

蝴蝶兰种苗工厂化生产技术研究与应用

杨士辉

(山东省聊城市农业科学研究院,山东聊城 252000)

摘要 利用蝴蝶兰花梗进行扦插培养,对长出的花梗芽进行离体培养诱导产生丛生芽;再通过转接增殖和生根培养获得所需数量的组培苗,研究和总结出各个培养阶段的培养方法和相应的培养基配方,适合进行工厂化生产和开发。

关键词 蝴蝶兰;种苗;组织培养;激素;工厂化生产

中图分类号 S682.3104⁺.3 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2008)12-0020-01

2005年以来,笔者通过幼嫩花梗扦插培养和丛生芽的增殖获得组培苗,具有生产流程短、繁殖速度快、整齐度高、变异率低、品质稳定等特点,解决了传统组织培养的诱导脱分化困难、繁殖系数低、繁殖周期长等问题,是进行工厂化生产的最佳方法。现将研究应用情况总结如下。

1 材料与方

1.1 材料

蝴蝶兰花梗、花梗苗、丛生芽、组培苗。

1.2 试验方法

1.2.1 不同激素配比对花梗腋芽诱导效果比较。将抽箭1个月的幼嫩花梗切段后,按自然生长状态接种在不同激素组合的1/2MS培养基上。每个处理接种30个花梗段。

1.2.2 不同激素浓度配比对丛生芽增殖的影响。在超净工作台上将花梗芽从基部切取后,切叶2/3转入不同激素配比的1/3MS培养基中。每个处理接种100瓶。

1.2.3 不同切割方式对丛生芽增殖的影响。将丛生芽进行以下切割处理:①全叶;②切叶1/3;③切叶2/3;④切除全部叶片。然后转入1/3MS+6-BA 5.0mg/L+Ade 3.0mg/L+NAA 1.0mg/L培养基上。每个处理接种100瓶。

1.2.4 不同激素浓度对蝴蝶兰壮苗的影响。将株高1cm以上的丛生芽切成单株,转入不同激素配比的1/3MS培养基上,每个处理接种100瓶,每瓶10株。

1.2.5 不同激素配比对组培苗生根的影响。将经过壮苗培养的株高2cm以上、有2叶1心的小苗转入不同激素浓度的生根培养基中进行生根培养,每处理接种100瓶,每瓶10株。

1.3 培养条件

温度25±2℃,光照强度1500~2000Lx,光照时间12h/d,30d后观察试验结果。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对花梗腋芽诱导效果比较

将花梗段接种在芽诱导培养基上,培养5d后腋芽开始膨大,25d后萌发出小叶。由表1可知,不同激素配比对于花梗芽萌发启动有很大影响。在一定的NAA浓度下,随6-BA浓度的增加,萌发率也随之提高;但6-BA超过5mg/L后芽体有扭曲变形的趋势。因此,花梗芽诱导培养以6-BA

3~5mg/L、NAA 0.5mg/L为宜。

表1 不同激素配比对花梗腋芽诱导效果比较

处理	6-BA 浓度 mg/L	NAA 浓度 mg/L	萌发率 %	芽体长势
1	1.0	0.5	17.3	芽小,生长速度慢,芽正常
2	3.0	0.5	80.0	芽体小,长势较快,芽正常
3	5.0	0.5	95.0	芽体大,长势快,芽正常
4	7.0	0.5	95.0	芽体粗短,长势慢,变异
5	10.0	0.5	100.0	芽体粗短,长势慢,变异,玻璃化

2.2 不同激素浓度配比对丛生芽增殖的影响

由表2可知,在NAA浓度一定的情况下,随着6-BA浓度的增大,增殖倍数不断提高;添加Ade丛生芽长势好,基部比较粗壮,分化周期缩短。说明6-BA和Ade配合使用要比单独使用6-BA效果好。以培养基1/3MS+6-BA 5.0mg/L+Ade 3.0mg/L+NAA 1.0mg/L分化增殖效果较好,分化能力强,可增值8~9倍。

表2 不同激素浓度配比对分化苗的影响

处理	6-BA mg/L	Ade 浓度 mg/L	NAA 浓度 mg/L	转接 瓶数	形成丛 生芽数	增殖倍 率	生长势
1	3.0	0	0.5	100	289	2.89	弱
2	3.0	3.0	1.0	100	455	4.55	壮
3	5.0	0	0.5	100	684	6.84	弱
4	5.0	3.0	1.0	100	812	8.12	壮
5	7.0	3.0	1.0	100	126	1.26	壮

注:基本培养基1/3MS,加糖20g/L、琼脂5.6g/L、椰汁200mL/L,pH 5.8。

2.3 不同切割方式对丛生芽增殖的影响

由表3可知,不同切割方式对蝴蝶兰丛生芽的分化有很大影响。在不伤害心叶的前提下,完全不切叶的几乎不分化;切除部分叶片的,其分化率随着切叶比例的增加而提高,增殖倍数一般在2~5;切除全部叶片的分化率最高,增殖倍数可达8~9。

表3 不同切割方式对蝴蝶兰分化苗的影响

处理	切叶方式	转接瓶数	丛生芽数	增殖倍数
1	不切叶	100	1180	1.180
2	切叶2/3	100	2089	2.089
3	切叶1/3	100	4693	4.693
4	全部切叶	100	8849	8.849

2.4 不同激素浓度对蝴蝶兰壮苗的影响

由表4可知,培养基中适量添加6-BA及NAA可促进新叶萌发,以1/3MS+6-BA 0.05mg/L+NAA 0.05mg/L壮苗效果最好,组培苗生长旺盛,短缩茎粗壮,并可产生1~2个

(下转第22页)

作者简介 杨士辉(1964-),男,大学本科,高级农艺师,主要从事蔬菜、花卉育种、组织培养和栽培技术研究。

收稿日期 2008-04-20

表3 不同抗褐化剂在培养过程中的现象观察

抗褐化剂种类	不同培养时间抗褐化效果	
	5d	10d
Vc	材料周围培养基少许乌青色;材料大部分绿色,少量变色材料	培养基少许乌青色;褐变材料增多,变色材料死亡,产生愈伤组织
PVP	周围培养基稍许乌青色;材料大部分绿色,少量变色	培养基稍许变色;褐变材料少许增多,部分褐化材料死亡,产生大量愈伤组织
AC	材料和培养基均未褐化	出现少许褐变材料,产生少量愈伤组织

表4 应用抗褐化剂后外植体的褐化率

AC//%			Vc//mg/L			PVP//%			CK
0.05	0.10	0.50	100	200	400	0.02	0.04	0.08	
7.8	6.7	4.4	20.0	16.7	15.5	13.1	12.3	10.0	36.7

综合诱导率、褐化率及培养过程中外植物体生长情况等3种指标分析可知,浓度为0.04%的PVP为乌头愈伤组织诱导过程中的最佳抗褐化剂。

3 讨论

组织培养中外植体的褐化存在着基因型差异,甚至同一植株的不同组织、不同器官在组织培养中褐化发生的频率、严重程度都存在着很大的差异,本研究以附子GAP种苗基地的优良乌头植株4月上旬的幼嫩叶片为外植体,研究了PVP、AC和Vc对愈伤组织诱导的影响。

3.1 PVP的影响

由于乌头富含乌头碱易使培养基褐化,尤其在培养的初期非常严重,严重影响外植体的诱导。本试验在培养基中加入抗褐化剂PVP,从试验结果可以看出,外植体褐化程度明显低于空白对照,这是由于PVP吸附了外植体产生的酚类物质经空气氧化后形成的醌类物质。

3.2 AC的影响

在培养基中加入AC可以吸附有害物质,对细胞的生

(上接第20页)

根长。

表4 不同激素对比对蝴蝶兰壮苗的影响

处理	6-BA 浓度 mg/L	NAA 浓度 mg/L	苗高度 cm	叶片数 片	苗长势情况
1	0	0	1.0~2.5	2	叶色绿
2	0	0.05	1.5~3.0	2~3	叶色浅,短缩茎长
3	0	0.1	2.5~3.5	2	叶色黄绿,短缩茎细长
4	0.05	0.05	2.5~3.0	2~3	叶色浓绿,短缩茎粗壮

注:基本培养基1/3MS,加活性炭1g/L、糖20g/L、琼脂粉5.6g/L、香蕉、土豆、胡萝卜各10g/L,pH5.8。

2.5 不同激素对比对组培苗生根的影响

由表5可知,随着NAA用量的增加,生根率有明显提高。以1/2MS+NAA 1.0mg/L效果最好,生根率可达100%,平均根数2~3条。

3 讨论

3.1 激素对丛生芽分化增殖的影响

在丛生芽分化增殖培养过程中,原来的芽能否进一步萌发新芽并形成丛生芽,取决于培养基中加入激素的种类和浓度。6-BA有利于芽的形成,NAA有利于生根,Ade可

长有利。这些被吸附的有害物质包括琼脂中所含的杂质、培养物在培养过程中分泌的酚、醌类物质以及蔗糖在高压灭菌时产生的5羟甲基糠醛。AC同时又能吸附生长调节物质、V_B、叶酸和烟酸等有益物质。本研究中,在愈伤组织诱导阶段向培养基中添加AC,不仅使愈伤组织诱导率急剧下降,而且引起90%以上的外植体白化脱色,可能是AC吸附了培养基中生长调节物质,从而抑制外植体脱分化^[7]。与空白对照、不同浓度的V_C及PVP比较,AC表现出较强的抗褐化能力,且随着浓度增大褐化率越小,抗褐化能力越强。本研究还发现PVP对愈伤组织无明显影响,但AC特别是高浓度的AC,严重影响了愈伤组织的诱导率,PVP与AC同样为吸附类型的抗褐化剂,但效果不同,其机理有待深入研究。

3.3 V_C的影响

V_C为抗氧化型的抗褐化剂。V_C对乌头愈伤组织诱导率、褐化率影响不大。可能是经过高温灭菌培养基中大部分V_C失活的原因。但可引起6.7%~20.0%的外植体褪绿变成淡黄色,叶片外植体大约因为失水而变薄,这样的外植体无任何愈伤启动迹象。

4 参考文献

- [1] 孙启时.药用植物学[M].北京:中国医药科技出版社,2003.
- [2] 冉雄.中药组织培养实用技术[M].北京:科学技术文献出版社,2004.
- [3] 田迎秋,刘帆,黄玉碧,等.乌头植株再生体系的建立[J].中草药,2007,38(8):1243-1246.
- [4] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭.植物组织培养外植体褐变的研究进展[J].北京林业大学学报,1999,21(3):78-84.
- [5] 高国训.植物组织培养中的褐变问题[J].植物生理学通讯,1999,35(6):501-506.
- [6] 陈菲,李黎,官伟.植物组织培养的防褐化探讨[J].北方园艺,2005,6(2):69-70.
- [7] 刘用生,李友勇.植物组织培养活性碳的使用[J].植物生理学通讯,1994,30(3):214-217.

表5 不同激素浓度对蝴蝶兰组培苗生根的影响

处理	NAA 浓度 mg/L	IBA 浓度 mg/L	接种量 瓶	生根率 %	平均根数 条
1	-	-	100	50	0.8
2	-	1.0	100	65	1.1
3	0.5	-	100	95	1.4
4	1.0	-	100	100	2.3

注:基本培养基1/2MS,加活性炭1g/L、香蕉、土豆、苹果各10g/L、糖20g/L、琼脂粉5.6g/L。

使芽体壮,长势好,三者配合使用效果较好。

3.2 激素的积累

经多次继代后会造外源激素的积累,反过来抑制内源激素的产生,使幼苗生长停止,茎细弱,叶片细小卷曲而成莲座状。出现这种情况,应改用基本培养基,停止添加激素,将幼苗体内过多的激素释放出来,逐步恢复正常生长状态。

4 参考文献

- [1] 曹君迈,王薇,任贤,等.不同因素对蝴蝶兰无性系组培苗增殖系数的影响[J].北方园艺,2006(5):152-153.
- [2] 曹修才,杨士辉,朱方平,等.蝴蝶兰组培技术与产业化开发[J].北方园艺,2006(6):150-151.
- [3] 秦凡等,周吉源.蝴蝶兰的组织培养研究[J].生物学杂志,2003(3):19-21.