

蝴蝶兰无性快繁规模化生产中玻璃化原球茎状体产生的原因及其恢复<sup>1)</sup>

顾德峰 赵春莉 张红伟

(吉林农业大学, 长春, 130118)

宋彦君 谷素敏 张家旭

(吉林国联农业生物技术发展股份有限公司)

**摘要** 对蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)组培生产中引起原球茎状体玻璃化的原因以及玻璃化原球茎状体再利用的效果进行了研究。结果表明:随着激素质量浓度增高和继代培养时间的延长,原球茎状体玻璃化程度加重。当激素 NAA 为 5 mg/L、BA 为 10 mg/L,继代培养到第 9 代时,2 种培养基中玻璃化率分别高达 71% 和 65%。玻璃化原球茎状体的平均增殖率仅为 2.2%,再生植物率为 183 株/瓶,明显低于正常的原球茎状体的 5.3% 和 1 297 株/瓶。玻璃化原球茎状体在无激素培养基中经 2~3 代培养后,玻璃化原球茎状体的数量下降到 0.84%,玻璃化现象可得到明显恢复,恢复后的原球茎状体的分化能力和植株生长状态与正常原球茎状体一致,无变异现象发生,可继续应用于组培生产。

**关键词** 蝴蝶兰;组织培养;原球茎状体;玻璃化

**分类号** S682.31; Q943.1

**Cause and Restoration of Vitrification for Protocorm-like Body in Tissue Culture and Rapid Propagation of *Phalaenopsis amabilis***/Gu Defeng, Zhao Chunli, Zhang Hongwei (Jilin Agricultural University, Changchun 130118, P. R. China); Song Yanjun, Gu Sumin, Zhang Jiayu (Jilin Guolian Agricultural Biotechnology Development Co., Ltd.)//Journal of Northeast Forestry University. -2007, 35(9). -55~56

An experiment was conducted to study the causes of vitrification and the reuse effect of protocorm-like body in cultivation of *Phalaenopsis amabilis*. Results show that the extent of vitrification for protocorm-like bodies aggravates with hormone concentration increasing and subculture time prolonging. The vitrification rates of two culture media with 5 mg · L<sup>-1</sup> NAA and 10 mg · L<sup>-1</sup> BA rose to 71% and 65%, respectively, when subculture to the ninth generation. The proliferation rate and regeneration rate of vitrification protocorm (2.2 and 183 individuals per bottle) were distinctly lower than those of formal protocorm (5.3 and 1 297 individuals per bottle). The vitrification was significantly reduced after 2 or 3 generations of cultivation using culture medium without hormone, and the number of vitrification protocorm could decrease to 0.84%. The differentiation ability of the restored protocorm and the state of plant growth were consistent with those of formal protocorm, and the restored protocorm could be continually applied to tissue culture.

**Key words** *Phalaenopsis amabilis*; Tissue culture; Protocorm-like bodies; Vitrification

蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)由于其色美、形雅、花期长等特点,倍受人们喜爱。随着市场对蝴蝶兰需求量的扩大,其组织培养及无性快繁工作也随之受到研究者和生产者的重视。有关蝴蝶兰的组培快繁工作,国内外学者均进行了许多研究<sup>[1-3]</sup>。但是,在蝴蝶兰规模化组培生产上,由于繁殖条件或繁殖方式不得当,可能会导致蝴蝶兰原球茎状体玻璃化,其结果使蝴蝶兰的生产效率和产品质量大幅下降。关于蝴蝶兰在无性快繁过程中,原球茎状体玻璃化产生的原因、防治措施以及由此所带来的潜在危害并未引起人们的足够重视,至今也尚未有详细的报道。自 1998 年始,作者对 5 个蝴蝶兰杂交种的原球茎状体继代扩繁进行了详细的研究,找出了引起原球茎状体玻璃化的原因,并研究出相应的防治措施,为在规模化生产中克服由原球茎玻璃化产生的危害提供了经济实用的解决方法。

## 1 材料与方法

**材料来源:**材料来自吉林国联农业生物技术发展股份有限公司。蝴蝶兰杂交种:*Dtps.* (Happy Valentine × Morgenrose),大红花(编号 G-112);*Dtps.* Minho Princess × *P.* Chib Shang's Stripes,红线条(编号 G-134);*Dtps.* (Sun Prince × King Shiang's Rose),大红花(编号 G-114);*P.* Hwafeng Redjewel 'Ruby',粉红大花(编号 G-50);*Dtps.* (Dygaus × Happy Valengine),白花红心(编号 G-105)。供试原球茎状体均由上述 5 个材料蝴蝶兰花梗无菌苗茎尖诱导而成。

**培养基及培养条件:**以 MS 和改良狩野培养基用于原球茎

状体的继代与增殖基本培养基。2 种培养基中分别添加不同质量浓度的 6-BA 和 NAA, pH 值 5.4~5.6。白天温度 25~28℃,晚间 23~25℃,光照 2 000~3 000 lx,光照时间 12 h/d。

**原球茎状体接种:**每次继代时对原球茎状体进行分类,将具有典型状态的原球茎状体、玻璃化原球茎状体以及其它非正常状态原球茎状体分别接种到原球茎状体继代培养基上。接种密度约为 1 粒/cm<sup>2</sup>,即底径为 9 cm 兰花培养瓶中(地雷瓶),每瓶接种 60~65 粒。每个培养周期为 70~80 d(约 2.5 个月),70~80 d 后进行下一次继代接种。每次转接以后以瓶为单位统计不同状态的原球茎状体。

**数据分析:**激素质量浓度和继代时间对原球茎状体的影响,采用新复极差进行差异显著性检验;玻璃化类原球茎与正常类原球茎分化增殖能力的差异采用 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 原球茎状体在不同激素质量浓度培养基中的表现

将 5 个品种原球茎状体分别在含有不同质量浓度激素的培养基上进行继代培养,起初的 1~3 代原球茎状体的状态并没有表现出大的差异,玻璃化的变异现象表现不明显,只是在两种培养基中原球茎状体的增殖速率有所不同,在改良狩野培养基中原球茎状体的增殖速率明显高于 MS 培养基。随着继代次数和时间的延长,5 个品种的原球茎状体均显现出不同的差异。第 4 代以后,在 2 种培养基中,随着激素浓度的增高和培养代数的增加玻璃化现象表现有加重的趋势(表 1)。激素水平在 NAA 5 mg/L + BA 10 mg/L 条件下,两种培养基继代到第 9 代时,玻璃化原球茎状体分别高达 71% 和 65%,出现严重玻璃化变异现象。新复极差检验表明,玻璃化原球茎状体发生的比例在 0.01 水平差异显著。可见在本试验中,高浓度激素的长期继代培养是导致原球茎状体玻璃化的重要因素。

1) 吉林省科技厅青年基金项目(20000556-2);吉林省科技厅重大项目(200504163)。

第一作者简介:顾德峰,男,1956年8月生,吉林农业大学园艺学院,副教授。

收稿日期:2007年1月17日。

责任编辑:程红。

表1 激素质量浓度和继代时间对原球茎状体玻璃化程度的影响

培养基种类	第5次继代	第6次继代	第7次继代	第8次继代	第9次继代	
MS	NAA 0 mg·L <sup>-1</sup> + BA 0 mg·L <sup>-1</sup>	0/521(0)	0/662(0)	1/505(0.001)	0/329(0)	1/403(0)
	NAA 1 mg·L <sup>-1</sup> + BA 3 mg·L <sup>-1</sup>	0/398(0)	3/332(0.01)	4/395(0.010)	8/438(0.02)	9/450(0.020)
	NAA 3 mg·L <sup>-1</sup> + BA 5 mg·L <sup>-1</sup>	3/288(0.01)	16/420(0.04)	17/345(0.050)	33/419(0.08)	30/333(0.090)
	NAA 5 mg·L <sup>-1</sup> + BA 10 mg·L <sup>-1</sup>	3/212(0.06)	36/301(0.12)	121/311(0.390)	231/399(0.58)	182/256(0.710)
改良狩野	NAA 0 mg·L <sup>-1</sup> + BA 0 mg·L <sup>-1</sup>	0/322(0)	0/586(0)	0/613(0)	0/492(0)	1/450(0.002)
	NAA 1 mg·L <sup>-1</sup> + BA 3 mg·L <sup>-1</sup>	0/219(0)	3/355(0.01)	4/400(0.010)	8/383(0.02)	8/411(0.020)
	NAA 3 mg·L <sup>-1</sup> + BA 5 mg·L <sup>-1</sup>	4/366(0.01)	13/650(0.02)	22/429(0.050)	39/555(0.07)	58/581(0.100)
	NAA 5 mg·L <sup>-1</sup> + BA 10 mg·L <sup>-1</sup>	16/327(0.05)	58/324(0.18)	115/412(0.280)	221/502(0.44)	246/378(0.650)

注:表中数据为5个品种的累加值,“/”前数据为玻璃化茎状体数,“/”后数据为总瓶数,括号内的数据为二者的比值。

## 2.2 玻璃化原球茎状体与正常原球茎状体分化增殖能力的比较

将5个品种的玻璃化原球茎状体和正常状态的原球茎状体分别转入无激素的改良狩野培养基进行1次继代扩繁后,再进行成苗培养(表2)。结果表明:玻璃化原球茎状体的分化增殖能力明显低于正常状态的原球茎状体,5个品种玻璃化原球茎状体的平均增殖率仅为2.2%,而正常原球茎状体的平均增殖率为5.3%。由玻璃化原球茎状体分化成苗的数量也明显少于正常原球茎状体的产苗数量,5个品种玻璃化原球茎状体平均每母瓶产苗183株(8111株/44瓶),而正常原球茎状体平均每母瓶产苗为1297株(58377株/45瓶),统计分析结果表明,两者在0.01水平差异显著。且由玻璃化原球茎状体分化成的幼苗多数质量状况也不及正常原球茎状体的幼苗,表现有叶厚、叶脆、水浸状,出瓶移栽难成活等特征。在本试验中还观察到,一些原球茎状体在激素NAA质量浓度达5 mg/L、BA质量浓度10 mg/L的培养基中长期继代培养后,其分化能力完全丧失,既无新的原球茎状体产生,也不分化成苗,以类似愈伤组织的状态进行扩增。由此可见,原球茎状体一旦形成玻璃化,就很难在生产上继续应用。

表2 玻璃化原球茎状体与正常原球茎状体分化增殖能力的比较

品种编号	玻璃化原球茎状体				正常原球茎状体			
	母瓶数	子瓶数	增殖率/%	生产幼苗/株	母瓶数	子瓶数	增殖率/%	生产幼苗/株
G-50	48	106	2.2	8480	43	220	5.1	59502
G-112	37	70	1.9	5660	36	167	4.6	41315
G-134	52	130	2.5	10432	58	319	5.5	74550
G-114	21	42	2.0	3460	40	198	5.0	47520
G-105	61	159	2.6	12525	48	283	5.9	68996
平均	44	101	2.2	8111	45	237	5.2	58377

## 2.3 玻璃化原球茎状体的恢复

选择各品种呈典型玻璃化状态的原球茎状体,将其转入无激素的改良狩野培养基中进行恢复培养处理。培养基食用白糖质量浓度由原来的20 g/L提高到30 g/L,光照强度保持在3000 lx。恢复培养结果见表3。从表3中可以看出,第1代恢复培养初,转入到无激素培养基中的原球茎状体全部呈玻璃化状态,经2.5个月的1次恢复培养后,第2次转接时,玻璃化原球茎状体的数量平均下降36.68%。再经2.5个月的第2代恢复,第3次转接时玻璃化原球茎状体的数量下降到0.84%。可见,经过1代的恢复培养,大部分原球茎状体的状态就有了明显的改观。经过2~3次的恢复培养原球茎状体可基本上恢复为正常状态。第4代恢复培养后,原球茎状体的整体状况与生产上使用的正常状态的原球茎状体基本上没有区别,无论在扩繁的增殖率上,还是幼苗的分化率及生长特征等方面基本一致。

表3 玻璃化原球茎状体的恢复效果

恢复培养代数	G-50	G-112	G-134	G-114	G-105	玻璃化原球茎状体平均比例/%
第1代	55/55	49/49	91/91	18/18	44/44	100
第2代	32/107	19/92	41/182	10/39	26/122	36.68
第3代	5/481	4/395	11/819	1/209	3/599	0.84
第4代	1/1920	0/1990	4/4765	0/836	0/2977	0.02

注:表中数据为玻璃化/总瓶数。

## 2.4 玻璃化原球茎状体的植株生长状态

对恢复后的玻璃化原球茎状体进行继代扩繁和成苗培养,并对其幼苗的生长周期进行了跟踪调查(表4)。5个品种共产幼苗36800株,出瓶移栽成活率均达96%以上。幼苗、中苗及大苗期的生长速度和状态与正常原球茎状体的植株相同。温室栽培2a后进行开花诱导,所调查的18300株开花株中,无变异现象发生。可见,玻璃化原球茎状体属于非遗传性变异,只要对其进行适宜的恢复性培养,可以继续利用于蝴蝶兰的组培生产。

表4 恢复后玻璃化原球茎状体的植株生长状况

品种编号	出瓶苗/株	成活率/%	开花株/株	变异株/株
G-50	5630	96	2862	0
G-112	3280	98	2190	0
G-134	8290	97	3216	0
G-114	9100	94	4310	0
G-105	10500	95	5722	0
合计	36800	96	18300	0

## 3 讨论

在植物组培生产中,由于培养物自身内在生理生化代谢的差异以及外界培养条件的影响,可能会产生多种多样不符合生产要求的现象。其中遗传稳定性和玻璃化问题是更为生产者 and 研究者所重视的问题。引起玻璃化现象发生的原因有很多,激素的过量使用往往是其原因之一<sup>[4]68-72</sup>。因此如何掌握好激素的用量,在组培生产上显得尤为重要。在蝴蝶兰组培生产中,不同的培养阶段,对激素用量的要求差异较大,一般在花梗苗培养和原球茎状体诱导阶段,常使用较高水平的激素,BA质量浓度一般在5~10 mg/L,NAA质量浓度一般在0.5~5 mg/L范围内<sup>[5-7]</sup>,否则可能不易达到预期的效果。但是,原球茎状体一经形成,在进一步长时期继代扩繁过程中,应尽可能地降低激素的用量,通常应在无激素的培养基中进行。否则,就有可能导致玻璃化等一些变异现象的发生。在蝴蝶兰无性扩繁中,一般情况下,玻璃化现象并不严重,如果一旦不慎发生了玻璃化原球茎状体,也不应急于作淘汰处理,这是由于玻璃化现象大多为非遗传的生理失调症状<sup>[4]68-72</sup>,所以只要对其进行适当的恢复培养,多数玻璃化原球茎状体可恢复正常,进而继续应用于生产,本试验的结果证实了这一点。

## 参考文献

- [1] 李军,柴向华,曾宝瑞,等.蝴蝶兰组培工厂化生产技术[J].园艺学报,2004,31(3):413-414.
- [2] Tanaka M, Sakanishi Y. Factors affecting the growth of in vitro cultured lateral buds from Phalaenopsis flower stalks[J]. Sci Hortic., 1978, 8:169-178.
- [3] 潘学峰,王安石,李海珠.蝴蝶兰组培快繁技术的研究进展[J].热带林业,2005,33(1):45-47.
- [4] 曹致义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1996:68-72.
- [5] 秦凡,周吉源.不同植物生长调节剂对蝴蝶兰快速繁殖的影响[J].武汉植物学研究,2003,21(5):452-456.
- [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] 陈之林,叶秀麟,梁承郢.蝴蝶兰花萼的离体培养[J].园艺学报,2003,30(2):242-244.