

大花蕙兰高频再生体系的研究

张晨晨, 余家平, 蒋琳, 徐莉莉, 林茂松, 王钰*

安徽大学生命科学学院, 安徽省生态工程与生物技术重点实验室, 合肥 230039

摘要: 以大花蕙兰无菌苗假球茎为材料诱导丛生芽。适宜诱导的培养基为MS+6.4 g·L⁻¹琼脂+0.5%活性炭+2.0 mg·L⁻¹6-BA+0.1 mg·L⁻¹NAA+30 g·L⁻¹蔗糖。其芽长至2~3 cm时, 转入生根培养基, 适宜的生根培养基为MS+6.4 g·L⁻¹琼脂+0.2 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹NAA+0.5 mg·L⁻¹生根粉(ABT), 生根率为100%。根长2~4 cm时炼苗移栽, 成活率可达95%。

关键词: 大花蕙兰; 组织培养; 丛生芽; 生根培养

Study on High-Frequency Regeneration System of *Cymbidium hybridum*

ZHANG Chen-Chen, YU Jia-Ping, JIANG Lin, XU Li-Li, LIN Mao-Song, WANG Yu*

Anhui Key Laboratory of Eco-Engineering and Bio-Technique, School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China

Abstract: The fascicular buds were induced from the pseudocorm of *in vitro* seedlings lump of *Cymbidium hybridum*. The results showed that, MS+6.4 g·L⁻¹ agar+0.5% activated carbon+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+ 30 g·L⁻¹ sugar is the best medium. The buds were transferred into the rooting medium when it reached 2–3 cm. The best rooting medium for the radication is MS+6.4 g·L⁻¹ agar+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ ABT. The rate of rooting could be 100%. The seedlings were planted into soil when their roots reached 2–4 cm. The survival rate amounted to 95%.

Key words: *Cymbidium hybridum*; tissue culture; fascicular buds; rooting

大花蕙兰是兰科兰属植物中的一部分大花型附生种类的杂交种, 又称虎头兰、新美娘兰或喜姆比兰, 是世界上栽培最普及的洋兰之一(杨玉珍和孙廷 2002; 朱艳和胡军 2000)。大花蕙兰的株形舒展, 花大而多, 花色艳丽, 既有洋兰优美之姿, 又有中国兰淡雅之香, 深受人们的喜爱。在自然情况下大花蕙兰繁殖速度慢, 繁殖系数低, 远不能满足市场商品生产的需要。组织培养技术是大花蕙兰快繁的有效途径之一(刘园和王四清 2005; 杨玉珍和孙廷 2002)。在大花蕙兰的组织培养中, 一般是通过诱导原球茎的增殖和苗的分化以达到快速繁殖的目的。但以原球茎诱导的起始材料需经历从脱分化到再分化的过程, 而且这种途径所需时间较长, 后代再生植株中容易发生变异。本文采用大花蕙兰无菌苗的假球茎, 不经愈伤组织阶段而直接诱导出丛生芽, 快速而稳定, 生产成本也有降低, 丛生芽每株每年以 4^{1.2} 的几何频率扩增, 比一般报道的高(谢为龙和谭群英 1994; 杨玉珍和孙廷 2002), 可在较短的时间内培育出大批商品苗, 从而为大花蕙兰的工厂规模化生产打下基础。

材料与方法

试材为本校植物组培实验室提供的大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)无菌苗。

取4~5 cm高, 健壮、无菌试管苗的假球茎, 于无菌操作台上, 切成6~8 mm的小块, 接种到诱导培养基上, 每瓶3个外植体, 每种培养基接种9瓶, 重复3次。诱导培养基以MS+6.4 g·L⁻¹琼脂+0.5%活性炭为基本培养基, 附加不同浓度的6-BA、NAA和蔗糖, 并采用4因素3水平正交设计[L₉(3⁴), 表1] (吴林等 2007; 王钰等 2006)。培养基的pH值为5.8, 在温度(25±2)、光照强度40 μmol·m⁻²·s⁻¹、每日光照14 h的条件下培养。接种4周后统计每瓶丛生芽的数量。

丛生芽长至2~3 cm时, 将丛生芽分割成单个外植体, 转入生根壮苗培养基, 生根壮苗培养与丛生芽诱导的处理方式和培养条件基本相同,

收稿 2007-10-23 修定 2007-11-06

资助 安徽省科技攻关项目(03013003)。

* 通讯作者(E-mail: yuwang800@hotmail.com; Tel: 0551-5108373)。

表1 诱导丛生芽和生根壮苗的正交试验表

Table 1 Orthogonal experiment of inducing cluster shoots and rooting

水平	诱导丛生芽			生根壮苗		
	6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	蔗糖浓度 /g·L ⁻¹	6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	ABT 浓度 /mg·L ⁻¹
1	1.0	0.1	20	0.1	0.1	0.1
2	2.0	0.2	30	0.2	0.5	0.3
3	3.0	0.3	40	0.3	1.0	0.5

只是附加不同浓度的 6-BA、NAA 和 ABT (表 1), 转接 2 周后调查苗的生根率, 4 周后统计根长及生长状况。

生根试管苗移栽时, 先将瓶盖打开, 在无菌室炼苗 2~3 d, 然后小心取出试管苗, 洗去根上附着的培养基, 将根部浸入 0.1% 多菌灵溶液中浸泡消毒 3 min, 再将幼苗小心插到装有蛭石的育苗盘上, 浇水后 1 个星期内用塑料薄膜覆盖保湿。

结果与讨论

1 生长调节剂和蔗糖对丛生芽诱导的影响

大花蕙兰类球茎接种到诱导培养基 2 周后, 芽开始萌发(图 1-a), 随后, 培养基中的丛芽开始增多(图 1-b), 有的培养基上还萌发出小芽丛。大多数培养基上都是在外植体的两端切口处诱导出 2~3 个丛芽, 丛生芽的数量最多达到 7 个, 少数为直接长成的单株小苗。接种 4 周后统计培养基上丛生芽的总数以及平均增值倍数(表 2), 差异达

到显著水平($\alpha=0.05$)及极显著水平($\alpha=0.01$)。每个因子各水平之间的丛生芽增值倍数有一定的差异, 3 个因子的影响大小也存在差异。它们对大花蕙兰丛生芽诱导影响的大小顺序为: 蔗糖>6-BA>NAA。蔗糖浓度过高或过低对芽的诱导都不利, 浓度过低时不能为丛生芽诱导提供充足的营养, 浓度过高时生根率随之增加, 而萌芽率则随糖的用量增加而减少。细胞分裂素类物质/生长素类物质的比值过小不利于丛生芽的诱导分化(刘明志和朱京育 2000), 比值过大丛生芽的分化系数尽管高, 但诱导的丛芽普遍矮小。综合以上结果可知 4 号培养基最有利于大花蕙兰丛生芽的增殖, 并能分化出大量的丛生芽(图 1), 增值倍数可达 4.07。如果丛生芽按一年转接 12 代计算, 理论上每株每年可以 4^{12} 的几何频率扩增。

2 生长调节剂对苗生根的影响

将健壮的单个丛生芽小植株转入生根壮苗培养基, 1~2 周后开始生根并逐渐生长, 新生长出

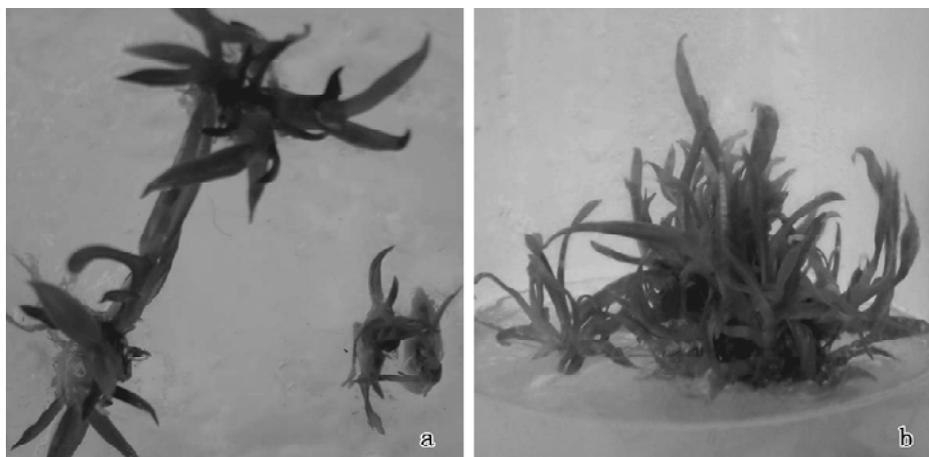


图1 大花蕙兰丛生芽的萌发(a)和形成(b)

Fig.1 Germination (a) and formation (b) of fascicular buds in *C. hybridum*

表2 大花蕙兰丛生芽的诱导

Table 2 Induction of fascicular buds in *C. hybridum*

编号	6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	蔗糖浓度 /g·L ⁻¹	丛生芽总数 / 个	增殖倍数
1	1.0	0.1	20	60	2.22
2	1.0	0.2	30	85	3.15
3	1.0	0.3	40	39	1.44
4	2.0	0.1	30	110	4.07
5	2.0	0.2	40	70	2.59
6	2.0	0.3	20	66	2.44
7	3.0	0.1	40	63	2.33
8	3.0	0.2	20	72	2.67
9	3.0	0.3	30	92	3.41

的根吸收营养物质后会明显促进茎叶的生长, 4周后丛生芽可产生2~5条根, 长成粗壮的根系, 植株可达5~6 cm高(图2)。生根率达到了100%, 各处理对大花蕙兰生根率并没有影响, 但不同对比对小苗生根的诱导效果不同(表3)。1号培养基小苗生根缓慢, 长势较弱。2号和3号培养基小苗长势较弱, 叶色淡绿, 根长但比较细弱。4号培养基小苗较健壮, 但叶色淡绿长势较弱。5号培养基效果最佳: 小苗健壮, 叶色深绿, 根数较多, 根粗且长, 根毛也较多, 长势良好。6号培养基小苗健壮, 叶色深绿, 但生根缓慢。7号培养基小苗细弱, 根数较少。8号和9号培养基小苗长势一般, 根部有少量丛生芽形成。方差分析表明ABT和NAA都对大花蕙兰生根壮苗的影响达到极显著水平, 高浓度ABT有利于大花蕙兰的生根, 适宜的NAA浓度对生根也有影响。6-BA对大花蕙兰生根壮苗的影响也达到显著水平,



图2 大花蕙兰的再生植株

Fig.2 Regenerated plantlet of *C. hybridum*

高浓度6-BA对兰花生根有抑制作用, 但有利于丛生芽的生长。综合观察的结果认为5号培养基为大花蕙兰生根壮苗的最佳培养基。

表3 大花蕙兰的根长和生根率

Table 3 Root length and percentage of root formation in *C. hybridum*

编号	6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	ABT 浓度 /mg·L ⁻¹	生根率 /%	根长 /cm
1	0.1	0.1	0.1	100	1.94
2	0.1	0.5	0.3	100	3.14
3	0.1	1.0	0.5	100	3.37
4	0.2	0.1	0.3	100	2.73
5	0.2	0.5	0.5	100	3.94
6	0.2	1.0	0.1	100	2.67
7	0.3	0.1	0.5	100	2.97
8	0.3	0.5	0.1	100	2.61
9	0.3	1.0	0.3	100	2.74

3 苗的移栽

移栽前打开瓶盖炼苗 1~2 d 后移栽, 移栽时选取生长健壮无污染的试管苗, 将小苗移入蛭石, 放在温度为 (23 ± 2) , 相对湿度为 70% 左右, 通风条件较好的环境下生长。移栽后及时盖膜和浇水, 以保持湿润, 切忌过干或过湿。过干会使植物干枯, 过湿则会导致烂根。移栽一周后每周浇一次 1/2MS 营养液, 15~20 d 后的成活率可达 95% (图 2), 远高于一般报道中 50% 的成活率(陈心启和罗毅波 2003; 刘园和王四清 2005)。

参考文献

陈心启, 罗毅波(2003). 中国兰科植物研究的回顾和前瞻. 植物学

报, 45 (5): 2~20

刘明志, 朱京育(2000). BA 和复合添加物对大花蕙兰增殖和分化的影响. 暨南大学学报, 21 (4): 7~8

刘园, 王四清(2005). 大花蕙兰的研究动向. 园艺学报, 32 (4): 748~752

王钰, 阮龙, 武廷章, 吴瑾华, 谢继峰, 吴林, 吴飞(2006). 三角紫叶酢浆草组培快繁技术的研究. 安徽农业大学学报, 33 (2): 230~233

吴林, 吴飞, 余家平, 蒋琳, 张晨晨, 王钰(2007). 驱蚊草组织培养及其愈伤组织诱导研究. 生物学杂志, 24 (4): 45~48

谢为龙, 谭群英(1994). 影响大花蕙兰试管苗培育的因素研究. 四川农业大学学报, 12 (2): 231~234

杨玉珍, 孙廷(2002). 大花蕙兰组织培养和快速繁殖技术研究. 北京林业大学学报, 24 (2): 86~88

朱艳, 胡军(2000). 大花蕙兰快速繁殖技术研究. 中国野生植物资源, (6): 57~59