

# 大花卷丹离体培养快速繁殖体系的建立

石 印, 向圆媛, 孙 明\*

(北京林业大学 园林学院, 北京 100083)

**摘要:** 以大花卷丹为试材, 以 MS 培养基为基础培养基, 附加不同种类和质量浓度的植物生长调节剂(6-BA、NAA), 研究大花卷丹离体培养快速繁殖技术。结果表明, 鳞片组培快繁的最佳取材部位是中层鳞片。大花卷丹不定芽分化最佳培养基为 MS+NAA 0.3 mg/L+6-BA 1.5 mg/L, 其分化率可达 76.7%。最佳增殖培养基为 MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L, 增殖系数达到 4.91; 最佳生根培养基为 MS+IAA 0.2 mg/L, 生根率达到 96.7%, 平均每苗根数可达 8.8 条。移栽前期最佳的基质配比为河沙: 草炭土=1:1, 成活率达到 76.0%。

**关键词:** 大花卷丹; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S644.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)01-0098-04

## Establishment of *in vitro* Rapid Propagation System of *Lilium leichtlinii*

SHI Yin, XIANG Yuan-yuan, SUN Ming\*

(College of Landscape & Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Using MS medium as basic medium, the influences of different concentration hormones (6-BA, NAA) on the tissue culture of *Lilium leichtlinii* were studied in order to explore the suitable level of hormones and increase the efficiency of tissue culture. Transplantation of *Lilium leichtlinii* was also studied to establish a high-frequency propagation system. The result showed that the optimal explant was the scale in the middle and MS medium with NAA 0.3 mg/L and 6-BA 1.5 mg/L was optimal for induction of adventitious shoots with an induction rate of 76.7%. The optimum multiplication medium was MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L, with the coefficient of multiplication being 4.91. The optimum rooting medium was MS supplemented with IAA 0.2 mg/L, with rooting rate of 96.7% and average root number of 8.8. Transplantation survival rate was high on the transplanting medium of sand: perlite=1:1, up to 76.0%.

**Key words:** *Lilium leichtlinii*; tissue culture; rapid reproduction

百合是世界著名的切花、盆花作物和重要景观植物, 全世界百合属植物有 100 多种<sup>[1]</sup>。我国百合资源丰富, 其中很多野生种都具有良好的抗性和极高的观赏价值, 是切花、盆花的重要育种亲本, 有的则可以直接应用于园林景观中。大花卷丹(*Lilium leichtlinii*)主要分布于吉林、辽宁、河北、陕西等省。夏季开花, 花冠红色, 2~10 朵排成总状花序, 具紫色斑点, 下垂, 抗性优良且具有较高观赏价值, 适合

园林应用<sup>[2]</sup>。在一些地区, 由于人工采挖, 野生大花卷丹居群受到严重的破坏, 对大花卷丹进行高效的人工繁殖是减少野生资源破坏, 满足实际需求的有方法。但目前针对大花卷丹繁殖的研究报道还较少<sup>[6-12]</sup>, 在离体培养快速繁殖方面更是未见报道。鉴于此, 以大花卷丹的鳞片为外植体, 对芽分化、增殖、生根及移栽进行较系统的研究, 以选择最佳分化、增殖及生根培养基, 建立离体培养快速繁殖体

收稿日期: 2012-09-20

基金项目: “十二五”科技支撑计划项目(2012BAD01B07); 中央高校基本科研业务费专项(TD2011-27); 北京林业大学大学生科研训练计划项目(SRTP)

作者简介: 石 印(1990-), 女, 安徽芜湖人, 在读硕士研究生, 研究方向: 花卉栽培。E-mail: 68400198@qq.com

\* 通讯作者: 孙 明(1980-), 男, 山东淄博人, 副教授, 博士, 主要从事园林植物种质资源与育种研究。

E-mail: sun.sm@163.com

系,为大花卷丹的资源保护、可持续利用及种苗生产提供可靠的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料和地点

大花卷丹采自北京林业大学小汤山科研基地,选取较新鲜的大花卷丹的鳞茎,周径约 2.5~3.5 cm。本试验研究部分在北京林业大学国家花卉工程技术研究中心实验室的组织培养室内进行,扩繁生产部分在北林科技种业公司温室进行。在取材和培养基的选用方面参考文献[3,5,8,10]的内容。

### 1.2 试验方法

1.2.1 鳞片灭菌处理 先将种球在 75%的乙醇中浸泡 30 s,取出后用清水冲洗干净,由外至内剥离鳞片。种球的 1~2 层作为外层,3~5 层作为中层,其余作为内层。用洗洁精清洗鳞片,并于流水中冲洗 30 min 后放入无菌操作台中,分别灭菌。首先用 75%的乙醇浸泡 30 s,再用无菌水清洗,然后用 5%的次氯酸钠溶液浸泡 20 min,之后用无菌水清洗 5 次,最后将水倒出,鳞片备用。

1.2.2 不定芽的诱导分化 将灭菌后的鳞片放在无菌滤纸上切成 0.8 cm<sup>2</sup> 的小块,并将有损伤的组织切除,分外、中、内层分别接种到添加 NAA(0.1、0.3、0.5 mg/L)和 6-BA(1.0、1.5 mg/L)的 MS 培养基上,使外植体切面与培养基充分接触。每瓶接种 1 片鳞片,每个处理接 30 瓶,重复 3 次。培养基 pH 值为 5.8,含蔗糖 3%、琼脂 0.7%。培养室温度 (23±2) °C,光照强度 1 500~3 000 lx,光照时间为 14 h/d。20 d 后调查接种材料的污染情况、外植体不同接种部位诱导分化情况等,30 d 后统计鳞片分化出的不定芽个数,计算诱导率。为确保试验结果可靠,所有试验重复 3 次。

1.2.3 丛生芽增殖培养 将诱导分化出的较健壮的丛生芽在无菌条件下分离成单株,转接到不同配比的增殖培养基上,以 MS 培养基为基础培养基,每种培养基接种 35 块外植体,培养条件同上,30 d 后观察增殖的情况并统计结果。

1.2.4 生根培养 增殖后的丛生芽株高约 2 cm 左右时,选出较强壮的丛生芽,将其分离成单株,转接入不同的生根培养基中。以 MS 培养基为基础培养基。每瓶接种 2 株单芽,每个处理 30 瓶。培养条件同上,20 d 后记录生根情况并统计结果。

1.2.5 炼苗及移栽方法 对生根培养后根系发达的幼苗进行炼苗,将装有组培苗的培养瓶置于室温条件下,逐渐把封口膜打开。炼苗 1 周后,将试管苗取出,统计生根数和生根率,用自来水将附在幼苗根

上的培养基冲洗干净,晾干后移入灭过菌的基质中。每种移栽基质处理均栽种 50 盆,每盆 1 株。栽好后浇透水,置于有散射光的阴凉处,1 周后恢复正常光照,40 d 后统计成活率。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同部位鳞片对大花卷丹不定芽分化效果的影响

从表 1 可以看出,大花卷丹鳞片的存活率表现为外层<中层<内层,外层鳞片全部死亡,中层鳞片与内层鳞片的存活率基本相同,内层最高,达到 42%。外层鳞片直接接触外界环境,易受到外界机械损伤,另外,空气、土壤中的细菌和真菌直接感染外层鳞片,使其受污染致死的几率大。本试验接种的大花卷丹外层鳞片,几乎在接种 1 周左右全部污染死亡;而中层与内层鳞片由于被外层鳞片包被保护,受感染的几率相对小。利用中层鳞片诱导不定芽分化时,接种的鳞片转绿较快,不定芽诱导速度快。这可能是由于中层鳞片比内层鳞片大且厚,其所能提供的营养物质丰富,更有机会受到外界环境的影响诱导生成不定芽<sup>[3-4]</sup>。因此接种大花卷丹诱导不定芽分化的最优选择是中层鳞片。

表 1 大花卷丹不同部位鳞片存活率及不定芽分化效果比较

鳞片位置	存活率/%	鳞片状态
内层	42	污染少,鳞片转绿慢,不定芽诱导速度慢
中层	40	污染少,鳞片转绿较快,不定芽诱导速度快
外层	0	污染大,几乎在接种 1 周左右全部死亡

### 2.2 不同质量浓度植物生长调节剂处理对大花卷丹鳞片不定芽分化的影响

大花卷丹鳞片初次接种后大约 6 周,在鳞片接近切口的附近开始出现白色或淡黄色小点,之后小点逐渐膨大长成绿色或浅绿色的鳞茎芽。鳞茎芽数量逐渐增多变大,多数集中在鳞片边缘,中间较少。从表 2 可以看出,6-BA 质量浓度较高时,愈伤组织形成较多,但不同的 NAA 质量浓度会影响不定芽的质量,NAA 质量浓度达到 0.5 mg/L 时,虽然愈伤组织形成较多,但是分化出的丛生芽太过密集,单芽质量差(1 号处理培养基);当 NAA 和 6-BA 质量浓度均低时(6 号处理培养基),可以形成较多愈伤组织,但是再生的不定芽较弱。2 号处理培养基接种的鳞片得到的不定芽数量最多,不定芽诱导率最大,达到 76.7%,并且愈伤组织多,鳞片分化出的不定芽叶色浓绿、叶片展开,芽体健壮。因此,MS+NAA 0.3 mg/L+6-BA 1.5 mg/L 是大花卷丹鳞片不定芽分化最佳培养基。

表 2 不同质量浓度植物生长调节剂处理对大花卷丹鳞片不定芽分化的影响

处理编号	植物生长调节剂及其质量浓度/(mg/L)	不定芽诱导率/%	愈伤组织及芽的生长情况
1	NAA 0.5+6-BA 1.5	60.0	愈伤组织多,芽团块状,难分离生长
2	NAA 0.3+6-BA 1.5	76.7	愈伤组织多,芽壮
3	NAA 0.1+6-BA 1.5	40.0	愈伤组织一般,芽长势一般
4	NAA 0.5+6-BA 1.0	43.3	愈伤组织一般,芽长势一般
5	NAA 0.3+6-BA 1.0	26.7	愈伤组织少,芽瘦弱
6	NAA 0.1+6-BA 1.0	53.3	愈伤组织较多,芽较弱

### 2.3 不同质量浓度植物生长调节剂处理对大花卷丹不定芽增殖的影响

从表 3 可以看出,增殖的芽数与 6-BA、NAA 的质量浓度配比有密切关系。NAA 质量浓度为 0.2 mg/L 时,6-BA 在中间质量浓度(2.0 mg/L)的激素组合,增殖芽数最多,增殖系数达到 4.91; NAA 质量浓度为 0.5 mg/L 时,随着 6-BA 质量浓度的升高,增殖芽数逐渐增多,在 6-BA 3.0 mg/L 时增殖系数达到 3.46。另外,6-BA 质量浓度相同,NAA 的质量浓度过高会抑制芽的增殖。经过 30 d 的培养,3 号处理增殖培养基的增殖系数最高,达 4.91,苗高多数集中在 6~7 cm,小鳞茎明显膨大,增殖苗呈现翠绿色,生长良好。因此,MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 是大花卷丹增殖的最佳培养基。

表 3 不同质量浓度植物生长调节剂处理对大花卷丹不定芽增殖的影响

处理编号	植物生长调节剂及其质量浓度/(mg/L)	增殖芽数/个	增殖系数
1	NAA 0.2+6-BA 1.5	95	2.71
2	NAA 0.5+6-BA 1.5	73	2.09
3	NAA 0.2+6-BA 2.0	172	4.91
4	NAA 0.5+6-BA 2.0	114	3.26
5	NAA 0.2+6-BA 3.0	140	4.00
6	NAA 0.5+6-BA 3.0	121	3.46

### 2.4 不同质量浓度 IAA 对大花卷丹生根的影响

将丛生芽转入生根培养基后,起初从大花卷丹鳞茎球底部或侧面可以看到有白色突起,然后白色突起逐渐长长,增粗。经过 20 d 的培养,2 号处理培养基(即 MS+IAA 0.2 mg/L)大花卷丹生根率高达 96.7%(表 4),是最佳生根培养基。

表 4 不同质量浓度 IAA 对大花卷丹生根的影响

处理编号	IAA 质量浓度/(mg/L)	接种数/株	生根苗数/株	生根率/%	平均生根数/条
1	0	60	52	86.7	4.5
2	0.2	60	58	96.7	8.8
3	0.5	60	50	83.3	6.3

### 2.5 不同基质对大花卷丹试管苗移栽成活率的影响

移栽基质直接影响试管苗的移栽成活率。培养 40 d 后,3 号基质(河沙:草炭土=1:1)中大花卷丹试管苗的成活率可达 76.0%(表 5),是最适合大花卷丹试管苗移栽的基质组合。

表 5 不同基质对大花卷丹试管苗移栽成活率的影响

基质编号	成分比例	移栽株数/株	成活株数/株	成活率/%
1	草炭:珍珠岩=1:1	50	26	52.0
2	河沙:珍珠岩=1:1	50	23	46.0
3	河沙:草炭土=1:1	50	38	76.0

## 3 结论与讨论

大花卷丹快速繁殖体系的建立,主要是依靠组织培养的手段,最终通过炼苗得到能适应一般环境的幼苗,其优点是利用较少的外植体材料在短时间内获得大量品质优良的脱毒再生植株,整个过程操作方便、快捷、节省人力物力,且不受外界环境条件的影响<sup>[8]</sup>。大花卷丹外部鳞片由于机械损伤,本身容易带菌,污染率较高,在相同的灭菌时间后,越往里层,鳞片的污染率越低<sup>[9-10]</sup>。本试验在启动阶段,使用的生长素和细胞分裂素分别是 NAA 和 6-BA,筛选出的最佳配比是 NAA 0.3 mg/L+6-BA 1.5 mg/L,在这个配比下不定芽诱导率可达 76.7%。最佳增殖培养基为 NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L,培养 20 d 即可增殖出大量丛生芽,小鳞茎膨大,叶子健壮,有少量根生出。最佳生根培养基为 MS+IAA 0.2 mg/L,培养 20 d 后有大量根生出。炼苗后对幼苗进行移栽,大花卷丹的移栽基质要求疏松,以便于植株的生长与扎根,还要含有生长所需的各种营养元素以及合适的 pH 值。本试验筛选的最佳移栽基质是河沙:草炭土=1:1,试管苗成活率达到 76.0%。说明合理的透气和保水条件对于幼苗生长的重要性,草炭土营养丰富,各种元素含量高,有较好的保水性,而河沙细致、疏

松,但营养成分不高,二者配合成为适合大花卷丹移栽的基质<sup>[3]</sup>。本试验结果对大花卷丹的开发利用和工厂化育苗有一定的参考意义。

#### 参考文献:

- [1] 龙雅宜. 百合,球根花卉之王[M]. 北京:金盾出版社, 1999.
- [2] 肖智,刘慧媛. 大花卷丹的经济价值及人工栽培[J]. 人参研究,2004(1):29-31.
- [3] 陈丽静,马爽,李丽丽,等. 东方百合“索蚌”离体培养快速繁殖体系建立[J]. 西南农业学报,2010,23(5):1652-1655.
- [4] 庞新霞. 东方百合离体培养与试管鳞茎诱导的研究[D]. 南宁:广西大学,2008:1-23.
- [5] 阮少宁,杨华,梁一池,等. 香水百合组织培养的试验研究[J]. 福建林学院学报,2001,21(2):142-145.
- [6] 潘佑找,赵金萍,曾祥秒,等. 野生乳头百合组织培养及快速繁殖研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(14):8256-8258.
- [7] 张晨,张美恒,樊金萍. 东方百合元帅“Acapulco”的组织培养及快繁体系的建立[J]. 作物杂志,2011(3):60-62.
- [8] Marinangeli P A, Hernandez L F, Pellegrini C P, *et al.* Bulblet differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum*[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2003, 128(3):324-329.
- [9] 孟杨,潘佑找,贾姗姗,等. 湖北百合的组织培养技术研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(17):4247-4248.
- [10] 赵强,李庆典,赵玉岭. 青岛百合的组织培养技术研究[J]. 北方园艺,2007(6):213-214.
- [11] 张鹏,巩延革,段祖安. 卷丹百合组培快繁技术研究[J]. 山东林业科技,2009(4):73-74.
- [12] 邵小斌,周翔,徐艳,等. 野生百合——卷丹的组织培养初探[J]. 天津农业科学,2010,16(4):18-19.
- (上接第 89 页)
- [2] 徐程,詹忠根,廖苏梅. 8 种不同地域铁皮石斛农艺性状及多糖和纤维素分析[J]. 浙江大学学报:理学版, 2008,35(5):576-579.
- [3] 金银兵. 铁皮石斛的生物学特性与开花授粉技术研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(11):5280-5282.
- [4] Goins G D, Yorio N C, Sanwo M M, *et al.* Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting[J]. J Exp Bot, 1997, 48:1407-1413.
- [5] 赵科,罗新宇,崔向中,等. CCFL 荧光粉的现状及其发展趋势[J]. 稀有金属,2008,32(4):245-251.
- [6] Tanaka M, Norikane A, Watanabe T. Cold cathode fluorescent lamps (CCFL) revolutionary light source for plant micropropagation[J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2009, 23:1497-2153.
- [7] 苏云飞. 细管径冷阴极荧光灯(CCFL)的研发[J]. 照明工程学报,2001,12(3):36-37.
- [8] Ding Y, He S L, Jaime A T D S, *et al.* Effects of a new light source (cold cathode fluorescent lamps) on the growth of tree peony plantlets *in vitro* [J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125:167-169.
- [9] 闫新房. 新型组培光源的开发及其在植物组织培养中的应用[D]. 郑州:河南农业大学,2009.
- [10] 张志良,翟伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2004.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.
- [12] Huan L V T, Tanaka M. Effects of red and blue light-emitting diodes on callus induction, callus proliferation, and protocorm-like body formation from callus in cymbidium orchid [J]. Environ Control in Biol, 2004, 42(1):57-64.
- [13] 刘晓英,徐志刚,常涛涛,等. 不同光质 LED 弱光对樱桃番茄植株的形态和光合性能的影响[J]. 西北植物学报,2010,30(4):725-732.
- [14] 唐大为,张国斌,张帆,等. LED 光源不同光质对黄瓜幼苗生长及生理生化特性的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2011,46(1):44-48.
- [15] 王忠. 植物生理学[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [16] 邱秀茹,焦学磊,崔瑾,等. 新型光源 LED 辐射的不同光质配比光对菊花组培苗生长的影响[J]. 植物生理学通讯,2008,44(4):661-664.
- [17] 徐凯,郭延平,张上隆. 不同光质对草莓叶片光合作用和叶绿素荧光的影响[J]. 中国农业科学,2005,38(2):369-375.