

大花蕙兰的组织培养和次生代谢物质的调控

张瑜, 付艳, 殷奎德

(黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319)

摘要:以茎尖、茎段、叶片、根尖作为外植体, 研究了大花蕙兰组织培养, 同时也对次生代谢物质的调控因素进行了探讨。结果表明, 茎尖是最佳的外植体; 培养基 MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1mg/L 对大花蕙兰愈伤组织和原球茎的诱导最好; 培养基 MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.5mg/L 对大花蕙兰原球茎的增殖较好; 激素积累和温度都能增加次生代谢物质的分泌。

关键词:大花蕙兰; 组织培养; 次生代谢物质

中图分类号:S6823132 **文献标识码:**A

The Tissue Culture of Cymbidium Grandiflorum and Regulation of Secondary Metabolite

Zhang Yu, Fu Yan, Yin Kuide

(College of Life Science and Biotechnology of Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319)

Abstract: Studies were carried out on tissue culture of Cymbidium grandiflorum, using terminal buds, stem sections, leaf blades and terminal roots as explants. At the same time, the discussions were continued on the regulative factors of secondary metabolite. The results showed that the terminal buds were the best explants, MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1mg/L was good for induction of callus and protocorm and MS+6-BA1.0mg/L + NAA0.5mg/L was more beneficial to proliferation of protocorm. The accumulation of hormone and temperature could increase the secretion of secondary metabolite.

Key words: Cymbidium grandiflorum, tissue culture, secondary metabolite

大花蕙兰 (*Cymbidium grandiflorum*) 是兰属中的一个种, 又称西姆比兰、虎头兰、系指原产于喜马拉雅山、印度、缅甸、泰国等地蕙兰的大型花原种以及它为基础杂交而得到的品种, 具有植株强健, 花大花多, 花色艳丽, 花期长等优点^[1], 是世界上栽培最普及的洋兰之一, 享有“兰花皇后”的美誉^[2]。尤其是当代的大花蕙兰品种, 都是经过一百余年多代杂交选育出的优良品种。与原种比较, 花型规整, 花瓣宽, 花朵优美, 色彩艳丽而丰富, 花茎直立而挺拔, 花朵数目多且排列紧密, 深受国内外兰花爱好者的欢迎, 具有较大的市场潜力。但大花蕙兰在自然状态下繁殖困难, 种子萌发率极低, 仅为 5% 左右, 且大花蕙兰传统分株繁殖周期长, 效率低^[3], 难以满足规模化生产的需要。所以应用组织培养的方法在短期内获得大批遗传性稳定的大花蕙兰优良种苗具有十分现实的意义。笔者对大

花蕙兰组织培养快繁技术进行了初步研究, 摸索出一套快速繁殖大花蕙兰的方法, 为大花蕙兰工厂化育苗提供了科学依据。同时笔者也就试验过程中遇到的大花蕙兰次生代谢物质分泌的主要原因及防治措施进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为南京中山植物园所提供的大花蕙兰试管苗。

1.2 方法

1.2.1 外植体的选取 本试验选取具有 5 片叶以上的健壮大花蕙兰试管苗为试材, 选用的外植体有茎尖、茎段、叶片、根尖。

1.2.2 培养基的筛选 试验以 MS 为基本培养基, 附加不同的植物生长调节剂, 试验设计如下配方, 其中每

基金项目: 黑龙江省大庆市资助项目“名贵花卉快速繁殖与万寿菊高产栽培体系的研究”(课题 SGG04-064)

第一作者简介: 张瑜, 女, 1981 年出生, 在读硕士研究生, 专业方向: 作物遗传育种。通讯地址: 163319 黑龙江省大庆市黑龙江八一农垦大学生命学院研究生。Tel: 0459-6819291, E-mail: zhangyu7992@163.com。

通讯作者: 殷奎德, 1964 年出生, 男, 教授, 硕士研究生导师。Tel: 0459-6819291, E-mail: yinkuide@sohu.com。

收稿日期: 2006-04-19, **修回日期:** 2006-05-20

个培养基接种 10 瓶,每瓶接种 2~4 个外植体,进行对比,观察其生长长势。

原球茎诱导、增殖培养基

MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.1mg/L

MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.5mg/L

MS+6-BA1mg/L+NAA0.1mg/L

MS+6-BA1mg/L+NAA0.5mg/L

MS+6-BA2mg/L+NAA0.1mg/L

MS+6-BA2mg/L+NAA0.5mg/L

MS+6-BA3mg/L+NAA0.1mg/L

MS+6-BA3mg/L+NAA0.5mg/L

壮苗生根培养基

1/2MS+NAA0mg/L

1/2MS+NAA0.2mg/L

1/2MS+NAA0.5mg/L

1/2MS+NAA1mg/L

1.2.3 培养条件

(1) 大花蕙兰组织培养的培养条件 pH5.2~5.8,蔗糖 3%,琼脂浓度 0.7%,培养室温度 22~25℃,每天光照 12h,光照强度 2000lx。

(2) 大花蕙兰次生代谢物分泌的培养条件 将初代培养诱导出来的原球茎接种到继代增殖培养基上,置于不同的温度条件即 23℃,27℃,31℃,其余条件均相同的环境下培养,继代两个月,每 20d 换一次培养基,观察培养基的情况。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对诱导率的影响

试验中选用的外植体有茎尖、茎段、叶片和根尖。它们诱导出的愈伤组织和原球茎的数目有明显差异(见表 1)。

其中以茎尖的诱导率最高,可达到 70%,且诱导出的愈伤组织和原球茎的质量较好,颜色浓绿,茎段

表 1 不同外植体对诱导率的影响

外植体	外植体数 (个)	诱导愈伤组织数 (个)	诱导原球茎数 (个)	诱导率 (%)
茎尖	30	6	15	70.0
茎段	30	3	10	43.0
叶片	30	1	0	3.3
根尖	10	0	0	0.0

的诱导率也较高,能达到 43%,且诱导出的愈伤组织和原球茎的质量也较好,但在茎段的诱导过程中褐化现象较为明显,应勤换培养基以避免其褐化现象的发生。叶片的诱导率很低,大多数叶片边缘都褐化死亡。而根尖则由于变干萎蔫没有诱导出愈伤组织和原球茎。这说明茎尖的分生能力明显优于其它部位,是大花蕙兰组培的最佳外植体。

2.2 不同激素配比对茎尖诱导率的影响

将茎尖接种到添加不同激素浓度的 MS 培养基

上,20d 后,就会发现茎尖周围有不同程度的愈伤组织和原球茎长出,由表 2 可以看到不同的激素梯度下诱导出的愈伤组织数和原球茎数明显不同。在初分化过程中,当 6-BA<2mg/L 时,适当的增加 6-BA 的浓度能够明显促进愈伤和原球茎的产生,但当 6-BA>2mg/L,则会对愈伤和原球茎的诱导产生抑制作用。不仅如此,6-BA 和 NAA 二者之间的比值也非常重要,当 6-BA 和 NAA 的比值为 10 时,诱导率最高,达到 70%,比值太大、太小都会使诱导率降低。

表 2 不同激素比对茎尖诱导率的影响

培养基	6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	接种数 (个)	诱导愈伤组织数 (个)	诱导原球茎数 (个)	诱导率 (%)
MS	0.5	0.1	30	3	10	43.3
MS	0.5	0.5	30	1	11	40.0
MS	1.0	0.1	30	6	15	70.0
MS	1.0	0.5	30	4	12	53.3
MS	2.0	0.1	30	2	8	33.3
MS	2.0	0.5	30	1	7	26.7
MS	3.0	0.1	30	1	7	26.7
MS	3.0	0.5	30	1	6	23.3

2.3 不同激素比对原球茎增殖的影响

将原球茎切成大小均匀的小块接种到下面的培养基中进行增殖培养,一个月后比较原球茎的增殖情况,结果见表 3。

原球茎在下述培养基中都能够快速增殖长出新的原球茎,但不同的激素梯度下,增殖倍数不尽相同,如表 4,当 6-BA1mg/L, NAA0.5mg/L 时,增殖倍数最

高,可达到 4.12,且原球茎的质量很好,色泽浓绿,长成的小苗健壮挺拔。而在其它梯度水平下的原球茎虽然可得到增殖,但原球茎色淡,增殖时间长,分化的小苗生长也较缓慢。

2.4 不同激素比对诱导生根的影响

当小苗长到 3~5cm 时,将其从增殖培养基转移至如下生根壮苗培养基中,观察生根情况,结果(见表

表 3 不同激素配比对原球茎增殖的影响

培养基	6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	平均增殖倍数	生长情况
MS	0.5	0.1	3.04	+
MS	0.5	0.5	3.13	+
MS	1.0	0.1	3.54	++
MS	1.0	0.5	4.12	+++
MS	2.0	0.1	3.80	++
MS	2.0	0.5	3.58	++
MS	3.0	0.1	3.21	+
MS	3.0	0.5	3.40	+

表 4 不同激素配比对诱导生根的影响

培养基	激素(mg/L)	根诱导率(%)	苗长势
1/2MS	NAA 0	3	植株生长缓慢, 弱小
1/2MS	NAA 0.2	69	植株生长健壮, 根多、粗且长
1/2MS	NAA 0.5	42	植株生长较健壮, 根少且细弱
1/2MS	NAA 1.0	16	植株生长缓慢, 根细弱

5)表明 NAA0.5mg/L 为最佳,此浓度下诱导的根多且很粗壮。当苗长到 5~6 片叶时,就可练苗移栽。

2.5 不同温度梯度对原球茎分泌次生代谢物质的影响

经过三个月的继代,发现置于不同温度条件下的培养基出现明显差异(见表 6),结果表明高温能促进

大花蕙兰中次生物质的代谢增强,使分泌物增加,这种分泌物质破坏了培养基中原有的养分,对大花蕙兰的生长产生抑制作用。

2.6 试管苗移栽

当苗长到 5~6 片叶,3 条根以上时,即可进行移栽,一般移栽前,先将容器打开盖子,于室温自然光下

表 5 不同温度梯度对原球茎分泌次生代谢物质的影响

温度/℃	培养基颜色	生长情况
23	白色	色泽浓绿, 分化的植株生长健壮
27	大多数为白色, 少量为粉红色	色泽淡绿, 分化的植株生长缓慢
31	大多数为粉红色, 少量为红色	色泽黄绿, 分化的植株细小瘦弱

放 3d,然后取出苗,用自来水将根系上的琼脂冲洗干净,再栽种到已灭过菌的基质中,基质以苔藓为佳,成苗率可达 100%。定植后的植株最好遮光 50%,温度 15~20℃,保持一定的相对湿度,且要注意通风。同时注意加强水肥管理,以少施、勤施为主,3~4 个月后可单株移植。

3 讨论

(1) 通过试验得出培养基 MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1mg/L 对大花蕙兰的愈伤组织和原球茎的诱导较好;培养基 MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.5mg/L 对大花蕙兰原球茎的增殖较好;培养基 MS+NAA0.2mg/L 对大花蕙兰的生根壮苗最佳。如果按其不同发育阶段给其最佳培养基,可在短期内完成大花蕙兰原球茎的继代、育苗、生根、壮苗 4 个阶段,可大大缩短工厂化育苗的时间。

(2)在笔者组织培养过程中遇到了一种不同于褐化的培养基变红的现象,通常认为是大花蕙兰分泌的次生代谢物质所致。影响这种代谢物质分泌的因素很多,温度是其主要原因之一,当温度升高时,会增加代

谢物的分泌,加速多酚氧化酶的氧化,使培养基变成粉红色,甚至红色,抑制植物的生长。

(3)当继代次数增加时,同样会出现这种培养基变红的现象,笔者认为随着继代次数的增加,某些激素会在植物体内进行积累,这种积累的结果会扰乱植物的正常生理代谢,使次生代谢物质的分泌增强,这种分泌物聚积在培养基中,使培养基变红,如果选用不含激素的继代培养基进行继代,这种现象就会明显减弱,因此在继代过程中可以选用两种培养基交替继代。

参考文献

- [1] 熊丽,吴丽芳.观赏花卉的组织培养与大规模生产[M].北京:化学工业出版社.2002,127~128
- [2] 松华.大花蕙兰史略[J].1995,53(1):14
- [3] 陈菁瑛,蓝贺胜.兰花组织培养与快速繁殖技术[M].北京:中国农业出版社.2004,82~84

(责任编辑:韩剑锋)