

# 红星凤梨组织培养与快速繁殖

平秀敏<sup>1,2</sup> 田敏<sup>1\*</sup> 李纪元<sup>1</sup> 段红平<sup>2</sup>

(1 中国林科院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400; 2 云南农业大学农业与生物技术学院, 云南昆明 650201)

**摘要:**以红星凤梨为试材,研究了生长调节物质、外植体类型、抑菌剂等对离体不定芽再生的影响。在 MS + TDZ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基上,腋芽、顶芽和叶片均可以诱导再生不定芽,腋芽和顶芽的不定芽再生频率相差不大,均为 37.2% - 53.3%,但叶片不定芽再生频率较低,仅为 2.8% - 13.3%。MS + 0.2 - 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ + 0.05  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA + 100  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  椰子水为适宜的不定芽增殖培养基;试管苗生根的适宜培养基为 MS + IBA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 100  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  椰子水;不定芽继代培养时,在灭菌后的培养基中加入 25 - 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  青霉素 G 钠能有效控制内生菌的污染。

**关键词:**红星凤梨;组织培养;快速繁殖

**中图分类号** S668.3 **文献标识码** A **文章编号** 1007-7731(2008)23-103-03

## Tissue culture and rapid propagation of *Guzmania lingulata*

Ping Xiumin et al. (1 Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, China; 2 Faculty of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** *Guzmania lingulata* protocorms were used as materials to establish the protocorm culturing system of *Guzmania lingulata*. The effects of growth regulators, varied explants and ablastin to the regeneration of adventitious shoots were studied. Adventitious shoots could be efficiently induced from axillary bud, terminal bud or leaves in the medium consists of MS + TDZ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA. The regeneration frequencies of adventitious buds induced from axillary buds and terminal buds are quite similar, both of which were 37.2% - 53.3%, while that of the leaves was only 2.8% - 13.3%. The medium optimum for the propagation of adventitious buds consists of MS + 0.2 - 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ + 0.05  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA + 100  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  coconut water extract, and the medium optimum for the rootage of the test-tube seedling was MS + IBA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 100  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  coconut water extract. Endophyte can be effectively controlled by adding in axenic medium with 25 - 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  penicillin G sodium.

**Key words:** *Guzmania lingulata*; Adventitious shoot; Regeneration; Tissue culture; Rapid propagation

红星凤梨(*Guzmania lingulata*)属于凤梨科铁兰属,别名为帝王星,原产于美国南部至美洲热带地区的常绿附生草本。红星凤梨株型较小,叶光滑,叶片翠绿光亮,手感柔软,较窄,叶缘无刺,呈松散的莲座状;红色穗状花序由叶筒中央抽出,花茎直立,花茎高出叶丛 20cm 以上,花茎上螺旋着生许多鲜红的苞片,构成星形的花序。红星凤梨任何时候都开花,花白色,花几乎藏在鲜红色的星形花苞内,十分诱人,花期长达半年之久,是一种花、叶两美的观赏植物<sup>[1]</sup>。红星凤梨具有很高的观赏价值,深受大众喜爱,是近年来国内外市场价格昂贵需求量较大的一种室内花卉。该植物通常以分株方式繁殖,繁殖系数低,不能满足市场需求。通过组织培养快速繁殖可在短期内向市场提供大量种苗。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 优质温室盆栽红星凤梨。

**1.2 试验方法** 选用优质红星凤梨腋芽、顶芽和叶片用自来水冲洗后蒸馏水冲洗 3 次,将腋芽和顶芽剥除其最外层的芽鳞片,然后用 70% 乙醇表面消毒 10s,用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  溶液浸泡消毒 6 - 10min,表面消毒后的腋芽、顶芽

用镊子除去老化的组织后接种于不同的生长培养基上诱导不定芽,接种时每瓶接一个。表面消毒后的叶片将叶鞘切成 0.5cm × 0.5cm 大小接种到 MS 附加各种激素组合的培养基上诱导芽的分化。

**1.3 培养条件** 25 ± 2℃、16h 光照/8h 黑暗条件下;光照强度为 2500Lx。基本培养基为 MS、1/2MS 和  $\text{N}_6$ 。添加 30% 蔗糖,5% 琼脂粉,以及不同的外源添加物、不同抑菌剂和不同的激素种类及浓度组合。pH 值为 5.8。

## 2 结果与分析

**2.1 不定芽的分化** 试验选用四种激素组合,分别是 6 - BA + KT 组合、TDZ + KT 组合、6 - BA + IAA 组合和 TDZ + NAA 组合(表 1)。实验结果表明,TDZ 诱导不定芽的分化率明显高于 6 - BA 和 KT,IAA 和 NAA 的作用无明显差异。MS 培养基中附加 TDZ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 时,三种外植体不定芽的分化频率均较高,腋芽、顶芽、叶片的分化率分别为 53.3%、45.6%、13.3%(10 号培养基)。在附加植物激素的培养基上,腋芽、顶芽和叶片均可以诱导产生不定芽,不同外植体分化频率不同。其中腋芽和顶芽的分化频率相差不大,均为 37.2% - 53.3%,

**基金项目:**中国林业科学研究院亚热带林业研究所重点项目(RISF060703)。

**作者简介:**平秀敏(1983-),女,硕士研究生,主要从事植物快繁殖技术方面的研究。\* 通讯作者 **收稿日期:**2008-10-15

但叶片再生频率较低, 仅为 2.8% - 13.3%。由于红星凤梨顶芽材料有限无法满足组培的需求, 腋芽较多, 而叶片分化率低, 因此红星凤梨快速繁殖的最佳外植体为腋芽。

表1 不同外植体与激素对不定芽分化的影响

序号	植物生长调节剂 (mg · L <sup>-1</sup> )					分化率 (%)		
	TDZ	6-BA	KT	IAA	NAA	腋芽	顶芽	叶片
1	3.0	3.0				14.9 ± 3.4a	14.3 ± 3.1a	3.9 ± 2.1b
2	4.0	2.0				17.3 ± 1.2a	12.5 ± 1.4a	2.8 ± 1.2a
3	5.0	1.0				11.6 ± 1.8a	17.8 ± 2.3b	3.3 ± 1.3a
4	2.0		3.0			38.5 ± 2.2a	36.7 ± 2.6a	9.1 ± 1.0b
5	3.0		2.0			16.4 ± 2.5c	13.3 ± 3.9c	5.7 ± 1.8b
6	4.0		1.0			37.2 ± 3.2a	41.7 ± 1.5b	7.9 ± 1.0a
7		2.0		2.0		24.4 ± 2.4b	25.6 ± 2.2a	5.7 ± 1.2b
8		2.0		1.0		31.2 ± 3.3a	31.1 ± 3.1b	8.9 ± 2.7a
9		2.0		0.5		35.7 ± 2.8a	21.6 ± 2.7a	10.0 ± 2.5a
10	2.0				0.5	53.3 ± 1.7c	45.6 ± 2.8b	13.3 ± 2.2a
11	3.0				0.2	10.2 ± 1.1b	17.3 ± 3.1b	11.5 ± 2.9a
12	4.0				0.1	17.8 ± 1.8b	12.6 ± 1.6c	4.4 ± 3.7b

注: 1. 培养基以 MS 为基础; 2. 表中数据为三次重复平均值 ± 标准误差; 3. 数值后的不同字母表示差异显著性 (p < 0.01)。表 2、4、5 同。

2.2 不定芽的增殖与复壮

2.2.1 不同浓度的 TDZ 与 NAA 组合对不定芽继代增殖的影响 将从外植体诱导出的丛生芽进行切割, 使之成为单芽, 在不同的培养基上培养, 每瓶接种 2 - 5 个芽。为了找到最大的增殖系数, 同时又让苗长得比较粗壮, 有利于生根, 获得健壮的再生植株。设置了不同浓度的 TDZ 和 NAA 来进行不定芽的继代培养。结果表明 (表 2), 在无激素的培养基上, 芽苗长势较差, NAA 浓度为 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 时, 芽苗长势较差, 低浓度的生长素 (NAA) 对不定芽的增殖效果明显, NAA 浓度降低到 0.05 时, 芽苗长势较好。TDZ 对不定芽的增殖效果影响较为显著, 低浓度的 TDZ 有利于不定芽的增殖, 当 TDZ 浓度从 0.2 - 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 时, 不定芽的增殖倍数相对较高, 芽苗长势相对较好。当 TDZ 浓度升高到 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 或 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 以上时, 不定芽的增殖倍数明显降低, 芽苗长势较差。因此, 一定浓度的植物生长调节剂对不定芽的增殖继代是必需的, 其中细胞分裂素 (TDZ) 的最适质量浓度为 0.2 - 0.5 mg · L<sup>-1</sup>, 生长素 (NAA) 的最适质量浓度为 0.05 mg · L<sup>-1</sup>。

表2 不同浓度的 TDZ 与 NAA 组合对芽增殖效果的影响

序号	TDZ (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA (mg · L <sup>-1</sup> )	芽高 (cm)	平均增殖倍数	芽的形态	效果
1	0	0	1.4a	2.9 ± 0.23a	黄绿色, 芽弱	差
2	0.2	0.1	1.5a	3.0 ± 0.17a	黄绿色, 芽弱	差
3	0.2	0.05	2.8d	4.9 ± 0.56c	绿色, 健壮	好
4	0.5	0.05	1.8b	3.6 ± 0.15ab	嫩绿色, 健壮	较好
5	1.5	0.05	2.6c	3.1 ± 0.22a	淡绿色, 健壮	一般
6	1.5	0.05	1.6a	3.3 ± 0.04a	淡绿色, 芽弱	差
7	2.0	0.05	1.1b	3.2 ± 0.02a	褐绿色, 芽弱	差

2.2.2 外源添加物对观赏凤梨不定芽增殖的影响 选择 MS、1/2MS 两种培养基。红星凤梨不定芽在分别含椰子

水 100g · L<sup>-1</sup>、马铃薯 100g · L<sup>-1</sup>、香蕉汁 100g · L<sup>-1</sup> 的培养基上的增殖效果如表 3 所示。由表 3 可以看出, MS 和 1/2MS 对不定芽的增殖效果无明显影响, 但加入椰子水后的增殖倍数与对照之间差异显著, 与加香蕉汁和马铃薯汁的培养基之间差异却并不显著。添加物的种类不同对培养效果也不同, 添加椰子水的培养基比添加香蕉汁或马铃薯汁的培养基更能促进不定芽的增殖。另外试验还发现有添加物的培养基上的丛生芽普遍比未添加营养物的培养基上的丛生芽生长长势要好。

表3 添加物对红星凤梨不定芽增殖的影响

培养基	添加物	扦插无菌苗数	平均增殖倍数	芽高 (cm)
MS		150	3.80 ± 0.22a	2.3
	椰子水	150	4.25 ± 0.17b	2.9
	香蕉汁	150	3.85 ± 0.13a	2.4
	马铃薯汁	150	3.84 ± 0.11a	2.2
1/2MS		150	3.80 ± 0.22a	2.8
	椰子水	150	4.15 ± 0.08b	3.7
	香蕉汁	150	3.77 ± 0.23ab	3.1
	马铃薯汁	150	3.85 ± 0.22a	2.9

注: 1. 表中数据为三次重复平均值 ± 标准误差; 2. 数值后的不同字母表示差异显著性 (p < 0.01)。

2.2.3 不同控制污染措施对不定芽继代培养的影响 在继代过程中, 外植体附近经常出现的黏液或混浊水迹, 这可能是内生菌引起的污染。为了获得无菌苗, 提高诱导率, 就必须控制内生菌的污染。本试验选用不同的抑菌剂加入灭菌后的培养基, 在保证外植体能正常分化的前提下尽可能减少内生菌污染。结果表明 (表 4), 使用各种抑菌剂都在一定程度上减轻了内生菌的污染, 同时也增加了丛生芽的黄化率。卡那霉素不仅对内生菌无抑制作用, 而且对丛生芽有害, 头孢霉素和羧苄青霉素的抑菌效果也不明显, 但对丛生芽无抑制作用, 青霉素 G 钠抑菌效果最好, 培养基中青霉素 G 钠浓度达 20 - 50 mg · L<sup>-1</sup>, 污染的培养基基本表现无菌状态, 并且丛生芽黄化率最低, 生长状况较好。

表4 不同控制污染措施对不定芽继代培养的影响

处理 (mg · L <sup>-1</sup> )	卡那霉素		头孢霉素		羧苄青霉素		青霉素 G 钠	
	污染率 (%)	黄化率 (%)						
5	43.4	3.8	38.6	0	43.9	0	27.3	0
20	33.6	15.6	43.5	14.7	41.5	11.5	6.4	0
50	37.8	24.3	13.6	53.7	33.6	17.3	1.3	0
80	12.4	76.3	22.3	63.3	25.8	28.7	0	11.3
100	2.6	87.2	14.7	77.6	13.3	29.4	0	33.6

2.3 生根及移栽 不定芽长至 3cm 左右, 即可切下转接到生根培养基上, 进行不定根的诱导。从不定芽形成的再生苗在附加 100g · L<sup>-1</sup> 椰子水和不同浓度 IBA 或 NAA 的 MS 培养基上 7 - 14d 后就会产生 2 - 6 根不定根。成为完整的再生苗。20d 后统计生根情况及 IBA、NAA 对观赏凤梨生根情况的影响 (表 5), 红星凤梨生根比较困难, 不定芽在无 IBA 和 NAA 的 MS 培养基上培养时, 一个月后仍然无根形成。低浓度的 NAA 和 IBA 对观赏凤梨不定根有

明显的促进作用,但较高浓度的 NAA 和 IBA 对根的形成有不利的影 响。同时在红星凤梨不定根形成中发现,加入 NAA 形成的根细长纤弱,加入 IBA 时形成的根粗短健壮,其中 MS + IBA0.50 mg · L<sup>-1</sup> + 100g · L<sup>-1</sup>椰子水培养基最适合生根,不仅粗壮且多,生根率达 90%。待生根苗长到 5-6cm 时,打开瓶盖,炼苗 2-3d 后,洗去小苗根部的培养基,移栽入营养土中,成活率可达 95%。

表 5 不同激素的浓度配比对生根的影响

生长素	浓度 (mg · L <sup>-1</sup> )	根长 (cm)	平均根数	生根率 (%)	开始生根时间 (d)	生根效果
NAA	0	0	0	0	0	无根,效果差
	0.05	1.23 ± 0.79a	1.50 ± 0.52a	16.5	15	根少,细长纤弱,效果差
	0.10	1.01 ± 0.27a	2.12 ± 0.75b	38.2	14	根多,长,效果一般
	0.50	0.98 ± 0.84a	1.70 ± 0.55a	47.8	11	根多,细长,效果一般
	1.00	1.14 ± 0.21a	1.42 ± 0.14a	26.1	17	根少,细长纤弱,效果差
IBA	0	0	0	0	0	无根,效果差
	0.05	0.42 ± 1.05a	1.31 ± 0.84a	21.4	9	根少,粗短,效果一般
	0.10	0.36 ± 0.87a	1.00 ± 0.89a	12.6	13	根少,粗短,效果一般
	0.50	0.65 ± 0.09b	3.75 ± 0.75c	48.7	14	根多,粗短健壮,效果好
	1.00	0.49 ± 0.15a	1.21 ± 1.05a	19.1	7	根少,粗短,效果一般

### 3 讨论

许多学者在研究观赏凤梨再生时发现,外植体类型、生长调节物质、基因型等均不同程度影响不定芽的诱导。Mathews<sup>[2]</sup>等从无菌小植株切取完整叶子,置于 MS + NAA 1.8 + IBA 2.0 + KT 2.1 (或 BA 2.2)培养基中培养,则在外植体切端增生愈伤组织,并于其上分化成芽,BA 比 KT 诱导出更多的芽。Wakasa<sup>[3]</sup>等以休眠腋芽、小冠芽、小裔芽进行培养,在 MS + 肌醇 100mg/L + 3% 蔗糖基础上添加 NAA 2.0 和 BA 2.0,得到球状体(一类特殊愈伤组织),转至仅含 BA 2.0 的培养基上长成苗,再移至不含激素的培养基上生根。桂意云等<sup>[4]</sup>将擎天凤梨的短缩茎切块接种到诱导培养基上,经 25d 培养长生不定芽,以固体培养基 MS + 6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 为佳。徐立<sup>[5]</sup>等以彩叶凤梨为材料发现,MS + KT 4.0 mg · L<sup>-1</sup> + IAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 为最好的分化和增殖培养基。

本试验以红星凤梨为材料研究发现,在同一种培养基 MS + TDZ 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 上,顶芽、腋芽和叶片三种外植体的再生均达到最佳(再生频率分别为 53.3%, 45.6% 和 13.3%),但考虑到外植体来源,取材、时间限制和诱导分化率等因素,最佳的外植体是腋芽。选择外植体对观赏凤梨快速繁殖是十分重要的,同一属凤梨不同种,同一种凤梨不同品种,同一品种不同器官,同一器官不同生理状态,对外界诱导反应的能力及分化再生能力是不同的。如不同基因型、不同年龄、不同生理状态的外植

体对培养基的反应不同。

细胞分裂素(TDZ)是诱导外植体分化的关键因子,适宜浓度的 TDZ(2.0 mg · L<sup>-1</sup>)能促进不定芽的分化,而低浓度的 TDZ(0.2-0.5 mg · L<sup>-1</sup>)有利于不定芽的增殖。MS + TDZ 0.2-0.5 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.05 mg · L<sup>-1</sup> + 100g · L<sup>-1</sup>椰子水为最佳的增殖培养基。MS + IBA 0.50 mg · L<sup>-1</sup> + 100g · L<sup>-1</sup>椰子水为最佳的生根培养基。TDZ 在观赏凤梨组织培养中的利用少见报道。TDZ 作为一种人工合成的激素,具有细胞分裂素和生长素的双重功能,它在植物体内及其稳定,比 BA 具有更高的活性<sup>[6-7]</sup>。培养基中加入一定浓度的有机添加物如椰子水、马铃薯汁和香蕉汁对不定芽的诱导均有一定的促进作用,这可能是由于这些有机添加物中含有一定浓度的植物激素所致。

试验研究中遇到的最主要的问题就是严重的污染问题,污染率往往高达 70% - 80%。污染率高的原因之一是由于凤梨的特殊结构,大多数附生凤梨叶片排列成莲座状,基部形成一个不漏水的叶筒。由于叶筒长期贮水,生长点长期处于水浸状态,使细菌侵入到组织内部,导致外植体消毒困难<sup>[8]</sup>。外植体消毒时间短,成活率低,往往接种 30d 后内源菌还不断表现出来;消毒时间长又易杀伤生长点,造成严重褐变,影响成活率;此外凤梨喜生长在湿润偏酸性的土壤中,而湿润土壤为许多微生物的繁殖与生长提供了有利条件,不仅表面易污染,外植体内部也易污染。为了降低污染率,必须选择合适的消毒剂 and 消毒时间,同时为提高消毒效果,在外植体处理过程中要尽可能剥尽其基部叶片,但是又不能伤及嫩茎组织。继代过程中在灭菌后的培养基中加入 25-50mg · L<sup>-1</sup>青霉素 G 钠能有效的控制内生菌的污染,这种控制不定芽内生菌污染的措施在观赏凤梨再生研究中属首次报道。

### 参考文献

- [1] 简·古蒂埃,格拉汉姆·克拉克. 室内观赏植物图鉴. 福州:福建科学出版社,2002:56.
- [2] Mathews V H, et al. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant in vitro cultures of pineapple. *Scientia Hort.*, 1979, 1: 319-328
- [3] Wakasa K. Variation in the plants from the tissue culture of Pineapple. *Journal of Breeding*, 1979, 29(1): 13-22
- [4] 桂意云,林纬,陶劲,等. 擎天凤梨离体培养快繁试验. *广西农业科学*, 2005, 36(6): 509-510
- [5] 徐立,李志英,赖齐贤,等. 彩叶凤梨的组织培养及快速繁殖. *植物生理学通讯*, 2003, 39(4): 3-44
- [6] Huetteman C A, Preece J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, 33: 105-119
- [7] Guo D P, Zhu Z J, Hu X X, et al. Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var *tsatsai*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 83: 123-127
- [8] 金文驰. 观赏凤梨的特殊结构与分类鉴定. *生物学通报*, 2005, 40(6): 20-22