

# 蝴蝶兰组培快繁新技术研究

任秋萍

(聊城大学农学院园艺工程系 山东 聊城 252059)

**[摘要]** 对蝴蝶兰组织培养中不同阶段适用的培养基和激素配比水平筛选结果表明:蝴蝶兰无菌播种诱导胚状体以 MS7 为基础培养基,添加 100g/L 新鲜土豆汁效果较好;原球茎增殖培养以较低浓度的无机盐较好,采用 MS7+香蕉汁 30g/L+苹果汁 10g/L+炭粉 1g/L+琼脂 5.6g/L+糖 20g/L 为基础培养基,添加 2.0 mg/L 的 BA 和 0.5 mg/L 的 NAA,原球茎的增殖系数 2 个月内能达到 5 倍以上,是最佳的组合;以 MS7+水果汁+ $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5g/L 为基础培养基,添加 0.1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 是较理想的生根培养基。

**[关键词]** 蝴蝶兰 组织培养 无菌种子 培养基 筛选

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis amabilis*) 花大,开花期长,花色艳丽,色泽丰富,花形美丽别致,观赏价值高,是兰科植物中栽培最广泛、最普及的种类之一,被誉为“洋兰皇后”<sup>[1-2]</sup>。蝴蝶兰主要是分株繁殖,但繁殖速度慢,贮藏和运输困难,而且容易携带病毒,严重阻碍了它在中国范围内的流通。无菌种子播种培养是现阶段经济有效的快繁方法和工厂化育苗的重要途径。

近几年研究蝴蝶兰组织培养的报道很多,但多以花梗、幼叶和茎尖为外植体<sup>[3]</sup>,且培养基配方较杂。为此,我们重新设计方案,采用无菌种子为外植体,对蝴蝶兰组织培养不同阶段的适用培养基和激素配比

水平进行了筛选。

## 1 材料与方法

### 1.1 试材

2005—2007 年在聊城大学农学院组培室内进行试验。供试材料为豹斑和虞美人,是本系的两个蝴蝶兰品种的优良单株,花色分别为白色和红色,在日温 25~28℃,夜温 18~22℃,相对湿度 80%,光照强度 1.5 万~2 万 lx 条件下,培养 30~50 d 抽出花梗,3 个月后第一朵花开放,进行自交授粉,保留 4 朵花打顶。在日温 25~28℃,夜温 22℃,相对湿度 90% 条件下培养,160 d 后采收果荚。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 无菌体系的建立** 将采收的果荚用洗洁精擦洗 2 次后,用流水冲洗 1~2 h,擦干果荚表面,将果荚两端切除,用 75% 的酒精浸泡 60 s 并,用无菌水冲洗 1 次后再用 0.1% 升汞液(每 10 mL 另加 1 滴吐温 80)浸泡 10 min 并不断摇晃,最后用无菌水冲洗 5~6 次,后放入培养皿中,将两端再次切掉少许,然后顺着果荚外部的凹槽,将果荚纵切成 4 部分。用镊子夹取其中的丝状物,均匀接种于培养基上。一般情况下,一个发育良好的果荚可接种 50~60 瓶。大约 15 d 后胚开始萌芽变绿,20 d 后可转入半母瓶培养。

**1.2.2 初代培养** 将蝴蝶兰种子接种于不同 MS 培养基上,观察并记录外植体萌发情况,以选择适宜的培养基。

**1.2.3 继代培养** 将初代培养的小苗转接到 MS 继代培养基上。

根据原球茎增殖情况来筛选适合蝴蝶兰继代培养的激素配比。

**1.2.4 生根培养** 将继代培养的新生小苗转入生根培养基,根据瓶苗的生根量选择最适宜的培养基、激素配比和培养条件。

**1.2.5 蝴蝶兰移栽** 将瓶苗置于栽培温室中炼苗 10 d 后,根部用水草包裹,栽植在 72 目穴盘中。白天 27~29℃,晚上 23~26℃,相对湿度 70%~80%,光照强度 6 000~8 000 lx<sup>[4]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 蝴蝶兰的初代培养

**2.1.1 初代培养基的筛选** 由于蝴蝶兰外植体接种后易褐变,因此培养基的选择是关键。MS 培养基主要是由大量元素、微量元素、铁盐和有机物组成。为了找到诱导原球茎较好的培养基,对 MS 培养基中成分的含量做适度调整,EC 值为 2.0, pH 值 5.5,每种培养基接种 30 瓶,培养温度 25℃左右,光照强度 1 500~2 000 lx<sup>[5]</sup>。8 种培养基都能诱导原球茎,但诱导效果不同(见表 1)。

试验结果表明,随着营养元素浓度逐渐降低,原球茎形成数量不断增加,以 MS7 诱导原球茎效果最好,原球茎形成 90% 左右,个体大,直径 3 mm,浓绿。但从 MS 到 MS7 号培养基表面都干燥,为此对培养基进行了改良。

**2.1.2 培养基的优化** 在这 8 种培养基中分别添加 100 g/L 新鲜土豆汁进行改良(见表 2)。

表 1 不同培养基配方原球茎形成情况

| 编号  | 大量元素 | 微量元素 | 铁盐  | 有机物  | 原球茎形成情况                                       |
|-----|------|------|-----|------|-----------------------------------------------|
| MS  | 1    | 1    | 1   | 1    | 原球茎形成 20%~30%, 有部分死亡, 原球茎直径 2~3 mm, 表面干燥。     |
| MS1 | 1    | 1    | 1   | 1/2  | 原球茎形成 20%, 有部分死亡, 原球茎直径 2 mm, 表面干燥。           |
| MS2 | 1/2  | 1/2  | 1/2 | 1/4  | 原球茎形成 40%~50%, 有部分死亡, 原球茎直径 2 mm, 表面干燥。       |
| MS3 | 1/3  | 1/3  | 1/3 | 1/6  | 原球茎形成 70%左右, 原球茎直径 1 mm, 后期发黄, 表面干燥。          |
| MS4 | 1/4  | 1/4  | 1/4 | 1/8  | 原球茎形成 75%左右, 原球茎直径 1 mm, 后期发黄, 表面干燥。          |
| MS5 | 1/5  | 1/5  | 1/5 | 1/10 | 原球茎形成 80%, 原球茎个体小, 直径 1 mm 左右, 后期有黄化现象, 表面干燥。 |
| MS6 | 1/2  | 1    | 1   | 1/2  | 原球茎形成 60%左右, 原球茎个体大, 直径 2 mm, 浓绿, 表面干燥。       |
| MS7 | 1/3  | 1    | 1   | 1/2  | 原球茎形成 90%左右, 原球茎个体大, 直径 3 mm, 翠绿, 表面干燥。       |

注:培养基各部分下的数字是与 MS 培养基相比较获得。

试验结果表明,添加 100 g/L 新基进行了下列试验:

鲜土豆汁后,均可使培养基和原球茎表面湿润,有利于原球茎的分化和生长,以 MS7 培养基效果最好。

**2.1.3 深入探索** 在上述 2 种试验结果基础上,进一步对 MS7 培养

(1) 在 MS7 培养基中添加激素 BA 0.3 mg/L + NAA 0.05 mg/L, 培养 20 d 后胚形成率为 90%, 75 d 后种子萌发,株高 3 mm,具有 1~2 片真叶,但出现大量畸形苗,培养基

表面干燥。

(2) 在 MS7 培养基中添加 100 g/L 新鲜土豆汁,培养 20 d 后胚形成率达 95%以上,60 d 后产生大量的原球茎,且以每月 2~3 倍速率增加,原球茎鲜嫩,表面湿润。

以上试验结果表明,在诱导胚状体时激素浓度要求较低,在胚培养时,只加 MS 培养基的部分成分即可,添加细胞分裂素和生长素易使胚生长畸形或抑制胚的生长。

综上所述,无菌播种进行胚培养诱导胚状体以 MS7 培养基为宜,即 1/3MS 大量元素 + MS 微量元素 + MS 铁盐 + 1/2MS 有机物 + 100g/L 新鲜土豆汁效果最好<sup>[6]</sup>。

## 2.2 蝴蝶兰的增殖培养

### 2.2.1 继代培养基的筛选

继代培养仍以 MS7 培养基为基础培养基,在其中添加不同的物质,原球茎在不同培养基上培养 70 d 后,均有幼苗形成,其配方及结果见表 3。这表明,添加香蕉、土豆、圆葱汁的培养基补充了植物生长所需的维生素,促进了植物的个体发育;而添加  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  的培养基有利于根的产生和生长。

**2.2.2 不同外源激素水平对蝴蝶兰增殖的影响** 以 MS7 培养基为

表 2 不同培养基改良后原球茎形成情况

| 编号  | 原球茎形成情况                                   |
|-----|-------------------------------------------|
| MS  | 原球茎形成 30%, 原球茎 2~2.5 mm, 深绿色, 表面湿润。       |
| MS1 | 原球茎形成 40%~60%, 原球茎 2 mm, 深绿色, 表面湿润。       |
| MS2 | 原球茎形成 80%, 原球茎 1~2 mm, 嫩绿色, 表面湿润。         |
| MS3 | 原球茎形成 85%, 原球茎 1~1.5 mm, 发黄, 表面湿润。        |
| MS4 | 原球茎形成 85%, 原球茎 1~1.5 mm, 发黄, 表面湿润。        |
| MS5 | 原球茎形成 90%, 原球茎 1 mm, 发黄, 表面湿润。            |
| MS6 | 原球茎形成 80%, 原球茎 2~2.5 mm, 翠绿色, 表面湿润。       |
| MS7 | 原球茎形成 110%, 有增殖现象, 原球茎 1~2 mm, 翠绿色, 表面湿润。 |

表 3 不同继代培养基配方

| 编号 | 培养基配方                                                                      | 原球茎及幼苗生长状况                                                  |
|----|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| A  | MS7+糖+香蕉汁+土豆汁+苹果汁+圆葱汁+炭粉 1 g/L                                             | 有部分原球茎死亡。出苗不整齐,整齐度为 20%。幼苗健壮,叶色深绿,株高 2 cm,具 1~2 片叶,1~2 条根。  |
| B  | MS7+花宝 1 号 1 g/L+花宝 2 号 1 g/L+蛋白胨 1 g/L+糖+香蕉汁+土豆汁+苹果汁+圆葱汁+炭粉 1 g/L         | 无原球茎死亡。出苗整齐,整齐度为 85%。幼苗叶色翠绿,株高 1~2 cm,具 2~3 片叶,1~2 条根。      |
| C  | MS7+蛋白胨 1 g/L+糖+香蕉汁+土豆汁+苹果汁+圆葱汁+炭粉 1 g/L                                   | 无原球茎死亡。出苗整齐,整齐度为 85%。幼苗健壮,叶色翠绿,株高 1~2 cm,具 2~3 片叶,1~2 条根。   |
| D  | MS7+蛋白胨 1 g/L+糖+香蕉汁+土豆汁+苹果汁+圆葱汁+ $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 0.3 g/L+炭粉 1 g/L | 无原球茎死亡。出苗整齐,整齐度为 85%。幼苗健壮,叶色翠绿,株高 2~2.5 cm,具 2~3 片叶,2~3 条根。 |

基础培养基,加入香蕉汁 30 g/L,苹果汁 10 g/L,炭粉 1 g/L,琼脂 5.6 g/L,糖 20 g/L,然后分别添加不同浓度的 BA 和 NAA。在无菌条件下,取出半母瓶中株高 4 cm、2~3 片真叶、生长期 120 d 的小苗为外植体,将根全部切除,再切伤基部未分化的原球茎,接种到不同激素水平的培养基上培养,培养基 pH 值为 5.5~5.8。将转接后的瓶苗置于培养室中全黑暗处理 1 周后,在温度 25 ℃,相对湿度 20%~40%,光照强度 1 800~2 000 lx,光照 14 h 的条件下培养<sup>[7]</sup>。定期观察原球茎增殖情况,计算繁殖系数(见表 4)。由表 4 可以看出原球茎增殖在 42 d 后已经有较明显的区别。BA 为 1.0 mg/L 增殖启动早,但整体增殖水平以 2.0 mg/L 为最佳,增高或降低 BA 浓度,繁殖系数都会降低。

NAA 能促进原球茎的增殖,但其增殖启动较晚,浓度以 0.5 mg/L 最好。在均添加 BA 和 NAA 的培养基中,增殖启动均较早,持续期均较长,繁殖系数比单独添加 BA 或 NAA 的都高。在 F4 培养基中,原球茎的增殖系数 2 个月内能达 5 倍以上,是最佳浓度组合。

### 2.3 蝴蝶兰的生根培养

**2.3.1 生根培养基的筛选** 为了提高试管苗移栽的成活率,要求试管苗生根整齐而且粗壮,我们试用了 3 种基本培养基:

E: 1/2 MS + 水果汁 +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5 g/L。

F: 花宝 1 号 2 g/L + 花宝 2 号 2 g/L + 蛋白胨 1 g/L + 水果汁 +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5 g/L。

G: MS 7 + 水果汁 +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5 g/L。

在这 3 种培养基中分别加入活性炭 5 g/L, EC 值为 2.8, pH 值 5.5~5.8。每种培养基接种 30 瓶,每瓶接种 5~7 株小苗,置于散射光下,培养温度 25 ℃左右,相对湿度 20%~40%,光照强度 1 800~2 000 lx,经过 70 d 的培养, E、F、G 小苗均长到 3~10 cm,具有 3~4 片真叶和 3~4 条根,生长健壮,新陈代谢和生长稳定。其中 E、F 幼苗深绿色, G 幼苗嫩绿色,生长势强,是最佳的生根培养基。

**2.3.2 激素配比和水平对瓶苗生根的影响** 以 MS7 + 水果汁 +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.5 g/L 为基础培养基,分别添加不同浓度的 NAA(0.1 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L), 活性炭 5 g/L, EC 值 = 2.8, pH 值 5.5~5.8。将继代培养得到的小苗转入到各种生根壮苗培养基上,置于散射光下,培养温度 25 ℃左右,相对湿度 20%~40%,光照强度 1 800~2 000 lx, 30 d 后调查各培养基中的蝴蝶兰生根率、平均每株生根数(见表 5)。

试验结果表明:随着 NAA 浓度的升高,生根率呈现先升后降的趋势,单独使用 NAA 诱导生根,浓度以 0.5 mg/L 为好;随着 BA 浓度的升高,生根率下降,表明高浓度 BA 抑制生根。因此,诱导蝴蝶兰生根的较为理想激素配比为 BA 0.1 mg/L + NAA 0.5 mg/L, 植株生根率高,根数多,生根长。

### 2.4 蝴蝶兰瓶苗移栽

当试管苗长至 3~10 cm,具有 3~4 片真叶和 2~3 条根时便可移栽。先将瓶苗置于栽培温室中炼苗 10 d,增强幼苗的抗逆性。出瓶时用水洗净试管苗根部的培养基,在 0.1% 的高锰酸钾溶液中浸泡 5 min 后,根部用水草包裹,栽植在 72 目穴盘中。从出瓶到移栽各个环节,注意切勿使试管苗受伤,并洗净粘

表 4 不同外源激素水平对蝴蝶兰增殖的影响

| 编号 | 激素<br>(mg/L)   | 繁殖系数 |      |      |
|----|----------------|------|------|------|
|    |                | 14 d | 28 d | 42 d |
| F1 | BA 1.0         | 2.33 | 2.87 | 3.02 |
| F2 | BA 2.0         | 1.75 | 2.34 | 4.11 |
| F3 | BA 5.0         | 1.66 | 1.97 | 2.69 |
| F4 | BA 2.0+NAA 0.5 | 2.11 | 2.60 | 4.32 |
| F5 | BA 2.0+NAA 1.0 | 2.20 | 2.84 | 4.88 |
| F6 | NAA 1.0        | 1.47 | 2.21 | 3.01 |
| F7 | NAA 2.0        | 1.58 | 2.17 | 3.22 |

表 6 不同培养基蝴蝶兰生根情况

| NAA<br>(mg/L) | BA<br>(mg/L) | 调查<br>/株 | 生根<br>/株 | 生根率<br>/% | 总生根<br>/条 | 平均根数<br>(条/株) | 平均根长<br>/cm |
|---------------|--------------|----------|----------|-----------|-----------|---------------|-------------|
| 0.3           | 0            | 50       | 39       | 78        | 156       | 4.7           | 0.57        |
| 0.5           | 0            | 50       | 45       | 90        | 174       | 5.1           | 1.21        |
| 1.0           | 0            | 50       | 41       | 82        | 114       | 3.8           | 1.01        |
| 0.3           | 0.1          | 50       | 40       | 40        | 160       | 4.9           | 0.63        |
| 0.5           | 0.1          | 50       | 48       | 48        | 197       | 5.9           | 1.42        |
| 1.0           | 0.1          | 50       | 44       | 44        | 145       | 4.1           | 1.19        |
| 0.3           | 0.3          | 50       | 29       | 58        | 97        | 3.1           | 0.33        |
| 0.5           | 0.3          | 50       | 31       | 62        | 109       | 4.3           | 0.98        |
| 1.0           | 0.3          | 50       | 32       | 64        | 128       | 5.2           | 1.34        |

# 树莓发展现状与前景(下)

张清华 董凤祥

(中国林业科学研究院森环森保所 北京 100091)

## 5 树莓发展现状

### 5.1 国外树莓发展现状

国外树莓有两大主产区,一是欧洲,1999年总产量约25万t,二是美洲,2003年总产量约15万t,亚洲没有统计(见表2)。

全球树莓总产量41 359.4万kg(FAO,2002年),37个国家种植树莓,面积约74 464.8 km<sup>2</sup>。自1992年以来,总产值增加38%,面积增加20%,产量增加15%,平均产量5.61 t/hm<sup>2</sup>。据世界粮农

组织粗略估计,世界黑莓总产量为31 961.6 kg。

美国是第三大树莓生产国,美国、加拿大两国的年总产量约5万t,其产量只能满足本国消费量的15%,美国树莓产量还在增加。1997年以来,美国年进口树莓产品4 500~6 300 t(FAO,2002年),大多从智利、加拿大、墨西哥等国进口。

其中塞尔维亚、智利是北、南两大半球的出口大国,年出口量约8万~10万t。由于采摘主要为手工方式,西欧已基本退

出生产领域,北美、东欧树莓生产处于停顿和萎缩之中。据美国农业部小浆果研究中心和美国华盛顿州红树莓委员会的市场分析,树莓世界市场的供求平衡量为200万t,目前只有40万t。全球树莓深加工产品已达100多类、数千品种,形成遍及全球的产品供应链。利用树莓籽可生产药用价值极高的树莓油(每吨售价高达40万美元),茎叶可提取饮料添加剂(英国)、食品添加剂(日本)和树莓酮(目前减肥效果最佳的功能性产品),树莓叶可做功能性茶叶(外贸购价为1万元/t)。国际市场95%树莓果进入深加工领域,5%进入鲜食领域。

### 5.2 国外市场树莓供求现状

树莓、黑莓、紫莓种植有一定地理限制(北温带和南半球部分低纬度的中高山区),属于劳动、资金和技术密集型产业。一方面鲜果易烂,不易保存,另一方面,原产地和主要消费国劳动力稀缺、人力成本高。目前,西欧自产量早已供不应求,主要依赖东欧。近年,韩、日两国和中亚、东南亚、中东需求剧增,进口产品主要是果酱、浓缩汁、果脯、原浆。韩国每年进口树莓2万t用于酿酒,日本每年进口1万t。

美国树莓原料短缺状况已持续多年。据美国西海岸浆果研究中心和美国华盛

表2 世界树莓生产量统计表

(2000年)

| 国 家  | 产量(t/a) |        |        |        |        |
|------|---------|--------|--------|--------|--------|
|      | 1995    | 1996   | 1997   | 1998   | 1999   |
| 俄罗斯  | 85 000  | 90 000 | 94 000 | 95 000 | 95 000 |
| 南斯拉夫 | 53 084  | 62 658 | 45 020 | 56 010 | 54 000 |
| 波兰   | 40 420  | 35 760 | 40 347 | 44 845 | 43 195 |
| 美国   | 32 200  | 25 150 | 38 000 | 37 240 | 37 240 |
| 德国   | 27 000  | 26 193 | 27 141 | 29 900 | 30 000 |
| 匈牙利  | 18 000  | 19 855 | 18 135 | 20 000 | 20 000 |
| 乌克兰  | 8 053   | 8 314  | 6 986  | 18 652 | 18 652 |
| 加拿大  | 20 000  | 15 077 | 17 173 | 14 944 | 14 500 |
| 英国   | 10 500  | 12 200 | 9 500  | 12 600 | 12 700 |
| 法国   | 7 467   | 7 541  | 6 833  | 7 116  | 8 059  |

附的培养基。培养条件是白天27~29℃,晚上23~26℃,相对湿度70%~80%,光照强度6 000~8 000 lx。

### 3 小结

(1) 在蝴蝶兰无菌播种进行胚培养诱导胚状体时,以MS7(即1/3 MS大量元素+MS微量元素+MS铁盐+1/2MS有机物)为基础培养基,添加100 g/L新鲜土豆汁效果较好。

(2) 使原球茎快速增殖是实现蝴蝶兰快速生产的关键。原球茎增殖培养以盐浓较低的无机盐较好,采用MS7+香蕉汁30 g/L+苹果汁

10 g/L+炭粉1 g/L+琼脂5.6 g/L+糖20 g/L为基础培养基,添加2.0 mg/L的BA和0.5 mg/L的NAA最佳,原球茎的增殖系数2个月内能达到5倍以上。

(3) 为了提高试管苗移栽成活率,以MS7+水果汁+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.5 g/L为基础培养基,添加0.1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA,是较为理想的生根培养基。

### 参考文献

- 1 吴应祥. 中国兰花[M]. 北京:中国林业出版社,1992:78-81.
- 2 胡一民. 蝴蝶兰生产的世界水平[J]. 花木盆景,1996,(6):44.

3 殷华林. 兰花栽培实用技法[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,2006:68-72.

4 乔恩·品斯克(德)著. 兰花[M]. 覃红波,张培译. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2004:156-158.

5 梅慧敏,张力. 洋兰名品100种. 国外名兰[M]. 北京:中国林业出版社,2004:124-126.

6 陈宇勒. 兰花:野外生境、栽培实例、鉴赏[M]. 广州:广东科技出版社,2006:68-69. ★

(栏目责任编辑 张作芳)