

蝴蝶兰离体快繁技术研究*

王玉英, 李枝林, 余朝秀, 彭绿春
(云南农业大学, 云南 昆明 650201)

摘要: 通过对蝴蝶兰花梗的诱导, 形成了再生植株, 经成功的增殖和生根培养, 建立了蝴蝶兰的快繁技术体系。实验结果表明: 低盐培养基附加不同的激素组合有利于蝴蝶兰的离体培养, KT 能降低培养基的褐化程度, 而 1/2 MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 8 % 香蕉泥最有利于蝴蝶兰丛芽的增生, 增殖率达 3 ~ 3.5 倍, 且叶片健壮; 1/2 MS + NAA 1.0 mg/L + 8 % 香蕉泥有利于促进生根。

关键词: 蝴蝶兰; 离体培养; 快繁技术

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-8246 (2006) 02-0099-03

A Study on *in vitro* rapid propagation of *Phalaenopsis*

WANG Yu-ying, LI Zhi-lin, YU Chao-xiu, PENG Lu-chun

(Flower Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201, P. R. China)

Abstract: Through inducing the flower stalk, the regenerated plants of *Phalaenopsis* were produced. With multiplication and root induction culture, the rapid propagation system of *Phalaenopsis* was established. The results showed that low salinity medium with different hormones combination was beneficial to the *in vitro* culture of *Phalaenopsis*, KT could decrease the degree of changing brown of medium. 1/2 MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 8 % banana mud was best for the proliferating of cluster buds, the proliferation rate could reach 3 ~ 3.5 times, and the leaves were healthy and strong, 1/2 MS + NAA 1.0 mg/L + 8 % banana mud was good for rooting.

Key words: *Phalaenopsis*; *in vitro* culture; rapid propagation

蝴蝶兰属 (*Phalaenopsis*) 植物生长于热带与亚热带, 属兰科中的气生兰类, 其花型似蝴蝶, 色彩丰富, 花期长达 1 ~ 2 个月, 在洋兰中素有“兰花皇后”之美称^[1], 是近年来国际花卉市场最受欢迎的热带兰。蝴蝶兰为单茎气生花卉, 植株极少发侧枝, 常规的繁殖方法难以满足市场需求, 而组织培养是快速繁殖蝴蝶兰的最有效途径。Oradee Iutumong 和 Yoneo Soguwa 1974 年报道了茎尖培养蝴蝶兰获得成功, 其先培养出该种花卉的芽球体 (PLB) 再培养出幼苗。Pieper & Zimmer 1976 年又报道了用蝴蝶兰花梗上切下的叶片, 在试管中诱导培养出芽球体^[2], 为以后利用组织培养法大量繁

殖蝴蝶兰打下了基础。目前, 有关蝴蝶兰的试管快繁研究报道较多, 但本项目以区别于众多文献所报道的方式对蝴蝶兰的诱导、增殖和生根培养技术进行了研究。据此繁殖出较多的试管植株, 为蝴蝶兰的工厂化育苗提供了又一条有效途径。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

以来自市场上比较流行的蝴蝶兰“红唇美人”品种作为供试母株, 取其已过盛花期带休眠芽的花梗作为外植体材料。

* 收稿日期: 2005-10-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3060074) 和云南省自然科学基金重点项目 (2002C003P) 资助。

第一作者简介: 王玉英 (1980-), 女, 云南大理人, 硕士研究生, 主要从事兰花复合育种及分子标记研究。

1.2 方法

1.2.1 诱导培养

本研究在云南农业大学花卉研究所进行。从母株上切下花梗，剪下其带芽茎段，其长约 0.5 cm，用自来水清洗干净，在饱和漂白粉上清液中浸泡 15 min，浸泡时不断搅动，浸泡后的茎段用流水冲洗干净，置于超净工作台上，先用 75 % 的酒精消毒 30 s，无菌水清洗 1 次，再用 0.1 % 的升汞浸泡 10 min（在此浸泡过程中仍不断用玻棒搅动），经无菌水洗干净，小心剥离去芽上的最外层叶鞘，把茎段纵剖，将切口平铺于诱导培养基上。

1.2.2 继代培养

诱导培养 40 多天后，将高约 0.5 cm 的不定芽单个切下，接种到已配备好的不同增殖培养基上。继代培养基设置 7 个处理，每处理 3 次重复。

1.2.3 生根培养

当苗长到 1.0 cm 高时，进行生根培养。生根培养基设置 5 个处理，每处理 3 次重复。

1.2.4 培养基

基本培养基采用 White 和 1/2 MS，分别附加 10 % 的椰乳和 80 g/L 的香蕉泥。另根据不同培养阶段的需求，加入不同浓度的 BA、KT、NAA 生长

调节剂；另加蔗糖 2 %，琼脂 0.72 %；调节其 pH 值为 5.5（此时褐化率低）^[2]。

1.2.5 培养条件

每天光照 12 h，光强 1 600 Lux，温度 25 ± 2℃。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰的花梗芽诱导培养效果

诱导培养基分①、②、③号即：①号为 1/2 MS + BA3.0 mg/L + NAA0.3 mg/L + 10 % 椰乳；②号为 1/2 MS + BA5.0 mg/L + NAA0.3 mg/L + 10 % 椰乳；③号为 White + BA5.0 mg/L + NAA0.3 mg/L + 10 % 椰乳。诱导培养 20 天后，②、③号培养基上茎段的芽开始萌动，继而发出侧芽，此后的 20 多天，芽长到 0.5 cm，但培养基褐化较严重，在培养过程中部分芽体于开始萌动时就出现枯死。因此，随后调整了培养基添加物以及使用了不同激素的组合。

2.2 不同激素及浓度的培养基对蝴蝶兰增殖的影响

将高约 0.5 cm 的蝴蝶兰试管苗从瓶中取出，切去叶片和基部褐化部分，分别转接到含有不同激素浓度的低盐培养基中，50 天后的培养结果见表 1。

表 1 不同激素及浓度的蝴蝶兰增殖情况

Tab. 1 Proliferation of *Phalaenopsis* treated with different hormones and concentrations

培养基 /mg · L ⁻¹	香蕉泥 /g · L ⁻¹	接种数 /个	丛芽总 数/个	增殖率 /%	植株生长情况
1/2MS + BA1.0 + NAA0.2	80	18	48	166.7	平均株高 1.5cm, 偶有长根, 培养基褐化
1/2MS + KT1.0 + NAA0.2	80	18	18	0.0	平均株高 2.0cm, 都长根, 培养基褐化较少
1/2MS + BA2.0 + NAA0.2	80	18	75	316.7	平均株高 1.0cm, 偶有长根, 培养基褐化
1/2MS + KT2.0 + NAA0.2	80	18	18	0.0	平均株高 1.5cm, 都长根, 培养基褐化较少
1/2MS + BA3.0 + NAA0.2	80	18	39	116.7	平均株高 1.6cm, 部分长根, 培养基褐化
1/2MS + KT3.0 + NAA0.2	80	18	24	33.3	平均株高 2.0cm, 都长根, 培养基褐化较少
1/2MS + KT1.5 + BA1.5 + NAA0.2	80	18	33	83.3	平均株高 2.1cm, 都长根, 培养基褐化

从表 1 可看出：在蝴蝶兰的增殖培养过程中，当采用 1/2MS 培养基附加 80 g/L 的香蕉泥时，不同激素组合的增殖效果差异显著。当 NAA 浓度为 0.2 mg/L 时，以浓度为 2 mg/L 的 BA 增殖率最高，可达 316.7 %，且平均株高最矮，叶片长势正常；当 BA 浓度为 1.0 mg/L 时，虽也获得了一定的增殖效果，但分裂不很旺盛。实验结果，还表明 KT 对蝴蝶兰苗的分裂效果远不及 BA 强，浓度 1.0 mg/L 与 2.0 mg/L 的 KT，其增殖率为 0，当浓度达

到 3.0 mg/L 时，有一定的增殖效果，且培养基褐化的程度较浅；BA 与 KT 同时使用，浓度都为 1.5 mg/L 时，其蝴蝶兰的增殖率较单独使用 KT3.0 mg/L 者高出 2 倍多。

2.3 不同激素及浓度的培养基对蝴蝶兰生根的影响

将高约 1.0 cm 的蝴蝶兰试管苗接种到附加 80 g/L 的香蕉泥且含有不同激素及浓度的生根培养基中，50 多天后的生根效果见表 2。

表 2 不同激素及浓度的蝴蝶兰生根情况

Tab. 2 Rooting condition of *Phalaenopsis* treated with different hormones and concentrations

培养基 /mg · L ⁻¹	接种数 /个	平均根 数/条	平均根 长/cm	生根率 /%	植株生长情况
1/2MS	10	2.33	2.80	100	平均株高 2.5 cm, 叶片肥厚, 色浓绿
1/2MS + NAA0.5mg/L	10	2.89	2.90	100	平均株高 1.5 cm, 叶片较小, 不是很粗壮
1/2MS + NAA1.0 mg/L	10	3.33	3.25	100	平均株高 1.8 cm, 叶片适中, 色浓绿
1/2MS + NAA1.5 mg/L	10	2.56	3.10	100	平均株高 1.7 cm, 叶片肥厚, 色浓绿
1/2MS + NAA2.0 mg/L	10	3.33	3.0	100	平均株高 1.2 cm, 叶片稍薄

表 2 数据表明: 在基本培养基 1/2MS 中, 附加 8% 的香蕉泥, 不同浓度的 NAA 对蝴蝶兰的促根效果不一。当 NAA 为 0 mg/L 时, 植株依然可以长根, 说明蝴蝶兰生根较易, 而所用的 NAA 浓度为 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 时, 生根数相同, 但从植株的总体生长情况来看, 浓度为 1.0 mg/L 的 NAA 其植株高达 1.8 cm, 叶片长势正常且色浓绿, 而浓度为 2.0 mg/L 的 NAA 其植株长势较弱。表明 NAA 浓度为 1.0 mg/L 的促根效果最好。

3 讨论

(1) 在蝴蝶兰的离体快繁过程中, 为避免兰科植物所易产生的褐化现象, 在其培养基中所用无机盐的成分是关键^[3]。本研究采用了低盐的 1/2 MS 和 White 基本培养基, 虽对切口处的褐化起到一定的抑制作用, 但效果不很明显。据文献报道^[4], 柠檬酸在诱导蝴蝶兰原球茎的过程具有抑制其褐化物质产生的功能, 且效果优于活性炭。但因本研究是由花芽直接诱导出侧芽, 省略了从原球茎诱导成苗的过程, 与大部分蝴蝶兰组织培养的诱导过程不一, 且在芽的增殖培养过程中发现单独使用 KT 时培养基的褐化程度较单独使用相同浓度的 BA 的要浅较多, 对于此, 在进行野生‘沉香虎头兰’种子无菌萌发及快速繁殖研究时^[5], 也发现了这种现象, 说明 KT 无论是对兰属 (*Cymbidium*) 或蝴蝶兰属植物都具有较 BA 能降低其褐化物质分泌的功能。可能是由于 KT 的分裂效果不及 BA, 产生的酚类物质较少。本研究结果表明, 可以通过不同激素的组合以降低兰花褐化物质的分泌。但其具体效果有待进一步研究。

(2) 本实验在试管苗的增殖和生根培养中都

加入了香蕉泥。据报道, 在兰花试管苗生长的培养过程中, 适当加入一些有机物或天然物质如甘氨酸、水解酪蛋白、香蕉泥、椰子汁等对其试管苗的生根长叶有很好的促进作用^[6]。另据有关文献^[7-8]报道, 在蝴蝶兰的组织培养过程, 加入不同浓度的香蕉泥后取得了良好的效果。与文献^[7]报道的 1/2 MS + BA2.0 mg/L + NAA0.2 mg/L 对原球茎的诱导效果最好相比, 若在此配方中再加入 8% 的香蕉泥会使蝴蝶兰丛芽的增殖取得更佳效果, 两项研究的结论有类似之处。至于香蕉泥对于兰科植物的作用机理还需研究。

参考文献:

- [1] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [2] 卢思聪. 中国兰与洋兰[M]. 北京: 金盾出版社, 1994.
- [3] 秦凡, 周吉源. 蝴蝶兰的组织培养研究[J]. 生物学杂志, 2003, 20(2): 19-20.
- [4] 张启香, 方炎明, 张晓平. 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(3): 38-40.
- [5] 李枝林, 余朝秀, 王玉英, 等. 野生‘沉香虎头兰’种子无菌萌发及快速繁殖研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(8): 269-270.
- [6] 陈子华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [7] 王平, 吴海红, 赵兴华, 等. 蝴蝶兰组织培养培养基组成的初步研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2004, 35(1): 10-12.
- [8] 潘学峰, 黄凤娇. 海南蝴蝶兰的组织培养研究[J]. 海南大学学报(自然科学版), 1997, 15(3): 206-211.