

中国兰的无菌播种与茎尖培养

祝鹏芳 陈长卿 编译

(辽宁省农业科学院花卉所)

兰花是单子叶植物,除南极洲和极地沙漠外,世界各地均有分布。中国兰又称东洋兰,主要指兰科兰属中的地生兰,其中有春兰、建兰、墨兰、寒兰、兔耳兰等。

中国兰花香怡人,倍受世人喜爱,但其原始的分株繁殖方法无疑使珍惜品种的增殖受到阻碍。中国兰种子的种皮存在着萌芽抑制物质,在普通的基质上种子的萌芽率极差,甚至根本不萌发,只有在无菌条件下播种,其有性繁殖才能得以解决,以组培方法繁殖热带兰的“兰花工业”早已闻名于世,而人们对中国兰的研究不仅起步晚,进展也慢。

本文就中国兰的无菌播种和茎尖培养将多年的研究结果阐述如下。

一、无菌播种。

(一)种子的准备。中国兰授粉后约4~5个月种子成熟,即可用于试验。兰花种子很小,约100~150 μ m,外被纤维状种皮,透过种皮可以观察到种皮边上的球形胚胎。胚胎上没有清晰的子叶、胚轴、胚芽和胎根,无胚乳,因此,常规播种难以萌发,只有在无菌条件下,借助适宜的培养基质才能萌芽。

(二)培养方法。1. 培养基选择。Knudson C. 附加细菌胰蛋白胨(Bacto-tryptone)的Knudson C. MS. White 以及附加细菌消化蛋白(Bacto-peptone)的 Hyponex 培养基都曾经成功地用于做寒兰的基本培养(Torikata et al, 1964; Kokubu et al., 1980; Muto, 1987; Choi and Chung, 1991)。3g/L 的 Hyponex 和 4g/L 的 Peptone 附加培养基(以下简称 H₃P₄)以及 3g/L 的 Hyponex 和 0.25g/L 的 Ca(NO₃)₂·4H₂O 附加培养基都曾用做春兰和建兰的基本培养基(Chung and Chun, 1983; Kapo, 1988, Choi and Chung, 1991)。本试验证明: H₃P₄ 对于中国兰的无菌播种最合适。0.1mg/L 的 NAA (萘乙酸)和 0.01mg/L 的 KT (激动素)的加入对促进春兰和寒兰的种子快速萌发有积极效应。

这与 Choi and Chung 1991 年的结论相同。另外, Muto 1987 年建议加入 0.1~1.0mg/L IAA (吲哚乙酸)和 1.0~10.0mg/L KT 也能促进种子快速萌芽。蔗糖的用量是 20~30g/L, 种子在 PH 值 5.0~5.6 时萌发最好。2. 预处理:中国兰的成熟种子萌芽较困难,原因是种皮存在着萌芽抑制物质,或种皮本身阻碍水份的渗透,所以接种前要进行预处理。种荚消毒以后,无菌条件下剥开种皮,试验中采用一个磁性的搅棒在无菌水中搅动种子,试验证明能够消除种皮中的抑制性物质,并增强种皮的渗透性。Kano 1965. 1976 年使用过 KOH 和/或 Ca(ClO)₂, 用以提高渗透性并消除萌芽抑制剂。近年来,又有学者提出了简单而有效的超声波处理方法(Miyoshi and Mii, 1988)。使用超声罐处理种子不仅使萌芽天数明显缩短,而且对幼苗的生长发育也有良好效果(Choi and Chung, 1991)。3. 环境条件。中国兰种子在 23~27℃ 良好萌发,最适培养温度为 25℃。每天需要 16 小时的光照。

(三)电子显微镜下种子的萌芽过程(图略):种子吸水后,胚胎膨胀,细胞呈现活泼状态。逐渐细胞开始分化成根状茎,根状茎表皮细胞分化成根茎毛,种皮开口处的根茎毛最多。通过电子显微镜可以观察到根状茎的表皮细胞和皮层,皮层里淀粉粒慢慢积累贮藏,待淀粉粒充满后,原形成层开始分化,随后形成了中柱。逐渐地,出现了根状茎增殖现象,从皮层组织处由 1 个分成 2 个或 3 个。2~3 个月,在根状茎顶端,芽原基形成。

二、茎尖培养。

中国兰的茎尖培养与其他兰花相比难度较大,原因是其外植体较易产生细菌和真菌引起的内部和外部污染;外植体细胞再生能力低,在空气中易变成褐色或枯竭。因此,培养材料的消毒程序和接种的防氧化等初培养技巧是组培繁殖中国兰的突破点。

北方园艺 (总 112) 47

(一) 初培养。1. 材料的消毒。一般的培养材料消毒采用 NaClO (次氯酸钠)、Ca (ClO)₂ (次氯酸钙)、乙醇等等 (Morel, 1969; Sagawa and Shoji, 1966; Chung et al., 1976)。但现已发现, 以上任何一种单一的消毒剂对中国兰茎尖消毒效果都不太理想。其中较为行之有效的消毒方法: 把茎尖先在 1% (W/V) 苯菌灵 (benlate) 中浸 10 分钟, 然后放入 1% (W/V) Ca (ClO)₂ 液中 10 分钟, 最后再转入 1% (W/V) Ca (ClO)₂ 液中 3 分钟。这样处理后的外植体就可以接种到含有 10 (10⁻⁶) 苯菌灵的培养基上进行培养了。2. 抗氧化。兰花茎尖在接种过程中遇到空气就可能被氧化成一种有毒的黑色膜, 它对茎尖组织发育起抑制作用, 因此接种前要进行预处理。试验证明: 用含 150mg/L 柠檬酸和抗坏血酸的溶液预处理外植体 1 小时是最有效的抵制氧化物的方法。还可以直接在培养基中加些活性炭、PVP、MBP 等, 也能达到抗氧化的目的。3. 培养基。试验证明, MS 是中国兰茎尖培养最好的诱导分化培养基。激素的使用方面, 有如下的参考: MS+NAA_{0.1} +KT_{0.1} (Hasegawa and Goi, 1987)。(注: 激素的使用单位均为 mg/L, 下同) MS+NAA_{0.1}+KT_{0.1} (Choi, 1990)。

(二) 增殖培养与生根培养。以下三种培养基都可以做增殖使用, 其中③最好。①Kundson C (含 Nitsch 微量元素) +KT/BA₁₀②MS+NAA_{0.1-1.0}+BA_{1.0-3.0}③H₃P₄+NAA_{0.1-2.0}+BA_{1.0-3.0}兰苗在增殖培养基上培养 2~3 个月后, 再转移到生根培养基上。H₃P₄+NAA_{1.0-2.0}+KT/BA_{1.0}+活性炭 500mg/L。在整个茎尖培养过程中, 除增殖培养需要先有 2 周的暗培养外, 每天都需要 16 小时的光照。温度在 25℃ 左右为宜。试验中还发现: 强光照 (3000—5000lux) 对得到健壮的幼苗更有利。

三、结论和讨论。

从报告中可以看出, 中国兰的无菌播种已经取得了很大进展: 找到了有效的预处理方法, 消除 3 种皮表面的萌芽抑制性物质, 萌芽率提高了。同时找到了适合的培养基, 使萌芽天数缩短了, 根状茎生长和分化的速度得到了提高。这些对于新品种的选育将起到积极的推动作用 (附图 1)。

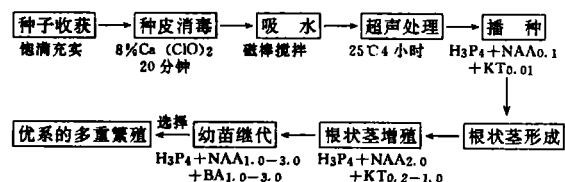


图 1 中国兰种子播种到幼苗继代过程示意图

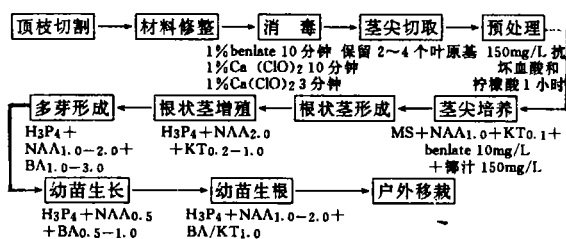


图 2 中国兰茎尖培养过程

中国兰的茎尖培养同样不仅可以用在优系的快速繁殖上, 还可以用在各种叶兰变种的选择繁殖上, 使其优良性状得以稳定保存。文中逐一解决了茎尖培养成功的几个关键步骤: 外植体的消毒; 接种操作的防氧化; 培养基的选择等等 (附图 2)。(沈阳东陵邮编 110161 译自韩国大邱民族大学校对丁慧清)

“农抗 120”防治苹果树腐烂病效果好

九十年代初我们开始筛选防治苹果树腐烂病的有效药剂, 通过七年的试验, 我们认为中国科学院生物防治研究所研制生产的 2% “农抗 120” 防治此病有特效。治愈率在 87% 以上, 复发率降低到 4%, 比对照药剂 “腐烂敌”、“福美砷”、“石硫合剂” 等防治效果显著。

用 “农抗 120” 防治苹果树腐烂病的具体方法是: 每年的 4 月中旬树液流动期开始检查树干、主枝基部、发现病疤用刀刮除、带少许好皮, 然后用小毛刷蘸 “农抗 120” 原液涂抹病疤, 以药液渗透病组织为度。两周后再涂抹一次, 伤口不必另行处理。小病疤当年愈合、大病疤 2~3 年也能愈合, 愈合组织生成较快, 且不易复发; 果树萌芽前全树喷洒 200 倍 “农抗 120” 药液一次, 预防腐烂病、兼防干腐病和花腐病; 整个生长季节要经常检查, 发现一块, 处理一块; 果树落叶前再全园认真细致复查一遍, 发现新病疤, 及时治疗, 方法同上。(吉林省磐石市长崴子乡多种经营办公室 高占民 邮编: 132218)

中国 10 大富裕村排名

根据统计数字, 我国十大富裕村的排名为: 1. 天津市静海县大邱庄; 2. 上海市马桥乡旗忠村; 3. 浙江省萧山市瓜沥镇航民村; 4. 辽宁省大连市甘井子区辛寨子镇华鑫村; 5. 灌翰省江阴市华土镇华西村; 6. 山东省牟平市宁海镇牟里村; 7. 江苏省无锡市郊区扬名乡金星村; 8. 广州市小榄镇永宁村; 9. 江苏省无锡县前州镇西塘村; 10. 山东省牟平市宁海镇西关村