

文章编号: 1674-7054(2013)03-0246-05

# 唐菖蒲茎尖脱毒培养技术及其在生产上的应用

张淑娟, 刘与明, 马丽娟, 翁 萍

(厦门市园林植物园 福建 厦门 361003)

**摘 要:** 唐菖蒲种球微小茎尖在  $MS + 6-BA\ 1.0 \sim 1.5\ mg \cdot L^{-1} + NAA\ 0.1 \sim 0.15\ mg \cdot L^{-1}$  的培养基上可诱导出丛生芽, 每 25 d 继代扩繁 1 次, 增殖系数为 3~4 倍; 将无根苗接种到  $1/2\ MS + NAA\ 0.3\ mg \cdot L^{-1}$  的培养基上, 15~20 d 便可形成良好的根系; 继续培养 3~4 个月, 可形成试管小球茎。经检测, 供试的 5 个品种的组培苗均未发现感染菜豆黄花叶病毒、黄瓜花叶病毒、烟草环斑病毒和蚕豆萎焉病毒, 获得无病毒植株。将无毒试管小球茎作为原原种, 在隔离网内进行栽培繁殖, 可为大田生产提供无毒种球。

**关键词:** 唐菖蒲; 茎尖培养; 脱毒; 试管球; 繁殖体系

**中图分类号:** S 682.2<sup>+</sup>4

**文献标志码:** A

唐菖蒲(*Gladiolus hybrids* Hort.) 系鸢尾科多年生球茎草本植物, 其挺拔的花枝形似利剑, 故别称剑兰, 栽培品种极为丰富, 花姿秀丽且色彩多样, 而且易保鲜, 耐贮运, 具有很高的观赏价值, 是世界四大切花之一。20 世纪 90 年代, 我国唐菖蒲种植曾盛极一时, 南北均有规模化栽培, 但由于缺乏系统的和科学的繁殖体系, 种性退化, 尤其是病毒引起的退化更为严重(危害唐菖蒲的病毒有近 10 种), 加上栽培粗放, 栽培技术相对落后, 以及市场等原因, 从而造成了唐菖蒲的种植面积明显萎缩。近年来, 我国唐菖蒲产区已先后发现了菜豆黄化花叶病毒(*Bean yellow mosaic virus*, BYMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、蚕豆萎焉病毒(*Broad bean wilt virus*, BBWV)、烟草环斑病毒(*Tobacco ring spot virus*, TRSV) 4 种<sup>[1]</sup>。病毒的侵染使唐菖蒲植株矮化、叶片出现褪绿、条纹或皱缩、叶缘呈锯齿状、花朵变小、花色变淡等<sup>[2-4]</sup>, 带毒种球则表现斑驳、个变小或畸形等。种性的退化, 使产量和质量受到很大影响, 甚至完全失去观赏价值。通过茎尖培养的方法可以脱除病毒, 恢复原品种的优良特性, 是解决唐菖蒲退化问题的可靠途径。多年来, 国内科研工作者们一直致力于这一领域的研究, 采用茎尖等部位以及热处理等方法进行组织培养脱毒研究, 取得了较好的脱毒效果<sup>[5-8]</sup>, 但是从研究成果到实际应用还相对滞后<sup>[9]</sup>。为了解决唐菖蒲种球受病毒侵染及退化问题, 笔者采用茎尖培养的方法, 建立了唐菖蒲的脱病毒无性系, 加快了优良品种无毒籽球的繁殖速度。现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 供试的品种为: 青骨红、粉友谊、马加烈、超级玫瑰和莎莎花边。其中, 青骨红、粉友谊取自清流鲜花花场, 马加烈取自厦门集美琴鹭鲜花种植专业社, 超级玫瑰、莎莎花边来源于中国农科院蔬菜花卉研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 茎尖培养方法** 剥去唐菖蒲球茎(直径约 3 cm) 外面的数层包片, 用自来水冲洗后, 于超净工作台上用  $\varphi = 75\%$  的酒精浸泡数秒, 再置于  $w = 0.1\%$  的升汞溶液中消毒 15 min, 接着用无菌水冲洗 5~6 次。在双目解剖镜下切取茎尖(大小约 0.3~0.5 mm), 然后接入诱导培养基中, 每瓶 2 个茎尖。

收稿日期: 2013-06-26

基金项目: 福建省林业厅花卉种苗科技攻关项目

作者简介: 张淑娟(1958-), 女, 福建龙岩人, 福建省厦门市园林植物园高级农艺师。

通信作者: 刘与明, 男, 福建厦门人, 福建省厦门市园林植物园高级农艺师。E-mail: liuym0057@163.com

1.2.2 培养基 不同阶段的培养基配方见表 1。

表 1 不同培养阶段的培养基配方  
Tab.1 The culture medium for various culture stages

培养阶段 Culture stages	培养基代号 Medium code	基本培养基 Basal medium	6 - BA/ ( mg · L <sup>-1</sup> )	NAA/ ( mg · L <sup>-1</sup> )	白糖/( g · L <sup>-1</sup> ) Sugar
茎尖诱导丛生芽 Shoot tips induced into clustered buds	I <sub>1</sub>	MS	0.5	0.05	25
	I <sub>2</sub>	MS	1.0	0.10	25
	I <sub>3</sub>	MS	1.5	0.15	25
	I <sub>4</sub>	MS	2.0	0.20	25
丛生芽继代增殖 Clustered buds proliferated via subculture	II <sub>1</sub>	2/3 MS	0.5	0.05	25
	II <sub>2</sub>	2/3 MS	1.0	0.10	25
	II <sub>3</sub>	2/3 MS	1.5	0.15	25
	II <sub>4</sub>	2/3 MS	2.0	0.20	25
无根苗生根 Plantlet rooting	III <sub>1</sub>	1/2 MS	—	0.1	20
	III <sub>2</sub>	1/2 MS	—	0.3	20
	III <sub>3</sub>	1/2 MS	—	0.5	20
	III <sub>4</sub>	1/2 MS	—	0.7	20

注: pH 值均为 6.2; 微量元素及有机成分均用全量  
Note: pH value is 6.2; Trace elements and organic contents are full in dosage

- 1.2.3 培养条件 培养温度 25 ~ 27 ℃ ,光照强度 2 000 lx ,每天光照 10 h。
- 1.2.4 病毒检测 委托厦门检验检疫局中心实验室检测 ,采用 SN / T 2964 - 2011 和 SN / T1146 - 2010 标准进行检测 ,每个品种 15 份茎尖再生植株。
- 1.2.5 组培苗的驯化与移栽
- 1.2.5.1 组培苗移栽 秋冬季节 ,将苗高 5 ~ 8 cm ,约有 5 条根的瓶苗放在常温下炼苗 3 ~ 5 d ,然后用镊子轻轻取出 ,用清水洗净试管苗根部的培养基 ,最后栽植于洁净的珍珠岩基质中。
- 1.2.5.2 试管小球茎的栽培 收获的试管小球茎经低温处理后作为原原种 ,于秋季天气凉爽时栽植于  $V_{\text{泥炭土}}:V_{\text{珍珠岩}}:V_{\text{岩棉灰}}=3:1:1$  的混合基质中。

2 结果与分析

- 2.1 茎尖外植体接种在 4 种诱导培养基上丛生芽的发生情况 唐菖蒲茎尖在附加不同质量浓度的 6 - BA 和 NAA 的 MS 培养基上培养约 14 d ,茎尖开始膨大( 图版 1 - 1) ,并逐渐在其周围长出若干突起 ,30 ~ 35 d 时 ,出现丛生芽。从表 2 可知 ,不同质量浓度的 6 - BA 和 NAA 对茎尖培养和丛生芽诱导的效果不同 ,在 6 - BA 0.5 ~ 2 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.05 ~ 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 的条件下 ,外植体均可诱导出丛生芽 ,但从丛生芽的生长状况看 ,以 I<sub>3</sub> 和 I<sub>2</sub> 培养基诱导的丛生芽长得较长 ,芽较健壮、数量也较多 ,达 5 ~ 7 个 ,未见愈伤组织发生; 处理 I<sub>1</sub> 培养基诱导的丛生芽长势较弱 ,芽较短、较细 ,发芽数较少 ,仅 2 ~ 4 个 ,而且丛生芽与培养基接触处有少量疏松的不规则愈伤组织发生; 处理 I<sub>4</sub> 培养基诱导的丛生芽也较多 ,但多数芽短小 ,不易长高 ,需延长培养时间才能长高。由此说明 I<sub>2</sub>、I<sub>3</sub> 培养基的 6 - BA 和 NAA 的用量与比例均适合唐菖蒲茎尖诱导丛生芽。
- 2.2 丛生芽的继代增殖 丛生芽增殖培养基中 6 - BA 和 NAA 的质量浓度设置与诱导阶段一致 ,只是基本培养基改为 2/3MS。从表 3 可知 ,在丛生芽增殖的最初 3 个周期里 ,与诱导结果相似 ,II<sub>3</sub> 和 II<sub>2</sub> 培养基的增殖效果最好 ,但随着多代扩大增殖( 大约 4 ~ 6 代开始) ,丛生芽增殖最好的培养基为 II<sub>2</sub> 和 II<sub>1</sub> ,即 6 - BA 的质量浓度为 1.0 ~ 0.5 mg · L<sup>-1</sup> ,丛生芽长势好 ,芽色较绿 ,数量较多且生长正常、无畸形( 图版 1 - 2) ,而 II<sub>4</sub> 和 II<sub>3</sub> 培养基因 6 - BA 和 NAA 的质量浓度较高 ,丛生芽短小簇生 ,芽呈黄白色 ,并出现畸形苗。笔者认为 丛生芽增殖初期效果最好的培养基为 2/3 MS + 6 - BA 1.0 ~ 1.5 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.10 ~ 0.15 mg · L<sup>-1</sup> ,每 25 d 丛生芽可增殖 3 ~ 4 倍。



图版 1

1. 膨大的茎尖; 2. 生长正常、长势良好的丛生芽; 3. 拟生根的粗壮组培苗; 4. 发育良好的健壮根系; 5. 移植在珍珠岩上的试管苗; 6. 试管小球茎; 7. 试管球出瓶前置于大棚内炼苗; 8. 收获的试管小球茎; 9. 晾干的试管小球茎

Legends

1. The swollen shoot tips; 2. Clustered buds with normal and vigorous growth; 3. The strong plantlets ready to root; 4. The well developed root system; 5. The *in vitro* plants transferred onto in the perlite; 6. The *in vitro* bulbs; 7. The *in vitro* plants hardening in the greenhouse; 8. The *in vitro* bulbs harvested; 9. The *in vitro* bulbs air-dried

表 2 不同质量浓度的 6-BA 和 NAA 对外植体诱导丛生芽的影响

Tab.2 The effects of different concentrations of 6-BA and NAA on the induction of the clustered buds

培养基代号 Medium code	6-BA /(mg · L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg · L <sup>-1</sup> )	芽长/cm Length of buds	芽数/个 Number of buds	芽生长状况 Growth of the buds
I <sub>1</sub>	0.5	0.05	1.5 ~ 2.0	2 ~ 4	芽较短、较细,芽数较少,芽呈黄绿色,有少量疏松愈伤组织 Buds shorter, thinner, fewer and yellow with a few loose calli
I <sub>2</sub>	1.0	0.10	2.0 ~ 3.0	5 ~ 6	芽长,数量较多,较粗壮,芽绿色 Buds long, more, rather robust and green
I <sub>3</sub>	1.5	0.15	2.5 ~ 3.5	5 ~ 7	芽长,数量多,粗壮,芽绿色 Buds long, numerous, robust, green
I <sub>4</sub>	2.0	0.20	0.5 ~ 1.0	7	芽数多,芽苗密集、短小,芽呈黄白色 Buds, numerous, dense, small, yellowish-white

注: 茎尖外植体诱导培养 42 d 时, 观察记载丛生芽发生和生长状况

Note: The regeneration and growth of the clustered buds induced from shoot tips as explants for 42 d were observed

表 3 不同质量浓度的 6-BA 和 NAA 对丛生芽增殖的影响

Tab.3 The effects of different concentrations of 6-BA and NAA on the proliferation of the clustered buds			
培养基代号 Medium code	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	芽生长情况 Growth of the buds
Ⅱ <sub>1</sub>	0.5	0.05	形成 3~5 个芽,平均芽长 3 cm,较细弱,色绿,外观正常、无畸形 3-5 shoots,3 cm tall by average, slender, green and normal
Ⅱ <sub>2</sub>	1.0	0.1	形成 5~8 个芽,平均芽长 4cm,芽粗壮,生长旺盛,芽苗绿,外观正常 无畸形 5-8 shoots,4cm tall by average, vigorous and normal
Ⅱ <sub>3</sub>	1.5	0.15	形成 5~8 个芽,芽较短,生长较慢,色泽黄白,有畸形苗出现 5-8 shoots, short, slow in growth, yellow; few abnormal
Ⅱ <sub>4</sub>	2.0	0.2	形成 6~10 个芽,芽矮小、密集簇生,生长缓慢,色黄白,畸形苗较多 6-10 shoots, small, densely clustered, slow in growth, yellow white; more abnormal

注: 继代转接培养 25 d 时观察记录瓶苗生长状况  
Note: The growth of in vitro plantlets after 25days of sub-culture was observed

2.3 无根苗的生根 切取增殖瓶中 2~3 cm 高的健壮组培苗(图版 1-3),接入生根培养基中,培养15~20 d 即可长出发育良好的根系(图版 1-4)。从表 4 可知,Ⅲ<sub>2</sub> 培养基生根效果最佳,发根多,生根快。

表 4 不同质量浓度的 NAA 对唐菖蒲组培苗生根的影响

Tab.4 The effects of different concentrations of NAA on the roots of Gladiolus hybrids cultured plantlets					
培养基代号 Medium code	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	根始发时间/d Initial time for root growth	根数/条 Number of roots	根长/cm Length of roots	根系生长状况 Growth of the roots
Ⅲ <sub>1</sub>	0.1	18	3~5	0.2~0.4	根较细,较短、根数较少 Roots, thin, shorter and fewer
Ⅲ <sub>2</sub>	0.3	10	5~8	1.0~1.5	根系较粗壮、较长,发根多,表面较光滑 Roots, thicker, longer, numerous, smooth on surface
Ⅲ <sub>3</sub>	0.5	10	5~8	1.0~1.5	根系较粗壮、发根多,但有根毛发生,粘住 培养基,不易清洗 Roots, robust, numerous, with some hairy roots sticking medium, not easy to clean
Ⅲ <sub>4</sub>	0.7	15	5~8	1.0~1.5	根系粗壮,但密布根毛,不易清洗 Roots, thick, with dense hairy roots, not easy to clean

注: 接种 30 d 后,观察根的数量和长度  
Note: The root number and length after 30 days of root inoculation were observed

2.4 组培苗的移植 在隔离网棚中,以洁净的珍珠岩作为基质,对发育良好的生根组培苗进行移栽(图版 1-5),约 15 d 就能成活。

从移植成活情况来看,如果气温在 12~26℃、空气湿度保持约 80%,移植成活率约达 70%,但是厦门的夏季炎热漫长,网室内的温度常高达 35~40℃,唐菖蒲试管苗的移植成活率一般为 30%~40%。因此,只有秋冬季节适合唐菖蒲试管苗的移植。

2.5 试管休眠球的培育 组培苗生根后,在瓶中继续培养 3~4 个月,可形成试管小球茎(图版 1-6),小球茎的数量由瓶内生根苗的数量所决定,如果瓶中有 15~20 株生根苗,便可形成 15~20 粒的 0.3~0.8 cm 的休眠球茎。

在培养的最初 1~2 个月,组培苗可长至 10~20 cm,叶子在瓶中盘叠生长,呈深绿色,为了增加光合效率,可将瓶苗置于塑料大棚内接受阳光照射(图版 1-7);2~3 个月时,便可看到每株苗的基部形成白色小球茎;3~4 个月时,组培苗叶色逐渐变黄,球茎变褐色,形成栓皮,进入休眠状态。此时,可取出瓶中小球茎(图版 1-8),自然晾干(图版 1-9)后置于 5℃ 冰箱中冷藏保存。这些小球茎可作为隔离网室栽培的种球(原原种)。在严格隔离的条件下,经原原种扩繁所生产的籽球为一级原种,并依此类推生产大量二级原种种球,可作为组培脱毒复壮种球供应生产商。

2.6 组培苗的病毒检测 5 个品种的瓶苗先后送到厦门检验检疫局中心实验室进行检测,结果表明,供试的 5 个品种均不带菜豆黄花叶病毒、黄瓜花叶病毒、烟草环斑病毒和蚕豆萎焉病毒。

### 3 讨 论

结果表明,在 MS 培养基  $I_2$  和  $I_3$  中,分别添加  $1.0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 6-BA 和  $0.1 \sim 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NAA,均可诱导唐菖蒲茎尖产生丛生芽。但是  $I_4$  培养基( $\text{MS} + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )萌生的丛生芽较短、芽数多、芽苗密集、短小、不易长高,需延长培养时间才能长高,这与 6-BA 的质量浓度偏高有关,因为 6-BA 有促进侧芽萌发的作用;而  $I_1$  培养基( $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )诱导的侧芽数量少、细弱、长势差,说明培养基中 6-BA 的质量浓度偏低。因此,生长调节剂的用量对丛生芽诱导有很大的影响。

为了获得大量生长健壮的丛生苗,必须进行继代增殖,但在实际生产中,经多次继代后,丛生苗往往出现短小簇生状,不易长高,色泽由绿转黄白,甚至有畸形苗发生,这可能与组培苗在多次连续继代后,激素在体内的累积有关。因此,要注意观察瓶苗生长状况,及时调整培养基中 6-BA 和 NAA 的用量,才能在增殖阶段培养出生长正常的健壮丛生苗。

唐菖蒲组培苗的移栽成活率不高,除了移栽对温湿度条件有一定要求外,还由于组培苗比较幼嫩,故移栽成活率较低。而试管休眠球作为原原种冷藏处理后,在隔离温室中种植,成活率极高,接近 100%,且种球易于保管和贮藏。所以,采取收获试管休眠球进行隔离生产繁殖无毒种球供应市场,可省去试管苗移栽过程,是较简便可行的做法,易于生产中推广应用。

### 参考文献:

- [1] 熊佑清. 唐菖蒲种球退化原因与杂交育种的研究[J]. 中国园林, 2000, 16(6): 80-81.
- [2] 孔宝华, 杨丽霞, 范云华, 等. 云南省唐菖蒲病毒病的发生及防治[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(3): 241-242.
- [3] 张建如, 沈淑琳. 花卉植物病毒及病毒病[M]. 上海: 上海科技出版社, 1991.
- [4] 陈燕芳. 唐菖蒲病毒种类鉴定分布危害和检验技术研究[J]. 植物检疫, 1993, 7(4): 312-315.
- [5] 崔月花, 张彪, 高红明, 等. 唐菖蒲茎尖培养脱病毒的研究[J]. 江苏农业研究, 2000, 21(4): 88-89.
- [6] 杨家书, 刘丹红, 俞孕珍, 等. 热处理结合茎尖组织培养脱除唐菖蒲病毒的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1995, 26(4): 342-347.
- [7] 李昌禹, 郭太君, 焦培娟, 等. 唐菖蒲组培脱毒技术研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 358-360.
- [8] 叶长秋, 张敏丽. 唐菖蒲优质种球生产技术[J]. 山东林业科技, 2010(1): 82-83.
- [9] 郝红云, 义鸣放. 唐菖蒲生物技术研究进展[M]// 中国园艺学会球根花卉分会. 中国球根花卉年报. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005: 162-169.

(下转第 256 页)

## Effects of Rain-shelter Cultivation on the Organic Acid Content of Wine Grape Berry

LIU Rui , GAO Qian , DUAN Changqing , PAN Qihong

( College of Food Science and Nutritional Engineering , China Agricultural University , Beijing 100083 , China)

**Abstract:** The concentrations of 4 organic acids in the berries of *Vitis vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ and *V. vinifera*. ‘Chardonnay’ subjected to rain-shelter cultivation and open cultivation were assessed by using high performance liquid chromatography. The expression of *VvIdnDH* encoding L-Idonate Dehydrogenase , a key enzyme involved in tartaric acid biosynthesis , was analyzed through Real-time PCR. The results showed that rain-shelter cultivation significantly increased the contents of tartaric acid , malic acid and oxalic acid in developing ‘Cabernet Sauvignon’ grape berries , but no significant difference in contents of these organic acids at harvest was observed between the two cultivation ways. Rain-shelter cultivation almost did not change the level of the four organic acids of ‘Chardonnay’ grape berries as compared to the open cultivation. Analysis of the expression of *VvIdnDH* revealed that gene expression in young berries was significantly up-regulated owing to rain-shelter cultivation and that the transcript abundance was maintained at a certain level during the following development , which may be a main reason for a high level of tartaric acid in developing grapes under rain-shelter cultivation. This work will not only provide some guidelines for the improvement of the rain-shelter cultivation in production of wine grapes , but also help to uncover the mechanism of tartaric acid accumulation in grape berries.

**Key words:** rain-shelter cultivation; organic acids; wine grape berries

---

( 上接第 250 页)

## Tissue Culture of *Gladiolus hybrids* Hort with Shoot Tips as Explants

ZHUANG Shujuan , LIU Yuming , MA Lijuan , WENG Ping

( Xiamen Botanical Garden , Xiamen , Xiamen 361003 , China)

**Abstract:** The shoot tips of the bulbs of *Gladiolus hybrids* were selected as explants for tissue culture. They were cultured on MS medium containing  $1 - 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA and  $0.1 - 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA and induced to produce clustered buds. The clustered shoots were proliferated 3 to 4 times every 25 days after the clustered buds were subcultured. Rootless plantlets formed a strong root system on the  $1/2$  MS culture medium supplemented with  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA in 15 to 20 days , and then produced *in vitro* bulbs after 3 to 4 months of subculture. Virus detection showed that the *in vitro* bulbs of 5 varieties of *G. hybrids* were free of bean yellow mosaic virus ( BYMV ) , cucumber mosaic virus ( CMV ) , tobacco ring spot virus ( TRSV ) and broad bean wilt virus ( BB-WV ) . These virus-free *in vitro* bulbs ( initial bulbs ) were cultivated in the net house for propagation of *G. hybrids*. The virus-free bulbs propagated from the bulbs in the net house can be used for commercial cultivation in the field.

**Key words:** *Gladiolus hybrids*; shoot-tip culture; detoxification; *in vitro* bulb; proliferation system