维普资讯 http://www.cqvip.com

大花蕙兰组织培养及快速繁殖研究

韩劲峰[1]， 韩晓华[2]

(1.北海市农业科学研究所， 广西北海 536000； 2.北海市绿丰洋兰研究所， 广西北海 536000)

摘要:以8个大花蕙兰品种茎尖为材料,采用不同培养基对茎尖原球茎进行诱导、增殖和分化培养,探讨不同浓度6-BA和椰乳对原球茎诱导、增殖和分化的影响效果。结果表明,低激素水平培养基1/2MS+0.5mg/L 6-BA+10%椰乳+2%白糖+适量活性炭对诱导产生原球茎的效果很好,大部分品种的原球茎诱导率达80%以上;在增殖培养基中添加0.5~1.0 mg/L6-BA和15%椰乳,可明显提高5个品种的原球茎诱导率和增殖率。将多次增殖的原球茎转入1/2MS+1.0mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+20%椰乳+1%白糖的分化培养基,原球茎可继续增殖并分化形成许多类胚性的单极丛生芽,再经分化培养后可获得大量根苗完整的再生植株。因此,试验结果可为大花蕙兰的高效低成本组培快繁途径提供依据。

关键词:大花蕙兰;原球茎;增殖;分化

中图分类号:S682.310^{+}.353 **文献标识码**:A **文章编号**:1002-8161(2008)03-0284-03

Tissue culture and rapid propagation of *Cymbidiam grandiforium*

HAN Jing-feng[1], HAN Xiao-hua[2]

(1. Agricultural Science Research Institute of Beihai City, Beihai, Guangxi 536000, China; 2. Lufeng Foreign Orchid Research Institute of Beihai City, Beihai, Guangxi 536000, China)

Abstract: The stem apexes of eight *Cymbidiam grandiforium* varieties were used as experiment materials, and the inducement, propagation and differentiation of protocorm of stem apex were carried out in different culture media to study the effects of different concentrations of 6-BA and coconut milk on them. The results showed that low hormone level culture medium with 1/2MS+0.5mg/L 6-BA+10%CM+2% white sugar + right amount activated carbon had better effect on the inducing of protocorm, the inducing rate of protocorm for most varieties were over 80%. Adding 0.5-1.0 mg/L 6-BA and 15% coconut milk in multiplication culture medium could increase the inducing rate and multiplication rate of protocorm for five varieties. The protocorm which multiplied many times was transferred to differentiation culture with 1/2MS+1.0mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+20%CM+1% white sugar, and the protocorm could continue to multiply and differentiate, then form many multiple shoot clumps of embryonic body. After differentiation culturing, a great amount of plant regeneration with root and sprout were obtained. Therefore, the results could provide reference to the tissue culture and rapid propagation method of *Cymbidiam grandiforium* with high efficiency and low cost.

Key words: *Cymbidiam grandiforium*; protocorm; multiplication; differentiation

大花蕙兰(*Cymbidiun grandiflorian*)是兰科蕙兰属的人工杂交新品种,它以优美艳丽的花色和高雅华贵的清香为世人喜爱而盛销国内外。采用传统的方法对大花蕙兰进行繁殖,速度很慢,难以满足市场需求。在Morel、Fomesbeeh等首次应用组织培养技术突破兰花的克隆繁殖之后,国内许多研究机构先后对兰花培养技术不断改进和完善,使该繁殖技术在兰花产业化生产上得到广泛的应用,并形成了“兰花工业”商品化生产[1,2]。

从80年代开始,我国进行兰花组织培养技术研究,虽然起步较晚,但进展很快,特别在高效快繁技术方面获得新的突破,目前全国各地正在加快兰花产业化生产的研究步伐。我们通过探讨培养基中最适合的生长激素浓度与配比,以提高大花蕙兰原球

收稿日期:2008-03-21

作者简介:韩劲峰(1973-),男,广西北海人,助理农艺师,主要从事植物组织培养研究工作

维普资讯 http://www.cqvip.com

茎的诱导、增殖和分化效率,为寻求快速、高效、优质、低成本的工艺技术及获得大量丛生芽的途径提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用大花蕙兰"紫花"等8个新品种的健壮植株的茎尖为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒处理 取无外周老叶的茎段3~5cm,冲洗干净后切取2cm左右茎尖,以75%酒精表面消毒10s后转入0.1%升汞溶液消毒10~15min,取出用无菌水冲洗3~5次并吸干,剥除嫩叶后挑取1mm左右茎尖以备接种。

1.2.2 原球茎诱导培养 将"紫花"等8个品种的茎尖分别接种在1/2MS+0.5mg/L 6-BA+10%椰乳+2%白糖+适量活性炭的培养基上诱导原球茎,暗培养7~10d。

1.2.3 原球茎继代增殖培养 将诱成的每个原球茎切成3~4小块为一聚团(群体效应),分别转入含4种不同浓度(0.5、1.0、1.5、2.0mg/L) 6-BA的1/2MS+15%椰乳+2%蔗糖增殖培养基中,继代培养4~5个周期,加速原球茎增殖,观察不同浓度激素对原球茎增殖的影响。

1.2.4 原球茎的分化培养 把大量增殖的原球茎转入1/2MS+1.0mg/L 6-BA+20%椰乳+0.5mg/L NAA+1%蔗糖分化培养基中进行绿苗的分化培养。

以上试验的培养基分别加入5g/L的琼脂,pH值5.8~6.0,置于26±2℃的恒温温室中进行培养,期间每天补充1500~2000lx光照(利用日光灯补光)12~14h/d,每个培养周期为20~25d。

2 结果与分析

2.1 不同品种原球茎的诱导效果

原球茎诱导培养结果表明,在相同的诱导培养基条件下,大部分品种原球茎的诱导效果很好,诱导率达80%~98%,也有部分品种诱导率仅为20%~40%,个别品种甚至很难诱导(见表1)。由此可见,不同品种间原球茎诱导效果存在的差异与品种的个体发育年龄、取材的生理状态、内源激素含量与分布状态以及细胞分裂的再生能力等都有密切关系[3]。因此,在组织培养繁殖前进行品种诱导试验,选定最佳品种和培养基配方十分必要。

表1 不同品种原球茎的诱导效果

Table 1 Induced effect of protocorm for different varieties

品种 Variety	茎尖数(块) Stem apex number(block)	原球茎形成数(个) Induced protocorm number	诱导率(%) Induction rate	备注 Remark
琴手 Qinshou	5	4	80	原球茎生长良好
夕阳 Xiyang	5	4	80	原球茎生长良好
大风 Dafeng	5	5	95	原球茎生长最好
紫花 Zihua	5	5	98	原球茎生长最好
山樱 Shanying	5	4	80	原球茎生长一般
梦露 Menglu	5	2	40	原球茎生长较弱
热情 Reqing	5	0	0	细胞基本不分裂
情圣 Qingshen	5	1	20	原球茎生长发育很差

2.2 不同浓度6-BA对原球茎诱导和增殖的影响

从表2可以看出,不同浓度6-BA(0.5~2.0mg/L)对紫花、大凤、夕阳等5个大花蕙兰品种原球茎的增殖效果有着明显差异。低浓度(0.5~1.0 mg/L)6-BA对原球茎的诱导与增殖均有明显的促进作用,诱导率均在70%以上;原球茎经过4~5个周期(约100d左右)的继代繁殖,增殖率达10^5;但当浓度超过1.0 mg/L时,原球茎的诱导率和增殖速度随着6-BA浓度的增加明显降低,特别是添加2.0mg/L 6-BA的诱导率仅为0~35%,与其他浓度相差很大。可见激素浓度在植物组织培养中起着决定性的作用,对细胞分裂和器官形成有重要影响[3],是植物组织培养及快速繁殖能否获得成功的关键。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 不同浓度6-BA对原球茎诱导和增殖的影响

Table 2 Effects of different concentration of 6-BA on the protocorm induction and multiplication

6-BA (mg/L)	紫花 Zihua		大凤 Dafeng		夕阳 Xiyang		琴手 Qinshou		山樱 Shanying	
	诱导率 Induction rate(%)	100d球茎数 Corm number	诱导率 Induction rate(%)	100d球茎数 Corm number	诱导率 Induction rate(%)	100d球茎数 Corm number	诱导率 Induction rate(%)	100d球茎数 Corm number	诱导率 Induction rate(%)	100d球茎数 Corm number
0.5	95	4100	95	4030	85	3978	80	3752	75	2650
1.0	98	4186	95	4251	80	3950	80	3860	70	2530
1.5	60	580	57	610	65	510	50	437	25	250
2.0	25	150	35	280	10	160	5	80	0	0

2.3 椰乳对原球茎增殖和分化的作用

将经过4次继代增殖形成的大量原球茎分批转入1/2MS+1.0mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+20%椰乳+1%白糖的分化培养基，培养20d左右。结果发现这些多次增殖的原球茎受椰乳含有天然激素所产生的"累加效应"的影响，实际上已提高了分化培养基中细胞分裂素的浓度而相对降低了生长素的比例，更有利于细胞分裂而导致器官形成[3,4]。在促进原球茎继续增殖的同时，球茎的表层出现细胞迅速分化并形成大量类胚型单极丛生芽的良好效果[5]。为了这些丛生芽更好的同步分化成长，将其分割成单株转入新的分化培养基后，很快获得大量(约25万苗)根苗生长健壮的再生植株—试管苗，达到快速增殖的目的。

2.4 试管苗移栽要点

移栽前先打开瓶盖，在有漫射光照的通风处进行适应性练苗5～7d。随后取出瓶苗，将附在根系的琼脂冲洗干净，稍晾干待栽。选用透气、排气、保湿性皆宜的基质进行栽培，用苔藓基质包苗移栽成活率可达100%，以碎木炭+细砂混合基质移栽成活率可达95%以上。移栽后，盆苗要置于75%遮荫棚内，每隔3～7 d视基质缺水情况，用自配的0.2%营养液(1升水中加入硝酸钙或过磷酸钙470mg、硝酸钾800mg、硫酸镁450mg、磷酸二氢钾200mg)分次浇灌，并加以细心护理，成活率可达70%以上。

3 结论与讨论

从本试验结果可看出，在1/2MS基本培养基中附加0.5～1.0mg/L6-BA+10%椰乳+2%白糖对大花蕙兰原球茎的诱导有显著效果，多数品种的诱导率达80%以上。虽然有些品种原球茎的诱导率较低，但如果适当调整激素浓度(包括附加的椰乳量)，仍可以提高其诱导率。

此外，适量的激素浓度对原球茎的增殖有重要影响。因为生长激素是培养基中的关键物质，对植物组织培养起着决定性的作用，特别是细胞分裂素与细胞的分裂和增殖密切相关，但浓度必须适当才能有效促进原球茎的生长增殖，浓度过高过低都不利于原球茎的形成和增殖。在本试验中，细胞分裂素6-BA浓度在0.5～1.0mg/L范围内，原球茎的诱导和增殖效果最佳，诱导率为80%～95%，增殖率达10^5，但当6-BA浓度超过1.0mg/L时，对原球茎的诱导和增殖反而起抑制作用。

在原球茎增殖和分化培养基中多次附加椰乳含量，实际上已经提高了细胞分裂素6-BA在培养过程中的"累加效应"，更有利于促进原球茎的细胞迅速分化并形成大量的类胚型单极丛生芽，这是加速植物良种无性系繁殖所期待的一条理想新途径。

在组织培养规模化生产的全程培养中，注重调整生长激素配比是关键技术。选择适于大花蕙兰组培的1/2MS低盐培养基，在有效加速无性系繁殖的前提下，以1%白糖代替蔗糖，自来水代替蒸馏水，用高固化度的琼脂可减少培养基的用量，以及使用廉价的椰乳都可大幅度降低生产成本，为加速植物组织培养工厂化育苗提供可行的技术依据。

参考文献：

[1] 中国科学院植物生理研究所细胞室. 植物组织和细胞培养[M]. 上海:上海科学技术出版社,1978:1-10.

[2] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科技出版社,1999.

[3] 张冬生. 植物体细胞遗传学[M]. 北京:复旦大学出版社,1989:65-75.

[4] 曾宋君. 五种石斛兰的胚培养及其快速系繁殖研究[J]. 园艺学报,1998,(1):75-80.

[5] 刘丽锋,张键. 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,(2):15-18.

(责任编辑 韦莉萍)