

墨兰原球茎生长的研究

陈丽 潘瑞炽* 陈汝民

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

摘要 以墨兰种子胚经培养诱导萌发形成的原球茎为材料, 研究其生长的最适条件。结果表明: 最佳基本培养基是MS培养基; NAA 0.5 mg L^{-1} +BA 1.0 mg L^{-1} 有利于生长和分化; 在培养基中加入1%蔗糖和0.1%活性炭最有利于原球茎生长; pH5.0偏酸环境适合于生长; 每天给予 $15.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 16 h的光照最佳。如将上述单因子组合在一起, 其原球茎鲜重增长率比对照(MS培养基)高46%。在不同切割方式中, 掰开法鲜重增长率比纵切法或横切法都高。

关键词 墨兰; 原球茎; 组织培养

中图分类号 Q944.6

EFFECTS OF MEDIA, GROWTH REGULATORS AND DIVIDING ON THE GROWTH OF *CYMBIDIUM SINENSE* PROTOCORMS CULTURED *IN VITRO*

Chen Li Pan Ruichi Chen Rumin

(Biology Department, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract The optimal culture conditions of the growth of *Cymbidium sinense* protocorms induced from embryo were studied. The results showed that MS was the best basal medium for *C. sinense* protocorm growth and organogenesis. Treatment of 0.5 mg L^{-1} NAA in combination with 1.0 mg L^{-1} BA was most satisfactory for protocorm growth. When 1% sucrose and 0.1% activated carbon were added to the basal medium, a superior growth of protocorms was observed. Highest increase of the fresh weight of protocorms was at pH 5.0. Protocorms grew well under $15.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensity for 16 hours per day. Combined treatment with all optimal single factors mentioned above showed that the fresh weight of protocorms was 46% higher than that of the control. As for the increase of proliferation coefficient, dividing the protocorms by hands gave good result in cutting manner.

Key words *Cymbidium sinense*; Protocorm; Tissue culture

有关兰花原球茎的形态变化^[1-3]及其生长对外界条件的要求^[4-6]已有一些研究, 但都是以建兰和 *Cymbidium* 杂交种为材料。近年来, 我们先后报道墨兰原球茎细胞器发育情况^[7]和镧对墨兰根状茎生长的促进作用^[8], 但迄今尚无墨兰原球茎生长的报道。本试验研究墨兰原球茎生长变化, 寻找其最适宜的培养条件及提高其繁殖系数的方法, 为墨兰组培苗进入工厂化生产提供依据。

* 通讯联系人。

1 材料和方法

原球茎的获得 供试材料为墨兰栽培种“企黑”(Cymbidium sinense cv Qihei)。原球茎用组织培养方法使种子萌发获得。培养基用改良 MS, 固体静止培养, 培养温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 照光时间 12 h d^{-1} , 经过 3-6 个月的后熟阶段萌发形成。选取生长均匀、大小直径约为 1 mm 的原球茎为试验材料。

原球茎生长速度和形态的观察 原球茎的生长速度以鲜重表示。取培养一定时间的原球茎, 去净表面琼脂, 用滤纸吸干水分后, 于 1/1000 电子天秤称重, 按周俊彦等的方法^[1] 计算增殖速度。在显微镜下观察原球茎在不同阶段中的形态变化。

单因子试验 以 MS, Miller, White, B₅ 和 N₆ 等培养基做试验, 以确定最佳基本培养基。在最佳基本培养基上分别加入属于生长素类的 IAA、NAA 和 2,4-D 及属于细胞分裂素类的 BA、ZT 和 KT 等 6 种植物激素, 浓度为 $0.2-2.0 \text{ mg L}^{-1}$; 选取生长素类及细胞分裂素类中的最佳种类和浓度, 进一步配比, 取得最佳激素配比和浓度。蔗糖筛选浓度是 0-3%, pH 筛选范围为 4.0-7.5, 活性炭筛选范围为 0-2%。在其他单因子筛选时, 蔗糖浓度、pH 及活性炭分别保持在 2%, 5.8 及 0.5%。每天分别给予 0、2、4、8、10、12、16 或 24 h 光照及 4.85、5.50、7.0、10.5 或 $15.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照强度, 以筛选最佳光照时间和光照强度。

组合试验 将筛选出的各个单因子的最佳浓度或光照时间、强度组合在一起, 与其各自最佳单因子相比, 观察其对原球茎生长的影响。

切割方式对原球茎生长的影响 将丛生型或根茎型的原球茎以掰开、横切和纵切的方式切割。40 d 后观察其成活率及增殖系数。

以上各种试验每瓶接种 0.1 g 左右, 每组处理至少 4 次重复, 至少两次平行测定。实验结果进行统计学处理。

2 结果和分析

2.1 培养基种类

在不同培养基上培养的原球茎, 其鲜重增长百分率有显著差异。培养 20 d, B₅ 培养基上的原球茎增长较快; 40 d 时, MS 培养基则更有利于原球茎生长, 比 B₅ 高 35% (表 1)。B₅ 培养基的铵盐浓度较低, 而 MS 培养基的离子(硝酸盐、钾盐和铵盐)含量高, 属于高盐低水势的培养基, 可保证组织生长所需要的矿质营养。因此, 本试验选用 MS 培养基为基本培养基。

2.2 原球茎生长和分化

原球茎接种在 MS 培养基后, 前期生长较慢, 每瓶 (0.1 g) 平均每天增加鲜重 0.5 mg; 40 d 后生长加快, 平均每天增重 2.5 mg; 140 d 后生长速度又降低。前期鲜重增加较慢是原球茎接种后的诱导适应过程, 而后期较慢是因培养基营养成分

表 1 不同培养基对墨兰原球茎生长的影响

Table 1 Effects of different media on protocorm growth of *C. sinense*

培养基 Medium	原初鲜重	培养 20 d Culture for 20 d		培养 40 d Culture for 40 d	
	Initial fresh weight (g)	鲜重 FW (g)	增长率 (%) Increase	鲜重 FW (g)	增长率 (%) Increase
MS	0.202	0.263 ± 0.03	30	0.483 ± 0.03	139
Miller	0.195	0.259 ± 0.05	33	0.398 ± 1.00	104
B ₅	0.210	0.288 ± 0.01	37	0.428 ± 0.07	104
N ₆	0.216	0.260 ± 0.01	20	0.298 ± 0.02	38
White	0.180	0.216 ± 0.03	20	0.250 ± 0.04	39

逐渐减少。由于原球茎分生能力很强, 如果继代培养则可无限增殖。

从图版可见, 墨兰原球茎在生长发育过程中, 形态也发生较明显的变化。接种时为圆球形(图版 I:1), 之后形成类似桑果状的球状突起, 大部分处于丛生型原球茎(图版 I:2), 而小部分某些突起拉长较快, 形成条状的根状茎(图版 I: 3,4), 根状茎前端进一步分化出芽(图 I: 5), 生根, 形成完整植株(图版 I: 6)。这样就建立了墨兰的无性系。丛生型原球茎易增殖, 根状茎易分化。

2.3 影响原球茎生长的外界条件

不同植物激素对原球茎生长有一定的影响。培养 20 d 后, 附加 0.5 mg L^{-1} NAA 和 BA 的原球茎鲜重增长率分别比对照(MS 培养基)高 5% 和 26%; 而培养 40 d 后, 则分别高 12% 和 26%; 0.5 mg L^{-1} IAA、2,4-D 及 KT 处理的原球茎鲜重增长率反而低于对照(表 2)。我们进一步研究 NAA 和 BA 在 $0-2 \text{ mg L}^{-1}$ 浓度范围内对原球茎生长的影响, 发现 NAA 的最适浓度是 1.0 mg L^{-1} , 而 BA 为 0.5 mg L^{-1} (图 1)。原球茎培养基需要生长素类和细胞分裂素类。试验得知, 0.5 mg L^{-1} NAA + 1.0 mg L^{-1} BA 处理的生长和分化都最快, 0.5 mg L^{-1} NAA + 0.5 mg L^{-1} BA 处理也较好(图 2)。

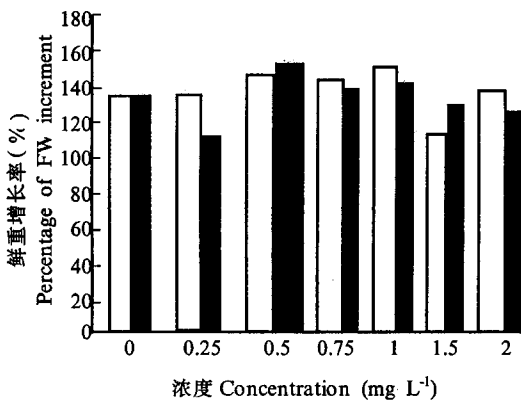


图 1 NAA 及 BA 对墨兰原球茎生长的影响(培养 40 d)

Fig. 1 Effects of NAA or BA on protocorm growth of *C. sinense* cultured for 40 days

□ NAA ■ BA

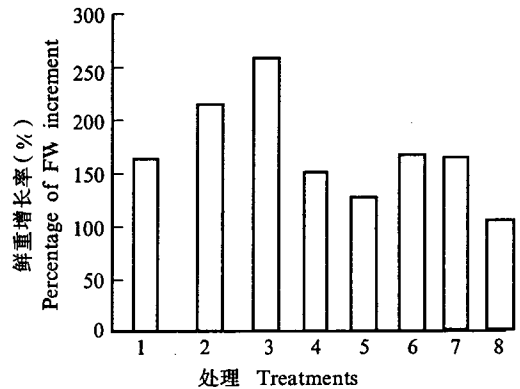


图 2 NAA 和 BA 组合对墨兰原球茎生长的影响(培养 40 d)

Fig. 2 Effects of NAA in combination with BA on protocorm growth of *C. sinense* cultured for 40 d

1. Control; 2. NAA 0.5 mg L^{-1} + BA 0.5 mg L^{-1} ; 3. NAA 0.5 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} ; 4. NAA 0.5 mg L^{-1} + BA 2.0 mg L^{-1} ; 5. NAA 1.0 mg L^{-1} + BA 0.5 mg L^{-1} ; 6. NAA 1.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} ; 7. NAA 1.0 mg L^{-1} + BA 2.0 mg L^{-1} ; 8. NAA 2.0 mg L^{-1} + BA 4.0 mg L^{-1} .

在处理 20 d 或 40 d 的调查发现, 培养基中 1.0% 蔗糖处理的原球茎生长最快, 1.5% 次之, 0.5% 和 2.0% 最差。

添加 0.05% - 0.5% 活性炭都可促进墨兰原球茎生长。培养 40 d 后观察, 0.1% 活性炭处理的原球茎生长最快, 比对照快 30%, 0.2% 和 0.05% 次之, 1% 处理则抑制生长。

墨兰原球茎培养在 pH4.0 - 7.0 条件下, 40 d 后, pH5.0 处理的原球茎鲜重增长最多, 比对照(MS 配方的 pH5.8)多 31%, pH5.5 次之, 而 pH4.5 则与对照一样, 当 pH4.0 和 pH7.0

时则明显抑制生长(表3)。

墨兰原球茎在黑暗条件下仍能增加鲜重,但发生白化,不能继续增殖。随着光照时间的增加,原球茎生长加快。培养20 d后调查,16 h d⁻¹处理生长最快,比对照(12 h d⁻¹)高18%,24 h d⁻¹处理的原球茎翠绿色,比对照生长快12%。从增长快和节省电力来看,每天光照16 h是可以的。

在4.85–15.5 μmol m⁻²s⁻¹光照强度范围内,原球茎生长随光照加强而加快。15.5 μmol m⁻²s⁻¹处理原球茎增长率较4.85 μmol m⁻²s⁻¹处理的高45%。光照继续增大,是否有利于原球茎生长,有待进一步试验。

如果把以上各单因子试验的最佳处理组合在一起,对原球茎生长的影响又如何?从表3可见,组合处理(MS+1%蔗糖+NAA 0.5 mg L⁻¹+BA 1.0 mg L⁻¹+0.1%活性炭, pH5.0,光照16 h d⁻¹,光强15.5 μmol m⁻²s⁻¹)40 d后的原球茎,其增长率比对照(MS)高46%,比各最佳单因子试验高17%–27%。培养时间越长,组合处理的效果越明显(图3)。我们认为,本组合处理的配方适用于培养墨兰原球茎。

2.4 切割方式

为了增加原球茎增殖系数,我们研究不同切割方式对原球茎生长和增殖的影响。切割后培养40 d调查结果表明,掰开方式的原球茎损伤程度小,成活率高,繁殖系数达4.0–5.0,即每一原球茎可掰为4–5个小个体,生长良好,总鲜重比原初原球茎增长102%,比对照(未切割)高40%。而横切或纵切的原球茎易褐化,影响生长,鲜重基本与对照一致。如果横切加纵切,

表2 不同植物生长调节剂(0.5 mg L⁻¹)对墨兰原球茎生长的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators (0.5 mg L⁻¹) on protocorm growth of *C. sinense*

生长调节剂 Growth regulator	原初鲜重 Initial fresh weight (g)	培养 20 d Culture for 20 d		培养 40 d Culture for 40 d	
		鲜重 FW (g)	增长率 (%) Increase	鲜重 FW (g)	增长率 (%) Increase
MS(control)	0.195 ± 0.04	0.300 ± 0.04	54	0.444 ± 0.12	128
NAA	0.168 ± 0.02	0.268 ± 0.04	59	0.401 ± 0.10	140
IAA	0.189 ± 0.03	0.290 ± 0.07	53	0.393 ± 0.12	108
2,4-D	0.244 ± 0.07	0.367 ± 0.07	51	0.435 ± 0.06	78
BA	0.186 ± 0.04	0.311 ± 0.02	80	0.466 ± 0.08	154
ZT	0.183 ± 0.03	0.293 ± 0.00	61	0.357 ± 0.05	96
KT	0.188 ± 0.04	0.263 ± 0.06	40	0.282 ± 0.08	50

表3 不同处理对墨兰原球茎生长的影响

Table 3 Effects of different treatments on protocorm growth of *C. sinense*

处理 Treatment	原初重量 Initial fresh weight (g)	培养 40 d 后重量 FW cultured for 40 d (g)	增长率 Increase (%)
MS (control)	0.132 ± 0.03	0.313 ± 0.08	138
MS+NAA 0.5 mg L ⁻¹ + BA 1.0 mg L ⁻¹	0.126 ± 0.02	0.314 ± 0.06	149
MS+Sucrose 1.0%	0.132 ± 0.01	0.325 ± 0.06	146
MS+Activated carbon 0.1%	0.132 ± 0.02	0.309 ± 0.05	154
MS (pH 5.0)	0.119 ± 0.01	0.298 ± 0.05	150
组合处理 Combined treatment*	0.132 ± 0.03	0.375 ± 0.04	184

*组合处理 Combined treatment: MS+NAA 0.5 mg L⁻¹+BA 1.0 mg L⁻¹+1% sucrose+0.1% activated carbon, pH 5.0, light intensity at 15.5 μmol m⁻²s⁻¹ for 16 h per day.

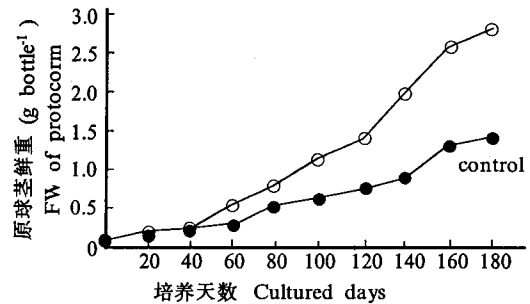


图3 组合处理对墨兰原球茎生长的影响

Fig. 3 Effects of combined treatment on protocorm growth of *C. sinense*

Combined treatment=MS+1% sucrose+0.5 mg L⁻¹ NAA+1 mg L⁻¹ BA+0.1% activated carbon at 5.0 pH, 15.5 μmol m⁻²s⁻¹ for 16 h d⁻¹.

损伤更大, 其鲜重增长远不如对照(表4)。

3 讨论

Kusumoto^[3]曾将兰属47个杂交种的原球茎的器官建成(如分化快慢、根状茎形成与否、增殖系数高低等)分为8类。而本研究表明, 墨兰原球茎首先增殖为丛生型, 然后有些丛生型转变为根状茎型, 进一步分化出根、芽, 与建兰原球茎增殖方式相同^[10], 而与Kusumoto提出的8个类型都不同。

用于兰属原球茎诱导增殖的培养基, 国内常用修改MS, White和VW等配方^[2,11], 国外常用Knudson C, MS, Kyoto等配方^[1,12,13]。最适培养基因品种而异。例如春兰需要无机盐含量低的培养基, 而蕙兰则要求无机盐含量高的培养基。墨兰原球茎在我们选用的几种培养基上均能生长, 但以高盐的MS配方最好, 表明墨兰喜在高盐的基质中生长。

植物激素影响兰属原球茎生长。Kusumoto^[3]报告2,4-D, KT, GA₃+NAA有助于兰属杂交种原球茎生长, 2,4-D+GA₃有利芽的生长, GA₃+NAA有利根的形成。Paek^[6]发现NAA和KT促进兰属原球茎生长。何嵩等^[4]观察到加入乙烯抑制剂硝酸银可提高春兰和墨兰杂交种根状茎的分化。孙安慈等^[10]报道NAA和BA可促进建兰根状茎增殖。本试验结果也认为NAA和BA有利于墨兰根状茎增殖。

蔗糖作为培养基中的能源物质和渗透调节剂, 对原球茎的生长影响较大。有认为2%蔗糖对兰属原球茎生长最好^[4]; 有认为2%—3%蔗糖促进芽的形成, 而根的分化和生长则以5%蔗糖最合适^[5]。本试验表明, 1%—1.5%的蔗糖浓度已满足墨兰原球茎的快速生长需要。如果长期培养, 可适当加大蔗糖的用量。

一般认为, 活性炭可吸附培养过程中外植体分泌的酚类物质, 防止褐化, 有利细胞生长; 但活性炭同时也吸附培养基中的其它成份, 特别在高浓度时。Paek^[6]报道原球茎在0.1%—0.5%活性炭中生长最好, 本试验亦有类似的结果。

pH影响细胞透性、代谢和培养物的生长和分化, 原球茎在偏酸的环境下生长最好。本实验证实墨兰原球茎在pH5.0—5.5环境中生长最好, 过酸或近中性都不合适, 与Kusumoto^[4]的结论一致。

切割方式影响原球茎的繁殖系数。本研究认为掰开方式最有利墨兰原球茎生长, 这点与春兰的结果一致^[6]。可是Amaki等^[17]认为, 杂种兰原球茎纵切可促进苗的形成。这可能是品种不同的结果。

参考文献

- 1 王熊. 地生兰(*Cymbidium*)个体发生途径的研究. 植物生理学报, 1990, 16(3):246—270
- 2 王熊, 陈季楚, 刘桂云等. 建兰和秋兰原球茎的发生及其无性系的建立. 植物生理学报, 1981, 7(2):203—207

表4 不同切割方式对墨兰原球茎增殖的影响

Table 4 Effects of protocorm cutting manner on the growth of *C. sinense*

切割方式	原初鲜重	培养40 d后重量	增长率
Cutting manner	Initial fresh weight (g)	FW cultured for 40 d (g)	Increase (%)
对照 Control	0.110 ± 0.01	0.189 ± 0.02	72
掰开 Dividing by hands	0.103 ± 0.01	0.208 ± 0.02	102
横切 Transverse cutting	0.109 ± 0.00	0.191 ± 0.02	75
纵切 Longitudinal cutting	0.108 ± 0.00	0.168 ± 0.01	55
横切加纵切 Transverse and longitudinal cutting	0.118 ± 0.01	0.169 ± 0.06	43

- 3 Kusumoto M. Interform variation of the proliferation, organogenesis and effects of growth regulating substances on *Cymbidium* protocorms cultured *in vitro*. J Japan Soc Hort Sci, 1980, 48(4):510-518
- 4 Kusumoto M. Effects of coconut milk, agar, and sucrose concentrations, and media pH on the proliferation of *Cymbidium* protocorm-like bodies cultured *in vitro*. J Japan Soc Hort Sci, 1980, 48(4):503-509
- 5 Paek K Y, Chun C K. Effect of pH on the organogenesis and nutrient uptake through *Cymbidium* protocorm culture. Korean J Plant Tissue Cult, 1985, 12(2):1-7
- 6 Paek K Y. Physiological characteristics of *Cymbidium* protocorm cultured *in vitro*. II Effects of several substances on organogenesis and subsequent growth of protocorm. Korean J Plant Tissue Cult, 1983, 10(1):27-35
- 7 罗虹, 陈汝民. La^{3+} 对墨兰根状茎某些细胞器发育的影响. 热带亚热带植物学报, 1996, 4(3):56-59
- 8 陈汝民, 罗虹, 叶庆生等. La^{3+} 对墨兰根状茎发育的调节作用. 植物学报, 1997, 39(5):483-485
- 9 周俊彦, 郭扶兴. 植物快速营养繁殖中繁殖速度及产率的计算. 植物学通报, 1991, 8(2):60-63
- 10 孙安慈, 任玲, 王伏雄. 建兰根状茎增殖条件的研究. 植物学通报, 1989, 5(3):147-150
- 11 王熊. 兰花生长发育规律的探讨. 山东农业大学学报, 1988, 19:19-24
- 12 Kusumoto M, Furukawa J. Effect of organic matter on the growth of *Cymbidium* protocorms cultured *in vitro*. J Japan Soc Hort Sci, 1997, 45(4):421-426
- 13 Kusumoto M. Effect of combination of growth regulating substances, and of organic matter on the proliferation and organogenesis of *Cymbidium* protocorms cultured *in vitro*. J Japan Soc Hort Sci, 1978, 47(3):391-440
- 14 何嵩, 卢思聪, 杜立群等. 从春兰和墨兰杂交的根状茎诱导再生植株. 植物学通报, 1994, 11(增刊):58-59
- 15 Paek K Y, Chun C K. Physiological characteristics of *Cymbidium* protocorm cultured *in vitro*. III Effects of temperature, sucrose concentration, and physical condition of medium on organogenesis of protocorm. Korean J Plant Culture, 1983, 10(1):33-44
- 16 张菊野, 俞玲凤, 连宏坤. 几种影响春兰原球茎生长与分化的因素. 植物生理学通讯, 1993, 29(3):175-178
- 17 Amaki W, Haguchi H. Effect of dividing on the growth and organogenesis of protocorm-like bodies in *Doritaenopsis*. Scientia Horticulturae, 1989, 39:63-72

图版说明

墨兰原球茎生长过程的形态变化. 1. 从种子萌发的原球茎; 2. 丛生型原球茎; 3. 原球茎上不规则突起; 4. 根状茎; 5. 根状茎分化出芽; 6. 具有芽、叶和根的小苗; 7. 在培养瓶中的小苗.

Explanation of Plate

Morphological changes of protocorm of *C. sinense* during growth. 1. Protocorms from seed germination; 2. Clumped protocorms; 3. Irregular protuberances on protocorms; 4. Rhizomes; 5. Buds differentiated from the tip of rhizomes; 6. Plantlet with bud, leaves and roots; 7. A plantlet in culture bottle.