

蝴蝶兰种子胚高频率诱导原球茎的研究

曹君迈¹, 任 贤¹, 王 薇¹, 陈彦云², 任玉峰¹

(1. 西北第二民族学院生命科学系, 银川 750021; 2. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

摘 要:以不同成熟度的蝶兰杂交 1 号种子为外植体进行离体培养, 探讨了不同激素配比、种子不同采收期以及在培养基中添加马铃薯汁和活性炭对原球茎形成、发育的影响以及对原球茎诱导效果的影响。结果表明生长了 4 个半月的未成熟种子胚最适宜离体培养, 仅需要 20 d 就可形成原球茎, 有效原球茎的诱导率达到 100%。吲哚 酸对蝴蝶兰未成熟种子胚的进一步发育以及诱导有效原球茎的形成和发育具有明显的促进作用, 其适宜的吲哚 酸浓度为 1 mg/L。在加入附加物时, 吲哚 酸的浓度范围可提高到 2 mg/L, 其有效原球茎的诱导率仍能达到 100%。

关键词: 蝴蝶兰; 种子胚; 采收期; 有效原球茎; 吲哚丁酸

中图分类号: S682.31; S603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2006)06-0130-03

蝴蝶兰(Phalanopsis)是世界著名的花卉之一。原生种仅有 20 多种^[1], 但栽培杂交品种较多。花色艳丽, 形如蝴蝶, 花序由数量不等的花朵成队排列犹如一列蝴蝶在空中翩翩起舞, 使人百看不厌, 深受消费者喜爱。但蝴蝶兰是单茎性气生根植物, 生长、发育要求的自然环境条件较为严格, 传统的繁殖方式为分株繁殖, 繁殖系数低、速度慢。从 20 世纪 60 年代起, 国外开始利用组织培养技术繁殖兰花种苗的商业生产^[2]; 国内, 对兰花组织培养研究起步较晚, 目前在生产中存在许多问题需要解决, 如: 以成苗的组织或器官诱导脱分化的难度较大, 繁殖周期相对较长且快繁效果不理想等^[3]。此外, 由于蝴蝶兰生产带来高额的经济效益, 许多生产厂家对技术问题秘而不宣, 从而阻碍了蝴蝶兰生产的发展^[4]。通过对蝴蝶兰人工有性杂交获得的蒴果种子进行组培研究, 发现在含有吲哚丁酸的培养基上, 20 d 就可发育成为颗粒较大的原球茎, 提高了有效原球的诱导率, 缩短了快繁周期, 加快了种子的生育进程, 有关这方面的研究尚未见文献报道。本项研究为蝴蝶兰的快速繁殖、工厂化育苗提供有效快捷的技术方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 试验材料来源于西北二民院生命科学系教学实验基地。分别取其“结实”135、165 和 195 d 黄绿色、淡黄色未开裂、黄色开裂的蒴果。

1.1.2 试剂 试验所用试剂均为分析纯, 植物激素购于 Sigma 公司。

1.1.3 仪器 利用奥林帕斯体式显微镜(SZ61)、生物显微镜(CKX41)观察、记载、数码相机拍照以及统计分析成熟度不同的蝴蝶兰“种子”形成原球茎的发育进程。

1.1.4 培养基 以 MS 培养基为基本培养基, 其中加蔗糖 20 g/L、琼脂条 6.5 g/L、pH5.8, 并配用 6-苄基腺嘌呤、萘乙酸和腺嘌呤和维生素 C, 用量单位 mg/L。添加物单位为 g/L, 培养基配方见表 1。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得 利用人工杂交技术对蝴蝶兰同一植株花茎上的 3~4 朵粉采用其它植株上的花授粉, 授粉后约 8~12 d 左右可见其有效的授粉花朵的子房开始返绿膨大, 随后逐渐形成蒴果。在正常的栽培管理条件下, 子房膨大乃至蒴果形成逐渐变黄或开裂大约经历 135~195 d 左右, 即蝶兰杂交 1 号品种。在无菌条件下, 将成熟度不同的蝶兰杂交 1 号品种蒴果的表面用 70% 酒精棉擦拭消毒 2~3 次, 用手术刀切开蒴果, 取其粉末状微细“种子”均匀地接种在不同处理的培养基上, 每处理接种 10 瓶。

1.2.2 培养条件, 温度为 22~28 ℃, 光照强度 2 000 Lx, 光照时间 10~12 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同处理对原球茎形成和发育的影响

由表 1 看出: 将成熟度不同的种子接种后, 每 4 d 观测一次, 其中详细观察记录了 4 个半月的种子发育进程, 并对其进行拍照, 见图 1。统计结果见表 1。4 个半月的蝴蝶兰种子原球茎形成约需要 2~4 周, 以 6 号处理形成原球茎最早, 比其它处理原球茎早形成 4~9 d, 但颗粒较小, 原球茎体积增加缓慢, 其次是吲哚丁酸不同浓度的几个处理比 6 号处理晚 4 d 但原球茎的体积增加较快, 1 号和 3 号处理相对较晚, 比 6 号处理晚 9 d。在不加激素的 MS 培养基上未形成原球茎。结果表明: 适宜浓度的 2,4-D 有利于原球茎的诱导, 但对原球茎的进一步生长可能有抑制作用 与黄鑫文的研究文献报道不同^[3]; IBA 虽然比 2,4-D 对原球茎的发生稍晚 但对原球茎的进一步发育是有利的; IBA 比 BA 和 NAA 对原球茎的形成启动能力强; 而在只有 IBA, 没有 BA 的培养基上, 仍能较快的形成原球茎; 无机盐的浓度过高, 影响原球茎的发育。所以细胞分裂素对原球茎的诱导不是必须的, 而生长素对原球茎的发生和形成是非常重要的。适宜浓度的 IBA 具有促进种子胚进一步发育, 最终形成成熟胚和诱导原球茎形成和发育的作用, 同时也证明蝴蝶兰种子是一种未成熟的胚, 即幼胚^[4], 另外还可从种子压片中观察到, 其结构与一般种子结构不同(见图 2), 只有微丝组成, 没有胚乳, 是一个发育不完全的胚。

* 基金项目: 西北第二民族学院基金项目(2004Y034)。

收稿日期: 2006-07-05

表 1 不同处理对原球茎形成和发育的影响

培养基	种子发育进程(月,日)					原球茎变化情况	原球茎形成时间(d)
	3.25	3.29	4.3	4.11	4.14		
1. 1/2MS+BA5+A4+NAA0.5+Vc4	黄略带绿	黄绿	浅绿	深绿	深绿	粒小,密基本整齐	25
2. MS	黄色	黄褐	褐色	褐色	褐色	没	没
3. MS+BA5+ A4+ NAA0.5+Vc4	黄绿	黄绿	绿	绿颗粒中有小部分	绿色颗粒中有部分变黄或黑	颗粒小,发育不整齐有退化	23
4. 1/2MS+IBA2+NAA0.02	黄绿	浅绿	深绿	绿颗粒中有部分	绿色颗粒中有的变白	颗粒较大发育不整齐有退化	20
5. 1/2MS+IBA3+NAA0.02	黄绿	变绿	变绿	绿色颗粒中有的变黑、有的变白	绿颗粒中有的变黑、有的变黄	颗粒稍大,发育不齐,退化严重	20
6. 1/2MS+BA4+KT1+2,4-D0.2	绿	绿	深绿	深绿	深绿	粒小密,发育基本整齐	16
7. 1/2MS+IBA1+NAA0.02	黄绿	绿	绿	亮绿	亮绿	颗粒较大,发育整齐	20

2.2 蝶兰杂交 1 号品种的不同采收期对原球茎诱导效果的影响

对不同采收期的蝶兰杂交 1 号品种,经不同处理的培养形成原球茎需要的天数进行统计,结果见表 2。

表 2 蝶兰杂交 1 号品种的不同采收期对原球茎诱导效果的影响

培养基	不同成熟度蝴蝶兰种子		
	4个半月原球茎形成时间(d)	5个半月原球茎形成时间(d)	6个半月原球茎形成时间(d)
1/2MS+BA5+A4+NAA0.5+Vc4	25	40	未
1/2MS+IBA1+NAA0.02	20	35	未
1/2MS+BA4+KT1+2,4-D0.2	16	32	未
MS	未	50	未
平均	20.3	39.3	未

由表 2 得出,以 4 个半月左右的蝴蝶兰种子诱导原球茎形成时间早,比 5 个半月平均早形成 19 d,6 个半月的种子 60 d 时还未形成原球茎。种子采收时间过晚,种子开裂,接种难度加大,在消毒过程中,易将种子损伤,另外可能由于种子自身开始退化的原因,不利于原球茎形成。从相同采收期来看,在没有细胞分裂素,只有生长素的培养基上,仍能形成原球茎。采收期为 5 个半月时,在 MS 培养基上形成原球茎,但时间较长,需要 50 d。收获期过早、过晚在 MS 培养基上都没有形成原球茎。结果表明:在利用蝴蝶兰种子进行原球茎诱导时,以 4 个半月的种子采收后进行离体培养效果较好。

2.3 不同浓度吲哚丁酸对有效原球茎诱导效果的影响

对不同浓度的吲哚丁酸处理的 4 个半月的种子,在实体显微镜下对原球茎、有效原球茎、退化原球茎的数量变化进行统计,其结果见表 3。

表 3 不同浓度吲哚丁酸对有效原球茎诱导效果的影响

培养基	调查项目				
	原球茎形成时间(d)	原球茎形成总数(个)	有效原球茎数(个)	退化原球茎数(个)	有效原球茎诱导率%
1/2MS+IBA1+NAA0.02	20	205	205	0	100
1/2MS+IBA2+NAA0.02	20	52	42	10	80.8
1/2MS+IBA3+NAA0.02	20	63	38	25	60.3

从表 3 得出:在 NAA 浓度相同的培养基上,原球茎诱导发生的时间不受 IBA 浓度高低的影响,但在发育过程中,对有效原球茎的形成影响很大,IBA 浓度达到 3 mg/L 时原球茎退化现象最为严重,其次为 2 mg/L,1 mg/L 没有退化,由此说明,最佳的 IBA 浓度范围应低于 2 mg/L,对原球茎诱导效果好,诱导率高达 100%。

2.4 不同添加物对吲哚丁酸浓度的要求及有效原球茎诱导效果的影响

将成熟期为 4 个半月的种子接种在表 4 不同培养基上,观察比较不加和附加有机物对有效原球茎的诱导情况,结果见表 4。

表 4 不同添加物对有效原球茎诱导效果的影响

培养基	调查项目				
	原球茎形成时间(d)	原球茎形成总数(个)	有效原球茎数(个)	退化原球茎数(个)	有效原球茎诱导率(%)
1/2MS+IBA2+NAA0.02	20	99	79	20	79.8
1/2MS+IBA2+NAA0.02+活性炭0.5	21	96	96	0	100
1/2MS+IBA2+NAA0.02+马铃薯汁100	19	76	76	0	100

由表 4 得出:在添加活性炭的培养基上,由于活性炭具有吸附作用,使吲哚丁酸释放缓慢,其浓度增加到 IBA 2 mg/L,仍没有降低对有效原球茎的诱导;而在没有加入活性炭的培养基上 IBA 浓度在 2 mg/L 时,有效原球茎的诱导率为 79.8%,比加入活性炭的培养基有效原球茎减少了 20.2 个百分点。在添加马铃薯汁的培养基上,有效原球茎的诱导率比不加的增高 20.2 百分点。由此说明,马铃薯汁和活性炭均能够缓解较高浓度 IBA 对有效原球茎诱导的副作用。

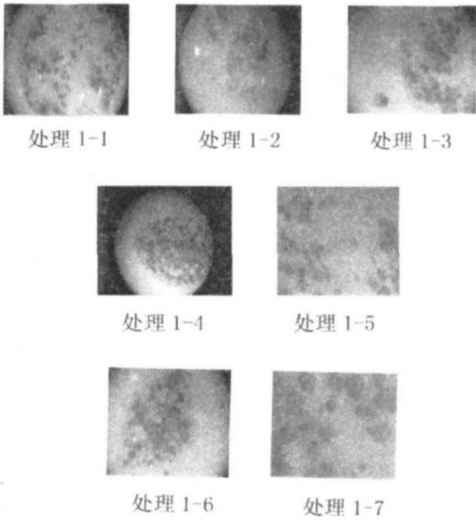


图 1 不同处理对原球茎发育的影响

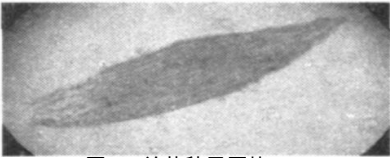


图 2 兰花种子压片

3 讨论

利用组培技术对蝴蝶兰胚、花梗、幼叶、茎尖、根尖和种子为外植体进行组培研究已有文献报道⁵⁻¹⁰,对蝴蝶兰原球茎增殖和组培快繁的研究主要集中在培养基种类和激素 6-BA 和 NAA 的研究上,而对其种子结构、种子组培适宜外植体的

寒地垄作油菜栽培技术

赵丰秋, 李月英

(黑龙江省齐齐哈尔市农业技术推广中心 161006)

中图分类号: S634.3 文献标识码: B

文章编号: 1001-0009(2006)01-0132-01

1 选茬整地

垄作油菜, 最好选择秋起垄、秋施肥的麦茬。豆茬、玉米茬也可以。为了保墒, 秋起垄的地应在地化冻 3~3.5 cm 时, 进行早春镇压。玉米、豆茬刨出捡净茬子。垄距 65~70 cm。

2 播种

2.1 品种 选用优质、高产“双低”油菜品种——皮维特和垦油 1 号, 青油 14 号和格劳保。

2.2 播种 4 月 25 日~5 月 5 日。垦油 3 号在齐齐哈尔市第一二、三积温带播期 4 月 15~5 月 1 日。

2.3 播量 每 667 m² 播种量为 1.5 kg(其中 0.5 kg 炒熟, 可使种子播的均匀)。

2.4 播法 采取 种或用 精量点播机播种, 播幅宽 7~8 cm, 播深 2.5~3 cm, 播后及时镇压, 为了把种子播在湿土上和消灭杂草, 播前将垄台上干土推去 2 cm 左右。播种要做到播量均匀, 深浅一致, 覆土严密, 播后镇压。

2.5 施肥 油菜是需肥较多的作物, 吸肥力强, 对氮、钾需

要量大, 对磷、硼反应敏感。为了满足油菜生长发育的需要和提高单位面积产量, 在秋施肥的基础上, 播种时, 施腐熟有机肥 2 000 kg/667 m², 种肥施尿素 5 kg/667 m², 硫酸钾 15~20 kg/667 m², 普钙 30~40 kg/667 m², 硼砂 0.5 g/667 m²。特别在初花期用新硼肥 60 mL/667 m² 兑水喷施, 增加油菜结实率。

3 田间管理

3.1 间苗 当油菜长到 6~7 cm 时进行人工间苗, 留拐子苗, 要做到选留大、壮苗, 植株分布均匀。保苗 4~5 万株/667 m²。

3.2 铲趟 油菜出苗后, 进行一次深松, 以放寒增温, 保苗早发。至油菜抽苔前要进行 2 次铲趟, 第一次铲趟可结合间苗进行, 要把苗眼的小草除净。油菜株高达 40~60 cm 时拿 1~2 次大草。

3.3 防虫 幼苗出土前后, 经常检查虫情, 发现跳甲为害, 要及时进行药剂防治, 可采用 5% 来福灵乳油 0.225 L/hm², 兑水 150~200 L 喷洒 1 次, 7 d 后再喷 1 次。也可用 50% 辛硫磷乳油 1 500 倍液, 或 20% 速灭杀 乳油 2 000 倍液防治。也可用 2.5% 敌百虫粉, 用药量 22.5~30 kg/hm²。

3.4 防病 油菜立枯病, 从幼苗到成株均可受害, 使植株生长缓慢, 叶片发黄、脱落而减产。防治: 轮作: 与禾本科作物实行 2 年以上的轮作。种子拌药: 用 50% 丰米可湿性粉剂, 或 50% 多菌灵+50% 福美双可湿性粉剂, 按 3:2 混合后, 用种子量的 0.3% 拌种, 防病效果好, 且对油菜安全, 并能兼治猝倒病。

4 收获

油菜田里大约有 2/3 的荚果变黄, 为收获最佳时期, 割后捆成码子, 码成人字码晾晒, 晴天晒 6~7 d 即可脱粒。

收稿日期: 2006-09-10

采收期以及 IBA 浓度及添加物对蝶兰未成熟胚有效原球茎诱导效果的研究未见报道。本试验着重对这几个方面进行了研究, 结果发现: 在一个蒴果内蝴蝶兰种子可达上万粒, 但其发育程度本身存在差异, 种子结构特殊, 只有微丝组成, 没有胚乳, 是一个发育不完全的胚, 见图 1; 在进行组培时要选择成熟度适宜的种子, 一般从种子受精到采收以 135 d 比较适宜, 此时, 有效原球茎的诱导效率高; 在培养过程中, 原球茎形成后, 吲哚丁酸浓度过高时, 可能由于细胞分裂和分化速度过快, 致使发育相对滞后的种子相继退化成白色体或暗黄色颗粒, 特别是在高浓度的吲哚丁酸(IBA 3 mg/L)中还可形成黑色颗粒, 但在低浓度(IBA 1 mg/L)时, 不发生这种生理现象, 发育滞后的种子能够适应它所生长的培养基, 进一步发育成原球茎, 而且形成的原球茎颗粒发育比较整齐。在高浓度的 IBA 的培养基中加入添加物, 可有效地防止退化现象, 并提高有效原球茎的诱导率。总之, 在 3 种不同的生长素中, 吲哚丁酸的作用, 比其它更有效。也就是说吲哚丁酸在蝴蝶兰未成熟胚中起着重要的生理作用。其生理生化机理还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 朱春林, 王家福, 王梓清. 蝴蝶兰原球茎增殖条件的优化[C]. 陈振光. 植物组织培养与试管育苗. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004. 344~349.
- [2] 彭立新, 王姝, 孟光云. 蝴蝶兰组织培养快繁研究[J]. 天津农业科学, 1999, (5): 27~29.
- [3] 黄鑫文, 陈创国. 蝴蝶兰组织培养与快速繁殖技术研究进展[C]. 陈振光. 植物组织培养与试管育苗. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004. 261~266.
- [4] 朱自清. 植物细胞工程[M]. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2003. 42, 61.
- [5] 邹金环, 赵大勇, 刘艳梅, 等. 蝴蝶兰组织培养快繁技术研究[J]. 北方园艺, 2005, (6): 86~87.
- [6] 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.
- [7] 张莉, 张明, 高宏秀. 兰花组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(11): 2134~2135, 2147.
- [8] 杨美纯, 周歧伟, 许鸿源. 蝴蝶兰的种子培养[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(4): 258~260.
- [9] 周俊辉, 叶超宏, 陈旭高. 蝴蝶兰原球茎增殖培养的研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2002, 15(3): 13~17.
- [10] 李进进, 廖俊杰. 蝴蝶兰根段的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 37.