

文章编号: 1000-5692(1999)02-0164-06

黄花白芨组培快繁技术

朱玉球¹, 王雪根²

(1. 浙江林学院资源与环境系, 浙江临安 311300; 2. 浙江省临安市锦城林业站, 浙江临安 311300)

摘要: 用不同的基本培养基、不同的植物生长调节剂及其配比、不同的原球茎切割方式系统地研究了黄花白芨 (*Bletilla ochracea*) 组织培养技术。试验结果表明: 1/2 MS+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA 培养基有利于原球茎增殖, 培养 60 d 增殖到 4.21 倍; Kyoto+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA 的培养基有利于诱导原球茎增殖、分化及幼苗的生长, 培养 60 d 分化形成的芽数为接种原球茎数的 4.79 倍; Kyoto+2.0 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA 的培养基对球茎切块诱导芽的效果最好。在继代培养中, 应采用纵切法切割球茎或用自然掰开法来分割原球茎。同时, 对进一步的研究提出了建议。表 5 参 4

关键词: 黄花白芨; 组织培养; 原球茎; 繁殖; 分化

中图分类号: S682.31; Q944.6 **文献标识码:** B

黄花白芨 (*Bletilla ochracea*) 属兰科 (Ochidaceae) 白芨属植物, 分布于我国的云南、贵州及四川西南部。其花鲜黄, 花期 5~6 月, 具有较高的观赏价值, 深受人们喜爱。因长期无限制人工采挖, 生态环境遭破坏, 天然贮量日益减少, 目前市场上已将其视为稀有名贵的观赏种。黄花白芨多行球茎增殖, 在人工栽培条件下, 1 个球茎 1 a 形成 1~3 个新球茎 (多数为 1 个), 年增殖率极低。本研究从无菌播种、基本培养基、植物生长调节剂种类与配比等环节探讨黄花白芨的组织培养技术, 旨在建立起无性繁殖系, 探索行之有效的快速繁殖技术。这对于扩大栽培, 满足市场需求以及保护野生资源都具有十分重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人工栽培的黄花白芨经人工授粉取得种子, 用于无菌苗培育和组织培养试材。

1.2 方 法

无菌苗培育采用 1/2 MS (Murashige and Skoog, 其中大量元素减半) 培养基, 固态静止培

收稿日期: 1998-09-28; 修回日期: 1999-01-20

作者简介: 朱玉球 (1963-), 女, 浙江永康人, 实验师, 从事植物遗传育种研究。

养方式。组培技术的研究选用 3 种基本培养基, 即 1/2 MS (1962), KC [Knudson (1946) C] 与 Kyoto (Kyoto Solution), 3 种植物生长调节剂, 即 6-苄基氨基嘌呤 (BA)、6-糠基氨基嘌呤 (KT) 和萘乙酸 (NAA) 不同配比, 并用不同的外植体种类和切割方法观察原球茎的增殖和分化, 统计原球茎个数和分化形成的芽数作为分析指标。

2 结果与分析

2.1 无菌苗培育

采用成熟未开裂的蒴果, 先用 70% 乙醇浸泡 5 min, 擦去果面的脏物, 再放入 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 升汞溶液中消毒 20 min, 用无菌水冲洗 3 次。然后在无菌条件下呈十字状纵切果实, 将种子轻轻抖落到培养基表面。约 1 周后可见种子吸水膨胀, 并由黄褐色变为淡黄绿色, 继而成小球体状(即原球茎)。1 个月后有 80% 的原球茎顶部出现幼叶, 继续培养长成具根的小苗。

2.2 原球茎增殖和分化的一般情况

原球茎经分割接种后 1 周左右, 在原球茎表面开始形成纤细的白色绒毛, 继续培养 10 d 左右, 产生 1 个或多个肉眼可见的乳白色的瘤状小突起, 即新原球茎的初期。它是一类呈珠粒状的, 由胚胎性细胞组成的, 类似嫩茎的器官。在兰科植物中多以这种器官发育、增殖、分化, 不同于多数植物组培中首先形成一团无固定结构形态的分生细胞(即愈伤组织)。随后, 球状突起逐渐增大, 呈浅绿色(新原球茎形成)。新形成的原球茎不经分割继续培养, 有的形成丛生形的原球茎, 有的形成芽和小植株。即在同一培养物中, 同时存在着不同发育时期的原球茎、芽和小植株。这与王熊等(1990)在地生兰离体培养中所观察的结果是相一致的^[1]。

2.3 基本培养基和植物生长调节剂对原球茎增殖与分化的影响

2.3.1 基本培养基对原球茎增殖和分化的影响 以 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 作为附加物, 对 3 种不同养分水平的培养基作试验比较。连续进行了 2 次培养试验(试验 1 和试验 2)。将接种后 60 d 时统计结果列于表 1。

表 1 基本培养基对原球茎增殖与分化的影响

Table 1 Effect of basic culture media on proliferation and differentiation of original bulbs

基本培养基	试 验 1			试 验 2		
	接种原球茎数/个	增殖后原球茎数/个	分化形成芽数/个	接种原球茎数/个	增殖后原球茎数/个	分化形成芽数/个
1/2MS	50 (5)	175	0	50	227	0
KC	50 (4)	0	100	50 (5)	0	109
Kyoto	50	0	264	50	0	215

说明: 培养时间为 60 d; () 内数字为原球茎污染数

由表 1 可见, 在 1/2MS 培养基中, 原球茎只增殖, 几乎不分化, 而且新形成的原球茎短而粗, 多数呈树杈状丛生形。在另 2 种培养基中, 情况与 1/2MS 不同, 在培养 30 d 时观察, 原球茎与芽并存, 培养到 60 d 时观察, 原球茎全部都分化成丛生芽和具有少量根的丛生苗。其中, Kyoto 原球茎的分化成芽率显著高于 KC 培养基。该试验结果表明, 黄花白苾原球茎

的增殖、分化与培养基中无机盐和有机成分的种类及含量等有关。在选用的3种培养基中, 1/2 MS 培养基有无机盐 14 种(其中大量元素 6 种)、有机成分 5 种, KC 培养基有无机盐 6 种(其中大量元素 4 种), Kyoto 培养基仅有 3 种无机盐(均为大量元素)。可认为黄花白芨原球茎分化要求的矿物元素种类比较简单, 1/2 MS 这种元素含量比较齐全的培养基反而会抑制原球茎的分化。

2.3.2 植物生长调节剂对原球茎增殖和分化的影响 植物生长调节剂是诱导兰科植物原球茎和小植株形成以及一些品种的种子发芽所必需的^[2,3]。把种子萌发形成的原球茎纵切分别接种、培养在不同植物生长调节剂水平的 Kyoto 培养基中进行培养。培养到 60 d 时的统计结果列于表 2。

表 2 植物生长调节剂对原球茎增殖和分化的影响

Table 2 Effect of plant growth regulators on proliferation and differentiation of original bulbs

生长调节剂/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			接种原球茎数/个	增殖后原球茎数/个	分化成芽数/个
KT	BA	NAA			
0.5		0.1	50 (10)	0	188
		0.5	50 (5)	98	0
		1.0	50	0	239
		2.0	50 (10)	0	94

说明: 培养基为 Kyoto, 培养时间为 60 d; () 内数字为原球茎污染数

由表 2 可见, 在较低 BA 水平下, 原球茎增殖慢, 且均以原球茎形态存在, 不能分化形成芽。在附加 $1.0 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 的培养基上, 接种后培养 30 d 时观察, 原球茎与芽并存, 到 60 d 时, 原球茎已全部形成芽, 并有部分出现根而成为小植株(丛生苗)。其中 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 增殖率显著高于 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA, 但附加 KT 的培养基上分化出的芽和丛生苗有 10%~15% 出现白化现象。可以认为, 中等质量浓度的 BA ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对黄花白芨原球茎的增殖和分化最为有利, 而 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BA 有利于原球茎形态保存和增殖。

2.4 基本培养基和植物生长调节剂对球茎切块诱导芽的影响

2.4.1 基本培养基对球茎切块诱导芽的影响 选用球茎直径 0.3 cm 的无菌苗, 在超净工作台上剥去叶, 以纵切法将球茎一分为二, 接种在生长调节剂水平相同的 3 种培养基上。试验结果表明, 3 种培养基都能使球茎有所增大并分化出芽, 但球茎的成芽率及每一块球茎的成芽数不同。由表 3 可见, Kyoto 培养基诱导芽的效果最好。

表 3 基本培养基对球茎切块诱导芽的影响

Table 3 Effect of basic culture media on bud induction of pieces cut from a bulb

培养基	接种数	成芽块数	成芽数	成 3 芽以上占成芽
	/块	/块	/%	数百分比/%
1/2MS	50	16	32	6.25
KC	50	13	26	7.69
Kyoto	50	24	48	12.5

说明: 培养基中均附加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, 培养时间 60 d

2.4.2 植物生长调节剂对球茎切块诱导芽的影响 在基本培养基选择的基础上, 进行生长调节剂种类和配比的对比试验。结果表明, BA 在 $0.5 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内成芽的块数及形成丛生芽的块数都随 BA 剂量的增加而增加(表 4)。可以认为较高质量浓度的 BA 对诱导球茎块成芽有促进作用。

表 4 植物生长调节剂对诱导球茎切块出芽的影响

Table 4 Effect of plant growth regulators on bud formation of pieces cut from a bulb

生长调节剂/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		接种数	成芽块数	成芽率	成 3 芽以上占成芽数百分比/%
BA	NAA	/块	/块	/%	
0.5	0.1	50	18	36	0
1.0	0.1	50	24	48	12.5
2.0	0.1	50	35	70	33.0

说明: 培养基为 Kyoto; 培养时间为 60 d

2.5 切割方法对原球茎增殖和分化的影响

多数兰科植物利用组织培养作快速繁殖时, 常采用切割原球茎的方法以达到原球茎增殖。为此, 试验采用 3 种切割方法: 纵切法(将原球茎纵切为二)、横切法(将原球茎横切为二)和掰开法(将大丛原球茎顺势掰散成小丛或单个)。结果, 以掰开法最佳, 纵切法次之, 横切法易导致原球茎褐变而死亡。这与 Amaki (1989) 认为杂种兰原球茎纵切可促进苗的形成是一致的^[4]。

2.6 继代培养

黄花白芨早期原球茎状球体外观上有一些乳白色瘤状小突起, 继代培养会逐渐发育成丛生形的原球茎。如果不切割这些丛生形的原球茎, 在含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 的 KC 和 Kyoto 培养基中继续生长, 60 d 内将陆续出芽和长成无根或具有少量根的丛生苗。而在 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 的 1/2MS 培养基中, 60 d 后大部分将陆续出芽, 长出小叶。为了达到大量繁殖之目的, 在原球茎形成阶段做增殖是最有利的。这是快速繁殖, 提高繁殖系数的核心。一般丛生形原球茎每月可继代 1 次, 原球茎数可增加 1 倍以上。在增殖培养中, 原球茎的分割不可太小, 否则原球茎生长不良, 甚至死亡。增殖的另一条途径是用丛生芽增殖方式, 即将无根的丛生芽自然掰开, 以小丛或单芽在 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 的 Kyoto 培养基中培养, 60 d 左右每芽可平均获得 2~3 个丛生芽。

2.7 试管苗移栽和壮苗培养

试管苗移栽成活率和进一步生长的状况与试管苗质量紧密相关, 提高苗的质量能提高移栽成活率与生长量。为此, 我们把增殖过程中形成的丛生芽进行分割, 以单芽的形式分别接入附加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 1/2MS, KC 和 Kyoto 培养基中培养, 芽都能顺利长根, 形成完整的植株。但不同的培养基, 幼苗生长状况有明显的差异。由表 5 可见, 幼苗的高生长和球茎生长在 Kyoto 培养基都是最好的。为此可认为, Kyoto 培养基最有利于幼苗的茁壮生长。当小苗长至 3~4 cm 时, 打开瓶取出小苗, 洗净粘在根上的培养基(尽量少伤根), 晾苗后, 移栽到经消毒的基质中, 置于 $20 \sim 50^\circ\text{C}$ 温室里, 用塑料袋保湿, 1 周便可去袋。但仍要保持一定的湿度, 成活率可达 95% 以上。待新叶展开和新根生长, 即可按正常盆栽法进行管理。

表5 基本培养基对幼苗生长的影响

Table 5 Effect of basic culture media on growth of seedlings

基本培养基	株数	平均苗高/cm	平均球茎/cm
1/2MS	50	2.61	0.149
KC	50	2.31	0.174
kyoto	50	3.09	0.289

说明: 培养时间 90 d

3 讨论

3.1 黄花白芫在野生状态或人工栽培条件下繁殖速度都很慢, 繁殖系数极低。应用组织培养进行无性快速繁殖, 每隔 30 d 即可进行原球增殖, 每个丛生形原球茎每次能增殖 1 倍以上, 在 1 a 内就能繁殖大量幼苗。从试验结果可以看出, 黄花白芫原球茎诱导、增殖、分化成芽以及生根等过程可在同一种培养基上完成, 但其各发育阶段在不同的培养基上有明显差异。笔者认为, 在继代培养中, 可根据培养的目的, 在各发育阶段选用合适的培养基, 有望克服在单一培养基上培养的缺点, 有利于原球茎的增殖与分化, 促进幼苗生长。

3.2 在 Kyoto 基本培养基上附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NNA}$, 对于诱导原球茎增殖和分化效果明显, 其原球茎、芽增殖率与附加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 时的水平相当, 但所分化出来的芽和丛生苗约有 10%~15% 缺乏叶绿素而呈白化苗, 其中有少量呈条纹状白化。这对于黄花白芫的快速无性繁殖是不利的, 而且完全白化苗在以后的移栽中也难以成活, 但是呈条纹状的白化苗移栽能成活。这种叶色上的变异也许是其新品种选育的一条途径, 深入的研究有待于进一步进行。

3.3 用组培法快速繁殖黄花白芫, 对于研究、保存和开发这种珍稀资源具有十分重要的意义。就其商业化利用而言, 繁殖的成本是关键因素。研究黄花白芫组培繁殖成本构成和取得单位成本时最大的繁殖率是下一步的重点工作。

参考文献:

- 1 王熊. 地生兰 (*Cymbidium*) 个体发生途径研究[J]. 植物生理学报, 1990, 16(3): 264~267.
- 2 张菊野, 俞玲凤. 几种影响春兰原球茎生长与分化的因素[J]. 植物生理学报, 1993, 29(3): 175~178.
- 3 杨乃博. 花卉试管繁殖[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 62.
- 4 Anaki W, Haguchi H. Effects of dividing on the growth and organogenesis of protocomm-like bodies in *Doritaenopsis*[J]. *Sci Hort*, 1989, 39(1): 63~68.

Fast propagation techniques of *Betilla ochracea* by means of tissue cultures

ZHU Yu-qiu¹, WANG Xue-gen²

(1. Department of Resources and Environment, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, China; 2. Jincheng Forest Station of Lin'an City, Lin'an 311300, China)

Abstract: A study of techniques for tissue cultures of *Betilla ochracea* was made in terms of basic culture media, hormones and their proportions and the cutting of original bulbs. It's showed that the medium compose of $1/2 MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ was favorable to the proliferation of the original bulb, with 4.21 times as many as the original proliferated in 60 days; the medium consisting of $\text{Kyoto} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ was favorable to the induction of the original bulb to proliferate and differentiate and the growth of seedlings, with 4.79 times as many as the number of buds of the original bulb differentiated and formed within 60 days; and the medium with $\text{Kyoto} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ involved had a good effect on the bud induction of pieces cut from the original bulb. In the culture of subsequent generations, vertical cutting of the bulb or natural separation of the original bulb should be used. Some suggestions for further studies are put forward meanwhile.

Key words: *Betilla ochracea*; tissue cultures; protocorm propagation; differentiation (biology)