

蝴蝶兰叶片 PLB 诱导因子的优化

任建宏¹, 乔永旭², 李彦辉², 王桂兰²

(1. 陕西榆林学院 生命科学院, 陕西 榆林 719000; 2. 唐山师范学院 河北 唐山 063000)

摘 要:以蝴蝶兰‘0404’嫩叶为试材, 研究无机盐浓度、生长调节剂、椰子汁剂量、培养基物理状态及光照条件对类原球茎的诱导。结果表明: 采用细胞分裂素 TDZ 和 6-BA 复配比单独使用 TDZ 诱导率提高 13.3%, 液体培养明显优于固体培养, 散射光优于黑暗和光照处理, 最优培养基为 1/2MS+TDZ 1.0 mg/L+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+CM 15.0%+蔗糖 30 g/L, pH 5.4。

关键词:蝴蝶兰; 类原球茎; 诱导

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)22-0139-04

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)原产亚热带, 因其花形奇特, 姿态优雅, 色彩鲜艳, 花期长久, 素有“兰花皇后”之美誉^[1], 深受世人的喜爱, 其需求量也因此逐年上升。长期以来人们不断尝试各种手段进行蝴蝶兰快速繁殖, 以满足日益增长的市场需求。

兰花的传统繁殖方式为分株繁殖, 但蝴蝶兰是单茎气生兰, 植株上极少发育侧枝, 亦可用种子繁殖, 但后代分离较大, 难于满足整齐划一的商品化需求。20 世纪 60 年代以后, 人们利用蝴蝶兰不同的外植体如茎尖、茎节、叶片等诱导类原球茎(Protocorm like-body, PLB)^[2], 再由 PLB 分化成幼苗形成完整植株, 是一条很好的再生途径。目前人们采用不同的方法, 通过诱导 PLB 的方式进行蝴蝶兰的快速繁殖, 但在诱导过程中存在叶片黄化褐化, 诱导率低的问题。基于此原因, 现研究无机盐浓度、生长调节剂、椰子汁、培养基物理状态、光照等因素对蝴蝶兰叶片 PLB 的诱导, 以确定适宜的培养基配方和培养条件, 提高 PLB 的诱导率, 为蝴蝶兰规模化生产奠定技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)品种“0404”。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 在无菌条件下取蝴蝶兰花梗芽无菌培养所得的新叶, 切成 1 cm² 的叶块(图 1), 接于下列各培养基中。

1.2.2 TDZ、NAA 对叶片 PLB 的诱导 A₁: MS+TDZ 1.0 mg/L+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L(激素所用单位下

同略); A₂: MS+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; A₃: MS+TDZ 1.0+NAA 0.1+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; A₄: MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; A₅: MS+TDZ 1.0+NAA 0.5+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; A₆: MS+TDZ 2.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; A₇: MS+TDZ 3.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L。

1.2.3 6-BA、NAA 对叶片 PLB 的诱导 B₁: MS+6-BA 10.0+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; B₂: MS+6-BA 10.0+NAA 0.1+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; B₃: MS+6-BA 10.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; B₄: MS+6-BA 10.0+NAA 0.5+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; B₅: MS+6-BA 5.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; B₆: MS+6-BA 15.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L。

1.2.4 椰子汁对叶片 PLB 的诱导 C₁: MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+琼脂 5.6 g/L; C₂: MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; C₃: MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 15.0%+琼脂 5.6 g/L; C₄: MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 20.0%+琼脂 5.6 g/L。

1.2.5 无机盐浓度对叶片 PLB 的诱导 D₁: MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; D₂: 1/2MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; D₃: 1/4MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L; D₄: 1/8MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 10.0%+琼脂 5.6 g/L。

1.2.6 培养基物理状态和光照对叶片 PLB 的诱导 E₁: 1/2MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 15.0%+琼脂 5.6 g/L(固体, 光照); E₂: 1/2MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 15.0%+琼脂 5.6 g/L(固体, 黑暗); E₃: 1/2MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 15.0%+琼脂 5.6 g/L(固体, 散射

第一作者简介: 任建宏(1965-), 女, 陕西榆林人, 本科, 副教授, 现从事农林生物科学研究工作。

收稿日期: 2010-08-17

光); E₄: 1/2MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 15.0%(液体, 光照); E₅: 1/2MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 15.0%(液体, 黑暗); E₆: 1/2MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 15.0%(液体, 散射光)。

1.2.7 TDZ 与 6-BA 2 种细胞分裂素组合对 PLB 诱导的影响 F₁: 1/2MS+TDZ 1.0+NAA 0.3+CM 15.0%(液体, 散射光); F₂: 1/2MS+TDZ 1.0+6-BA 3.0+NAA 0.3+CM 15.0%(液体, 散射光); F₃: 1/2MS+TDZ 1.0+6-BA 5.0+NAA 0.3+CM 15.0%(液体, 散射光); F₄: 1/2MS+TDZ 1.0+6-BA 10.0+NAA 0.3+CM 15.0%(液体, 散射光)。

以上各培养基中均含蔗糖 30 g/L, pH 5.4, 每处理 10 瓶, 每瓶 3 个叶块, 2 次重复, 统计 PLB 茎诱导情况。培养温度均为(25±2)℃, 光强 1 200~1 500 lx, 光照时间 12 h/d。散射光处理是不开灯管光照也不用四周黑塑料膜覆盖的处理。

2 结果与分析

2.1 生长调节剂对 PLB 诱导的影响

如表 1 所示, 在 A₁~A₇ 中 A₄ 叶片诱导率为 28.3%, 明显高于其它处理, 随着 A₅~A₇ 中 TDZ 浓度升高, 诱导率反而有下降趋势, 且有少量玻璃化出现。可见高浓

度 TDZ 不利于 PLB 诱导增殖。TDZ 为 1.0 mg/L, NAA 为 0.3 mg/L 的 A₄ 处理, 在接种 7 d 时叶片开始加厚, 30 d 时叶片基部出现黄绿色突起, 继续发育即可形成 PLB, 而在其它不同浓度处理中, PLB 发生稍晚。添加 6-BA 的 6 种处理中, 6-BA 浓度为 10.0 mg/L, NAA 为 0.3 mg/L 的 B₃ 培养基, 叶片诱导率最高, 达到 13.3%, 当 6-BA 浓度提高至 15.0 mg/L 时, 诱导率下降, 只有 6.6%。过高浓度 6-BA 不利于 PLB 诱导; 培养初期叶片切口向下弯曲, 中间向上隆起; B₃ 处理, 在培养 7 d 后部分叶片开始变大增厚, 33 d 以后叶片基部有黄绿色突起, 进一步分化形成 PLB。只添加细胞分裂素 TDZ(A₁)的处理, 虽然也有 PLB 发生, 但诱导率极低, 黄化、褐化比较严重, 添加少量生长素 NAA, 诱导率明显提高。随着 NAA 浓度增加, 诱导率变化不大, 因此低浓度 NAA 对 PLB 发生就有很好的促进作用, 单独使用 NAA 和 6-BA 没有 PLB 发生。比较 TDZ 和 6-BA 对 PLB 的诱导作用可看出, TDZ 的效果明显大于 6-BA。在添加 TDZ 的处理中, 最高诱导率 28.3%; 添加 6-BA 的处理中最高只有 13.3%。添加 TDZ 的处理 PLB 发生较早, 叶片绿色, 生长良好, 黄化率低, 60 d 后仍能保持鲜绿色; 添加 6-BA 的各处理, 叶片深绿色, 黄化现象严重。

表 1 生长调节剂对 PLB 诱导的影响

培养基 编号	生长调节剂			黄化开始/d	萌动开始/d	结果/60 d	
	TDZ/mg·L ⁻¹	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹			黄化率/%	诱导率/%
A ₁	1.0	0	0	6	40	90.0	1.7
A ₂	0	0	0.3	4	—	100	0.0
A ₃	1.0	0	0.1	6	32	76.7	20.0
A ₄	1.0	0	0.3	6	30	68.3	28.3
A ₅	1.0	0	0.5	5	32	75.0	23.3
A ₆	2.0	0	0.3	6	35	81.3	18.3
A ₇	3.0	0	0.3	6	36	85.0	11.7
B ₁	0	10.0	0	4	—	98.3	0.0
B ₂	0	10.0	0.1	5	40	90.0	8.3
B ₃	0	10.0	0.3	5	33	83.3	13.3
B ₄	0	10.0	0.5	5	36	86.6	10.0
B ₅	0	5.0	0.3	4	42	93.3	3.3
B ₆	0	15.0	0.3	6	38	90.0	6.6

表 2 椰子汁对叶片 PLB 诱导影响

培养基 编号	椰子汁 /%	黄化开始 /d	萌动开始 /d	结果/60 d	
				黄化率/%	诱导率/%
C ₁	0	4	—	98.3	0
C ₂	10	6	30	76.7	26.6
C ₃	15	6	30	66.7	31.7
C ₄	20	6	30	65.0	31.7

2.2 椰子汁对叶片 PLB 诱导影响

外植体接种在不同浓度椰子汁培养基 C₁~C₄ 中, 所有添加椰子汁的培养基, 经 60 d 培养后, 叶基部均有淡绿色或绿色 PLB 的发生, 不添加椰子汁则没有 PLB, PLB 诱导率为 C₁<C₂<C₃=C₄, 诱导率随椰子汁含量增加而提高, 但添加 15%和 20%的培养基诱导率均为

31.7%(表 2)。可见培养基中添加椰子汁是必需的, 但超过一定量后诱导率不再提高, 从经济角度考虑, 以添加 15%最好。

2.3 无机盐对叶片 PLB 诱导影响

如表 3 所示, PLB 的诱导率随无机盐浓度的降低先

表 3 无机盐含量对叶片 PLB 诱导影响

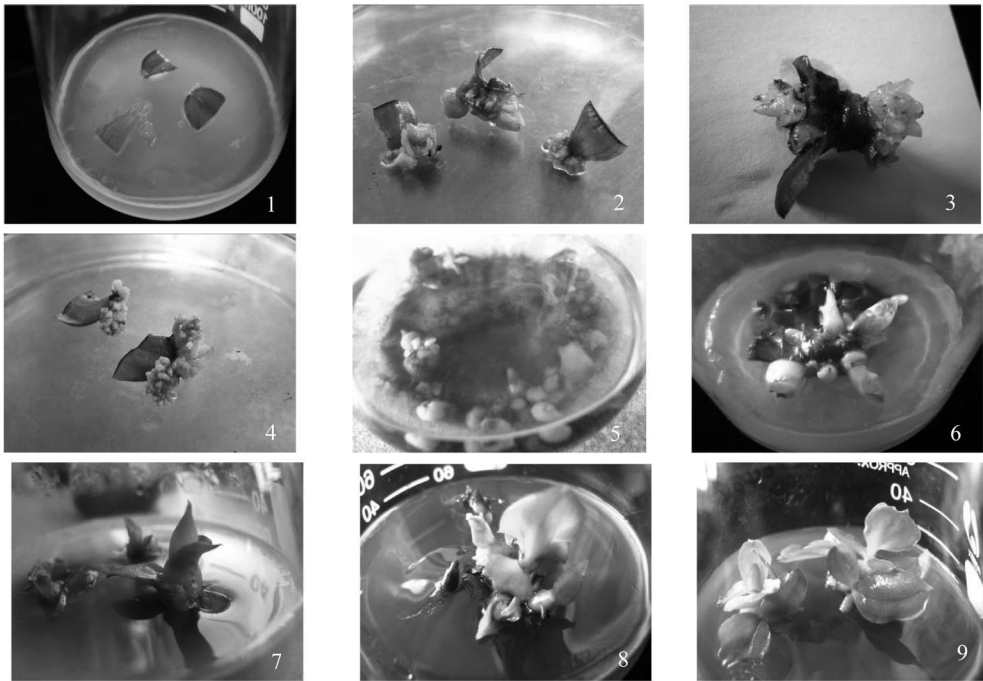
培养基 编号	无机盐 含量	黄化开始 /d	萌动开始 /d	结果/60 d	
				黄化率/%	诱导率/%
D ₁	MS	6	30	70.0	28.3
D ₂	1/2MS	10	29	63.3	33.3
D ₃	1/4MS	5	30	76.6	18.3
D ₄	1/8MS	4	35	83.3	3.3

升高再下降, 因此高盐不利于 PLB 的诱导; 1/4MS、1/8MS 中无机盐含量过低, 无机营养不足, 也不利于 PLB 的诱导; 而 1/2MS 培养基的 PLB 诱导率最高, 达 33.3%, 说明蝴蝶兰 PLB 的诱导需要中等含量的无机盐浓度。

2.4 培养基物理状态和光照对 PLB 诱导的影响

相同条件下, 液体培养能提高 PLB 的诱导率(表 4)。固体培养易使外植体褐化死亡, 诱导率相对较低。从表 4 数据看出, 光照对 PLB 诱导也有一定影响,

光照下液体培养效果(图版-2)不如黑暗和散射光下培养, 黑暗液体培养诱导的 PLB 呈白色(图版-3), 培养后期, 暗处理条件下外植体褐化死亡, PLB 颜色浅, 有少量玻璃化出现, 所以经黑暗处理的材料, 当 PLB 诱导出来后应及时转移到光下继续培养。散射光下培养的效果最好, 当与液体培养结合时诱导率明显提高, 达 51.7%, 而且散射光处理 PLB 生长状态良好, 颜色鲜绿, 没有玻璃化出现(图版-4), 将散射光诱导的 PLB 转入新鲜液体培养基继代 1 次, 20 d 后增殖得到更多 PLB(图版-5)。



图版

注: 1. 叶块; 2. 光照下液体培养 60 d 后诱导的 PLB; 3. 黑暗下液体培养 60 d 后诱导的 PLB; 4. 散射光下液体培养 60 d 后诱导的 PLB; 5. 散射光下液体培养继代培养的 PLB; 6. 7. PLB 培养 7 d 时的生长情况; 8. 9. PLB 培养 30 d 后长出幼嫩叶片。

培养基物理状态和光照对 PLB 诱导影响							
培养基 编号	培养基 状态	琼脂含量 /g · L ⁻¹	处理条件	黄化开始 /d	萌动开始 /d	结果/60 d	
						黄化率/%	诱导率/%
E ₁	固体	5.6	光照	10	30	61.7	35.0
E ₂	固体	5.6	黑暗	15	28	50.0	41.7
E ₃	固体	5.6	散射光	15	28	36.7	45.0
E ₄	液体	0	光照	16	32	45.0	46.7
E ₅	液体	0	黑暗	18	31	35.0	49.9
E ₆	液体	0	散射光	17	28	28.3	51.7

2.5 最佳培养条件的组合与筛选

TDZ、6-BA 都能使离体细胞脱分化、再分化, 诱导 PLB 的发生, 但二者对细胞的生理生化、诱导过程中某些基因的启动等一系列反应和机制不完全相同, 因此利用筛选出的较好的试验条件又对 TDZ 和 6-BA 进行复配设计了 F₁ ~ F₄ 共 4 种处理。试验结果显示(表 5), F₃ 培养基诱导效果最好, 诱导率达 63.3%, 因此 TDZ 和 6-BA 进行适当比例的复配能有效地提高诱导率, 在含

TDZ 1.0 mg/L 培养基中添加 6-BA 5.0 mg/L 比单独添加 TDZ 1.0 mg/L 提高 PLB 的诱导率达 13.3%。将试验诱导的 PLB 进行培养, PLB 7 d 开始生长, 叶片伸展(图版-6、7), 30 d 后小苗长大并有根生出(图版-8、9)。综上分析, 蝴蝶兰“0404”叶片诱导 PLB 适宜培养基为: 1/2MS+TDZ 1.0 mg/L+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+CM 15.0%+蔗糖 30 g/L, pH 5.4。散射光下液体培养。

表 5 最佳培养条件的筛选

培养基 编号	生长调节剂			光照 处理	黄化开始 /d	萌动开始 /d	结果/ 60 d	
	TDZ/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$				黄化率/ %	诱导率/ %
F ₁	1.0	0	0.3	散射光	17	29	26.7	50.0
F ₂	1.0	3.0	0.3	散射光	17	29	28.3	56.7
F ₃	1.0	5.0	0.3	散射光	17	30	25.0	63.3
F ₄	1.0	10.0	0.3	散射光	16	28	30.0	58.3

3 结论与讨论

生长调节剂是蝴蝶兰叶片诱导 PLB 的主要因子。大量研究表明, TDZ 的活性很强, 它通过调节植物生长激素起作用, 同时还能调节细胞膜结构、能量水平、营养吸收和同化作用^[3]。TDZ 可以引起细胞分裂素的积累或合成, 并可抑制内源生长素的降解^[4], You S P^[5] 等人发现用 TDZ 处理离体叶后能延缓叶绿素降解速度, TDZ 对叶片 PLB 诱导效果较 6-BA 好, 但浓度大时易使 PLB 玻璃化和畸形。该试验发现 TDZ 在一定程度上抑制外植体黄化, 可能是 TDZ 与细胞中某些酶发生作用的结果。NAA 是离体培养重要的生长素类物质, 试验中发现较低浓度的 NAA 有利于 PLB 的诱导, 在实际使用时以 0.1~0.3 mg/L 较为合适。另外适量的椰子汁能明显促进蝴蝶兰 PLB 的诱导, 因其含有氨基酸、矿物质、维生素和碳水化合物等复杂成分, 这些成分能明显促进细胞的增殖和培养物的生长。试验中还发现添加 CM 15% 对蝴蝶兰 PLB 诱导效果最好, 这与卜朝阳等^[6,7] 人的研究一致。

蝴蝶兰叶片诱导 PLB 早已获得成功, 但普遍存在诱导率偏低、黄化和褐化的现象, 适当降低培养基中大量元素的含量有利于 PLB 的增殖。鲁雪华等^[8] 在筛选花梗节间切段诱导 PLB 时发现, 1/2MS 和改良 MS 较 MS 的诱导效果明显, 该试验证实了这一点。试验的环境因子也能明显影响 PLB 的诱导, 暗培养时可提高 PLB 的诱导率, 有利于叶块向 PLB 分化, 光照时间越长, 外植体黄化率越高, 这与杨美纯^[9] 的报道一致。但暗培养时

间不宜太长, 否则诱导出的 PLB 容易玻璃化, 40 d 左右最好。研究发现蝴蝶兰组织培养过程中外植体容易褐变, 而液体培养能有效防止这种现象, 并明显提高 PLB 的诱导率, 因此采用液体培养进行蝴蝶兰 PLB 的诱导有望成为新的途径。

参考文献

[1] 杨海芸 吴震 王广东 等. Effects of different culture conditions on adventitious shoots regeneration from the excised leaves of *Phalaenopsis* [J]. 南京农业大学学报 2007, 30(1): 44-49.
[2] Joseph A, Robert E. Micropropagation of *Orchids* [M]. New York: John Wiley & Sons Inc 1993: 446-485.
[3] 徐晓峰 黄学林. TDZ: An efficacious plant growth regulator [J]. 植物学通报, 2003, 2(2): 227-237.
[4] 李成慧 蔡斌 单丽丽, 等. Application of orthogonal design in protocorm induction from leaves of *Phalaenopsis* [J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and life Science Edition), 2004, 25(2): 76-78.
[5] You S P, Liang S H, Xu L G. The effect of TDZ on senescence and some physiological processes in detached leaves of barley [J]. J Hangzhou Univ. 1992, 19: 352-353.
[6] 卜朝阳, 蒋慧萍, 满若君. Regeneration of stem pedicel bud and PLB induction from leaves of *Phalaenopsis* [J]. 江苏农业科学 2008(3): 147-150.
[7] 顾伟民 曹春英, 丁世民 等. Tissue Culture Research of *Phalaenopsis* [J]. 山东林业科技 2004(5): 12-13.
[8] LU X H, GUO W J, XU L H, et al. The preliminary research on the rapid propagation of *Phalaenopsis* by using the joint-points of flower-stems as explants [J]. 园艺学报 2002, 29(5): 491-492.
[9] 杨美纯 周歧伟, 许鸿源 等. Effect of external factors on protocorm-like body inducement in *Phalaenopsis* leaves [J]. 广西植物 2000, 20(1): 42-46.

Optimization on Factor of PLB Induced by Leaves of *Phalaenopsis*

REN Jian-hong¹, QIAO Yong-xu², LI Yan-hui², WANG Gui-lan²

(1. Life Science Faculty, Yulin College, Yulin, Shaanxi 719000; 2. Department of Life Science, Tangshan Normal College, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: Using leaves of *Phalaenopsis* spp ‘0404’ as the explants to study on the factors of inducing PLB such as the concentration of inorganic salts, the growth regulators, the doses of coconut milk, the physical state of medium and the light conditions were studied. The results showed that the effects of TDZ and the 6-BA of cytokinin multiple used had a higher induced rate of 13.3% than TDZ used respectively. The liquid culture medium was superior to solid medium. The scattered light treatment was better than the treatment of darkness and light. The optimum medium was that 1/2MS+TDZ 1.0 mg/L+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+CM 15.0%+sugar 30 g/L, pH 5.4.

Key words: *Phalaenopsis*; protocorm-like body (PLB); induce