

蝴蝶兰高效离体繁殖途径的研究

卜 朝 阳

(广西农业科学院 生物技术研究所, 广西 南宁 530007)

[摘 要] 以蝴蝶兰花梗为初次诱导的外植体,对蝴蝶兰的离体繁殖途径进行了研究。结果发现,通过花梗腋芽萌发可获得无菌芽,再以所得的嫩芽茎段和叶子作为离体培养的增殖材料,2~3 个月后便可获得大量的不定芽。该结果表明:(1)在初次培养中加入 PVP 并进行暗培养,其抗褐化效果最佳。(2)增殖培养基以 MS+6-BA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 或 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 组合较好,其茎段萌发率均高达 90%,增殖倍数分别高达 2.8 和 2.9;叶片芽的诱导率分别为 56%和 57%,增殖倍数最高达 4.8 和 4.6。(3)经济有效的壮苗和生根诱导培养基为“改良 VW+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L”,芽的有效率为 88%,发根率达 93%。

[关键词] 蝴蝶兰;离体繁殖;萌发率;增殖倍数;诱导率;褐化率

[中图分类号] Q943.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)12-0069-04

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* spp.) 为兰科 (Orchidaceae) 蝴蝶兰属 (*Phalaenopsis*), 原生种有 40 多种, 分布在南北纬 23° 之间, 改良品种则不胜数, 商品化生产的品种多为杂交改良后的新品种^[1]。蝴蝶兰有很高的欣赏价值和经济价值, 其以品种丰富、花色艳丽、花姿优雅和花期长等特性赢得了世人的青睐, 在世界花卉产业中占有极其重要的地位^[2~3]。蝴蝶兰高效离体繁殖技术不但可以保持母本的优良特性, 而且变异率低, 生产周期短, 繁殖系数较大, 符合蝴蝶兰商品化、规模化生产的要求。蝴蝶兰的试管繁殖研究, 已有几十年之久, 但其早期工作仅限于实验室研究, 近 20 年来, 世界不少国家已经开始进行蝴蝶兰工厂化育苗生产技术的研发, 其无性繁殖多通过茎尖诱导或原球茎成苗途径进行^[4~10]。截止目前, 关于用花梗作外植体, 诱导腋芽萌动, 然后用无菌芽的茎段和嫩叶作离体增殖培养, 不经过原球茎直接成苗的高效繁殖途径的报道较少。本研究通过对蝴蝶兰离体苗高效繁殖途径的研究, 目的在于提高其增殖率和有效率, 降低褐化率、变异率和生产成本, 以期为蝴蝶兰的工厂化育苗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

试材选用蝴蝶兰红花系 Dtps. Formosa Rose、

白花系 Phal. Mount Lip 以及小花系 P. Sweet Smile 的花梗嫩芽。

1.2 外植体的处理、接种和芽的诱导

取上述 3 个蝴蝶兰品种的幼嫩花梗, 流水冲洗 20 min, 切成茎段, 用体积分数 75% 酒精浸泡 30 s, 再用体积分数 0.1% 的升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 5 次, 吸干后切成 1~2 cm 长的茎段, 每茎段留侧芽或茎节, 接种于诱导增殖培养基上 (图 1)。培养基为改良 MS, 附加于 6-BA 0.5~4.0 mg/L, NAA 0.2~2.0 mg/L 和 KT 0~1.0 mg/L 上。培养 30~45 d 后切下侧芽或顶芽并转入激素水平较低的培养基 (MS+6-BA 0.2~0.5 mg/L+NAA 0.5~1.0 mg/L) 中, 再继续培养 1 个月, 让芽节间伸长, 叶片展开。

1.3 增殖培养

将以上培养所得到的顶芽、侧芽茎段及其嫩叶作为增殖培养的材料, 接种于初次诱导的改良 MS 培养基中, 进行增殖培养以获得不定芽 (图 2~4)。茎段增殖培养时间为 45 d 左右, 叶片增殖诱导的培养时间为 75 d 左右。计算茎段萌发率、叶片诱导率及芽的增殖倍数。茎段萌发率是萌发新芽的茎段数占试验茎段总数的百分率; 叶片诱导率是诱导出不定芽的叶片数占试验叶片总数的百分率; 芽的增殖倍数是在增殖培养基上培养 1 个周期后 (茎段 45 d,

[收稿日期] 2005-04-19

[基金项目] 科技部农业科技园基金 (2005EA106-26); 广西农科院科技发展基金项目 (2002006)

[作者简介] 卜朝阳 (1968—), 女, 广西南宁人, 副研究员, 主要从事花卉与林木生物技术研究。

叶片 75 d) 所获得的总芽数与增殖试验初始数的商。



图 1 花梗外植体诱导

Fig. 1 Pedicels explant inducing



图 2 花梗腋芽萌动

Fig. 2 Axillary budding from pedicel



图 3 腋芽、顶芽增殖

Fig. 3 Shoot multiplication



图 4 叶片诱导成芽

Fig. 4 Shoots produced from leaf

1.4 培养材料褐化的抑制

在蝴蝶兰外植体初次培养和第 1 次增殖时,在其诱导增殖培养基 M1 中附加不同的抗褐化剂。其中 M1 培养基为改良 MS,附加的抗褐化剂为 1.0 mg/L 6-BA, 0.2 mg/L NAA, 1.0 mg/L KT。本试验共设 4 个处理:(1)M1 培养基;(2)M1 培养基+100 mg/L VC;(3)M1 培养基+1 mg/L PVP;(4)M1 培养基+1 g/L Ac。每处理的外植体数均是 30 个,重复 3 次。此外,每个处理还采用了暗培养及常规培养两种培养方式。观察记录并计算褐化率,褐化率是褐化外植体占该处理试验外植体的百分率。

1.5 壮苗培养与生根培养

将增殖培养后获得的不定芽分成单株,接种于壮苗培养基中,使节间伸长,叶片舒展。不定芽在壮苗培养基中培养 45~60 d 后,挑选健壮的正常芽转入新鲜的培养基上进行生根诱导培养,生根培养时间为 60~90 d。对既能壮苗又能诱导生根的培养基

进行了筛选,壮苗培养基与生根培养基相同,基本培养基有 3 种:改良 MS 培养基、KC 培养基和 VW 培养基;不同培养基中有 2 个附加物组合,即 I:0.1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA, II:100 g/L 香蕉+150 g/L 椰汁+100 g/L 马铃薯。共设 6 个处理,每处理 150 株不定芽,重复 2 次。观察记录并计算芽的有效率和发根率,芽的有效率是指壮苗培养后能选作生根培养的芽苗数占总芽苗数的百分率;发根率为生根培养阶段发根苗数占总发根试验芽数的百分率。

2 结果与分析

2.1 培养基中不同激素组合对芽增殖效果的影响

由表 1 可以看出,培养基中植物生长调节剂(6-BA, NAA, KT)的不同组合水平对蝴蝶兰离体培养茎段芽的萌发率、叶片不定芽的诱导率及其增殖倍数均有不同的影响。茎段芽的萌发率以处理 3 和处

理 5 最高,为 90%;叶片诱导率以处理 7 最高,为 60%;芽的增殖倍数,不管是茎段还是叶片,均以处理 7 最高,分别为 2.9 倍和 5.5 倍。总的看来,培养基中激素浓度过低或过高均不利于茎段的萌动、叶片诱导和芽的增殖。11 个激素组合中,以 0.5~2.0 mg/L 6-BA,0.2~0.5 mg/L NAA 的效果较好。

表 1 不同激素组合对蝴蝶兰离体培养芽增殖的影响
Table 1 Effects of different hormone combinations on shoot multiplication of *Phalaenopsis* in vitro culture

处理 Treat- ment	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	KT/ (mg·L ⁻¹)	茎段萌发率/% Stem germi- nation rate	叶片诱导率/% Leaf induc- tion rate	茎段芽增殖倍数 Shoot multi- plication of stem	叶片芽的 增殖/倍 Shoot multi- plication of leaf
1	0.5	0.2	0	76	32	2.3	3.3
2	0.5	0.5	0	67	35	2.1	3.8
3	0.5	0.2	1.0	90	56	2.8	4.8
4	1.0	0.2	0	80	45	2.6	3.8
5	1.0	0.2	1.0	90	57	2.7	4.6
6	1.0	0.5	0	78	48	2.0	4.1
7	2.0	0.5	0	87	60	2.9	5.5
8	2.0	0.5	1.0	74	39	2.3	4.3
9	2.0	1.0	0	71	43	2.6	4.0
10	4.0	2.0	0	65	51	1.8	2.8
11	4.0	2.0	1.0	63	48	1.9	3.4

注:以 Dtps. Formosa Rose 为试验材料。
Note: Using Dtps. Formosa Rosa as experiment material.

2.2 抗褐化剂、培养方式及植物品种对抑制褐化的影响
褐化是蝴蝶兰离体培养中的常见现象,尤其是在前期培养中,褐化会影响植物离体培养的正常进行,包括芽的萌发和增殖效果,严重时会导致培养材料死亡。由表 2 可知,影响培养材料褐化的因素除了培养基附加的不同抗褐化剂之外,还有植物品种、培养方式两个因素。

表 2 培养基中附加抗褐化剂对蝴蝶兰芽萌动及增殖的影响
Table 2 Effects of different resistances for browning on shoot produce and multiplication of *Phalaenopsis*

品种 Species	培养条件 Culture condition	对照 Control			Vc			PVP			活性炭 Activated charcoal		
		褐化率/% Brown rate	褐化 程度 Brown status	芽萌发或 增殖效果 Results of shoot produce and mul- tiple	褐化率/% Brown rate	褐化 程度 Brown status	芽萌发或 增殖效果 Results of shoot produce and mul- tiple	褐化率/% Brown rate	褐化 程度 Brown status	芽萌发或 增殖效果 Results of shoot produce and mul- tiple	褐化率/% Brown rate	褐化 程度 Brown status	芽萌发或 增殖效果 Results of shoot produce and mul- tiple
Dtps. Formosa Rose	暗培养 Darkness culture	91	+++	一般 So-so	82	+++	较好 Better	73	++	较好 Better	61	+	差 Poor
	常规培养 Normal,culture	100	++++	差 Poor	95	++++	一般 So-so	87	+++	一般 So-so	61	++	差 Poor
Phal. Mount Lip	暗培养 Darkness culture	86	++	一般 So-so	80	++	较好 Better	72	++	较好 Better	60	+	差 Poor
	常规培养 Normal,culture	90	+++	差 Poor	87	+++	较好 Better	85	+++	较好 Better	51	+	差 Poor
P. Sweat Smile	暗培养 Darkness culture	45	+++	一般 So-so	35	+	一般 So-so	27	+	一般 So-so	0		差 Poor
	常规培养 Normal,culture	50	++	一般 So-so	47	++	一般 So-so	38	+	一般 So-so	16	+	差 Poor

2.2.1 抗褐化剂 由表 2 可见,加入活性炭的褐化率较低,褐化程度较轻,但芽的萌发和增殖效果较对照差,这是因为活性炭不但对培养基中的醌类化合物、黑素等有害物质有吸附作用,同时也吸附了部分分裂素、生长素、维生素等相关成分,从而减少了这些物质的浓度,在抑制褐化的同时也影响到芽的萌发和增殖效果。进行抗褐化处理的目的是为了获得芽的高萌发率和增殖倍数,如果抑制褐化但未获得较高萌发率和增殖倍数,那也无法达到离体培养的目的。因此,活性炭并非最佳选择。从表 2 看,最佳的处理是附加 PVP 并采用暗培方式,其既在一定程度上抑制了褐化,同时也获得较好的芽萌发率和增殖效果。

2.2.2 培养方式 由表 2 可见,暗培养较常规培养

的抗褐化效果好。但只能暗培一定的时间,否则会影响到芽的生长。

2.2.3 植物品种 从试验的 3 个品种来看(表 2),褐化最严重的是 Dtps. Formose Rose,而 P. Sweet Smile 的褐化程度较轻。可见,褐化与植物本身的内在因素有关,不同植物种类及其不同品种的褐化程度有所差别。基于大规模商品化生产的目的,为提高效率、降低成本,品种品系应该是考虑因素之一。

2.3 不同培养基和附加物对壮苗促成和生根培养的影响

经过增殖培养,选出生长正常的健康芽进行壮苗促成培养和生根诱导培养。这两个阶段所用培养

基一样,对于大规模商业化生产来说,最好的培养基是既能达到培养效果,而其组成又比较简单。因此,本试验对既能壮苗又能诱导生根的培养基进行了比较筛选,由表 3 可知,3 种基本培养基中以改良 VW 效果较好,其有效芽多、发根率高,而且苗的长势最好。在同一种基本培养基中,两种附加物组合的试验结果(芽有效率和发根率)差别不大,以加水果汁附加物的效果相对较好,但其成本较高且配备较为繁琐,从生产成本和操作的方便性考虑,前一种组合即 0.1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA 更适合商品化的大规模生产。

表 3 不同培养基和附加物对蝴蝶兰壮苗和生根的影响

Table 3 Effects of different mediums and supplement on shoot elongation and rooting of *Phalaenopsis*

处理 Treatment	基本培养基 Basic media	附加物 Supplements	芽有效率/% Effective rate of shoot	发根率/% Rate of rooted	苗长势 Seedlings growth status
1	Modified MS	I	77	86	较好 Better
2	Modified MS	II	79	87	较好 Better
3	Modified KC	I	73	82	较好 Better
4	Modified KC	II	76	83	好 Good
5	Modified VW	I	88	93	好 Good
6	Modified VW	II	89	95	好 Good

3 讨论

本试验研究的蝴蝶兰离体苗繁殖途径既简单又经济有效,无论是外植体的选择、再生芽方式,还是培养基的组成,均适于商品化大规模生产,既可提高蝴蝶兰生产效率,又可以降低生产成本。但是,其中还存在着一些尚需继续探索的问题。如用茎段腋芽萌动芽繁殖方式的增殖率较低,而用叶片诱导不定芽方式虽然增殖率较高,但以后是否存在变异隐患

尚不清楚。另外,本试验所用的培养基虽然简单、经济且有效,但离体培养阶段附加的人工合成的植物生长调节剂(6-BA,KT,NAA,IBA),对商品苗移栽后的温室生长状况及开花品质的稳定性有无影响,迄今尚无试验数据,故应与采用天然水果类附加物的培养基所培育的种苗进行系统的比较试验,才能为蝴蝶兰商品化育苗生产提供更为可靠的科学依据。

〔参考文献〕

- [1] 胡松华. 蝴蝶兰[M]. 广东: 广东科技出版社, 1996.
- [2] 杨先芬. 工厂化花卉生产[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [3] 陆奎眉, 张汉荣. 海峡两岸蝴蝶兰产业发展现状与合作前景[J]. 福建热作科技, 2004, 29(1): 39-41.
- [4] 彭立新, 王 珠, 孟广云. 蝴蝶兰组织培养快繁研究[J]. 天津农业科学, 1999, 5(2): 27-29.
- [5] 曾宋君, 彭晓明, 张京丽, 等. 蝴蝶兰组织培养和快速繁殖[J]. 武汉植物学研究, 2000, 18(4): 344-346.
- [6] 潘学峰, 黄凤娇. 海南蝴蝶兰的组织培养研究[J]. 海南大学学报(自然科学版), 1997, 15(3): 206-211.
- [7] Chen Y C, Chang C. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*[J]. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2000, 36(5): 420-423.
- [8] 秦 凡, 周吉源. 不同植物生长调节剂对蝴蝶兰快速繁殖的影响[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(5): 452-456.
- [9] 陈 勇, 林开县, 王君晖, 等. 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(1): 84-97.
- [10] Wang Jing-wen, Ming Feng, Ye Ming-ming, et al. A reliable protocol for plant regeneration from pedicel axillary bud *Phalaenopsis in vitro*[J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2004, 43(2): 230-234.

(下转第 77 页)

Dynamic character of climatic evolutionary process for tree growth-ring

WANG Jing-min¹, DAO Xia-yan², LIU Jianjun¹

(¹ College of Life sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry,
Yangling, Shaanxi, 712100, China; ² Yangling Vocational and Technical College)

Abstract: The tree growth-ring proxy data, that is, a non-linear dynamical system, are employed to analyze the dynamic character. The results show that the time serial of tree growth-ring is chaotic, the attractors are opened in reconstructed vector space when time-lag is 9 and embed dimension is 3. Kolmogorov entropy of the time-serial is 0.032, which shows the precipitation (May to June) in Huashan area sways future precipitation (May to June). Hurst exponent is 0.555 6, which shows the precipitation time serial (May to June) in Huashan area remains stable.

Key words: tree growth-ring; climatic evolutionary process; dynamic character; chaos time serial

(上接第 72 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)12-0069-EA

A high efficient protocol for *Phalaenopsis in vitro* propagation

BU Zhao-yang

(Biotechnology Research Institute of Guangxi Academy of Agriculture Science, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: A high efficient protocol for *Phalaenopsis in vitro* propagation was described with pedicels as explants for initial culture. Results showed that the shoots could be produced by axillaries budding from explants. And using young stems and leaves as multiplication material *in vitro* culture, regeneration shoots were obtained directly approximately 2—3 months after culture. The results indicated that: (1) the optimum method for browning resistance was media supplement with PVP and under darkness for initial culture. (2) The optimum media for multiplication was: MS+6-BA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L or MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L. For stem, both of the germination rate went up to 90%; and one multiplication time was up to 2.8, the other 2.9. For leaf, one of the induction rates was 56%, the other 57%; and one multiplication time reached 4.8, the other 4.6. (3) An efficient and economic medium for elongation and rooting was modified VW+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L, the effective rate of shoot was 88% and the rate of rooting was 93%.

Key words: *Phalaenopsis*; *in vitro* propagation; germinating rate; times of multiplication; induction rate; browning rate