

Explore the Effect of Exogenous Hormones on Rapid Propagation of Tissue Culture of Native Orchids in Northern Guangxi

Liang Guo, Lifeng Qin, Qinglan Wen

Guilin Forestry Science Research Institute, Guilin Guangxi
Email: 690704326@qq.com

Received: Aug. 18th, 2017; accepted: Sep. 3th, 2017; published: Sep. 8th, 2017

Abstract

The effect of IBA and 6-BA two kinds of exogenous hormones and active carbon (AC) on rapid propagation of northern Guangxi native orchid tissue culture was studied by $L_9(3^4)$ orthogonal test. At the induction stage of protocorms formation, the suitable medium was MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.6 mg/L + AC 4.0 mg/L; at the proliferative stage of protocorms, the suitable medium was MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.4 mg/L + AC 4.0 g/L; in the differentiation stage of protocorms, the suitable medium was MS + 6-BA 0.4 mg/L + IBA 0.6 mg/L + AC 0.5 g/L; in the seedling and rooting stage, the suitable medium was 1/2MS + IBA 0.4 mg/L + AC 1.0 g/L.

Keywords

Native Orchids, Exogenous Hormones, Tissue Culture and Rapid Propagation, Protocorm

外源激素对桂北地区原生国兰组培快繁的效应探究

郭亮, 秦丽凤, 文清岚

桂林市林业科学研究所, 广西 桂林
Email: 690704326@qq.com

收稿日期: 2017年8月18日; 录用日期: 2017年9月3日; 发布日期: 2017年9月8日

摘要

利用 $L_9(3^4)$ 正交试验方法, 研究IBA、6-BA两种外源激素和活性炭(AC)对桂北地区原生国兰组培快繁的

效应。原球茎诱导形成阶段适宜培养基为MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.6 mg/L + AC 4.0 mg/L; 原球茎增殖期适宜培养基为MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.4 mg/L + AC 4.0 g/L; 原球茎分化期适宜培养基为MS + 6-BA 0.4 mg/L + IBA 0.6 mg/L + AC 0.5 g/L; 壮苗及生根阶段适宜培养基为1/2MS + IBA 0.4 mg/L + AC 1.0 g/L。

关键词

原生国兰, 外源激素, 组培快繁, 原球茎

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

国兰作为我国十大传统名花之一, 主要由春兰、莲瓣兰、蕙兰、建兰、寒兰、墨兰、春剑七大类组成, 其观赏价值和经济价值尤为突出, 深受人们喜爱。随着人们对兰花需求量日益增大, 传统的繁殖方式已不能满足市场需求, 桂北地区作为国兰的主产区之一, 继续探索出一条新型的国兰繁殖道路, 不仅有利于满足市场的需求。更对保护桂北地区国兰的优良种源具有重要意义。与传统的国兰繁殖方式相比, 利用组培快繁技术进行国兰的无性繁殖, 其繁殖系数更高, 繁殖速度更快, 受自然条件约束少, 可全年生产, 可以在短期内获得大量实生苗[1]。我国早在上世纪 80 年代便已开展兰花组培快繁的研究工作, 王熊等以建兰(大一白品种)和秋兰为材料, 切取茎尖或侧芽的分生组织, 诱导形成原球茎, 然后形成丛生型原球茎并实现离体增殖生长, 成功获得建兰和秋兰的无性系[2]; 2013 年刘幸佳利用对比试验的方法, 分别总结出了国兰中寒兰、蕙兰、春兰根状茎分化的适培养基配方[3]。本文旨在探究外源激素对桂北地区原生国兰组培快繁的效应, 为今后在桂北地区利用组培快繁技术培养原生国兰打下基础。

2. 试验材料与试验方法

2.1. 试验材料

以广西北部广泛生长的蕙兰侧芽作为组培快繁材料, 材料采自广西桂林市林业科学研究所。

2.2. 试验方法

2.2.1. 外植体的组织培养

以无病虫害、长势良好的原生蕙兰作为母本, 利用解剖刀自母本基部切取幼嫩的侧芽, 长度约为 5 cm 左右, 利用手术剪去侧芽顶端已展开的嫩叶, 将嫩芽置于清水中, 并加入 1~2 滴洗洁精清洗 5 min, 然后流水冲洗 3~5 次; 在无菌条件下利用 75%酒精和 0.1% HgCl₂ 分别进行浸泡灭菌, 具体方法为: 首先用 75%酒精浸泡嫩芽 30 s, 快速转入无菌水中震荡清洗 2~3 次; 而后用 0.1% HgCl₂ 浸泡 5 min, 边浸泡边震荡, 浸泡结束后转入无菌水中冲洗 4 次~5 次; 最后利用无菌滤纸吸干多余水分, 并将茎尖切下, 接种于诱导培养基中。

2.2.2. 诱导生成原球茎

诱导原球茎试验以 MS 为基本培养基, 利用 L₉(3⁴)正交试验方法, 筛选出 6-BA、IBA、和 AC 三种

因素在该试验阶段的适浓度组合, 每种因素设计 3 个水平, 分别为: 6-BA (1.0、1.5、2.0 mg/L)、IBA (0.2、0.4、0.6 mg/L)和 AC (2.0、4.0、6.0 g/L), 共分为 9 个处理, 每个处理接种 15 瓶, 每瓶外植体接种数量为 1。

2.2.3. 原球茎增殖及分化培养

本试验阶段同样以 MS 培养基为基本培养基, 利用 $L_9(3^4)$ 正交试验方法, 筛选出 6-BA、IBA、和 AC 三种因素适宜促进增殖及分化的浓度组合, 每种因素设计 3 个水平, 分别为: 6-BA (0.5、1.0、1.5 mg/L)、IBA (0.2、0.4、0.6 mg/L)和 AC (0.5、2.0、4.0 g/L), 共分为 9 个处理, 每个处理接种 15 瓶, 每瓶接种原球茎的数量为 5 块。

2.2.4. 原生国兰诱导生根试验

本试验阶段以 1/2MS 培养基为基本培养基, 共设置 4 个处理, 分别为: 处理 1 (1/2MS + AC 1.0 g/L)、处理 2 (1/2MS + AC 1.0 g/L + IBA 0.2 mg/L)、处理 3 (1/2MS + AC 1.0 g/L + IBA 0.4 mg/L)、处理 4 (1/2MS + AC 1.0 g/L + IBA 0.6 mg/L), 每个处理接种 50 瓶, 每瓶接种组培苗的数量为 5 株。

各处理在加入相应浓度外源激素和 AC 的同时, 还需加入等量的蔗糖(含量为 3%)和琼脂(含量为 5%), 培养基配置完成后, 统一调节 pH 至 5.6~5.8, 并在 121℃ 下灭菌 20 min, 接种后的外植体应确保于相同条件下培养, 培养温度为 25℃~28℃ 之间, 光照时间为 12 h/d, 光照前度为 1500 lx~2000 lx。

2.3. 数据分析

2.3.1. 数据分析涉及的计算公式

诱导生成原球茎阶段、原球茎增殖和分化阶段、壮苗及诱导生根阶段均从接种之日起, 每 5 d 观察 1 次, 40 d 统计原球茎增殖倍数, 70 d 后统计原球茎分化成苗结果。试验中所用到的计算公式如下:

公式 1: 原球茎诱导率(%) = 诱导出原球茎的外植体数/培养外植体数 × 100

公式 2: 原球茎增殖倍数 = (培养后原球茎个数 - 原球茎接种数)/原球茎接种数

公式 3: 原球茎分化率(%) = 分化的原球茎数/原球茎接种数 × 100

公式 4: 生根率(%) = 生根的小苗数/总小苗数 × 100

2.3.2. 正交试验数据分析方法

本试验采用 $L_9(3^4)$ 正交试验方法, 共有 3 个水平(分别用水平 A、水平 B、水平 C 表示), 每个水平下有三个因素(各因素为 A1、A2、A3、B1、B2、B3、C1、C2、C3), 正交试验组合后见表 1, 在正交试验分析中须计算 K 值(指标值之和)和 R 值(极差), 计算公式为:

1) K1: 123 结果相加, 456 结果相加, 789 结果相加

2) K2: 147 结果相加, 258 结果相加, 369 结果相加

3) K3: 159 结果相加, 348 结果相加, 267 结果相加

4) R 值: 因素 A 下 K 最大 - K 最小, 因素 B 下 K 最大 - K 最小, 因素 C 下 K 最大 - K 最小。

3. 试验结果与分析

3.1. 不同外源激素对比对原生国兰诱导原球茎生成的影响

通过对接种到含有不同外源激素配比的培养基上的外植体进行观察可知, 10 d 后接种外植体的基部开始出现膨大, 这是即将生成原球茎的标志; 20 d 后部分外植体基部开始出现白色的原球茎; 40 d 左右可在接种的外植体基部周围发现大量的原球茎。观察表 2 和表 3 可知, 由于 9 组处理的外源激素配比不同, 最终可测得的诱导率具有很大差别, 其中 3 号处理的原球茎诱导率最高, 为 92.9%, 利用数据统计

Table 1. Example of orthogonal test**表 1.** 正交试验分析例表

处理序号 Treatment No.	水平 A Level A	水平 B Level B	水平 C Level C	结果 Result
1	A1	B1	C1	
2	A1	B2	C3	
3	A1	B3	C2	
4	A2	B1	C2	
5	A2	B2	C1	
6	A2	B3	C3	
7	A3	B1	C3	
8	A3	B2	C2	
9	A3	B3	C1	

Table 2. Effect of different hormone treatments on protocorm induction**表 2.** 不同外源激素对比对原球茎诱导的影响

处理序号 Treatment No.	激素(mg/L) Hormone		AC (g/L)	接种个数 Inoculated explants	诱导出原球茎的外植体个数(个) Explants with protocorm	诱导率(%) Induction rate
	6-BA	IBA				
1	1.0	0.2	2.0	15	8	53.3
2	1.0	0.4	6.0	15	10	66.7
3	1.0	0.6	4.0	14	13	92.9
4	1.5	0.2	4.0	15	7	46.7
5	1.5	0.4	2.0	13	7	53.9
6	1.5	0.6	6.0	14	10	71.4
7	2.0	0.2	6.0	14	7	50.0
8	2.0	0.4	4.0	15	8	53.3
9	2.0	0.6	2.0	15	8	53.3

Table 3. Statistical analysis of protocorm induction**表 3.** 原球茎诱导试验统计分析

3 水平平均值 Three level mean value	诱导率(%) Induction rate		
	6-BA	IBA	AC
K1	71.0	50.0	53.5
K2	57.3	58.0	64.3
K3	52.2	72.5	62.7
R	18.8	22.5	10.8

分析原理, 可计算各因素诱导率的 R 值, 结果显示 IBA (22.5) > 6-BA (18.8) > AC (10.8), 说明三种外源激素对诱导原生国兰生成原球茎都起到了较大的促进作用, 其中又以 IBA 的促进作用最大; 利用不同 k 值间的大小比较可知, 6-BA 最大的 k 值为 k1 (71.0), IBA 最大的 k 值为 k3 (72.5), AC 最大的 k 值为 k2 (64.3), 因此应选取组合 3 (6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.6 mg/L + AC 4.0 mg/L) 为本次试验的最佳外源激素组合。

3.2. 不同外源激素对比对原生国兰原球茎增殖和分化的影响

为了实现原生国兰组培快繁从试验阶段向大规模工业化生产转化, 必须将实现原生国兰原球茎快速增殖作为研究重点。通过原球茎的不断增殖, 可分化产生新的幼芽, 每个幼芽经过培养可形成独立的植株, 但由于培养基中养分有限, 在同一培养基中原球茎不能无限增殖, 因此应定时进行转接。诱导培养 40 d 后, 分别将诱导生成的原球茎纵切成大小均匀的 4 块, 并接种到用于增殖分化的培养基上, 进行增殖分化试验。

经观察, 接种在增殖培养基中的原球茎约在 10 d 左右开始出现萌动现象, 当培养至 20 d 时可观察到明显的增殖现象, 40 d 经统计分析可知(见表 4), 原球茎的增殖倍数在 2.6~7.3 之间, 继续培养有明显的芽分化现象产生, 70 d 时进行芽分化率统计(见表 4), 分化率在 43.6%~96.6% 之间。

综合分析表 4 和表 5 可知, 由于 9 组处理的外源激素配比不同, 最终可测得的诱导率具有很大差别。在增殖阶段, 组合 6 的原球茎增殖倍数最大为 7.3, 3 种因素在此阶段 R 值由大到小依次为: IBA (2.24) > 6-BA (1.04) > AC (0.50), 因此 IBA 是影响原球茎增殖的最主要因素; 利用不同 k 值间的大小比较可知, 6-BA 的增殖阶段最大 k 值为 k2 (5.67), IBA 的增殖阶段最大 k 值为 k2 (5.47), AC 的增殖阶段最大 k 值为 k3 (5.30), 因此本次试验中原生国兰在原球茎增殖阶段最佳的外源激素配比为: 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.4 mg/L + AC 4.0 g/L。在分化阶段, 原球茎分化率最高为 96.6%, 3 种因素在此阶段 R 值由大到小依次为: IBA (30.43) > 6-BA (22.27) > AC (8.90), 因此 IBA 和 6-BA 对分化阶段影响较大, 且以 IBA 为主; 利用不同 k 值间的大小比较可知, 6-BA 的分化阶段最大 k 值为 k2 (76.40), IBA 的分化阶段最大 k 值为 k3 (76.33), AC 的分化阶段最大 k 值为 k1 (68.60), 因此本次试验中原生国兰在原球茎分化阶段最佳的外源激素配比为: 6-BA 0.4 mg/L + IBA 0.6 mg/L + AC 0.5 g/L。

Table 4. Effect of different hormone treatments on protocorm multiplication and differentiation

表 4. 不同外源激素对比对原球茎增殖、分化的影响

处理序号 Treatment No.	激素(mg/L) Hormone		AC (g/L)	原球茎增殖倍数 Protocorm multiplication time	分化率(%) Differentiation rate
	6-BA	IBA			
1	0.5	0.2	4.0	3.1	43.6
2	0.5	0.4	2.0	5.2	75.0
3	0.5	0.6	0.5	6.1	77.5
4	1.0	0.2	2.0	4.0	49.2
5	1.0	0.4	0.5	5.7	83.4
6	1.0	0.6	4.0	7.3	96.6
7	1.5	0.2	0.5	2.6	44.9
8	1.5	0.4	4.0	5.5	62.6
9	1.5	0.6	2.0	5.8	54.9

3.3. 不同激素配比对原生国兰生根的影响

增殖培养的原球茎生长至 70 d 左右, 开始分化生成不定根, 但此时生成的不定根较为细弱, 且小苗苗高增长几乎停滞, 这大大降低了移栽苗的成活率, 因此在小苗生根前, 必须进行壮苗培养, 具体方法为: 将增殖培养时期由原球茎分化成的无根苗切割成单苗, 并转入壮苗生根培养基。在 4 种不同配方的培养基中可观察到, 10 d 左右单苗与培养基接触部位开始膨大, 并形成根原基, 20 d 左右可以观察到有不定根生成, 且植株有明显增高, 当生长至 40 d 后, 统计 4 种不同配方培养基中单苗的生长状况(生根率、根粗平均值、根长平均值、苗高平均值、根数平均值), 结果见表 6。

由表 6 反映数据可知, 处理 3 与其他处理相比, 更能促进组培苗生根, 与处理 4 相比, 处理 3 仅苗高平均数略低, 综合考虑, 应选择处理 3 为适宜促进国兰生根的配方。因此, 1/2MS + IBA 0.4 mg/L + AC 1.0 g/L 为促进国兰生根的适培养基。

4. 试验总结及讨论

本次试验利用广西北部广泛生长的蕙兰侧芽作为组培快繁材料, 利用正交试验方法, 分别探究不同外源激素对外植体原球茎的诱导形成、增殖与分化、壮苗及生根的影响, 从而筛选出在不同阶段适宜的外源激素配比。在原球茎诱导期适宜培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.6 mg/L + AC 4.0 mg/L; 原球茎增殖期适宜培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.4 mg/L + AC 4.0 g/L; 原球茎分化期适宜培养基为 MS + 6-BA 0.4 mg/L + IBA 0.6 mg/L + AC 0.5 g/L; 壮苗及生根阶段适宜培养基为 1/2MS + IBA 0.4 mg/L + AC 1.0 g/L。利用正交试验中所得的 R 值比较可知, IBA 和 6-BA 在原球茎诱导形成阶段和原球茎分化阶段的影响作用相对较大, 在原球茎增殖阶段影响作用相对较小, 两种外源激素相比较, IBA 的影响作用更为明显。与另外两种外源激素相比 AC 在各阶段的影响相对较弱, 但 AC 与酚类及其氧化物具有极强的亲和作用, 而酚类及其氧化物又是导致外植体褐变的诱导物质, AC 在外植体培养过程中可以起到很好的抗褐变作用[4], 因此各阶段中 AC 的含量也具有重要的影响。

Table 5. Statistical analysis of protocorm multiplication and differentiation

表 5. 原球茎增殖、分化试验统计分析

3 水平平均值 Three level mean value	增殖倍数 Multiplication time			分化率(%) Differentiation rate		
	6-BA	IBA	AC	6-BA	IBA	AC
K1	4.80	3.23	4.80	65.37	45.90	68.60
K2	5.67	5.47	5.00	76.40	73.67	59.70
K3	4.63	4.03	5.30	54.13	76.33	67.60
R	1.04	2.24	0.50	22.27	30.43	8.90

Table 6. Effect of different hormone treatments on root

表 6. 不同激素配比对原生国兰生根的影响

处理序号 Treatment No.	IBA (mg/L)	生根率(%) Rooting rate	根粗平均值(cm) Mean root length	根长平均值(cm) Mean root length	苗高平均值(cm) Mean plantlet height	根数平均值(条) Mean root number
1	0	66	0.169	0.822	1.753	0.87
2	0.2	83	0.220	0.869	2.552	1.25
3	0.4	98	0.293	1.288	2.790	2.91
4	0.6	95	0.267	1.259	2.815	2.66

基金项目

桂林市科技成果转化与推广项目(2016011303-1)。

参考文献 (References)

- [1] 李慧敏. 兰花组培快繁研究进展[J]. 农业研究与应用, 2014(1): 53-56.
- [2] 王熊. 兰花快速无性系繁殖的研究及花芽分化的探讨[J]. 植物生理学报, 1984(4): 13-14.
- [3] 刘幸佳. 几种国兰组织培养及春兰菌根真俊研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江农林大学, 2013.
- [4] 张先云, 袁秀云, 马杰. 杂交兰的组织培养与快速繁殖技术研究[J]. 河南科学, 2009, 27(4): 419-421.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: br@hanspub.org