

地生兰组培快繁技术研究

伍建榕¹, 韩素芬², 朱有勇³, 吕梅¹, 王光平²

(1. 西南林学院 西南生物多样性保育国家林业局重点实验室, 云南 昆明 650224; 2. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 南京 210037; 3. 云南农业大学 植物病理重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要: 利用地生兰蒴果生产种子苗及切取优良母株的侧芽进行茎尖诱导繁殖, 筛选出适合云南几种地生兰种子生长和茎尖培育及分生苗生长的培养基配方和组培快繁技术。适合种子发芽培养基为 1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 3.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+1 g/L 兰花培养液(泰国购入); 茎尖培养基配方为 1/2 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 3.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+新鲜椰子汁(CM)250 mL/L+1%葡萄糖+微量维生素 C, 平均诱导原球茎个数 3.9/个丛生芽的诱导 1/2 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+AC 2 g/L; 丛生芽生根 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+AC 2 g/L。

关键词: 地生兰; 蒴果; 组织培养; 生根诱导

中图分类号: S 682.31; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)05-0202-04

我国传统的“兰花”概念上说, 中国兰花仅指产于我国的兰科(Orchidaceae)、兰属(*Cymbidium*)植物, 而且主要指其中的地生兰。其花和叶都具有较高的观赏价值和药用价值。目前我国云南地生兰的开发与利用仍处于初级阶段。由于供需矛盾突出, 在经济利益的驱动下, 农民上山大量采挖野生地生兰, 野生兰花资源受到严重破坏; 为了保护野生资源及满足广大消费者的需求, 利用蒴果生产种子苗及切取优良母株的侧芽进行茎尖诱导繁殖, 筛选出适合云南几种地生兰种子生长和茎尖培育及分生苗生长的培养基配方和组培快繁技术, 将为解决地生兰的大量繁殖提供理论依据^[1]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 地生兰蒴果 春兰(*Cymbidium goeringii* Rehb. f.)、墨兰(*C. Sinense* Willd)及虎头兰(*C. hookerianum*)种子采自云南保山、元江、西双版纳、思茅、怒江贡山等地, 自然生长的各种兰科植物的蒴果, 待果皮由绿稍转黄时采摘, 4℃下保存备用。

1.1.2 外植体 从以上3种野生生长健壮的植株上切取长度3~5 cm的侧芽。3种种子发芽培养基配方^[2],

设5个培养基处理: ①1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 3.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+椰子汁(CM)150 mL/L; ②1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 3.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L(CK); ③1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 3.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+GA₃ 0.2 mg/L; ④1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 3.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+2 g/L 兰花培养液(泰国购入); ⑤1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 3.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+1 g/L 兰花培养液(泰国购入)。培养基 pH 值均为 5.6。

1.1.3 茎尖培养基配方 设5个培养基处理^[3-4]: ①1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+新鲜椰子汁(CM)250 mL/L+1%葡萄糖+微量维生素 C; ②1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+新鲜椰子汁(CM)250 mL/L+1%葡萄糖+微量维生素 C; ③1/2 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 3.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+新鲜椰子汁(CM)250 mL/L+1%葡萄糖+微量维生素 C; ④1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 3.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+1%葡萄糖; ⑤1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+活性炭(AC)2 g/L+1%葡萄糖(CK)。培养基 pH 值均为 5.6。

1.1.4 丛生芽增殖培养基配方 ①1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+AC 2g/L; ②1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+AC 2 g/L; ③1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+6-BA 3.0 mg/L+AC 2 g/L; ④1/2 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+AC 2 g/L。

第一作者简介: 伍建榕(1963-), 女, 福建清流人, 博士, 教授, 从事森林病理学及资源微生物利用研究的学科科研工作。E-mail: wujianrong63@yahoo.com.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671717); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(06Z057B)。

收稿日期: 2007-12-14

1.1.5 生根培养基配方 ①1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+AC 2 g/L; ②1/2 MS+NAA 0.2mg/L+AC 2 g/L; ③1/2 MS+IBA 0.5 mg/L+AC 2 g/L; ④1/2 MS+IBA 0.2 mg/L+AC 2 g/L。

1.2 方法

1.2.1 种子发芽繁殖方法 蒴果均采用升汞消毒法进行消毒, 无菌条件下将蒴果放入 75%酒精浸泡 10 s, 用 0.1%升汞摇晃 15~20 min, 无菌水清洗 3 次, 再用 0.1%升汞摇晃 3~4 min, 然后用无菌水清洗 3 次, 再经消毒的蒴果平置于灭菌培养皿中, 用手术刀徐徐纵向切开果皮, 将种子均匀撒播于培养基内, 每个蒴果播 15 瓶。播种后将培养基置于光照强度为 1 500~2 000 lx, 相对湿度 80%~90%的条件下培养, 温度 25℃的光照培养箱中培养, 培养 30~40 d 左右开始抽出嫩芽后进行继代培养和生根培养, 长成合格幼苗, 观察 5 种培养基播种苗的生长发育情况。

1.2.2 侧芽培养方法 侧芽采用升汞消毒法进行消毒, 从野生生长健壮的植株上切取长度 3~5 cm 的侧芽。切取时芽基部尽量多留一些, 以免误伤茎尖生长点。剥去侧芽外层 1~2 片叶鞘, 用自来水冲洗外植体侧芽, 75%酒精浸泡 10 s, 用 0.1%升汞摇晃 15~20 min, 无菌水清洗 3 次, 再用 0.1%升汞摇晃 3~4 min, 然后用无菌水清洗 3 次, 侧芽经消毒后, 于无菌条件下将外包嫩叶剥至 1~2 片, 小心切除芽基部, 保留生长点在内的长约 2~3 cm 茎尖顶端分生组织块, 接入茎尖培养基培养, 每瓶放入 2 块, 每个品种接种 5 瓶, 将接种后的培养基置于光照强度为 1 500~2 000 lx, 相对湿度 80%~90%的条件下培养, 温度 25℃的光照培养箱中诱导培养, 经继代培养和生根培养, 长成合格分生苗, 注意比较不同配方培养基上苗木生长情况^[9]。

2 结果与分析

2.1 种子繁育培养基配方试验

种子播种于不同培养基置于 25℃的光照培养箱中培养后, 种子开始转绿并逐渐膨大, 产生原球茎。齿瓣石斛种子萌动最早, 虎头兰其次, 春兰较慢, 但后期生长较快, 墨兰萌动及生长都较慢。从种子转绿膨胀到抽芽大约需要 40~50 d。50 d 左右开始抽出嫩芽, 每瓶初代播种苗经 2~3 次继代培养, 分转为 50~80 瓶生根播种苗(每瓶 30 株)。培养 80 d 左右后长成根茎叶整齐, 生长正常的播种瓶苗。

在 5 种不同培养基上春兰、墨兰及虎头兰种子均可发芽长成嫩芽, 但①、③、④、⑤培养基较②更适合于它们的生长, 表现在种子转绿快生长整齐, 发芽成苗率高, 根茎叶粗壮, 叶色较浓绿, 苗高 2~3 cm, 特别是①、④、

⑤培养基含有天然椰子汁和兰花培养液长势最佳, 见表 1。表 1 中, 从种子到培养成为 2~3 cm 高的组培苗, 春兰和虎头兰约需 90 d, 而墨兰却要 360 d。除不同兰花品种的遗传性状不同外, 可能还与种子成熟度有关, 墨兰蒴果不成熟发芽时间长是主要原因。在培养基中加入一定量活性炭和维生素 C, 对抑止褐变有明显作用。

表 1 春兰、墨兰及虎头兰种子生长培养基比较

处理	调查瓶数	成活率/%	生长势	叶片数	叶色	苗高/cm
①	40	95	较粗壮	3~5	浓绿	2~3
④	40	95	较粗壮	3~5	浓绿	2~3
⑤	40	95	较粗壮	3~5	浓绿	2~3
③	40	80	粗壮	3	绿	2
②	40	60~70	一般	1~2	绿	<2

注: 表中春兰、虎头兰数据为播种苗生根培养 90 d 出瓶移栽前调查结果; 墨兰数据为播种苗生根培养 360 d 出瓶移栽前调查结果

2.2 侧芽培养基配方试验

2.2.1 不同激素配比对春兰形成原球茎的影响 外植体在加有一定激素配比的培养基上, 10 d 左右外植体侧芽萌发, 20 d 后周围出现许多白色颗粒状愈伤组织, 继续培养逐渐转为绿色, 25 d 后可形成大量的原球茎。其不同激素配对外植体诱导形成原球茎的试验结果见表 2。观察统计试验结果, 相同浓度的 NAA 下, 高浓度的 6-BA 对原球茎增殖有明显的促进作用, 但当其浓度高于 4 mg/L 时, 反而会抑制其生长。试验得出的最佳激素配比为 NAA 0.5 mg/L, 6-BA 3.0 mg/L, 平均增值率为 4。

表 2 不同激素配对外植体诱导形成原球茎结果比较

配方	基本培养基 / mg · L ⁻¹	不同激素配比		平均诱导 原球茎
		6-BA	NAA	
①	1/2 MS	1.0	0.3	2.5
②	1/2 MS	2.0	0.3	2.7
③	1/2 MS	3.0	0.5	3.9
④	1/2 MS	4.0	0.5	2.4

2.2.2 丛生芽的诱导 当原球茎培养 25 d 以后, 将源于茎尖及花穗的原球茎取出, 切成小块, 继续移入 6-BA 3.0 mg/L 的培养基中, 进行增殖培养(原球茎逐渐长大并长出新的原球茎)。50 d 后, 原球茎可增殖 4 倍。原球茎的继代培养在诱导培养基上进行, 将需继代的原球茎切割后转入新鲜的培养基。每个月重复 1 次此过程, 几个月后即可得到大量的原球茎。生长健壮的原球茎转入不同激素配比的分化培养基中进行不定芽诱导, 30~40 d 开始分化, 逐步诱导出丛生芽, 继续培养 30 d 左右可发育成不具根的幼芽。观察不定芽生长情况, 不同激素配比的不定芽诱导试验结果见表 3, 当激素浓度配比为 6-BA 1 mg/L, NAA 0.05 mg/L 时, 有利于丛生

芽的分化。

表 3 不同激素对比对春兰的丛生芽诱导结果

培养基 1/2MS	不同激素配比		丛生芽生长情况
	6-BA	NAA	
①	0.5	0.05	愈伤较松散, 不定芽少或无
②	1.0	0.05	丛生芽萌动长成大量小植株, 芽丛健壮
③	1.5	0.05	愈伤过于致密 不定芽少或无
④	2.0	0.05	丛生芽萌动长成大量小植株并诱导产生幼根

2.2.3 不同激素浓度对比对不定芽增殖的影响 分化

表 4 不同激素浓度对比对春兰的丛生芽增殖的结果

不同激素配比		增殖倍数	平均苗高/cm	生长状况
6-BA	NAA			
1.0	0.1	2.0	1.0	不定芽分化率低, 生长慢, 叶色淡绿 长势较弱
2.0	0.1	4.0	3.5	不定芽分化率高, 芽丛健壮 叶色深绿, 幼苗健壮
2.0	0.5	1.5	0.5	不定芽分化率低, 色黄, 低矮
3.0	0.5	2.5	2.5	不定芽分化率高, 纤细, 丛生状

2.2.4 丛生芽生根 当丛生芽长到 1.5~2.5 cm 并具 3~4 片叶子时, 自底部切下, 转入生根培养基内诱导生根。每瓶置 10~15 株小苗 30 d 后小苗基部可分化出

表 5 2 种激素浓度对春兰的丛生芽诱导生根结果

培养基/ mg · L ⁻¹	试验株数	生根率/ %	诱导生根情况
1/2 MS+NAA 0.5	20	90	10 d 左右开始生根, 30 d 生根 5~6 条 根黄白色长 4~5cm 呈放射状
1/2 MS+NAA 0.2	20	83	20 d 左右开始生根, 35 d 生根 3~4 条 根粗壮, 呈放射状
1/2 MS+IBA 0.5	20	79	30 d 左右开始生根, 40 d 生根 5~6 条 根细弱
1/2 MS+IBA 0.2	20	68	40 d 开始生根 65 d 生根 5~6 条, 根细弱

3 结论与讨论

种子萌发培养基研究结果, 春兰、虎头兰和齿瓣石斛的种子在人工培养基上均可诱导发芽并最终形成试管苗, 3 种种子培养基配方中添加适量的椰乳及购置专门的兰花营养液等, 给种子提供了多种必需的营养生长物质和环境条件, 有利于种子的正常生长和发育; 此外种子的成熟度与在培养基上的萌发时间的长短密切相关, 成熟度越高, 萌发时间越短, 种子苗成活率越高; 另还与抑制褐变的活性碳及维生素 C 有关^[9]。

春兰的茎尖组织培养研究筛选出有利于原球茎诱导增殖的培养基为 1/2 MS +NAA 0.5 mg/L+6-BA 3.0 mg/L, 增值率为 4; 有利于不定芽的分化的培养基为 1/2 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L; 有利于生根的培养基为 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L。春兰茎尖诱导不仅与激素 NAA 和 6-BA 的浓度比例相关, 而且与取材的季节有关, 在生长旺盛的季节, 兰花新芽上的酚类物质含量较高, 而生长较弱的季节, 酚类物质明显减少, 诱导出不定芽的几率大, 并褐变减轻, 再者通过在培养基中加入活性碳及勤转瓶(1 次 20~25 d)可减轻褐化物质对外植体的伤害。

培养基上的材料一般 30 d 左右继代 1 次, 重复继代数次, 使分化材料增殖到一定的数量后再进行生根培养。把供试验的接种材料、幼苗切割开, 分别接种在不同浓度的 6-BA 和 NAA 中, 30 d 后观察增殖情况、平均苗高及生长状况(见表 4)。由表 4 可看出在相同浓度的 1/2 MS 培养基中, 随着 6-BA 浓度增高, 分化的芽也随之增加。当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L, NAA 为 0.1 mg/L 时, 芽增殖倍数高, 苗粗壮, 叶色浓绿; 但随着 6-BA 浓度增高, 芽增殖倍数逐渐减少, 并且苗生长不正常。

1 cm 左右的长的根。2 种浓度的 NAA 和 IBA 生长素的诱根生根比较试验, 其结果以 NAA 0.5 mg/L 的生根效果最佳(见表 5)。

比较两者, 春兰茎尖诱导时间较种子萌发生长时间长, 且种子生长较茎尖生长快。春兰、墨兰和虎头兰等的种子及茎尖生长比其它附生兰(卡特兰)种类时间要长, 生长速度较慢。

外植体的消毒时间要适量, 表面消毒不完全, 容易引起污染, 消毒时间过了容易杀死茎尖分生组织, 完全消毒后, 在放入培养基之前, 应用手术刀将新芽的底部切取 1~2 mm, 容易形成愈伤组织和不定芽点。

参考文献

[1] 伍建榕. 云南濒危野生兰花与菌根真菌的相互关系研究[D]. 南京: 南京林业大学博士论文, 2005: 11-17.
 [2] 何炎明 关永全, 胡源. 安诺兰的试管繁殖研究[J]. 中山大学学报丛, 1996(2): 19-24.
 [3] 刘青林 马钰, 郑玉梅. 花卉组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社 2002: 104-114.
 [4] 赵贵林 郑平, 何穗华, 等. 小型卡特利亚兰的组织快繁研究初报[J]. 广东农业科学, 2002(3): 24-26.
 [5] 秘彩莉 霍晨敏, 冯全义, 等. 大花蕙兰快速繁殖技术初报[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2002, 26(2): 190-192.
 [6] 伍建榕 韩素芬, 朱有勇. 春兰与丝核菌共培养体系的建立及菌根显微结构研究[J]. 南京林业大学学报 2005(3): 105-108.

(本文作者还有: 刘婷婷, 孙会林, 单位同第一作者)

植物激素对大花蕙兰组培快繁的影响

田志强

(河南农业大学 科技处, 河南 郑州 450002)

摘要: 在大花蕙兰组培快繁过程中, 植物激素对原球茎的诱导、增殖及幼苗的分化有显著影响。细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 最佳配比对大花蕙兰组织培养很重要, 尤其是细胞分裂素影响较大。

关键词: 大花蕙兰; 组织培养; 植物激素

中图分类号: S 682.31; S 603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)05-0205-02

大花蕙兰(*Cymbidium*)是兰科兰属中一部分大花附生种及其杂交种的统称, 属复茎地生兰或半附生兰, 原产地在喜马拉雅山脉及东南亚高山上, 是世界五大重要商品兰花之一, 近几年在我国花卉市场上流行的高档室内盆栽花卉, 具有极高的观赏价值, 株型高大雄伟, 花大而多, 色彩鲜艳。由于大花蕙兰多为杂交种, 种子繁殖无法保持其品质特性, 其结实率也相当低, 分株能力弱, 因而繁殖系数低, 繁殖速度慢, 远远不能满足商品化生产的需求, 而采用组织培养方法进行原球茎增殖可以达到工厂化生产目的。试验研究植物激素对大花蕙兰组织培养快速繁殖的影响, 并成功地建立了快繁体系, 可以用于工厂化育苗。

作者简介: 田志强(1977-), 男, 河南安阳人, 助理研究员, 主要从事植物生理及生物技术研究。E-mail: 03712008@sohu.com。

收稿日期: 2008-01-11

1 材料与方法

1.1 材料

大花蕙兰采自河南农业大学兰花园中 FN⁴ 品种, 选取健康饱满 10~15 cm 长的芽, 剥去外部叶片直到 5 mm 大小, 消毒处理后作为外植体诱导材料。

1.2 植物激素对原球茎诱导的影响

以 MS 为基本培养基, 6-BA 设 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L(单位下同)4 个浓度水平, NAA 浓度为 0.2 mg/L, 培养基均附加香蕉汁 100 g/L, 活性炭 0.5 g/L, 每处理接 10 瓶, 每瓶接 1 个茎尖, 培养 30 d 后, 调查原球茎诱导率。

1.3 植物激素对原球茎增殖及幼苗分化的影响

将诱导的原球茎分别接种于下列不同培养基中: ① MS+6-BA 1.0+NAA 0.1; ② MS+6-BA 1.0+NAA 0.5; ③ MS+6-BA 1.5+NAA 0.1; ④ MS+6-BA 1.5+

Study on the Quick Multiplication of Terrestrial Orchid

WU Jian-rong¹, HAN Su-fen², ZHU You-yong³, LV Mei¹, WANG Guang-ping², LIU Tingting¹, SUN Hui-lin¹

(1. Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China of State Forestry Administration, Southwest Forest College, Kunming, Yunnan 650224, China; 2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forest University, Nanjing 210037, China; 3. The Phytopathology Lab. of Yunnan Agriculture University, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: The seeds and the top of stalk of terrestrial orchid as explants were cultured on medium. The tissue culture of terrestrial orchid were studied. The results were as follows: The best culture medium for seed germinate of terrestrial orchid was 1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 3.0 mg/L+active carbon(AC) 2 g/L+1 g/L(culture liquid of the orchid from Thailand); The best medium in inducing protocorm was 1/2 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 3.0 mg/L+(AC) 2 g/L+fresh coconut juice (CM) 250 mL/L+1% glucose+micro-vitamin C. The best medium in adventitious buds induced was 1/2 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+AC 2 g/L; The best medium in rooting of adventitious buds was 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+AC 2 g/L.

Key words: Terrestrial orchid; Capsule; Tissue culture; Rooting induction