

文章编号: 1001-1498(2003)04-0434-05

墨兰离体快繁研究

项艳¹, 於凤安¹, 彭镇华²

(1. 安徽农业大学森林利用学院, 安徽 合肥 230036;

2. 中国林业科学研究院, 北京 100091)

摘要: 采用墨兰的茎尖和芽为外植体, 研究墨兰的组织培养要点。通过对墨兰组织培养中外植体的选择、芽的诱导、继代增殖、壮苗培养、生根诱导和移植进行研究, 运用正交试验筛选出芽快速生芽的最佳培养基为: MS + 6-BA 4.0 mg L⁻¹ + NAA 1.0 mg L⁻¹ + 琼脂 8 g L⁻¹ + 蔗糖 30 g L⁻¹, 生根的最佳培养基为: 1/2MS + NAA 3.0 mg L⁻¹。分析比较出芽长为 1.0 cm, 叶长为 1.5 cm, 叶数为 2~3 条的兰花苗有利于生根。

关键词: 墨兰; 芽的诱导; 继代增殖; 生根诱导; 移植

中国分类号: S722.3⁺7 **文献标识码:** A

中国兰花, 通常是指兰属 (*Cymbidium*) 植物中一部分地生种。中国兰以香气馥郁, 色彩淡雅, 花姿优美, 叶态飘逸见长, 是庞大兰科家族中独特且稀少的种属。中国兰沿用传统的分株繁殖法, 繁殖系数极低, 常规情况下种子不完全, 极难萌发, 因此世界上多采用组织培养来繁殖种苗^[1]。我国台湾省和东南亚一些国家利用组织培养对蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* spp.) 进行了工厂化生产, 获得了较大的经济效益^[2]。近年来笔者从国内引进墨兰 (*Cymbidium sinense* (Andr.) Willd.) 优良品种, 利用茎尖和腋芽为外植体开展墨兰组织培养^[3], 较系统地研究了墨兰的组织培养和试管苗生产技术, 为墨兰遗传资源的保存和开发利用及其工厂化生产提供参考。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

以墨兰的茎尖和腋芽为外植体^[4]。

1.2 方法

1.2.1 材料的表面灭菌 取 6~13 cm 的新芽, 从植株茎部切离, 用利刀除去根、脏物和外包叶 2~3 片, 充分洗净后将材料再切取 2~3 cm, 在 10% 次氯酸钠药液中消毒 10 min, 灭菌后用无菌水冲洗数次, 再放到灭菌滤纸上吸干水份, 然后在解剖镜下无菌操作剥取茎尖和腋芽, 一般茎尖大于 2 mm, 带 2 个原叶基, 接种到培养基中。

1.2.2 类原球茎的诱导与增殖 外植体接种后放置在 23~25℃ 的黑暗条件下, 培养 1~2 个月后可分化出 1 至数个乳白色的类原球茎, 类原球茎的增殖应在转绿前, 将其切割成小块,

收稿日期: 2002-10-12

基金项目: 中国森林生态网络体系“线”的研究与示范(2002BA516A15)

作者简介: 项艳(1965—), 女, 安徽桐城人, 副教授, 在读博士。

或给予针刺等损伤,转入类原球茎增殖培养基上以繁殖更多的类原球茎;或放在液体培养基中,在旋转培养床上进行旋转培养,在其小块组织稍为长大后,转接到分化培养基上,分化芽和根。

1.2.3 芽的诱导与增殖 将开始萌发的类原球茎置于 $MS + 6-BA 3 \text{ mg L}^{-1} + NAA 1 \text{ mg L}^{-1}$ 培养基中,诱导芽的发生,将诱导出的芽接种在附加生长素和分裂素的不同浓度配比的培养基上,6-BA 的浓度分别为 2.0、3.0、4.0 mg L^{-1} ,NAA 浓度分别为 0.1、0.5、1.0 mg L^{-1} ,进行双因素正交试验,观察芽的分化状况,筛选最佳培养基。

1.2.4 根的诱导 采用 4 种不同的生根培养基,分别是:(1) $1/2MS + NAA 3.0 \text{ mg L}^{-1} + KT 0.5 \text{ mg L}^{-1}$; (2) $1/2MS + NAA 3.0 \text{ mg L}^{-1}$; (3) $1/2MS + IBA 2.0 \text{ mg L}^{-1}$; (4) $1/2MS + IBA 4.0 \text{ mg L}^{-1}$ 。从中筛选诱发根生长的最佳培养基配方,同时观察多大的芽适宜诱导根的生长。

1.2.5 移植 炼苗 3~4 d,取出苗后洗净粘在根上的培养基,晾干后,栽植在通气、透水、保湿的介质中。先在高湿、弱光条件下缓苗 6~10 d,以后放在 15~25 ℃、空气相对湿度 80% 左右的条件下养护,定期补施营养液。

2 结果与分析

2.1 类原球茎的诱导与增殖

将外植体培养在 MS 培养基上,经 2 个月后外植体发生了类原球茎,呈丛生状,在 NAA 作用下,脱分化为愈伤组织,有黄色也有绿色。从生长状况来看,通常是绿色转为黄色,也有少数由黄色转为绿色,在转移中发现绿色的类原球茎组织较松脆、密集,能分化不定芽,而呈黄色的愈伤组织则松软,含水量丰富,潮湿。将诱导形成的类原球茎切下,移入新配制的成份相同的培养基,这种培养基配方中,生长素比例较大,激动素比例较小,易于类原球茎增殖,但不易分化。在显微镜下,可见类原球茎顶端呈卵状突起,或尖端锐利,深绿色,幼嫩,含水丰富,外表光滑,有颜色稍浅的,表面有不规则凸凹,生长旺盛。

2.2 芽的诱导与增殖

待类原球茎增殖到一定数量,将一部分类原球茎培养在分化培养基上,适当增加激动素的比例,减少生长素的比例,配方为 $MS + 6-BA 3 \text{ mg L}^{-1} + NAA 1 \text{ mg L}^{-1}$,约经 30 d,即可看见丛生状的绿色类原球茎顶端冒出一个个尖细的小芽,在培养基中的类原球茎,存在着不同的发育状态:有的已分化为细细的小芽;有的才开始形成芽的雏形,即绿色类原球茎上才出现凸出的小芽点;有的则仍呈绿色类原球茎状;而有的已转为黄色、褐色,并发现玻璃化芽,多呈丛生状。当类原球茎发育成丛生状不定芽时,大多不能正常发育成茎,由类原球茎萌发的独立的芽能继续发育,最终成为带叶的茎。

为提高芽的增殖系数,采用双因素正交试验,配制 9 种不同浓度比例的培养基,接种后的材料置于温室中培养,培养温度为 25 ± 1 ℃,连续光照 8~10 h。18 d 后统计结果并进行直观分析(表 1)。

从表 1 可见:组合 6 号最优,即 6-BA 为 4.0 mg L^{-1} ,NAA 为 0.5 mg L^{-1} ,但从实际结果来看,组合 9 号最好,即 6-BA 为 4.0 mg L^{-1} ,NAA 为 1.0 mg L^{-1} 。从极差看,其值越大,表示该因素越重要。因此,从本次试验结果表明,在这两种激素中重要的因素是 6-BA。通过观察,配方 2 中诱导产生的芽数最少,长势也最弱,新芽发黄,基部很少有新球茎形成;配方 9 中,新增芽

长势强劲,基部有相当数量的新球茎形成,配方9中的NAA浓度较高,高浓度NAA对墨兰芽的增殖和生长有一定的抑制作用,但是只要6-BA和NAA浓度配比恰当,则会更好地诱导墨兰的增殖;配方5中芽的诱导情况较为特别,在长芽的同时,也有根发生的情况,但芽长势一般。因此芽增殖的最佳培养基组合是配方9,即6-BA为 4.0 mg L^{-1} ,NAA为 1.0 mg L^{-1} 。

2.3 生根的诱导

2.3.1 4种培养基对兰花组培苗生根的影响

采用的兰花组培苗的规格为:平均有叶3片,芽长2 cm,叶长1.6 cm,叶宽5 mm,每种培养基接种20个芽。

从表2可以看出,第1种培养基的诱生根的生长效果比较差,第2种培养基的生根效果最好,因为在这种培养基上生长的兰花芽的根数最多,有根芽所占的比例也最大,6月4日观察根条数为18条,有根芽所占的比例达

60%,到6月11日,根条数就增加到25条,有根芽所占的比例已达到80%。从第3和第4种培养基中,可以看出高浓度的IBA刺激根生长的效果比较明显。不同成分的培养基诱发兰花组培苗根的发生效果不同,寻找一种最适宜的生根培养基,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。

2.3.2 不同规格兰花组培苗的生根状况比较 从表3可以看出:芽越长,根条数越多;芽越小,芽的生长越明显,而根的生长情况就越差。例如, 种规格兰花,两个星期只长出5条根,有根的兰花芽仅占20%,芽的长度超过1倍,其它方面也有较大的增长。 、两种规格的兰花,芽的生长情况相差不大,长根的情况也很相近, 规格兰花,两周后长根13条,有根芽比例为45%; 规格兰花,长根16条,有根芽比例为55%。从经济角度来考虑,应该选用 规格的兰花芽生根,缩短出苗所需的时间,提高经济效益。

表1 正交设计试验安排与结果

组合号	6-BA/ (mg L^{-1})	NAA/ (mg L^{-1})	平均 增殖倍数	平均芽 长/cm
1	2.0	0.1	2.0	3.6
2	3.0	0.1	0.8	1.0
3	4.0	0.1	1.6	3.7
4	2.0	0.5	1.5	3.4
5	3.0	0.5	2.1	3.9
6	4.0	0.5	2.0	4.5
7	2.0	1.0	1.6	3.2
8	3.0	1.0	0.9	3.3
9	4.0	1.0	2.9	12.2
K ₁	5.1	4.4		
K ₂	3.8	5.6		
K ₃	6.5	5.4		
极差	2.7	1.2		

*基本培养基为MS+30 g L⁻¹蔗糖+8 g L⁻¹琼脂

表2 不同培养基对兰花组培苗生根的影响

观测日期(月-日)	06-04				06-11			
培养基种类	1	2	3	4	1	2	3	4
根数	3	18	8	13	8	25	13	16
有根芽比例/ %	10	60	25	45	25	80	40	55

表3 不同规格兰花组培苗的根发生状况

观测日期(月-日)	05-29			06-04			06-11		
兰花规格									
平均芽长/cm	0.6	1.6	2.8	1.0	1.8	2.9	1.5	2.1	3.2
平均叶长/cm	0.5	1.4	2.0	0.6	1.5	2.2	1.3	1.8	2.1
平均叶宽/mm	2.4	3.1	5.2	2.7	3.7	5.5	3.1	4.8	5.9
叶片数	1~2	2~3	3~4	2	2~3	4	2~3	3	4~5
根数	0	0	0	3	7	9	5	13	16
有根芽比例/ %	0	0	0	10	28	33	20	45	55

2.4 移植

兰花试管苗“自立”能力较差,移栽养护难度较大,如果不能克服这些问题,移栽中将会使组培苗损失严重,成苗率较低。因此,应尽量协调移栽过程中温度、光照、湿度、营养、移栽介质等因素与组培苗的关系,使兰花苗逐渐从异养向自养过渡。具体做法是:待组培苗长到10~12 cm高时,打开培养瓶盖,炼苗3~4 d,然后将苗从瓶中取出,洗净粘在根上的培养基(注意尽量不要伤根),晾干后栽植在通气、透水、保湿的栽培介质中,先在高湿弱光条件下缓苗6~10 d,以后放在15~25 ℃、空气相对湿度为80%左右的条件下养护,定期补施营养液并喷多菌灵防止杂菌感染。

3 结论与讨论

(1) 类原球茎诱导与增殖试验表明:组织松脆、密集的绿色类原球茎能分化为不定芽,而组织松软、含水丰富、潮湿的黄色类原球茎则不能^[5]。同时,墨兰在生长素比例较大、激动素比例较小的培养基中,易于增殖类原球茎,而不易于分化。实际上,在组织培养中,分化培养基的生长激素和剂量,能否分化根和芽,完全取决于激素种类和剂量^[6]。每种兰花都不完全一样,要经过试验摸索才能掌握,可以设计几种配方,进行对比实验来确定。

(2) 正交试验筛选的芽增殖最佳培养基为:MS+6-BA 4.0 mg L⁻¹+NAA 1.0 mg L⁻¹+琼脂 8 g L⁻¹+蔗糖 30 g L⁻¹。筛选出的最佳生根培养基为:1/2MS+NAA 3.0 mg L⁻¹。但从多年对中国兰的组织培养研究中发现,兰属不同种的最佳培养基各不相同,但也有共同点,具体表现为:继代增殖和壮苗生根所用的激素浓度和组合大致相同,都可持续使用同一种培养基完成继代增殖和壮苗生根(这也可以作为衡量培养基是否理想的重要标准)^[7]。作者认为可以在接入类原球茎后,在相同培养时间内,以芽/类原球茎(体积比)的比值作为调配培养基的指标。增殖初期为了快速增殖,可调大比值(6~8),增殖基数满足后,比值一般维持在1~1/3,应将类原球茎的增殖量控制为零或低水平作为生根培养基的标准。另外,继代增殖转接时只接芽,不接类原球茎也可避免其累积。培养基的调配可通过改变激素和无机盐的浓度实现。本试验采用固态培养基,尽管所需的时间较长,分化的整齐度也不一致,但在大规模生产时是一种切实可行的办法。首先,采用固态培养可一次向瓶内注入较多的培养基,足以维持根状茎分化过程中一个半月的营养需求,从根状茎诱导出完整植株的全过程中间只须转接1次,而液态培养15 d就要转接1次,完成这一过程需要转接3次。其次,固态培养不需要摇床等特殊设备,投资较少,占用实验室的空间也较少,所以固态培养诱导分化是一种节省劳力和设备投资的方法。

(3) 中国兰要想走向世界,走向普及,特别是占领城市阳台,必须立足育种。中国兰多为二倍体,多倍体的潜力尚待发掘利用,因此,以组培为主要手段,开展中国兰的多途径综合育种,尤其是开展种属间杂交,结合染色体加倍而形成的异源四倍体,应用前景广阔。

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,1999. 268~278
- [2] 卢思聪. 中国兰与洋兰[M]. 北京:金盾出版社,1994. 96~104
- [3] 於凤安,彭镇华. 用不定芽和芽生芽途径离体繁殖中国兰[J]. 安徽农业大学学报,1993,20(增刊):37~39

- [4] 吴应祥. 中国兰花[M]. 北京:中国林业出版社, 1993. 70~71
- [5] 王熊, 吴敦肃. 建立类原球茎生长、发育过程中扫描电镜观察[J]. 植物生理学报, 1994, 17(2): 192~196
- [6] 王熊. 兰花快速无性繁殖系的研究及花芽分化[J]. 植物生理学报, 1994, 17(4): 391~396
- [7] Simmonds J. Induction, growth and direct rooting of adventitious shoot of *Begonia × hiemalis*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1984, 3(4): 283~289

Tissue Culture of *Cymbidium sinensis*

XIANG Yan¹, YU Feng-an¹, PENG Zhen-hua²

(1. Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China;

(2. Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: The explants of *Cymbidium sinensis* stems and spores were used to study *Cymbidium sinensis* tissue culture essentials. It dealt with the selection of explant, induction of proliferation, subculture, rooting and outplanting of *Cymbidium sinensis*. The results showed that the best medium to induce proliferation was MS + 6-BA 4.0 mg L⁻¹ + NAA 1.0 mg L⁻¹ + agar 8 g L⁻¹ + sugar 30 g L⁻¹, by wielding orthogonal test. While rooting medium was half MS and 3.0 mg L⁻¹ of NAA. At the same time, we obtained by analyzing and contrasting the standard spore to bring about rooting, which offered basis of *Cymbidium sinensis*, such as enlarging produce, increasing living rate and improving economy benefits correspondingly.

Key words: *Cymbidium sinensis*; spore induction; proliferation; rooting; outplanting

本刊加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”的声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《林业科学研究》编辑部

2003年6月