

春兰组培快繁技术研究

刘幸佳¹, 徐伟韦², 崔玉花³, 崔永一⁴

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300; 2. 慈溪市农业技术推广中心, 浙江 慈溪 315300;
3. 吉林省龙井市农村能源环保办公室, 吉林 龙井 133400; 4. 浙江农林大学 农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300)

摘要:以春兰‘宋梅’根状茎为试材,研究了NAA及活性炭对春兰根状茎增殖的影响,并通过正交设计筛选有利于根状茎芽分化和幼苗生根的培养基。结果表明:NAA和活性炭均能不同程度促进根状茎的增殖与生长;1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L为根状茎芽分化的最适培养基;1/2MS+IBA 1.0 mg/L+活性炭 2.0 g/L为春兰组培苗生根的最适培养基。

关键词:春兰;根状茎;组培;快繁

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)20-0101-04

春兰(*Cymbidium goeringii*)是兰科植物品种最为丰富的一个种,也是繁殖相对困难的种之一。兰花生产一般采用分株方式,但繁殖系数较低。在自然条件下,兰花种子发育不完全,极难萌发,许多名贵兰花无法大量繁殖。目前已经有部分兰花能够由外植体离体培养成功诱导出类原球茎并进一步生长形成根状茎^[1-3],但诱导初代培养所需的时间较长且培养过程中容易发生褐化导致外植体死亡。此外,兰花组培苗在移栽过程中成活率普遍较低且开花迟,这一现象除了与移栽基质、生态条件有关外,与其自身的健壮程度也有密切关系。组培苗的长势与根系的生长状况决定了移栽后小苗的成活率。提高组培苗的生根率,培养苗壮的大苗能提高移栽后的生长量,从而缩短至开花的生育期。

该试验以春兰‘宋梅’根状茎为试材,研究了不同培养基组分对春兰根状茎增殖分化及幼苗生根的影响,以期对春兰组培快繁体系的构建和优良种苗的生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为茎尖诱导产生的春兰‘宋梅’根状茎。

第一作者简介:刘幸佳(1988-),女,硕士研究生,现主要从事兰科植物的组织培养及其菌根真菌研究等工作。E-mail: liuxingjia880228@126.com.

责任作者:崔永一(1966-),男,博士,教授,硕士生导师,现主要从事兰科植物品种改良和生理生化及分子生物学研究等工作。E-mail: orchidcui@163.com.

基金项目:浙江省温州科技局国际合作资助项目(H20080049);浙江省新苗人才计划资助项目(2008R40G2100075);浙江省农业科学院国际合作专项经费资助项目(2045200517)。

收稿日期:2013-05-15

1.2 试验方法

1.2.1 增殖培养 以1/2MS为基本培养基,添加6-BA 0.1 mg/L和活性炭1 g/L,设置NAA质量浓度分别为1.0、3.0、5.0 mg/L;以1/2MS为基本培养基,添加NAA 5.0 mg/L和6-BA 0.1 mg/L,设置活性炭质量浓度分别为0.3、0.5、0.8、1.0 g/L。

1.2.2 分化培养 以MS培养基为基本培养基,对无机盐浓度、6-BA浓度和NAA浓度3个因素做 $L_9(3^4)$ 正交设计(表4),进行3因素3水平正交实验,分析3个因素对根状茎芽分化的影响。选取1 cm左右,生长较一致且无分枝的根状茎接种到上述各处理的培养基中,每处理接种15瓶,每瓶10个接种材料。40 d后,统计增殖倍数(增殖倍数=新长出的根状茎分枝数/接种根状茎数)、最长分枝长、鲜重、干重、根状茎侧枝数及芽诱导个数等指标。

1.2.3 生根培养 选取3 cm左右的芽转入生根培养基诱导生根,以1/2MS为基本培养基,对IBA浓度、6-BA浓度和活性炭浓度3个因素做 $L_9(3^4)$ 正交设计(表7),进行3因素3水平正交实验,分析这3个因素对春兰组培苗生根壮苗的影响。每个处理接种15瓶,每瓶10个接种材料。30 d后,统计株高、叶片数、根长、根数等指标。

以上各处理培养基均加入蔗糖20 g/L和琼脂7.2 g/L,pH调至5.8,以40 mL每瓶分装。接种后材料置于温度25℃,湿度70%~80%,光照强度2 000 lx的培养室中,光照时间14 h/d。

1.3 数据分析

数据统计分析采用SPSS 19.0处理,多重比较用Duncan检验法。

2 结果与分析

2.1 NAA 及活性炭对春兰‘宋梅’根状茎增殖的影响

由表 1 可知,不同浓度的 NAA 对根状茎增殖有显著的促进作用,处理组根状茎增殖倍数均显著高于 CK。在浓度 1.0~5.0 mg/L 范围内,根状茎增殖倍数随 NAA 浓度的升高而升高,并在 5.0 mg/L 时达到最大,同时其根状茎的侧枝长、鲜重和干重的平均值均高于其它处理组。故培养基中添加适宜浓度的 NAA 有利于根状茎增殖生长。

表 1 不同浓度 NAA 对春兰‘宋梅’根状茎增殖的影响

Table 1 Effect of different concentrations of NAA on multiplication of ‘Songmei’ rhizome

NAA /mg · L ⁻¹	增殖倍数 /倍	侧枝长 /cm	鲜重 /g	干重 /g
0(CK)	3.80±0.07cC	0.88±0.05bB	0.34±0.06dD	0.07±0.01dD
1.0	5.17±0.04abAB	1.31±0.04aA	0.49±0.08cC	0.10±0.02cCD
3.0	5.70±0.02aAB	1.32±0.06aA	0.55±0.03cC	0.11±0.01cC
5.0	5.80±0.05aA	1.37±0.01aA	0.88±0.02aA	0.17±0.01aA

注:小写英文字母和大写英文字母分别表示 Duncan 多重比较法检测结果差异显著性($P=0.05$, $P=0.01$),下表同。

由表 2 可知,活性炭同样能够促进根状茎的分枝和生长,根状茎的增殖倍数随活性炭加入量的增加而提高,且以 1 g/L 活性炭的效果最佳。不同活性炭浓度处理的根状茎生长旺盛,增殖倍数、侧枝长度、鲜重和干重均极显著高于 CK。陈锵^[4]研究发现活性炭在 0~3 g/L 浓度范围内,春兰根状茎增殖数和总重量随浓度增加都明显增多。而罗虹^[5]研究表明,活性炭含量高于 5 g/L 时,对墨兰根状茎仍有促进作用,但效果不明显。该研究的活性炭对根状茎增殖效果的影响趋势与上述结论基本一致。

表 2 不同浓度活性炭对春兰‘宋梅’根状茎增殖的影响

Table 2 Effect of different concentrations of activated charcoal on multiplication of ‘Songmei’ rhizome

活性炭 /g · L ⁻¹	增殖倍数/倍	侧枝长 /cm	鲜重 /g	干重 /g
0(CK)	4.26±0.07cC	0.92±0.05cC	0.62±0.06bB	0.12±0.01bB
0.3	5.05±0.08bB	1.22±0.05bB	0.80±0.07aA	0.15±0.01aAB
0.5	5.50±0.03aAB	1.31±0.05aAB	0.85±0.08aA	0.16±0.02aAB
0.8	5.78±0.09aA	1.36±0.09aA	0.86±0.07aA	0.16±0.01aA
1.0	5.88±0.05aA	1.38±0.01aA	0.91±0.02aA	0.17±0.01aA

2.2 无机盐浓度和植物生长调节剂对春兰‘宋梅’根状茎芽分化的影响

由表 3 可知,无机盐浓度及植物生长调节剂的种类、浓度和配比均能够影响根状茎的芽分化。直观分析可以看出,有利于春兰根状茎芽分化的最优组合为处理 5,其效果显著高于处理 3、6、9。仍需进一步对其结果进

表 3 无机盐浓度、6-BA、NAA 对春兰‘宋梅’根状茎芽分化的影响

Table 3 Effect of different concentrations of inorganic salt, 6-BA, NAA on differentiation of ‘Songmei’ rhizome

处理	无机盐浓度	6-BA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	根状茎侧枝数 /个	芽诱导数 /个
1	MS	1.0	0.1	7.31±0.07cC	3.88±0.05aA
2	MS	2.0	0.3	6.03±0.06fE	3.83±0.01aAB
3	MS	3.0	1.0	5.57±0.06gF	2.31±0.03cC
4	1/2MS	1.0	1.0	6.35±0.05eD	3.68±0.07aAB
5	1/2MS	2.0	0.1	5.60±0.05gF	4.11±0.06aA
6	1/2MS	3.0	0.3	8.55±0.07aA	3.04±0.09bBC
7	1/4MS	1.0	0.3	5.16±0.08hG	4.00±0.05aA
8	1/4MS	2.0	1.0	7.77±0.06bB	3.56±0.02abAB
9	1/4MS	3.0	0.1	7.16±0.06dC	3.07±0.02bBC

行极差和方差分析,从而确定最优方案。

表 4 极差分析表明,各因子对根状茎芽分化的影响作用从大到小依次为 6-BA、NAA、无机盐浓度。根状茎芽诱导数随无机盐浓度的减少,呈先升高后降低的趋势,在 1/2MS 时达到最大值;随 6-BA 和 NAA 浓度的增加而降低。

表 4 芽诱导数的极差分析

Table 4 Range analysis of induction of the buds

序号	无机盐浓度	6-BA/mg · L ⁻¹	空列	NAA/mg · L ⁻¹	芽诱导数 /个
1	1(MS)	1(1.0)	1	1(0.1)	3.89
2	1	2(2.0)	2	2(0.3)	3.83
3	1	3(3.0)	3	3(1.0)	2.32
4	2(1/2MS)	1	2	3	3.68
5	2	2	3	1	4.11
6	2	3	1	2	3.04
7	3(1/4MS)	1	3	2	4.00
8	3	2	1	3	3.56
9	3	3	2	1	3.06
K1	10.04	11.57	10.49	11.06	
K2	10.83	11.50	10.57	10.87	
K3	10.62	8.42	10.43	9.56	
k1	3.35	3.86	3.50	3.69	
k2	3.61	3.53	3.52	3.62	
k3	3.54	2.81	3.48	3.19	
R	0.26	1.05	0.04	0.50	

主次因素

6-BA>NAA>无机盐浓度

表 5 方差分析表明,6-BA 因素差异极显著,而无机盐浓度和 NAA 2 个因素差异不显著。因此,6-BA 在根状茎分化成苗中有重要作用。

表 5 芽诱导数的方差分析

Table 5 Variance analysis of induction of the buds

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
区组	0.0155	2	0.0078		
无机盐浓度	0.3389	2	0.1695	1.4251	0.2663
6-BA	6.4889	2	3.2445	27.2834**	0.0001
NAA	0.0097	2	0.0048	0.0406	0.9603
误差	2.1405	18	0.1189		
总变异	8.9936				

综上所述,可确定春兰根状茎芽分化的最适培养基为 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

2.3 植物生长调节剂和活性炭对春兰“宋梅”生根的影响
由表6可以看出,活性炭及植物生长调节剂的种类、浓度和配比在一定程度上能够影响根状茎的芽分

化。直观分析可以看出有利于春兰根状茎芽分化的最优组合为处理1,其效果显著高于处理3、7、8、9。仍需进一步对其结果进行极差和方差分析,从而确定最优方案。

表6 不同浓度 IBA、6-BA 和活性炭对春兰‘宋梅’生根的影响
Table 6 Effect of different concentrations of IBA,6-BA,activated charcoal on ‘Songmei’ rooting

处理	IBA/mg · L ⁻¹	6-BA/mg · L ⁻¹	活性炭	株高/cm	叶片数	生根数	根长/cm
1	0.5	0	1.0	4.67±0.13bB	4.26±0.12cB	1.91±0.06aA	1.20±0.01cBCD
2	0.5	0.1	2.0	4.66±0.16cB	5.34±0.15abA	1.82±0.06aA	1.23±0.08bcBC
3	0.5	0.5	3.0	3.87±0.14dC	3.75±0.02dBC	1.63±0.04bBC	1.03±0.03dDE
4	1.0	0	3.0	6.29±0.11aA	4.25±0.04cB	1.87±0.08aA	1.45±0.07aA
5	1.0	0.1	1.0	5.10±0.13bB	5.28±0.09abA	1.80±0.06aAB	1.33±0.02abAB
6	1.0	0.5	2.0	3.31±0.15cCD	4.97±0.08bA	1.84±0.04aA	1.35±0.08abAB
7	2.0	0	2.0	4.21±0.11cB	5.15±0.08dC	1.51±0.09bC	1.25±0.03bcB
8	2.0	0.1	3.0	3.49±0.14dD	5.00±0.03bA	1.63±0.06bBC	1.06±0.09dCDE
9	2.0	0.5	1.0	3.21±0.10cCD	5.22±0.15aA	1.32±0.06cD	0.88±0.05eE

表7 极差分析表明,IBA 因子对春兰生根影响最大,其次为 6-BA,影响最小的是活性炭;生根数随 6-BA 浓度的增加而减少,随 IBA 和活性炭浓度的增加呈先增加后

表8 生根数的方差分析
Table 8 Variance analysis of rooting

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
区组	0.0160	2	0.0080		
IBA	0.6458	2	0.3229	83.0848 **	0.0001
6-BA	0.1537	2	0.0768	19.7700 **	0.0001
活性炭	0.1219	2	0.0609	15.6818 **	0.0001
误差	0.0700	18	0.0039		
总变异	1.0072				

表7 生根数的极差分析
Table 7 Range analysis of induction of rooting

序号	因素				生根数 /条
	IBA/mg · L ⁻¹	6-BA/mg · L ⁻¹	空列	活性炭/g · L ⁻¹	
1	1(0.5)	1(0)	1	1(1.0)	1.91
2	1	2(0.1)	2	2(2.0)	1.82
3	1	3(0.5)	3	3(3.0)	1.63
4	2(1.0)	1	2	3	1.87
5	2	2	3	1	1.80
6	2	3	1	2	1.84
7	3(2.0)	1	3	2	1.51
8	3	2	1	3	1.63
9	3	3	2	1	1.32
K1	5.36	5.29	5.38	5.03	
K2	5.51	5.25	5.01	5.17	
K3	4.46	4.79	4.94	5.13	
k1	1.79	1.76	1.79	1.68	
k2	1.84	1.75	1.67	1.72	
k3	1.49	1.60	1.65	1.71	
R	0.30	0.16	0.14	0.04	
主次因素 IBA>6-BA>活性炭					

减少的趋势,即活性炭浓度为 2.0 g/L 时,对春兰生根效果最佳。

通过方差分析进一步验证,其结果与极差分析相一致,且 IBA、6-BA 和活性炭对春兰生根的影响均达到极显著水平。综合上述分析,可确定春兰组培苗生根的最适培养基为 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+活性炭 2.0 mg/L。

2.4 移栽驯化

选取株高 13 cm 左右,展叶 5~6 枚,生根 3~5 条的组培苗,洗净根部培养基后,移栽至泥炭土:蛭石为 1:1 的混合基质中,置于温度 25℃,光照强度为 2 000 lx 的培养室,光照时间 14 h/d,保持湿度 70%~80%,5~7 d 浇水。移栽 2 个月后成活率可达到 85.2%。

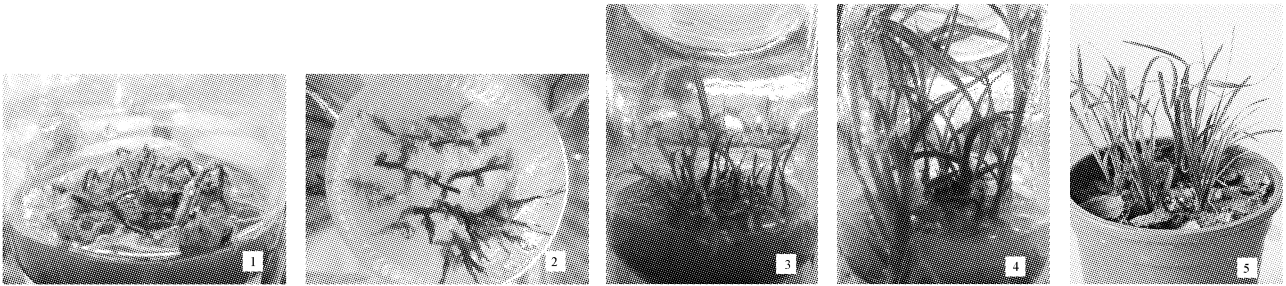


图1 春兰组织培养过程及移栽驯化

注:1:增殖培养;2:分化培养;3:生根培养;4:壮苗培养;5:移栽驯化。

Fig.1 Tissue culture process and transplanting domestication of *Cymbidium goeringii*

Note:1: Multiplication;2: Differentiation;3: Rooting;4: Strong seedling;5: Transplanting domestication.

3 结论与讨论

3.1 不同添加物对春兰根状茎增殖的影响
植物生长调节剂是兰科植物诱芽分化和植株再生

所必需的,其种类和浓度均对根状茎的增殖分化起到重要作用^[6-8];较高浓度的生长素和低浓度的细胞分裂素组合有利于根状茎增殖,反之则有利于根状茎分化成

苗。该研究探讨了不同质量浓度的 NAA 对春兰根状茎增殖效果的影响,结果表明 1.0~5.0 mg/L NAA 均有利于根状茎增殖,与孔凡龙等^[9]的研究结果相似。

低浓度的活性炭可吸附培养过程中外植体所分泌的酚、醌类等有害物质,有利于原球茎、根状茎及苗的生长^[10],但高浓度可能会吸附培养基中生长调节剂及烟酸、维生素 V6 等组分,不利于植株生长。陈镭^[4]研究表明,活性炭在 3.0 g/L 内均对春兰根状茎的增殖有促进作用。罗虹^[5]研究表明,在墨兰根状茎增殖培养基中加入活性炭能够加速根状茎长粗和多分枝,但当浓度达 5.0 g/L 效果不明显。该研究探讨了低浓度活性炭对春兰根状茎增殖效果的影响,结果表明活性炭浓度在 1.0 g/L 内,春兰‘宋梅’根状茎增殖倍数和鲜重随活性炭浓度的增加而提高;而活性炭浓度>1.0 g/L 对根状茎增殖的影响作用仍需进一步研究。

3.2 植物生长调节剂对根状茎芽分化的影响

细胞分裂素 6-BA 在兰科植物组织培养中对根状茎芽诱导起着重要作用。该研究采用正交设计,确定春兰根状茎芽分化的最适培养基为 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L,这与石乐娟等^[11]的研究结果相似,即当 6-BA 浓度达 1.0 mg/L 时,根状茎的芽分化效果最好。褚云霞等^[12]认为 6-BA 的浓度为 3.0 mg/L 的培养基最有利于春兰根状茎诱导芽分化,而该研究中 6-BA 3.0 mg/L 处理对根状茎诱导芽分化的效果略差,这可能是由于不同品种的基因型、内源激素和多酚类物质含量等因素存在差异,致使诱导启动的难度不尽相同。在兰花优良种苗的繁育过程中,应针对不同种类找出各自最适培养基和培养条件,才能实现高效快速繁殖。

3.3 植物生长调节剂对组培苗生根的影响

生长素 IBA 对兰科植物生根效果显著。李洪林等^[13]以 IBA 1.0 mg/L 培养基对独蒜兰进行生根培养,其生根率可达 90%。项艳等^[14]研究发现,墨兰生根过

程中高浓度的 IBA 刺激根生长的效果较明显。该研究以 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+活性炭 2.0 g/L 的培养基生根效果最佳,且有利于幼苗生长。不同组分的培养基诱导兰花组培苗根分化效果不同,寻找一种适宜的生根培养基,对缩短出苗时间和提高兰花苗的移栽成活率,具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Bhadra S K, Hossain M M. In vitro germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species[J]. Plant Tissue Culture, 2003, 3(2): 165-171.
- [2] Shimasaki K, Uemoto S. Rhizome induction and plantlet regeneration of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures in vitro[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991(25): 49-52.
- [3] 李丽, 罗君琴. 春兰离体培养及植株再生(简报)[J]. 亚热带植物科学, 2007, 36(2): 65-66.
- [4] 陈镭. 春兰根状茎增殖与诱芽技术研究[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(7): 33-35.
- [5] 罗虹. 活性炭对墨兰根状茎生长的影响[J]. 广东农业科学, 1998(1): 30-31.
- [6] 石乐娟, 张放. 春兰根状茎的增殖与分化的影响因素研究[J]. 浙江农业科学, 2006(6): 638-641.
- [7] 周全, 余平. 春兰根状茎的增殖与分化条件优化[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(1): 27-30.
- [8] 孙崇波, 刘玫, 施季森, 等. 蕙兰种子无菌萌发及植株再生[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(4): 231-235.
- [9] 孔凡龙, 贾玉芳, 柴明良, 等. 春兰离体根状茎生长和分化的研究[J]. 核农学报, 2009, 23(2): 253-256.
- [10] 卜学贤, 陈维伦. 活性炭对培养基中植物生长调节物质的吸附作用[J]. 植物生理学报, 1988, 14(4): 401-405.
- [11] 石乐娟, 张放, 张士良, 等. 植物生长调节剂对线艺春兰根状茎的增殖与分化的影响[J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 887-890.
- [12] 褚云霞, 张永春, 靖相密, 等. 春兰根状茎增殖与分化培养[J]. 上海农业学报, 2007, 23(3): 82-85.
- [13] 李洪林, 付志惠, 杨波. 独蒜兰的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 632.
- [14] 项艳, 於凤安, 彭镇华. 墨兰离体快繁研究[J]. 林业科学研究, 2003, 16(4): 434-438.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Cymbidium goeringii*

LIU Xing-jia¹, XU Wei-wei², CUI Yu-hua³, CUI Yong-yi⁴

(1. School of Landscape Architecture, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300; 2. Cixi Agriculture Technology and Popularization Center, Cixi, Zhejiang 315300; 3. Office of Rural Energy and Environmental Protection in Longjing of Jilin Province, Longjing, Jinlin 133400; 4. School of Agricultural and Food Science, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300)

Abstract: With rhizomes of *Cymbidium goeringii* ‘Songmei’ as explants, the effects of plant growth regulators (NAA) and activated charcoal on multiplication of rhizomes were studied, the media components for differentiation and rooting were screened by orthogonal test. The results showed that NAA and activated charcoal could promote the multiplication and growth of rhizomes in different degrees. For differentiation it was the best on 1/2MS medium containing 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA. As for rooting, 1/2MS supplemented with 1.0 mg/L IBA and 2.0 g/L activated charcoal was the best.

Key words: *Cymbidium goeringii*; rhizomes; tissue culture; rapid propagation