

# 文心兰的组织培养及生理特性的初步研究

曹云英, 侯海涛, 刘宇杰, 周蓉, 赵华

(南通大学 生命科学院, 江苏 南通 226019)

**摘要:**以文心兰试管组织为材料,对适合原球茎、芽苗增殖、壮苗生根的培养基及其生长过程中部分生理生化指标进行了初步研究。结果表明:原球茎最佳增殖培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA+1.0 g/L 活性炭,不定芽最佳增殖培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 g/L 活性炭,壮苗最佳培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D+1.0 g/L 活性炭,最佳生根培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L NAA+1.0 g/L 水解酪蛋白。生理测定结果表明,同一种材料由于转接前的培养基不同或不同的继代次数其超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性存在差异,分化苗转接前 NAA 为 0.1 mg/L 的 SOD 和 POD 活性高于 NAA 为 0.5 mg/L,继代次数增加后,其活性会增强,原球茎转接前 6-BA 为 0.5 mg/L 的活性比 2.0 mg/L 的活性高,同工酶谱也证明了这一点。表明原球茎增殖 6-BA 2.0 mg/L 好于 0.5 mg/L,分化苗的增殖 NAA 0.5 mg/L 好于 0.1 mg/L。

**关键词:**文心兰;组织培养;保护酶活性;同工酶分析

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)21-0114-05

文心兰是兰科文心兰属的总称,原产于中南美洲和北美洲南部,因其花形奇特,花姿秀美,形似舞女,又称舞女兰<sup>[1]</sup>。它的花小而繁多,形态多变,花期因品种而异,花朵可持续 1~3 个月,是上等的切花材料,也可以作为盆栽植物供人们观赏<sup>[2]</sup>。按照传统的繁殖方式进行分株,一株文心兰 1 年仅繁殖 2~3 个芽,繁殖系数很低<sup>[3]</sup>,不能满足消费者的需要。组织培养技术的应用,可以加快繁殖速度。关于文心兰的组织培养已有报道<sup>[4-8]</sup>,但它们均以离体的外植体或以试管苗的叶片为材料,而以原球茎或试管芽为材料来研究其继代、扩增、壮苗及生根方面的较少。

有研究表明组培苗在多次继代后能保持遗传上的稳定性<sup>[9]</sup>,但多次继代后无性系会发生变异<sup>[10]</sup>,但其机理尚不清楚,因此该研究通过对文心兰原球茎增殖及芽、苗增殖的研究,探讨不同类型的培养基对原球茎的增殖及分化成苗的效果及影响,同时测定了组培苗生理生化方面的指标,旨在明确组培苗在继代过程中由于培养基成分的变化或继代次数增加而导致的生理生化方

面变化的原因,为文心兰脱毒、快繁提供参考基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为文心兰的试管芽、原球茎,由南通蔬菜研究所提供。基本培养基采用 MS 或 1/2MS,附加 3% 蔗糖和 0.65% 琼脂。

### 1.2 试验方法

1.2.1 添加不同物质对文心兰组织培养的影响 继代培养:原球茎为 6-BA(1.0、2.0、3.0 mg/L)+NAA(0.1、0.3、0.5 mg/L)+活性炭(0、0.5、1.0 g/L)(表 1),不定芽为 6-BA(2.0、3.0、4.0 mg/L)+NAA(0.1、0.3、0.5 mg/L)+活性炭(0.1、0.3、0.5 g/L)(表 2),60 d 观察生长情况;增殖培养:原球茎为 6-BA(0.2、0.5、1.0 mg/L)+2,4-D(0、0.5 g/L)+NAA(0、0.4 mg/L)(表 3),不定芽为 6-BA(1.0、2.0 mg/L)+0.5 g/L 2,4-D(表 4),20 d 观察增殖情况;每瓶接种 3 个材料,每处理 10 瓶,2 次重复。121℃(1.1 kg·L<sup>-1</sup>·cm<sup>-2</sup>)压力下灭菌 15 min,pH 5.8。壮苗培养:6-BA(1.0、0.5 mg/L)+2,4-D(1.0、0.5 mg/L),共 4 个配方。生根培养:MS+4.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA、1/2MS+0.5 mg/L NAA+1.0 g/L 水解酪蛋白和 1/2MS+1.0 mg/L NAA+1.0 g/L 水解酪蛋白(表 5),15 d 和 30 d 分别观察生根情况。培养室温度保持在(25±2)℃,光照时数 12 h/d,光照强度 1 500~2 500 lx。

1.2.2 文心兰保护酶活性测定 称取 2 号增殖原球茎

**第一作者简介:**曹云英(1970-),女,博士,副教授,现主要从事植物生理等研究工作。E-mail:cyu@ntu.edu.cn。

**基金项目:**江苏省高校自然科学研究面上资助项目(13KJB210005);南通市科技局农业科技创新与产业化资助项目(HL2012028);南通大学前期预研资助项目(11ZY011);南通大学博士启动基金资助项目(12B006)。

**收稿日期:**2014-05-19

[Y1(转接前为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, 转接后为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D 的培养基), Y2(转接前为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, 转接后为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D 的培养基)]及 2 号苗扩增的组培材料[M1(转接前为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 培养基接种到 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D)及 M2(转接前为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 培养基接种到 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D)]及 M1 继代之前的材料 M 0.5 g, 加入少量 0.05 mol/L (pH 7.8) 磷酸钠缓冲液, 再加入为 0.05 g 的聚乙烯吡咯烷酮, 于冰上研磨成匀浆, 定容到 5 mL, 于 13 000 r/min 冷冻离心 20 min, 上清液即为粗酶液。过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法测定<sup>[11]</sup>。以 1 min OD 增加 0.01 单位定义为 1 个活力单位变化值, 即  $U \cdot \min^{-1} \cdot g^{-1}$  (以鲜质量计)表示酶活性大小。超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑(NBT)比色法<sup>[12]</sup>测定。以 50%抑制率的酶液量( $\mu$ L)作为一个酶活力单位(U), 即  $U \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$  (以鲜质量计)表示酶活性大小。

1.2.3 文心兰同工酶分析 POD 和 SOD 同工酶分析: 取 0.1 mL 粗酶液中于指形试管中, 加入 0.1 mL 40%的蔗糖溶液, 充分振荡混匀, 供同工酶分析。采用聚丙烯酰胺垂直电泳, 浓缩胶为 2.5%, 分离胶 SOD 为 10%, POD 为 7.5%, 每孔点样 40  $\mu$ L。每孔电泳的电流强度在浓缩胶中为 1 mA, 在分离胶中为 2 mA。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸, 在 4℃条件下电泳。电泳后 SOD 采用氮蓝四唑染色法<sup>[13]</sup>, POD 采用醋酸联苯胺染色法<sup>[14]</sup>进行染色。

## 2 结果与分析

### 2.1 文心兰的组织培养

2.1.1 不同植物激素配比及添加活性炭对文心兰原球茎或不定芽继代的影响 从表 1 和表 2 可以看出, 不同配方对不定芽及原球茎的生长有差异, 60 d 统计分析, 每块原球茎上增殖了 2.1~4.2 块原球茎, 分化了 1.6~

表 1 植物激素配比及添加活性炭对文心兰原球茎继代的影响

Table 1 Effect of the ratio of plant hormones and adding activate carbon on *Oncidium* protocorm subculture

培养基配方						
培养基		Culture medium formula			增殖数	分化苗数
Culture medium		6-BA	NAA	活性炭	Proliferation number/块	Differentiation seedlings number/个
	MS	/(mg·L <sup>-1</sup> )	/(mg·L <sup>-1</sup> )	Activate carbon /(g·L <sup>-1</sup> )		
1		1.0	0.2	1.0	4.1±0.12	3.0±0.28
2	1/2	2.0	0.3	0	3.1±0.65	2.2±0.83
3	MS	3.0	0.1	0.5	2.2±0.74	5.7±0.89
4		1.0	0.3	0.5	2.1±0.15	1.6±0.60
5	MS	2.0	0.1	1.0	4.2±0.19	1.6±0.39
6		3.0	0.2	0	4.2±0.43	2.0±0.38

表 2 植物激素配比及添加活性炭对文心兰不定芽继代的影响

Table 2 Effect of the ratio of plant hormones and adding activated carbon on *Oncidium* adventitious bud subculture

培养基		培养基配方			增殖芽苗数
Culture medium	MS	6-BA	NAA	活性炭 Activate	Proliferation bud seedling number
		/(mg·L <sup>-1</sup> )	/(mg·L <sup>-1</sup> )	carbon/(g·L <sup>-1</sup> )	/个
1		2.0	0.3	0.5	2.06±0.24
2	1/2	3.0	0.5	0.1	1.69±0.23
3	MS	4.0	0.1	0.3	1.88±0.35
4		2.0	0.5	0.3	2.26±0.30
5	MS	3.0	0.1	0.5	4.08±0.62
6		4.0	0.3	0.1	2.48±0.36

5.7 个苗; 每个不定芽增殖了 1.69~4.08 个芽苗。与 1/2MS 相比, MS 培养基对芽苗及原球茎的生长更有利, 增殖数更高。不定芽的继代培养中 5 号培养基生长得最好, 增殖苗数最多; 原球茎形成率最高的是 6 号培养基(图 1)。另外还发现原球茎在继代的过程中均有苗的分化现象产生, 某些激素组合(如 2 号培养基)使原球茎出现玻璃化现象(图 2)。



图 1 文心兰原球茎形成

Fig. 1 Formation of *Oncidium* protocorm

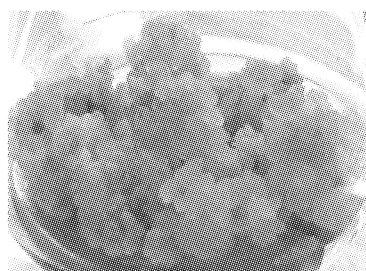


图 2 文心兰继代中的玻璃化

Fig. 2 Vitrification of *Oncidium* subculture

2.1.2 植物激素组合对文心兰原球茎或不定芽增殖的影响 由表 3 可知, 20 d 后不同浓度的 6-BA 对原球茎的增殖数均有一定的影响, 但相差不显著。其中 4 号培养基表现最好, 增殖数最高, 产生较多的原球茎。从表 4 可以看出, 6-BA 在 1.0~2.0 mg/L 范围内与 0.5 mg/L 2,4-D 配合时适合于文心兰的扩增, 2 个处理差异显著, 2 号培养基更有利于芽增殖, 苗粗壮, 叶色浓绿。故添加 6-BA 2.0 mg/L 对芽的增殖效果好。

表3 植物激素对文心兰原球茎增殖的影响

Table 3 Effect of plant hormones on *Oncidium* protocorm proliferation

培养基 Culture medium	培养基配方 6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	Culture medium formula 2,4-D /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	原球茎增殖数 Protocorm proliferation number/块
1	1.0	0.5	—	2.11±0.85
2	0.5	0.5	—	2.06±0.80
3	0.2	0.5	—	2.14±0.74
4	1.0	—	0.4	2.17±0.70

表4 不同外源激素组合对文心兰苗扩增的影响

Table 4 Effect of different exogenous hormone combination on *Oncidium* seedlings amplification

培养基 Culture medium	培养基配方 6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	Culture medium formula 2,4-D /(mg·L <sup>-1</sup> )	分化的苗数 Differentiation seedlings number/个
1	1.0	0.5	4.16±0.70
2	2.0	0.5	4.55±0.42

2.1.3 壮苗生根 在分化培养基上分化的芽苗一般生长纤细,需进一步壮苗生根。试验结果表明,几种培养基均可达到壮苗的目的,但激素组合 0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D 效果更好(图3)。经过壮苗处理的试管苗转接到生根培养基上,由表5可知,15 d后观察部分试管苗已经生根,根短粗,色白。30 d后统计生根条数,发现2号培养基对分化苗生根效果较好,根短粗且平均生根数较多(图4),有利于试管苗移栽成活。



图3 文心兰壮苗培养

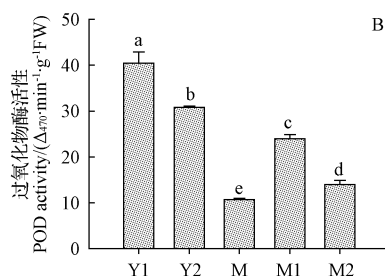
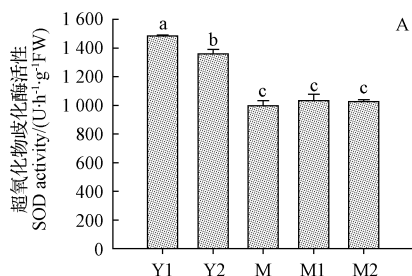
Fig. 3 *Oncidium* strong seedlings culture

图5 不同激素配比或继代次数对组织培养材料 SOD 和 POD 活性的影响

Fig. 5 Effect of different ratio hormone or subculture frequency on SOD and POD activities of tissue culture materials

2.2.2 保护酶同工酶的电泳分析 从图6可以看出,不同激素配比的培养基或继代次数对文心兰的 SOD 同工酶谱影响较大,试管苗与原球茎的 SOD 酶谱带数有明

显变化,原球茎有2条明显的主带(B、C),还有1条带隐约可见(A),Y1的2条主带比Y2稍亮;而试管苗3材料差异明显,继代M1材料有5条带,比原球茎多了D带



图4 文心兰生根苗

Fig. 4 *Oncidium* rooted plantlets

表5 不同外源激素组合对文心兰生根的影响

Table 5 Effect of different exogenous hormone combination on *Oncidium*

培养基 Culture medium	培养基配方 MS	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	水解酪蛋白 Casein hydrolysate/(g·L <sup>-1</sup> )	生根数 Root number /条
1	MS	4.0	0.5	—	2.34±0.45
2	1/2MS	—	0.5	1.0	2.63±0.57
3	1/2MS	—	1.0	1.0	2.52±0.67

2.2 文心兰原球茎及芽苗的保护酶活性及同工酶分析

2.2.1 不同激素对比对 SOD 和 POD 活性的影响 由图5A可以看出,同一材料由于转接前的培养基不同或不同的继代次数其 SOD 活性在原球茎和芽苗间存在差异。原球茎 Y1 的 SOD 活性显著高于 Y2,约提高了 9.35%;而试管芽苗未继代 M 及继代后的材料 M1 及 M2 的 SOD 活性差异不显著。原球茎各处理的 SOD 活性高于试管苗。从图5B可知,各处理的 POD 活性的变化趋势与 SOD 活性一致。总体上原球茎各处理的 POD 活性明显高于试管苗,各处理间差异显著。试管苗间比较,试管芽苗继代 M1 的 POD 活性最高,未继代 M 活性最低,继代 M2 活性居中,M1 比 M2 高了 71.7%;原球茎间2个处理 POD 活性比较,Y1 的活性明显高于 Y2,约高了 23.9%,表明经过多次继代后,不同培养基组成对植物生长造成不同的生态环境,导致试管材料的保护酶活性不同。



和 E 带,未继代 M 和继代 M2 均有 3 条带(A、B、C),亮度是 M1 最亮,其次是 M2, M 最暗,说明原球茎中同工酶活性 M1 最强, M 活性更弱。原球茎同工酶活性与 M 表现相似。不同激素配比的培养基或继代次数对文心兰的 POD 同工酶谱也有明显的影响。试管苗(M、M1、M2)同工酶均有 6 条谱带, M1 的 A、B、C 3 带明显比 M、M2 的谱带亮且条带更宽。原球茎 Y1 与 Y2 均有 7 条带, Y1 的谱带颜色较深, 谱带较宽。谱带颜色的深浅宽窄与酶活性表达的强弱有关。POD 同工酶分析的结果与酶活性变化趋势相一致。

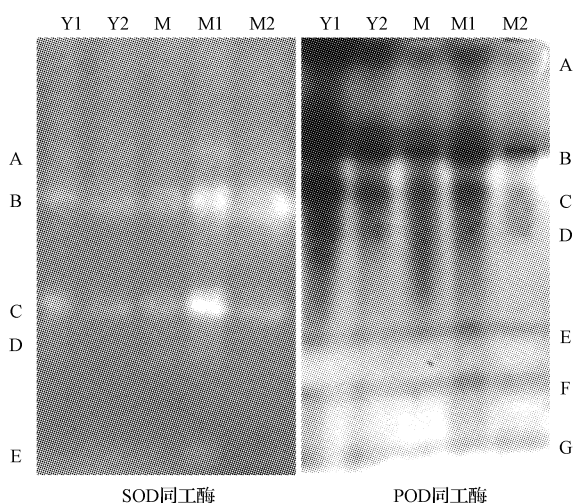


图 6 不同激素配比或继代次数对组织培养材料的 SOD 和 POD 酶谱的影响

Fig. 6 Effect of different ratio hormone or subculture frequency on SOD and POD zymogram of tissue culture materials

### 3 结论与讨论

在植物组织培养中,继代是获得更多组培材料的一种常见的方法。继代培养基包括基本培养基和外源植物生长调节物质两大类,有时也加入其它物质如活性炭、抗氧化物质等。该研究表明 MS 作为基本培养基,添加生长素类萘乙酸和细胞生长素类 6-BA,同时添加适当浓度的活性炭,发现文心兰试管原球茎继代过程中既有原球茎的大量扩增,也有分化苗的产生,而试管芽苗在继代过程中仅出现了更多的试管苗。为了使试管原球茎增殖过程中仅产生原球茎,选择了 MS 作为基本培养基,比较了生长素类萘乙酸和 2,4-D 的效果,发现二者变化不明显。在试管苗增殖过程中把萘乙酸改成为 2,4-D,增殖效果明显提高。此外,通过原球茎扩增及其分化或试管苗的扩增都可以获得大量的试管苗,再通过壮苗培养、根的诱导,练苗就可以移栽到室外,为文心兰的室外栽培提供大量的材料。该试验结果表明原球茎增殖适宜的配方为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA+

1.0 g/L 活性炭。芽苗增殖的适宜配方 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 g/L 活性炭,壮苗的适宜培养基 MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D+1.0 g/L 活性炭,生根的适宜培养基 1/2MS+0.5 mg/L NAA+1.0 g/L 水解酪蛋白。

有研究表明,SOD 和 POD 作为植物细胞内的保护性酶,不仅与植物抵抗植物抵御不良环境条件有关,而且也与环境某些营养元素胁迫有关<sup>[15]</sup>。在该试验文心兰原球茎及芽苗的组织培养中,发现继代次数增加或不同的培养基配方其生长状况不尽相同,通过对上述组织培养材料的保护酶 SOD 和 POD 活性及其同工酶分析,发现原球茎材料的 SOD 和 POD 活性变化一致,POD 同工酶表达结果与其活性一致,而 2 种材料的 SOD 同工酶表达差异不明显;试管苗 SOD 活性 3 个材料差异不大,但其同工酶表达差异明显;而 POD 活性变化差异明显,同工酶表达基本一致。也就是说不管是原球茎还是试管苗,或者继代次数不同,它们的 POD 和 SOD 活性或同工酶表达有所不同,而它们在组织培养的过程中,由于它们的培养基不同或继代次数的不同,意味着培养环境的改变,植物为了适应这个环境,体内的保护酶 SOD 和 POD 活性或同工酶表达会发生相应的变化。

### 参考文献

- [1] 段左俊,白旭华. 文心兰的研究现状[J]. 热带林业,2006,34(1):24-26.
- [2] 郭志刚,五井正宪. 嘉兰茎尖培养与块茎形成的研究[J]. 园艺学报,1998,25(2):179-183.
- [3] 曹夜义,刘国民. 实用植物组织培养技术[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1996:154-155.
- [4] 黄丽云,范海阔,周焕起,等. 碳源浓度对文心兰组培生长的影响研究[J]. 江西农业学报,2010,22(3):64-66.
- [5] 刘晓荣,王碧青,朱根发. 文心兰研究进展[J]. 亚热带植物科学,2007,36(3):85-90.
- [6] 陈心怡. 文心兰的组织培养[J]. 植物生理学通讯,1989(6):49.
- [7] 崔广荣. 文心兰组织培养及转基因研究进展[J]. 草业学报,2010,19(4):220-229.
- [8] 陈晓旋,李洪波,叶春海,等. 文心兰类原球茎的诱导与增殖技术的优化[J]. 热带作物学报,2010,31(9):1464-1468.
- [9] 高丽,杨波,李洪林. 叶艺春兰组培苗遗传稳定性的 ISSR 研究[J]. 亚热带植物科学,2007,36(2):13-14.
- [10] 刘玲梅,汤浩茹,刘娟. 试管苗长期继代培养中的形态发生能力与遗传稳定性[J]. 生物技术通报,2008(5):22-27.
- [11] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,1990:154-155.
- [12] 曹云英,赵华. 高温胁迫下油菜素内酯对水稻幼苗的保护作用[J]. 中国水稻科学,2007,21(5):525-529.
- [13] 罗广华,王爱国. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性显示[J]. 植物生理学通讯,1983(6):44-45.
- [14] 王海廷,黄永芬,汪清胤. 番茄不同生育期和不同部位过氧化物同工酶分析[J]. 园艺学报,1981,8(4):29-35.
- [15] 刘鹏,杨玉爱. 铜、硼对大豆叶片膜脂过氧化及体内保护系统的影响[J]. 植物学报,2000,42(5):461-466.

# 甜瓜 PMR5 抗白粉病基因的遗传定位

王贤磊, 宁雪飞, 高兴旺, 谢丽琼, 李冠

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘要:**以甜瓜白粉病抗性品种 PMR5, 感白粉病甜瓜伽师及杂交  $F_1$  以及  $BC_1$ 、 $BC_2$  分离群体为试材, 接种白粉菌生理小种 1, 采用抗病遗传分析, 并利用 BSA(Bulked Segregation Analysis) 结合 SSR(Simple Sequence Repeat) 分子标记方法, 研究抗白粉病基因的遗传规律获得与其连锁的分子标记, 利用获得的分子标记对抗白粉病基因进行遗传定位。结果表明:  $BC_1$  中抗病与感病分离比为 64:27,  $BC_2$  中分离比为 37:27, 推测 PMR5 在  $BC_1$  中表现 2 个显性基因, 在  $BC_2$  中表现单显性基因遗传模式。用  $BC_2$  对抗病基因进行遗传定位发现, 一共有 11 个位于 LGII 的 SSR 分子标记与抗白粉病基因连锁, 抗病基因位于标记 CMGA36 和 SSR25208 之间约 104 113 bp。

**关键词:**甜瓜; 白粉病; 基因; BSA; SSR

**中图分类号:**Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)21-0118-05

甜瓜(*Cucumis melo* L.) 是一种经济价值高的经济作物, 在世界各地广泛种植。新疆甜瓜以其独特的风味享誉世界, 深受人们喜爱。其中伽师瓜栽培历史悠久,

果型大, 果肉肉厚且质细, 香甜清脆、糖分含量高, 含有丰富的营养物质。然而伽师瓜易感白粉病, 这对其生产量造成了严重的影响。近几年我国在甜瓜种植季节雨水增多, 加之设施栽培日益推广, 加剧了白粉病的传播。

甜瓜白粉病是一种广泛发生于甜瓜产区的真菌病害, 在世界各主要栽植区都有报道<sup>[1]</sup>。西班牙、以色列、美国、法国等种植甜瓜的国家, 白粉病早已成为甜瓜商

**第一作者简介:**王贤磊(1981-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为植物分子遗传。E-mail: wangxianlei2000@163.com.

**基金项目:**新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2012211B03)。

**收稿日期:**2014-06-10

## Primary Study on Tissue Culture and Physiology Character of *Oncidium*

CAO Yun-ying, HOU Hai-tao, LIU Yu-jie, ZHOU Rong, ZHAO Hua

(College of Life Science, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019)

**Abstract:** Taking *Oncidium* test-tube tissue as materials, the culture medium which was suitable for protocorm; bud seedling proliferation, making seedlings stronger and promoting the root growth of seedlings were screened; some physiological and biochemical indexes of growth process of plantlet regeneration and rooting were also monitored. The results showed that suitable proliferation culture medium for protocorm-like bodies (PLBs) was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA+1.0 g/L activated-charcoal, MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 g/L activated-carbon was suitable for adventitious bud multiplication. MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D+1.0 g/L activated-carbon was better for raising strong plants. 1/2 MS+0.5 mg/L NAA+1.0 g/L casein hydrolysate was optimal for producing root. For the same sample, the activity and isozymes of superoxide dismutase and peroxidase because of different culture medium before transferring or the subculture time. SOD and POD activities of the differentiated seedlings sample which transferred from medium containing 0.1 mg/L NAA were higher than those transferred from 0.5 mg/L NAA. With the subculture times increased, its activities enhanced, the activity of sample from medium containing 0.5 mg/L 6-BA was higher than that from 2.0 mg/L 6-BA before transferring for PLBs, isozyme spectrum also proved this point. It suggested that medium containing 2.0 mg/L 6-BA were better than that containing 0.5 mg/L for PLBs proliferation, medium containing 0.5 mg/L NAA were better than that containing 0.1 mg/L for shoot multiplication.

**Keywords:** *Oncidium*; tissue culture; protective enzyme activity; isozyme analysis