

蝴蝶兰组培苗类原球茎的诱导与分化

乔永旭, 张永平, 陈超, 韩兴辉, 王旭, 刘桂萍

(唐山师范学院 生命科学系 河北 唐山 063000)

摘要:以蝴蝶兰 PRD640 的试管苗的叶片为试材, 对影响类原球茎 (PLB) 发生、增殖、分化等因子进行了系统研究。试验采用了正接、反接和斜接 3 种接种方式, 设计了 6 种诱导培养基, 2 种增殖培养基, 2 种分化成苗培养基。结果表明: 正接叶片的 PLB 诱导率最高, 为 33.3%, 反接和斜接分别 3% 和 0%。较高浓度的 6-BA 更有利于 PLB 的诱导; 1/2MS+6-BA 10 mg/L+椰子汁 10% 是蝴蝶兰 PLB 诱导的最适宜培养基; 1/2MS+NAA 1 mg/L+6-BA 2 mg/L 是蝴蝶兰 PLB 增殖的理想培养基; 适宜的成苗培养基为 1 号培养基。椰子汁对 PLB 的诱导有明显的促进作用。

关键词: 蝴蝶兰; 叶片; 类原球茎; 诱导; 分化

中图分类号: S 682.2⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0138-04

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis hybrid*) 为兰科多年生附生草本, 其花形态优美, 结构精巧奇特, 花色多样, 花期持久, 素有“兰花皇后”的美誉, 具有很高的观赏价值和经济价值。目前蝴蝶兰的快速繁殖主要通过种子萌发产生实生苗, 这种方式产生的后代变异大, 不能适应商品化生产的要求。因此, 利用营养器官快速繁殖技术对扩大蝴蝶兰的增殖倍数, 是非常必要的^[2]。1949 年 Rotor G 利用无菌培养技术成功的促使蝴蝶兰花梗上的休眠芽发育成完整的植株^[3], 此法经改进后^[4-5], 曾一度成为蝴蝶兰的主要无性繁殖方式。但在实际生产中, 由于外植体数量限制, 繁殖系数难以提高。随后法国科学家 Morel 注意到虎头兰的茎尖在无菌的培养基上可以形成类似于胚所形成的原始球体, 将其命名为 Protocorm-like-body (PLB)。它可以很快繁殖成小苗, 脱除了兰花的病毒, 又能快速大量繁殖。1974 年, Intiwong 和 Sagawa 利用蝴蝶兰茎尖诱导产生 PLB, 然后分化幼芽, 形成植株^[6]。近年来, 蝴蝶兰的快速繁殖主要通过茎尖、种子、茎段、根尖、叶、花梗等作为外植体进行组织培养^[7-9], 比起其他繁殖器官, 采用叶片为外植体, 可减轻或避免对母株的伤害, 而且叶片数量多, 取材不受季节的影响, 是较理想的繁殖材料。目前, 对蝴蝶兰叶片诱导 PLB 的研究已有不少报道^[10-12], 普遍存在诱导率低下, 增殖倍率不高的状况。试验采用组培苗叶片为外植体, 通过不同的接种方式, 对适合蝴蝶兰 PLB 诱导、增殖和分化的基

本培养基、生长调节剂的种类及浓度进行了试验, 以期对蝴蝶兰的快速繁殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蝴蝶兰 PRD640 试管苗 (苗龄 1 a, 苗高 7~8 cm, 叶片幼嫩翠绿, 生长旺盛)。由唐山师范学院生物科学技术系细胞工程室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片的培养方式对 PLB 的诱导 取试管苗上部幼嫩的叶片, 在无菌条件下, 用解剖刀切成 1 cm×1 cm 的小块, 小于 1 cm×1 cm 的幼叶不做切割。按正、反、斜 3 个方向接种在诱导 PLB 的培养基上, 培养基为 MS+6-BA 5.0 mg/L+椰子汁 10%。培养基中含有琼脂 6 g/L, 蔗糖 20 g/L, 活性炭 3 g/L, pH 为 5.3~5.6。培养条件: 温度为 25℃, 日光照 12 h, 光照强度 2 000 lx。

1.2.2 蝴蝶兰 PLB 的诱导 取无菌苗幼嫩的叶片, 在诱导 PLB 的培养基上培养。PLB 诱导的基本培养基为 1/2MS、MS。根据添加生长调节剂的种类、比例和有无附加物设定 6 个处理: A: MS+6-BA 3.0 mg/L; B: MS+6-BA 5.0 mg/L; C: MS+6-BA 5.0 mg/L+椰子汁 10%; D: 1/2MS+KT 10 mg/L+NAA 5 mg/L+椰子汁 10%; E: 1/2MS+6-BA 10 mg/L+NAA 1 mg/L+腺嘌呤 10 mg/L; F: 1/2MS+6-BA 10 mg/L+椰子汁 10%。培养基内含物和培养条件同上。

1.2.3 蝴蝶兰 PLB 的继代增殖 从培养出 PLB 的培养瓶中取出 PLB, 用解剖刀切成小块, 接种到 2 种培养基中, 每瓶接 5 块, 进行培养。PLB 的增殖量以培养 1 个月后的统计数据计算。该试验 PLB 增殖量是以每个接种物培养 1 个月所形成的新 PLB 的直径计算, 即平均增殖量=继代后的培养物直径-继代时的接种物直

第一作者简介: 乔永旭 (1978-), 男, 硕士, 讲师, 现从事植物细胞工程和植物资源开发与利用科研与教学工作。E-mail: qiaoyx123@163.com。

基金项目: 河北省科技厅生物工程资助项目 (04547008D-2)。

收稿日期: 2009-10-09

径^[13]。增殖培养基为: G: 1/2MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L; H: 1/2MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L, 培养基内含物和培养条件同上。

1.2.4 蝴蝶兰 PLB 分化成苗 从增殖后的 PLB 中挑选出大小均一, 色泽鲜亮, 颗粒形态正常, 生长势良好的, 在无菌条件下分别接种到 1 号和 2 号等成苗培养基中(表 1)。pH 为 5.4~5.8, 培养条件同上。

表 1 2 种成苗培养基的配方		
成分	1 号/g · L ⁻¹	2 号/g · L ⁻¹
花宝 1 号	3	2.5
花宝 2 号	0	0.5
蔗糖	20	2.5
琼脂	8	10
蛋白胨	2	2
香蕉汁	100	50
活性炭	1	1

2 结果与分析

2.1 PLB 的诱导

2.1.1 叶片的培养方式对 PLB 的诱导 正接叶片的 PLB 的诱导率明显高于反接和斜接的叶片, 前者的诱导率为 33.3%, 而后两者几乎无法诱导出 PLB(表 2)。在培养过程中还发现, 在同一叶片上, 叶基部靠近叶柄部位的叶片较叶中部和叶尖部叶片的诱导率稍高(图 1)。未切割的幼叶(小于 7 mm×7 mm)诱导率较低, 这一结果与前人报道不相一致的^[14], 因此采用正接叶片基部的叶块为适宜的接种方式。

表 2 不同类型培养基 PLB 的诱导率			
类型	接种叶片数	产生 PLB 叶片数	诱导率/%
正接	30	10	33.3
反接	30	1	3.3
斜接	30	0	0

2.1.2 不同培养基对 PLB 的诱导 PLB 是一类呈珠粒状的幼嫩器官, 开始长出时为白色晶莹的小球体, 随着小球体体积的增大, 在 PLB 的表面上长出毛状假根。在兰科植物中多以这种器官发育、增殖、分化。叶片在接种 30 d 后, 切口处陆续有 PLB 生成, 有些叶块上表面也有单个的 PLB 长出。PLB 发生于切口或叶上表面的浅层细胞, 用镊子轻轻拨动即可使 PLB 外植体分离。40 d 后统计 PLB 的诱导率。叶片能在多种培养基上诱导产生 PLB, 其中以 1/2MS+6-BA 10 mg/L+椰子汁 10%效果最佳, 其 PLB 诱导产生速最快, 诱导率最高(表 3)。

表 3 不同叶片培养方式的诱导率			
培养基	接种叶片数	产生类原球茎的叶片数	诱导率/%
A	30	3	10.0
B	30	6	20.0
C	30	10	33.3
D	30	0	0.0
E	30	2	6.7
F	30	21	70.0

由培养基 A、B 和 F 可以看出, 高浓度的 6-BA 有助于 PLB 的产生。在 3~10 mg/L 的浓度范围内, 随着 6-BA 浓度的增高, PLB 的诱导率也大大增加。由培养基 D 和 E 可以看出, 高浓度的 NAA (5 mg/L)比低浓度的 (1 mg/L)对 PLB 的诱导有更强的抑制作用, 当 NAA 的浓度较高时, PLB 的诱导几乎不启动, 当 NAA 浓度低时, 对 PLB 的诱导也有较强的抑制作用。

2.1.3 椰子汁对 PLB 的诱导 添加椰子汁的培养基 PLB 的诱导率远远高于没有椰子汁的培养基(表 3)。没有添加椰子汁的 B 培养基 PLB 的诱导率只有 20%, 添加 10%的椰子汁后诱导率提高了 13.3%。此外, 添加椰子汁后, 不仅 PLB 数量多, 且颜色翠绿、饱满、生长势旺盛; 无椰子汁的, 形成的 PLB 数目少, 大多呈现淡黄色, 少数变褐, 畸形, 有些甚至死亡。

2.2 PLB 的增殖

将 PLB 接种到 2 种增殖培养基中, 培养 30 d 后观察, 每瓶培养基中接种的 PLB 变成表面凹凸不平、形状不规则的培养物, 直径都有明显增大, 表面有白色绒毛。从 PLB 的增殖量来看, 6-BA 2.0 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L 处理差别不大(表 4)。

表 4 2 种培养基增殖情况		
编号	激素组成/mg · L ⁻¹	增殖量
G	NAA 1.0+6-BA 2.0	4.1
H	NAA 1.0+6-BA 1.0	3.9

2.3 PLB 的分化成苗

PLB 增殖后, 在成苗培养基上培养 30 d 后, 有些 PLB 已分化出 2 片鞘叶; 随着鞘叶的生长, 在 2 片鞘叶之间长出真叶, 继续生长并长出第 1 条根。PLB 在长大的同时也发生少量增殖, 稍大一些的 PLB 进而分化出芽。在切块细小稀疏的培养瓶内, 群体生长较慢, 而在切块较大且密集的培养瓶里, 群体生长旺盛, 表现出一定的群体生长效应。

1 号培养基上 PLB 分化出的芽整齐划一, 大部分 PLB 都已分化出芽, 分化频率远较 2 号培养基高, 并且苗翠绿健壮, 长势旺盛; 2 号培养基上只有少部分 PLB 分化成苗, 并且试管苗的生长势较弱。因此 1 号培养基为 PLB 分化成苗的适宜培养基。

3 讨论

试验条件下, 以 1/2MS+6-BA 10.0 mg/L+椰子汁 10%为诱导培养基, 以切成 1 cm×1 cm 的蝴蝶兰叶片为外植体, 接种 40 d 后 PLB 的诱导率可达 70%以上。杨美纯^[11]等人在诱导初期频繁转瓶, 叶片 PLB 诱导率达 61.1%, 而此试验不经转瓶就获得了 70%的诱导率。活性炭吸附对植株本身有害的物质、生长调节物质以及 Fe-EDTA、VB₆、叶酸、烟酸等成分, 对形态发生和器官有良好效果, 同时活性炭有利于植物生根, 这与前人的研

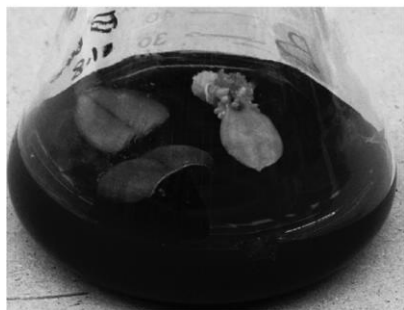


图1 叶片诱导出的 PLB

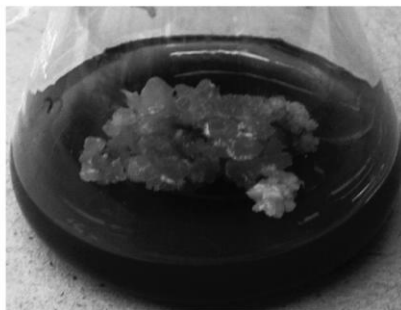


图2 PLB 的增殖

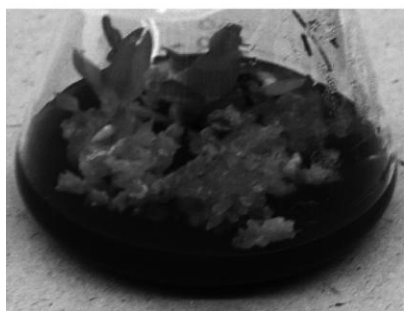


图3 PLB 的分化



图4 PLB 分化成苗

究结果一致。转接 PLB 过程中,某些 PLB 团块切割不均匀,导致有些外植体过小,而使其增殖困难甚至发黄、变褐直至死亡,这可能与 PLB 的群生效应有关。因此在进行 PLB 继代增殖培养时,转接稍大些的 PLB 团块是很必要的。王静^[13]等人研究认为,PLB 的增殖量与 6-BA 的浓度有关,在 NAA 用量相同的情况下,随着 6-BA 浓度的增加,增殖量也随着增加。组织培养中常用的有机添加物如椰子汁、香蕉汁是一类含有氨基酸、激素和酶等有机物且成分较为复杂的天然复合物。研究表明,它们对细胞和组织的增殖和分化有明显的促进作用^[15],试验进一步证实了这一点。2 号培养基的 PLB 分化成苗的比率比 1 号低,长势较弱,可能与花宝一号、花宝二号、蔗糖和香蕉汁的用量及比例有关。试验采用的分化培养基在蝴蝶兰 PLB 分化成苗试验中无人报道。在蝴蝶兰快速繁殖研究中,蝴蝶兰外植体形成的 PLB 较少,且在形成后难于增殖,这可能与培养条件有关,适宜的激素浓度选择范围可能也与培养基的种类有关。试验筛选出最佳的适于 PLB 的产生和增殖的大量元素、激素附加物的组合,可获得生长良好的 PLB,并能成苗,可为今后对蝴蝶兰的改良研究提供理论支持。

参考文献

- [1] 秦贺兰,孙红梅.蝴蝶兰研究进展[J].河南职业技术学院学报,2002,30(2):31-35.
- [2] 彭立新,王姝,孟广云.蝴蝶兰组织培养的研究[J].天津农业科学,

1999,5(2):27-29.

- [3] Rotor G. Method of vegetative propagation of phalaenopsis stemcuttings [J]. Amer orchid Soc Bull, 1949(18): 739-739.
- [4] Solly M R J R. Stem propagation of phalaenopsis [J]. Amer Orchid Soc Bull, 1966(84): 40-42.
- [5] Urata U, Iwanga E T. The Use of Tto-type vials for vegetative propagation of phalaenopsis [J]. Amer Orchid Soc Bull, 1965(83): 410-413.
- [6] Intuwong O, Sagacus Y. Clonal propagation of phalaenopsis by shoot-tip culture [J]. Amer Orchid Soc Bull, 1975(93): 893-895.
- [7] 张秀清,王志武.蝴蝶兰实生苗不同器官的离体培养[J].植物学通报,1996,13(1):50-53.
- [8] 李军,许大熊,朱饱卿.等.植物组织培养简报摘编(蝴蝶兰花梗苗根尖)[J].植物生理学通讯,1999,35(3):209.
- [9] 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.
- [10] 蔡平里.图解兰花繁殖最新技术[M].台湾:淑馨出版社,1996:58-65.
- [11] 杨美纯,周歧伟,许鸿源,等.外部因子对蝴蝶兰叶片原球茎发生的影响[J].广西植物,2000,20(1):42-46.
- [12] Myint R T, Chung M Y, Chung J D et al. Propagation via in vitro culture of leaf tissue of phalaenopsis seedling [J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 2001, 42: 1-5.
- [13] 王静,姜玉露,郝再彬.等.大量元素有机添加物激素对蝴蝶兰原球茎增殖的影响[J].上海农业科技,2004(3):21-23.
- [14] 张秀清,王志武,王春英,等.蝴蝶兰实生苗原球茎诱导研究[J].莱阳农学院学报,1995,12(1):44-46.
- [15] Lindeman EGP, Gunckel J E, Davidson O W. Meristem culture of Cattleya [J]. Amer Orchid Soc. Bull, 1970, 39: 1002-1004.

不同培养基成分对石斛兰继代和生根的影响

蔺红苹, 房美玲

(湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘要: 对石斛兰 (*Dendrobium*) 的继代培养及生根培养进行研究。结果表明: 不同的细胞分裂素和生长素比例对石斛兰继代培养的影响不同, 石斛兰继代培养最适培养基: MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L+10%椰乳+琼脂 8.0 g/L+蔗糖 30 g/L; 不同的有机添加物组合对石斛兰根的生长也不同, 石斛兰壮苗生根最适培养基: 1/2 MS+IBA 2.0 mg/L+肌醇 2.0 mg/L+水解酪蛋白 1.0×10^3 mg/L+香蕉泥 1.0×10^5 mg/L+琼脂 8.0 g/L+蔗糖 30 g/L。

关键词: 石斛兰; 继代培养; 生长素; 细胞分裂素

中图分类号: S 682.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0141-03

石斛兰属兰科石斛属(*Dendrobium*), 是观赏价值较高的花卉, 是我国古文献中最早记载的兰科植物之一。其花姿优美, 花色艳丽, 花期较长, 多具芳香气味, 深受人们喜爱, 在国际花卉市场中占有重要地位。当今世界上许多国家都有广泛栽培, 尤以东南亚最盛, 其中以泰国产量最大。另外, 新加坡、马来西亚和我国台湾也有一定数量生产。石斛兰与卡特兰、蝴蝶兰、万带兰并列为观赏价值最高的四大观赏兰类。近年来, 国内花卉市场上石斛兰鲜切花供不应求, 主要缘于其自然繁殖力很

低, 常规繁殖速度太慢, 许多优良品种无法大量繁殖以满足日益增长的市场需求, 利用组织培养技术可以扩大石斛兰生产规模^[1]。该试验旨在探讨石斛兰组培快繁过程中某些因素对其茎芽的增殖分化及生根的影响, 以寻求最适宜的组培快繁条件来扩大生产。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料(石斛兰幼芽)由组培实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 不同培养基配方^[2-4] ①石斛兰继代培养起始培养基: MS+6-BA 1.0 mg/L+10%椰乳+琼脂 8.0 g/L+蔗糖 30 g/L; ②石斛兰继代培养的的培养基(不同的细胞分裂素和生长素比例)见表 1; ③石斛兰生根培养基配方(不同的有机添加物组合)见表 2。

第一作者简介: 蔺红苹(1979-), 女, 硕士, 实验师, 主要研究方向为组织培养及微生物学。E-mail: yuzaidongji@yahoo.com.cn.
收稿日期: 2009-11-20

PLB Induction and Differentiation of *Phalaenopsis* Tissue Culture Plant

QIAO Yong-xu, ZHANG Yong-ping, CHEN Chao, HAN xing-hui, WANG Xu, LIU Gui-ping
(Department of Life Science, Tangshan Teachers College, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: Using leaves of *Phalaenopsis* tissue culture plant as explants, the effects of various factors on protocorn-like-body (PLB) induction, PLB growth and PLB differentiation were studied. We desined six kinds of medium for PLB induction, two kinds of medium for PLB growth and two kinds of medium for PLB differentiation. There are three kinds of metherds in PLB induction. The results showed that the induction rate of the first metherd was the best, the rate was 33.3%; The high concentration of 6-BA was helpful to PLB induction. 1/2MS+6-BA 10 mg/L+10% coconut milk was the suitable medium for PLB induction; 1/2MS+NAA 1 mg/L+6-BA 2 mg/L was ideal medium for PLB growth. Coconut milk promoted PLB induction.

Key words: *Phalaenopsis* hybrid; leaves; rotocorn-like-body; induce; differentiation