

文章编号:1004-1729(2008)02-0166-05

观果凤梨的组织培养研究

王小精,潘学峰,梁启明

(海南大学 农学院, 海南海口 570228)

摘要:以光滑凤梨腋芽为外植体,研究观果凤梨组培快繁的适宜条件。结果表明:培养基 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+ρ(蔗糖)30 g·L⁻¹有利于诱导出芽,可用于初代培养;MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+φ(CW)10%+ρ(蔗糖)40 g·L⁻¹有利于形成丛生芽,可用于增殖培养,月增殖系数可达5.3倍;1/2 MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+ρ(蔗糖)40 g·L⁻¹适宜诱导生根,生根率达96.7%;试管苗经炼苗4 d后,移栽在椰糠与表土(V:V=1:1)的混合基质中,成活率高达95.0%。

关键词:观果凤梨;丛生芽;组织培养

中图分类号:S 668.3

文献标识码:A

观果凤梨是一类以观果为主的观赏凤梨,隶属凤梨科(Bromeliaceae),为多年生草本常绿植物,原产于美洲的热带和亚热带地区^[1],喜温暖湿润且通风的环境,其叶形优雅,果实形美色艳,植株生命力强,观赏期可长达数月,而且植株耐阴性、耐寒性强,可久置室内,具有极高的观赏价值。近年来,观果凤梨倍受人们的青睐,已成为风靡我国的盆栽花卉^[2]。其中,光滑凤梨(*A. comosus* 'smooth gayenne')叶色美丽,当聚合果成熟时,果皮呈橙红色或黄色,并从叶丛中央抽出,亭亭玉立,极具观赏价值,可盆栽观果。目前,观赏凤梨在生产上的繁殖方法多采用分株繁殖和播种繁殖法^[3-4],不仅占地多,生产成本高,而且繁殖速度慢,繁殖系数低,远不能满足市场需求。应用组培快繁技术进行观赏植物繁殖,具有繁殖速度快、不受季节影响等特点,对优良品种的引进和推广均有重大意义。目前,国内已对多种观叶或观花凤梨的组织培养进行了研究,例如,大莺歌凤梨、康泰凤梨、彩叶凤梨、百剑凤梨等^[5-10]。但有关观果凤梨的离体培养研究还甚少,尚未建立起有效的快繁体系,种苗供应能力不足。因此,采用组培快繁技术已成为解决观果凤梨种苗市场需求的当务之急,笔者就观果凤梨的组织培养进行了研究,旨在为组培快繁技术提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 以栽培种光滑凤梨(*A. comosus* 'smooth gayenne')的腋芽为外植体。

1.2 方法

1.2.1 无菌外植体的制备 选取健壮无病虫害植株的腋芽,放在1 000 mL烧杯中,经洗衣粉溶液浸洗2次后,用自来水反复冲洗6~8次,除去泡沫和污物,然后置于超净工作台上,于无菌条件下对外植体进行表面消毒。先用φ=75%的酒精浸泡30 s,再用ρ=1 g·L⁻¹的升汞溶液浸泡9 min,无菌水漂洗4~5次,然后用解剖刀切取芽尖,接种到初始培养基中进行培养。

1.2.2 培养条件 培养室温度为(25±3)℃,光照强度1 500~2 000 lx,光照时间12 h·d⁻¹。

1.2.3 培养基制备方法 按组织培养的常规方法进行配制^[11],所有培养基均含有ρ=7 g·L⁻¹的卡拉胶,除对蔗糖的质量浓度试验外,培养基中的蔗糖质量浓度均为30 g·L⁻¹,pH调至5.8。培养基分装后,经高温高压(121℃,0.14 MPa)灭菌20 min,冷却备用。

1.2.4 培养基配方

1.2.4.1 初始培养基 本实验所采用的初始培养基为MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹。

收稿日期:2007-12-26

作者简介:王小精(1982-),男,海南临高人,海南大学农学院2005级作物遗传育种专业硕士研究生。

1.2.4.2 不同激素对比对从芽增殖的影响 以 MS 为基本培养基,6-BA 设置 3 个质量浓度梯度:1.0, 2.0,3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;NAA 设置 4 个质量浓度梯度:0,0.1,0.2,0.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,共 12 个处理组合. 外植体以单芽接入,每个处理接种 5 瓶,每瓶 3 个芽,30 d 后观察芽的增殖情况,并统计芽的增殖系数.

1.2.4.3 不同质量浓度的蔗糖对芽继代增殖的影响 在选出最适的激素配比的基础上,以 MS 为基本培养基,分别附加不同质量浓度的蔗糖(分别为:0,20,30,40,50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). 每处理接 5 瓶,每瓶均接 3 个芽. 30 d 后观察试管苗的长势,并统计增殖系数.

1.2.4.4 不同体积分数的椰子水对芽增殖的影响 以 MS+6-BA 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + ρ (蔗糖) 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为基本培养基,添加 $\varphi=5\%$ 和 $\varphi=10\%$ 的椰子水与不加椰子水的处理进行比较试验. 共 3 个处理,每处理接 5 瓶,每瓶均接 3 个芽,30 d 后观察芽的生长情况,并统计增殖系数.

1.2.4.5 生根培养基 以 1/2 MS 为基本培养基,设置 3 种激素配比:IBA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,NAA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,IBA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每个处理接种 5 瓶,每瓶 5~8 株芽苗(选健壮无根苗接种),40 d 后观察根的生长情况,并统计生根率与发根数.

1.2.5 试管苗的移栽 移栽前,先将培养瓶转移出培养室,打开瓶盖,在自然散射光下炼苗 2~3 d,然后从瓶中取出试管苗,用清水洗净粘附在根系上的培养基,置于通风阴凉处进行晾苗,晾苗时间分别为:0,1,2,3,4 d,最后将其分别移栽到不同的基质中. 试管苗移栽前用 600~800 倍的多菌灵浸泡 3~5 min,能有效地避免茎腐病的发生,然后移栽到椰糠、椰糠+表土($V_{\text{椰糠}}:V_{\text{表土}}=1:1$)、河沙 3 种移栽基质中. 每个处理移栽 20 株,30 d 后观察试管苗的成活情况,统计移栽成活率.

2 结果与讨论

2.1 初始无菌材料的获得 将灭菌过的外植体接种到 MS+6-BA 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的初始培养基上培养,10 d 后腋芽基部开始膨大,20 d 左右,腋芽基部膨大的部位产生浅绿色突起,侧芽也萌动生长(图版 1),再经过 15 d 培养,开始形成丛生芽. 待芽长到 0.5 cm 左右时,即可将其切成单芽接种于增殖培养基.

2.2 芽的增殖培养

2.2.1 不同激素对比对芽增殖的影响 在相同的培养条件下,采用不同激素组合的 MS 培养基,观察激素对芽增殖的影响,结果见表 1 和图 1. 从表图中可以看出,单独使用 6-BA 的增殖效果并不是很理想,其中 A_1 和 A_3 处理的增殖系数都很低, A_2 处理的增殖系数虽高,但芽的长势不是很好,芽体较细,不利于后期的生根培养. 6-BA 与 NAA 搭配使用的增殖效果普遍比单独使用 6-BA 的处理好,其中以处理 A_8 对芽的增殖效果最好,增殖倍数可达 3.13,芽色浓绿,芽体粗壮. 随着 6-BA 质量浓度的增大(如处理 A_{10}),芽的增殖系数有所降低,可能是过高质量浓度的 6-BA 抑制了芽的发生. 因此,合适的激素配比才能对芽的继代增殖有好的促进作用. 本试验表明:较适宜观果凤梨芽增殖的培养基是 MS+6-BA 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

表 1 不同激素对比对芽增殖的影响

处理编号	生长调节剂 配比/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种芽数/个	增殖芽数/个	增殖系数/倍	芽苗长势
A_1	6-BA1.0	15	26	1.73	芽色淡绿,芽体较细
A_2	6-BA2.0	15	40	2.67	芽色浓绿,芽体纤细
A_3	6-BA3.0	15	31	2.07	芽色淡绿,芽体纤细
A_4	6-BA1.0+NAA0.1	15	29	1.93	芽色淡绿,芽体纤细
A_5	6-BA1.0+NAA0.2	15	38	2.53	芽色浓绿,芽体健壮
A_6	6-BA1.0+NAA0.3	15	35	2.33	芽色浓绿,芽体健壮
A_7	6-BA2.0+NAA0.1	15	32	2.13	芽色浓绿,芽体健壮
A_8	6-BA2.0+NAA0.2	15	47	3.13	芽色浓绿,芽体粗壮
A_9	6-BA2.0+NAA0.3	15	43	2.87	芽色浓绿,芽体粗壮
A_{10}	6-BA3.0+NAA0.1	15	28	1.87	芽色浓绿,芽体短壮
A_{11}	6-BA3.0+NAA0.2	15	34	2.27	芽色浓绿,芽体短壮
A_{12}	6-BA3.0+NAA0.3	15	39	2.60	芽色浓绿,芽体短壮

注:以 MS 为基本培养基,每个处理均添加 $\rho=30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖.

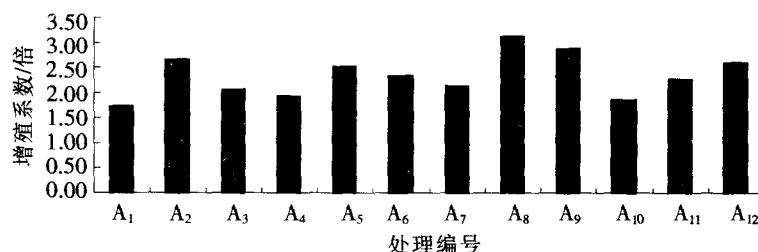


图1 不同激素对比对芽增殖的影响

2.2.2 不同质量浓度的蔗糖对丛生芽继代培养的影响 实验结果见表2和图2. 培养基中不含蔗糖时,不能产生丛生芽,且苗枯黄至死. 蔗糖质量浓度在 $20 \sim 40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,增殖系数随着蔗糖质量浓度的增加而增加;蔗糖质量浓度为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,增殖系数达最高,为4.0倍,芽体粗壮;随着蔗糖质量浓度进一步提高,增殖系数逐渐下降,且抑制芽的生长,显失水状态. 因此,蔗糖质量浓度并非越高越好,只有合适的质量浓度才能有利于增殖. 本试验表明:蔗糖质量浓度为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时较有利于观果凤梨丛生芽的继代增殖.

表2 不同蔗糖质量浓度对丛生芽继代培养的影响

ρ (蔗糖)/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	重复			平均增殖 系数/倍	差异显著性		生长状况
	I	II	III		0.05	0.01	
0	0	0	0	0	a	A	苗全部枯死
20	2.0	2.2	3.1	2.43	b	B	芽纤细
30	3.1	3.2	3.5	3.27	c	CE	芽健壮,但不高
40	3.8	4.0	4.2	4.00	d	DE	芽粗壮,正常
50	3.5	3.7	3.9	3.70	d	E	芽显失水状态

注:基本增殖培养基为 $\text{MS} + 6 - \text{BA} 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 处理间 $F = 48.1 > F_{0.01}$, 相同小写字母为差异不显著,不同小写字母为差异显著;相同大写字母为差异不显著,不同大写字母为差异极显著.

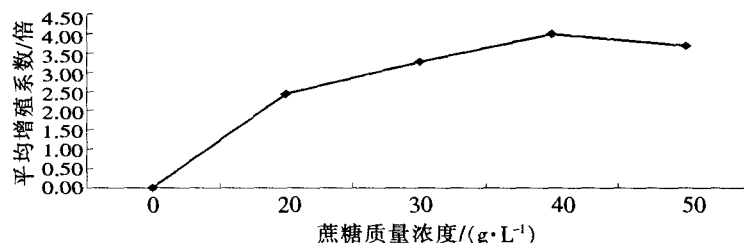


图2 不同蔗糖质量浓度对丛生芽继代培养的影响

2.2.3 添加椰子水(CW)对芽增殖的影响 以 $\text{MS} + 6 - \text{BA} 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \rho$ (蔗糖) $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为基本培养基,添加 $\varphi = 5\%$ 和 $\varphi = 10\%$ 的椰子水与不加椰子水进行比较,接种30 d后调查. 结果表明,添加椰子水的培养基更有利于芽的增殖,其中 $\varphi = 10\%$ 椰子水的处理,丛生芽生长旺盛,芽粗壮,且增殖系数都高于 $\varphi = 5\%$ 的椰子水和对照组. 所以添加 $\varphi = 10\%$ 椰子水,对观果凤梨继代繁殖、壮苗都有较好的效果.

表3 添加不同体积分数的CW对芽增殖的影响

φ (椰子水)/%	接种芽数/个	增殖芽数/个	增殖系数/倍	生长状况
0	15	69	4.6	芽生长正常
5	15	75	5	芽壮,正常
10	15	79	5.3	芽壮,生长旺盛

注:基本培养基 $\text{MS} + 6 - \text{BA} 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \rho$ (蔗糖) $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2.4 不同激素对比对试管苗生根的影响 当继代的芽大部分长至2 cm左右时,将其切成单芽,转接到3种不同激素配比的生根培养基上,40 d后调查长根数与植株的生长情况(见表4). 结果表明,3种生根培养基诱导生根的效果都很好,试管苗均能生根(图版3),生根率分别为80.0%、86.7%、96.7%. 其中IBA与NAA配合比单独使用的效果好,生根率为96.7%,平均生根条数为7.1条,平均株高为3.9 cm,根

粗壮,有利于移栽成活.

表 4 不同激素对比对试管苗生根的影响

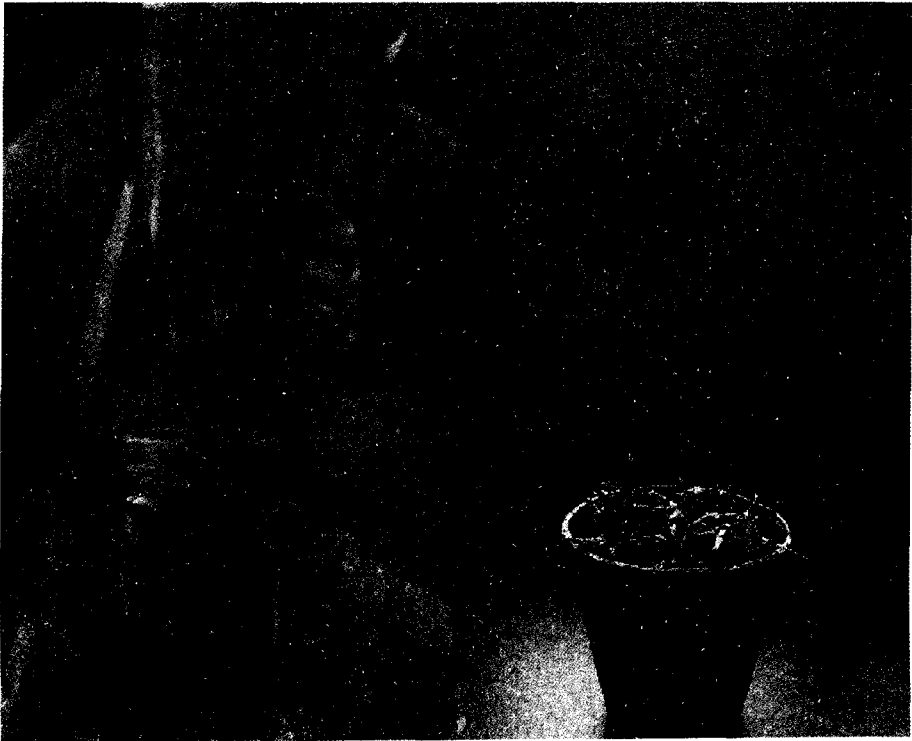
激素配比/(mg · L ⁻¹)	生根率/%	平均生根数/条	平均株高/cm	根的形态
IBA0. 5	80. 0	4. 1	3. 1	根细长
NAA0. 5	86. 7	5. 9	3. 6	根细长
IBA0. 5 + NAA0. 5	96. 7	7. 1	3. 9	根粗壮

注:基本培养基:1/2 MS + 活性炭 1 g · L⁻¹ + ρ(蔗糖)40 g · L⁻¹

2.2.5 试管苗的移栽 在组织培养中,试管苗的移栽是一个重要的环节,而成活率的高低则决定其能否用于生产,所以炼苗时间的长短、炼苗方式、移栽基质的选择至关重要. 当试管苗高 4 cm 左右,有 4~6 片叶,6~7 条根时,即可移栽. 从表 5 可看出,移栽成活率随晾苗天数的增多而升高. 不晾苗时,3 种基质移栽成活率都较低,分别为 35%,50%,45%;晾苗 2 d 以上,成活率明显升高;晾苗 4 d 的移栽成活率最高,其中椰糠 + 表土($V_{\text{椰糠}}:V_{\text{表土}}=1:1$)的基质成活率达到 95%,且试管苗长得健壮,叶片浓绿(图版 4),以河沙与椰糠为基质的成活率分别为 80%和 85%,试管苗长势弱,叶片有些黄绿. 所以,在炼苗过程中再进行晾苗处理,可提高观果凤梨试管苗移栽成活率. 晾苗较合适的天数为 4 d,移栽基质以椰糠 + 表土($V_{\text{椰糠}}:V_{\text{表土}}=1:1$)为最好.

表 5 试管苗的移栽情况

晾苗天数/d	河沙			椰糠 + 表土 ($V_{\text{椰糠}}:V_{\text{表土}}=1:1$)			椰糠		
	移栽株数/株	成活株数/株	成活率/%	移栽株数/株	成活株数/株	成活率/%	移栽株数/株	成活株数/株	成活率/%
0	20	7	35	20	10	50	20	9	45
1	20	9	45	20	11	55	20	9	45
2	20	11	55	20	14	70	20	12	60
3	20	15	75	20	17	85	20	16	80
4	20	16	80	20	19	95	20	17	85



图版说明

1. 外植体上的腋芽萌发; 2. 丛生芽; 3. 生根的试管苗; 4. 移栽成活的试管苗

3 结 论

- 3.1 在继代培养中选用 $6-BA\ 2.0\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1}$ 的激素配比,可提高观果凤梨丛生芽的增殖倍数,并能使芽生长健壮,但要注意 $6-BA$ 的浓度不能过高,否则可能会抑制芽的发生。
- 3.2 糖类是培养基中提供碳源的惟一来源。蔗糖的加入起着提供碳源和调节渗透压的双重作用,但蔗糖质量浓度过高或过低都会抑制试管苗的生长,质量浓度过低会造成碳源供应不足,而质量浓度过高又会导致植物细胞内渗透压降低^[11]。试验表明,蔗糖质量浓度为 $40\ g \cdot L^{-1}$ 时有利于观果凤梨的离体培养。
- 3.3 椰子水(CW)是一种天然复合有机物,含有丰富的氨基酸、矿物质、维生素和碳水化合物等,这些物质具有促进培养物的生长等作用^[11]。在增殖培养基中添加 $\varphi = 10\%$ 椰子水更有利于芽的增殖。
- 3.4 在生根培养阶段,以 $IBA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$ 的配比诱导生根效果较好,生根率达 96.7%,根多且粗壮,植株长势好,有利于后期的炼苗移栽。
- 3.5 观果凤梨原产于热带亚热带地区,喜好温暖湿润的气候,因此试管苗的移栽基质应以疏松透气、水分保持和养分供应良好的材料为好。本实验采用椰糠 + 表土 ($V_{椰糠} : V_{表土} = 1 : 1$) 作为移栽基质,成活率高达 95%。此外,在炼苗过程中进行适当的晾苗处理,也可以提高试管苗的移栽成活率。

参考文献:

- [1] 张应麟,凤梨科花卉[J]. 广东园林,1999(2):1 - 15.
- [2] 林兵,黄敏玲. 观赏凤梨生产现状及商品性栽培技术[J]. 福建农业科技,2003(1):37.
- [3] 赵贵林,何德华,郑平,等. 观赏凤梨种子繁殖技术初探[J]. 广东农业科学,2003(3):32 - 34.
- [4] 顾韵莉,杜文尉,严志衡,等. 观赏凤梨的组织培养快速繁殖技术研究[J]. 上海农业科技,2005(1):99 - 100.
- [5] 林思诚,任慧. 大莺歌凤梨离体培养快速繁殖试验[J]. 广东林业科技,2005(1):15 - 18.
- [6] 远凌威,张苏锋,袁正仿,等. 康泰凤梨组织培养与快速繁殖研究[J]. 信阳师范学院学报:自然科学版,2003,16(3):320 - 321.
- [7] 徐立,李志英,赖齐贤,等. 彩叶凤梨的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2003,39(4):344.
- [8] 董川宏. 常见观赏凤梨及其繁殖栽培[J]. 广东园林,1997(2):34.
- [9] 毕可鹏,赵秋,徐立. 百剑凤梨的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2004,40(4):469.
- [10] 钟红梅,曹明华. 八宝剑凤梨的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2004,40(4):202.
- [11] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 甘肃:甘肃科学技术出版社,2002.

A Study on Tissue Culture of Bromelia(*A. comosus*)

WANG Xiao-jing, PAN Xue-feng, LIANG Qi-ming
(College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The tissue culture and rapid proliferation of *Ananas comosus* 'smooth gayenne' were studied by using fascicular bud as explants. The results showed that the medium of $MS + 6-BA\ 1.0\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1} +$ sucrose $30\ g \cdot L^{-1}$ was effective to induce shooting and it is suitable for the first generation cultivation; $MS + 6-BA\ 2.0\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.2\ mg \cdot L^{-1} + CW(\varphi = 10\%) +$ sucrose $40\ g \cdot L^{-1}$ could effectively induce fasciculate buds and it is suitable for subculture and proliferation. The propagation coefficient was 5.3 every 30 days. The most optimum rooting medium was $MS + IBA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1} +$ sucrose $40\ g \cdot L^{-1}$, and the rooting rate was 96.7%. The plantlets were transplanted in substrate mixed surface soil and coconut coir after getting stocky shoots. Hardening off for four days; The survival rate of tube plant reached 95.0%.

Key words: bromelia; fascicular bud; tissue culture