维普资讯 http://www.cqvip.com

第24卷 第4期 上海交通大学学报(农业科学版) Vol.24 No.4
2006年8月 JOURNAL OF SHANGHAI JIAOTONG UNIVERSITY (AGRICULTURAL SCIENCE) Aug.2006

文章编号:1671-9964(2006)04-0365-05

大花蕙兰(*Cymbidium hybridium*)离体快速繁殖技术

殷丽青[1,2],王广东[1],张建军[2],王新其[2],沈革志[2],杜永芹[2],李秀芬[2]
(1.南京农业大学 园艺学院,南京 210095;2.上海市农业科学院 林木果树研究所,上海 201106)

摘 要:以大花蕙兰茎尖和茎节段作外植体进行了离体快速繁殖技术研究。结果显示:茎尖诱导芽的效果优于茎节段;适宜诱导培养基为 MS+BA 4.0 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1}+AC 0.6 g·L^{-1},茎尖在该培养基上芽的诱导率为 71.4%;丛芽增殖适宜培养基为 MS+ BA 2.0 mg·L^{-1} +NAA 0.2 mg·L^{-1}+ AC 03. g·L^{-1},增殖率为 3.79; 原球茎增殖、分化的适宜培养基为 MS+ BA 1.0 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1}+ AC 0.3 g·L^{-1},增殖率为 6.1,分化率为 71.1%;生根和壮苗的适宜培养基为 MS+NAA 0.5 mg·L^{-1}+AC 0.3 g·L^{-1},试管苗生根率达 100%。

关键词:大花蕙兰(*Cymbidium hybridium*);组织培养;快速繁殖
中图分类号:S682.31 **文献标识码**:A

Study on *In Vitro* Rapid Propagation of *Cymbidium hybridium*

YIN Li-qing[1,2], *WANG Guang-dong*[1], *ZHANG Jian-jun*[2],
WANG Xin-qi[2],*SHEN Ge-zhi*[2], *DU Yong-qin*[2], *LI Xiu-fen*[2]
(1. College of Horticulture, Nanjing Agriculturl University, Nanjing 210095;
2. Forestry and Pomology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China)

Abstract: In this paper, the studies were carried out on *in vitro* rapid propagation techniques of *Cymbidium hybridium*, using shoot tips and stem sections as explants. The results showed inducing percentage of shoot tips is higher than that of stem sections,the optimal medium for inducing the shoot tips was MS +4.0 mg·L^{-1} BA + 0.2 mg·L^{-1} NAA +0.6 g·L^{-1} AC,the inducing rate of shoot tips was 71.4%.The optimal medium for propagation of clumpy buds was MS +2.0 mg·L^{-1} BA + 0.2 mg·L^{-1} NAA+0.3 g·L^{-1} AC,and the propagation coefficient was 3.79. The optimal medium for the multicapltion and differentitation of the protocorms was MS +1.0 mg/LBA + 0.2 mg·L^{-1} NAA+0.3 g·L^{-1} AC, and the propagation coefficient of the protocorms was 6.1, the differentitation rate was 71.1%. MS +0.5 mg·L^{-1} NAA +0.3 g·L^{-1} AC was better for the plantlet growth and rooting, and 100% of plantlets rooted well.
Key words: *Cymbidium hybridium*; tissue culture; rapid propagation

大花蕙兰(*Cymbidium hybridium*)是一类经杂交改良的大花型附生兰花,由于她具有大而奇特的花形,艳丽多变的花色,较长的花期等优点而深受广大消费者的喜爱。近年来进口大花蕙兰已成为我国花卉市场新宠,深受广大消费者的青睐,具有很大的市场潜力。由于大花蕙兰种子发芽率低,且种子实生苗变异大,商品苗主要通过无性繁殖获得,常规的分株繁殖速度缓慢,远不能满足商品化生产的要求[1,2]。通过组织培养技术实现种苗工厂化生产是建立大花蕙兰等兰花产业化体系的技术关键。国内外已有一些大花蕙兰组

收稿日期:2006-03-10
作者简介:殷丽青(1965-)女,上海市嘉定人,在读硕士,副研究员,研究方向:植物生物技术,E-mail:gdwang@njau.edu.cn;
王广东为本文通讯作者.

维普资讯 http://www.cqvip.com

织培养研究的报道[3~10],谷祝平等报道了大花蕙兰茎尖培养及其形态建成的研究[3,4],王维华等报道了大花蕙兰鳞茎培养及高频率幼苗繁育的研究[5],还有学者报道了培养基中糖浓度、添加天然复合物,切割原球茎方式及育苗基质筛选的研究[6~10]。本研究以大花蕙兰幼芽的茎尖和茎节段为外植体,进行大花蕙兰的无菌芽诱导、丛生芽增殖、原球茎的增殖与分化、试管苗生根等组织培养技术研究,为建立和完善大花蕙兰种苗工厂化生产体系提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

大花蕙兰供试材料系上海向农科技有限公司提供的大花蕙兰品种"华尔兹",以健壮母株基部萌发的幼芽茎尖及茎节段为外植体进行离体培养研究。

1.2 方法

1.2.1 *外植体的准备和无菌系的建立* 选长 4~8 cm 长的幼芽,用解剖刀贴紧芽基部切离,剥去最外面 1~2枚叶片, 用流水冲洗 30 min, 剪掉芽的上半部分,75%酒精灭菌 30 s 后用 0.1% $HgCl_2$ 灭菌 12 min,$HgCl_2$ 溶液中附加 2 滴土温 80。外植体灭菌后用无菌水冲洗 4~5 次,浸于含维生素 C 2 $g \cdot L^{-1}$ 的无菌水中备用。接种前用无菌吸水纸吸干外植体表面的水分,在无菌条件下,剥去幼芽上的包叶,将茎尖(0.6 mm 左右)或带节的茎段接种于诱导培养基。在外植体诱导过程中,根据其生长及褐化情况适时进行转接。

1.2.2 *培养基及培养条件* 以 MS 为基本培养基,不同阶段添加不同种类和浓度的植物生长调节剂和附加物,诱导培养基添加活性炭 0.6 $g \cdot L^{-1}$,生根培养基中添加蔗糖 20 $g \cdot L^{-1}$,多效唑 0.2 $mg \cdot L^{-1}$,其余所有培养基均添加活性炭 0.3 $g \cdot L^{-1}$,蔗糖 30 $g \cdot L^{-1}$,水解酪蛋白 1 $g \cdot L^{-1}$,琼脂粉 6.5 $g \cdot L^{-1}$,pH 为 5.6。培养温度 25~28 ℃,光照 12 $h \cdot d^{-1}$,光强 2 000 lx 左右。外植体诱导阶段进行弱光照培养。

1.2.3 *结果统计分析* 外植体抗褐化试验于接种后的 1、3、5、10、20 d 观察记录外植体的褐变情况, 培养 30 d 后调查统计褐变死亡率。"R"表示没有褐变;"+"表示外植体表面轻微褐变;"++"表示有少数(15%以下)外植体褐变比较明显;"+++"表示有较多(30%以上)外植体明显褐变;"++++"表示外植体严重褐变(90%以上褐变并逐渐死亡)。无菌芽诱导、丛芽增殖、原球茎增殖与分化等试验分别于接种后 45 d 观察、统计结果;壮苗生根试验于接种后 35 d 观察、统计结果。

2 结果与分析

2.1 不同附加成分对抑制外植体褐化的影响

在大花蕙兰组织培养的最初几代,外植体的褐化现象较为严重,本研究将活性炭、聚乙烯吡咯烷酮、香蕉泥等加入培养基中,观察外植体的褐变情况并统计褐变死亡率,结果如表 1 所示:未添加任何抗褐化物质的培养基上,3~5 d 后有少数外植体褐变比较明显,20 d 后接种物严重褐变,并陆续死亡,整瓶培养基也全部变为红色。将适量活性炭、聚乙烯吡咯烷酮、香蕉泥等抗褐化物质加入培养基中,均可不同程度地抑制培养物的褐化现象,其中 0.6 $g \cdot L^{-1}$ 活性炭抑制培养物褐化效果较好,培养 30 d 后褐变死亡率为 19.1%,成活率达 81.9%;其次为聚乙烯吡咯烷酮,30 d 后培养物的成活率达 68.2%;香蕉泥对抑制大花惠兰褐化也有一定效果,但部分材料出现水渍状死亡,30 d 后成活率为 47.0%。

表 1 培养基中不同附加成分对外植体褐化的影响

Table 1 Effect of different additions in medium on browning of the explants

附加物 Additions	浓度/($g \cdot L^{-1}$) Concentration	1d	3d	5d	10d	20d	褐变死亡率/% Rate of browning and died
活性炭 Activated charcoal	0.6	R	R	R	+	++	19.1
聚乙烯吡咯烷酮 Polyvinglpyrrolidone	0.6	R	R	+	++	+++	31.8
香蕉泥 Banana mud	100	R	+	++	++	+++	53.0
对照 Control	/	+	++	++	+++	++++	100

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 植物生长调节剂对无性系诱导的影响

经灭菌处理的茎尖和茎节段接种于含不同生长调节剂的诱导培养基上,结果表明:在 4 种诱导培养基上均能获得无性系。当 BA 浓度在 0.5~4.0 mg·L^{-1} 时,获得无性系的比例随着 BA 浓度的提高而增大(见表 2),4 种处理中,BA 4.0+NAA 0.2 的生长调节剂配比中最适宜大花蕙兰无性系的诱导,且丛生芽的形成率也较高,在该培养基上,外植体接种 15 d 后逐渐开始形成无菌芽,45 d 后茎尖诱导培养获得无性系的比例为 71.4%,丛生芽诱导率为 28.6%,茎节诱导培养获得无性系的比例为 57.1%,丛生芽诱导率为 14.3%。研究结果同时表明,茎尖和茎节段 2 种不同外植体对培养基中激素配比和浓度要求基本一致。比较了 2 种不同外植体诱导无性系的效果,表明茎尖诱导无性系的效果优于茎节段,前者不但无性系诱导率高,生长粗壮,而且丛生芽诱导率也明显高于后者。

表 2　不同激素浓度对外植体诱导芽的影响

Table 2 Effect of plant growth regulator on the shoot inducing from the explant　　%

生长调节剂/(mg·L^{-1}) Plant growth regulator	茎尖诱导率 Inducing rate of shoot tips			茎节段诱导率 Inducing rate of stem sections		
	单芽	丛芽	无性系	单芽	丛芽	无性系
BA 0.5+NAA 0.2	18.2	0	18.2	14.3	0	14.3
BA 1.0+NAA 0.2	33.3	0	33.3	26.7	0	26.7
BA 2.0+NAA 0.2	41.6	16.7	58.3	41.7	0	41.7
BA 4.0+NAA 0.2	42.8	28.6	71.4	42.8	14.3	57.1

2.3 生长调节剂对丛生芽与原球茎增殖的影响

2.3.1　*不同生长调节剂种类和浓度对丛生芽增殖的影响*　剪去无菌芽上半部分,将其基部切成 1~3 个组织块后接种于不同培养基,45 d 后统计增殖芽数,比较不同生长调节剂对大花蕙兰丛生芽增殖的影响。结果如表 3 所示:大花蕙兰丛生芽增殖的最佳培养基为 MS +BA 2.0 mg·L^{-1}+ NAA 0.2 mg·L^{-1}+AC 0.3 g·L^{-1}。在相同营养成分的培养基上,无激素条件下大花蕙兰无性系增殖缓慢,但叶片伸展较快;在加入少量 NAA 的培养基中,大花蕙兰丛生芽的增殖系数随着 BA 浓度的提高而增大,但激素浓度过高不利于其丛芽的生长繁殖,且存在玻璃化现象。在相同条件下,KT 的作用小于 BA,当 KT 浓度由 1.0 mg·L^{-1} 增加到 4.0 mg·L^{-1} 时,丛生芽的增殖系数从 1.26 提高到 2.08,其效果远不如相同浓度 BA 的增殖效果。实验中还发现,随着继代时间的推移(30 d 后),除对照(无激素培养基)外,所有增殖培养基上的培养物基部均会产生白色颗粒状组织并逐渐转绿形成原球茎(见图 1-1)。

表 3　不同生长调节剂种类和浓度对丛芽增殖的影响

Table 3 Effects of different media on shoot multiplication

生长调节剂 Plant growth regulator/(mg·L^{-1})	增殖系数 Propagation coefficient	生长情况 Growth state
0	1.09	叶片伸展较快,不形成原球茎
BA 1+NAA 0.2	1.95	生长好,基部形成原球茎壮
BA 2+NAA 0.2	3.79	生长旺,基部形成原球茎多
BA 4+NAA 0.2	4.58	芽多,细弱,有玻璃化现象
KT 1+NAA 0.2	1.26	叶片伸展较快,偶有原球茎形成
KT 2+NAA 0.2	1.86	生长正常,基部形成少量原球茎
KT 4+NAA 0.2	2.08	生长弱,基部形成少量原球茎

2.3.2　*不同生长调节剂种类和浓度对原球茎增殖和分化的影响*　在增殖培养基上,随着继代次数的增多,形成原球茎的数量逐渐增多。为了提高大花蕙兰的繁殖效率,本研究探索了不同激素种类和配比对原球茎增殖和分化的影响。结果如表 4 所示:当培养基中 NAA 浓度较低(0.2 mg·L^{-1})时,BA 浓度低,原球茎增殖慢,但萌发正常,展叶快,适当提高 BA 浓度,可大大提高原球茎增殖系数,芽的分化率也大大提高,进一步提高加 BA 浓度,原球茎增殖速度稍有提高,但芽的分化率降低了 7.7%;当培养基中 NAA 浓度较高(0.5 mg·L^{-1})时,比较有利于原球茎的增殖,但不利于原球茎分化芽。根据结果比较,MS+BA 1.0 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1},有利于原球茎的增殖与分化同时进行,在该培养基上,12 d 左右培养物基部开始形成新的原球茎并不断增殖,先形成的原球茎分化成丛生芽(见图 1-2,图 1-3),随着培养时间的推移,部分丛生芽逐渐展叶、生根,50 d 左右可形成完整的大花蕙兰试管苗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 4 不同培养基对原球茎增殖和芽分化的影响

Table 4 Effects of different media on protocorms multiplication and differentitation

BA/(mg·L⁻¹)	NAA/(mg·L⁻¹)	增殖系数 Propagation ceofficient	分化率/% Rate of differentitation	生长情况 Growth state
0.5	0.2	2.1	56.9	原球茎长势差,但能萌发
1.0	0.2	6.1	71.1	原球茎增殖快,分化率高
2.0	0.2	6.6	63.4	原球茎增殖快,生长正常
0.5	0.5	4.2	38.5	原球茎稀少,萌发慢,
1.0	0.5	11.7	42.2	原球茎增殖快,萌发慢
2.0	0.5	9.8	29.7	原球茎增殖快,分化率低

2.4 不同培养基对幼苗生根的影响

将增殖培养获得的大花蕙兰幼苗分别接种于附加活性炭并添加不同生长素的培养基上，以 MS 无生长激素培养基作对照诱导生根。结果如表 5 所示,NAA 对诱导大花蕙兰幼苗的生根具有明显的促进作用,在 MS+NAA 0.3 mg·L⁻¹ AC 0.3 g·L⁻¹+培养基上，幼苗生根率和根数比对照的分别提高了 49.6%和 63.6%;适当提高 NAA 浓度至 0.5 mg·L⁻¹，对大花蕙兰幼苗的诱导生根及其试管苗的生长具有很大的促进作用,幼苗生根率可达 100%,每株平均根数为 5.4 条,比对照的分别提高了 136.4%和 390%;当提高 NAA 浓度至 1.0 mg·L⁻¹ 则试管苗的生根率、根数等指标开始下降,近基部出现少量的气生根。当 NAA 浓度提高到 2.0 mg·L⁻¹ 时,试管苗基部长根较少或不长根,叶腋间气生根多,苗比较瘦弱,叶片发黄,说明 NAA 浓度过高对大花惠兰无根苗生根具有抑制作用。由此可见,在大花蕙兰试管苗的生根培养基中附加 NAA 是必须的,适宜浓度为 0.3~1.0 mg·L⁻¹,最适宜浓度为 0.5 mg·L⁻¹。在适宜培养基上,试管苗 10 d 后开始陆续长根,根系粗壮,叶色深,生长旺(见图 1-4)。

表 5 不同培养基对试管苗生根的影响

Table 5 Effect of different media on rooting of shoot

生长调节剂 Plant growth regulator/(mg·L⁻¹)	接种苗数(株)No of primary shoots	生根苗数(株)No of rooting shoots	每株平均根数(条) No.of average roots	生根率 Rate of rooting/%
NAA 0	26	11	1.1	42.3
NAA 0.3	30	19	1.8	63.3
NAA 0.5	30	30	5.4	100.0
NAA 1.0	30	28	4.3	93.3
NAA 2.0	27	10	1.2	37.0

3 讨论

在大花蕙兰组织培养中,褐化现象往往会影响其离体培养效果,防止外植体褐变是诱导其无菌系的关键,外植体如果发生褐变,随着时间的推移，外植体的褐变程度会逐渐加深,轻则抑制材料的生长,重则导致死亡。本研究将活性炭、聚乙烯吡咯烷酮、香蕉泥添加于培养基对降低外植体的褐变死亡率具有较好的效果。当外植体出现褐化后,及时将其转接于相同成分的新鲜培养基上,也有助于控制褐化现象的扩展。

在植物组织培养中植物再生途径有体细胞胚胎发生和器官发生两种,具体通过哪种途径形成再生植株受外植体种类及培养基中生长调节剂的种类和浓度的影响。有研究者认为,大花惠兰组织培养中原球茎是来源于体细

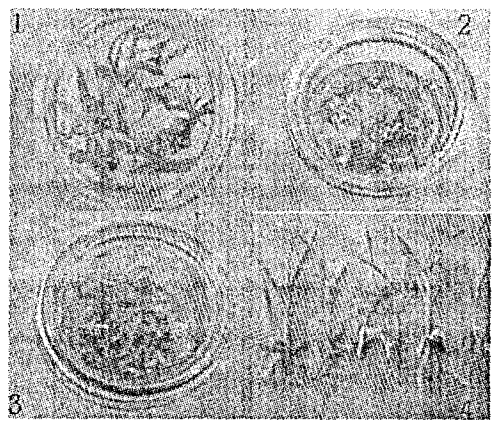

图 1 大花蕙兰离体快速繁殖过程

Fig. 1 *In Vitro* papid propagation of *Cymbidium hybridium*

1.丛芽的增殖及原球茎的诱导 Propagation of clumpy buds and protocorms inducing

2.原球茎的增殖与分化 Protocorms multiplication and differentitation

3.丛生芽 Propagation of clumpy shoots

4.生根的幼苗 Regenerated plantlets

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞胚胎发生途径[11]。本研究中,由外植体诱导直接获得无菌芽进行增殖培养,此过程则属于器官发生途径。

通常,大花惠兰组织培养是由外植体诱导获得原球茎,再进行增殖、分化、生根[3,8~10]。而丛生芽则是大花惠兰快速繁殖的新途径[12],本研究利用大花惠兰幼芽的茎尖和茎节段作外植体,诱导直接获得无菌芽,其中包括单芽和丛芽,在丛芽增殖过程中获得了原球茎,在原球茎增殖过程中,部分原球茎可直接分化、生根形成完整植株。说明大花惠兰可以通过组织培养一步成苗,即在同一培养基上完成增殖、分化和生根,这对于简化培养程序、降低快速繁殖成本具有重要作用。对于种源稀少,急需获得无性系的大花惠兰品种(株系),可利用外植体诱导获得的无菌芽直接生根获得完整试管苗,不必经过原球茎途径,可大大缩短组织培养时间。

提纯复壮是提高园艺植物观赏价值的手段之一。目前,我国大花惠兰生产上应用的种苗大多是从国外引进的二代以上的商品苗,利用少量观赏价值高的大花惠兰健壮植株幼芽作外植体,进行组织培养快速繁殖种苗,在大量生产种苗的同时,可利用营养成分和激素调配等措施进行试管苗的提纯复壮,对保持和提高大花惠兰原有品种特性具有积极意义。在快速繁殖过程中,应随时淘汰变异株、弱株,并合理控制激素浓度和配比以提高种苗质量。

参考文献:

[1] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1991.237-278.
[2] 吴应祥.中国兰花[M].北京:中国林业出版社,2001.8-10.
[3] 谷祝平,颜廷进.大花惠兰茎尖组织培养及其形态建成研究[J].实验生物学报,1989,22(20):149-155.
[4] Zhuping Gu, Arditti J. The effects of BA, 2,4-D and IAA on shout-tip cultures of *Cymbidium* [J]. Lindleyana, 1987, 2(2):88-89.
[5] 王维华,毕英娜,吴威娜,等.大花惠兰蜂茎培养及高频率幼苗繁育[J].莱阳农学院学报,2003,20(1):46-47.
[6] 李树和,张　磊,王震星,等.大花蕙兰组织培养和试管苗移栽技术的研究[J].天津农学院学报,2003, 20(1):32-35.
[7] 朱　艳,胡　军,秦民坚,等.大花蕙兰的快速繁殖技术研究[J].中国野生植物资源,2000(6):57-59.
[8] 曾小龙.不同配方的培养基对洋兰原球茎生长和增殖的影响[J].广东教育学院学报,1996(3):110-112.
[9] 徐宏英,王　芳.大花蕙兰组培快繁影响因素分析[J].园艺学报,2002,29(2):183-185.
[10] 熊　英,黄寿先,黄广业,等.虎头兰组培快速繁殖技术的研究[J].广西农业生物科学,2003,22(3):186-190.
[11] 谷祝平,高金城,李柏年,等.大花惠兰茎尖培养的扫描电镜观察研究[J].西北植物学报,1990,10(2):128-131.
[12] 刘丽锋,张　健.丛生芽——大花蕙兰快速繁殖的新途径[J].四川农业大学学报,2004,22(2):150-152.

(上接第 361 页)

参考文献:

[1] 于永福.中国野生植物保护工作的里程碑——国家重点保护野生植物名录(第一批) 出台[J].植物杂志,1995(5):3-11.
[2]傅立国.中国植物红皮书[M].北京:科学出版社,1992.
[3]叶其刚,李建强.浙江省中华水韭分布现状与濒危原因[J].武汉植物学研究,2003,21(3):216-220.
[4] 郝日明,徐惠强,黄致远,等.中国珍稀濒危保护植物在江苏省的自然分布及其特点[J].生物多样性,2000,8(2):153-162.
[5] 陈家宽,王海洋,何国庆.江西境内珍稀濒危植物普通野生稻和中华水韭产地的考察[J].生物多样性,1998,6(4):260-266.
[6] 刘　星,庞新安,王青锋,等.中国3种水韭属植物自然居群水体化学性质特征及差异性研究[J].植物生态学报,2003,27(4):510-515.
[7] 庞新安,刘　星,刘　虹.中国三种水韭属植物的地理分布与生境特征[J].生物多样性,2003,11(4):288-294.
[8] 何子灿,蔡　清,刘宏涛,等.珍稀濒危蕨类植物中华水韭染色体数目的研究[J].武汉植物学研究,2002,20(3):241-242.
[9] 刘　星,王　勇,王青锋,等.中国水韭属植物的染色体数目及其分类学意义[J].植物分类学报,2002,40(4):351-356.
[10] 陈媛媛,叶其刚,黄宏文.中华水韭(*Isoetes sinensis*) 等位酶分析的初步研究[J].武汉植物学研究,2003,21(1):91-94.
[11] 陈媛媛,叶其刚,李作洲,等.极濒危植物中华水韭休宁居群的遗传结构[J].生物多样性,2004,12(6):564-571.
[12] 陈进明,王晶苑,刘　星.等.中华水韭遗传多样性的 RAPD 分析[J].生物多样性,2004,12(3):348-353.
[13] 鲁如坤.土壤-植物营养学[M].北京:化学工业出版社,1998.