

文章编号: 0490-6756(2007)04-0891-04

毛唇独蒜兰的离体快速繁殖研究

于晓娟¹, 纳海燕¹, 胡晓丽¹, 魏兴强², 范 昆², 刘方媛³

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 云南英茂生物农业技术公司, 安宁 650301;

3. 中科院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘 要: 以毛唇独蒜兰的原球茎块作为外植体进行快速繁殖的研究, 结果表明: 毛唇独蒜兰 (*Pleione hookeriana*) 在 1/2MS+6-BA 1 mg/L 下丛生芽的出芽率为 80%, 而在 TH+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1 mg/L 下丛生芽的出芽率 93%, 并且增殖倍数比 1/2MS 多. 在 MS+土豆 50 g/L 培养基有利于毛唇独蒜兰原球茎增重. 诱导丛生芽的原球茎切块大小不小于 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm.

关键词: 毛唇独蒜兰; 丛生芽诱导; 原球茎**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A

Study on tissue culture of *pleione hookeriana*

YU Xiao-juan¹, NA Hai-yan¹, HU Xiao-li¹, WEI Xing-qiang², FAN Kun², LIU Fang-yuan³

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Yingmao Bio-agriculture, Kunming Anning 650301, China;

3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650301, China)

Abstract: The protocorms of *Pleione hookeriana* in vitro were used as explants for the rapid propagation. The results were stated as follows: the multiple shoots rate of protocorms of *P. hookeriana* was 80% in 1/2 MS medium+1 mg/L 6-BA, however that of explants was 93% in TH medium+0.2 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA. TH medium is better than 1/2 MS medium on proliferation. MS+50 g/L potato was optimal for the weight of protocorms of *P. hookeriana*. The explants producing multiple shoots should be bigger than 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm.

Key words: *Pleione hookeriana*, multiple shoots, protocorms

1 引 言

独蒜兰属是兰科植物中有很高观赏价值的一个属, 全属约 20 种, 我国有 16 个种, 主要产于我国秦岭山脉以南, 西至喜马拉雅地区, 南至缅甸、老挝和泰国的亚热带地区和热带凉爽地区^[1-3]. 独蒜兰属植物花型奇特, 花色丰富, 是很珍贵的小型盆栽花卉^[4]. 独蒜兰的假鳞茎, 药名毛慈姑, 是传统

名贵中药, 可用于肝硬化、黄疸, 尤其是对降低 γ -球蛋白, 升高白蛋白的效果更为显著; 其汁液可用于乳腺癌、食道癌等抗癌治疗^[5].

在自然条件下, 独蒜兰的种子不易萌发, 而以假鳞茎分株繁殖, 繁殖速度慢且数量有限^[6]. 毛唇独蒜兰 (*Pleione hookeriana*) 是兰科独蒜兰属半附生草本植物, 高 7~15 cm. 假鳞茎卵形, 顶生 1 叶, 叶椭圆状披针形, 长 8~9 cm, 宽 2~2.5 cm, 叶掉

收稿日期: 2006-09-27

作者简介: 于晓娟(1981-), 女, 2004 级硕士研究生.

通讯作者: 纳海燕. E-mail: hayana@scu.edu.cn

后在假鳞茎顶具有 1 杯状齿环。6~7 月开花,花和幼叶同时出现,花葶顶立 1 朵花,花大,淡紫色,稍下垂,萼片近等,长圆形,长 2.8~4.5 cm,宽 0.8~1 cm;花瓣长圆形,较萼片稍窄;唇瓣近肾形,较大,基部阔楔形,不明显 3 裂,侧裂片圆形,中裂片楔形,顶端稍凹缺,唇瓣前部边缘具不整齐的锯齿或近全缘,内面 7 条主脉上具许多流苏状刚片。毛唇独蒜兰的生境分布于海拔 2600~3100 m 的林下树干苔藓丛中或林下石上及覆土中,分布于西藏、云南、贵州、湖北、广西、广东、印度东北部至尼泊尔、泰国、老挝也有^[7]。本研究希望通过组织培养的方法,对毛唇独蒜兰这一野生花卉进行离体快速繁殖。

独蒜兰的离体快繁的研究对于里生独蒜兰资源的保护、持续利用和商业性生产开发有重要意义。特别是种子培养成功对于独蒜兰育种工作十分关键。独蒜兰在国内外市场上有较大的需求,但是我国对于独蒜兰属植物的种质保护研究与开发上尚处于初级阶段,近年来有少量有关独蒜兰组织培养方面的报道,但对于我国独蒜兰属植物的 16 个种来说,无疑还需要进行大量的研究^[8,9]。

2 材料和方法

2.1 材料

野生毛唇独蒜兰的种子,以原球茎为外植体进行研究。

培养基:花宝 0.3% + 蛋白胨 0.2% + 土豆 50 g/L + 香蕉 50 g/L + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + 蔗糖 2% + 活性炭 0.5% + 琼脂 1% 在无菌条件下将已灭菌的毛唇独蒜兰果荚切开,取出种子播种于培养基上,培养条件为:光照 12 h/d,光照强度 2000 lx,温度(25±2)℃。

2.2 方法

2.2.1 灭菌 将带荚果的种子用流水冲洗 5 min 后,用下面的步骤进行消毒:0.15% 升汞浸泡 20 min、75% 的酒精消毒 1 min,再用无菌水洗 3 次。

2.2.2 继代培养 继代培养基:MS + 土豆 50 g/L + 活性炭 0.5% 在毛唇独蒜兰种子萌发后,接种到继代培养基中培养。

2.2.3 丛生芽诱导 1/2MS(Murashige-Skoog)培养基,蔗糖 2%,培养基用 1.0% 的琼脂固化,pH 值为 5.5,选用不同激素种类和浓度进行培养,激素单位为 mg/L(见表 1) 选择直径≥0.5 cm 的原球

茎,横切或纵切为 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小的小块作为外植体接种,每瓶接种 6~8 块。统计丛生芽出芽率。

TH(Thomale)培养基,蔗糖 2%,培养基用 1.0% 的琼脂固化,pH 值为 5.0,添加不同激素种类和浓度进行培养,激素单位为 mg/L(见表 1)。选择大小适合的原球茎切成 0.5 cm³ 的小块接种,统计丛生芽出芽率。

2.2.3 出芽率和增殖倍率的计算方法 出芽率 = 丛生芽个数/外植体总数×100%,增殖倍数 = 每个丛生芽的单个芽数/1。

表 1 两种诱导丛生芽的培养基

Tab. 1 Two culture mediums of 1/2MS and TH for shooting regeneration

培养基种类	培养基编号	激素种类及浓度(mg/L)
1/2MS	1	NAA 0.2 + 6-BA 1
	2	NAA 0.2 + 6-BA 2
	3	6-BA 1
	3	6-BA 2
	3	6-BA 3
	3	NAA 1 + 6-BA 3
TH	a	NAA 0.2 + 6-BA 1
	b	NAA 0.2 + 6-BA 2
	c	6-BA 1

3 结果和分析

3.1 种子萌发的培养

培养基中的毛唇独蒜兰种子在播种 4 周后开始萌发,出现绿色点状突起。随着培养时间增长,突起逐渐形成小原球茎,并有叶的分化(如图 1-1)。2 个月后原球茎叶片长成,长叶后的原球茎经过 2 次继代培养,有利于原球茎的增大,使生长速度加快(如图 1-2)。

3.2 MS 培养基为基本培养基诱导丛生芽的结果

接种 3 周后可以看到外植体有变化,开始出芽(如图 1-3),接种 10 周后丛生芽生成(如图 1-4),其中 3 号培养基的配方丛生芽的出芽率最高,为 80%。其次为 2 号培养基,出芽率为 75%。在 1/2MS 培养基中,激素只加入 6-BA 时,6-BA 浓度越高,出芽率越低;同时加入 NAA 和 6-BA 时,比单独使用 6-BA 时的培养基诱导的出芽率要高(表 2)。表明 NAA 对于诱导丛生芽有促进作用,但是 NAA 的浓度高于 1 mg/L 时,丛生芽的出芽率降低。将丛生芽分割切开,接种到继代培养基后,丛生

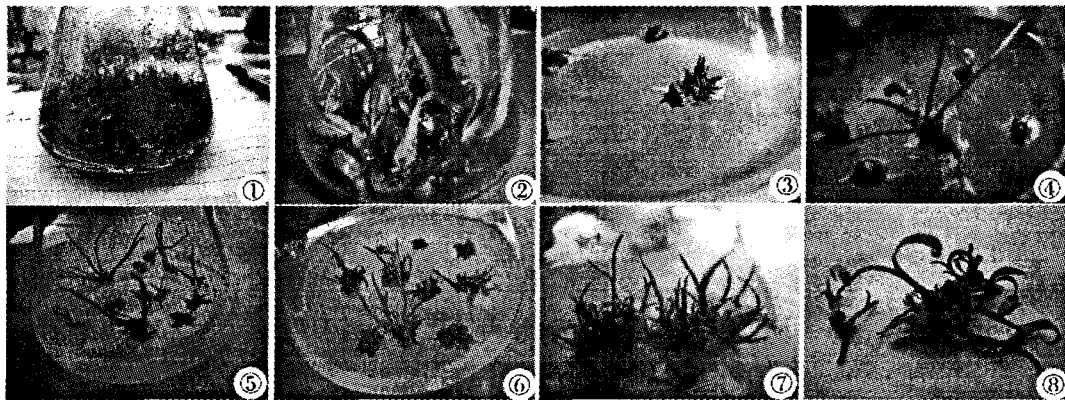


图1 图版说明

①毛唇独蒜兰种子萌发(播种后10周);②毛唇独蒜兰瓶苗(土豆培养基中);③毛唇独蒜兰的丛生芽(诱导3周后);④毛唇独蒜兰的丛生芽(10周);⑤a号配方中的丛生芽;⑥b号配方中的丛生芽;⑦继代培养;⑧生根培养

① Germination from seeds of *P. hookeriana* (the 10th week after sowing seeds), ② Growing up of *P. hookeriana* after subculture (in potato medium), ③ The multiple shoots of *P. hookeriana* (3 weeks), ④ The multiple shoots of *P. hookeriana* (10 weeks), ⑤ The multiple shoots of the recipe a, ⑥ The multiple shoots of the recipe b, ⑦ Subculture, ⑧ Rooting of shoots

表2 1/2MS培养基诱导丛生芽的结果

Tab.2 The results of 1/2 MS culture medium for shooting regeneration

1/2MS培养基	培养基编号					
	1	2	3	4	5	6
出芽率*	62.5% ± 1.2	75% ± 1.1	80% ± 1.4	60% ± 2.1	55% ± 1.0	50% ± 1.2

* Mean ± S. E.

芽继续生长成为毛唇独蒜兰的小植株。

3.3 TH培养基为基本培养基时不同激素诱导丛生芽的结果

接种2周后开始出芽,6周后丛生芽长成,将单个芽从丛生芽中切分开,接种在继代的TH培养基中继续培养。由表3可以得知,三种加了激素的培养基诱导的效果都很理想,a号培养基出芽率最高为93%,其次是b号培养基,出芽率为91%,而c号培养基出芽率为85%。在没有加激素的TH培养基对照组中出芽率为0,这说明激素对于诱导丛生芽起决定性作用,当6-BA浓度为1mg/L时,诱导丛生芽的效果最好,加大6-BA浓度后,反而诱导率下降;当加入0.2mg/L NAA时,有利于丛生芽的诱导。如图1-5所示,a号培养基中的丛生芽长势最好,丛生芽诱导数量多,生长快速,一般诱导6周后丛生芽长成,丛生芽的增殖倍数高;b号培养基中诱导的丛生芽数量较a号少,增殖倍数也低,且丛生芽较小(图1-6)。

表3 TH培养基诱导丛生芽的结果

Tab.3 The results of TH culture medium for shooting regeneration

TH培养基	培养基编号		
	a	b	c
出芽率*	93% ± 1.4	91% ± 1.7	85% ± 1.1

* Mean ± S. E.

3.4 诱导生根

诱导出的丛生芽经过继代培养,培养是在原有培养基的基础上加入50g/L土豆,继代培养有助于丛生芽的原球茎生长,然后将其置于1/2MS + 0.5mg/L NAA + 0.5mg/L 6-BA培养基上诱导生根,可以得到再生植株。

4 结 语

4.1 原球茎大小及切割方式对诱导丛生芽的影响
作为外植体所选的原球茎越大则诱导频率越高。将原球茎一分为二,横切或纵切后接种。若所切

的茎块太小,随培养时间的增长,外植体会变成褐色,最后死亡;太大则不易诱导出丛生芽.根据实验结果,切成的小茎块大小应不小于 0.5 cm^3 ,如果原球茎太大,可以切成几个小块,每一块都可以诱导丛生芽.就切割方式来说横切或纵切,对于丛生芽的产生没有太大影响.

4.2 不同激素组合浓度对诱导丛生芽的影响

本研究采用 NAA 与 6-BA 两种激素,设计 6 种不同浓度的诱导配方.实验结果表明:6-BA 在诱导丛生芽的过程中起主要作用.单独使用 6-BA 就可以诱导丛生芽的产生.当 6-BA 浓度为 1 mg/L 时,诱导的效果最佳,丛生芽出芽率高,6-BA 浓度太低太高都不利于诱导;加入一定浓度的 NAA 后,对于不同的培养基诱导结果略有不同.在 $1/2\text{MS}$ 培养基中丛生芽的诱导率下降;在 TH 培养基中添加 0.2 mg/L 的 NAA 则有利于丛生芽的诱导.在不加激素时,两种培养基中均没有看到丛生芽的出现,显示了激素在丛生芽诱导中所起到的决定性作用.

4.3 不同培养基组分对诱导丛生芽的影响

由图 1-7 可知,在添加相同浓度和种类激素条件下, $1/2\text{MS}$ 和 TH 培养基诱导丛生芽的出芽率并不相同,TH 培养基诱导丛生芽的出芽率明显高于 $1/2\text{MS}$ 培养基.其中 $1/2\text{MS}$ 培养基的诱导效果最好的是加入 6-BA 1 mg/L 的配方,而 TH 培养基诱导效果最好的是 NAA 0.2 mg/L + 6-BA 1 mg/L .由图 1-8 可知,TH 培养基诱导的丛生芽的增殖倍数明显高于 $1/2\text{MS}$ 培养基诱导的丛生芽的增殖倍数.TH 培养基中加入 NAA 0.2 mg/L + 6-BA 2

mg/L 时,诱导的丛生芽的增殖倍数最高为 7.6;在 $1/2\text{MS}$ 中加入 6-BA 1 mg/L 时,诱导的丛生芽的增殖倍数为 5.

在两种培养基中, $1/2\text{MS}$ 培养基诱导的丛生芽萌发和生长需要时间长,至少需要 10 周,而相对的 TH 培养基培养时间短,接种 6 周后就可看到丛生芽的生长,且出芽率与增值倍数较 $1/2\text{MS}$ 培养基高.在加入激素的 TH 培养基中可观察到许多外植体在开始时先转变为浅绿色并逐渐膨大,再生长成丛生芽,所以形成的丛生芽的数量很多.

参考文献:

- [1] 黄成林,项艳,吴泽民,等.独蒜兰快繁技术的研究[J].安徽农业大学学报,2004,31(1):100.
- [2] 孙安慈.花卉产业又创新——独蒜兰组培成功[J].植物杂志,2003,(1):13.
- [3] 陈心启,吉占和.中国兰花全书[M].北京:中国林业出版社,1998.
- [4] 陈之林,叶秀麟,梁承鄞,等.白花独蒜兰的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(4):455.
- [5] 文林.山慈姑的功用[J].中国民族民间医药杂志,2003,65:343.
- [6] 陈心启.中国植物志:18卷[M].北京:科学出版社,1999.
- [7] 吴丽芳,张素芳,杨春梅,等.滇独蒜兰的组织培养研究,2005,20(5):749.
- [8] Lu M C. High frequency plant regeneration from callus culture of *Pleione formosana* Hayata[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004,78(1):93.
- [9] Cribb P, Butterfield I. Genus *Pleione* [M]. Borneo: Natual History Publications, 1999.