

王 凯,王凯琪,常 裕,等. 南泥湾野生山丹丹组培快繁技术[J]. 江苏农业科学,2019,47(14):59-62.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.013

南泥湾野生山丹丹组培快繁技术

王 凯¹,王凯琪¹,常 裕¹,孙志宏^{1,2},齐向英¹

(1. 延安大学,陕西延安 716000; 2. 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:为建立南泥湾野生山丹丹快繁和植株再生系统,并进一步为山丹丹试管内育种提供材料,以南泥湾林场后场采集到的野生山丹丹的鳞茎为材料,研究不同浓度 6-BA 对南泥湾野生山丹丹启动培养的影响、不同 6-BA 与 IBA 浓度组合对其继代培养的影响、IBA 浓度对其组培苗生根的影响,并对生根苗进行了炼苗移栽。结果表明,(1)南泥湾野生山丹丹启动培养的较佳培养基为 MS + 白砂糖 30 g/L + 琼脂 5.5 g/L + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 活性炭 0.2 g/L,9 d 转绿,21 d 分化出了小鳞茎,分化率为 84%;(2)较佳继代培养基为 MS + 白砂糖 30 g/L + 琼脂 5.5 g/L + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L,培养 25 d 后,繁殖率(繁殖系数)为 7.3;(3)较佳生根培养基为 1/2 MS + 白砂糖 30 g/L + 琼脂 5.5 g/L + IBA 0.3 mg/L,培养 25 d 后,生根率为 84%,以上培养基 pH 值均为 6.8。用生根培养的山丹丹组培苗炼苗移栽成活率达到了 100%。

关键词:野生山丹丹;鳞茎;组织培养;植株再生;6-BA

中图分类号: S682.2⁺90.4⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2019)14-0059-03

山丹丹,学名山丹(*Lilium pumilum* DC.),为百合科百合属多年生球根花卉。山丹丹鳞茎含淀粉,供食用,也可入药,有滋补强壮、止咳祛痰、利尿等功效。花鲜红色,下垂。山丹丹是一种抗寒性很强的优良的百合属种质资源,可用于培育抗寒耐旱的百合花品种^[1-2]。南泥湾野生山丹丹(图 1)种质是延安大学山丹丹大学生创业团队 2013—2015 年在南泥湾林场进行种质资源调查时发现的。南泥湾野生山丹丹种质相较于劳山种质有花色为橙红色、上仰的特异性。山丹丹在自然状态下繁殖系数小,人们对其保护意识不强、过度采挖以及生态环境的变化,导致野生山丹丹品质退化严重、数量稀少。

组织培养技术可以有效提高山丹丹繁殖效率、改善品质退化等。目前,已经建立山丹丹离体快繁再生体系,并对山丹丹组培苗的继代培养、生根培养及移栽条件进行研究^[3-5]。陕北地区山丹丹组培快繁研究仅有劳山山区的种质^[6],南泥湾种质并无报道。我们采用组培快繁的方法对南泥湾野生山丹丹进行快速大量繁殖,以期建立南泥湾野生山丹丹快繁和植株再生系统,解决该种质数量稀少的问题,并进一步为山丹丹试管内育种提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为 2015 年 5 月采自陕西省延安市宝塔区南泥湾林场后场的 8 颗野生山丹丹鳞茎。

1.2 方法

收稿日期:2019-04-17

基金项目:国家自然科学基金(编号:31650007);国家农业农村部质量安全监管项目(编号:181821301092371070)。

作者简介:王 凯(1992—),男,陕西宝鸡人,硕士研究生,主要从事细胞与组织工程技术研究。E-mail:18829716810@139.com。

通信作者:齐向英,副教授,硕士生导师,研究方向为山丹丹资源保育、育种与生物科普。E-mail:15991582581@139.com。

1.2.1 启动培养 将鳞茎外层腐烂鳞片剥除,鳞盘朝上用自来水冲洗 2 min,用吸水纸吸干表面水分,放入超净工作台备用。再将启动培养基、接种工具、0.1% HgCl₂、吐温 20 以及 75% 无水乙醇放入超净工作台备用,打开紫外灯和空气快速杀菌消毒机(型号:LH-2000)灭菌 30 min 之后,在超净工作台上将鳞片剥下,用 75% 无水乙醇将鳞片浸泡 30 s,无菌水清洗 1 min。转入 0.1% HgCl₂ 加 1 滴吐温 20,振荡 8 min,无菌水清洗 3 次,每次 2 min,再用无菌滤纸吸干表面水分后的鳞片接种于启动培养基上。每瓶接种 1 个鳞片,每个激素水平接种 13 瓶。先散光培养 7 d,防止其失水褐化,后转入光下培养。培养室温度设置在(25±2)℃,光照时间 12 h/d,光照度(1 500±200) lx,相对湿度 60%~75%。



图1 南泥湾野生山丹丹

启动培养基为:MS 基本培养基 + 白砂糖 30 g/L + 琼脂 5.5 g/L,pH 值为 6.8。6-BA 浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5 mg/L 共 4 个水平,并加入 NAA 0.01 mg/L 和活性炭 2 mg/L。

1.2.2 继代培养 将初代培养中诱导出的小鳞茎,待其芽苗生长、抽出肥绿叶片之后,接入继代培养基上进行培养,每瓶接入 1 个小鳞茎,每处理接 10 瓶,以 30 d 为 1 个培养周期。培养温度(24±2)℃,光照时间 12 h/d,光照度(1 500±200) lx,相对湿度 60%~75%。

继代培养基为:MS 基本培养基 + 白砂糖 30 g/L + 琼脂

5.5 g/L, pH 值为 6.8。使用 6-BA 浓度 0.8、1.0、1.2、1.4 mg/L 共 4 个水平, IBA 浓度 0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L 共 4 个水平的 2 因素 4 水平试验。

1.2.3 生根培养 挑选生长健壮、无污染的继代苗转接进生根培养基, 避光培养 7 d 后转入光下培养。生根培养基: 1/2 MS + 白砂糖 30 g/L + 琼脂 5.5 g/L, pH 值为 6.8, IBA 浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L 共 4 个水平。培养温度 (24 ± 2) °C, 光照时间 12 h/d, 光照度 (1 500 ± 200) lx, 相对湿度 60% ~ 75%。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 6-BA 对山丹丹启动培养的影响

接种后 4 个浓度处理的污染率分别为 0%、7%、0%、7% (表 1), 均可满足试验需求。鳞片在启动培养基上 9 d 左右呈现出转绿情况, 14 d 左右边缘呈现白色颗粒状突起, 21 d 左右突起的部分分化出小鳞茎 (图 2), 随后不断长出叶片。每个鳞片上分化出了 4 ~ 8 个小鳞茎。启动培养中统计结果

表 1 启动培养结果

6-BA 浓度 (mg/L)	接种鳞片数 (个)	污染率 (%)	成活数 (个)	转绿数 (个)	转绿率 (%)	出芽鳞片数 (个)	出芽率 (%)
0.1	13	0	6	4	30	2	15
0.5	13	7	10	7	53	6	46
1.0	13	0	13	12	92	11	84
1.5	13	7	11	9	69	9	69

注: 转绿率 = (转绿的外植体数/接种的外植体数) × 100%; 出芽率 = (出芽的外植体数/接种的外植体数) × 100%; 污染率 = (污染数/接种数) × 100%。

2.2 6-BA 与 IBA 对山丹丹继代培养的影响

2.2.1 6-BA 与 IBA 组合对继代培养的影响 继代培养 15 d 左右材料均分化出含有鳞片的叶 (图 3), 25 d 时统计新生出芽数 (以 2 叶片中间所夹的生长点为准), 增殖系数见表 2, 不同处理下增殖系数呈现出不同的变化。F₆ 处理下新生芽数最多, 为 73 个, 增殖系数达到最大, 为 7.3。其次为 F₇ 处理, 新生芽有 69 个, 增殖系数为 6.90。再其次为 F₅ 处理, 新生芽有 52 个, 增殖系数为 5.2。最差的是 F₁ 处理, 只分化出 3 个新芽, 增殖系数也只有 0.30。可见 F₆ 处理下即 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L 的 6-BA 与 IBA 组合较其他组合更有利于南泥湾地区山丹丹组培的继代培养。



图3 组培苗继代培养

2.2.2 6-BA 与 IBA 各自对继代培养的影响 在不同培养基中, 随着 6-BA 浓度的增大, 增值系数先增加后减小, 在 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时达到最大值, 为 5.70。随着 IBA

(表 1) 表明, 不同浓度 6-BA 的培养基中, 鳞片的分化情况不同, 总体为先升高后降低。转绿率, 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时最高, 1.5 mg/L 时次之, 0.1 mg/L 时最低。出芽率, 当 6-BA 在 1.0 mg/L 浓度时最高, 1.5 mg/L 浓度时次之, 0.1 mg/L 时最低。所以认为在 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时对南泥湾地区山丹丹启动培养效果好。

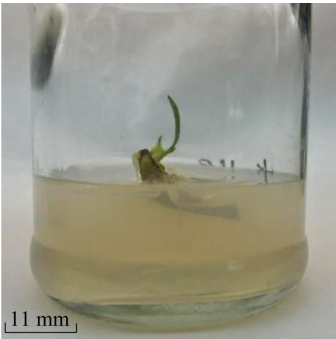


图2 组培苗启动培养

表 2 继代培养结果

序号	A: 6-BA 浓度 (mg/L)	B: IBA 浓度 (mg/L)	A × B	增殖系数	新生芽数
F ₁	0.8	0.1	1	0.30	3
F ₂	0.8	0.2	2	0.50	5
F ₃	0.8	0.3	3	0.90	9
F ₄	0.8	0.4	4	1.20	12
F ₅	1.0	0.1	1	5.20	52
F ₆	1.0	0.2	2	7.30	73
F ₇	1.0	0.3	3	6.90	69
F ₈	1.0	0.4	4	3.40	34
F ₉	1.2	0.1	1	2.20	22
F ₁₀	1.2	0.2	2	2.60	26
F ₁₁	1.2	0.3	3	2.30	23
F ₁₂	1.2	0.4	4	1.80	18
F ₁₃	1.4	0.1	1	1.10	11
F ₁₄	1.4	0.2	2	1.20	12
F ₁₅	1.4	0.3	3	1.00	10
F ₁₆	1.4	0.4	4	0.70	7
k ₁	0.72	2.20			
k ₂	5.70	2.90			
k ₃	2.22	2.77			
k ₄	1.00	1.77			
R	4.98	1.13			

注: 增殖系数 = 新生芽数 (以 2 叶片中间所夹的生长点为准) / 接种芽数。

的浓度增大, 增值系数在 0.2 mg/L 时达到最大, 为 2.90。这

2 种外源激素对继代培养的方差分析结果见表 3,6-BA 的 F 值为 23.92,大于临界值 $F_{0.05}$,所以 6-BA 的影响达到显著水平;IBA 的 F 值为 0.18,未达显著水平。

表 3 不同激素浓度的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	临界值
6-BA	62.74	3	20.91	23.92	$F_{0.05}=9.28$
IBA	3.28	3	1.09	0.18	$F_{0.01}=29.46$
误差	17.48	3	5.82		
总和	73.23	15			

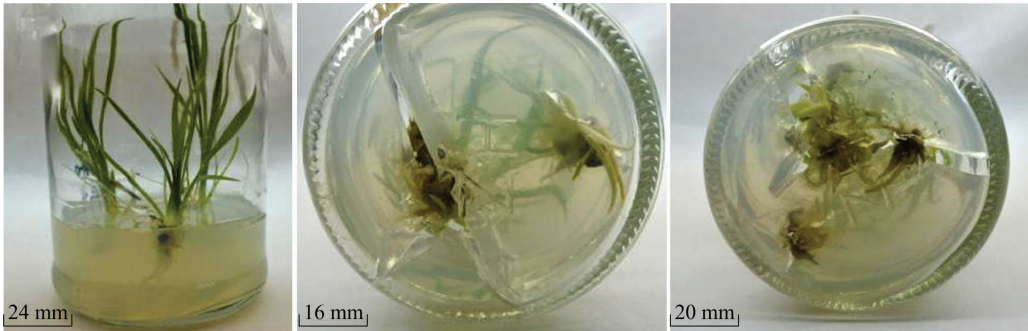


图 4 组培苗生根培养

表 4 生根培养结果

IBA 浓度 (mg/L)	生根率 (%)	平均根长 (cm)	平均根数 (条)
0.1	54	2.82	2.4
0.2	71	2.73	3.1
0.3	84	3.22	5.3
0.4	31	2.37	4.1

注:生根率=(生根苗数/接种的总苗数)×100%。

3 炼苗移栽

3.1 炼苗

用高锰酸钾溶液对栽培工具浸泡消毒。将生根培养获得的组培苗挑选长出 5~7 张叶子、叶片最低高度达 5 cm、生根数达 5 条以上、根长达到 4 cm 以上的生根苗进行炼苗。先将生根苗连同培养瓶一起置于移栽设施中放置 7 d,然后打开瓶口再放置 2~3 d。

3.2 移栽

将炼苗后成活的生根苗取出,清洗掉多余的培养基,定植在营养钵内,每个营养钵装栽培基质 100 g,栽种 1 株生根试管苗(图 5)。移栽后每 7 d 浇 1/2MS 大量营养液 1 次。空气湿度保持在 80%~90%,遮光率 50%,光照度(1 000±500) lx,环境温度控制在 22~26℃。移栽过程每天观察植株的生长情况,在小苗管理期间要经常喷水,防止烂根。每隔 2~3 周追 1 次稀薄液体肥料,定期喷洒杀菌剂,预防病害发生。经 2 个月的管理,待小苗长出 5 对以上新叶后即移栽成活。调查结果表明,成活率为 100%。

4 讨论与结论

启动培养是否成功与外植体选择有很大关系。马永红等认为,以山丹丹器官作为外植体时分化能力由大到小为种子>鳞片>幼嫩茎段>叶片^[7]。鉴于鳞片诱导不受季节因

2.3 IBA 浓度对山丹丹组培苗生根的影响

将继代培养获得的组培苗接种在 IBA 浓度不同的生根培养基上,10 d 观察到山丹丹鳞片基部有乳白色颗粒状的愈伤组织形成,然后分化出根(图 4)。25 d 后统计结果见表 4,显示所有 IBA 浓度下都有根生成,且 IBA 浓度对生根率、根长、生根条数和根的形态有影响。在 IBA 浓度为 0.3 mg/L 的水平下生根率达到最高,为 84%,平均根长达到 3.22 cm,平均根数 5.3 条,均优于其他 3 个水平;根的形态为基部膨大、端部细长。

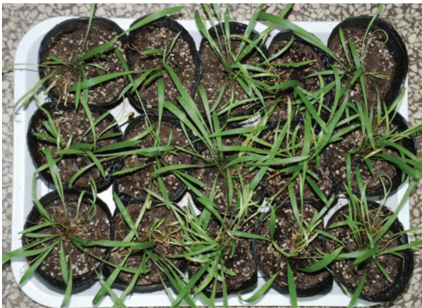


图 5 组培苗移栽

素影响,本次试验选用南泥湾野生山丹丹鳞片进行诱导,发芽率达 84%。鳞片易于诱导、繁殖系数高,但其后期污染率较高,要及时转入新的培养基。刘冬云等筛选适合山丹丹的启动培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L^[8-9]。本试验筛选的启动培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L,其中差异可能由材料的生态类型引起,还有待进一步研究。影响山丹丹生长发育的重要因素之一是植物生长调节剂的种类和浓度。van Aartrijk 等认为,低浓度生长素和高浓度细胞分裂素的组合对百合鳞片分化有促进作用^[10]。本试验筛选出有利于南泥湾山丹丹继代培养的外源激素浓度为 1.0 mg/L 6-BA 与浓度为 0.2 mg/L 的 IBA 组合,验证了该结论。本试验继代培养中,对不定芽的增殖有决定性作用的是细胞分裂素,而生长素对不定芽叶片的生长分化有至关重要的影响。高浓度 6-BA、低浓度 IBA 的培养基易于分化不定芽,而在一定的 IBA 浓度范围内,增殖的芽数随着 6-BA 浓度的提高而增长,但芽之间变得越发紧凑,适当增加 IBA 的浓度,不定芽叶片伸张,鳞茎也有所膨大。诱导生根一般需要降低无机盐浓度,常使用低浓度的 MS 培养基^[11],本次使用 1/2MS 诱导出了根,但生根培养基中 IBA 浓度不宜过高,否则会产生愈伤组织,再在愈伤组织下面生出根,这样的根容易掉落,不利于移栽。

李 双, 向 涛, 周海峰, 等. 鲤疱疹病毒 II 型 ORF72 基因克隆、蛋白原核表达和抗体制备[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14): 62–65.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.014

鲤疱疹病毒 II 型 ORF72 基因克隆、蛋白原核表达和抗体制备

李 双¹, 向 涛¹, 周海峰¹, 吴 霆^{1,2}, 顾 伟¹, 王 文¹, 孟庆国¹

(1. 南京师范大学生命科学学院/江苏省水生甲壳动物病害重点实验室, 江苏南京 210023;

2. 江苏省宝应县水生动物疫病预防控制中心, 江苏宝应 225800)

摘要: 异育银鲫作为我国重要的淡水经济鱼类, 其鳃出血病为主要病害, 并造成重大经济损失, 该病病原为鲤疱疹病毒 II 型 (cyprinid herpesvirus II, CyHV-2)。目前, 研究主要在该病的检测和病理方面, 对于免疫学检测方面研究较少。本研究根据 CyHV-2 ORF72 基因序列设计了 1 对特异性引物, 利用患病异育银鲫肾脏 DNA 作为模板, 通过 PCR 扩增得到 CyHV-2 ORF72 基因全长, 该基因序列全长为 1 113 bp, 可编码 370 个氨基酸的蛋白。该基因与 pET-28a 表达载体连接构建重组原核表达载体 pET-ORF72 转入大肠杆菌中, 经 IPTG 诱导表达得到了分子量约为 45 ku 的重组蛋白, 与预测的蛋白大小基本一致。将纯化的重组蛋白皮下多点注射免疫新西兰大白兔制备了 ORF72 的多克隆抗体, 经 Western Blotting 检测抗体能与病毒粗提液有良好反应, 特异性较好, 本结果可为下一步建立疫苗和免疫检测方法奠定基础。

关键词: 异育银鲫; 鲤疱疹病毒 II 型; ORF72; 多克隆抗体; Western Blotting

中图分类号: S941.41 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)14-0062-04

鲫鱼是江苏省重要的大宗淡水养殖品种之一, 在淡水养殖业中具有重要地位^[1-3]。在江苏省鲫鱼精养面积达 533.3 km² 以上, 2011 年产量达 54.80 万 t, 产值约 80 多亿

收稿日期: 2018-04-03

基金项目: 渔业重大技术集成与示范推广项目 (编号: D2015-13-5)。

作者简介: 李 双 (1990—), 女, 山东惠民人, 硕士, 研究方向为异育银鲫鳃出血病的预防和控制。E-mail: jsws19661314@163.com。

通信作者: 孟庆国, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事水生动物病害和免疫学研究。E-mail: mlzzcld@aliyun.com。

以南泥湾野生山丹丹的鳞茎进行组培快繁得出以下结论: 较佳启动培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L + AC 2 mg/L, 此时出芽率达到 84%; 较佳继代培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L, 增殖系数达到 7.3; 较佳生根培养基为 1/2MS + IBA 0.3 mg/L, 生根率为 84%。以上培养基均附加白砂糖 30 g/L、琼脂 5.5 g/L, pH 值均为 6.8。用继代培养的山丹丹组培苗炼苗移栽成活率能达到 100%。

参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [2] 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(5): 63–64.
- [3] 李小英, 王文和, 赵剑颖, 等. 百合白天使与山丹远缘杂交胚胎发育的细胞学研究 [J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 256–262.
- [4] 刘冬云, 史宝胜, 李银华, 等. 不同碳源及 PP₃₃₃、GA₃ 对山丹丹组

元, 居全国首位。随养殖集约化程度的增高、养殖密度的增大以及养殖水环境的恶化, 鲫鱼的病害问题也日益突出, 目前已成为威胁鲫鱼养殖业健康发展的主要因素。在这些病害中, 主要以近几年发生的鳃出血病最为严重。经检测确认, 引起这种疾病的病原是鲤疱疹病毒 II 型 (CyHV-2), 该病毒的宿主范围较窄, 仅感染金鱼、鲫鱼和它们的变种^[4-5,8], 致死率可高达 90%~100%^[4], 给水产养殖业造成严重危害。

CyHV-2 首次发病是在日本养殖的金鱼中^[9], 目前该病在美国^[4-5]、澳大利亚^[5]、我国台湾省^[8]、英国^[10]等地均有发生, 其流行情况分布全球。2011—2012 年, CyHV-2 导致我国养殖的异育银鲫 (*Carassius gibelio*) 出现严重死亡, 也是我

- 苗鳞茎增大的影响 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 2(2): 32–35.
- [5] 刘冬云, 孟庆瑞, 郭庭杰, 等. 山丹启动培养中生理生化特性的研究 [J]. 中国农学通报, 2005(7): 204–206, 212.
- [6] 齐向英, 陈宗礼, 薛 皓, 等. 陕北野生山丹丹组培快繁技术研究 [J]. 北方园艺, 2011(22): 115–117.
- [7] 马永红. 野生山丹丹组培快繁的研究 [J]. 园林科技, 2007(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(3): 289–290, 293.
- [9] 刘冬云, 梁海永, 史宝胜, 等. 野生山丹的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 641.
- [10] van Aartrijk J. Growth regulator requirements for adventitious regeneration from *Lilium* bulb scale tissue *in vitro*, in relation to duration of bulb storage and cultivar [J]. Scientia Horticulturae, 1981, 14(3): 261–268.
- [11] 张俊秀. 百合组培苗生根培养基配方的筛选 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(12): 124–125.