

蝴蝶兰花梗组织培养快速繁殖

苏悦^{1,2}, 姬海泉³, 杜凤霞⁴

(1. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁工学院, 辽宁 锦州 121000; 3. 辽河油田振兴公司, 辽宁 盘锦 124010; 4. 辽宁省林业种苗管理总站, 辽宁 沈阳 110036)

摘要:通过组织培养的方法诱导蝴蝶兰花梗上的休眠芽萌发,可以得到无菌的蝴蝶兰丛生芽。以无菌丛生芽上的幼叶和茎尖、腋芽为外植体,进行组织培养,建立起蝴蝶兰的无菌培养体系。诱导休眠芽萌发的培养基为 MS + BA5; 利用幼叶进行原球茎诱导的培养基为 1/3MS + Hyponex3.5g + KT10 + NAA0.1; 利用茎尖和腋芽进行原球茎诱导的培养基为 MS + BA3 + 柠檬酸 30mg·L⁻¹; 原球茎增殖的培养基为 1/3MS + BA2 + KTO.5 + NAA0.1 + 椰乳 200ml, 也可以利用原有的初代培养基; 生根培养基为 1/3MS + Hyponex3.5g + NAA0.1 + IBA0.1 + 胰蛋白胨 2g + 香蕉 200g。

关键词:蝴蝶兰; 组织培养; 原球茎; 外植体

中图分类号: Q813.12 S628.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1714(2006)02-0020-03

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* sp.) 为兰科蝴蝶兰属植物。蝴蝶兰是单茎气生兰, 植株很少发育侧枝。因此, 对其进行常规无性繁殖增殖速度极慢; 其种子极为细小, 多发育不完全, 萌芽率极低, 且无法保持母本的优良性状。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。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

供试材料取自蝴蝶兰的 2 年生开花植株的花梗, 时间为 1~2 月。

1.2 实验方法

1.2.1 花梗消毒

剪取蝴蝶兰的整枝花梗, 首先用软毛刷沾肥皂水刷洗花梗表面, 用自来水冲洗后将花梗切成数段。再用 0.1% 的升汞(氯化汞)溶液(加适量吐温)做表面灭菌 8~12min, 然后用无菌水冲洗 3~4 次。

1.2.2 诱导丛生芽

将花梗剪成 2cm 长的带腋芽的切断, 基部向下插入 MS + BA5 的培养基上, 培养条件为 28℃、1000

~1500lx、光照 14h·d⁻¹。

1.2.3 蝴蝶兰的叶片培养

将丛生芽的叶片切成 8~10mm × 8~10mm, 放入成分为: 基本培养基 1/3MS + Hyponex(花宝 1 号) 3.5g·L⁻¹ 附加 KT 和 NAA 的培养基中, 培养条件为 25℃、500lx、光照 16h·d⁻¹。

1.2.4 蝴蝶兰的茎尖、腋芽培养

剥取 150~180d 的丛生苗的茎尖和腋芽, 大小约 2mm, 接种在成分为: 基本培养基 MS 附加 BA、柠檬酸、椰乳的培养基上。

1.2.5 原球茎的继代培养

将经由叶片或茎尖、腋芽产生的原球茎切成小块, 转入增殖培养基中进行继代培养。为了便于对比, 本实验所用的原球茎均为粒径不小于 3mm 的单个球体。继代培养基为 1/3MS + BA2 + KTO.5 + NAA0.1 + 椰乳 200ml。培养条件为 25℃、1500~2000lx、光照 14h·d⁻¹。

1.2.6 蝴蝶兰的生根培养

当原球茎顶端长出一片小叶时, 即可转入生根培养基中, 进行生根培养。生根培养基为 1/3MS + Hyponex3.5g + NAA0.1 + IBA0.1 + 胰蛋白胨 2g + 香

蕉 200g; 增殖培养基为 1/3MS + BA2 + KTO. 5 + NAA0.1 + 椰乳 200ml。培养条件为 28℃、1500 ~ 2000lx、光照 14h·d⁻¹。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰幼叶不同部位形成原球茎的能力

蝴蝶兰幼叶不同部位分化出原球茎的能力是不同的。接种 80d 后的统计数据见表 1。

表 1 幼叶不同部位形成原球茎的能力

叶片部位	叶片数	分化出原球茎叶片数	形成原球茎百分率(%)
整叶(8~10mm)	50	24	48
叶尖(3mm长)	50	0	0
叶中(4~5mm)	50	5	10
叶基(3mm)	50	2	4

从表 1 可以看出,对幼叶而言,其原球茎的形成能力整叶比叶片好,叶中比叶基部好,而叶尖最差。分析其原因,可能与外植体所含的营养物质、外植体的发育程度不同有关。

2.2 激素水平对蝴蝶兰幼叶形成原球茎的影响

实验结果表明,激素的用量为 KT10、NAA0.1 时,叶片分化率达到峰值 55%,激素水平与此差距越大,叶片的分化率也越低(见表 2)。所以,在蝴蝶兰的叶片培养中,激素的用量和配比显得十分重要。

表 2 不同激素组合对幼叶形成原球茎的影响 %

激素水平	NAA				
	0	0.05	0.1	0.2	0.5
1	0	0	0	0	0
5	0	10	15	5	5
10	10	25	55	20	10
15	0	0	20	10	0

2.3 温度和光照对蝴蝶兰叶片形成原球茎的影响

表 3 温度和光照对蝴蝶兰叶片形成原球茎的影响

温度(℃)	光照条件	培养叶片数	产生原球茎叶片数	原球茎形成率(%)
20	明	50	0	0
	暗	50	0	0
25	明	50	26	52
	暗	50	0	0

注:表中“明”指光照条件为 500lx、16h·d⁻¹。

蝴蝶兰叶片在 25℃、光照 500lx、16h·d⁻¹ 的条件下原球茎的形成率为 52%。在 20℃ 时,无论光培养或暗培养,叶片均不能形成原球茎(见表 3)。实践证明,室温在 28℃ 以上时,叶片会逐渐变褐死亡。分析叶片褐变的原因,可能是:在 28℃ 以上时,多酚

氧化酶的活性增强,产生大量茶色的醌类有害物质,导致叶片变褐死亡。

2.4 激素水平对蝴蝶兰茎尖、腋芽形成原球茎影响

激素水平和对比对茎尖、腋芽形成原球茎的影响非常显著。当激素 BA 用量为 3mg·L⁻¹,不附加生长素时,分化出原球茎的茎尖或腋芽达 80%;激素的用量和配比与此差距越大,外植体的分化率越低(见表 4)。

表 4 激素水平对蝴蝶兰茎尖、腋芽形成原球茎的影响 %

激素水平	BA					
	0	1	2	3	4	5
0	0	0	50	80	60	40
0.05	0	10	30	60	50	30
NAA	0.1	0	0	20	50	30
	0.2	0	0	20	20	30
	0.3	0	0	10	20	10

2.5 柠檬酸对蝴蝶兰茎尖、腋芽形成原球茎的影响

在蝴蝶兰茎尖、腋芽的培养过程中,培养基 MS + BA3 里是否添加柠檬酸,对原球茎的形成有很大影响,柠檬酸对蝴蝶兰茎尖、腋芽形成原球茎有明显的促进作用。45d 时,培养基成分为 MS + BA3 + 柠檬酸 30mg·L⁻¹ 的成活率为 90%,而对照组只有 55%;90d 时,培养基成分为 MS + BA3 + 柠檬酸 30mg·L⁻¹ 的成活率为 85%,而对照组只有 30%。经观察,死亡的外植体基本上是由褐变引起。这说明,柠檬酸的抗氧化作用较强,能有效地抑制酶促褐变。它提高诱导效率是通过降低褐变死亡率来实现的。

2.6 转接时间对蝴蝶兰原球茎的增殖系数和原球茎品质的影响

适时转接是提高原球茎增殖效率并兼顾原球茎质量的最有效的措施。实验结果表明,原球茎以 45d 左右转接增殖为好,增殖系数为 3.2,无玻璃化现象。若原球茎转接过早(30d),虽然其粒径大、品质好(粒径 ≥ 3mm 原球茎数占 67.8%),无玻璃化,但增殖系数低,仅为 2.0;若原球茎转接过早(60d),虽然其增殖系数较高(3.5),但其粒径小、品质差(粒径 ≥ 3mm 原球茎数占 41.4%),且已出现玻璃化现象。

2.7 原球茎增殖过程中的群体生长效应

原球茎的增殖倍数和品质,与植入时的疏密程度有关(见表 5)。

表5 原球茎增殖过程中的群体生长效应

植入原球茎 (粒)	45d后原球茎总数 (粒)	≥3mm原球茎粒数 (粒)	百分率	玻璃化	增殖系数	生根苗数量
120	410.5	105.8	25.8	12.4	3.4	8.4
80	252.3	126.4	50.0	0	3.15	12.1
40	71	21.7	30.2	0	1.76	29.3

注:表中百分率=原球茎粒数(不小于3mm)/原球茎总数,是原球茎品质优劣的指标。

由表5可见,在接种时植入的原球茎过密,则原球茎的增殖占优势,其增殖系数虽然较高,其品质却有所下降;反之,若植入的原球茎过于稀疏,则幼苗的生长发育占优势,原球茎的增殖受到抑制,不但增殖系数下降,原球茎的品质也未见提高;而当瓶内的原球茎疏密适中时,其生长势头十分旺盛,增殖系数和质量都明显提高,表现出一定的群体生长效应。

2.8 幼苗在增殖培养基和生根培养基上生长状况的差异

蝴蝶兰幼苗在增殖培养基和生根培养基上都可以生长和生根,但生长状况却有显著差异(见表6)。

表6 幼苗在增殖培养基和生根培养基上生长状况

培养基 类别	30d			90d		
	每株根数 (条)	叶长 (cm)	叶色	每株根数 (条)	叶长 (cm)	叶色
增殖培养基	1.3	1.6	浅绿	2.4	3.6	浅绿
生根培养基	1.8	1.2	浓绿	3.9	4.5	浓绿

注:表中叶长为第一叶长度。

从表6可以看出,虽然蝴蝶兰幼苗在两种培养基上都可以生根和生长,但在生根培养基1/3MS + Hyponex3.5g + NAA0.1 + IBA0.1 + 胰蛋白胨2g + 香蕉200g上,幼苗的生长状况明显优于增殖培养基1/3MS + BA2 + KT0.5 + NAA0.1 + 椰乳200ml。分析认为这是由培养基中激素水平、激素比率、附加成分等因素共同决定的。比如,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/生长素比值有利于生根。又如,椰乳有利于兰科植物分化和增殖,常用于蝴蝶兰原球茎的增殖培养。而香蕉有利于兰科植物壮苗和生根,常用于蝴蝶兰幼苗的生根培养。

3 结论与讨论

3.1 蝴蝶兰的组织培养过程中,经常要取不同部位作外植体。这样不仅会损伤母株,而且要对材料逐一消毒。不但麻烦,而且会有不同程度的污染率。

本实验所用的所有材料,均取自于由花梗腋芽培养出的无菌丛生苗,省去了消毒灭菌的环节,十分方便可行。这对其他植物的组织培养有十分重要的借鉴意义。

3.2 在蝴蝶兰的初代培养过程中,幼叶、茎尖和腋芽都可作为外植体。实验表明:利用叶片作外植体,诱导率低(约50%),叶基和叶尖尤为困难,并且花费的时间长。而利用茎尖、腋芽作外植体诱导原球茎,成功率高、花费的时间短(约14d)。利用根尖作外植体,尚没有培养成功的报道。因此,选用合适的材料作外植体,进行初代培养,是能否成功的关键。

3.3 蝴蝶兰原球茎转接的最佳时间一般在45d左右。转接过早达不到预期的增殖系数,转接过晚则瓶内的营养成分不足,产生的新球体过于细小,原球茎品质不佳,甚至出现不同程度的玻璃化现象。

3.4 在原球茎的增殖过程中,总有一定数量的原球茎发育成幼苗,这就存在着在同一生存空间内原球茎和幼苗争夺营养、互相胁迫的现象。若转接时培养瓶内植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,有利于原球茎增殖。若转接时培养瓶内植入的原球茎较为稀疏,则群体效应减弱,原球茎增殖系数降低,相当多的原球茎发育成幼苗,不利于原球茎增殖。因此,在继代培养过程中应根据自身的需要适当调整原球茎的植入密度。如果主要以原球茎的增殖为目的,就要在原球茎植入时保持一定的密集程度。如果产苗量和增殖并重,原球茎植入时应适当稀一些。

参考文献:

- [1]陈兴盼.文心兰的组织培养[J].植物生理学通讯,1989,(6):49.
- [2]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.

(责任编辑:韩素梅)