

玉花兰绿芽分化及生根的组织培养条件研究

金花¹, 朴炫春¹, 廉美兰^{1*}, 杨金凤¹, 朴美英²

(1. 延边大学农学院园艺系, 吉林龙井 133400; 2. 吉林省龙井市老头沟农业技术推广站, 吉林龙井 133400)

摘要 以玉花兰的根状茎为外植体, 研究了引起玉花兰根状茎绿芽分化的各种因素。结果表明: Hyponex-2 培养基有利于玉花兰绿芽的分化, 而且诱导芽数多, 生长良好。6-BA 促进绿芽的形成, 且在浓度为 4 mg/L 时效果最佳; 选择根状茎的上部作为外植体时, 绿芽分化较好; 在绿芽分化阶段, 采用 400 lx 的光照条件培养比较适宜; Hyponex-2 培养基中添加浓度为 1.0 mg/L 的 NAA 有利于根的诱导, 同时也能促进地上部的生长发育。

关键词 玉花兰; 组织培养; 根状茎; 绿芽; 生根

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)02-00376-02

Study on Culture Conditions of Shoot Differentiation and Rooting of *Cymbidium niveo-maginatium*

JIN Hua et al (Department of Horticulture, Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

Abstract Factors in rhizome differentiation of *Cymbidium niveo-maginatium* were studied in this paper. The results showed that shoot formation was favorable in Hyponex-2 (N:P:K=20:20:20) medium and mass shoots were found in this medium. Moreover, BA 4 mg/L in Hyponex-2 medium and 400 lx of light intensity promoted shoot formation of *Cymbidium niveo-maginatium*. During rooting stage, NAA 1.0 mg/L was suitable for rooting and shoot growth.

Key words *Cymbidium niveo-maginatium*; Tissue culture; Rhizome; Shoot; Rooting

玉花兰 (*Cymbidium niveo-maginatium*) 种子常规播种难以萌发, 故一般以分株繁殖为主, 然而 1 株健壮的兰花每年只能长出 1 至数个芽, 繁殖系数低^[1]。同时由于长期无性分株繁殖, 带病毒植株逐年增多, 导致品种退化, 影响了兰花地观赏价值和经济价值^[2]。利用植物组织培养技术可有效地克服病毒积累, 大大提高繁殖系数, 近年来植物组培技术已成为兰花生产的主要技术手段^[3]。为此, 笔者以玉花兰的根状茎作为试材, 探讨根状茎分化绿芽和绿芽生根的影响因子, 旨在为玉花兰扩繁体系的完善提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 取玉花兰即将开裂的蒴果在浓度为 75% 的酒精中浸泡 1 min, 再用浓度为 0.1% 的 HgCl₂ 溶液消毒 15 min 后, 用无菌水冲洗 5~6 次, 在超净工作台上剖开蒴果, 均匀播种于 1/2 MS 固体培养基中。90 天后形成原球茎, 将形成的原球茎接种于 MS+NAA 0.5 mg/L 的固体培养基中, 在温度为 (25±2) °C, 相对湿度为 70%, 光照强度为 1 600 lx, 每天光照 16 h 条件下培养, 进一步诱导根状茎。待根状茎长至 3~4 cm 时, 将其切成 1 cm 长, 作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 绿芽分化。将 50 ml 的培养基注入 200 ml 的柱状瓶中, 用铝箔纸封住瓶盖后, 在温度为 120 °C, 压力为 1.2 kg/cm² 的条件下高压灭菌 15 min。将根状茎切成 1 cm 长接种。

1.2.1.1 培养基种类试验。将根状茎接种于 MS (Murashige-Skoog)、KC (Knudson C)、VW (Vacin&Went)、Hyponex-1 (Hyponex 3 g [N:P:K=7:6:19]+peptone 4 g) 和 Hyponex-2 (Hyponex 3 g [N:P:K=20:20:20]+peptone 4 g) 等 5 种不同培养基中, 各种培养基中均附加 6-BA 5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L, pH 值均为 5.0。

1.2.1.2 6-BA 浓度试验。基本培养基为 Hyponex-2 培养基,

并加入蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L (pH 值为 5.0), 6-BA 浓度处理为 2、4、6、8 mg/L, 以未加 6-BA 处理为对照。

1.2.1.3 光照强度试验。将根状茎外植体接种于 Hyponex-2+BA 4 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L (pH 值为 5.0) 培养基中, 在光照强度分别为 0、400、1 600 lx 的条件下培养。

1.2.1.4 根状茎接种部位。将根状茎按上部(生长点)、中部、底部分别切成 1 cm 长, 分别接种于绿芽分化培养基中 Hyponex-2+BA 4 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L (pH 值为 5.0) 培养。

1.2.2 生根培养。在 Hyponex-2+BA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+7.0 g/L 琼脂+1.0 g/L 活性炭 (pH 值为 5.0) 培养基中, 分别加入浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/L NAA, 对照未加任何生长调节剂。将已诱导出 1 到数个绿芽的根状茎分别接入 200 ml 的柱状瓶 (培养基量为 50 ml) 进行培养。

1.2.3 培养条件。所有试验处理均接种 5 瓶作为重复, 每瓶 6 个外植体。培养温度为 (25±2) °C, 相对湿度为 70%, 光照强度为 1 600 lx, 每天光照 16 h。培养 60 d 后进行调查。

数据分析利用 SAS (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) 程序, 采用邓肯氏新复极差法进行比较。

2 结果与分析

2.1 绿芽分化

2.1.1 培养基种类的筛选 (表 1)。从表 1 可以看出, 培养基的种类对玉花兰绿芽分化数、绿芽鲜物重和干物重均有影响。从根状茎诱导出的绿芽数在 Hyponex-2 培养基中为 4.4 个, 显著多于其他培养基处理, 其次是 MS 培养基处理 (3.7 个), 最少的是 KC 培养基处理, 仅发生 1.9 个绿芽。在 Hyponex-2 中, 绿芽的鲜物重及干物重显著好于其他处理,

表 1 不同培养基对玉花兰绿芽分化和生长的影响

培养基种类	绿芽分化数 个/外植体	鲜物重 mg/外植体	干物重 mg/外植体
MS	3.7 b	30.8 b	4.5 b
KC	1.9 c	23.3 c	3.6 d
VW	2.1 c	30.5 b	3.8 cd
Hyponex-1	2.4 c	33.6 b	4.3 bc
Hyponex-2	4.4 a	47.5 a	5.6 a

注: 同列不同小写字母表示在 0.05 水平上有差异。下同。

基金项目 国家自然科学基金委资助项目 (30560094); 国家教育部重点基金项目 (205035)。

作者简介 金花 (1979-), 女, 吉林龙井人, 硕士, 从事组织培养研究。
* 通讯作者。

收稿日期 2006-10-17

在 KC 培养基中绿芽生长最差,其鲜物重仅为 Hyponex-2 培养基处理的 50%。

将已诱导的绿芽按大小分类后,调查绿芽分化率,发现所有培养基中绿芽分化率均达到 100%,但各处理中所诱导出的绿芽大小不同(图 1)。Hyponex-2 培养基中,中型(0.2~0.4 mm)绿芽分化率最高,而大型(≥ 0.4 mm)和小型(≤ 0.2 mm)发生率低;MS 培养中,小型绿芽最多,其诱导率为 63.6%,而大型的仅为 2.3%;VW 中,大型绿芽所占比重较大,然而这些绿芽却有黄化现象发生。

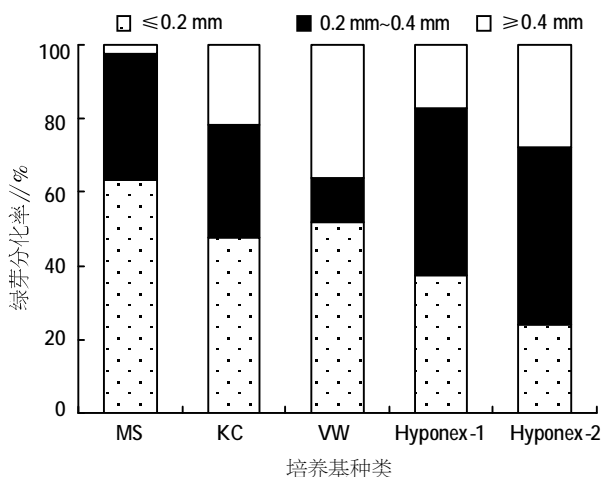


图 1 不同培养基种类对绿芽分化率的影响

2.1.2 6-BA 对绿芽分化的影响。在 Hyponex-2 培养基中添加不同浓度的 6-BA, 结果发现不同浓度的 6-BA 对绿芽分化数、绿芽鲜物重、干物重及干物质含量都有影响(表 2)。从表 2 可以看出,绿芽分化数在 6-BA 0~4 mg/L 时,随着浓度升高呈增加的趋势,而且不添加 6-BA 不形成绿芽,但 6-BA 浓度高于 6.0 mg/L 时绿芽数有下降的趋势;在 6-BA 浓度低于 6 mg/L 时,绿芽的直径也随浓度的增加而增加,但浓度为 4、6、8 mg/L 处理之间在 0.05 水平上无差异。在 6-BA 浓度为 4、6、8 mg/L 处理间绿芽的鲜物重在 0.05 水平上无差异,显著优于 2 mg/L 的 6-BA 处理,干物重和干物质含量则是浓度为 4 mg/L 的 6-BA 处理最佳。在培养过程中,当 6-BA 浓度过高时(8 mg/L),绿芽出现部分肥大现象。

表 2 6-BA 对玉兰花绿芽分化及生长的影响

6-BA mg/L	绿芽分化数 个/外植体	绿芽直径 mm	鲜物重 mg/外植体	干物重 mg/外植体	干物率 %
0	-	-	-	-	-
2	1.8 c	3.3 b	28.4 b	4.0 bc	14.1
4	3.4 a	3.9 ab	43.6 a	6.8 a	15.5
6	3.1 ab	4.3 a	50.2 a	4.8 bc	9.4
8	2.5 bc	3.7 ab	50.3 a	4.9 b	9.8

注:“-”表示因无绿芽分化而未调查。

2.1.3 光照强度对玉兰花发芽分化与生长的影响(表 3)。由表 3 可知,所有光照处理分化出来的绿芽大小均在 2~3 cm。在黑暗中根状茎的头部肿胀、发白,不宜形成绿芽;而在 1 600 lx 光照下所诱导出来的绿芽虽然在数量、鲜物重和干物重都显著优于黑暗条件和 400 lx 处理,但诱导出的绿芽发黑,分布不整齐,几乎所有的绿芽都集中在根状茎的前端,不利于生长;而在 400 lx 光照中培养根状茎所诱导出的绿芽鲜嫩、饱满,出芽整齐,生长比较良好。

2.1.4 根状茎不同部位对绿芽分化的影响(表 4)。从表 4 可

表 3 光照强度对玉兰花绿芽分化与生长的影响

光照强度 // lx	绿芽分化数 个/外植体	鲜物重 mg/外植体	干物重 mg/外植体
0	0.7 b	70.67 c	9.60 c
400	5.2 a	159.58 b	14.10 b
1 600	5.2 a	187.38 a	30.35 a

表 4 根状茎不同部位对绿芽分化及生长的影响

根状茎部位	绿芽数 个/外植体	鲜物重 mg/外植体	干物重 mg/外植体
上部	3.8 a	166.5 a	20.3 a
中部	1.8 b	90.1 b	10.9 b
底部	1.2 b	61.9 b	7.7 b

以看出,在含生长点的根状茎上部所诱导的绿芽数为 3.8 个,明显多于中部(1.8)和底部(1.2),绿芽鲜物重和干物重为中部的 1.8 和 1.9 倍,是基部的 2.7 和 2.6 倍,其效果非常显著。

2.2 生根培养(表 5、6) 由表 5 可知:随着 NAA 浓度的增加,诱导出的根的数量及长度也随之增加。当 NAA 浓度为 1.0 mg/L 时所诱导的根数、大小均达到最高值,分别为 1.3 个和 6.8 mm;当 NAA 浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/L 时,根数显著优于对照,而此 3 个处理间在 0.05 水平上无差异。对于根的鲜物重及干物重,在添加 NAA 处理显著大于对照,但不同浓度 NAA 处理间在 0.05 水平上无差异。从生根率来看,在不加 NAA 的情况下也能生根,但是根的发生率偏低,仅为 44%,根的发生率随 NAA 浓度呈增高的趋势,NAA 浓度为 1.0 和 2.0 mg/L 时根的发生率可达 89%。

表 5 NAA 浓度对玉兰花根的诱导与根生长的影响

NAA mg/L	根数 个/外植体	根长 mm	根鲜物重 mg/外植体	根干物重 mg/外植体	生根率 %
0	0.5 b	4.9 b	12.0 b	1.5 b	44.0
0.5	1.2 b	5.5 b	39.5 ab	3.1 ab	77.8
1.0	1.3 a	6.8 a	52.9 a	5.6 a	89.1
2.0	1.0 a	6.8 a	39.5 ab	3.9 ab	88.9

由表 6 可知,从绿芽中长出植物体时 NAA 浓度对植物体数的增加不起作用,NAA 浓度超过 1.0 mg/L 时反而对植物体数有抑制作用;NAA 对株高的促进效果明显,但 NAA 浓度为 0.5~2.0 mg/L 时,浓度的高低对株高不起作用。NAA 不影响地上部鲜物重,而对于干物重,NAA 浓度为 1.0 和 2.0 mg/L 时为最好。

表 6 生根培养中不同浓度 NAA 对地上部生长的影响

NAA // mg/L	苗数 个/外植体	株高 // mm	鲜物重 mg/外植体	干物重 mg/外植体
0	3.7 a	4.6 b	259.8 a	30.9 b
0.5	3.4 ab	5.5 ab	337.6 a	31.4 b
1.0	3.2 ab	6.8 a	309.8 a	44.6 a
2.0	2.5 b	6.7 a	302.2 a	44.0 a

3 结论与讨论

玉兰花的组织培养是有效的解决其繁殖系数低,不能进行规模化生产的重要途径。该试验对影响玉兰花根状茎绿芽分化的一些因素进行了研究,发现玉兰花在绿芽分化过程中,在 Hyponex-2 培养基中,不论是绿芽分化的数量,还是生长状态都显著优于其他培养基处理。因此,选用 Hyponex-2 培养基适宜于玉兰花绿芽分化培养。在 Hyponex-2 培养基中添加 4 mg/L 的 6-BA 有利于玉兰花根状茎的绿芽的分化。在 400 lx 的光照下,不但促进根状茎绿芽的诱

(下转第 379 页)

(上接第 377 页)

导,而且其生长情况也非常良好。该结果与钟士传等人在关于大花蕙兰的组织培养研究中的结果相同^[3]。丁兰等人报道,降低细胞分裂素浓度或适量增高生长素浓度能促进绿芽分化,尤其在无生长调节剂的培养基上,圆球茎分化率极高,很快均匀分化出苗和根^[4]。这与该试验的结果有所不同。玉花兰已经分化的绿芽在转入生根培养基后,虽然在无生长调节剂培养基上也能生根,但发生率较低,地上部的生长也不佳,而添加 1.0 mg/L 的 NAA 的处理有利于根的诱导及

地上部的发育。至于其他细胞分裂素,如激动素、噻苯隆、玉米素等的影响还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 卢思聪.兰花栽培入门[M].北京:科学出版社,1998.
- [2] 罗林会,曹小路,董毅.兰花植物组织快繁研究[J].遵义科技,2003,31(3):13-15.
- [3] 钟士传,郑亚琴,王侠礼,等.大量元素、生长调节剂和糖对大花蕙兰组织培养的影响[J].中国农学通报,2000,16(3):48-50.
- [4] 丁兰,梁桂霞,傅华龙.卡特丽亚兰的组织培养与快速繁殖的研究[J].四川大学学报:自然科学版,2001,38(1):106-110.