

蝴蝶兰组培快繁技术研究

黄象男, 臧 新, 吕晓辉, 任建升
(郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001)

摘要: 通过组织培养的方法诱导蝴蝶兰花梗上的腋芽萌发, 可以得到无菌的蝴蝶兰不定芽。以不定芽上的幼叶为外植体, 建立蝴蝶兰的无菌培养体系。结果表明: 诱导腋芽萌发的培养基为 MS+5 mg/L 6-BA; 利用幼叶进行原球茎诱导的最佳培养基为 MS+5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.1 g/L 活性炭(AC)+150 mL/L 椰汁(CM); 原球茎增殖的培养基为 3 g/L 花宝一号(Hyponex No. 1)+5 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA+150 mL/L CM; 生根培养基为 3 g/L Hyponex No. 1+0.1 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA+0.5 g/L AC+100 mL/L 土豆汁。

关键词: 蝴蝶兰; 花梗腋芽; 原球茎; 组织培养

中图分类号: S682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)01-0091-04

Rapid Propagation of *Phalaenopsis* Orchid by Tissue Culture

HUANG Xiang-nan, ZANG Xin, LV Xiao-hui, REN Jian-sheng
(Bioengineering Department of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The axenic adventitious buds were gained by inducing the germination of the axillary bud of floral stalk in *Phalaenopsis* orchid. The young leaves of the axenic adventitious bud were employed as explants to establish the axenic culture system. The results showed that in MS medium with 6-BA 5 mg/L, the axillary buds of floral stalk could be induced to germinate. Using the young leaves to induce the protocorm-like body, the medium with MS + 5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 0.1 g/L AC + 150 mL/L coconut milk(CM) showed the best effects. The suitable media propagating protocorm-like bodies were 3 g/L Hyponex No. 1 + 5 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA + 150 mL/L CM. In rooting stage, 3 g/L Hyponex No. 1 + 0.1 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA + 0.5 g/L AC + 100 mL/L potato juice was efficient.

Key words: *Phalaenopsis*; Axillary bud of floral stalk; Protocorm-like body; Tissue culture

蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)为兰科蝴蝶兰属,因其迷人的花色,深受广大爱好者的欢迎。由于蝴蝶兰是单轴气生兰,植株很少发育侧枝,因此利用传统的无性繁殖方法,繁殖系数低、繁殖速度慢,远远不能满足商品化生产的要求^[1];其种子极为细小,多发育不完全,通过种子萌发而来的实生苗易于发生基因变异,无法保持母本的优良性状,失去商业观赏价值,因此有性繁殖困难^[2]。而利用组织培养的方法对蝴蝶兰进行无性繁殖,既可以大量生产优质的无菌苗,又可以避免变异植株的产生。因此,组织培养

是蝴蝶兰大量繁殖的最有效手段^[3]。本研究利用花梗直接诱导腋芽,成活率高且对母株影响小,是比较理想的外植体来源。通过研究蝴蝶兰组培快繁过程中各种因素对花梗腋芽诱导、原球茎诱导及增殖等方面的影响,为规模化生产提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料取自成年蝴蝶兰已开花的花梗。

1.2 试验方法

收稿日期: 2007-06-12

基金项目: 郑州大学博士科研启动基金

作者简介: 黄象男(1968-),女,河南驻马店人,在读硕士研究生,研究方向: 植物细胞工程。

1.2.1 花梗消毒 将带有腋芽的蝴蝶兰花梗剪成2 cm长的节段进行冲洗,用10%的漂白粉溶液表面灭菌20 min,除去腋芽的苞叶,再用0.1%升汞消毒10 min后,用无菌水冲洗5遍,接种在MS+5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA培养基上诱导丛生芽。培养条件为温度28℃、光照强度1500 lx、光照时间12 h/d。

1.2.2 原球茎的诱导 将诱导出的不定芽的叶片切成5 mm×5 mm大小,接种在添加了150 mL/L椰汁(CM)的不同激素浓度的培养基上进行原球茎诱导,叶片近轴部分接触培养基。原球茎诱导培养基的正交试验设计见表1。培养条件为温度25℃、光照强度500 lx、光照时间16 h/d。

1.2.3 原球茎的增殖及分化 在无菌条件下,将诱导的原球茎取出横切成几小块,转入添加了150 mL/L有机复合物的继代培养基中,进行增殖培养。花宝一号(Hypoxex No. 1)培养基的添加量为3 g/L, pH值为5.4。原球茎增殖培养基的正交试验设计见表2。

1.2.4 蝴蝶兰的生根培养 将已分化出不定芽的蝴蝶兰接种在附加0.5 g/L活性炭(AC)和100 mL/L土豆汁(PJ)的生根培养基中。蝴蝶兰幼苗生根培养基的正交试验设计见表3。

2 结果与分析

2.1 不同培养条件对原球茎诱导的影响

幼叶切块在诱导培养基上培养7 d左右开始有黑色物质分泌,1个月后,从每个叶片组织块上产生1~6个不等的黄绿色瘤状突起,即原球茎。从表1可以看出,6-BA因素的极差(R)最大,培养基因素次之,NAA和AC因素最小;这说明6-BA对原球茎诱导影响最大,其次是培养基,NAA和AC影响最小。

评价各因素水平平均值发现,培养基和6-BA因素均以第3水平值最大,NAA因素以第2水平值最大,AC因素以第1水平值最大,因此最佳培养基组合为MS+5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.1 g/L AC+150 mL/L CM,诱导率可达53.1%。

2.2 不同培养条件对原球茎增殖及分化的影响

原球茎切块在增殖培养基上培养25 d左右时,每个原球茎周围产生少量肉眼可以看到的突起,少数原球茎表面形成白色的绒毛。继续培养时发现,原球茎由淡黄色转变为绿色,成为具绿色叶原基的假鳞茎原球茎,进而分化成苗。

表1 不同培养条件诱导原球茎的正交试验结果(L₉3⁴)

处理编号	基本培养基类型	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	AC (g/L)	诱导率 (%)
1	1/3MS	1	0	0.1	0.0
2	1/3MS	3	0.5	0.3	9.4
3	1/3MS	5	1	0.5	21.9
4	1/2MS	1	0.5	0.5	6.3
5	1/2MS	3	1	0.1	12.5
6	1/2MS	5	0	0.3	28.1
7	MS	1	1	0.3	15.6
8	MS	3	0	0.5	34.4
9	MS	5	0.5	0.1	53.1
X1	10.43	7.30	20.83	21.87	
X2	15.63	18.77	22.93	17.70	
X3	34.37	34.37	16.67	20.87	
K1	31.3	21.9	62.5	65.6	
K2	46.9	56.3	68.8	43.1	
K3	103.1	103.1	50.0	62.6	
R	23.93	27.07	6.27	4.17	

从表2可以看出,基本培养基和6-BA对原球茎增殖有极显著影响,而NAA和有机添加物对原球茎增殖无明显影响。因此原球茎增殖的最适宜培养基为3 g/L Hypoxex No. 1+5 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA+150 mL/L CM。

表2 不同基本培养基和生长调节因子对原球茎增殖影响的正交试验结果(L₉3⁴)

处理编号	基本培养基类型	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	有机添加物 (mL/L)	增殖系数
1	1/2MS	1	0.5	CM	2.9
2	1/2MS	3	1	PJ	3.6
3	1/2MS	5	2	BJ	4.7
4	MS	1	1	BJ	2.2
5	MS	3	2	CM	3.1
6	MS	5	0.5	PJ	4.2
7	Hypoxex No. 1	1	2	PJ	3.2
8	Hypoxex No. 1	3	0.5	BJ	4.0
9	Hypoxex No. 1	5	1	CM	5.5
X1	3.73	2.77	3.70	3.83	
X2	3.17	3.57	3.77	3.67	
X3	4.23	4.80	3.67	3.63	
K1	11.2	8.3	11.1	11.5	
K2	9.5	10.7	11.3	11.0	
K3	12.7	14.4	11.0	10.9	
R	1.07	2.03	0.10	0.20	
F值		基本培养基		106.81**	
		6-BA		393.50**	
		NAA		1.00	
		有机添加物		4.31	

注:BJ为香蕉汁;**表示极显著水平(P<0.01)

2.3 不同培养条件对蝴蝶兰幼苗生根的影响

幼苗在接种25 d左右开始长出根点,并逐渐伸长,根尖呈白色。以每株具有2~3片完全展开叶和

3条或3条以上根的苗计为生根苗。从表3可以看出,各因素影响根长的主次顺序为NAA、基本培养基类型和6-BA;方差分析表明,NAA和培养基因素效应都达到显著水平,而6-BA的效应达不到显著水平。故适宜蝴蝶兰生根的最佳组合为3g/L Hyponex No. 1+0.1mg/L 6-BA+1mg/L NAA+0.5g/L AC+100mL/L 土豆汁。

表3 不同培养条件对蝴蝶兰生根影响的正交试验结果(L₃³)

处理 编号	基本培养 基类型	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	生根率 (%)	平均根长 (cm)
1	1/2MS	0.1	0.3	72.8	1.3
2	1/2MS	0.3	0.5	74.7	1.2
3	1/2MS	0.5	1	81.2	2.2
4	MS	0.1	0.5	73.6	1.1
5	MS	0.3	1	79.8	1.7
6	MS	0.5	0.3	66.7	0.9
7	Hyponex No. 1	0.1	1	85.3	2.3
8	Hyponex No. 1	0.3	0.3	75.0	1.4
9	Hyponex No. 1	0.5	0.5	76.9	1.5
X1	76.23	77.23	71.50		
X2	73.37	76.50	75.07		
X3	79.07	74.93	82.10		
K1	228.7	231.7	214.5		
K2	220.1	229.5	225.2		
K3	237.2	224.8	246.3		
R	5.70	2.30	10.60		
F 值	基本培养基		25.01*		
	6-BA		4.25		
	NAA		89.56*		

注: * 表示显著水平(P<0.05)

3 讨论

1) 在蝴蝶兰组织培养过程中,外植体的选择起着关键性的作用。文献报道中以茎尖、叶片和腋芽作为外植体的居多^[4~7]。茎尖作外植体诱导原球茎诱导率高、周期短,但损伤母株,而且还会有不同程度的污染率。本研究采用腋芽萌发的不定芽的幼叶为外植体,虽然诱导率稍低,但大大降低了污染率,减少了工作量。

2) 防止材料褐变是蝴蝶兰组培成功的关键。褐变的主要原因是材料伤口分泌出酚类化合物,在多酚氧化酶的作用下转变成醌类物质引起的^[8]。幼叶在诱导原球茎的过程中7d左右就开始有黑色物质分泌,随着培养时间的增加褐化现象愈加严重,甚至叶片褐化死亡。本研究中,加入活性炭欲减轻褐变现象,但效果并不理想,可能与褐变发生原因比较

复杂有关。

3) 试验中发现,6-BA浓度对原球茎的增殖速度有显著地影响。较高的细胞分裂素/生长素比值有利于增殖,而较低的细胞分裂素/生长素比值则有利于生根。随着原球茎增殖数量的增加,总会有一部分出现芽的分化,从而影响原球茎的进一步增殖,这与原球茎在增殖过程中的群体生长效应有关。据苏悦等报道^[9],在同一生存空间内原球茎和幼苗存在着争夺营养、互相胁迫的现象。继代时接入的原球茎密度适中,则表现出一定的群体生长效应,增殖系数高、分化出的幼苗少。反之,则原球茎分化成幼苗,不利于增殖。

4) 花宝一号(7N-6P-19K)最早是用来作为兰科植物种子萌发的培养基,现已常被当作植物肥料来使用^[10]。花宝一号培养基pH值较低,因此在灭菌后培养基的湿度较大,呈现出半液半固状态。试验中发现,这样的培养基更有利于原球茎的增殖,这与Park So Young的报道相一致^[11]。

5) 组织培养中常用的有机添加物如椰子汁、香蕉汁和土豆汁等是一类含有氨基酸、激素和酶等成分较为复杂的天然复合物^[12]。大量研究证明,它们对细胞和组织的增殖及分化有明显的促进作用^[13,14]。试验过程中,原球茎一般都可分化成苗,但往往有些不分化出苗,甚至产生畸形苗。除了品种的差异外,也与培养条件有关系,加入有机添加物可以有效地促进苗的分化。在3种添加物中,椰子汁效果优于土豆汁和香蕉汁,而添加土豆汁的培养基对原球茎分化幼苗的影响与香蕉汁的差异较小。但椰子受采摘季节和价格的影响,有可能马铃薯将是低成本的有效添加物。

参考文献:

- [1] 彭立新,王姝,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.
- [2] 邵双,关丽杰. 蝴蝶兰花梗腋芽诱导的影响因素[J]. 沈阳化工学院学报,2005,19(2):84-86.
- [3] 秦凡,周吉源. 蝴蝶兰的组织培养研究[J]. 生物学杂志,2003,20(3):19-21.
- [4] 梁新安,杨录军,王慧瑜,等. 大花蕙兰高频再生体系的建立[J]. 河南农业科学,2006(10):85-87.
- [5] 曾宋君,彭晓明,张京丽,等. 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖[J]. 武汉植物学研究,2000,18(4):344-346.
- [6] 杨美纯,周歧伟,许鸿源,等. 外部因子对蝴蝶兰叶片原球茎状体发生的影响[J]. 广西植物,2000,20(1):42-46.

(下转第109页)

值的升高显著影响仔猪的生产性能和消化、循环等系统的生理功能^[4]。本项研究中,小肠各段和盲肠内容物 pH 值均以 IgY 组较低,空白组较高;且 IgY 组空肠、回肠内容物 pH 值均显著低于空白组空肠、回肠内容物 pH 值($P<0.05$)。由此表明,IgY 的添加改善了仔猪肠道 pH 值,有益于仔猪消化能力的提高。

微生物与动物体及环境之间是一个相互依赖、相互制约的微生物生态体系。在微生物生态平衡状态下,动物肠道中的正常微生物菌群对肠道的结构和功能、对增强机体免疫能力、抵抗疾病起着十分重要的作用。当微生物生态平衡被破坏,肠道中某些致病菌和条件性致病菌大量增殖时,动物便会出现病理症状^[5]。仔猪的肠道微生物区系处于不稳定状态,很多因素都能通过影响仔猪肠道微生物菌群,而参与机体免疫系统的调节。

与空白组相比,IgY 组回肠、盲肠段内容物大肠杆菌浓度明显降低,乳酸杆菌浓度明显升高。进一步说明了 IgY 通过抑制肠道内大肠杆菌的生长,改善了肠道微生物区系,调节机体免疫系统,从而缓解仔猪断奶引起的一系列应激反应。

综上所述,抗大肠杆菌多价 IgY 可能通过改变仔猪肠道微生物区系,降低肠道大肠杆菌浓度,增加肠道乳酸菌浓度,从而降低小肠后段和大肠内的 pH 值。而仔猪肠道 pH 值的降低,对于改善肠道、提高断奶仔猪的免疫能力具有重要作用。并且 IgY 对大肠杆菌的抑制作用已经达到了与抗生素接近的效果,在一定条件下,IgY 可以取代抗生素防治仔猪大肠杆菌性腹泻,提高断奶仔猪生产性能。

参考文献:

- [1] 于力. 动物传染病学[M]. 北京:中国农业出版社, 1998:56—132.
- [2] 陈敏. 国外医学——预防、诊断、治疗用生物制品分册[J]. 2001,24(1):23—25.
- [3] Nikoo Arasteh, Aminirissehei A H, Yousif A N *et al.* Passive immunization of rainbow trout with chicken egg yolk immunoglobulins (Igy) [J]. Aquaculture, 2004,231:23—36.
- [4] 李清,杨亮宇,贾俊静,等.[J]. 当代畜牧,2004(1):3—5.
- [5] 何明清. 动物微生物学[M]. 北京:中国农业出版社, 2001:35—57.

(上接第 93 页)

- [7] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1997:237—278.
- [8] 崔德才,徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京:化学工业出版社,2003:331—332.
- [9] 苏悦,姬海泉,杜凤霞. 蝴蝶兰花梗组织培养快速繁殖[J]. 辽宁林业科技,2006(2):20—22.
- [10] Nishimura. Reviews and Perspectives [J]. Japanese Orchids,1982,12:331—346.
- [11] Park So Young, Murthy H N, Paek Kee Yoeup. Prothorm-like body induction and subsequent plant regen-

eration from root tip cultures of *Doritaenopsis* [J]. Plant Science,2003,164:919—923.

- [12] 何松林,孔德政,杨秋生,等. 碳源和有机添加物对文心兰原球茎增殖的影响[J]. 河南农业大学学报, 2003,37(2):154—157.
- [13] Fu F M L. Studies on the tissue culture of orchid [J]. Orchid Review,1979,87:343—346.
- [14] Sagawa Y, Kunisaki J T. Clonal propagation of orchid by tissue culture [M]. Tokyo:Tokyo Press,1982:683—684.

(上接第 95 页) 或成年树,桃砧杏与杏砧杏在生长发育和结果产量方面都存在明显差异。虽然桃砧杏的成活率、早期丰产性远远优于杏砧杏,但存在严重的问题。所以在今后育苗及生产中要严格限制桃砧的使用。

2) 对于丰产期树猝死问题的原因,需作进一步研究。生产中采用合理修剪,控制负载量,加强水肥管理,可以有效地减少和延缓这一现象的发生。

3) 由于杏树的寿命很长,其经济结果年限可达几十年、上百年,所以本研究并不完整,数据有待进

一步完善。

参考文献:

- [1] 李体智. 嫁接杏树适宜砧木试验报告[J]. 烟台果树, 1995,52(4):8—9.
- [2] 王公兴,唐公田,王惠山. 金太阳等欧美杏品种在不同砧树上的高接反应[J]. 果农之友,2006(8):6—7.
- [3] 樊巍,王齐瑞,杨海青,等. 优质高档杏生产技术[M]. 郑州:中原农民出版社,2003.
- [4] 赵改荣,黄贞光. 樱桃优质丰产栽培技术[M]. 北京:中国农业出版社,2001.