

四种观赏凤梨的离体繁殖

洪燕萍¹ 林顺权^{2*} 林庆良³

(1. 福建龙岩师专生物系, 福建 龙岩 364000; 2. 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642;
3. 福建农林大学亚热带果树研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 以粉菠萝 [*Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker]、八宝剑 [*Vriesea poelmannii* Hort.]、虎斑姬凤梨 [*Cryptanthus zonatus* (Vis.) Beer]、七彩羞凤梨 [*Neoregelia carolinae* (Beer) L. B. Sm.] 等的幼株茎段为外植体, 以 MS+NAA 0.5 mg L⁻¹+BA 5 mg L⁻¹ 为诱导培养基, MS+BA 1 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹ 为增殖培养基, 可获得较好增殖效果。用 1/2 MS+NAA 0.5 mg L⁻¹ 生根效果较好, 以椰糠: 砂 = 1:1, 或椰糠: 泥炭土: 蛭石 = 1:1:1 为基质移苗的成活率均达 95% 以上。

关键词: 凤梨科; 离体培养; 繁殖

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2002)01-0063-06

In vitro Culture of Some Bromeliaceae

HONG Yan-ping¹ LIN Shun-quan^{2*} LIN Qing-liang³

(1. Dept. of Biology, Longyan Teachers' College, Longyan 364000, China; 2. College of Horticulture, South China Agri. Univ., Guangzhou 510642, China; 3. Inst. of Subtrop. Fruit, Fujian Agri. and Forestry Univ., Fuzhou 350002, China)

Abstract: Micropropagation was studied of four bromeliad plants, *Aechmea fasciata*, *Vriesea poelmannii*, *Cryptanthus zonatus* and *Neoregelia carolinae*, cultured by stem explants. Induction medium of MS+NAA 0.5 mg L⁻¹+BA 5 mg L⁻¹ led to budding after one or two weeks of culture. MS+BA 1 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹ was the optimum medium in subculture. The optimum concentration of NAA was 0.5 mg L⁻¹ in rooting. Plantlets transplanted on media contained coconut-bant:sand=1:1 or coconut-bant:turf:vermiculite (1:1:1) had better survival rate up to 95%.

Key words: Bromeliaceae; *In vitro* culture; Micropropagation

观赏凤梨的品种繁多, 不少具有较高的观赏价值, 但其增殖的速度较慢, 进行离体培养研究的还不多, 而且没有较系统的基础研究和建立较有生产效益的快繁体系。此外, 以离体培养为手段进行变异品种选育、种质资源保存等研究也有待开展。本实验以凤梨科四个属共四种植物为材料, 探索观赏凤梨离体繁殖的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

粉菠萝 [*Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker]、八宝剑 [*Vriesea poelmannii* Hort.]、虎斑姬凤梨 [*Cryptanthus zonatus* (Vis.) Beer]、七彩羞凤梨 [*Neoregelia carolinae* (Beer) L. B. Sm.] 取自缤纷(厦门)园艺公司, 均以蘖芽或腋芽萌发的小苗的茎段及试管苗叶片基端为外植体材料。

收稿日期: 2001-03-29 接受日期: 2001-12-03

* 通讯作者 Corresponding author

1.2 培养基

诱导培养基:①MS+NAA 0.5 mg L⁻¹+BA 5 mg L⁻¹;②MS+NAA 1 mg L⁻¹+BA 5 mg L⁻¹;③MS+2,4-D 4 mg L⁻¹+NAA 2 mg L⁻¹;④MS+2,4-D 2 mg L⁻¹+IBA 2 mg L⁻¹+BA 0.1 mg L⁻¹。

增殖培养基:MS+BA 1 mg L⁻¹+NAA 0.05-5 mg L⁻¹;MS+NAA 0.1 mg L⁻¹+BA 0.1-10 mg L⁻¹;1/2MS, 1/4 MS+NAA 0.1 mg L⁻¹+BA 1 mg L⁻¹。

壮苗培养基:MS+KT 1, 2, 5 mg L⁻¹;MS+BA 0.3, 1, 5 mg L⁻¹。

生根培养基:1/2MS+NAA 0.1, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹;MS, 1/2MS, 1/4MS+NAA 2 mg L⁻¹+活性炭 0, 0.1%。

所有培养基均加蔗糖 3%, 固体培养基加琼脂 0.7%。诱导壮苗均采用固体培养基, 增殖培养采用固体和液体两种培养基进行比较。

培养方式的转换包括:①液体培养基转入液体培养基;②液体培养基转入固体培养基;③固体培养基转入固体培养基;④固体培养基转入液体培养基。

1.3 育苗方法

冠芽及蘖芽先去除叶片, 洗净, 将茎段置于 0.1% 升汞中灭菌 10 min, 用无菌水冲洗 3-5 次, 再切成长 1 cm 左右的上、中、下茎段, 接入诱导培养基①和②, 然后置于 28±1℃, 光照 16 h d⁻¹, 光强 2 000 lx 左右条件下培养。在诱导培养基上继代 1-2 代, 然后转入增殖培养基。试管苗叶片基部置于诱导培养基③和④中培养, 置于 28±1℃, 暗培养。产生愈伤组织后转入弱光培养。

将诱导生成的芽或芽丛转入增殖培养基, 并进行固体培养与液体培养方式转换。增殖数代的较大的苗, 转入壮苗培养基后再转入生根培养基; 或直接转入生根培养基。培养得到的较大的有根或无根苗, 移入基质:①椰糠:砂=1:1、②椰糠:泥炭土:蛭石=1:1:1、③泥炭藓或④砂中, 记录成活率, 筛选出成活率高、长势好的基质。

从瓶内或移栽后小苗的形态特征和叶色初步判断是否发生变异, 估计变异率。

2 结果和分析

2.1 诱导培养

茎段诱导以 NAA 0.5 mg L⁻¹+BA 5 mg L⁻¹ 培养基中芽的萌动早, 生长快。本文后续的外植体实验均以 MS 培养基加此调节剂组合为起点培养基。

四种凤梨的中部茎段萌动最早, 上部茎段萌动稍迟, 下部茎段易污染。八宝剑和七彩盖凤梨茎中段接种一周后即已萌动, 上段约 10 d 后萌动, 下段污染。虎斑姬凤梨中段接种约 5 d 后萌动, 15 d 后芽达 2 mm, 上段 25 d 后萌动, 下段污染。两个不同取材来源的粉菠萝分别记为粉菠萝 1 和粉菠萝 2, 两者萌动迟早不一, 前者的上段接种一周后萌动, 15 d 后芽约 4 mm 高, 中段 30 d 后萌动, 下段未萌动; 后者中段约 15 d 后才萌动, 上段 30 d 后萌动, 下段未萌动。重复取材粉菠萝 2, 以较小的还未发根的粉菠萝苗为材料, 切取的茎段外植体褐化程度较轻者, 萌动早, 诱导效果较好。

2.2 增殖培养

以下各种处理均以八宝剑的增殖体为试材, 以芽丛块株数变化来计算增殖倍数。

生长调节剂的影响 用 MS+BA 1 mg L⁻¹+NAA 0.05, 0.1, 0.5, 1 或 5 mg L⁻¹ 液体培养基, 每

个处理组合接种 30 个左右的增殖体, 30 d 后以芽苗株数计算增殖率(增殖倍数)。除 NAA 0.05 mg L^{-1} 与 0.1 mg L^{-1} 的增殖率相近(5.02, 5.05)之外, 随着 NAA 浓度增加至 0.5, 1.5, 芽丛增殖倍数减小, 分别为 3.98, 3.22, 3.27。从其生长状况看, 芽间的联系随 NAA 浓度的增加变得松散, 芽苗变大, 说明虽然随 NAA 浓度的增加芽丛增大速率减小, 但芽丛里芽苗的生长较好, 对后续的壮苗有一定的益处。

以 MS+NAA 0.1 mg L^{-1} +BA 0.1, 0.5, 1, 3, 5 或 10 mg L^{-1} 液体培养基培养, 每个处理组合接种 30 个左右的增殖体, 30 d 后记录的结果是: 随 BA 浓度的增大, 增殖率增大, 浓度在 0.1, 0.5 和 1 mg L^{-1} 时, 增殖率分别为 3.70, 4.28, 5.05。但此后浓度再增大至 3, 5 和 10 mg L^{-1} 时, 增殖率反而下降, 分别为 3.76, 3.44, 2.79。这说明增殖培养以 BA 1 mg L^{-1} 为好。

基本培养基和细胞分裂素的影响 以 MS, 1/2MS 或 1/4MS+NAA 0.1 mg L^{-1} +BA 1 mg L^{-1} 为培养基, 每个组合接种 20 个左右的增殖体, 50 d 后记录, 结果平均增殖倍数分别为 5.05, 4.70, 3.90。以 Barlett 检验法进行多个方差齐性检验, 方差具齐性。以单因素方差分析样本无显著差异, 即增殖培养阶段用上述三种基本培养基, 其增殖倍数并无显著差异。

以 MS+NAA 0.1 mg L^{-1} +BA 或 KT 1 mg L^{-1} 液体培养, 每个处理组合接种 20 个左右的增殖体, 50 d 后, 1 mg L^{-1} BA 条件下其增殖系数达 8.30, 是 1 mg L^{-1} KT 条件下(3.41)的 2.43 倍。

固液转换的影响 以 MS+NAA 0.1 mg L^{-1} +BA 1 mg L^{-1} 的固体和液体培养基进行固液转换培养, 每种处理接种约 20 个芽丛块, 记录增殖倍数, 观察培养方式的转换对增殖的影响。不同转换方式的培养结果分别为: 固体转入液体增殖倍数最高, 达 6.58(a), 液体转入固体增殖倍数达 5.78 (b), 固体转入固体增殖倍数达 5.29(b), 液体转入液体增殖倍数达 4.45(c) (以 Duncan 法进行多重比较, a, b, c 分别表示 $p=0.05$ 的显著性差异检验, 下同)。

黄化培养 参照 Kiss^[1] 的黄化途径增殖的方法, 以粉菠萝和虎斑羞凤梨为试材, 将生长健壮的大苗(茎高约 1 cm)切除叶片转入 MS+NAA 2 mg L^{-1} 进行暗培养。经约 20 d 的培养, 黄化苗抽出约 1 cm, 50 d 后黄化苗抽出达 5-8 节, 长 5-7 cm, 若原苗较小, 切除叶片转入 MS+NAA 2 mg L^{-1} 进行暗培养后, 茎不抽长, 抽出黄化叶片。在实验中发现, 每个茎段抽出黄化苗 1-2 个。有些黄化苗在节处生出气生根, 有些黄化苗在节处又抽出黄化的腋芽。

2.3 生根培养

NAA 的影响 以粉菠萝的芽苗为试材, 以固体培养基 1/2MS+NAA 0.1, 0.5, 1.2 mg L^{-1} 进行生根培养, 每种处理组合约接种 20 株小苗。原苗无根, 茎高约 0.1 cm, 经 2 个月的培养后记录茎高及根数, 并进行显著性测验, 结果如表 1 所示。可见, 0.5 mg L^{-1} 为 NAA 促进生根的最佳浓度。

基本培养基及活性炭的影响 以 MS, 1/2MS, 1/4MS+NAA 2 mg L^{-1} + 活性炭 0 或 0.1% 为生根培养基, 2 个月后进行结果统计分析, 结果如下: 以不加活性炭的培养基进行结果统计, 基本培养基为 MS, 1/2MS, 1/4MS 的平均茎高(cm)分别为 1 (a), 0.33 (b), 0.27(b), 平均根数分别为 10 (a), 5.33 (b), 2.70 (c); 不区分基本培养基进行统计, 结果为加活性炭的平均茎高为

表 1 NAA 浓度对茎高和根数的影响
Table 1 Effect of 1/2MS medium supplemented with NAA on shoot height and root number of bromeliads

NAA (mg L^{-1})	平均茎高(cm) Shoot height	平均根数 Root number
0.1	0.27c	2.57b
0.5	0.47a	6.71a
1.0	0.36b	6.20a
2.0	0.35b	5.93a

以 Duncan 法进行多重比较, a, b, c 分别表示 $p=0.05$ 的显著性差异检验 a, b and c: treatments significantly different from each other. Duncan-test $p 0.05$.

0.20 cm, 平均根数为 1.62, 不加活性炭的平均茎高为 0.31 cm, 平均根数为 3.44, 不加活性炭的茎高及根数极显著高于加活性炭的。从外观长势看, 加活性炭的培养基, 小苗叶成束状向上生长; 未加活性炭者小苗叶较平展。加活性炭者根数量少, 为正常根, 不加活性炭者根数量多, 为气生根。

以上结果表明, 经较长时间的培养(约 2 个月), 与 1/2MS、1/4MS 相比, MS 培养基对小苗的生长较好, 但是较短培养时间的观察结果却不相同, 培养约 20 d 后观察, 仅 1/2MS 中生根率达 40%, MS 与 1/4MS 中未生根, 可见 1/2MS 为较好的基本培养基。

如前述实验中, 以 1/2MS+NAA 0.1, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹ 为生根培养基, 20 d 后观察, 发现 NAA 0.1, 0.5 或 1 mg L⁻¹ 的生根率达 80%, 小苗的生长也较好, 但 NAA 浓度高(2 mg L⁻¹)时, 小苗初期生长不佳, 叶出现黄褐, 特别是基部叶, 有些苗后期死亡, 生根率仅为 40%。可以推断, 对于较小的苗, 不加活性炭时, NAA 浓度 2 mg L⁻¹, 会对其产生一定的毒害, 抑制其生长, 加活性炭的生长较好, 但仍不及 NAA 0.5 mg L⁻¹ 培养基的。而对于较大的苗, NAA 2 mg L⁻¹ 且不加活性炭, 苗生长健壮, 未出现叶片黄褐, 对苗的生长是有利的。

综合较短时间培养和较长时间培养的观察结果, 可以认为, 以 1/2MS+NAA 0.5 mg L⁻¹ 进行生根培养为好。若培养时间较长, 且原苗较大, 可采用 MS+NAA 2 mg L⁻¹。在 NAA 浓度不过高的条件下, 生根培养以不加活性炭为好。

增殖培养基的影响 培养于 MS+KT 1, 2 或 5 mg L⁻¹ 中的单芽, 两个月后观察发现, 芽几乎不生长, 叶色较绿, 含有 2-3 芽的小芽丛略有增殖。培养于 MS+BA 0.3, 1 或 5 mg L⁻¹ 的单芽亦无明显生长, 叶呈暗绿色, 含有 2-3 芽的小芽丛有明显增殖, 变为约含 10 芽的小芽丛。可以认为, 仅含 KT 或 BA 的培养基都不能使芽生长, 但是, 将培养后的芽苗转入生根培养基 1/2MS+NAA 1 或 2 mg L⁻¹ 后, 芽苗开始生长, 原培养基含 BA 与 KT 的平均茎高分别为 0.14 cm, 0.43 cm, 统计分析两者差异极显著。而且, 由含 BA 的原培养基转移来的芽苗生根率约为 50%, 由含 KT 的原培养基来的接近 100%。

从其外观长势亦可明显看出, 原培养于 KT 中的芽, 在生根培养基中为单芽或 2-3 芽小芽丛, 芽均较高, 芽丛中芽间分界明显。而原培养于 BA 中的芽, 在生根培养基中形成芽丛, 如 BA 浓度由低到高, 则芽丛由稀到密, 芽由小到大, BA 达 5 mg L⁻¹ 者, 生根培养生成芽丛很密, 有的形似绿色圆球状愈伤组织。可初步断定, 原培养基含 BA 会使继代培养中芽增殖, 从而影响芽的生长。

2.4 移苗

将有根苗、无根苗、大苗、小苗、单芽、丛芽等不同材料于 6 月份分别移栽于不同基质中, 2 个月后的成活率与长势如下。按不区分苗的类型进行统计, 不同基质中成活率有差异, 其中①和②基质中苗的成活率均达 95%以上, ④基质中的达 85%以上, ③基质中的仅 60%左右。大苗(茎高约 2-4 mm, 苗高约 2-3 cm)在①、②和④基质中的成活率均达 100%, 在③基质中的也达 90%以上, 小苗(茎高约 1 mm, 苗高低于 2 cm)成活率则较低, 在①②基质中的达 90%, 在④基质中的达 80%以上, 在③基质中的仅 50%左右。芽丛成活率与小苗相似。

苗的长势也有所不同。以大苗(茎高约 2-4 mm, 苗高约 2-3 cm)进行移栽, 两个月后茎高达 4-6 mm, 苗高达 3-4 cm, 叶片明显变宽, 由 1-2 mm 变为 4-5 mm, 苗健壮, 移栽效果好; 其次为小苗, 苗高达 2 cm 左右, 苗较弱, 叶片也无明显变宽; 芽丛长势最差, 几乎无长高, 但苗间变松散, 较易分割。

综合成活率与长势两方面来看,以椰糠:砂=1:1或椰糠:泥炭土:蛭石=1:1:1为基质,以大苗进行移栽,移栽效果好。以小苗或芽丛进行移栽,成活率也不低,但生长较慢。

粉菠萝、八宝剑、虎斑姬凤梨在瓶内或移栽后均未发现形态变异。其他进行凤梨离体培养的实验室发现叶片为全绿的观赏凤梨离体培养发生变异的比率很低,如缤纷园艺公司的八宝剑变异率为万分之一左右,而七彩羞凤梨在瓶内发现大量的变异。原七彩羞凤梨叶片为黄绿相间,即有黄色纵条纹,培养后出现全绿、全黄及不同程度黄色纵条纹的小苗,说明七彩羞凤梨为嵌合体,在培养中出现分离。

3 讨论

不同茎段的诱导效率 诱导实验中以中部茎段诱导效果好。上段由于原叶基的生长,包被茎段,造成茎段实际受光不足,且顶芽的存在抑制隐芽的萌动。不同种顶芽的抑制强度不同。下段则由于茎段老化,隐芽不易萌动。实验中还发现,由于所取的小苗生长发育情况和生理状态,会导致接种后不同程度褐化及萌动速度不一。一般以较小的苗为材料,切取的茎段褐化程度较轻,诱导效果较好。其内在机制尚须进一步研究。

利用黄化途径的增殖 Kiss等以健壮的苗通过黄化途径进行增殖,几乎不会发生变异。黄化苗的高度与原苗的高度具有显著的相关性^[1]。但获得一定高度健壮的苗,需要经过较长时间的培养,因此以黄化苗途径进行增殖费时较长,无法达到很高的增殖速度。黄化途径进行增殖要解决如何快速获得健壮大苗的问题,我们以丛生芽的方式进行增殖,可以避免过高的变异率,又可以达到较高的增殖率。变异率统计与调查结果也证实了芽生芽的途径变异率很低。值得一提的是,七彩羞凤梨在诱导获得的萌动腋芽中未发现变异,但在增殖获得的芽丛中产生大量的变异,因此以黄化途径增殖控制变异仍有应用前景。

活性炭的效用 活性炭已在防止培养物变褐的培养过程中广泛应用^[2]。林惠端等^[3]在培养基中加活性炭使凤梨生根良好,但从我们的实验来看,当NAA浓度低于 1 mg L^{-1} 时,以不加活性炭培养基生根较好,而当NAA浓度高(2 mg L^{-1})时,会对小苗产生一定的毒害,生长受到抑制。加入活性炭则可减弱NAA的毒害作用,但小苗生长仍不及NAA 0.5 mg L^{-1} 培养基的。这说明活性炭仅能减弱NAA的部分毒性。而对于较大的苗,NAA 2 mg L^{-1} 且不加活性炭对苗无毒害,有利于生长。

展望 本文在凤梨科几种植物的离体培养上进行了一些探索,初步建立了数种凤梨科植物的快繁技术体系。其中,粉菠萝的离体培养尚未见到国内报道;国外报道须经愈伤组织途径^[4],而本实验则不须经愈伤组织途径,减少了变异的可能性。与八宝剑和七彩羞凤梨同属的植物已见不少报道^[5-8],同种尚未见报道;与虎斑姬凤梨同属的植物国内已见报道^[9],但同种尚未见报道。因此,本研究取得的进展对于观赏凤梨在我国进一步推广应用有一定意义。本文初步总结出凤梨试管育苗需要估计的主要参数,包括增殖率、培养基配方、移苗基质、移苗成活率等。在此基础上,今后若能对技术体系和有关参数进一步完善,并找出各参数与成本之间的数量关系,使试管育苗可以实现最优化生产,提高投入产出比^[10],则此快繁体系有望较好地应用于生产。

参考文献:

- [1] Kiss E, Kiss J, Gyulai G, et al. A novel method for rapid micropropagation of pineapple [J]. Hort Sci, 1995, 30(1): 127-129.

- [2] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6):501-505.
- [3] 林惠端, 付锡德. 凤梨组织培养研究简报 [J]. 中国果树, 1981, (2):49-50.
- [4] Vinterralter B, Vinterhalter D. True-to-the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* Baker [J]. Sci Hort, 1994, 57(3):253-263.
- [5] Fischer G, Zimmer K. Multiple Sprossbildung bei *in vitro* gekeimten Samen [J]. Gartenbau Wissenschaft, 1987, 52(3):135-140.
- [6] Kukulczanka K, Czastka B. Propagation of some species of the Bromeliaceae family cultured *in vitro* [J]. Acta Hort, 1989, 251:167-172.
- [7] Mercier H, Kerbauy G B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana* [J]. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 1992, 30(3) 247-249.
- [8] Tombolato A F C, Takebayashi S S G, Costa A M. et al. Cultura *in vitro* da bromiliar [J]. Agronomico, 1991, 43(2-3):77-78.
- [9] 李华明, 陈志红, 陈维新, 等. 剥粒凤梨(台农 4 号)的快速繁殖及简化培养的研究 [J]. 热带作物学报, 1990, 11(1):91-96.
- [10] 林顺权, 陈振光. 园艺植物苗木快速繁殖的决策支持系统 [J]. 福建农业大学学报, 1996, 25(2):150-153.

中国羊蹄甲属一分布新记录

张奠湘

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘要: 报道了原产于越南的蟹钳叶羊蹄甲在中国的分布新记录。

关键词: 羊蹄甲属; 新记录

中图分类号: Q949.751.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2002)01-0068-01

A Bauhinia (Leguminosae) Species New to China

ZHANG Dian-xiang

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: A Vietnamese species of *Bauhinia* L., *B. carcinophylla* Merr., is newly recorded from China.

Key words: *Bauhinia*; New record

在准备《中国植物志》的英文版“Flora of China”的羊蹄甲属稿件的过程中, 作者发现在哈佛大学标本馆的一份采自广西钦州的标本(钟观光 1861), Larsen 教授曾研究并鉴定为 *Bauhinia carcinophylla* Merr., 本文作者亦认同。我们最近几年亦在广西凭祥等地多次采集到无花果的该种植物标本。毫无疑问, 该种植物普遍见于广西与越南交界的地区。作为《中国植物志》未收录的一个种, 现予报道。

蟹钳叶羊蹄甲(新拟)

Bauhinia carcinophylla Merr., J. Arnold Arb. 23: 171 (1942); Larsen & Larsen, Fl. Camb. Laos et Vietn. 18: 198 (1980). Type: Vietnam, Quang Ninh, Tsang 29033 (holotype: A!; isotype: IBSC!)

广西钦州, 钟观光(K. K. Tsong) 1861(A).

收稿日期: 2001-12-10 接受日期: 2001-12-21

基金项目: 中国科学院知识创新工程青年科学家小组项目及经费择优支持回国工作基金项目