



# 心叶球兰组织培养与快速繁殖试验

管 艳, 肖三元, 梁国平

(云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100)

**摘要:**以心叶球兰叶片为外植体, 愈伤组织诱导和继代增殖培养基 MS+6-BA $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +白糖 3%, 诱导的愈伤组织多, 生长旺盛, 增殖倍数为 2~3 倍; 丛芽诱导培养基 MS+KT $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +白糖 3%, 芽的诱导率为 79.3%; 在丛芽增殖及复壮培养基 1/2MS+IBA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +白糖 2% 上, 有 20%~30% 玻璃化丛芽转为绿色苗, 玻璃化单芽经复壮培养长成绿色苗; 诱导生根培养基为 1/2MS+IBA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +白糖 2%, 玻璃化生根率为 56.4%, 淡绿色苗生根率达 91.1%。瓶苗移栽基质泥炭土:珍珠岩:甘蔗渣 (1:1:1) 的成活率最高, 达 91.4%。

**关键词:**心叶球兰; 组织培养; 快速繁殖; 玻璃化苗

**中图分类号:**S682.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1672-450X(2007)02-0041-03

## *Hoya kerrii* in Vitro and Its Rapid Propagation

GUANG Yan, XIAO Shan-yuan, LIAN Guo-ping

Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong 666100, China

**Abstract:**Take the leave of *Hoya kerrii* as explant, the optimum medium for more induce callus and inherit multiplication was MS+6-BA $2.0\text{mg/L}$ +NAA $0.5\text{mg/L}$ +2,4-D $1.0\text{mg/L}$ +GA $1.0\text{mg/L}$ +3% sugar, with strong growth and 2-3 times of proliferation; Induction of cluster bud reaches to 79.3% in the medium of MS+KT $0.5\text{mg/L}$ +NAA $0.5\text{mg/L}$ +GA $1.0\text{mg/L}$ +3% sugar; Vitrification of shoots in the medium for proliferation and regeneration of 1/2MS+IBA $1.0\text{mg/L}$ +2% sugar turned to green one (20%-30%); Induction of roots is in medium of 1/2MS+IBA $0.5\text{mg/L}$ +2% sugar, rooting rate of vitrification and light green shoots were 56.4% and 91.1% respectively. The survival rate of bottle shoots in media of mud:pearlite:sugarcane waste (1:1:1) was the highest (91.4%).

**Key words:** *Hoya kerrii*; In vitro culture; rapid propagation; vitrification of shoots

心叶球兰 (*Hoya kerrii*), 又称腊兰、腊花、腊腺花、凹叶球兰, 为萝藦科球兰属肉质附生植物, 原产于泰国、老挝<sup>[1,2]</sup>。心叶球兰是近年来引进的一种新型观赏植物, 生长缓慢, 耐旱、耐荫, 适宜室内摆放观赏, 极具市场开发前景。常规繁殖方式是利用茎段扦插, 繁殖系数低, 生长缓慢, 对此, 我们进行了心叶球兰的组织培养与快速繁殖试验, 现将试验结果报道如下:

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

供试材料为从泰国引进的心叶球兰, 取生长健壮的成熟叶片作外植体。

#### 1.2 试验方法

##### 1.2.1 外植体愈伤组织诱导

将心叶球兰叶片材料用饱和洗涤剂浸泡 5~

10min, 经自来水冲洗 10~15min, 然后用 75% 乙醇浸泡 30s, 无菌水冲洗一次, 再用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡 10~15min, 最后用无菌水冲洗 4~5 次, 滤干水分。在无菌状态下, 将经表面灭菌的材料切成  $1.0\text{cm}^2$  左右的小块, 分别接种于  $A_1$ : MS+6-BA $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +白糖 3%;  $A_2$ : MS+6-BA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +KT $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +白糖 3%;  $A_3$ : MS+6-BA $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +KT $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +白糖 3% 等 3 种处理的诱导培养基中。

##### 1.2.2 愈伤组织增殖培养

将培养 45~50d 的愈伤组织块切下, 分别转接在  $B_1$ : MS+6-BA $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +白糖 3%;  $B_2$ : MS+6-BA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +KT $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +白糖 3%;  $B_3$ : MS+6-BA $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +白糖 3% 等 3 个不同处理的愈伤组织继代增殖培养基中。



### 1.2.3 丛芽诱导

将亮绿色紧密的愈伤组织切成  $1.0\text{cm}^3$  左右的团块, 分别转接在以  $\text{MS} + \text{NAA} 0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{GA} 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 白糖 3% 为对照, 再分别附加不同细胞分裂素 6-BA、KT、ZT 各  $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 4 种处理培养基中。

### 1.2.4 丛芽增殖及复壮

将带有少量愈伤组织的玻璃化丛芽转接在  $1/2\text{MS} + \text{IBA} 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 白糖 2% 的培养基中, 培养 40 ~ 45d, 观察丛芽增殖和玻璃化芽复壮情况。

### 1.2.5 生根培养

将玻璃化单芽和淡绿色单芽分别转接在生根诱导培养基中, 以  $1/2\text{MS} +$  白糖 2% 为基本培养基, 分别附加生长素  $\text{IBA} 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{NAA} 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{IAA} 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $\text{IBA} (0.5、1.5、2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 。以上培养基均附加琼脂粉  $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} 5.8$ 。培养室温度  $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 光照强度  $1000 \sim 1500\text{lx}$ , 光照时间  $10\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$  左右。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对外植体愈伤组织诱导的影响

培养 10d 后, 材料切口处开始膨大呈淡绿色, 20d 后开始产生愈伤组织, 40d 后  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  处理的愈伤组织诱导率分别为 88.5%, 67.5%, 41.7%。 $A_1$  培养基诱导的愈伤组织大, 生长旺盛, 呈绿色团块。 $A_3$  培养基多数外植体产生的愈伤组织小, 生长慢。

### 2.2 不同处理对愈伤组织继代增殖培养的影响

继代增殖的愈伤组织培养 30d 后,  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $B_3$  三种处理中均形成 2 种质地的愈伤组织, 一种为亮绿色紧密颗粒状组织, 一种为亮黄色疏松颗粒状组织。前一种愈伤组织有分化芽的能力, 而后一种愈伤组织没有分化能力, 培养 50 ~ 60d 后逐渐褐变死亡。 $B_1$  培养基中的愈伤组织生长旺盛, 增殖 2 ~ 3 倍, 而在  $B_2$ 、 $B_3$  培养基中愈伤组织生长较慢, 增殖 1 ~ 2 倍。

### 2.3 不同细胞分裂素对诱导丛芽分化的影响

在 4 种丛芽诱导培养基中, 愈伤组织增殖 1 ~ 2 倍后基本不再增殖, 30d 后直接从愈伤组织上分化出 2 ~ 4 个芽点, 随后大部分长成玻璃化的苗 (仅有 10% 的为正常苗)。玻璃化苗叶、茎呈透明或半透明状, 失绿, 叶片肥厚卷曲, 最后变黄脱落。

培养 50d 后 (表 1), 4 种处理中以 KT 芽的诱导率最高, 达 79.3%, 其次是 6-BA、ZT, 分别为 54.0%、43.7%, CK 诱导率最低, 为 18.3%。在丛芽分化过程中同样出现 2 种质地的愈伤组织, 一是亮绿色紧密组织分化出芽或芽丛; 另一种最初是亮绿色紧密组织, 但在培养过程中逐渐转变成亮黄色疏松组织, 不分化芽, 并且逐渐褐变死亡。

表 1 不同细胞分裂素对诱导丛芽分化的影响

激素	愈伤组织因数	产芽率 (%)
CK	93	18.3
KT	96	79.3
6-BA	87	54.0
ZT	87	43.7

### 2.4 丛芽增殖及复壮

培养 40 ~ 45d 的玻璃化丛芽基部密集叶腋处或愈伤组织上, 又分化出 3 ~ 6 个新的玻璃化丛芽, 而原来的玻璃化芽逐渐伸长 2 ~ 5cm, 1 ~ 2 个节, 无叶, 其中有 20% ~ 30% 的从顶部往下渐转为淡绿色苗。

把长 2cm 以上的玻璃化或淡绿色丛芽分切成单芽转接在相同的新鲜培养基中, 培养 40 ~ 45d, 芽伸长 3 ~ 5cm, 为绿色或淡绿色苗, 长出 1 片绿色叶片, 茎粗壮, 有 2 ~ 3 节, 其中约有 10% 的苗长出 1 ~ 2 条根。

### 2.5 生根诱导

培养 40d 后 (表 2), 玻璃化苗和淡绿色苗在附加 IBA 的培养基中生根率最高; 其次是 IAA, 根从愈伤组织中产生, 黄褐色, 易断; NAA 不生根。在培养过程中, 在 3 种培养基中均产生愈伤组织: IBA 形成愈伤组织少, 呈褐色; IAA 多呈亮褐色; NAA 最多, 呈

表 2 不同生长素和培养材料对生根的影响

生长素	培养材料	接种株数	生根数 (株)	生根率 (%)	生长状况
$\text{IBA} 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	玻璃化苗	79	32	40.5	苗淡绿色或绿色, 产愈量少, 呈褐色
	淡绿色苗	180	140	77.8	苗绿色, 产愈较少, 褐色
$\text{NAA} 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	玻璃化苗	96	0	0	苗玻璃化, 产愈多呈水晶透明, 水浸状, 苗倒伏
	淡绿色苗	84	0	0	苗上部淡绿色, 产愈多呈水晶透明, 水浸状, 倒伏
$\text{IAA} 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	玻璃化苗	90	3	3.3	苗基部起 2/3 淡绿色, 1/3 绿色, 产愈中上, 亮褐色
	淡绿色苗	78	5	6.4	苗基部起 1/3 淡绿色, 2/3 绿色, 产愈中, 呈亮褐色



透明状。从苗的长势来看, IBA 中玻璃化苗转为淡绿色或绿色, 淡绿色苗转为绿色, 其上部仍为淡绿色, 有少量苗倒伏。NAA 中玻璃化苗不变, 上部苗茎肥粗, 倒伏。IAA 中玻璃化苗从苗基部起 2/3 为淡绿色, 1/3 为绿色, 淡绿色苗从苗基部起 1/3 为淡绿色, 2/3 为绿色。IBA 不同浓度培养基培养 50 天后的试验结果 (表 3) 表明: 低浓度 ( $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的诱导玻璃化苗和淡绿色苗生根率最高, 无愈伤组织产生, 长 0.5~1.5 片绿色叶, 1~3 条白色的根, 根长 1.0~3.0cm。随着 IBA 浓度的增高, 生根率逐渐下降, 产生褐色的愈伤组织量逐渐增多, 叶片数下降, 根 1~2 条, 为白色、浅褐色至褐色, 根短, 容易脱落。

### 2.6 移栽

将瓶苗放置在自然散射光下炼苗一周, 取出瓶苗洗净附着在根部的培养基, 移栽至 4 种不同的混合基质 (表 4) 中, 浇足定根水, 置于荫蔽度为 80% 的荫棚下, 湿度保持在 60%~70%。60d 后调查成活率。

试验结果 (表 4) 以泥炭土:珍珠岩:甘蔗渣 (1:1:1) 的混合基质最好, 移栽成活率为 91.4%, 长出 0.5~1.0 片新叶; 而泥炭土:珍珠岩 (1:1) 混合基质的排水性较差, 成活率仅为 57.7%。

### 3 讨论

本项试验结果, 心叶球兰成熟叶片为外殖体组培的愈伤组织诱导和增殖培养基, 以 MS+6-BA2.0

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA}0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + 2,4\text{-D}1.0 + \text{GA}1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} +$  白糖 3% 为好 (诱导率 88.5%; 增殖 2~3 倍); 加入 KT 的 MS+KT $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA}0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{GA}1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} +$  白糖 3% 的丛芽诱导率最高, 达 79.3%; 玻璃化苗在 1/2MS+IBA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  培养基上有 20%~30% 转变为绿色苗; 生根培养基 1/2MS+IBA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} +$  白糖 2% 的生根率较高, 玻璃化苗为 56.4%。淡绿色苗为 91.1%; 瓶苗移栽基质泥炭土:珍珠岩:甘蔗渣 (1:1:1) 的成活率最高, 达 91.4%。

试验观察到, 所诱导的愈伤组织有两种形态: 一种为亮绿色紧密颗粒状组织, 有分化芽的能力; 另一种是亮黄色疏松颗粒状组织, 没有芽分化能力。

试验还观察到, 加入 NAA $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的生根培养基, 对玻璃化苗和深绿色苗均不能刺激生根, 玻璃化苗亦不能转为深绿色、绿色, 与加其它生长素培养基上的表现不同。丛芽分化培养基中有 NAA ( $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 分化出的均为玻璃化苗。由此看来, 也许 NAA 及其使用浓度是心叶球兰组培产生玻璃化苗的一个重要因素。

### 参考文献:

- [1] 薛聪贤. 补遗·新品种 180 种 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2002: 29.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 36 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 484.

表 3 IBA 不同浓度和培养材料对心叶球兰诱导生根的影响

IBA	培养材料	接种数 (株)	生根数 (株)	生根率 (%)	产愈伤组织量	叶片数 (片)	条数 (根)	颜色	长度 (cm)
0.5	玻璃化苗	78	44	56.4	0	0.5~1.0	1~2	白色	1~2
	淡绿色苗	192	175	91.1	0	1.0~1.5	2~3	白色	2~3
1.5	玻璃化苗	78	30	38.5	++	0~0.5	1~2	浅褐色	0.5~1
	淡绿色苗	192	125	65.1	+	0.5~1.0	1~2	浅褐色	1~1.5
2.0	玻璃化苗	78	24	30.8	+++	0~0.5	1~2	褐色	0.5~1
	淡绿色苗	180	109	60.6	++	0~0.5	1~2	褐色	0.5~1

注: 表中产愈伤组织量 “+、++、+++” 表示愈伤组织量的多少。

表 4 不同混合基质对心叶球兰瓶苗成活率的影响

基 质	移栽株数	成活株数	成活率 (%)
泥炭土:珍珠岩:甘蔗渣 (1:1:1)	300	253	84.3
泥炭土:珍珠岩 (1:1)	300	173	57.1
泥炭土:珍珠岩:甘蔗渣 (1:1:1)	162	148	91.4
泥炭土:珍珠岩:甘蔗渣:表土 (1:1:1:0.5)	162	121	74.7