

蝴蝶兰组培不定芽增殖条件的优化*

王冬云¹⁾ 汪建亚²⁾* * 蔡 桁²⁾ 蒋祥娥²⁾

(¹⁾华中农业大学园艺林学学院,武汉 430070; ²⁾湖北省林木育种中心,武汉 430079)

摘要 以黄花蝴蝶兰的花梗腋芽诱导出的不定芽为外植体,利用正交设计法研究了培养基的无机营养、TDZ、有机添加物和蔗糖4种因素对不定芽增殖的影响。结果表明:蝴蝶兰不定芽增殖的最佳培养基配方为KC+TDZ 0.20 mg/L+椰子水 200 mL/L+蔗糖 14 g/L+柠檬酸 30 mg/L,其中有机添加物的种类和浓度对不定芽增殖的影响最大。

关键词 蝴蝶兰; 不定芽增殖; 正交设计; 组织培养

中图分类号 S 682.310.36

文献标识码 A

文章编号 1000-2421(2007)06-0856-03

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* Bl. spp.)属热带气生兰,其花大,花期长,花色艳丽、色泽丰富,花形美丽别致,如蝴蝶翩翩起舞,因而得名。在热带兰中有“兰花皇后”之美称,是近年来最受欢迎的洋兰之一。蝴蝶兰是单茎性气生兰,植株很少发育侧芽,且种子极难萌发,对其进行常规性的繁殖,增殖速度很慢,故多采用组织培养的方法对其进行快速繁殖。本研究在前人工作的基础上^[1-3],以黄花蝴蝶兰的花梗芽为材料,利用正交设计法进行组织培养和快速繁殖,获得了试管苗,为满足市场需求提供了一条有效的途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为湖北省林木育种中心引进的黄花蝴蝶兰品种,取其花梗(带腋芽)为外植体。

1.2 试验方法

接种当天剪取黄花蝴蝶兰花梗,于超净工作台上用75%酒精浸泡30 s,0.1%升汞消毒12 min(在消毒过程中要不断摇晃灭菌瓶让材料充分灭菌),最后用无菌水冲洗5次。将消毒后的材料先用无菌滤纸吸干其表面的水分,切成2~3 cm的茎段(带腋芽),接种到诱导培养基上使其萌发,从萌发的花梗芽基部诱导出不定芽,再以不定芽进行增殖,最后将增殖芽接入生根培养基诱导生根,待其形成完整的植株后移栽。

1.3 培养条件

培养基附加柠檬酸 30 mg/L,琼脂 6.5 g/L,调节pH到5.4,121℃下高温灭菌20 min。培养室温度为(25±2)℃,每天光照12 h,光照强度1 500~1 800 lx。

2 结果与分析

2.1 外植体的获得

将消毒后的花梗芽按极性插于培养基MS+6-BA 10 mg/L上,培养15 d后花梗芽逐渐萌动膨大,1个月后长出带小叶的不定芽。

2.2 不定芽增殖

利用正交设计法[L₁₆(4⁴)]研究了培养基中的无机营养、TDZ、有机添加物和蔗糖4种因素对黄花蝴蝶兰不定芽增殖的影响。试验设计的因素、水平安排见表1。

将不定芽分别接种在不同处理的培养基上,各接15瓶(每瓶3芽)。观察到不定芽15 d左右开始长出绿色的小芽点,20 d左右长出小的原球茎,并逐渐生长出不定芽(图1-A)。在本试验中,新增殖的不定芽长度达到0.5 cm以上才计数,2个月后统计不定芽增殖倍数(增殖倍数=增殖芽数/接种芽数),具体试验设计及结果见表2。

采用极差分析法可以看出各因素的主次顺序,并找出参试因素的最佳水平组合(表2),由4因素

收稿日期:2007-01-10

*湖北省重大科技攻关项目(2004AA204B02)资助

** 通讯作者。E-mail: wangjianya2000@yahoo.com

王冬云,女,1982年生,硕士。现在工作单位:江苏省宿迁市泗洪县建设局,宿迁 223900。E-mail: dongyunwang1982@126.com

表 1 $L_{16}(4^4)$ 因素及水平表¹⁾

A	B	C/(mg·L ⁻¹)	D	E/(g·L ⁻¹)
1	MS	0.05	椰子水(Coconut water) 100 mL/L	0
2	VW	0.10	椰子水(Coconut water) 200 mL/L	7
3	KC	0.15	土豆汁(Potato juice)15 g/L+ 苹果汁(Apple juice)15 g/L	14
4	花宝 1 号 Hyponex	0.20	土豆汁(Potato juice)30 g/L + 苹果汁(Apple juice)30 g/L	21

1)A. 水平 Levels; B. 无机营养 Nutrient solution; C. TDZ; D. 有机添加物 Organic compounds; E. 蔗糖 Sucrose; 下同 The same as follows
的 k 值大小可得出, 在黄花蝴蝶兰不定芽增殖过程中, 以 KC 为基本培养基较好; TDZ 浓度需求量较高, 适宜剂量为 0.20 mg/L; 椰子水的效果优于苹果汁和土豆汁的混合物, 椰子水适宜的剂量为 200 mL/L; 蔗糖适宜的剂量为 14 g/L。从极差值大小可以看出, 不同因素对蝴蝶兰不定芽增殖影响的主次关系为 $C>B=D>A$ 。这说明对于蝴蝶兰不定芽增殖起主要作用的是有机添加物, 其次是蔗糖和 TDZ, 培养基的无机营养对增殖的影响较小。

表 2 正交试验设计及结果¹⁾

处理 Treatments	因素 Factors				不定芽增殖倍数 The rate of adventitious buds proliferation
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.0
2	1	2	2	2	4.5
3	1	3	3	3	3.0
4	1	4	4	4	2.3
5	2	1	2	4	4.5
6	2	2	1	3	5.0
7	2	3	4	2	2.0
8	2	4	3	1	1.7
9	3	1	3	2	0.7
10	3	2	4	1	1.0
11	3	3	1	4	5.4
12	3	4	2	3	12.0
13	4	1	4	3	2.6
14	4	2	3	4	3.0
15	4	3	2	1	6.3
16	4	4	1	2	5.4
K_1	10.8	8.8	16.8	10	
K_2	13.2	13.5	27.3	12.6	
K_3	19.1	16.7	8.4	22.6	
K_4	17.3	21.4	7.9	15.2	
k_1	2.7	2.2	4.2	2.5	
k_2	3.3	3.4	6.8	3.2	
k_3	4.8	1.2	2.1	5.7	
k_4	4.3	5.4	2.0	3.8	
R	2.1	3.2	4.8	3.2	

综上所述, 黄花蝴蝶兰不定芽增殖培养基的最佳处理为 $A_3B_4C_2D_3$, 即 KC+TDZ 0.20 mg/L + 椰子水 200 mL/L + 蔗糖 14 g/L + 柠檬酸 30 mg/L, 黄花蝴蝶兰不定芽在此配方上的增殖倍数达到 12.0。

2.3 生根诱导培养

将增殖芽接种到 1/2 MS+GA₃ 0.1 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 蔗糖 20 g/L 的培养基上, 30 d 左右可以长出具根、茎、叶的完整植株, 而且植株健壮、长势好(图 1-B)。

2.4 试管苗移栽

将具有 3~4 片叶子的生根组培苗在温室下再培养 1 周, 打开瓶盖炼苗 3~4 d, 从瓶中取出试管苗, 洗去根部的培养基, 用水苔包住小苗基部栽植在穴盘中, 白天温度控制在 25℃, 夜间 18℃ 左右, 相对湿度开始 100%, 然后慢慢降低。1 个月后统计移栽成活率达到 91.5%。组培苗移栽 4~6 周之后可适当施一些液体肥料, 每周 1 次。

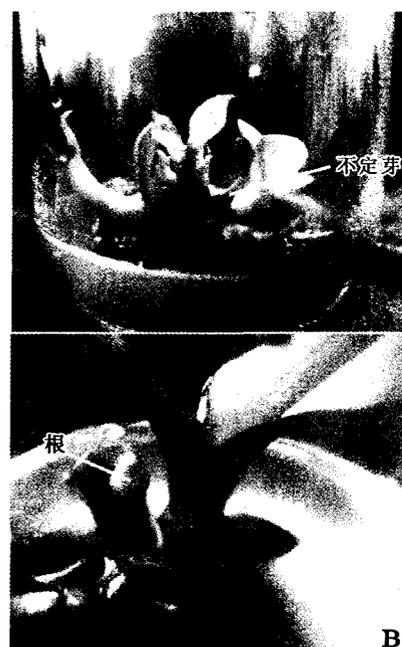


图 1 蝴蝶兰不定芽的诱导及生根

Fig. 1 The induction of adventitious shoot and root

A. 诱导不定芽 Adventitious shoot induction;
B. 诱导生根 Root induction

3 结论与讨论

蝴蝶兰不定芽增殖时, 潘学峰等^[1]在 MS+BA 12.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 上增殖倍数为 3; 林宗铿等^[6]在花宝 1 号 3 g/L+6-BA 10 mg/L+

NAA 0.2 mg/L + 腺嘌呤 10 mg/L + 肌醇 100 mg/L + 椰子水 100 mL/L 上增殖倍数为 7.24。本试验在 KC + TDZ 0.20 mg/L + 椰子水 200 mL/L + 蔗糖 14 g/L + 柠檬酸 30 mg/L 上取得了较好的增殖效果,增殖倍数达到 12.0。

TDZ 是一种高活性的细胞分裂素,其活性一般是 6-BA 的数十至数百倍,对蝴蝶兰不定芽的增殖起到很好的作用。TDZ 可以引起细胞分裂素的积累或合成,并可抑制内源生长素的降解^[4]。TDZ 对各种外植体芽的再生诱导效果较 6-BA 好,但浓度大时易玻璃化和畸形^[9]。

椰子水、马铃薯、苹果等有机添加物是蝴蝶兰组织培养中常用的有机添加物,它们含有氨基酸、矿物质、维生素和碳水化合物等成分,这些成分对细胞的增殖和培养物的生长有明显的促进作用。试验表明,在上面几种不同种类和浓度的添加物中,椰子水 200 mL/L 对蝴蝶兰原球茎增殖效果最好。

目前关于蝴蝶兰组织培养过程中遇到的褐变问题还没有完全解决,但可以采取适当的措施加以控制。前期预备试验表明在培养基中加入柠檬酸可明显减轻褐化,这可能与柠檬酸抑制了多酚氧化酶的

活性或增强了醌类化合物还原剂有关。本试验中发现培养基 pH 为 4.5~5.0 时,培养物排出的褐变物质较多,pH 为 5.4~5.5 时排出的褐变物质较少。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 胡海英,王建宇. 蝴蝶兰的离体培养与快繁技术研究[J]. 宁夏大学学报:自然科学版,2002,23(4):367-369.
- [4] 李成慧,蔡斌,单丽丽,等. 应用正交设计法探讨蝴蝶兰叶片类原球茎的诱导[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2004,25(2):76-78.
- [5] 刘奕清,熊运海,王大平. 蝴蝶兰离体快繁优化体系研究[J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2005,27(3):410-412.
- [6] 林宗铿,黄德贵. 蝴蝶兰花梗的组织培养及快速繁殖[J]. 福建热作科技,2001,26(1):6-9.
- [7] 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.
- [8] 张国治,严霄,王凤仙. 正交设计在组织培养研究中的应用[J]. 植物生理学报,1985,21(5):214-216.
- [9] 徐晓峰,黄学林. TDZ——一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报,2003,2(2):227-237.

Optimization of Tissue Culture Condition on Proliferation Adventitious Buds of *Phalaenopsis* Bl. spp.

WANG Dong-yun¹⁾ WANG Jian-ya²⁾ CAI Heng²⁾ JIANG Xiang-e²⁾

¹⁾College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China;

²⁾Forest Tree Breeding Center of Hubei Province, Wuhan 430079, China)

Abstract The peduncle axillary bud of *Phalaenopsis* Bl. spp. with yellow was induced adventitious shoot as explants. The orthogonal design was used to study the effects of inorganic nutrition, TDZ (N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5ylurea), organic additive substances and sucrose contained in the culture medium on the adventitious shoots propagation of *Phalaenopsis* spp. The results indicate that the optimal medium for shoot propagation of *Phalaenopsis* Bl. spp. is KC basal medium supplemented with 0.20 mg/L TDZ, 200 mL/L coconut water, 14 g/L sucrose and 30 mg/L citric acid. And the variety and concentration of organic additive substances are the most effective elements.

Key words *Phalaenopsis* Bl. spp.; adventitious buds proliferation; orthogonal design; tissue culture

(责任编辑:张志钰)