

虎头兰的组织培养与快速繁殖的研究

曹 受 金

(中南林业科技大学, 湖南长沙 410004)

摘 要:以虎头兰茎尖、茎段和叶为外植体, 结果表明: 适宜的原球茎诱导培养基: $KC+5\text{ mg/L BA}+0.5$ (或 1.0) $\text{mg/L NAA}+0.5\% \sim 1\%$ 蔗糖; 增殖培养基: $KC+5\text{ mg/L BA}+0.1$ (或 0.5) $\text{mg/L NAA}+0.2\%$ 蛋白胨; 分化及育苗培养基: $KC+0.1\text{ mg/L NAA}+10\%$ 香蕉匀汁+ 0.1% 活性炭。BA 在原球茎的产生、增殖分化中起着主导作用。

关键词:虎头兰; 组织培养; 外植体

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)03-0167-03

虎头兰(*Cymbidium hookerianum*)因其花形规整丰满, 色泽鲜艳, 花茎直立, 花期长以及素雅的香味深受到国内外兰花爱好者的青睐, 具有较大的市场潜力。目前我国虎头兰的种苗、成品花大多从日本、韩国及我国台湾地区引进^[1]。虎头兰主要采取传统的分株方法进行繁殖, 其繁殖率低, 周期长, 难以满足规模化生产的需要^[2], 因此探讨虎头兰快繁技术具有很高的经济价值和现实意义。以茎尖、试管苗茎节、叶片为外植体, 获得了原球茎及再生植株, 较深入地考察了各种因子对原球茎产生、增殖、植株再生的影响, 对上百种培养基进行比较和筛选, 得到了较为理想的优化诱导培养基、优化原球茎增殖培养基、分化及育苗培养基。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用材料为虎头兰盆栽植株。由长沙市兰花研究开发公司提供。

1.2 方法

1.2.1 诱导培养基 以 KC 为基本培养基, 与 BA, NAA, KT 和 IBA 4 种激素的不同剂量组合, 配制成原球茎诱导培养基(表 1、表 2 和表 3)。

1.2.2 接种 取成熟植株长约 2.0 cm 左右的茎尖, 流水冲洗, 除去外层茎叶, 放入 10% 次氯酸钠溶液中灭菌 10 min, 无菌水冲洗干净, 取茎尖 1~2 mm 接种在诱导培养基上。

1.2.3 培养条件 光照强度为 1 200 Lx, 光暗各 12 h, 培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 培养基 pH5.5。

1.2.4 观察 4 周后统计叶片的培养和原球茎诱导的结果及不同激素培养原球茎的增殖结果, 5 周后统计茎尖及茎段的培养诱导的结果。

1.2.5 增殖培养基 以 KC 为基本培养基 A; 以 15 种不同剂量、4 种不同激素组合, 组成增殖培养基, 见表 4; B: 以蛋白胨、水解蛋白、复合氨基酸、胰蛋白胨等添加物组成增殖培养基, 见表 5。

1.2.6 植株再生 将增殖培养基上已开始分化的原球茎转移到加有 10% 香蕉匀汁、0.1% 活性炭和 0.1~0.5 mg/L NAA 及 0.1~0.5 mg/L 2,4-D 的 KC 固体培养基上, 待植株长到 2.0 cm 左右, 将其单个分开植于新鲜培养基上, 保持株距, 每瓶定数。

2 结果与分析

2.1 原球茎的诱导培养

不同激素组合对原球茎形成的影响方面: 对茎尖、茎段及叶片的诱导使用了 4 种植物激素的不同组合, 培养结果详见表 1、表 2 和表 3。从表 1 可以看出, BA 与 NAA 的组合对茎尖的诱导效果好于 KT 与 NAA 组合, 诱导率最高可达 75%, 最低 63%。从表 2 的结果来看, 13~18 号培养基上的茎段不经过原球茎阶段直接出芽形成芽丛; 1、7、8、10~12、19~24 号培养基均适合于茎段的诱导培养, 不仅诱导率高, 而且每个外植体所产生的平均原球茎数也都在 5 个以上, 考虑到高浓度激素组合易引起植株变异。因此, 低浓度激素诱导效果较好的情况下, 尽可能不用高浓度激素组合, 所以 7、8 号培养基的诱导效果更理想。从表 3 的统计结果看, 13~18 号培养基上的叶片直接出芽形成芽丛, 未观察到原球茎的产生, 芽较多地产生在叶基部。7、8 和 9 号培养基均可用于叶片的诱导培养, 其中 8 号培养基的诱导效果最理想。

从以上试验还观察到, 在细胞分裂素含量相同的情况下, 随着生长素浓度的增高, 所形成的原球茎平均数降低, 在继代培养中, 原球茎分化后形成苗的发育情况

第一作者简介: 曹受金, 男, 1972 年生, 中南林业科技大学副教授, 主要从事园艺组培方面的教学与科研工作。

基金项目: 湖南省林业厅科技项目。

收稿日期: 2006-10-16

也有差异,即随着生长素浓度的增高,其苗逐渐变得健壮,也相应变矮。在细胞分裂素绝对浓度较高和生长素绝对浓度较高或生长素绝对浓度很低的情况下,原球茎致密无分化,呈愈伤组织状。

2.2 原球茎的增殖培养

2.2.1 激素对原球茎增殖的影响 原球茎的增殖培养是实现兰花快速繁殖的关键,在适合的培养上,原球茎增殖很快,分化后可得到大量再生苗。15种不

表 1 激素组合对茎尖形成原球茎的影响					
培养基及激素(mg/L)			外植体数	形成原球茎的	诱导率(%)
BA	KT	NAA		外植体数	
—	1.0	0.1	8	3	38
1.0	—	0.1	8	5	63
0.5	—	0.1	8	5	63
—	0.5	0.1	8	4	50
1.0	—	0.1	8	6	75
—	1.0	0.1	8	4	50

表 2				不同激素组合对茎段形成原球茎的影响									
序号	激素(mg/ L)			诱导率 (%)	平均原球 茎数(个)	平均 芽数(个)	序号	激素(mg/ L)			诱导率 (%)	平均原球 茎数(个)	平均 芽数(个)
	BA	NAA	IBA					BA	NAA	IBA			
1	0.5	0.1	—	72	5.8	—	13	0.5	—	0.1	73	—	1.5
2	0.5	0.2	—	30	4.2	—	14	0.5	—	0.2	48	—	2.0
3	0.5	0.5	—	48	2.8	—	15	0.5	—	0.3	55	—	2.8
4	1.0	1.0	—	46	3.1	—	16	1.0	—	0.5	48	—	3.8
5	1.0	2.0	—	43	2.5	—	17	1.0	—	1.0	45	—	2.3
6	1.0	5.0	—	21	2.2	—	18	1.0	—	2.0	72	—	1.8
7	5.0	0.5	—	80	6.8	—	19	5.0	—	0.5	70	5.9	—
8	5.0	1.0	—	72	6.2	—	20	5.0	—	1.0	78	5.1	—
9	5.0	5.0	—	48	3.1	—	21	5.0	—	2.0	70	6.0	—
10	9.0	0.0	—	75	6.0	—	22	9.0	—	0.5	72	6.0	—
11	9.0	1.0	—	63	5.6	—	23	9.0	—	1.0	65	6.5	—
12	9.0	3.0	—	69	5.2	—	24	9.0	—	2.0	60	7.0	—

表 3				不同激素组合对叶形成原球茎的影响									
序号	激素(mg/ L)			诱导率 (%)	平均原球 茎数(个)	平均 芽数(个)	序号	激素(mg/ L)			诱导率 (%)	平均原球 茎数(个)	平均 芽数(个)
	BA	NAA	IBA					BA	NAA	IBA			
1	0.5	0.1	—	8	4.0	—	13	0.5	—	0.1	16	—	1.5
2	0.5	0.2	—	13	5.0	—	14	0.5	—	0.2	6	—	2.0
3	0.5	0.5	—	15	4.5	—	15	0.5	—	0.3	5	—	2.0
4	1.0	1.0	—	16	5.0	—	16	1.0	—	0.5	15	—	3.5
5	1.0	2.0	—	14	4.5	—	17	1.0	—	1.0	13	—	3.0
6	1.0	5.0	—	7	3.0	—	18	1.0	—	2.0	11	—	1.5
7	5.0	0.5	—	23	5.3	—	19	5.0	—	0.5	16	7.8	—
8	5.0	1.0	—	35	6.0	—	20	5.0	—	1.0	18	6.2	—
9	5.0	5.0	—	24	5.1	—	21	5.0	—	2.0	9	5.0	—
10	9.0	1.0	—	16	5.2	—	22	9.0	—	0.5	14	6.5	—
11	9.0	3.0	—	0	0	—	23	9.0	—	1.0	12	5.0	—
12	9.0	6.0	—	0	0	—	24	9.0	—	2.0	6	4.5	—

同激素组合的增殖培养基培养的原球茎增殖结果见表4。从表4结果看,所选的激素组合对原球茎增殖影响不大,但不同的激素组合对原球茎发育的方向起着调控作用。低浓度BA及较高浓度NAA(IBA)导致原球茎分化,高浓度BA和低浓度NAA(IBA)维持原球茎增殖,考虑到继代培养中激素逐代积累的问题,不宜选太高浓度的BA,4和5号培养基的激素组合较适宜。

2.2.2 复合添加物对原球茎增殖的影响 在KC培养基中附加不同浓度的4种复合添加物,从表5的结果可见,含0.2%蛋白胨的培养基效果最好,其存活率和增殖率都很高,并且在以后的继代培养中观察到,原球茎所分化的苗壮,叶绿素含量高,其他3种复合添加物显然是由于存活率不高而影响了鲜重增加率。

表 4 不同激素和剂量组合对原球茎增殖的影响						
序号	激素组合(mg/L)				鲜重增加率(%)	分化率(%)
	BA	KT	NAA	IBA		
1	2.0	—	—	—	56	75
2	8.0	—	—	—	58	55
3	0.5	—	0.1	—	53	88
4	5.0	—	0.1	—	55	35
5	5.0	—	0.5	—	58	45
6	5.0	—	1.0	—	57	84
7	5.0	—	2.0	—	56	90
8	5.0	—	—	0.5	55	72
9	5.0	—	—	1.0	57	85
10	—	1.0	0.5	—	51	90
11	—	5.0	0.5	—	53	85
12	—	5.0	1.0	—	56	86
13	—	5.0	2.0	—	50	82
14	—	5.0	—	0.5	54	60
15	—	5.0	—	1.0	53	55

表 5 不同的复合添加物对原球茎增殖的影响

类型	蛋白胨(%)			水解蛋白(%)			复合氨基酸(%)			胰蛋白胨(%)		
	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3
存活率(%)	91	98	90	75	55	78	91	56	88	50	50	74
鲜重增加率(%)	82	90	85	50	10	80	75	8	75	7	15	46
分化率(%)	90	98	90	76	20	86	99	50	90	28	36	58

2.3 植株的再生

分化的原球茎在再生培养基上两周后分化出芽, 4 周后逐渐长出幼叶和根。从培养 10 周后的观察结果可见, 不同激素及浓度对植株生长影响很大。0.5 mg/ L 2, 4-D 可强烈地抑制苗的生长, 苗矮小、叶片宽大扭曲, 苗基部产生大量球茎, 其体积是正常原球茎体积的 3 倍; 0.1 mg/ L 2, 4-D 也抑制苗生长, 只是表现比 0.5 mg/ L 2, 4-D 要轻一些。0.1 mg/ L 及 0.5 mg/ L NAA 两者效果差异不大, 与对照相比, 根长而壮, 株高无差异, 与含 1 mg/ L NAA 培养基上的苗相比, 苗稍高, 根稍细, 考虑到激素逐代积累的问题, 以选 0.1 mg/ L NAA 浓度为好, 因此育苗培养基选: KC 附加 0.1 mg/ L NAA 及 10%香蕉匀汁、0.1%的活性炭为佳。

3 讨论

试验结果表明, 激素在原球茎及芽的诱导中起着主导作用。BA 对虎头兰幼叶及茎段的诱导非常有效, KT 与 BA 相比其效应弱得多。当 BA 为 5 mg/ L 左右, NAA 为 0.1 ~ 0.5 mg/ L 时, 原球茎诱导率达到最高, 每个外植体上的原球茎数也最多。这表明高浓度细胞分裂素与低浓度生长素的条件对虎头兰原球茎发生有利, 甚至去掉生长素, 原球茎的诱导率仍然很高。由此表

明, 在原球茎诱导过程中生长素并不是必需的。在 BA 与 NAA 的组合中, 外植体形成原球茎; 在 BA 与 IBA 组合中当 BA 为 0.5 ~ 1 mg/ L, IBA 为 0.1 ~ 2 mg/ L 时, 浓度高反而对不定芽产生不利。

激素对原球茎的增殖培养同样重要, 它对原球茎生长发育的方向起着调控作用, 高浓度 BA 和低浓度 NAA 或 IBA 限制原球茎的分化, 促进其增殖, 并且随 BA 浓度增高和 IBA 或 NAA 浓度的降低, 抑制分化作用增强, 相反降低 BA 浓度, 或适量增高生长素浓度, 促进原球茎分化。

复合添加物成份复杂, 富含各种氨基酸, 维生素等成份, 一定浓度和种类的复合添加物对原球茎的增殖效果很好, 鲜重增加快, 原球茎生长健壮, 0.2%的蛋白胨对原球茎的增殖效果最好, 实验所用其他 3 种复合添加物效果较差。从结果看, 显然是由于外植体的存活率不高而影响了鲜重增加率, 死亡率高可能是由于这 3 种复合添加物的某些成份对原球茎毒害较大, 也可能是因为浓度太高, 引起渗透压的改变, 导致原球茎死亡, 因此原球茎的增殖培养基最好加入适当的激素, 以控制原球茎发育方向, 加入适当种类和适当浓度的复合物添加物以促进其快速增殖。

参考文献:

[1] 熊英, 黄寿先. 虎头兰组培快速繁殖技术的研究[J]. 广西农业科学, 2003, (3): 186.
[2] 范成明, 李枝林. 兰花组织培养及分子生物学研究进展[J]. 园艺学报, 2003, (4): 487.

Study on the Tissue Culture and Rapid Propagation
Technique of the *Cymbidium hookerianum*

CAO Shou Jin

(Central South University of Forestry & Technology, Changsha, Hunan 410004)

Abstract: The stem top and stem segment and leaf of *Cymbidium hookerianum* are good explant, The results showed that the best medium to induction of protocorm was KC+5 mg/ L BA+0.5(or1.0)mg/ L NAA +sugar 0.5% ~ 1%; Prolif-eration medium wasf KC+5 mg/ L BA+0.1(or 0.5) mg/ L NAA+peptone 0.2%; cultivation medium was KC+0.1 mg/ L NAA+banana juice 10% +active carbon 0.1%. The key to origin and multiplication of protocorm was BA.
Key words: *Cymbidium hookerianum*; Tissue culture; Explant