维普资讯 http://www.cqvip.com

蝴蝶兰原球茎诱导与增殖研究

崔广荣 张子学 张从宇 胡能兵
(安徽科技学院植物科学院 安徽凤阳 233100)

摘要:以蝴蝶兰试管苗茎尖为外植体,接种于添加不同浓度激素配比的1/2 MS培养基上进行原球茎诱导。试验结果表明:在NAA与6-BA的不同浓度组合中,以1/2 MS + NAA 2.0 mg/L + 6-BA 4.0 mg/L诱导效果最好,诱导率达65%;在NAA与Ad的不同浓度组合中,以1/2 MS + NAA 2.0 mg/L + AD 4.0 mg/L诱导效果最好,诱导率达55%;在原球茎的增殖培养中,以1/2 MS + NAA 2.0 mg/L + 6-BA 2.0 ~ 4.0 mg/L + AD 2.0 mg/L培养基增殖效果最好,最高增殖系数可达9.98。

关键词 蝴蝶兰 茎尖 原球茎诱导 原球茎增殖 组织培养

Study on PLB Induction and Propagation of *Phalaenopsis*

Cui Guangrong, Zhang Zixue, Zhang Congyu, Hu Nengbing
(Plant Science Department of Anhui Science and Technology University Anhui Fengyang 233100)

Abstract: The stem tips of *phalaenopsis* test-tube shoot were used as explants to be cultured in the medium 1/2 MS with different concentrations of hormones. The results showed that the medium 1/2 MS + NAA 0.2 mg/L + 6-BA 4.0 mg/L was best suitable for protocorm-like body (PLB) induction among the combinations of NAA and 6-BA and the induction rate could reach to 65 percent. Among the combinations of NAA and Ad, the medium 1/2 MS + NAA 2.0 mg/L + AD 4.0 mg/L was best suitable for PLB induction and the induction rate reached to 55 percent. The best medium for PLB propagation was 1/2 MS + NAA 2.0 mg/L + 6-BA 2.0 - 4.0 mg/L + AD 2.0 mg/L and the highest propagation coefficient could reach to 9.98.

Key words *Phalaenopsis* Stem tip PLB inducing PLB propagation Tissue culture

蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)为兰科(Orchidaceae)蝴蝶兰属植物,素有"洋兰皇后"之称,株型奇特,乃单茎附生兰的代表种[10]。蝴蝶兰的人工繁殖主要通过种子无菌发芽和组织离体培养两条途径进行,离体茎尖、叶片等经培养后产生原球茎(Protocorm-like body, PLB)。原球茎的发生途径可通过愈伤组织[2]或由茎尖[1,4]、幼叶[2,4,8]等器官直接产生[5,6],再通过原球茎的增殖、分化培养而得到大量幼苗[1-6]。由于蝴蝶兰是一种杂交品系,因此前者虽然简单易行,短期内可获得大量幼苗,但是有性后代变异率高,除了少数自花系列较稳定以外,难以形成品质划一的大规模栽培。而通过离体器官诱导原球茎快繁法获得试管苗品质基本一致,增殖系数较高,变异型较少,适合大规模繁殖[1,2,4,6],并形成所谓"兰花工业"。以上两种快繁方法都有不少报道,但以不同激素组合进行蝴蝶兰茎尖诱导原球茎的系统研究却不多见[9]。

本试验采用蝴蝶兰(*Phalaenopsis Tsuei foa Lady*)试管苗为材料,剥取茎尖进行原球茎(PLB)诱导及增殖,研究不同激素及浓度组合对蝴蝶兰原球茎(PLB)诱导、增殖的影响。旨在筛选出适合蝴蝶兰原球茎(PLB)诱导、增殖的培养基配方,建立试管苗快繁体系,为蝴蝶兰的工厂化生产提供理论依据和技术支持,并为进一步研究外源激素对原球茎发生发育作用的生理生化机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料及主要药品

蝴蝶兰试管苗(品种为条纹花系霍娅淑女, *P. Tsuei Foa Lady*);6-苄基腺嘌呤(6-BA);腺嘌呤硫酸盐(Ad);

收稿日期:2006-08-26。
基金项目:安徽科技学院自然科学基金项目(2003 Y 207)和学科梯队建设项目。
作者简介:崔广荣(1966 ~),男,副教授,硕士;主要从事植物组织培养和遗传学的教学及研究工作。

维普资讯 http://www.cqvip.com

萘乙酸(NAA);新鲜椰汁。

1.1.2 基本培养基

1/2 MS + 糖 20 g/L + 琼脂 4 g/L + 椰汁100 ml/L + 外源激素;pH = 5.8。

1.1.3 培养条件

温度(25 ± 1)℃;光照强度 1 500 ~ 2 000 lx;光照时间 12 h/d。

1.2 方 法

1.2.1 原球茎诱导

(1)以 1/2 MS 为基本培养基,分别添加不同浓度 6-BA(2.0、4.0、8.0 mg/L)和 NAA(0、2.0、4.0 mg/L),按照完全随机组合设计,形成 9 个处理(见表 1);(2)以 1/2 MS 为培养基,分别添加不同浓度的 Ad(2.0、4.0、8.0 mg/L)和 NAA(0、2.0、4.0 mg/L),按照完全随机组合设计,形成 9 个处理(见表 2);(3)将前两批处理中最好的一个处理配方进行组合形成一个以 6-BA、AD、NAA 三种激素的组合配方,随机接种一些茎尖,观察记录生长状况,60 d 统计计算其诱导率,并与前两批最好处理组合比较优劣。剥离茎尖直径大小约 0.5 mm,每处理共接种 40 个茎尖。

表 1 6-BA 和 NAA 浓度组合对蝴蝶兰原球茎诱导的影响

处理号	外源激素(mg/L)		接种茎尖数	形成原球茎茎尖数	诱导率(%)	差异显著性(5%)
	NAA	6-BA				
Ⅰ-1	0.0	2.0	40	12	30	bc
Ⅰ-2	0.0	4.0	40	16	40	b
Ⅰ-3	0.0	8.0	40	14	35	b
Ⅰ-4	2.0	2.0	40	22	55	ab
Ⅰ-5	2.0	4.0	40	26	65	a
Ⅰ-6	2.0	8.0	40	16	40	b
Ⅰ-7	4.0	2.0	40	8	20	c
Ⅰ-8	4.0	4.0	40	16	40	b
Ⅰ-9	4.0	8.0	40	12	30	bc

表 2 Ad 和 NAA 浓度组合对蝴蝶兰原球茎诱导的影响

处理号	外源激素(mg/L)		接种茎尖数	形成原球茎茎尖数	诱导率(%)	差异显著性(5%)
	Ad	NAA				
Ⅱ-1	2.0	0.0	40	4	10	c
Ⅱ-2	2.0	2.0	40	8	20	bc
Ⅱ-3	2.0	4.0	40	12	30	b
Ⅱ-4	4.0	0.0	40	22	55	a
Ⅱ-5	4.0	2.0	40	22	55	a
Ⅱ-6	4.0	4.0	40	12	30	b
Ⅱ-7	8.0	0.0	40	0	0	d
Ⅱ-8	8.0	2.0	40	0	0	d
Ⅱ-9	8.0	4.0	40	0	0	d

1.2.2 原球茎增殖

以 1/2 MS 为培养基 + 6-BA(2.0、4.0、6.0) + AD(2.0、4.0、6.0) + NAA 2.0 组合形成 9 个处理(见表 3),每处理 10 瓶,每接种原球茎质量为 0.5 g 左右。培养 60 d 后称量原球茎重量并计算出原球茎的增殖系数(增殖质量/接种质量)。为了减少称重时误差,进行 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 外源激素对蝴蝶兰茎尖诱导及原球茎生长的影响

2.1.1 NAA 与 6-BA 对蝴蝶兰茎尖诱导及原球茎生长的影响

接种后 10 d 内,茎尖变化不明显,只是在接种茎尖的培养基处有少量的褐化现象存在,这是茎尖伤口流出的酚类物质被氧化的缘故,所有的处理中都存在这一现象。接种后 20 d 左右,茎尖均开始呈亮绿色,但随着培养时间的延长,不同处理中接种的茎尖生长出现了不同的变化。在不含 NAA 的处理中(处理Ⅰ-1、2、3)随着 6-BA 浓度的提高,PLB 形成率不断增大,但处理Ⅰ-2 和处理Ⅰ-3 间的差异不显著,且处理Ⅰ-1 和处理Ⅰ-2 中有部分茎尖形成幼苗;在 NAA 含量为 2.0 mg/L、6-BA 浓度为 2.0 mg/L 和 4.0 mg/L 时,PLB 的形成率显著提高,表现出两种激素对 PLB 诱导的协同促进作用,但 6-BA 浓度为 8.0 mg/L 时,诱导率反而降低。不过在这 3 个处理中(处理Ⅰ-4、5、6)无幼苗形成现象,部分茎尖褐化死亡。在 NAA 浓度为 4.0 mg/L 时,PLB 诱导率有降低的趋势,因褐化死亡的茎尖较多,反映出过高的 NAA 含量不利于茎尖形成 PLB,实际上过高的 6-BA 也不利于 PLB 的形成。在接种 40 d 左右,所有形成的 PLB 均增殖为类似愈伤组织的颗粒状,但大小因不同处理而不同。总体上看,处理Ⅰ-5 中的 PLB 生长较快,颗粒状的 PLB 明显(见版图Ⅰ-A)。各处理中茎尖的形成率如表 1 所示。

2.1.2 Ad 与 6-BA 对蝴蝶兰茎尖诱导及原球茎生长的影响

不同浓度的两种激素及其组合对茎尖诱导率的影响如表 2 所示。接种 10 d 内各处理中接种的茎尖生长变化与 2.1.1 的结果类似。在随后的培养过程中,Ad 的作用表现出与 6-BA 的作用存在一定的差异。首先是过高的 Ad 浓度(8.0 mg/L)对原球茎形成起着完全的抑制作用,表现为所有的茎尖都逐渐褐化死亡;其次是 Ad 与 NAA 的协同作用不明显,两者在低浓度时才表现出一定的协同作用效应(处理Ⅱ-2、3),但其 PLB 诱导率还是相对较低;Ad作用形成的PLB与6-BA和NAA协同效应形成的PLB虽然在后期培养中的增殖效应没有差异,

维普资讯 http://www.cqvip.com

但其对茎尖褐化死亡有一定促进作用。不同浓度的Ad与NAA及其组合诱导形成的PLB在颜色、形状等物理特征上与处理Ⅰ-5没有根本区别。

2.1.3 NAA、6-BA及Ad对蝴蝶兰茎尖诱导及原球茎生长的影响

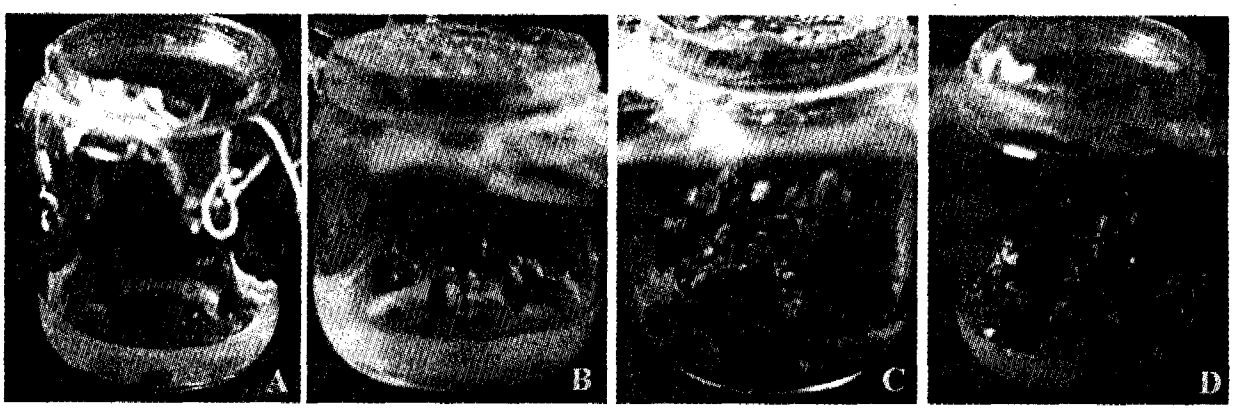
为了进一步考察2.1.1和2.1.2中的最佳处理激素组合是否能协同作用而能够进一步提高茎尖诱导率,将上述结果中的最佳激素组合重新组合起来,形成了2.0 mg/L NAA +4.0 mg/L 6-BA +4.0 mg/L Ad新的激素组合。结果发现这种组合PLB诱导率为56%,并未能提高PLB的形成率(与2.0 mg/L NAA +4.0 mg/L Ad组合的诱导率相当,低于2.0 mg/L NAA +4.0 mg/L 6-BA组合)。但同时也发现该组合形成的PLB在后期的增殖生长较快,PLB颗粒状更加明显(见图版Ⅰ-B)。

表3 不同浓度激素组合对蝴蝶兰原球茎(PLB)增殖的影响

处理号	外源激素(mg/L)			增殖系数			平均增殖系数	差异显著性5%	PLB生长状况
	NAA	6-BA	Ad	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ			
Ⅲ-1	2.0	0.0	0.0	1.12	1.06	1.20	1.13	g	较多苗分化
Ⅲ-2	2.0	0.0	2.0	4.64	5.02	4.73	4.80	e	正常
Ⅲ-3	2.0	0.0	4.0	6.66	6.91	6.58	6.72	cd	正常
Ⅲ-4	2.0	0.0	6.0	6.70	6.59	6.60	6.63	cd	少量褐化
Ⅲ-5	2.0	2.0	0.0	8.87	9.11	9.02	9.00	ab	少量苗分化
Ⅲ-6	2.0	2.0	2.0	10.03	9.89	10.02	9.98	a	正常
Ⅲ-7	2.0	2.0	4.0	9.31	9.11	8.90	9.11	ab	正常
Ⅲ-8	2.0	2.0	6.0	7.11	6.89	7.28	7.09	c	少量褐化
Ⅲ-9	2.0	4.0	0.0	9.15	9.53	9.20	9.29	ab	少量苗分化
Ⅲ-10	2.0	4.0	2.0	9.56	9.98	9.19	9.58	a	正常
Ⅲ-11	2.0	4.0	4.0	9.36	9.39	9.57	9.44	ab	正常
Ⅲ-12	2.0	4.0	6.0	8.64	8.30	8.20	8.38	b	较多褐化
Ⅲ-13	2.0	6.0	0.0	7.21	6.96	7.30	7.16	c	正常
Ⅲ-14	2.0	6.0	2.0	6.97	7.11	7.01	7.03	c	正常
Ⅲ-15	2.0	6.0	4.0	5.15	5.09	5.28	5.17	d	少量褐化
Ⅲ-16	2.0	6.0	6.0	3.25	3.17	3.41	2.28	f	较多褐化

2.2 不同激素浓度对蝴蝶兰原球茎(PLB)增殖和生长的影响

在所有处理中,PLB在接种后初期(10 d内)并无明显的变化,在接种15 d左右,部分处理中的PLB开始增殖,随着培养时间的推迟,不同处理中的PLB增殖表现出来的差异越来越明显,如表3所示。最为明显的是在不含Ad而6-BA浓度相对较低或无的情况下(处理Ⅲ-1、5、9),有部分PLB分化成苗(见图版Ⅰ-C);而在Ad和6-BA浓度过高时则会引起部分PLB褐化现象。总体上来看,保持较高浓度(2.0~4.0 mg/L)的细胞分裂素对蝴蝶兰PLB增殖有利,Ad和6-BA在一定的浓度范围内的配合使用,能有效促进蝴蝶兰PLB的增殖,体现了激素之间的协同作用,如处理Ⅲ-6(见图版Ⅰ-D)。另外,与单独使用NAA相比,单独使用6-BA在2.0~6.0 mg/L范围内能有效地促进蝴蝶兰PLB的增殖(处理Ⅲ-5、9、13),Ad在2.0~6.0 mg/L范围内,对蝴蝶兰的PLB增殖作用也极为显著,而且无苗的分化,这一点与其对文心兰原球茎的作用类似,有促进PLB形成和增殖作用[11]。



图版Ⅰ说明:A.处理Ⅰ-5中的原球茎诱导及生长;B.处理Ⅱ-6中的原球茎诱导及生长;C.原球茎在处理Ⅲ-5中增殖,有部分原球茎分化成苗;D.原球茎在处理Ⅲ-6中的增殖。

3 讨论与结论

蝴蝶兰等洋兰原球茎诱导、增殖是实现工厂化育苗、保持种苗优良性状一致的重要环节,也是兰花发育生物学、基因工程等相关研究的重要技术基础,研究兰花高效的原球茎诱导、增殖体系不仅具有重要的应用价值,而且在基础理论研究方面也具有重要意义。影响蝴蝶兰原球茎诱导、形成的因素比较多,但主要包括培养基类型、外源激素的组成及浓度、外植体种类、有机物的添加等方面[2,4,6~9],而外源激素的种类及其浓度对原球茎能否形成

维普资讯 http://www.cqvip.com

起着关键的作用[7-9]。近些年来,国内的一些学者在培养基类型、有机物的添加、外植体的种类等方面都做了较为具体而详细的研究[4,5,9],但在激素及组合方面的研究不够系统,尤其是以1/2 MS为基本培养基时的原球茎诱导、增殖的效果不够理想,诱导率和增殖率相对较低[4,9]。

蝴蝶兰原球茎的诱导需要较高浓度的细胞分裂素和生长素,但过高的外源激素则不利于茎尖的成活、原球茎的诱导与增殖,主要表现为外植体的褐化死亡。导致外植体褐化的原因主要包括基因型、生理状态、培养条件、培养基无机盐浓度及激素的种类和浓度等[7]。本试验研究表明,采用合适的外源激素及其浓度组合,能有效提高蝴蝶兰原球茎的诱导率和增殖率。而在6-BA或Ad浓度超过4.0 mg/L时,易引起蝴蝶兰茎尖或原球茎褐化,两种高浓度的细胞分裂素组合使用会加重褐化程度,但较低浓度细胞分裂素又易使茎尖或原球茎形成苗。在生产上如何采用合适的激素组合进行原球茎增殖和分化苗而又不至于原球茎积累过多,本试验的相关结果可为生产者提供有益的参考。

参考文献

1 Intuwong O, Sagacus Y. Clonal propagation of Phlaenopsis by shoot-tip culture[J]. Amer Orchid Soc Bull, 1975(93): 894-895.
2 Ishii Y, Takamura T, Goi M Callus induction and somatic embryogenesis of Phalaenopsis[J]. Plant Cell Rep, 1998(17): 446-450.
3 鲁雪华,郭文杰,徐立晖,等. 蝴蝶兰花梗节间段培养繁殖的初步研究[J]. 园艺学报,2002,29(5):491~492.
4 秦凡,周吉源. 不同生长调节剂对蝴蝶兰快速繁殖的影响[J]. 武汉植物研究,2003,21(5):452~456.
5 何松林,王献,鲁琳,等. 培养基和添加物对蝴蝶兰原球茎分化幼苗的影响[J]. 2003,5:11~13.
6 王怀宇. 蝴蝶兰的快速无性繁殖[J]. 园艺学报,1989,16(1):73~77.
7 潭文澄. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1991,247~253.
8 扬美纯,周几伟,许鸿源. 外部因子对蝴蝶兰叶片原球茎状体发生的影响[J]. 广西植物,2000,18(4):344~346.
9 叶晓青,谢东,魏书. 不同激素水平对蝴蝶兰原球茎状体增殖影响[J]. 江苏林业科技,2000(增刊):27.
10 陈璋,蔡幼华. 洋兰[M]. 福州:福建科学技术出版社,2000,47~51.
11 崔广荣,刘士勋,刘敏,等. 文心兰茎尖组织培养的研究[J]. 种子,2004,23(12):16~19.

中国种子协会召开首届玉米种业峰会

为分析我国玉米种业发展面临的问题,探讨加快玉米种业发展的途径和措施,推动玉米种子企业的合作和交流,中国种子协会于2006年12月15日在辽宁沈阳召开了首届玉米种业峰会。协会副会长兼秘书长李立秋主持了会议。会议由辽宁东亚种业集团公司承办,来自中种集团、山东登海种业、北京奥瑞金种业、北京德农种业、合肥丰乐种业、北京金色农华种业等6家副会长单位和辽宁东亚种业、山西屯玉种业、三北种业、辽宁丹玉种业、河南农科院种业、吉林吉农高新等6家常务理事单位、理事单位的负责人,协会副会长、辽宁省农业科学院院长陶承光,协会副会长、辽宁省种子管理局局长申雅娟,以及协会秘书处的同志参加了会议。会议就建立公平的市场竞争秩序、组建玉米种业分会、建立种子企业定期磋商机制、加强企业间的联合等议题达成了广泛共识。

会议首先交流了2006~2007年度杂交玉米种子的产销形势。认为由于今年制种面积和产量进一步增加,加上已有的种子库存,明年杂交玉米种子总量供大于求较为突出。为维护种子市场的正常秩序,促进我国玉米种业的良性化发展,种子企业间要采取有序竞争的方式,既要向农民提供质优价廉的种子,又要反对竞相压价、低价抛售等不正当竞争行为,以维护种子市场的正常秩序,推动玉米种业的稳定发展。

针对玉米制种中存在的问题,会议倡议,为了维护正常的制种秩序,保护种子企业和制种农民的合法利益,种子企业要加大相互间的沟通与协调,反对争抢基地、非法制种、抢购套购等行为。同时,会议也希望政府有关部门进一步规范制种秩序,加强制种管理,给企业创造良好的制种环境,并帮助协调好企业、农民和地方之间的利益分配机制。

会议分析了当前我国玉米种业的发展状况。一致认为,自"种子工程"和《种子法》实施以来,民营玉米种子企业不断壮大,产业要素配置不断得到优化;产业集中度不断提高,此次与会的12家玉米种子企业的经营量已经占到全国的50%以上。玉米种业已经成为我国种业中市场化进程最快、发展最为迅猛的产业。同时,会议认为,现阶段我国玉米种子企业仍然"多、小、散",与种业发达国家相比,产业聚集度偏低,开发新品种和抵御市场风险的能力还很弱,种子企业之间、种子企业和科研单位之间要加强联合,以实现"双赢"和"共赢"。

会议建议尽快成立中国种子协会玉米种业分会。分会应以企业为主体,同时吸收有关管理和科研单位。希望协会秘书处在广泛征求各方意见的基础上,尽早拿出组建方案。会议认为,此次玉米种业峰会搭建了企业间相互沟通与交流的平台,增进了企业间的互信,一致同意将这种形式固定下来,以形成玉米种业定期磋商机制。最后,会议商定,下次峰会将于2007年3月份在北京举行,北京金色农华种业科技有限公司将承办下次峰会。