

寒兰的快速繁殖技术

朱国兵, 杨柏云*, 蔡奇英, 罗丽萍, 管毕才

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330047)

摘要: 以寒兰(*Cymbidium kanran* Makino)根状茎为外植体, 采用 B₅ 基本培养基, 并附加不同浓度的 6-BA、NAA、TDZ (苯基噻二唑基脲 -thidiazuron)和 S-3307(优康唑 -uniconazole), 对类原球茎的诱导、继代增殖、分化、生根等进行研究。结果表明: 诱导类原球茎的最佳培养基为 B₅ + TDZ 0.50 mg L⁻¹ + NAA 0.25 mg L⁻¹, 诱导率 98.3%; 继代增殖的最佳培养基为 B₅+S-3307 1.0 mg L⁻¹+ NAA 0.2 mg L⁻¹ + 蔗糖 3.5%, 增殖系数 9.4; 类原球茎分化的最佳培养基为 B₅ + S-3307 0.75 mg L⁻¹ + 6-BA 1.0 mg L⁻¹ + NAA 0.4 mg L⁻¹, 分化率 87.8%; 最佳的生根培养基为 1/2B₅ + NAA 0.2 mg L⁻¹ + 活性炭 0.05%, 生根率达 100%。

关键词: 兰花; 寒兰; 类原球茎; 快速繁殖

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)02-0151-06

Rapid Propagation of *Cymbidium kanran* Makino

ZHU Guo-bing, YANG Bai-yun, CAI Qi-ying, LUO Li-ping, GUAN Bi-cai

(College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract: Propagation of *Cymbidium kanran* Makino by using rhizomes as explants to study the effects of growth regulators on the induction, multiplication and differentiation of protocorm-like bodies (PLBs), and the rooting. The results showed that the optimal medium for induction of PLBs was B₅ containing 0.50 mg L⁻¹ TDZ and 0.25 mg L⁻¹ NAA, in which induction rate of PLBs was 98.3%, for multiplication of PLBs it was B₅ containing 1.0 mg L⁻¹ uniconazole (S-3307) and 0.2 mg L⁻¹ NAA and 3.5% sucrose, the multiplication coefficient being 9.4. For differentiation it was best on B₅ medium containing 0.75 mg L⁻¹ S-3307, 1.0 mg L⁻¹ 6-BA and 0.4 mg L⁻¹ NAA, in which the differentiation rate was 87.8%. As for rooting, 1/2B₅ supplemented with 0.2 mg L⁻¹ NAA and 0.05% active carbon, in which rooting rate reached 100%.

Key words: Orchid; *Cymbidium kanran* Makino; Protocorm-like bodies (PLBs); Rapid propagation

自从 1960 年 Morel 开创兰花快速组织培养技术以来, 兰花的快速繁殖尤其在中国兰的组织培养方法上有许多突破^[1-5]。以往关于中国兰的快繁研究多集中在对春兰、建兰、蕙兰和墨兰等组织培养, 并且建立了相应的离体快繁技术体系, 但有关寒兰的组织培养尚未见较系统的报道, 对寒兰快速繁殖技术体系建立的研究仍属空白。寒兰(*Cymbidium*

kanran Makino)叶姿碧绿清秀, 花色丰富, 香气沁人, 有较高的观赏价值和经济价值, 目前国内正悄然兴起一股寒兰热。然而寒兰传统的分株繁殖方法, 繁殖系数很低, 制约了寒兰的产业化发展。本文以寒兰种子萌发后形成的根状茎为外植体, 对类原球茎诱导、增殖、分化等进行研究, 以期对寒兰的试管苗生产技术和遗传资源的保存、开发利用提供参

收稿日期: 2005-09-19 接受日期: 2006-02-20

基金项目: 江西省农业厅重点项目资助

*通讯作者 Corresponding author

1 材料和方法

材料 以寒兰 (*Cymbidium kanran* Makino) 的种子萌发后形成的根状茎为外植体, 由南昌大学植物细胞工程实验室提供。

培养基的配制 以 B₅ 为基本培养基, 其组成及植物生长物质配比如下:

(1) 类原球茎诱导培养基: B₅ + TDZ 0–0.75 mg L⁻¹ + NAA 0.25–0.75 mg L⁻¹ (表 3);

(2) 继代增殖培养基: B₅ + S-3307 0.5–1.5 mg L⁻¹ + NAA 0.2–0.6 mg L⁻¹ + 蔗糖 2.0%–5.0% (表 1、4);

(3) 分化培养基: B₅ + S-3307 0.75–1.25 mg L⁻¹ + 6-BA 0.5–1.5 mg L⁻¹ + NAA 0.2–0.6 mg L⁻¹ (表 2、5);

(4) 生根培养基: B₅, B₅ + AC 0.05%, 1/2B₅ + AC 0.05%, 1/4B₅ + AC 0.05%, 皆附加 NAA 0.2 mg L⁻¹ 和琼脂 0.68%。以上培养基的蔗糖浓度 3.5%, pH 5.6–5.8, 121℃ 高压灭菌 20 min, 冷却备用。

类原球茎的诱导 选取来源于同一培养基上生长粗壮的根状茎, 在超净台上用解剖刀切除顶芽后, 将其切成 2 个节的根状茎段, 随机接种到表 3 的各组培养基中, 每瓶 40 个, 重复 3 次。每瓶装培养基为 40 ml, 7 d 更换一次。25 d 后统计诱导出的类原球茎数计算诱导率。诱导率 = 1/2 (诱导的类原球茎数 / 接种外植体数) × 100%。

类原球茎的继代增殖 选取 S-3307 (优康唑 - uniconazole)、NAA 和蔗糖三因素, 各取三水平 (表 1), 进行正交实验。将表 3 第 5 号培养基诱导出来的类原球茎剥离下来, 随机接种到表 4 的各组培养基中, 每瓶接种 20 个, 重复 3 次。培养基的量以及更换培养基的时间同上。60 d 后观察统计类原球茎的增殖情况。

类原球茎的分化 选取 6-BA、S-3307 和 NAA 三因子, 各取三水平 (表 2), 进行正交实验。

表 1 类原球茎增殖因素水平表

Table 1 Design of growth regulators for multiplication of protocorm-like bodies (PLBs)

水平 Level	因素 Factors		
	S-3307* (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	Sucrose (%)
1	0.5	0.2	2.0
2	1.0	0.4	3.5
3	1.5	0.6	5.0

*S-3307=uniconazole

将表 4 第 4 号培养基中簇生的类原球茎切成大小含 20–25 个类原球茎的块状体, 随机接种到表 5 的各组培养基中, 每瓶 2 块, 重复 3 次。培养基的量以及更换培养基的时间同上。60 d 后统计分析类原球茎芽的分化情况, 计算苗的分化率。苗分化率 = (分化的苗数 / 接种的类原球茎个数) × 100%。

表 2 类原球茎分化因素水平表

Table 2 Design of growth regulators for protocorm-like bodies (PLBs) differentiation

水平 Level	因素 Factors		
	6-AB (mg L ⁻¹)	S-3307* (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)
1	0.5	0.75	0.2
2	1.0	1.00	0.4
3	1.5	1.25	0.6

*S-3307=uniconazole

生根培养 当类原球茎上分化出的幼苗长到 3–4 cm 时, 将表 5 第 4 号培养基中的苗切割下来, 转接到表 6 的 4 组培养基中进行生根培养, 30 d 后观察统计苗的生根情况。

移植 将表 6 第 3 号培养基中的植株炼苗 5 d 后, 取出苗洗净粘附在根上的培养基, 在 0.5 mg L⁻¹ 的 IBA 溶液中浸 2 min, 自然晾干后, 栽植在蛭石: 腐殖土 = 2:1 的介质中, 置于 20–25℃、空气相对湿度 85% 左右的环境中养护, 定期喷洒 B₅ 大量营养元素和多菌灵以防止杂菌感染。

培养条件 类原球茎的诱导、增殖、分化为液体振荡培养, 90 r min⁻¹, 光强 18 μmol m⁻²s⁻¹; 生根培养的光强 36–45 μmol m⁻²s⁻¹。光照 14 h d⁻¹, 温度 25–27℃。

2 结果和分析

2.1 类原球茎的诱导

培养 8 d, 表 3 中 5、6 号培养基中外植体首先启动, 节上的芽点向外微凸, 白色。约 20 d 后类原球茎形成, 黄白色, 椭圆形, 米粒大小 (图版 I : 1), 1 号培养基启动最迟, 在 12 d 时才开始启动。实验结果 (表 3) 表明: 在只有激素 NAA 的 1 号培养基中, 其诱导率最低仅为 5.8%。在有 NAA、TDZ (苯基噻二唑基脲 - thidiazuron) 配合的 5、6、7 号培养基皆有较高的诱导率, 其中, TDZ 和 NAA 的浓度分别为 0.50 mg L⁻¹ 和 0.25 mg L⁻¹ 时诱导率最高, 为 98.3% ;

在没有或低浓度 TDZ 的 1、2、3、4 号培养基中,外植体因褐变死亡的数目较少,但随着其浓度的增加褐变加剧,当其浓度为 0.75 mg L⁻¹ 的 8、9、10 号培养基中外植体褐变最为严重,造成大量死亡。从图 1 可见,类原球茎诱导率在不同的 NAA 水平上皆随着 TDZ 的浓度增加而先升后降,当 TDZ 为 0.50 mg L⁻¹ 时,诱导率都达到最高值;而在 TDZ 的各个水平上,不同浓度的 NAA 对诱导率的影响不很明显(图 2)。此外,方差分析表明 TDZ 对类原球茎诱导率的影响极显著。因此,TDZ 在类原球茎的诱导中起重要的影响作用。

2.2 类原球茎的继代增殖

在培养过程中,黄白色的类原球茎逐渐转变成黄绿色,最后成为深绿色。随着类原球茎不断产生,经过几次继代培养可形成簇生的类原球茎(图版 1:2)。实验结果与直观分析(表 4)表明:4 号培养基的增殖系数最高为 9.4,此外,新增殖的类原球茎个大、体圆、色绿,生长旺盛,故增殖的最优组合为 S-3307 1.0 mg L⁻¹ + NAA 0.2 mg L⁻¹ + 蔗糖 3.5%;从极差 R 值可知,S-3307 因子对类原球茎的增殖起主要作用,其次为蔗糖,影响最小的是 NAA 因子。方差分析表明,S-3307 对类原球茎增殖的影响差异显著。

2.3 类原球茎的分化

类原球茎经过 45 d 左右的分化培养,陆续分化出根和芽,形成幼小苗(图版 1:3)。实验结果与直观分析(表 5)表明:6-BA 的浓度在 0.5-1.0 mg L⁻¹ 时,随着浓度的增加,成苗率也逐渐增加,但 6-BA 浓度超过 1.0 mg L⁻¹ 时,苗的分化受到明显抑制;4 号培

养基分化苗的速度快,苗整齐一致长势好,并且分化率最高,可达 87.8%,故分化的最优组合为 S-3307 0.75 mg L⁻¹ + 6-BA 1.0 mg L⁻¹ + NAA 0.4 mg L⁻¹;从极差 R 值分析可知,6-BA 因子对类原球茎分化成苗影响最大,其次为 NAA,影响最小的是 S-3307 因子;通过方差分析可知 6-AB 因素差异极显著,而 NAA 和 S-3307 二因素差异显著。因此,6-AB 在类原球茎分化成苗中有重要作用。

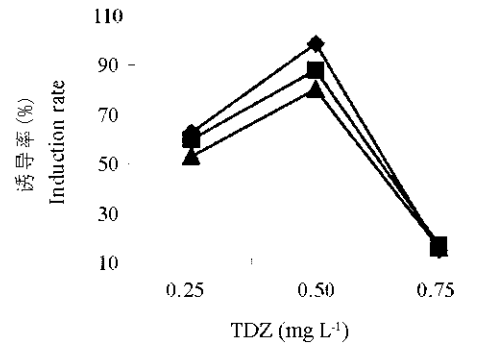


图 1 TDZ 对类原球茎诱导的影响
Fig.1 Effect of TDZ on induction rate of protocorm-like bodies

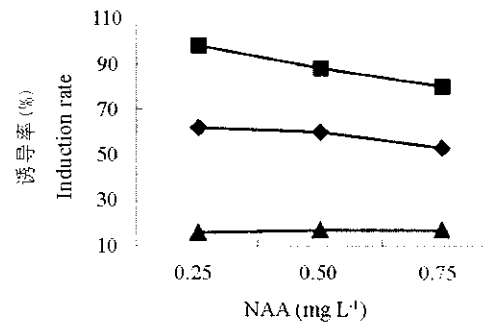


图 2 NAA 对类原球茎诱导的影响
Fig.2 Effect of NAA on induction rate of protocorm-like bodies

表 3 寒兰类原球茎诱导的结果

Table 3 Results of the induction of protocorm-like bodies (PLBs) from rhizome segments of *C. kanran*

编号 No.	TDZ (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	接种数(个) No. of inoculation	类原球茎数(个) No. of PLBs induced	褐变死亡数(个) No. of necrotic explants	诱导率 Induction rate (%)
1 (Control)	0	0.25	120	14	2	5.8
2	0.25	0.25	120	150	3	62.5
3	0.25	0.50	120	145	5	60.4
4	0.25	0.75	120	128	6	53.3
5	0.50	0.25	120	236	19	98.3
6	0.50	0.50	120	211	18	87.7
7	0.50	0.75	120	193	24	80.5
8	0.75	0.25	120	38	63	15.8
9	0.75	0.50	120	42	71	17.5
10	0.75	0.75	120	40	65	16.7

2.4 生根培养

将分化的寒兰幼苗转接到生根培养基, 经过 30 d 培养, 可以得到优质的试管苗(图版 I :4)。实验结果(表 6)表明: 由于 2 号培养基加入了 0.05% 的 AC(活性炭 -active carbon), 其平均每株的根数和生根率都有所提高。3 号培养基的生根率达到最高,

为 100%, 约为 2 号生根率的 2 倍, 此外, 3 号培养基中的植株十分健壮, 根系发达, 长势良好。4 号培养基的生根率为 93%, 同 3 号培养基相比略有降低。1 号培养基的生根率最低, 仅为 41%。由此可见, AC 的附加以及大量元素的减半对于苗的生根有利, 1/2 B₅ + NAA 0.2 mg L⁻¹ + AC 0.05% 为最佳生

表 4 类原球茎增殖试验结果

Table 4 Effects of growth regulators on the multiplication of protocorm-like bodies (PLBs)

编号 No.	S-3307 (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	Surose (%)	接种类原球茎数 (个) No. of PLBs inoculated	60 d 类原球茎数 (个) No. of PLBs after 60 d	增殖系数 Propagation coefficient
1	0.5	0.2	2.0	60	306	5.1
2	0.5	0.4	3.5	60	384	6.4
3	0.5	0.6	5.0	60	318	5.3
4	1.0	0.2	3.5	60	564	9.4
5	1.0	0.4	5.0	60	516	8.6
6	1.0	0.6	2.0	60	378	6.3
7	1.5	0.2	5.0	60	246	4.1
8	1.5	0.4	2.0	60	192	3.2
9	1.5	0.6	3.5	60	312	5.2
R	3.9	0.6	2.1			
主次顺序 Order	1	3	2			

表 5 类原球茎分化的试验结果

Table 5 Effects of growth regulators on the differentiation of protocorm-like bodies (PLBs)

编号 No.	6-BA (mg L ⁻¹)	S-3307 (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	接种类原球茎数 (个) No. of PLBs inoculated	60 d 苗数 (株) No. of shoots after 60 d	苗分化率 Differentiation rate (%)
1	0.5	0.75	0.2	125	78	62.4
2	0.5	1.00	0.4	143	100	69.9
3	0.5	1.25	0.6	142	86	60.6
4	1.0	0.75	0.4	131	115	87.8
5	1.0	1.00	0.6	134	109	81.3
6	1.0	1.25	0.2	140	105	75
7	1.5	0.75	0.6	124	62	50
8	1.5	1.00	0.2	141	67	47.5
9	1.5	1.25	0.4	148	75	50.7
R	31.8	5.0	7.8			
主次顺序 Order	1	3	2			

表 6 不同培养基对寒兰生根培养的影响

Table 6 Effects of different media on rooting of plantlets of *C. kanran*

编号 No.	培养基 Medium	苗接种数 (株) No. of shoots inoculated	60 d 总根数 (条) No. of roots after 60 d	生根率 Rooting rate (%)	平均每株根数 (条) Average root no. per plantlet
1	B ₅	86	132	41	1.5
2	B ₅ + AC 0.05%	85	162	57	1.9
3	1/2 B ₅ + AC 0.05%	80	360	100	4.5
4	1/4 B ₅ + AC 0.05%	88	299	93	3.4

根培养基。

2.5 移植

寒兰的试管苗“自生”能力弱,移栽养护难度很大,在移植过程中应尽量考虑到温度、光照、湿度、营养、移栽介质等因素对组培苗生长的影响,确保其逐渐从异养向自养顺利过渡,从而提高成苗率,本实验的移植成活率可达90%以上(图版1:5)。

3 讨论

在兰花组织培养中,原球茎(或类原球茎)的诱导几乎都需要细胞分裂素的参与,常附加6-BA^[6-8],而TDZ在原球茎诱导方面的研究尚未见报道。TDZ最初是由Scherring等作为一种棉花落叶剂而发展起来,是一种人工合成的苯基脲重氮噻唑取代衍生物。Thomas和Kafferman^[9]研究证实TDZ可诱导细胞分裂素的生物合成,并可抑制内源生长素的降解,近年来,它作为一种有效的形态发生调节剂在植物组培与快繁中得到了广泛的应用。本试验结果表明,在仅有生长素NAA的情况下,寒兰根状茎段类原球茎的诱导率极低,而附加TDZ后其诱导率显著提高,最高可达98.3%,因此,TDZ可有效地用于诱导寒兰类原球茎。

中国兰组织培养中面临的主要问题之一是如何克服褐化。植物组织培养过程中的褐变是多种因素综合作用的结果,其中植物生长物质使用不当,会使组培材料褐变,这是由于细胞分裂素(6-BA或KT)有刺激多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)活性提高的作用^[10]。TDZ作为一种高活性细胞分裂素,低浓度(0.25–0.50 mg L⁻¹)与NAA配合使用可以大大提高类原球茎的诱导率,但当浓度超过0.50 mg L⁻¹时,寒兰根状茎段的褐变程度显著加剧,造成外植体的大量死亡,这就说明TDZ是诱发褐变的一个主要因子,至于其是否与它对PPO和POD活性的影响有关则有待于进一步证实。

S-3307是一种新型高效植物生长调节剂,具有促进分蘖,强烈抑制细胞伸长,矮化植株的作用。其广泛用于小麦、水稻、油菜等大田作物,具有用量少、成本低、活性强、残留期短及对环境污染小的特点而在逐渐取代多效唑。目前,国内外在它对植物生理方面的研究较多,在组织培养方面的研究报道很少^[11],对兰花原球茎(或类原球茎)的增殖研究尚

未见报道。本研究表明,S-3307、NAA和蔗糖三个因子对寒兰类原球茎增殖影响起主要作用的是S-3307。

此外试验中还发现,植株高度2.0 cm以下的苗生根培养时,其假鳞茎顶芽便发育成细长的长满表皮毛的根状茎,并且不断地朝根状茎的途径发育,因此,进行壮苗生根培养时,宜选择株高3.0 cm以上苗为好,这对工厂化育苗有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Wang X(王熊), Cheng J C(陈季楚), Liu G Y(刘桂云), et al. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture[J]. Acta Phytophysiol Sin(植物生理学报), 1981, 7(2):203–207. (in Chinese)
- [2] Wang X(王熊). Studies on the orchid clonal propagation and floral bud differentiation by means of tissue culture [J]. Acta Phytophysiol Sin(植物生理学报), 1984, 10(4):391–395. (in Chinese)
- [3] Chou Y J. The seed germination and sterile culture of orchids [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin(西北植物学报), 1981, 1(2):55–59. (in Chinese)
- [4] Chen L(陈丽), Pan R C(潘瑞焜), Chen R M(陈汝民). Effects of media, growth regulators and dividing on the growth of *Cymbidium sinense* protocorms cultured *in vitro* [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 1999, 7(1):59–64. (in Chinese)
- [5] Duan J Y(段金玉), Xie Y H(谢亚红). Effects of hormones and seed treatment on the germination of seeds of *Cymbidium* species under sterile condition [J]. Acta Bot Yunn(云南植物研究), 1982, 4(2):197–201. (in Chinese)
- [6] Zeng S J(曾宋君), Cheng S J(程式君), Zhang J L(张京丽), et al. A study on tissue culture and rapid propagation of *Cymbidium sinense* and its hybrids *in vitro* [J]. Guihaia(广西植物), 1998, 18(2):153–156. (in Chinese)
- [7] Jia Y J(贾勇炯), Cheng F(陈放), Lin H H(林宏辉), et al. Studies on the induction and differentiation cluster-protocorm of *Cymbidium ensifolium* SW. [J]. J Sichuan Univ(Nat Sci)(四川大学学报), 1998, 35(2):258–262. (in Chinese)
- [8] Wu X X(吴晓霞), Jiang D Y(姜敦云), Cui Y H(崔月花), et al. Tissue culture and rapid propagation of *Cymbidium grandiflorum* [J]. Plant Phytophysiol Com(植物生理学通讯), 2002, 38(2):141. (in Chinese)
- [9] Thomas J C, Katterman F R. Cytokinin activity induced by thidiazuron [J]. Plant Physiol, 1986, 81: 681–683.
- [10] Wu X X(吴晓霞), Cheng G(陈刚), Zhang B(张彪), et al. Advances in the study browning in plant tissues [J]. Heibei J For Orch Res(河北林果研究), 2002, 17(3):284–288. (in Chinese)
- [11] An D G(安调过), Zhong G C(钟冠昌), Mu S M(穆素梅), et al. Studies on the application of uniconazole(S-07) [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin(西北植物学报), 1997, 17(4):487–492. (in Chinese)

图版说明

图版 I

- 1. 类原球茎的诱导;
- 2. 类原球茎的增殖;
- 3. 苗的分化;
- 4. 生根培养;
- 5. 移植的小苗。

Explanation of plate

Plate I

- 1. Induction of protocorm-like bodies (PLBs);
- 2. Multiplication of PLBs;
- 3. Shoot differentiation from PLBs;
- 4. Rooting culture;
- 5. Transplanted seedlings.

