

蝴蝶兰组培快繁技术体系研究

王常芸, 李晓亮, 张京伟, 王建玲, 王冬梅

(烟台市农业科学研究院, 山东 烟台 265500)

摘要:以“红天鹅”蝴蝶兰为试材,研究了6-苄氨基嘌呤(6-BA)浓度、取样节位、附加物对花梗腋芽诱导分化及不同外植体诱导原球茎分化的影响,以期建立蝴蝶兰组培快繁技术体系。结果表明:6-BA浓度为3.0 mg/L时,花梗腋芽分化率最高,为96%;取基部2、3节位幼嫩、粗壮的花梗腋芽诱导分化效果最好,分化率可达100%;以土豆替代香蕉、白砂糖替代蔗糖,可大大降低培养基的生产成本;根座和芽座是诱导原球茎分化的最佳外植体,诱导率可达90%以上。该试验筛选出了2条蝴蝶兰高效组培快繁技术体系。

关键词:蝴蝶兰;花梗腋芽;组织培养;快速繁殖;技术体系

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0122-03

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)属兰科蝴蝶兰属植物,又称蝶兰,其人工繁殖技术主要通过种子无菌发芽和组织离体培养等方法进行^[1-2]。蝴蝶兰组织培养的外植体如叶片、茎尖、花梗、根部^[3-5]等均可诱导产生分生组织,但是不同外植体材料间的诱导率存在很大差异^[2-6]。培养基中不同附加物、添加的激素浓度与比例对诱导分化率也有一定影响。该试验拟对花梗腋芽组培快繁关键技术进行研究,以期建立简便、实用、高效的产业化蝴蝶兰繁殖体系,以保持蝴蝶兰原品种的优良种性和生活力,满足花卉市场需求。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“红天鹅”(Doritaenopsis ‘Red Swan’)为烟台市农业科学研究院花卉研究所推广销售较好的蝴蝶兰品种。植株生长健康良好、无病虫害。

1.2 试验方法

试验于2011年2月至2012年8月在山东省烟台市农业科学研究院组培实验室进行。

1.2.1 外植体的选择与消毒 从基部剪取发育1~2个月的幼嫩花梗,消毒方法参见文献^[7]。

1.2.2 培养基与培养条件 基本培养基主要成分为MS培养基,糖源(白糖和蔗糖)20~25 g/L,琼脂10 g/L,50 mL三角瓶分装。培养基采用121.6℃下高压灭菌25 min。培养条件参见文献^[8]。待腋芽长大后,采用250 mL的三角瓶进行继代培养,每1~2个月

继代1次。

1.2.3 不同浓度6-苄氨基嘌呤(6-BA)对花梗腋芽诱导分化的影响 将每个带腋芽的花梗切成3 cm的小段,斜切基部分别把幼嫩带侧芽的花梗按正常生长极性方向插入不同浓度6-BA(0、0.5、1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 mg/L)的MS培养基上,观察分化结果。

1.2.4 不同取样节位对花梗腋芽诱导分化的影响 取幼嫩花梗,从基部由下往上分别标记1~5的花梗节位,接种于3 mg/L的6-BA培养基上,观察比较其分化结果。

1.2.5 不同附加物对花梗腋芽分化的影响 蔗糖、椰汁及香蕉泥是蝴蝶兰组织培养常见的培养基附加物,蔗糖浓度及椰汁对蝴蝶兰类原球茎诱导的影响相关研究已有一些报道^[9-10]。该试验以MS为对照,设置了添加不同附加物的MS培养基处理。培养基中分别添加10%~15%的土豆泥或香蕉泥,添加20~25 g/L的蔗糖或白糖。

1.2.6 不同外植体对诱导原球茎的影响 选择花梗腋芽分化、生长良好的试管苗,不需要再进行消毒处理,分别接种不同组织器官(叶尖、叶中部、叶基部、根尖、根中部、根基部、芽座、根座和试管苗),培养基中6-BA浓度为3 mg/L。

2 结果与分析

2.1 不同浓度6-BA对花梗腋芽诱导分化的影响

由表1可知,6-BA对蝴蝶兰花梗腋芽的萌发具有明显的促进作用,在不加6-BA的MS培养基中,没有芽体分化。在一定浓度范围内,随着6-BA浓度的升高,花梗侧芽分化率逐渐增高,当6-BA为3.0 mg/L时,分化率最高,达到96%。而后随6-BA浓度的增加分化率有

第一作者简介:王常芸(1966-),女,山东龙口人,本科,高级农艺师,现主要从事农业生物技术等研究工作。

收稿日期:2013-04-09

所下降,当 6-BA 为 5.0 mg/L 时,分化率为 88%,且分化出的芽体变矮、变脆、易折断,有一定程度的玻璃化现象出现。随 6-BA 浓度增大,分化率逐渐降低,玻璃化现象逐渐加重。

表 1 不同浓度 6-BA 对花梗腋芽诱导分化的影响

Table 1 Effects of different concentrations of 6-BA on peduncle axillary bud differentiation

6-BA/mg · L ⁻¹	接种数/个	分化数/个	分化率/%
0	50	0	0
0.5	50	17	34
1.0	50	32	64
3.0	50	48	96
5.0	50	44	88
7.0	50	23*	46
10.0	50	16**	32

注: * 表示有玻璃化现象发生, ** 表示玻璃化现象较严重。

Note: * indicates that vitrification slightly, ** stands for vitrification seriously.

2.2 不同取样节位对花梗腋芽诱导分化的影响

由表 2 可以看出,第 1、2、3 节位的腋芽总体分化良好,尤其以第 2、3 节位腋芽分化最好,分化率可达 100%。随着取样位置的升高,腋芽分化率开始降低,第 4 节位腋芽分化率仅为 56%,第 5 节位腋芽只有少量腋芽分化,分化率较低,且分化的部分植株也很快死亡。

表 2 不同取样节位对花梗腋芽分化的影响

Table 2 Effects of sampled internodes on peduncle axillary bud differentiation

花梗节位	接种数 /个	分化数 /个	分化率 /%	芽生长状况
1	50	43	86	生长良好
2	50	50	100	生长健壮
3	50	50	100	生长健壮
4	50	28	56	部分生长健壮,部分生长中死亡
5	50	5	10	大部分生长中死亡,极少部分存活
6	50	0	0	不分化

2.3 不同附加物对花梗腋芽分化的影响

从表 3 可以看出,添加土豆泥或香蕉泥的培养基分化、生长状况均较好,分化率都可达到 90% 以上。以香蕉泥作为附加物的效果比土豆泥培养基稍好些,但差异不显著($P>0.05$)。添加香蕉泥的培养基中,接种后外植体下端及周边培养基有轻微褐化现象,但不影响外植体分化生长,添加土豆泥的培养基少有褐化现象。其产生原因及解决办法有待于进一步研究。添加蔗糖或白

表 3 不同添加物培养基对花梗腋芽分化的影响

Table 3 Effects of medium additives on peduncle axillary bud differentiation

培养基	接种数 /个	分化数 /个	分化芽生长状况	分化率 /%
MS(对照)	50	0	不分化	0
MS+土豆泥+蔗糖	50	46	分化芽生长良好	92.00
MS+土豆泥+白砂糖	50	45	分化芽生长良好	90.00
MS+香蕉泥+蔗糖	50	46	分化芽生长良好	92.00
MS+香蕉泥+白砂糖	50	46	分化芽生长良好	92.00

砂糖的培养基也均生长良好,几乎无明显差异。因此用土豆替代香蕉,用白砂糖替代蔗糖可以大大降低蝴蝶兰规模化增殖的生产成本。

2.4 不同外植体对诱导原球茎的影响

由表 4 可以看出,叶片各部位,包括叶尖、叶中部、叶基部,经过转接后都没有分化,且接种的叶片部位出现颜色变黄变绿的现象;接种根各部位,包括根尖、根中部、根基部,经过 2 次继代培养后,生长较好,但只有 1 个根基部分化出原球茎,分化率很低,只有 3.3%。把试管苗的叶从基部剪去,再把芽部与根部分开,即把带芽部分与带根部分从中间位置横切成上下 2 个部分,但根系要连一起(称为根座),上面带芽部分也要连一起(称为芽座),按极性方向分别接种于培养基上,经过 2~3 次继代转接后,根座和芽座都分别诱导分化出原球茎,诱导分化率都达到 90% 以上,且长势良好。而完整的试管苗继代转接后没有诱导分化出原球茎,只是每株试管苗再分化出 2~3 棵小苗。可见,根座和芽座是诱导原球茎的较好外植体。

表 4 不同外植体对诱导原球茎的影响

Table 4 Effects of different explants on peduncle axillary bud differentiation

外植体	部位	接种数 /个	诱导分化情况	诱导分化率 /%
叶片	叶基部	30	不分化,且叶黄化	0
	叶中部	30	不分化,且叶黄化	0
	叶尖	30	不分化,且叶黄化	0
根	根基部	30	1 个污染,1 个根基部分化出原球茎	3.3
	根中间	30	不分化	0
	根尖	30	不分化	0
芽座		30	1 个污染,27 个诱导分化出原球茎	90.0
根座		30	1 个污染,28 个诱导分化出原球茎	93.3
试管苗		30	2 个污染,没有诱导出原球茎,但有 27 个试管苗各再分化出 2~3 个芽	—

3 结论与讨论

6-BA 在促进蝴蝶兰组织培养过程中起着决定作用^[11]。该试验证实,MS 培养基+3 mg/L 6-BA 最好,对芽体分化的促进作用最明显,腋芽分化率高达 96%,且生长健壮,能有效减少玻璃化现象发生。这一结果与朱懿等^[12]的研究结果基本一致,但与陈勇等^[13]关于蝴蝶兰丛生芽的诱导过程中必须是生长素和细胞分裂素同时存在的结论有所不同。这可能与选择的外植体材料及取材时间差异有关。另外,试验中还发现,6-BA 浓度可以根据需要适当做些调节,低浓度有利于成苗,高浓度利于分化快繁。

花梗腋芽诱导分化是蝴蝶兰组培快繁过程中主要手段,选用基部 2、3 节位幼嫩、粗壮的花梗腋芽进行诱导分化,其分化效果明显好于其它部位成熟、细弱的腋芽。其原因可能是越靠近花梗基部腋芽发育成营养芽的机

率越大,而上部位的花梗腋芽发育成花芽的机率较大。这一结论有悖于王仁睿等^[14]关于幼嫩花梗比开花后的花梗诱导率低,死亡率高的报道。这可能与试验的品种差异有关,但具体原因尚不明确。另外,试验中还观察到幼嫩、粗壮的花梗分化率明显高于成熟、细弱花梗;在继代转接过程中,要及时把花梗底部发黑部分切去,但分化芽不要着急从花梗上切下,要等分化芽长到 1.5~2.0 cm 左右再单独切下芽进行培养。若过早切下,分化芽则会生长变缓慢甚至死亡。具体原因还有待进一步研究。

蝴蝶兰规模化生产中,培养基材料是仅次于厂房、设备等固定成本的第二大生产成本,约占总成本量的 23%~24%^[15-16]。蝴蝶兰组培快繁产业化生产中,用白砂糖替代蔗糖可以在保持良好的生长效果的同时大大降低生产成本。这一研究结果与刘海珊^[17]的研究结果基本一致。用土豆替代香蕉,尤其是北方地区在保持同样生长效果的同时可以降低很大生产成本。这在以往的研究中鲜有报道。

根座和芽座是诱导原球茎的最佳外植体,诱导率可高达 90%以上,这方面的研究亦鲜有报道。叶片各部位很难诱导出原球茎,根部也只有根基部诱导出了原球茎,但机率很低。原球茎在继代转接过程中,表现出一定的群体效应。所以在转接继代时要保证一定的群体密度,否则会影响原球茎的生长速度。

该试验研究探明了花梗腋芽组培快繁的关键技术,筛选出了 2 种蝴蝶兰高效快繁技术体系:1 种是花梗腋芽直接诱导分化出芽,再经过芽生芽进行快繁;另 1 种是由花梗腋芽诱导分化出的芽,再诱导出原球茎,经原球茎增殖快繁。这 2 种体系能够在保持优良种性的同时加快繁殖速度。

参考文献

- [1] 刘真华,葛红,郭绍霞,等. 蝴蝶兰组织培养中的褐化控制研究[J]. 园艺学报,2005,32(4):732-734.
- [2] 魏琪,李凤兰,胡国富,等. 蝴蝶兰快速繁殖研究进展[J]. 园艺学报,2006,33(4):915-920.
- [3] 肖丽红,黄鑫文,陈创国. 蝴蝶兰组织培养与快速繁殖技术研究进展[J]. 广东农业科学,2007(3):39-42.
- [4] 王伟,曾伏虎,张苏锋. 蝴蝶兰的组织培养与快速繁殖[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版),2004,17(3):335-337.
- [5] 李进进,廖俊杰,柯丽婉,等. 蝴蝶兰根段的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2000,36(1):137.
- [6] 陈玲,徐信,李苇洁,等. 蝴蝶兰组织培养技术研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,39(5):2565-2566,2569.
- [7] 杨海燕. 蝴蝶兰组培快繁体系的研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2006.
- [8] 王冬云,汪建亚,蔡衍,等. 蝴蝶兰组培不定芽增殖条件的优化[J]. 华中农业大学学报,2007,26(6):856-858.
- [9] 何松林,王献,鲁琳,等. 培养基和添加物对蝴蝶兰原球茎分化幼苗的影响[J]. 中南林学院学报,2003,23(5):11-13.
- [10] 鲁雪华,郭文杰,徐立晖,等. 蝴蝶兰花梗节间段培养繁殖的初步研究[J]. 园艺学报,2002,29(5):491-492.
- [11] 崔广荣,侯喜林,张子学,等. 蝴蝶兰叶片离体培养胚状体的发生及组织学观察[J]. 园艺学报,2007,34(2):431-436.
- [12] 朱懿,严红. 蝴蝶兰花梗腋芽萌发的研究[J]. 北方园艺,2008(3):197-198.
- [13] 陈勇,林开县,王君晖. 蝴蝶兰的快速繁殖和规模化栽培技术研究[J]. 浙江大学学报(理学版),2004,31(11):84-88.
- [14] 王仁睿,李明福,韩林波,等. 蝴蝶兰组织培养体系的建立及其关键技术研究[J]. 中国农学通报,2010,26(10):197-201.
- [15] 卜朝阳,李炳楠. 蝴蝶兰组培快繁商品化生产经济效益分析[J]. 华中农业大学学报(社会科学版),2007(1):77-81.
- [16] 吴纲,陶文明,储海霞,等. 蝴蝶兰组织培养工厂化育苗的成本预算[J]. 江苏林业科技,2009,36(1):36-39.
- [17] 刘海珊. 蝴蝶兰组培苗生产成本研究[D]. 北京:北京林业大学,2008.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation System of *Phalaenopsis*

WANG Chang-yun, LI Xiao-liang, ZHANG Jing-wei, WANG Jian-ling, WANG Dong-mei
(Yantai Agricultural Science and Technology Institute, Yantai, Shandong 265500)

Abstract: Taking *Doraienopsis* 'Red Swan' as material, in order to establish the tissue culture technique system of *Phalaenopsis*, the effect of 6-BA concentration, samples internodes, medium additives on peduncle axillary bud differentiation were studied, and the influence of different explants on peduncle axillary bud differentiation was also studied. The results indicated that the differentiation rate of peduncle axillary bud was up to 96% when the 6-BA concentration was 3.0 mg/L; the young but strong axillary bud, second or third internodes from the base of peduncle was the suitable explants to induction, the differentiation rate could reach 100%; replaced banana and sucrose by potato and white granulated sugar was an ideal method to reduce medium cost; generally levels of hormones were the highest in the base of root and bud stem, the rate of adventitious bud induction reached to 90%. Following that, two effective rapid propagation technique systems were found by series experiments.

Key words: *Phalaenopsis*; peduncle axillary bud; tissue culture; rapid propagation; technique system