

蝴蝶兰的组织培养技术研究

李娜

(辽宁工程技术大学 理学院, 辽宁 阜新 123000)

摘要:以蝴蝶兰的叶片、花梗腋芽、花梗节间、茎尖、根尖为外植体,通过对蝴蝶兰组织培养的不同类型的基本培养基及各种激素配比进行组合试验,筛选出蝴蝶兰组织培养的最适外植体及其培养基配方。试验结果表明:花梗腋芽是蝴蝶兰组培的最佳外植体,其理想培养基配方为:1/2MS + 2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.3% Ac + 20 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂,原球茎诱导率可达72.9%。

关键词:蝴蝶兰;组织培养;原球茎;外植体

中图分类号:S682.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-8581(2008)09-0051-03

Study on Tissue Culture Technique of Butterfly Orchid

LI Na

(College of Sciences, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, China)

Abstract: The leaves, pedicel axillary bud, pedicel internode, stem tip and root tip of butterfly orchid were used as explants, and the best explant and culture medium were screened by testing different culture medium with hormone combination. The result showed that the best explant was pedicel axillary bud, and the best culture medium was 1/2 MS medium supplemented with 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + Ac 0.3% + cane sugar 20 g/L + agar 8 g/L. The protocorm induction rates of pedicel axillary bud was 72.9%.

Key words: Butterfly orchid; Tissue culture; Protocorm; Explant

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)又称蝶兰,属热带或亚热带的气生兰,原产于中国台湾、菲律宾、印尼、泰国、马来西亚等地^[1]。其株型美观,花形奇特,色彩艳丽,花期长久,在热带兰中有“兰花皇后”之美誉^[2],具有极高的观赏和经济价值,在国内外花卉市场上极受欢迎。但由于蝴蝶兰是单茎性气生兰,极少发育侧枝,很难采用常规分株法进行无性繁殖,而且其种子不含胚乳,在自然条件下萌发率极低,也难以利用种子播种方式进行有性繁殖,因此利用蝴蝶兰快速繁殖技术对扩大蝴蝶兰的繁殖是非常必要的^[3]。目前,国内外以蝴蝶兰茎尖、茎段、根尖、叶、花梗等外植体进行组培繁殖有不少报道,但多数只停留在实验室阶段,没有形成规模化栽培。本试验旨在筛选蝴蝶兰组培的最适外植体,确定其理想的培养基配方,为蝴蝶兰试管苗的工厂化生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 3月初从花市采购花期中的蝴蝶兰,以蝴蝶兰的叶片、花梗节间、花梗腋芽、茎尖和根尖作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 培养基的配制 选用MS、1/2MS、1/3MS、Knudson C、VW(Vauin and Wont)、B₃、N₆、自制G3^[4]培养基作为基本培养基,在此基础上添加不同浓度、不同配比的植

物激素进行组合诱导试验,激素6-BA、NAA的质量浓度分别为0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、10.0 mg/L,2,4-D的质量浓度为0、0.5、1.0、2.0 mg/L。所有的培养基均用0.8%的琼脂固化,蔗糖浓度为2%,pH 5.6,并添加0.3%的活性炭(Ac)以防止外植体褐化,然后分装,在121℃条件下灭菌30 min。

1.2.2 材料的选取和预处理 选择蝴蝶兰的叶片、花梗节间、花梗侧芽、茎尖、根尖等部位进行诱导培养。将采集的外植体用自来水冲洗干净,浸泡2 h后,用洗衣粉液浸洗5 min,用流水冲洗干净后,在无菌工作台上进行表面消毒,即先用75%酒精表面灭菌15 s,无菌水冲洗2次;再放入0.1% HgCl₂溶液中浸泡12~15 min,其间不断摇动,然后用无菌水冲洗3~4次;再放入30% NaClO溶液中消毒10~12 min,然后用无菌水冲洗4~5次,用无菌滤纸吸干材料表面水分备用。

叶片:将叶片按叶尖、中部和基部分别切成0.3~0.5 cm²的小块,切割后的叶片按正、反、斜3种方式接种在培养基上。

茎尖:在超净工作台上将茎芽置于解剖镜下,一手用细镊子将其按住,另一手用解剖针将叶片和叶原基剥掉,当形似一个闪亮半圆球形的顶端分生组织充分暴露出来之后,用锋利的长柄刀片将其切割下来,上面可带有

收稿日期:2008-05-25

基金项目:辽宁工程技术大学青年基金项目(2005B)。

作者简介:李娜(1976-),女,满族,辽宁北镇人,硕士,讲师,主要从事植物组织培养研究。

叶原基,按生长极性将其接种于培养基中。

花梗腋芽:将处理好的花梗在距腋芽上下两端约0.5 cm处切下,并将花梗切段,下端切成斜角。按生长极性插入培养基中。

花梗节间:在切取花梗腋芽的同时,将花梗节间切成0.5 cm左右的薄片作外植体,按生长极性插入培养基中。

根尖:将处理好的根尖按生长极性插入培养基中。

1.2.3 培养条件 将外植体接种在不同的培养基上,培养条件为温度 25 ± 1 °C,环境湿度70%~80%,初期在黑暗条件下培养7~10 d,以防止褐化,然后在光强度为2000~2500 lx,每天光照12 h条件下培养。

2 结果与分析

2.1 不同外植体的成活率 茎尖的成活率最高达85%;其次为花梗侧芽,成活率为75%;花梗节间的成活率为32.5%;叶片和根尖最差,分别为12.5%和7.5%。

2.2 不同外植体的原球茎诱导

2.2.1 叶片的原球茎诱导 叶片原球茎的诱导率与叶龄、切取的部位以及在培养基上放置的方式有关。叶龄越小,原球茎的诱导率越高,90%以上的未切割幼叶都能诱导原球茎,而切割的叶小块的诱导率仅在20%左右。将幼叶切断进行培养时,中间部分原球茎诱导率比顶部和基部好;将成年植株叶片切断进行培养时,叶基部诱导率明显高于叶片中部和叶尖部位。正放在培养基上的叶片原球茎的诱导率明显高于反放和斜放的叶片,反放和斜放在培养基上的叶片几乎不能诱导原球茎。诱导率也与切段大小直接相关,切段太小成活率低,以0.5 cm左右为最好。

叶切块诱导原球茎的形成中,6-BA的浓度起着决定作用。在一定范围内,原球茎诱导率随6-BA浓度的上升而增加,6-BA在3.0~5.0 mg/L时诱导原球茎的数量最多,速度最快;但当6-BA的浓度大于5.0 mg/L时,诱导率反而下降;随着6-BA的浓度达到10.0 mg/L,产生原球茎数不断减少,且长势弱,颜色偏黄,极易玻璃化,最后褐化死亡。NAA对叶片诱导原球茎作用不明显,低浓度(0.5 mg/L以下)的2,4-D能促进愈伤组织的形成,但抑制原球茎的分化。叶片培养的基本培养基以MS培养基最为合适,而1/3MS、VW和B₅的培养效果均次之。在MS+5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.3% Ac+20 g/L蔗糖+8 g/L琼脂的培养基中,原球茎的诱导效果最好,诱导率达36.4%。

2.2.2 花梗腋芽的原球茎诱导 蝴蝶兰的花梗腋芽也可以进行离体培养,而且培养效果较好,不同部位的花梗腋芽离体培养的效果不同,有明显的顶端优势。花梗上部的腋芽通常比花梗基部的腋芽萌芽率高,过老的花梗腋芽再生能力弱而不宜培养。这种现象可能与花梗不同位置腋芽的发育程度有关,由于花梗上部腋芽的体积明

显比基部的腋芽大,可能比下部的发育的好。

花梗腋芽原球茎的诱导不仅取决于BA和NAA的绝对数量,而且取决于二者的相对比例。在BA/NAA值最大的条件下,诱导率处于最低状态;在BA/NAA值最小条件下,诱导率也接近于最低;当BA/NAA值接近于10:1时诱导率较大。综合分析认为,当取得2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA配比时效果较佳。花梗腋芽作为外植体诱导原球茎,基本培养基以1/2MS培养基最为合适,在1/2MS+2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.3% Ac+20 g/L蔗糖+8 g/L琼脂的培养基中,原球茎的诱导效果最好,诱导率可达72.9%。

2.2.3 花梗节间的原球茎诱导 花梗节间的原球茎诱导率与花梗的幼嫩程度直接相关,花梗发育时间越短诱导率越高,以花梗生长时间为10 d的诱导率最高(达30%),20 d的次之(25%),30 d以后的仅为4%,发育时间超过150 d的则不能诱导出原球茎。

以生长10 d的花梗为外植体在各种基本培养基上进行离体培养,在MS培养基上的效果最好。在一定范围内原球茎诱导率随着6-BA浓度的增加而增大,6-BA在1.0~10.0 mg/L范围内均能诱导出原球茎,但以5.0 mg/L的效果最好;6-BA的浓度大于5.0 mg/L时,诱导率下降,这可能是由于6-BA促进组织褐化^[5],尤其是高量6-BA会使组织严重褐化的结果。随6-BA浓度升高,诱导出的原球茎逐渐变得幼嫩、细弱,扩繁效果差,这可能是与6-BA促进细胞分裂分化过快有关^[6,7]。低浓度的2,4-D和NAA对花梗诱导原球茎没有明显的效果,高浓度的2,4-D能促进愈伤组织形成,但抑制愈伤组织形成原球茎。最适的培养基配方为MS+5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.3% Ac+20 g/L蔗糖+8 g/L琼脂,诱导率为30%。

2.2.4 茎尖的原球茎诱导 在本试验中,茎尖及其外围组织的诱导均获成功。其诱导率与外植体放置密度成正比,即密度愈大诱导率愈高,反之则低。6-BA在茎尖诱导原球茎的过程中起着主要作用,单加NAA、2,4-D以及不加任何激素的情况下都不能诱导原球茎。在不含NAA的处理中随着6-BA浓度的提高,原球茎形成率不断增大,在NAA含量为2.0 mg/L、6-BA浓度为3.0 mg/L和5.0 mg/L时,原球茎的形成率显著提高,表现出两种激素对原球茎诱导的协同促进作用,但6-BA浓度为7.0 mg/L时,诱导率反而降低。当6-BA浓度达到10.0 mg/L时出现褐化死亡,这可能与高浓度6-BA刺激多酚氧化酶作用有关^[8]。在NAA浓度为3.0 mg/L时,原球茎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不利于茎尖形成原球茎。

利用茎尖进行茎尖培养,可得到大量的原球茎,原球茎诱导率为这5种外植体之首,其适宜的培养基为MS+5.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA+0.3% Ac+20 g/L

蔗糖 + 8 g/L 琼脂,其诱导率可达 87%。

2.2.5 根尖的原球茎诱导 以根尖为外植体时,MS、1/2MS、KnudsonC、V&W 效果均较好,但以 MS 培养基的效果最佳。6-BA 浓度以 5.0 mg/L 时较好,低浓度(0.5 mg/L)的 2,4-D 明显地能促进原球茎的形成,NAA 对根尖原球茎的诱导无明显的促进作用^[8]。

在本试验中,根尖的原球茎诱导效果最差,其相对较佳培养基为 MS + 5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.3% Ac + 20 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂,其诱导率为 23%。

3 结论

外植体的选择以花梗侧芽为最好。花梗侧芽离基质远,侧芽有苞片包被,带菌少,灭菌后,成活率高。叶片、根尖离基质近,带菌多,灭菌后成活率低。茎尖灭菌后成活率较高,但用茎尖时,会损伤母株,造成浪费。因此蝴蝶兰外植体以花梗侧芽最好,既不浪费材料,接种后成活率又高,成活率可达 75%。

以蝴蝶兰外植体诱导原球茎适宜的基本培养基为 MS 培养基,不同外植体进行诱导时需添加不同配比的激素,但过高的外源激素则不利于外植体的成活、原球茎的诱导,主要表现为外植体的褐化死亡。6-BA 是诱导原球茎的主要因子。

(上接第 50 页)

胞内源激素的水平不同有关。一般认为器官分化的倾向是取决于内源 CTK 和生长素的平衡,不同植物的外植体中原有的激素种类及其浓度不同,因而为达到这种平衡,需要补加的激素及其浓度也就不同^[13]。

3.3 TDZ 与生根 TDZ 浓度较低时,培养基中不加 NAA 也有部分外植体生根,与培养基中仅含 KT 或 2Ip 的作用相似,这可能是因为 TDZ 和一般细胞分裂素一样,可促进休眠芽中的生长素合成,也因此培养基中加入 NAA 能促进根的发生和生长。高浓度 TDZ 抑制生根可能是因为 TDZ 浓度较高打破了生根所需的内源生长素和细胞分裂素的平衡,再加入低浓度 NAA 也不能使其恢复平衡。

参考文献:

- [1] 李明军. 怀山药茎段愈伤组织的诱导与多芽体的形成[J]. 华北农学报, 2000, 15(2): 85 ~ 88.
- [2] 丰锋, 叶春海, 王耀辉, 等. 淮山药的组织培养与快速繁殖[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2007, 20(1): 24 ~ 28.
- [3] 黄洪河. 福建省山药发展前景分析与探讨[J]. 江西农业学报, 2007, 19(6): 63 ~ 65.

花梗腋芽的理想培养基配方为: 1/2MS + 2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.3% Ac + 20 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂, 原球茎的诱导率可达 72.9%。

参考文献:

- [1] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 甘肃: 甘肃科学技术出版社, 2002.
- [2] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991. 247 ~ 253.
- [3] 彭立新, 王妹, 孟广云. 蝴蝶兰组织培养繁殖的研究[J]. 天津农业科学, 1999, 5(2): 27 ~ 29.
- [4] 曾宋君, 程式君, 张京丽, 等. 墨兰及其杂种的组织培养和快速繁殖研究[J]. 广西植物, 1998, 18(2): 153 ~ 156.
- [5] 李冬杰, 张进献, 魏景芳, 等. 培养基和培养条件与红豆杉细胞培养中褐化的关系[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(1): 96 ~ 98.
- [6] 杨美纯, 周歧伟, 许鸿源, 等. 外部因子对蝴蝶兰叶片原球茎体发生的影响[J]. 广西植物, 2000, 20(1): 42 ~ 46.
- [7] 刘福平, 洪丽萍, 郑明琼. 6-BA, 2,4-D 诱导蝴蝶兰类原球茎外植体的研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(8): 69 ~ 71.
- [8] 周吉源, 戴均贵. 不同植物生长调节物质对华黄芪愈伤组织形成及器官发生的效应[J]. 华中师范大学学报, 1997, 31(1): 80.

- [4] 李明军, 杨建伟, 张嘉宝, 等. 怀山药的茎段培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(4): 275 ~ 276.
- [5] 汪国莲, 陈明, 孙玉东, 等. 淮山药的茎尖培养与快速繁殖[J]. 江苏农业科学, 2003, (3): 77 ~ 78.
- [6] 蔡建荣, 曾军, 张志勇, 等. 怀山药茎段组织培养及增殖的研究[J]. 江苏农业科学, 2002, (2): 14 ~ 15.
- [7] 李艳红, 宋美珍, 庄木. 青花菜组织培养再生体系的研究[J]. 浙江农业学报, 2001, 22(3): 48 ~ 53.
- [8] 蔡建荣. 山药茎节间部组织培养及移栽技术研究[J]. 江西农业学报, 2006, 18(4): 108 ~ 109.
- [9] 周俊彦, 郭扶兴. 苯基脲衍生物的细胞分裂素活性[J]. 植物生理学通讯, 1990, (4): 8 ~ 13.
- [10] 周俊彦, 张宗勤. Thidiazuron 对榕树离体繁殖的影响[J]. 植物学报, 1992, 34(11): 889 ~ 892.
- [11] 周俊彦, Collet G F. Thidiazuron 的细胞分裂素活性研究. I. 对番木瓜 (*Carica pentagona*) 愈伤组织诱导及芽生长的作用[J]. 西北植物学报, 1989, 8(4): 203 ~ 211.
- [12] 孙崇波, 谢鸣, 蒋桂华, 等. 草莓主栽品种丰香高效离体再生体系的研究[J]. 浙江农业学报, 2003, 15(2): 69 ~ 72.
- [13] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 85.