

蝴蝶兰类原球茎玻璃化产生的原因及恢复效果研究

顾德峰¹, 刘 喆², 宋彦君³, 赵春莉¹, 王 奇¹

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林省经济管理干部学院,
吉林 长春 130012; 3. 吉林国联农业生物技术发展股份有限公司, 吉林 长春 130022)

摘 要:对蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)组培生产中引起类原球茎玻璃化的原因以及玻璃化类原球茎再利用的效果进行了研究。结果表明,随着植物生长调节剂浓度增高和继代培养的时间延长,类原球茎玻璃化程度加重。当 NAA 浓度为 5 mg/L、BA 浓度为 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%。玻璃化类原球茎的平均增殖率仅为 2.2,再生植株率为 183 株/瓶,明显低于正常类原球茎的 5.3 和 1 297 株/瓶。玻璃化类原球茎在无植物生长调节剂培养基中经 2~3 代恢复培养后,数量下降到 0.84%,玻璃化现象可得到明显恢复,恢复后的类原球茎的分化能力和植株生长状态与正常类原球茎一致,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;类原球茎;玻璃化

中图分类号:S 682.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)08-0183-03

蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)由于其生物学特点,种子无胚乳,又属单茎兰,所以在产业化生产中难于其它非兰科花卉,只能通过组织培养手段建立快繁体系。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^[1-3]。但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,可能会导致蝴蝶兰类原球茎玻璃化现象,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,类原球茎玻璃化产生的原因和防治方法,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 1999 年始,对 5 个蝴蝶兰杂交种的类原球茎继代扩繁进行了详细的研究,找出了引起组培快繁过程中类原球茎玻璃化的原因,并研究出相应的恢复措施,为在规模化生产中克服由原球体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

1.1 材料来源

供试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), 编号 G-112; Dtps. (Minho Princess × P. Chib Shang's Stripes), 编号 G-134; Dtps. (Sun Prince × King Shiang's Rose), 编号 G-114; P. Hwafeng Redjewel 'Ru-

by', 编号 G-50; Dtps. (Dygaus × Happy Valengine), 编号 G-105。类原球茎由上述 5 个材料花梗无菌苗茎尖诱导而成。

1.2 培养基及培养条件

以 MS 和狩野培养基(Kyoto)^[4]用于类原球茎的继代与增殖基本培养基。2 种培养基中分别添加不同浓度的 6-BA 和 NAA(见表 1), pH 5.4~5.6。培养条件:白天温度 25~28℃, 晚间 23~25℃。光照 2 000~3 000 Lx。光照时间 12 h/d。

1.3 类原球茎接种

每次继代时对类原球茎进行分类,将具有典型状态的类原球茎、玻璃化类原球茎以及其它非正常状态类原球茎分别接种。将分类后的类原球茎组织均匀地接种到继代培养基中。接种密度约为 1 粒/cm²,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。每次转接后统计不同状态类原球茎的瓶数。

2 结果与分析

2.1 类原球茎在不同生长调节剂浓度培养基中的表现

将类原球茎分别在含有不同浓度生长调节剂的培养基进行继代培养后,起初的 1~3 代类原球茎的状态并没有表现出大的差异。从第 4 代后,在 2 种培养基中,随着生长调节剂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)。生长调节剂水平在 NAA 5 mg/L+BA 10 mg/L 条件下,2 种培养基继代到第 9 代时,玻璃化类原球茎分别高达 71%和 65%,表现出严重玻璃化现象。

新复极差测验表明,玻璃化类原球茎发生的比例在

第一作者简介:顾德峰(1956-),男,硕士,副教授,主要从事园林植物组织培养工作。E-mail:gu.df@163.com。

基金项目:吉林省科技厅青年基金资助项目(20000556-2);吉林省科技厅重大课题资助项目(200504163)。

收稿日期:2007-03-21

0.01 水平差异显著。在试验中还观察到,一些类原球茎在生长调节剂 NAA 浓度达 5 mg/L、BA 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

无新的类原球茎产生,也不分化成苗,以类似愈伤组织的状态进行扩增。由此可见,高浓度生长调节剂的长期继代培养是导致类原球茎玻璃化的重要因素之一。

表 1 生长调节剂浓度和继代时间对类原球茎玻璃化程度的影响

| 生长调节剂水平 | 第 5 次继代 玻璃化/总瓶数 | 第 6 次继代 玻璃化/总瓶数 | 第 7 次继代 玻璃化/总瓶数 | 第 8 次继代 玻璃化/总瓶数 | 第 9 次继代 玻璃化/总瓶数 |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| MS 培养基 | | | | | |
| NAA 0 mg/L+BA 0 mg/L | 0/521 | 0/662 | 1/505 | 0/329 | 1/403 |
| NAA 1 mg/L+BA 3 mg/L | 0/398(0) | 3/332(0.01) | 4/395(0.01) | 8/438(0.02) | 9/450(0.02) |
| NAA 3 mg/L+BA 5 mg/L | 3/288(0.01) | 16/420(0.04) | 17/345(0.05) | 33/419(0.08) | 30/333(0.09) |
| NAA 5 mg/L+BA 10 mg/L | 13/212(0.06) | 36/301(0.12) | 121/311(0.39) | 231/399(0.58) | 182/256(0.71) |
| 改良狩野 | | | | | |
| NAA 0 mg/L+BA 0 mg/L | 0/322 | 0/586 | 0/613 | 0/492 | 1/450 |
| NAA 1 mg/L+BA 3 mg/L | 0/219(0) | 3/355(0.01) | 4/400(0.01) | 8/383(0.02) | 8/411(0.02) |
| NAA 3 mg/L+BA 5 mg/L | 4/366(0.01) | 13/650(0.02) | 22/429(0.05) | 39/555(0.07) | 58/581(0.10) |
| NAA 5 mg/L+BA 10 mg/L | 16/327(0.05) | 58/324(0.18) | 115/412(0.28) | 221/502(0.44) | 246/378(0.65) |

注:表中数据为 5 个品种的累加值。

2.2 玻璃化类原球茎与正常类原球茎分化增殖能力比较

将 5 个品种的玻璃化类原球茎和正常状态的类原球茎分别转入无生长调节剂的改良狩野培养基进行一次继代扩繁后,再进行成苗培养。结果表明,玻璃化类原球茎的分化增殖能力明显低于正常的类原球茎,玻璃化类原球茎的平均增殖率仅为 2.2,而正常类原球茎的平均增殖率为 5.3(表 2)。

表 2 玻璃化类原球茎与正常类原球茎分化增殖能力的比较品种编号

| 品种 编号 | 玻璃化类原球茎 | | | | 正常类原球茎 | | | |
|----------|---------|-----|-----|--------|--------|-----|-----|--------|
| | 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 | 8 480 | 43 | 220 | 5.1 | 59 502 |
| G-112 | 37 | 70 | 1.9 | 5 660 | 36 | 167 | 4.6 | 41 315 |
| G-134 | 52 | 130 | 2.5 | 10 432 | 58 | 319 | 5.5 | 74 550 |
| G-114 | 21 | 42 | 2.0 | 3 460 | 40 | 198 | 5.0 | 47 520 |
| G-105 | 61 | 159 | 2.6 | 12 525 | 48 | 283 | 5.9 | 68 996 |
| 平均 | 44 | 101 | 2.2 | 8 111 | 45 | 238 | 5.3 | 58 377 |

由玻璃化类原球茎分化成苗的数量也明显少于正常类原球茎的产苗数量,5 个品种玻璃化类原球茎平均每母瓶产苗 183 株(8 111 株/44 瓶),而正常类原球茎平均每母瓶产苗为 1 297 株(58 377 株/45 瓶)。不仅如此,由玻璃化类原球茎分化成的幼苗多数质量状况也不及正常类原球茎的幼苗,表现有叶厚、叶脆、水浸状,出瓶移栽难成活等特征。由此可见,类原球茎一旦形成玻璃化,就很难在生产上继续应用。

2.3 玻璃化类原球茎的恢复

选择各品种呈典型玻璃化状态的类原球茎,将其转入无生长调节剂的改良狩野培养基中进行恢复培养处理。恢复培养结果见表 3。可以看出,第 1 代恢复培养时,转入到无生长调节剂培养基中的类原球茎全部呈玻璃化状态,经 2.5 个月的一次恢复培养后,第 2 次转接时,玻璃化类原球茎的数量平均下降为 36.68%。仅仅经过一代的恢复培养,大部分类原球茎的状态就有了明

显的改观。再经 2.5 个月的第 2 代恢复,第 3 次转接后玻璃化类原球茎的数量下降到 0.84%。可见经过 2~3 次的恢复培养类原球茎可基本上恢复为正常状态。第 4 代恢复培养后,类原球茎的整体状况与生产上使用的正常状态的类原球茎基本上没有区别,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 继代培养次数对玻璃化类原球茎的恢复效果

| 品种编号 | 第 1 代培养 | 第 2 代培养 | 第 3 代培养 | 第 4 代培养 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|
| | 玻璃化/总瓶数 | 玻璃化/总瓶数 | 玻璃化/总瓶数 | 玻璃化/总瓶数 |
| G-50 | 55/55 | 32/107 | 5/481 | 1/1920 |
| G-112 | 49/49 | 19/92 | 4/395 | 0/1990 |
| G-134 | 91/91 | 41/182 | 11/819 | 4/4765 |
| G-114 | 18/18 | 10/39 | 1/209 | 0/836 |
| G-105 | 44/44 | 26/122 | 3/599 | 0/2977 |
| 玻璃化类原球茎平均比例 | 100% | 36.68% | 0.84% | 0.02% |

2.4 玻璃化类原球茎的植株生长状态

表 4 恢复后玻璃化类原球茎的植株生长状况

| 品种编号 | 出瓶苗/株 | 成活率/% | 开花株/株 | 变异株/株 |
|-------|--------|-------|--------|-------|
| G-50 | 5 630 | 96 | 2 862 | 0 |
| G-112 | 3 280 | 98 | 2 190 | 0 |
| G-134 | 8 290 | 97 | 3 216 | 0 |
| G-114 | 9 100 | 94 | 4 310 | 0 |
| G-105 | 10 500 | 95 | 5 722 | 0 |
| 合计 | 36 800 | 96 | 18 300 | 0 |

对恢复后的玻璃化类原球茎进行继代扩繁和成苗培养,并对其幼苗的生长过程进行了跟踪调查(表 4)。5 个品种共产幼苗 36 800 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类原球茎的植株相同。温室栽培 2 a 后进行开花诱导,所调查的 18 300 株开花株中,无变异现象发生。因此,只要对玻璃化类原球茎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。

3 讨论

在植物组培生产中,引起玻璃化现象发生的原因有很多^[5],生长调节剂的过量使用往往是其原因之一。因

此如何掌握好生长调节剂的用量,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,对生长调节剂用量的要求差异较大,一般在花梗苗培养和类原球茎诱导阶段,常使用较高水平的生长调节剂^[6-8],否则可能不易达到预期的效果。但是,类原球茎一经形成,在进一步长时期继代扩繁过程中,应尽可能地降低生长调节剂的用量,通常应在无生长调节剂的培养基中进行。不然的话,就有可能导致玻璃化现象的发生。在蝴蝶兰无性系扩繁中,一般情况下,玻璃化现象并不严重,如果一旦不慎,发生了玻璃化类原球茎,也不应急于作淘汰处理,由于玻璃化现象大多为非遗传的生理失调症状^[5],所以只要对其进行适当的恢复培养,多数玻璃化类原球茎可恢复正常,进而继续应用于生产,试验的结果证实了这一点。

Study on the Cause and Restoration of Vitrification PLB in Tissue Culture and Rapid Propagation of *Phalaenopsis*

GU De-feng¹, LIU Zhe², SONG Yan-jun³, ZHAO Chun-li¹, WANG Qi¹

(1. College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin Province Economics and Management Cadres College, Changchun 130012, China; 3. Jilin International Union Agricultural Biology Technique Development Ltd., Changchun 130122, China)

Abstract: Studying on the causes and the recycle effects of vitrification protocorm in manufacture of *Phalaenopsis*. Results showed that: it aggravates the extent of protocorm vitrification with the increase of hormone concentration and the expansion of subculture time. The vitrification rates of two culture mediums rise to 71% and 65% respectively when the concentration of hormone NAA was 5mg/L, hormone BA was 10 mg/L and subculture the ninth generation. The reproduction ability and plant regeneration rate was lower distinctly than formal protocorm. The phenomenon of vitrification could restore significantly after culture 2 or 3 generations in the culture medium without hormone. The differentiation ability of protocorm restored and the state of plant growth was consistent with the formal protocorm. It could continue applying to the manufacture of tissue culture.

Key words: *Phalaenopsis*; Tissue culture; Protocorm-like body; Vitrification

参考文献

- [1] 李军,柴向华,曾宝琦,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] 卢思聪. 中国兰与洋兰[M]. 北京: 金盾出版社, 1997: 16.
- [5] 曹牧义,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.
- [6] 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.
- [7] 王怀宇. 蝴蝶兰的快速无性繁殖[J]. 园艺学报, 1989, 16(1): 73-77.
- [8] 陈之林,叶秀麟,梁承鄞. 蝴蝶兰花萼的离体培养[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 242-244.

由于在葡萄病害防治中存在着误区,导致了生产中葡萄病害防不胜防。常见的误区有:

1 重治轻防

许多病害往往是在发现明显的症状后,才开始急于施用有效的治疗性药剂。治疗性的药剂(如多菌灵、甲基托布津等广谱性的药剂)由于长期多次使用,往往使病菌产生了不同程度的抗药性,防病的效果也在逐步变差,病害更加难以防治。保护性的药剂(如波尔多液等制剂)能起到很好的控制病源和保护植株的作用,并且不会产生病菌的抗药性,这类药剂防病时往往被忽视。

2 乱混乱配

在有多种病害发生时,分不清病害的种类,不了解药剂防治的针对性,只

是为了减省施药用工,达到一工多效的目的,常将几种药剂混合在一起使用,尤其是目前市面上一些商品药本身就是复配剂,这反而更使病菌产生多向的抗药性,再换用其他的药剂也根本无效。

3 重量轻质

即重视用药次数,而忽视每次的用药质量。生产上在病害多发季节,每隔7~15 d用药一次或雨后用药一次,许多果农按此规律用药,但常出现用药不到位现象。如霜霉病没有重点喷叶背,黑痘病没有重点喷植株的幼嫩部分等。在喷施保护性的药剂时,不全面,留有许多死角,造成病害再次发生危害。

4 防果不防叶

防治葡萄病害 须防六大误区



果穗有病易引起注意,而叶上的病害常被忽视。生产上常见因霜霉病危害而造成大量的植株落叶现象。

5 重采果前轻采果后

在葡萄采收前往往会精细管理,采收后便任其自然,造成后期病害大量发生,落叶提早,严重影响到次年的产量。

6 重视化学防治,忽视综合的栽培措施

葡萄病害的发生与架面内外的通风透光、土壤的肥水状况、树势的强弱密切相关,单纯依靠化学防治很难从根本上解决。