

洋兰组培快繁褐变抑制因子探讨

姚丽娟, 徐晓薇, 林绍生, 陈中林, 陈义增

(浙江省亚热带作物研究所, 温州景山 325005)

摘要: 兰科植物在组培快繁时, 存在着易褐变死亡的问题。在培养基中添加 1~2g/L 活性碳, 适时切除培养物的褐化部分及时更换新鲜培养基, 能有效地抑制褐变死亡的发生。培养基中加入 10% 椰子水, 采用适宜的培养温度, 能促进原球茎的生长, 减少原球茎增殖过程中的褐变。采用大花蕙兰幼嫩花梗做外植体, 在诱导培养基中添加 NAA, 有利于防止外植体褐化, 降低外植体的褐变率。

关键词: 大花蕙兰; 蝴蝶兰; 组培快繁; 褐变; 抑制因子

中图分类号: S682.31 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2006)04-0162-02

洋兰是兰科植物中重要的盆花和切花种质。其花朵硕大, 花型奇异多姿, 花期特长, 观赏价值和经济价值俱佳, 在世界花卉生产中占据了独特的地位。自 1960 年 Morel 利用兰属茎尖去病毒和大量繁殖的方法成功后, 兰花的组培快繁在一些国家和地区发展成了一种新兴产业。以大花蕙兰、蝴蝶兰为代表的洋兰近几年在我国也是倍受青睐, 发展迅速。但兰科植物在组培快繁生产中存在着易褐化死亡的问题: 初代培养时外植体从启动到形成原球茎的时间较长, 生长缓慢, 极易褐变夭折; 继代增殖过程中原球茎也易发生褐变死亡, 因此如何克服褐变成了组培快繁生产成功与否的关键。从 1999 年起进行蝴蝶兰、大花蕙兰等洋兰的组培快繁技术研究, 就如何解决褐化问题进行了探讨。

1 外植体褐变抑制因子的探讨

1.1 外植体褐变情况

洋兰(大花蕙兰、蝴蝶兰、文心兰)茎尖、腋芽(花梗腋芽)、幼嫩花梗、茎段、叶片、根尖在初代培养时均会发生褐变现象。在 MS、1/2MS 或 KC 培养基上, 一般接种一至二周左右, 外植体插入位置的培养基变褐变黑(大花蕙兰接种 3~4d 后便开始分泌一种红色的多酚氧化物, 渐渐地整个培养基变红, 培养物的切口处因而变为褐色), 叶片在叶缘部位渗出褐化物, 并逐渐扩散, 严重的导致整个外植体变黑死亡。

1.2 外植体褐变抑制的对策

1.2.1 在培养基中添加活性碳 在培养基中加入 0.5~2g/l 活性碳, 能有效地降低外植体的褐化率(见表 1)。由表可知, 加入活性碳后, 能推迟培养物始现渗出物的时间, 培养基变色部分的直径也变小, 最终降低了外植体的褐化率。

表 1 活性碳对洋兰外植体褐化的影响

组别	培养物始现渗出物时间(d)	培养基变色部分直径大小(cm)	褐化死亡外植体数/接种外植体	褐化率 %
加入活性碳组	12	0.9	5/15	33.3
对照组	7	1.4	11/15	73.3

注: ①试材为蝴蝶兰花梗侧芽, 基本培养基为 MS, 加入活性炭用量为 2g/L; ②每瓶接入一个花梗侧芽, 培养 15d 统计变色部分直径大小。

1.2.2 适时切除培养物的褐化部分, 及时更换新鲜培养基 洋兰外植体褐化死亡, 是由于刀片伤害切口处细胞, 受伤细胞分泌多酚氧化酶氧化酚类物质成醌, 扩散到培养基中, 抑制其他酶活性, 毒害整个外植体的缘故。为了避免褐变物质积累在培养基中, 适时切除培养物的褐化部分, 接种后 10

~15d 转一次新培养基, 结果褐化率明显降低(见表 2)。

表 2 及时更换新鲜培养基对洋兰外植体褐化率的影响

组别	供试外植体数(个)	褐化外植体数(个)	褐化率(%)
及时更换培养基组	15	7	46.7
对照	15	11	73.3

注: 试材为蝴蝶兰花梗侧芽。

1.2.3 NAA 对大花蕙兰幼嫩花梗诱导褐变率的影响 大花蕙兰幼嫩花梗在 MS、1/2MS、花宝基本培养基上诱导。结果表明: 在基本培养基中添加 NAA, 有利于防止外植体褐化, 降低外植体的褐变率(见表 3)。

表 3 NAA 对外植体褐变率的影响

基本培养基	激素类别		接种外植体数	外植体褐变数	外植体褐变率(%)
	6-BA	NAA			
MS	✓	✓	13	6	46.2
花宝	✓	✓	8	5	62.5
1/2MS	✓	✓	8	2	25
1/2MS	✓	×	13	13	100

备注: 接种后一个月观察统计, 6-BA 浓度为 0.2~0.5mg/L, NAA 浓度为 0.2~1 mg/L; “✓”表示“添加”, “×”表示“未添加”。

2 原球茎褐变抑制技术

2.1 添加椰子水对原球茎褐化率的影响

椰子水是一种天然复合有机物, 含有丰富的氨基酸、矿物质、维生素和碳水化合物, 这些物质具有促进培养物的生长等作用。本试验用添加 10% 椰子水与不加椰子水对照进行比较, 结果见表 4。

表 4 添加椰子水对原球茎褐化率的影响

组别	接种原球茎数(个)	褐化原球茎数(个)	褐化率(%)
添加椰子水组	30	2	6.7
对照组	30	7	23.3

注: 基本培养基为 1/2MS, 培养 30d 调查褐变数。

试验表明: 添加 10% 椰子水可提高原球茎的存活率, 减少褐化死亡现象。原球茎在含有椰子水的培养基上生长健壮, 增殖迅速。

原球茎增殖在培养基中添加活性碳同样有利于减少褐化死亡现象。增殖期活性碳用量, 一般采用 0.5~1g/L。

2.2 培养温度对原球茎褐化率的影响

洋兰培养过程中温度应该比较恒定。温度过低, 形成原

* 基金项目: 浙江省温州市科技局资助项目(N2002A07)。

收稿日期: 2006-01-09

白色西伯利亚百合的组培快繁

刘凤民

(广东惠州农校, 516023)

中图分类号: S682.2⁺9 文献标识码: A
文章编号: 1001-0009(2006)04-0163-01

百合(*Lilium tenuifolium* Fisch)是百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)植物的统称,百合是世界著名的观赏花卉。西伯利亚(*Siberia*)属于东方百合杂种系(The Oriental Hybrids),为百合中的名贵品种群,由于其花色纯白、花形奇特、芳香宜人而深受人们的喜爱,成为近年国内外市场热销的花卉种类之一,东方百合是通过杂交育种选育出来的,种子高度败育,常采用传统的鳞茎球繁殖方法,繁殖速度缓慢,在短期内难以满足市场需求,目前国内主要通过进口种球进行生产,为了降低生产成本,实现种球的自主繁育,进行组织培养与快速繁殖已十分必要,并且在百合的优良品种快速繁殖、脱毒复壮、新品种培育以及应用生物技术进行分子育种中,组织培养都是比较适合的方法,百合许多器官和组织都可进行组织培养诱导成苗,如花丝、花托、子房等花器官进行离体培养,但花器官作外植体取材易受开花期的限制,不能常年进行组培生产,而鳞茎球却不受此制约,可连年取材进行组培生产。而这种西伯利亚百合是东方百合中热销的品种,具有良好的观赏和经济价值,因此其快繁方法有重要意义。

1 百合鳞茎球外植体的灭菌

将白色西伯利亚百合鳞茎球,先经自来水流水冲洗40min后,用毛刷刷去泥土冲洗干净,把鳞茎球中的鳞片叶剥下后,剔出病残者,挑选靠近鳞茎盘基部的幼嫩鳞片叶,用刀修整,剔除菌斑及瑕疵,放入培养皿中待用。在超净工作台上,用75%酒精浸泡30s,用无菌水漂洗后再放入0.1%AgCl₂中浸泡8~10min,用无菌水漂洗5次后,放入无菌的培养皿中用灭菌的滤纸吸干水分,切成4mm×4mm的小块作外植体备用。

2 百合组培的培养基和培养条件

包括基本培养基附加不同激素组合,具体各阶段培养基

如下:基本培养基:选用MS培养基或1/2MS培养基,以上培养基均加入0.55%琼脂,3%蔗糖,pH5.8,培养温度25~28℃,光照度2200~2500Lx,光照10h/d;①诱导培养基:MS+2.4-D1.5+BA0.2;②增殖培养基:MS+BA0.5+NAA0.2;③生根培养基:1/2MS+NAA0.2mg/L。

3 百合鳞片愈伤的诱导、继代增殖及生根

在超净工作台上,将消毒处理的外植体小块背面朝下放在诱导培养基①中,在组织培养室中暗培养一周后进行光照培养,20d左右时鳞片表面及切口处出现浅绿色突起,1个半月后在突起中诱导出芽丛,同时基部淡黄绿色愈伤组织长大。培养至2个半月愈伤组织中一部分发出芽丛,还有一部分继续增殖长大,培养至3个半月时将高度生长至4~5cm以上并生出鳞茎球的小苗移至生根培养基中生根,其它在诱导培养基中的愈伤组织部分可经切割后移至增殖培养基中继续诱导,继代产生大量的愈伤和芽丛。继代培养每隔一个半月进行一次,每次继代芽的增殖达到了约3倍,愈伤的增殖达到了约4倍,增殖循环不断进行下去就达到B扩繁的目的。在组织培养室培养期间注意观察,随时剔除污染的材料,以免交叉感染。

4 炼苗及移栽

移入生根培养基中的苗经一个半月生长出大量根系,并且苗基部的鳞茎球发育至直径达2~3mm,就可敞开瓶口在培养室中炼苗。一周后,用流动水清洗干净根系上的培养基,移入事先喷洒过0.2%百菌清的基质(沙:花肥:椰糠为2:1:1)中,放入培养箱中培养,温度为25℃,平均光照强度2500Lx,每日光照12h。每隔2d浇水,培养15d后再移入花盆或大田中生长。

该项研究可达到接种无菌率72%,存活率63%以上。建立了百合组培苗的快速繁殖途径。百合经诱导培养后生出无菌的小苗,而每个新生的无菌小苗在生长过程中,很快生长出新的小鳞茎片,这种无菌的小鳞茎片可继续进行以上的增殖培养。技术简单,操作方便,而且所用的试剂均为常规化工产品,成本低廉,有利于大规模的工厂化生产。每隔1个半月继代1次的频率,1个普通大小的鳞茎球在一年时间内,可繁殖出百合组培大苗1.5万~2万株,第二年可达到约50万株。组培快繁方法繁殖百合具有繁殖速度快,占地面积小,新出苗整齐且无菌的特点。

球茎球状体所需时间较长,生长很缓慢;温度过高,又容易造成污染并且易褐变。通过研究认为采用适宜的培养温度可以降低褐变程度(见表5)。

表5 不同培养温度对洋兰原球茎褐变的影响

培养温度(℃)	生长情况	褐变程度(%)
18	很慢	4.8
24	正常	5.0
30	正常	24.3

注:试材为大花蕙兰。

3 结语

兰科植物在外植体诱导和原球茎分化培养时,都存在褐变死亡的问题。因而减轻或控制褐变发生是兰科植物组织培养研究的重要内容。褐变的主要机理是组织细胞受到伤害后,使得其还原性物质被空气中的氧气氧化为醌类物质,

后者具有细胞毒性。本试验表明,在培养基中添加活性炭,对于发生褐变的材料适时切除褐变部位并及时更换新鲜培养基,使用添加椰子水的培养基促进生长,采用适宜的培养温度,均能较好的防止褐变死亡的发生。在实际操作中还采取了其他一些措施,如外植体采集后用流水冲洗30min以上,在接种前先将外植体在无菌水中浸泡处理、控制光温条件、避免过高温度等,对降低褐化死亡率均有一定的作用。

采用大花蕙兰幼嫩花梗做外植体,在诱导培养基中添加NAA,有利于防止外植体褐化,降低外植体的褐变率。关于这点先未见报导将进一步探讨。

参考文献:

[1] 谭文澄,戴策刚,观赏植物组织培养技术[M].中国林业出版社1997:238-277.
[2] 祝骥,姚汝华.苦丁茶愈伤组织的诱导与褐变抑制[J].热带亚热带植物学报2000,8(4):319-323.