

邵和平,张宁宁,张 琼,等. 卡特兰的无菌播种及组培快繁技术研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):50-52.

卡特兰的无菌播种及组培快繁技术研究

邵和平,张宁宁,张 琼,孙永平,夏明霞,王苏宁,陈 晨

(江苏丘陵地区南京农业科学研究所,江苏南京 210046)

摘要:以卡特兰的种子为试验材料,对 3 种播种培养基进行试验,结果表明,花宝 1 号培养基对种子出苗有利,也适宜用于种子苗的继代培养。以卡特兰交配种和平×白天母的种子苗原球茎为试验材料,对 4 种原球茎增殖培养基进行筛选试验,结果表明,MS+4.4 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+3% 蔗糖+6 g 琼脂培养基的诱导成活率最高,能够产生大量的绿色愈伤组织,培养 10 周后,在愈伤组织周边出现原球茎的分化,诱导成活率 50%。以大新一号、将军、和平的新梢不同节位的芽点分生组织为试验材料,用配方为 MS+4.4 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+3% 蔗糖的液体培养基进行茎尖克隆培养,每个新梢可切取 5 个外植体,培养 7 周后,3 个品种均有外植体获得了绿色愈伤组织,中下节位分生组织的诱导成活率较高。

关键词:卡特兰;无菌播种;分生组织;组培快繁

中图分类号:S682.310.4⁺1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)05-0050-03

卡特兰(*Cattleya hybrida*)是热带兰中花朵最大、色彩最艳丽的种类,国际上有“洋兰之王”的美誉^[1]。卡特兰指的是一个大家族,包括卡特兰属原生种,卡特兰属内种间杂交种以及卡特兰与若干近缘属如巴拉索兰属(*Brassavola*)、蕾丽兰属(*Laelia*)之间交配产生的两属间、三属间甚至四属间的杂交种。卡特兰品种极其繁多,花形、花色千姿百态,许多品种具有特殊的芳香。

自卡特兰于 1824 年被发现以来,已有 180 多年的栽培历史,目前已被培育出近千个园艺品种。巴西、哥伦比亚、哥斯达黎加等国将雍容华贵、娇艳多变的卡特兰定为国花。卡特兰在亚洲的泰国、新加坡、印度尼西亚、马来西亚、菲律宾和中国台湾地区都有规模化的生产,这些地区成为世界卡特兰的主产区。而在欧洲,由于能源消耗大、栽培周期长、生产成本低,卡特兰的生产面积逐年缩小,近年来其生产逐步转向非洲。在美洲,卡特兰在南美、中美国家的栽培生产日益兴旺,产品主要出口美国、加拿大等国,国际卡特兰的生产销售竞争激烈。

我国栽培卡特兰的时间不长,有规模的生产起步于 20 世纪 80 年代,主要集中在广东和云南两省,大多是由合资企业生产,目前能基本满足国内需求,并有少量出口。随着国内花卉消费水平的提高,卡特兰的需求量将会大幅度上升。卡特兰品种分原种和交配种 2 类。原种是指原产于自然界的品种,但并不是纯种花。原种花虽然具有原始美,但品种有限,花型花色也不佳,如要选拔出更优良的花型花色,只有通过杂交从其后代中进行筛选。卡特兰通过分株、播种和克隆 3 种方式繁殖。分株可以完全保持母株的品种特性,但繁殖率低。播种繁殖是杂交育种的唯一途径,种子苗播种繁育虽然较难

预测每株花苗将来的优劣,但一旦获得优秀的个体则身价倍增;每个交配品系可以开出各种不同花色的兄弟株,每株实生苗都具有独特的花色特征,这就是洋兰杂交的新奇之处。克隆繁殖既可以保持母株的品种特性,又可以实现规模化生产、使优良品种大量扩繁,是现代兰花产业的产业技术关键。

目前江苏丘陵地区南京农业科学研究所通过组培无菌播种建立了多个卡特兰品种和杂交组合的繁殖体系,同时进行卡特兰优良品种的克隆快繁。为提高繁殖系数,对外植体、基本培养基和激素对愈伤再生体系的增殖影响进行了研究,以期对卡特兰快速繁殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为卡特兰黑将军、和平×白天母、益生 1 号×白天母、益生 1 号×国庆、新市×雪玉的种子和卡特兰大新一号、将军、和平的新梢芽点外植体,均由江苏丘陵地区南京农业科学研究所园林研究室提供。

1.2 试验方法

从资源圃筛选花期相近的卡特兰优良亲本,进行父母本配合杂交,获得杂交果实,在种子近完全成熟但未开裂前进行无菌播种。对 3 种种子播种培养基(1/2MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA、MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA、花宝 1 号)进行配方筛选,播种出苗 8 周后,继续以相同培养基进行继代培养,增加花宝 1 号+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 作为继代培养基,每 3~4 周转接 1 次。

将完好的蒴果在 0.5% 次氯酸钠溶液中浸泡 10 min,无菌蒸馏水冲洗 3 次;用消毒的解剖刀剖开蒴果,把种子散布到 100 mL 无菌蒸馏水中,用磁力搅拌器混合均匀,每瓶培养基中均匀散布 1 mL 种子混合液,约含种子 1 000 粒。在卡特兰种子无菌播种初期进行暗培养,待种子膨大、原球茎形成后进行加光培养。

无菌苗原球茎的增殖培养:从和平×白天母的无菌播种苗中选择长约 5 mm、带 3~4 片叶的新芽,将叶片剥离、原球

收稿日期:2012-10-15

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(10)116];江苏省科技支撑计划(编号: BE2009325)。

作者简介:邵和平(1967—),男,江苏宜兴人,副研究员,主要从事观赏植物的育种、快繁及设施栽培技术研究。Tel: (025) 85899156; E-mail: shaoheping@sohu.com。

茎切割成小块后放置在 50 mL 培养基中。基础培养基为改良 MS 培养基;1 L 培养基中添加 100 mg 肌醇、1.0 mg 烟酸、1.16 mg 盐酸吡哆醇、0.9 mg 盐酸硫胺素、100 mg 水解酪蛋白。设计 4 个不同的培养基处理:MS + 1.75 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 3% 蔗糖,液体静止培养(A);MS + 1.75 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 3% 蔗糖 + 15% 椰乳,液体静止培养(B);MS + 4.4 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA + 3% 蔗糖 + 6g/L 琼脂,固体培养(C);MS + 4.4 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA + 3% 蔗糖 + 15% 椰乳 + 6 g/L 琼脂,固体培养(D)。比较不同培养基配方的诱导频率。

新梢分生组织的增殖培养:用 3 个卡特兰交配种的新梢顶芽和侧芽作为材料,分别取顶芽、第 2 芽、第 3 芽、第 4 芽、第 5 芽的芽点分生组织,用配方为 MS + 4.4 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA + 3% 蔗糖的液体培养基进行分生组织克隆培养。外植体消毒采取氯化汞法;剥去外层叶片,用流水冲洗 30 min,再用 0.1% 氯化汞消毒 10 min,最后用无菌蒸馏水漂洗 6~8 次,每次 5 min。氯化汞消毒时要严格掌握时间,因为侧芽内层的叶片十分幼嫩,消毒时间过长极易杀死分生组织。顶芽外植体在芽点下部水平切取,再在生长点中心部位的周围切割取出分生组织块;切取侧芽外植体时先从芽点上部纵向斜切一刀,再在芽点下部横切一刀,把生长点分离,再在生长点中心部位的周围切割,取出分生组织块,分生组织块应有约为 5 mm×5 mm×5 mm。获取的分生组织块在解剖镜下进一步切割,用无菌解剖刀剥除残留的叶原基,在最幼小的叶原基下部切取外植体,丢弃基部,上部作外植体进行初代培养,重新切取的分生组织块大小为直径 2~3 mm。液体培养瓶放置在摇床上,摇动频率 120 r/min。培养后比较不同品种不同节位分生组织的诱导频率。

2 结果与分析

2.1 种子的无菌播种

试验表明,5~6 月龄未完全成熟果实的种子最容易成功

萌发。用花宝 1 号作培养基对种子出苗有利,表现为种子转绿生长整齐,发芽成苗率较高,根茎叶生长正常,叶色较浓绿。由于生长速度较快,经过 4~5 个月的瓶内培养,幼苗株高达 3~5 cm,且根茎叶齐全,达到移栽标准,健康的卡特兰小苗移栽存活率较高。1/2MS 培养基中的种子出苗后褐化严重,成活率较低,长势慢,转接后 2~3 个月才开始生长。MS 培养基中的种子出苗后褐化情况稍好,约 50% 有褐化现象,且长势较快,转接后 1 个月开始生长。因此花宝 1 号是卡特兰种子萌发的最适培养基,也适宜用作卡特兰的继代培养,用该培养基培养的幼苗根茎叶健壮,叶色绿,生长速度较快。继代培养基花宝 1 号 + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA 在品种间的效果差异较大,在新市×雪玉上的促进生产作用明显,种子苗根茎叶粗壮,叶片宽大质厚,叶色浓绿,生长速度快,但用于其他品种上时,根系生长受抑制,根系褐化较多,幼苗根茎叶细弱,生长速度慢。

2.2 原球茎的增殖培养

由表 1 可以看出,对种子无菌苗的原球茎用 4 种改良的 MS 培养基培养 6 周后,增殖诱导效果间差异较大,C 培养基的诱导成活率最高,达到 65%,繁殖体产生大量绿色愈伤组织,体积较大;其次是 D 培养基,诱导成活率达 45%,绿色愈伤较多,体积中等。可见椰乳的添加没有促进繁殖体的分生增殖,说明分生组织在初始培养阶段的分生增殖主要依赖于生长素的调节作用,对椰乳类营养添加物的要求不高。2 种液体培养基 A 和 B 中繁殖体死亡明显,存活的繁殖体增殖不明显。继续培养至 10 周后,C 培养基中的愈伤组织进一步增大,颜色深绿,组织紧密,同时在周边出现原球茎的分化,诱导成活率达 50%;其次是 D 培养基,愈伤组织增殖明显,颜色深绿,组织紧密,但原球茎的分化不明显,诱导成活率为 30%;而用 A 培养基和 B 培养基诱导,不仅诱导成活率低,而且愈伤组织增殖慢,呈淡绿色,有玻璃化趋势。液体培养基常用于原球茎的再生培养,但在本试验的生长调节剂浓度下,液体培养基的促进增殖生长的能力还不强。

表 1 不同培养基对卡特兰分生组织再生诱导的影响

培养基代号	培养基配方	分生组织再生诱导成活率(%)	
		培养 6 周	培养 10 周
A	MS + 1.75 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 3% 蔗糖	35	10
B	MS + 1.75 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 3% 蔗糖 + 15% 椰乳	30	15
C	MS + 4.4 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA + 3% 蔗糖 + 6 g/L 琼脂	65	50
D	MS + 4.4 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA + 3% 蔗糖 + 15% 椰乳 + 6 g/L 琼脂	45	30

2.3 分生组织的增殖培养

由表 2 可见,用改良的 MS 液体培养基对来自卡特兰新梢上的顶芽与侧芽分生组织培养 7 周后,3 个品种均有分生组织获得了绿色愈伤组织,培养物增生至 7~8 mm 宽。从成活组织的芽点节位看,中下节位的侧芽诱导成活率高,卡特兰品种将军、和平分别在第 3 芽和第 3、第 4 芽获得了绿色愈伤组织,大新一号在最下部的第 5 芽获得了绿色愈伤组织,3 个品种的顶芽和第 2 芽均没有诱导成功。本试验结果与 Kako 的结果相吻合^[2]。由于受到试验材料数量的限制,无法进行不同节位分生组织诱导频率的精确对比,但中下节位侧芽诱导频率高的趋势较明显。

表 2 卡特兰不同品种外植体再生诱导成活率和侧芽成活节位的关系

品种	外植体再生诱导成活率(%)	分生组织成活节位
大新一号	20	第 5 芽
将军	20	第 3 芽
和平	40	第 3 芽、第 4 芽

3 结论与讨论

3.1 种子培养

本研究以卡特兰的种子为材料,探讨了影响卡特兰无菌播种繁殖的若干因素。结果表明:花宝一号培养基最适合卡特兰种子萌发后的原球茎形成和根茎叶生长。卡特兰的种子

较小, 种性较弱, 适宜的种子发育度对种子萌发的影响较大, 且不同的培养基配方对卡特兰种子苗的生长影响较大。在卡特兰种子培养基中添加适量的生长调节剂(6-BA、NAA), 能够给种子苗生长提供必要的营养生长调节物质, 对种子苗的生长发育有利^[3]。但本试验中生长最好的种子培养基并不含生长调节剂, 继代培养时添加生长调节剂也只对个别交配种具有促进作用, 并对其余交配种产生抑制作用。不同生长调节剂对兰花幼苗生长的影响很微妙, 如色氨酸能抑制生长, 而尼克酸和 IAA 确实有促进生长的作用^[4]。本试验中生长调节剂的添加对部分种子苗有利, 这种差异可能是由品种特性决定的, 也可能源于种子苗生长的差异。如果一种生长调节剂对种子苗有促进作用, 这种作用应该发生在种子萌发的初期, 因为在萌发初期, 种子苗内部产生的生长激素很少或根本没有, 随着幼苗叶片和根系的不断形成, 内源生长激素也开始启动合成并积累, 最后达到正常水平, 外源生长激素的添加对种子苗培养后期的作用将逐渐消失, 甚至可能打乱幼苗的正常生长。对卡特兰种子培养基中生长调节剂的选择利用还有待于进一步研究。

3.2 植物生长调节剂

外植体的增殖需要一些合适的生长激素, 如在卡特兰的 MS 静态液体培养中添加 0.1 mg/L NAA 或 2,4-D 就分别取得了最高 50%、60% 的成活率^[5]。自从 1960 年兰花的组织培养取得成功以来, 兰花的组织培养技术逐渐发展为两大培养模式: 一种是把外植体诱导并保持未分化的愈伤组织或原球茎状态, 增殖通过原球茎的增生来实现, 只有当获得足够多的愈伤组织后才进行不定芽的分化培养; 另一种强调弱化愈伤组织的形成, 建议尽早把外植体诱导分化成不定芽, 增殖则通过不定芽的不断切割增生来实现^[6]。根据以上模式, Jones 等把生长调节剂的配方设计为 2 种模式, 即高浓度的愈伤组织诱导法和约 1/2 浓度的不定芽诱导法^[6]。本试验中由种子播种得到的原球茎在含高浓度生长调节剂的 MS 固体培养基上大量增生愈伤组织, 而在含低浓度生长调节剂的 MS 液体培养基上的愈伤组织增生较少。把芽点分生组织培养在含相同高浓度生长调节剂的 MS 液体培养基上, 用 120 r/min 的频率摇动培养, 成活的外植体同样获得了大量增生愈伤组织。Cybularz-Urban 等在对来自克隆培养的无菌苗进行增殖培养时, 也采用了高浓度的生长调节剂, 即 5.0 mg/L 6-BA、0.2 mg/L ZT、1.0 mg/L NAA, 在适宜的光谱下培养出大量健康的卡特兰幼苗^[7]。赵贵林等在小型卡特兰上的试验则发现, 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 的浓度配比最佳, 诱导培养 40 d 后外植体基部分生出较多的愈伤组织和不定芽点, 经继代培养, 不定芽点逐渐发育长成不定芽^[8]。由于不同试验所用的材料和试验条件等因素存在差异, 试验结果之间难以

比较, 但高浓度的生长调节剂配方能够促进愈伤组织增生、低浓度的配方能够促进不定芽发生的趋势较明显。因此初步认为, 4~5 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA 是合适的愈伤组织增生配方, 2.0 mg/L 6-BA + 0.1~0.2 mg/L NAA 是合适的不定芽诱导配方。

3.3 固体培养与液体培养

外植体诱导愈伤组织的形成具有一定的偶然性, 一般认为液体培养比固体培养更有利于愈伤组织的形成。主要是由于卡特兰的茎尖培养易发生褐变, 导致外植体切口部位组织坏死。Scully 等均建议在初始培养阶段采用液体培养^[9-10], 也许正是为了避免发生褐变。一般认为褐色素的形成是影响卡特兰正常发育的重要因素, 但它的化学成分目前还不清楚, 液体培养避免了外植体与空气的接触, 可以最大限度地降低褐变现象的发生。本试验中对来自播种苗的原球茎切割后用改良的 MS 固体培养基进行初始培养, 褐变现象较少, Cybularz-Urban 等在对来自克隆培养的试管苗进行增殖培养时也采用固体培养方法^[7], 可能是试验材料均来自经过多次转接培养的试管苗, 体内褐变物质较少的缘故。

参考文献:

- [1] 邵和平, 高年春, 张宁宁, 等. 卡特兰开花特性鉴定与花期调控栽培技术[J]. 金陵科技学院学报, 2008, 24(3): 70-75.
- [2] Kako S. Clonal propagation of cattleya through shoot meristem culture[J]. JARQ, 1973, 7(2): 109-115.
- [3] 吕复兵, 冯学明. 卡特兰组培快繁中影响原球茎成苗的几个因素探讨[J]. 广东农业科学, 2007(1): 35-36.
- [4] Arditti J. Factors affecting the germination of orchid seeds[J]. The Botanical Review, 1967, 33(1): 1-97.
- [5] Ichihashi S, Kako S. On the clonal propagation of *Cattleya* through shoot meristem culture. III [C]//Autumn Meeting of Jap Soc Hort Sci. 1971: 282-283.
- [6] Jones D, Tisserat B. Clonal propagation of orchids[M]//Pollard J W, Walker J M. Methods in molecular biology; vol. 6: Plant cell and tissue culture. Clifton, New Jersey: The Humana Press, 1990: 181-191.
- [7] Cybularz-Urban T, Hanus-Fajerska E, Swiderski A. Effect of light wavelength on *in vitro* organogenesis of a *Cattleya hybrid*[J]. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 2007, 49(1): 113-118.
- [8] 赵贵林, 郑平, 何穗华, 等. 小型卡特兰的组培快繁研究初报[J]. 广东农业科学, 2002(5): 24-26.
- [9] Scully R M. Aspects of meristem culture in the *Cattleya alliance*[J]. Bull Amec Orchid Soc, 1967, 36: 103-108.
- [10] Reinert R A, Mohr H C. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristems[J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1967, 91: 664-671.