

蝴蝶兰种子无菌播种诱导增殖原球茎试验研究

余慧琳¹, 胡月华¹, 朱一仪²

(1. 商丘职业技术学院 河南 商丘 476000; 2. 商丘鑫财花卉公司 河南 商丘 476000)

摘要: 利用不同激素浓度及添加物对蝴蝶兰未成熟胚有效原球茎进行诱导研究。结果表明: 进行无菌播种采收未开裂的果荚比已开裂的要有利的多, 采摘最佳时间为授粉后 120 d; 原球茎增殖效果最佳的激素组合是 BA 3.0+NAA 0.2; 200 mL/L 椰乳对蝴蝶兰 PLB 增殖的影响效果最好, 其次为香蕉和马铃薯。

关键词: 蝴蝶兰; 种子; 激素; 原球茎

中图分类号: S 682.31; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)04-0188-03

蝴蝶兰又称蝶兰, 为兰科蝴蝶兰属花卉, 因其花形酷似蝴蝶, 花色丰富艳丽, 花期持久, 花形独特, 气质高雅, 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。素有“洋兰皇后”之美誉。蝴蝶兰是单茎性气生根植物, 植株上极少发育侧枝。其种子非常细小, 不含有为种子萌发提供营养的胚乳或其他组织, 胚发育不完全, 在自然条件下很难萌发。传统的繁殖方式为分株繁殖, 繁殖系数低、速度慢, 年繁殖系数仅为 1~3, 无法大量生产, 远远不能满足消费者的需求。利用蝴蝶兰种子进行无菌播种, 诱导原球茎, 进行原球茎快速增殖, 是工厂化生产蝴蝶兰实生苗的一条重要途径^[1]。

利用组培技术对蝴蝶兰胚、花梗、幼叶、茎尖和种子为外植体进行组培研究已有文献报道^[2-5], 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, 而对其种子组培适宜外植体的采收期及激素浓度及添加物对蝴蝶兰未成熟胚有效原球茎的诱导效果的研究未见报道, 该试验尝试对这几个方面进行研究, 为工厂化生产蝴蝶兰寻找相关数据。

1 材料

试验可于秋、冬季进行, 选取商丘鑫财花卉公司选出的品质优良的开花蝴蝶兰植株进行杂交, 组合为: 蝴蝶兰盆花台湾 51 号(花瓣粉红色, 上有深紫红色条纹)。

2 试验方法

2.1 取果荚

蝴蝶兰的果实是蒴果, 长条状, 长约 10~20 cm, 内含种子上万甚至百万粒, 呈粉状。但果实成熟后, 种子保持发芽力的时间很短, 因此采集的果实必须是刚成熟

但未开裂的。

2.2 外植体消毒

果荚在无菌播种前应做如下处理: 取完整未开裂果荚, 用流水冲洗 30 min 后, 用软毛刷刷洗果荚外皮, 确保果实表面的杂物已经冲洗干净, 然后在超净工作台上用 70% 酒精消毒 1 min, 0.1% 升汞消毒 10~11 min, 再用无菌水冲洗 4~5 次后放入培养皿备用。

2.3 无菌播种

在超净工作台上, 用无菌手术刀将果荚前后端各切下 1 cm, 中间段纵切, 用镊子将内部肉眼几乎看不见的种子刮下放入加有无菌水的培养皿中, 使种子散到水中, 然后用专门的移液器将浮在无菌水表面的种子和水一起吸取, 铺入种子萌发培养基上, 晃匀即可。

2.4 统计方法

PLB 增殖量以每个接种物经 2 个月培养后所产生形成的 PLB 团数量计算。即平均增殖量=(新增 PLB 团个数-接种 PLB 团个数)/接种 PLB 团个数, 增殖倍率=培养 60 d 后平均 PLB 团个数/继代接种当天 PLB 个数。

3 结果与分析

3.1 种子不同采收期对蝴蝶兰种子萌发及原球茎形成的影响

选取结荚 A=100 d, B=120 d, C=140 d, D=180 d 的果荚, 播种结束后将其放入培养室首先进行黑暗培养, 4 个品种中 B、C 首先出现变化, 7 d 后种子开始膨大, 12 d 后多数种子微泛淡黄色, 20 d 后种子萌动, 可见部分种子由淡黄色转绿, 黄绿色的球状芽点出现, 此时开灯补充光照继续培养, 温度保持在 25~27℃, 光照强度为 2 000~3 000 lx, 每天光照 10~14 h, 原球体体积慢慢增大, 颜色转为绿色, 70 d 左右可形成大量的原球茎^[6]。A 和 D 种子的萌发时间最长, 萌发后先形成微泛淡黄色原球茎, 再发育成绿色原球茎, 形成大量原球茎的时间

第一作者简介: 余慧琳(1966-), 女, 硕士, 副教授, 现从事植物组织培养教学研究工作。E-mail: huiliny@163.com。

收稿日期: 2008-12-20

均在 100 d 左右, 比 B、C 所用时间明显要长, 且从原球茎形态观察无大差别, 因此, 从提高生产效益角度看, 蝴蝶兰播种最好是取生长 120 d 的蒴果⁷。

3.2 不同培养基对蝴蝶兰种子萌发及原球茎诱导影响

分别以 1/4MS、1/2MS、MS 和改良 KC 为培养基, 只加入 2%香蕉汁, 不加任何激素情况下, 按上述方法将种子无菌播种后, 进行观察比较其萌发状况, 无菌播种 1 周后, 1/2MS 培养基上种子由金黄色转为淡黄色, 即发芽开始。这是由于胚吸水膨胀, 撑破种皮形成淡黄色胚的结果。接着发芽的种子由淡黄色逐渐转绿, 上部有尖状突起, 下部有白色吸收毛出现。至播种 1 月后形成原球体, 尖状突起慢慢变成叶⁸。改良 KC 和 MS 培养基上的种子发生变化是在播种 10 d 以后, 胚慢慢膨大, 突破种皮, 呈淡绿色, 慢慢转成绿色, 1/4MS 培养基上的种子发生变化是在 2 周以后, 原球茎呈绿色, 可以用肉眼明显看到。

表 1 不同培养基对蝴蝶兰种子萌发的影响

基本培养基	启动萌发时间	30 d 表现情况	萌发率
1/4MS	14 d 以后发生变化	原球茎呈绿色	10%~20%
1/2MS	7 d 种子由金黄色转为淡黄色	形成原球体 尖状突起慢慢变成叶	20%~30%
MS	播种 10 d 以后	呈淡绿色 慢慢转成绿色	20%~30%
改良 KC	播种 10 d 以后	呈淡绿色 慢慢转成绿色	20%~30%

由表 1 可见, 蝴蝶兰种子在 MS、1/4MS、1/2MS、改良 KC 几种基础培养基中, 均能发芽。但发芽速度和发芽率明显有差异。蝴蝶兰种子在 1/2MS、MS、改良 KC 3 种基本培养基中的萌发率较佳为 20%~30%, 在 1/4MS 培养基中的萌发率为 10%~20%。这可能与培养基所含有的植物生长发育必需矿质元素量的多少有关。

3.3 不同添加剂对蝴蝶兰种子萌发及原球茎诱导影响

以 1/2MS 为基本培养基上加入不同的有机添加物, 观察其对种子萌发及原球茎增殖的影响, 从已诱导原球茎的培养瓶中选取原球茎团做为外植体, 体积 4 mm 见方⁹, 在无菌条件下, 转接到 1/2MS 基本培养基添加不同有机添加物的 280 mL 培养瓶中, 每瓶接 5 个外植体, 每处理重复 3 次。由表 2 可见, 天然物质椰乳、香蕉汁、苹果汁和活性炭对原球茎增殖具有促进作用。有添加物的增殖效果好于无添加物的, 其中添加椰乳、香蕉汁和马铃薯处理与无添加物处理差异达显著水平。不同添加物的增殖效果以椰乳最佳, 培养基中原球茎增殖量最多, 同时增殖的原球茎大而健壮, 而且生长速度很快, 香蕉汁次之, 增殖的原球体颗粒大, 壮实, 整齐度较好, 马铃薯汁和苹果稍差。

3.4 不同激素对蝴蝶兰种子萌发和原球茎增殖的影响

在 1/2MS+200 mL/L 椰乳+0.2%活性炭的基本培养基中附加不同浓度的 BA 和 NAA 激素组合。BA

的浓度分别为 1.0、2.0、3.0 mg/L, NAA 的浓度分别为 0.1、0.2、0.3 mg/L, 增加一组不添加激素对照组, 组成 10 组培养基, 进行培养观察统计结果。

表 2 有机添加物对蝴蝶兰原球茎增殖的影响

有机添加物	接种原球茎数	新增原球茎数	平均增殖量	平均增殖倍率/%
椰乳	15	94	5.50	6.3
香蕉	15	57	3.24	3.8
苹果	15	43	1.85	2.87
马铃薯	15	47	1.96	3.13
对照	15	49	2.11	3.27

60 d 后 10 个组的萌发率都在 60%以上, 其中 1/2MS+BA 3 mg/L+NAA 0.1 mg/L 组的最高, 播种后 60 d 达 100%, 种子首先变绿, 膨大, 出现外观瘤状愈伤组织, 直径约 1 mm, 表面球状物不明显, 在增殖过程中可见表面突起一个个圆球, 部分表面细胞分化出根毛状物。

经 30 d 培养后, 接入的 PLB 状体周围形成成团的第 2 代 PLB, 培养物直径变大。继续培养至 60 d 后观察, 每个处理的培养物都明显增大。其中以 BA 3.0+NAA 0.2 的效果为最好。平均增殖量为 5.40 平均增殖倍率为 6.4。其余浓度组合包括不加激素的处理, PLB 都有不同程度的增殖, 在不使用激素的处理中, PLB 也有增殖, 但速度缓慢, 并在培养过程中开始分化成具有根、叶的完整植株¹⁰。

表 3 植物激素对蝴蝶兰原球茎增殖的影响

激素用量		接种原球茎数	新增原球茎数	平均增殖量	平均增殖倍率/%
BA	NAA				
0	0	15	37	1.30	2.47
1.0	0.1	15	51	2.47	3.47
1.0	0.2	15	61	3.06	4.07
1.0	0.3	15	49	2.52	3.27
2.0	0.1	15	53	2.91	3.53
2.0	0.2	15	60	3.02	4.00
2.0	0.3	15	59	2.91	3.93
3.0	0.1	15	77	4.11	5.13
3.0	0.2	15	92	5.13	6.13
3.0	0.3	15	65	3.43	4.06

由表 3 可见, 原球茎的诱导不仅取决于 BA 和 NAA 的绝对数量, 而且取决于二者的相对比例。该研究中在 BA/NAA 比值最大的条件下, 诱导率处于最低状态, 在 BA/NAA 比值最小条件下, 诱导率也接近于最低。当 BA/NAA 比值接近于 10:1 时诱导率较大。综合分析认为, 在试验设计的范围内, 当取得 2.0BA:0.2NAA 配比时效果较佳。

4 讨论与小结

由种子无菌发芽而来的实生苗个体间存在着差异, 在杂交育种上尤为突出。但可借助此法筛选品相不同的特色蝴蝶兰苗。

4.1 采收时期

蝴蝶兰种子培养应选用未开裂的蒴果。当蒴果饱满、果皮绿中泛黄时即可采收播种, 一般气温越高, 蒴果开裂的时间越提前。进行无菌播种采收未开裂的果荚比已开裂的要有利的多, 从试验结果看, 采摘最佳时间为授粉后 120 d, 一方面便于整体消毒, 简化灭菌程序, 另外可缩短授粉至播种的时间, 加快育成进程。但是北方温室大棚中的温度与光照对果荚生长时间长短的影响仍然没有具体的数据支撑, 还有待于进一步研究。

4.2 不同激素

虽然是播种繁殖, 而非离体培养繁殖, 但仍需一定水平的激素才能保持小苗优势生长。与其他大多植物一样, 激素种类和浓度的选择使用, 常常是影响组织培养结果和效率的关键因子, 试验表明, 原球茎增殖效果最佳的激素组合是 BA 3.0 + NAA 0.2, 对诱导细胞分裂、原球茎组织分生达到预期的效果。对于未加任何激素的处理, 原球茎仍能增殖, 但随着培养时间的延长, 部分原球茎开始分化。这种现象可能是在诱导启动培养阶段原球茎已积累有一定量的内源激素, 细胞分裂素和生长素之故。并且随着增殖继代次数的增加, 植物组织对外源激素的需量也会降低。

4.3 不同培养基

蝴蝶兰原球茎的增殖效果与基本培养基的选择有相当大的关系。

4.4 不同添加剂

蝴蝶兰组织培养过程中容易产生褐变现象, 而降低

培养基的无机盐浓度可减轻褐变^[19]。椰乳、马铃薯、香蕉等有机添加物是组织培养中常用的成分, 含有氨基酸、激素、酶等有机物, 他们对细胞的增殖有明显的促进作用, 其中椰乳 200 mL/L 对蝴蝶兰 PLB 增殖的影响效果最好, 其次为香蕉和马铃薯。在其他对蝴蝶兰原球茎增殖的影响因子中, 活性炭的使用也产生了良好的作用, 由于各方面原因, 活性炭与其他添加物之间的影响关系此次研究未涉及, 但也构成了后续研究的延伸。

参考文献

- [1] 范成五, 黄燕芬, 构久兰, 等. 蝴蝶兰无菌播种繁殖试验[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(4): 28-29.
- [2] 曹君迈, 任贤, 王薇, 等. 蝴蝶兰种子胚高频率诱导原球茎的研究[J]. 北方园艺, 2006(6): 130-132.
- [3] 刘晓燕, 向青云, 刘玲玲, 等. 基本培养基及附加物对蝴蝶兰原球茎增殖效果的影响[J]. 种子, 2005(6): 18-20.
- [4] 陈超. 蝴蝶兰无菌播种方法的比较研究[J]. 北方园艺, 2006(1): 35-36.
- [5] 廖福琴, 黄萍萍, 张永柏, 等. 蝴蝶兰无菌播种快繁技术[J]. 闽西职业大学学报, 2004(3): 89-90.
- [6] 丁峰. 蝴蝶兰无菌播种快繁技术[J]. 江苏农业科学, 2005(4): 79-80.
- [7] 崔广荣, 张子学, 张从宇, 等. 蝴蝶兰原球茎诱导与增殖研究[J]. 种子, 2006(12): 20-23.
- [8] 章玉平, 刘成运, 胡鸿钧, 等. 蝴蝶兰无菌萌发技术的研究[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(1): 82-86.
- [9] 徐晓薇, 柴明良, 姚丽娟, 等. 蝴蝶兰类原球茎增殖和脱分化的研究[J]. 浙江农业科学, 2006(4): 401-403.
- [10] 许传俊, 李玲. 几种培养基及光照对蝴蝶兰叶片外植体褐变的影响[J]. 亚热带植物科学, 2006, 35(1): 9-12.

Study on Propagation of Protocorm of *Phalaenopsis* by Induction in Asepsis Sowing

YU Hui-lin¹, HU Yue-hua¹, ZHU Yi-yi²

(1. Shangqiu Vocational and Technical College Shangqiu, Henan 476000, China; 2. Xincai Flowers Company in Shangqiu, Shangqiu, Henan 476000, China)

Abstract: To induce the effective protocorm of immature embryos was studied on *Phalaenopsis* by different hormone concentration and additives. The results showed that harvesting the none cracked seed pods more favorable than the cracked one for the sterile seeding. The best time for picking was 120 days after pollination. The most suitable hormone combination for the propagation of protocorm was BA 3.0 + NAA 0.2; 200 mL/L coconut milk was the best for *Phalaenopsis* PLB propagation, followed by bananas and potatoes.

Key words: *Phalaenopsis*; Seeds; Hormone; Protocorm