

摘要 该实验以蝴蝶兰花梗为外植体, MS为基本培养基, 对影响腋芽诱导的MS基本培养基中无机盐浓度、植物生长调节物质的种类和浓度配比、外植体选取部位等因素进行了研究。实验结果表明: 选用1/3MS处理来诱导花梗腋芽萌发生长的综合效果最好; 单独使用细胞分裂素(6-BA)时的芽苗诱导率比同时使用细胞分裂素和生长素的诱导率高; 花梗腋芽的取材部位影响萌发率和营养芽的形成。

关键词 蝴蝶兰; 花梗腋芽; 组织培养

蝴蝶兰组织培养的初步研究

■ 冯艳秋, 李洪忠, 于洋, 张晓琳
(辽宁农业职业技术学院 115009)

蝴蝶兰是兰科蝴蝶兰属(*Phalaenopsis*)植物, 主要分布于亚洲与大洋洲热带和亚热带地区, 多生于阴湿多雾的热带森林中离地3~5 m高的树干上, 也有长于溪涧旁的湿石上。因其株型美观, 色彩艳丽, 花期持久, 在热带兰中素有“兰花皇后”之美称, 是兰科植物中栽培最广泛的四大观赏热带兰之一, 在花卉市场深受消费者的青睐。蝴蝶兰是单茎性气生兰, 很难用传统分株方式进行无性繁殖; 此外蝴蝶兰种子极小, 没有胚乳, 发育不完全, 极难萌发, 因此世界上多采用组织培养繁育种苗。目前, 随着生物工程技术的广泛应用, 组织培养已成为中国兰花快速繁殖的重要手段。近年来, 对蝴蝶兰的组织培养较多的是用胚、幼叶、茎尖和根尖等多种器官为外植体进行组织培养研究的报道, 但这些方法对母株都有不同程度的损伤, 笔者通过多个试验处理, 以蝴蝶兰开花后的花梗作为外植体, 进行了初代组培研究, 结果表明非常有效。因为在开花后再取花梗作为培养材料, 这样不但可以了解母株的开花性状, 又不损伤母株, 因此比采用蝴蝶兰根尖、茎尖进行快速无性繁殖更有应用价值, 特别是对一些稀有品种的保存和快繁。

1.1 材料

供试材料大部分购于吉林国联农业实用生物技术开发有限公司培育的粉花蝴蝶兰杂交种(*Phalaenopsis hybrid*)。一部分取自辽宁农业职业技术学院园林系蝴蝶兰花卉大棚的粉花蝴蝶兰杂交种(*Phalaenopsis hybrid*), 来源虽不一样, 但品种及外植体选材、接种等方法一样。

1.2 方法

1.2.1 取材及消毒: 蝴蝶兰开花后, 将花梗剪下, 剥除已开放的花朵及花蕾后将花梗切成2~3cm长的节段, 每段带1个腋芽, 在70%酒精中浸30min, 0.15%升汞(外加数滴吐温-20)消毒15min, 无菌水冲洗5~6次。

1.2.2 外植体接种: 以带腋芽的花梗节段为外植体进行接种。

1.2.3 培养基: 基本培养基为MS, 并对MS培养基的大量元素进行改良试验。蔗糖2.5%, 琼脂粉0.8%, 活性炭0.5g/L, 调pH值为5.5~5.6。激素用BA(6-苄基腺嘌呤)或BA和NAA(α-萘乙酸)的组合, 培养基用100mL的三角瓶分装, 每瓶25mL, 121℃高压蒸汽灭菌15min。

1.2.4 培养条件: 培养温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照度2000lx, 光照时间12h/d。

2.1 MS培养基无机盐浓度对花梗腋芽萌发的影响

基本培养基分别设置为MS, 1/2MS, 1/3MS, 1/4MS, 1/5MS(注: 无机盐大量元素给予不同程度的减少, 而无机盐微量元素和有机物质的含量都不变), 各培养基组合中均加生长素(NAA)0.2mg/L, 细胞分裂素(6-BA)5mg/L, 外植体采用花后花梗基部上数第3~4节位带腋芽的茎段。

1周后, 各处理的茎段腋芽都有所萌动, 以后陆续萌发, 长出芽苗。5周后统计结果见表1。

从表1可以看出: 适当降低MS培养基的大量元素浓度含量可以提高蝴蝶兰花梗腋芽的萌发率, 当MS的大量元素降低至1/4时腋芽的萌发率可达94.4%, 1/5MS腋芽的萌发率反而下降, 说明大量元素含量太少时, 花梗腋芽的萌发率又会降低。

表1 MS无机盐浓度对花梗腋芽萌发的影响

培养基	接种外植体数	污染数(个)	出芽个数(个)	不定芽诱导率(%)
MS	20	2	8	44.4
1/2MS	20	1	10	52.6
1/3MS	20	3	14	82.4
1/4MS	20	2	17	94.4
1/5MS	20	4	13	81.2

表2 蝴蝶兰花梗不同位置腋芽离体培养的影响(50d)

腋芽的位置	花梗段数		萌发率%	营养芽数(个)
	总数(个)	萌发数(个)		
1	19	6	31.6	6
2	20	13	65.0	19
3	20	15	75.0	26
4	18	17	94.4	38
5	18	17	94.4	32

注: 接种数不包括污染和褐化的材料

表3 不同浓度的外源激素对花梗苗分化株数的影响(50d)

6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种数	诱导最初时间 (d)	出芽数	不定芽诱导率 (%)	芽苗的生长 状况
1	0.2	16	13	7	43.7	单芽
3	0.2	17	11	9	53.9	2块产生丛生芽
5	0.2	19	9	14	73.6	5块产生丛生芽
7	0.2	18	8	16	88.8	9块产生丛生芽
10	0.2	18	12	13	72.2	7块产生丛生芽
1	0	16	8	9	56.2	单株
3	0	17	6	12	70.5	3块产生丛生芽
5	0	18	5	17	94.4	7块产生丛生芽
7	0	17	7	14	82.3	8块产生丛生芽
10	0	17	9	12	70.5	6块产生丛生芽

注: 接种数不包括污染和褐化的材料

7周后观察表明: 无机盐浓度低的处理, 芽苗生长状态较差, 特别是1/5MS培养基处理, 表现为芽苗细小瘦弱, 生长停滞, 叶端变黄等症状, 1/4MS处理次之, 可能是无机营养供应不足的缘故; 而无机盐浓度高的MS处理前期生长状态较好, 但后期由于褐化程

度严重而影响甚至阻止恶化芽苗的生长, 1/2MS 处理次之。只有 1/3MS 处理, 其不定芽诱导率虽比 1/4MS 处理的低, 只有 82.4%, 但芽苗的长势好, 且褐化程度低。因此综合考虑来看, 选用 1/3MS 处理来诱导花梗腋芽萌发生长最好。用低浓度无机盐处理, 要及时更换培养基, 以防无机营养的不足而影响芽苗的生长。

2.2 花梗不同位置腋芽培养效果的差异

蝴蝶兰的花梗通常有 5 个腋芽, 在进行离体培养时花梗不同位置的腋芽培养结果有较大差异。以 1/3MS+6-BA 5mg/L+NAA 0.2 mg/L 为培养基, 以花梗不同部位的带芽节段为外植体进行离体培养, 50 天后进行观察统计, 结果见表 2。

从表 2 可以看出: 基部第 1 个腋芽的离体培养效果最差, 萌发率仅 31.3%, 而且形成的均为单个营养芽。第 2 个腋芽的萌发率和增殖倍数比第 1 个腋芽高, 但均低于第 3、4、5 位置的腋芽。花梗基部以上第 4、第 5 个腋芽离体培养时萌发率均高于 90%, 并且都可以形成 2~3 个丛生的营养芽, 但第 4 个腋芽营养芽的增殖倍数比第 5 个腋芽高。

2.3 不同浓度的外源激素对花梗苗分化的影响

以蝴蝶兰花后花梗节段基部向上数 4~5 位带腋芽的茎段为外植体, 以 1/3MS 为基本培养基, 同时添加不同浓度的 6-BA, 附加 0 或 0.2 mg/L 的 NAA。

接种培养 2 周后, 观察到在不同处理中均有花梗腋芽发生, 而且有的处理产生了丛生芽; 以后不定芽陆续长出了小叶和茎尖, 50 天后调查统计结果见表 3。

由表 3 可知, 诱导蝴蝶兰花梗腋芽的分化随外源激素的种类和浓度配比的不同而产生不同的结果。在培养基中当 6-BA 和 NAA 同时存在时, 其分化率随着两者的浓度比值高低的不同而有所不同, 比值越高, 其分化率越高, 但 6-B 超过 7mg/L 时比值再升高将降低其分化率; 6-BA 在 7 mg/L 以下时, 无 NAA 存在时, 其分化效果更好。说明在 6-BA 浓度较低的情况下, 单独使用 6-BA 会比同时使用 6-BA 和 NAA 产生更好的诱导分化效果, 而且浓度越高, 诱导效果越好, 但超过 7mg/L 时, 诱导效果反而下降, 表现在, 培养基的褐化和芽苗玻璃化现象加重, 可能由于细胞分裂素浓度过高, 从而抑制腋芽的萌发。综合来看, 6-BA 的最佳含量为 5.0 mg/L, 腋芽萌发率和增殖率较高, 芽苗长的也较粗壮, 培养基褐化程度也相对较轻。

2.4 试管苗的生根及移植

将继代培养的小苗移入 1/3MS+ NAA 0.2mg/L+ 香蕉汁 100g/L 的培养基中培养 60 天时, 小苗长出 3~5 条根。连瓶带苗放在室温炼苗 1 周左右, 然后打开瓶盖炼苗 2~3 天, 洗净根部, 用 0.1% 的高锰酸钾水溶液浸泡 3~4min 后种植。基质可用陶粒或小粒状椰壳或水苔等, 用前也要用高锰酸钾、多菌灵、百菌清等广谱性杀菌剂消毒后方可使用。蝴蝶兰出瓶苗较难管理, 浇水宜少量多次, 浇湿苗及栽培基质表层即可, 栽培环境需

保持较高的空气湿度。出瓶苗经一个多月的精心管理后适应性大大增强, 此时可转入常规栽培管理。浇水管理得当, 蝴蝶兰出瓶苗成活率可达 90% 以上。

★ 适当降低 MS 大量元素的浓度可以明显提高蝴蝶兰花梗腋芽的萌发率。但浓度太低会影响芽苗的后期生长, 甚至会影响花梗腋芽的萌发率。试验结果表明: 1/3MS 的综合培养效果最好。

★ 蝴蝶兰花谢后的花梗腋芽也可以进行离体培养, 而且培养效果较好, 但不同部位的花梗腋芽离体培养的效果不同, 有明显的顶端优势, 花梗上部的腋芽通常比花梗基部的腋芽萌发率高, 过老的花梗腋芽再生能力弱而不宜培养。实验表明: 以花梗基部向上数第 4 个腋芽萌发能力最强。这种现象可能与花梗不同位置腋芽的发育程度有关, 由于花梗上部腋芽的体积明显比基部的腋芽大, 因此上部的腋芽可能比下部的发育的好。

★ 6-BA/NAA 浓度比值的高低极大地影响着花梗腋芽的萌发, 比值越高, 越有利于腋芽萌发, 但比值过高, 也就是说 6-BA 含量过高, 反而会抑制腋芽萌发, 而且玻璃化和褐化现象加重。试验结果表明单独使用 6-BA 时, 其浓度在 5mg/L 之间的综合效果较好。■



专业兰花温室制造商及
蝴蝶兰种苗供应商
做最好的农业设施, 服务世界花卉业

佛山市坤宇温室(园艺)有限公司

广东省佛山市顺德区陈村花卉世界玉兰路十四号
 温室: 0757-23337185 13825568585、13703010551
 兰花: 0757-23317919、23339703、13288303268
 传真: 0757-23316402
 台湾嘉义县六脚乡 00886-5-3781644
 网址: www.kunyi.com.tw www.kyws.com.cn

