茎,但各个组合的分化率不同,MS+6-BA0.1mg/l+NAA0.1mg/l 山丹鳞片分化率最高,其分化率可达 67.4%。普遍认为生长素和细胞分裂素以

6-BA 和 NAA 配合为佳,且细胞分裂素/生长素的比值较高时,诱导芽的分化,这时细胞分裂素起主导作用。

表 3 不同激素组合对山丹鳞片分化小鳞茎的影响

激素组合	接种数	分化数	分化率(%)
MS+6-BA0.1mg/l+NAA0.1mg/l	66	44	66.7
MS+6-BA0.5mg/l+NAA0.1mg/l	58	35	60.3
MS+6-BA1.0mg/l+NAA0.1mg/l	78	47	60.3
MS+6-BA2.0mg/l+NAA0.1mg/l	95	64	67.4

2.3.2 不同部位山丹鳞片对小鳞茎形成的影响

山丹鳞茎由多层鳞片抱合而成,不同部位山丹鳞片对小鳞茎的形成有不同影响(见表 4)。

表 4 不同部位山丹鳞片对小鳞茎形成的影响

鳞片部位	接种数	分化数	分化率(%)	分化芽数	形成愈伤数
1	14	2	14.3	10	2
2	14	7	50	5	7
3	18	12	66.7	22	9
4	18	15	83.3	23	14
5	16	14	87.5	32	11
6	11	8	90.9	19	9
7	4	4	100	11	3
上部	22	10	45.5	34	11
中部	47	30	63.8	55	25
下部	26	24	92.3	61	17

可以看出鳞片不同部位分化鳞茎能力的差别,虽然第 6、7 层分化率很高,但从鳞片分化小鳞茎数量看,第 5 层鳞片分化小鳞茎数最多,第 2 层最少。而且以基部最多,中部其次,上部最少。从外植体分化率看,自外向内、自上向下分化率不断增加,而且差别较大。试验过程中还观察到,同一处理,接种的外植体大,愈伤组织形成的早,且生长也较快,外植体过小(<0.3cm)易干枯死亡,同时发现外植体大的不仅容易诱导出愈伤组织,且能分化出不定芽。

2.4 不同继代培养基对山丹鳞茎增殖的影响

继代培养应用的中间繁殖体为诱导阶段形成的鳞茎及叶片,接入不同的增殖培养基中,培养 10d 左右,从转接幼茎基部形成新的不定芽,随后长成小鳞茎。试验采用了 10 种不同激素组合进行继代培养

(见表 5)。

表 5 不同继代培养基对山丹鳞茎增殖的影响

激素组合	接种数	不定芽数	增殖系数(不定芽数/接种数)
MS+6-BA0.1mg/l	54	31	0.57
MS+6-BA0.5mg/l	8	8	1
MS+6-BA1.0mg/l	60	48	0.8
MS+6-BA2.0mg/l	66	40	0.61
MS+6-BA3.0mg/l	66	24	0.36
MS+6-BA4.0mg/l	66	91	1.21
MS+6-BA1.0mg/l+2-4D0.1mg/l	28	51	1.82
MS+6-BA1.0mg/l+2-4D0.2mg/l	23	102	4.43
MS+6-BA1.0mg/l+NAA0.1mg/l	18	73	4.05
MS+6-BA2.0mg/l+NAA0.1mg/l	21	83	3.95

表 5 表明:在不加生长素 NAA 的条件下,鳞茎增殖率很低,虽然细胞分裂素 6-BA 的生理作用是诱导芽的分化,促进侧芽的萌发生长。但生长素 NAA 配合一定的细胞分裂素共同诱导不定芽的增殖系数明显高于只加细胞分裂素 6-BA 的增殖系数。从加入细胞分裂素与生长素组合来看,MS+6-BA1.0mg/l+2-4D0.2mg/l 组合增殖率为 4.43,但其培养基所培养的苗成丛状,纤细,且 2,4-D 价格相对较高。MS+6-BA1.0mg/l+NAA0.1mg/l 组合增殖率为 4.05,但苗长势良好,整齐度也较高。因此,从工厂化育苗的角度来考虑,拟采用 MS+6-BA1.0mg/l+NAA0.1mg/l 组合。

2.5 不同生根培养基对山丹试管苗生根率的影响

将继代的山丹小鳞茎切下转入生根培养基,6d 左右开始生根,过后调查 6 种生根培养基的生根情况(如表 6)。

从表 6 可看出,加生长素的 MS 培养基生根较多,且苗长势较好,其中 MS+IBA0.5mg/l 生根较多,且根粗,故选用其作为山丹试管苗的生根培养基。

2.6 不同基质对山丹试管苗成活率的影响

将试管苗移出 2~3d 后,开瓶炼苗 2d,转入荫棚栽植,移栽时小心倒出试管苗,用清水冲洗根部残留培养基,然后栽入 3 种基质中,基质用 1:500 多菌灵杀菌,移栽 10d 后调查成活率(见表 7)。

从表 7 可看出,3 种基质中山丹试管苗移栽均能成活,切成活率均很高。由于泥炭土营养丰富,疏松透气,所以苗长势健壮,叶色浓绿。

表 6 不同生根培养基对山丹试管苗生根率的影响

激素组合	接种 苗数	生根 苗数	生根 率(%)	平苗 根数	试管苗 长势
MS	15	8	53.3	4.6	根细,苗弱
1/2MS	10	6	60	5.3	根中粗,苗壮
MS+IBA0.1mg/l	14	11	71.4	7.9	根粗,苗壮
MS+IBA0.5mg/l	10	8	80	8.1	根较粗,苗壮
MS+6-BA0.1mg/l+IBA1.0mg/l	12	5	41.7	6.8	根较粗,苗弱
MS+6-BA0.1mg/l+IBA2.0mg/l	10	5	50	4.9	根细,苗弱

表 7 不同基质对山丹试管苗成活率的影响

移栽基质	移栽苗数	成活苗数	成活率(%)	苗长势
泥炭土	5	5	100	苗壮
50%泥炭土+ 50%珍珠岩	5	5	100	苗较壮
普通培养土	11	11	100	苗弱

3 结论

采用山丹进行组织培养可以在短期内获得大量小苗,解决栽培中种源较少的矛盾。

培养基中外源激素种类对比对山丹不定芽的诱

导和增殖影响较大,通过调整培养基中的外源激素的浓度,可使山丹不定芽的分化率达 67.4%,使不定芽以 4.43 的比例增殖,繁殖系数大。将鳞片分切成块再培养可显著增加小鳞茎分化数量,较大鳞片形成的小鳞茎数量较多。单个鳞片以基部分化能力最强,中部次之,上部分化能力最低。因此工厂化育苗拟采用中内层鳞片中部培养。试验结果表明:适宜山丹鳞片诱导不定芽的培养基为:MS+6-BA2.0mg/l+IBA0.1mg/l。鳞片最佳继代培养基为MS+6-BA1.0mg/l+IBA0.1mg/l,较适宜生根培养基为 MS+IBA0.5mg/l,生根率达 80%,平均每棵苗生根 8.1 条,根粗苗壮,移栽成活率高,试管苗移栽基质以泥炭土佳,10d 成活率可达 100%。

参考文献

- [1] 陈小兰,胡琼华,王红霞.金百合的离体快速繁殖.植物学通讯.2000.
- [2] 陈小兰,胡琼华,王红霞.通江百合的组织培养.植物学通讯.2000.
- [3] 罗凤霞,徐桂华,金丽丽,孙晓梅,朱明.新铁炮百合微繁殖的研究.沈阳农业大学学报.2000.
- [4] 王家福,陈振光.百合快速繁殖条件的优化.福建农业大学学报.1999.

(上接第 42 页)

大对国外信息的了解和交流。

3.9 课题立项前的检索除了解本国其它城市的科研情况,还至少应掌握世界同纬度、同类地区的情况,为课题的立项及推广提供更广阔的空间。

3.10 凡我院负责的课题及编辑的刊物,摘要部分必备中英两种文字,有利于我院科研成果的推广及与其他国家的交流。

我国科技工作的重要内容是加强国家创新体系建设,强化国家创新能力。而科技文献信息作为国家的战略资源,是国家创新体系的重要支撑和保障条件。充分利用信息化、网络化等现代技术,及时获取世界研究和发展前沿的最新成果,为园林科技工作

者跟踪和赶超世界先进水平提供强有力技术支撑,从而达到提高园林行业技术进步。

参考文献

- [1] 卢长利,郭俊华.信息技术的投资价值研究[J].科研管理,2002,23(5):16~19.
- [2] 邱均平,马海群.知识管理与信息管理(OL).http://www.CHINACI.COM, 2001~12~04.
- [3] 朱涛,姜丹.现代科技文献信息机构评价模型研究[J].科研管理,2002,23(6):107~112.
- [4] 翟杰全.国家科技传播体系内的知识交流研究[J].科研管理 2002,23(2)5~12.