

李正民, 王安石, 王健, 等. 蝴蝶兰不定芽的组培快繁技术[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 46-49.

蝴蝶兰不定芽的组培快繁技术

李正民¹, 王安石², 王健¹, 陶楚¹

(1. 海南大学园艺园林学院, 海南海口 570228; 2. 海南出入境检验检疫局热带植物隔离检疫中心, 海南海口 570311)

摘要: 通过诱导蝴蝶兰豹斑花花梗腋芽萌发出无菌不定芽, 以不定芽为外植体, 建立蝴蝶兰无菌培养体系。结果表明: 在花宝 1 号 3.0 g/L + BA 3.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 20 g/L 的培养基中, 腋芽萌发效果很好。采用 $L_{16}(4^4)$ 正交设计探讨基本培养基、BA、NAA、蔗糖 4 个因素对蝴蝶兰不定芽增殖的影响, 得出 BA 是影响增殖系数的主要因素, NAA、基本培养基次之, 蔗糖最弱。MS + BA 8.0 mg/L + NAA 0.8 mg/L + 蔗糖 20 g/L 对不定芽增殖有良好的效果, 增殖系数能够达到 2.83。诱导蝴蝶兰生根的最佳培养基为花宝 1 号 3.5 g/L + MET 0.4 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 蔗糖 20 g/L。移栽基质以水苔最好, 成活率达 93.18%。

关键词: 蝴蝶兰; 不定芽; 组织培养

中图分类号: S682.310.36 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0046-04

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis spp.*) 别称蝶兰, 属热带或亚热带的气生兰, 其株型美观, 花形奇特, 色彩艳丽, 花期长久, 在热带兰中有“兰花皇后”之美誉, 其盆栽和切花在国际花卉市场上有很高的经济价值^[1]。蝴蝶兰不能进行传统分株繁殖, 自然条件下种子也很难萌发, 目前的繁殖方式有 3 种: 一是近成熟果实消毒后无菌播种产生实生苗, 操作简单易行, 但容易有花色分离等变异情况发生^[2]; 二是利用茎尖、叶片等外植体诱导类原球茎, 经过分割增殖最终分化成苗, 该方法取材广, 类原球茎可多次分割继代, 繁殖系数高, 但经过愈伤组织阶段有较高变异率, 所分化的试管苗也偏弱; 三是丛生芽途径即利用花梗腋芽直接诱导出不定芽并继代增殖^[3], 该方法虽取材受限, 但可以根据蝴蝶兰花朵性状表现情况筛掉无商业价值和携带毒株等不良植株, 根据需求选择表现优秀的母本扩繁避免不必要的浪费, 且所诱导的不定芽均能高度保留母本优良性状, 极少存在变异, 满足蝴蝶兰规模化生产的要求^[4]。本试验旨在利用蝴蝶兰花梗腋芽为外植体, 探索其不定芽快繁体系, 以期能为蝴蝶兰组培苗的工厂化生产提供依据。

1 材料与与方法

1.1 供试材料

供试蝴蝶兰材料为采自海南省文昌市动植物隔离检疫农场蝴蝶兰品种圃的豹斑花 (*Dtps. Leopard Prince*) 优良植株。

1.2 取样与消毒

选晴天 11:00 左右取材, 用无菌刀片切取健壮的蝴蝶兰植株花苞初始开放的幼嫩花梗。参考潘雪峰等的消毒方法^[5], 首先用 75% 乙醇对花梗进行全面喷淋后放置于无菌操作台上, 用浸在 75% 乙醇中的湿棉球对花梗作进一步的表面清洁与消毒, 待花梗表面稍干后, 选取花梗上带有饱满腋芽的

部位, 在距腋芽上下两端约 2 cm 处进行切段, 接着剥去腋芽外面的苞片, 置于 0.1% 氯化汞溶液中消毒 12 min, 然后用无菌水冲洗 5 遍, 并按预设的试验方案接种到事先准备好的培养基上。

1.3 培养基的配置

试验涉及 KC、VW、MS、1/2MS、花宝 1 号 (N-P-K: 7-6-19, 下略) 5 种基本培养基, 在此基础上按不同的试验阶段和目的添加不同浓度、不同配比的植物激素。调节所有培养基的 pH 值为 5.8, 并用 0.85% 卡拉胶固化, 分装到聚丙烯组培袋中, 在 121 °C 条件下灭菌 24 min, 待冷却凝固后使用。

1.4 试验设计

1.4.1 不定芽的诱导 选用 5 种基本培养基: KC、VW、MS、1/2MS、花宝 1 号 3.0 g/L, 培养基均附加 BA 3.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 20 g/L。每袋接种 1 个花梗腋芽, 每种培养基接种 40 袋, 重复 3 次。50 d 后记录并统计各处理的生长情况。

1.4.2 不定芽的增殖 花梗腋芽诱导出不定芽后, 将所获得的不定芽在无菌操作台上分切为单芽后转入准备好的增殖培养基中进行增殖培养。增殖试验设基本培养基、BA、NAA、蔗糖 4 因素 4 水平的 $L_{16}(4^4)$ 正交试验 (表 1), 共 16 个处理, 每个处理 20 袋, 每袋接种 3 个芽。60 d 后统计各处理的增殖情况, 所得数据用 SAS 软件分析。

表 1 $L_{16}(4^4)$ 因素及水平表

水平	A: 基本培养基	B: BA 含量 (mg/L)	C: NAA 含量 (mg/L)	D: 蔗糖含量 (g/L)
1	KC	2	0.4	10
2	MS	4	0.6	20
3	1/2MS	6	0.8	30
4	VW	8	1.0	40

1.4.3 生根培养 增殖芽长成不具根的幼苗时需将幼苗分开转入生根培养基中进行生根培养。本试验选择花宝 1 号 3.5 g/L 为基本生根培养基, 附加 0.5 mg/L NAA、20 g/L 蔗糖, pH 值 5.8; 设置多效唑 (MET) 0 (CK)、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L 6 个梯度处理来研究多效唑浓度对组培苗生根的影

收稿日期: 2012-10-10

基金项目: 海南省三亚市院地合作项目 (编号: 2010YD59)。

作者简介: 李正民 (1988—), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要研究方向为热带花卉组培。E-mail: lizhengmin1988@gmail.com。

通信作者: 王健, 教授。E-mail: wjyym@yahoo.com.cn。

响。每处理接种 30 袋,每袋转接 2 棵无根幼苗,所转接无根幼苗需生长势一致。转接后,每隔 5 d 观察 1 次,60 d 后统计分析各处理的生根情况。

1.5 培养条件

培养温度(25±2)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,连续光照 12 h/d。

1.6 炼苗与移栽

炼苗与移栽是组培快繁中关键的一步。将生长健壮、根系发达的试管苗置于温棚内自然环境下炼苗 7 d,棚内采取遮阴措施,温度保持在 25~35℃,空气湿度保持在 80% 以上。炼苗结束后,洗净试管苗根部的培养基,将试管苗置于甲基托布津 800 倍液浸泡 5 min,晾干,选择植株健壮、生长势一致的试管苗移栽到预先高温消毒好的基质中。基质共设有 6 组处理:A,水苔;B,泥炭:珍珠岩=1:1(体积比);C,小块松树皮;D,椰丝;E,椰糠;F,椰块。每组处理一穴盘共 44 株,重复 3 次,随机区组排列,60 d 后统计成活率、植株鲜重,并用 TYS-3N 植物营养测定仪每组随机测量 10 株移栽苗的叶绿素含量(SPAD 值)和含氮量,所得数据用 SAS 软件分析。移栽后棚内温度控制在 18~28℃之间,最低不低于 15℃,最高不超过 32℃;湿度控制在 70%~80%之间;光照控制在 1 万 lx 左右;定期通风;各处理统一水肥管理,浇水以见干见湿为宜,试管苗定植长出新根后再浇叶面肥。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对花梗诱导的效果

由图 1 可知,5 种培养基均能诱导花梗腋芽萌发不定芽。其中,不定芽诱导率最高的是 MS,可达到 86.87%,但褐化较严重,诱导的不定芽以单芽为多。花宝 1 号 3.0 g/L 不定芽率仅次于 MS,为 85%,所萌发的芽体双芽和三芽居多,褐化程度最轻(图 2),可能与其铁盐含量低有关。1/2MS 不定芽萌发率为 83.33%,位居第三,萌发的不定芽多单芽和双芽,但都偏瘦弱,有中等程度褐化。VW 的诱导率为 75%,萌发的不定芽约有 2/3 为双芽。萌发效果最差的是 KC 培养基,不定芽率最低且芽体瘦弱,可能与其营养元素不够丰富有关。综合来看,蝴蝶兰花梗腋芽诱导适宜的培养基为花宝 1 号 3.0 g/L+BA 3.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+蔗糖 20 g/L。

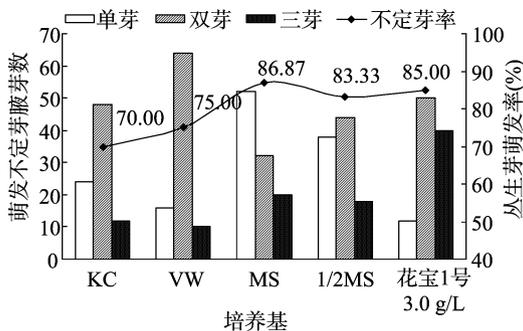


图1 不同培养基对花梗诱导的效果

2.2 不定芽的增殖

在表 2 中可以看出,16 个处理中,除 1 号增殖系数为 0.83 外,其余 15 个增殖系数均大于 1;7、8、12、14 号增殖系数



图2 腋芽萌发现象

达到 2.0 以上(包含 2.0),8 号增殖系数更是接近 3.0,为最高。由极差 R 可看出,不定芽增殖的影响因素依次为 $B > C > A > D$,说明 BA 含量对蝴蝶兰不定芽增殖起主要作用,其次是 NAA 含量和基本培养基,蔗糖浓度的影响最小。从 k 值可得出各因素在增殖阶段的较优水平,分别是 MS、BA 8.0 mg/L、NAA 0.8 mg/L、蔗糖 20 g/L。用 Duncan's 法分析结果表明, A_2 与 A_1 差异显著,与 A_3 、 A_4 差异不显著; B_1 与 B_1 、 B_2 、 B_3 差异显著; C_3 与 C_1 差异显著,与 C_2 、 C_4 差异不显著; D 因素各水平之间无显著差异。综上所述,蝴蝶兰不定芽增殖阶段的适宜处理组合是 MS + BA 8.0 mg/L + NAA 0.8 mg/L + 蔗糖 20 g/L,增殖倍数达到 2.83 倍(图 3)。

表 2 不定芽增殖培养基优化正交试验设计与结果

编号	A	B	C	D	增殖系数
1	1	1	1	1	0.83
2	1	2	2	2	1.43
3	1	3	3	3	1.67
4	1	4	4	4	1.92
5	2	1	2	3	1.48
6	2	2	1	4	1.67
7	2	3	4	1	2.17
8	2	4	3	2	2.83
9	3	1	3	4	1.67
10	3	2	4	3	1.33
11	3	3	1	2	1.40
12	3	4	2	1	2.17
13	4	1	4	2	1.80
14	4	2	3	1	2.00
15	4	3	2	4	1.42
16	4	4	1	3	1.83
k_1	1.46b	1.45b	1.43b	1.79a	
k_2	2.04a	1.61b	1.63ab	1.87a	
k_3	1.64ab	1.67b	2.04a	1.58a	
k_4	1.76ab	2.19a	1.81ab	1.67a	
R	0.58	0.74	0.61	0.29	

注:增殖系数=新增芽数/接种数;同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),表 4 同。

2.3 生根培养

所设 6 组处理,生根萌动时间大都集中在 40 d 后,并无太大差异。由表 3 可以看出,多效唑有明显促进生根作用,其浓度与生根率和根数呈正相关,与根长呈负相关。在对照组里,生根率可以达到 78.33%;在多效唑添加量达到 0.8 mg/L 后,生根率达到 100%,除 0.2 mg/L MET 处理外,其余处理均



图3 不定芽增殖



图4 生根诱导

与对照组差异极显著;多效唑添加到0.4 mg/L时,生根率已经达到95%,与0.6、0.8、1.0 mg/L MET组无显著差异。1.0 mg/L MET处理组平均根数最多,达到5.82条;对照组最低,为2.39条,随着多效唑浓度的提升,平均根数也不断增加,各组处理间差异极显著。平均根长以对照组最高,为3.49 cm,与其余各组(除0.2 mg/L MET组外)差异极显著;0.8、1.0 mg/L处理平均根长均低于2 cm,两者之间无显著差异。随着多效唑浓度的增加,根系逐渐变多且粗短,绿色根尖也越来越短,在浓度超过0.4 mg/L后,叶片、节间变小甚至畸形,不利于出苗移栽(图4、图5)。综合生根率和植株表现,在蝴蝶兰生根培养中,多效唑浓度以0.4 mg/L为宜,适宜的生根培养基为花宝1号3.5 g/L+MET 0.4 mg/L+蔗糖20 g/L。

表3 多效唑浓度对蝴蝶兰生根的影响

MET浓度 (mg/L)	生根率 (%)	平均根数 (条)	平均根长 (cm)	生长描述
0(CK)	78.33C	2.39F	3.49A	叶片正常,根系细长
0.2	86.67BC	2.92E	3.24A	叶片正常,根系变短变粗
0.4	95AB	3.47D	2.49B	叶片正常,根系粗壮
0.6	98.33A	4.24C	2.15C	叶片变小且圆,根系短且粗壮
0.8	100A	5.25B	1.53D	叶片出现畸形,根系短而粗
1.0	100A	5.82A	1.44D	叶片畸形,节间缩短,根短且粗

注:平均根数=总根数/生根苗数;平均根长=随机选取30条根总根长/30;同列不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

2.4 炼苗与移栽

成活率是评价移栽基质最重要的指标。由表4可以看出,6组处理除F组成活率低于60%外,其余均在70%以上。A最高,为93.18%;E处理次之,为86.36%;B处理略低于80%,3组处理之间无显著差异,均与F处理差异显著。成活

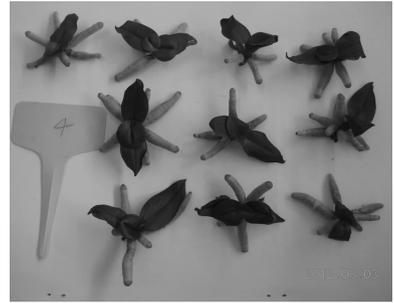


图5 多效唑对生根的矮壮作用

率高低排列为A>E>B>D>C>F。叶片含氮量可反映植株对肥料的吸收情况,可以看出各处理含氮量均 ≥ 1.70 mg/g,含氮量最高的为A处理,与其余各组差异显著;其余各组之间无显著差异。叶绿素含量是反映植物特别是光合机构生理状况的一个重要指标,它对肥水反应非常灵敏,因此可以作为检测基质保肥效果的指标。其测定结果是SPAD值,SPAD值与叶绿素之间成正比关系,因此SPAD值可间接代表叶绿素含量。同含氮量一样,A处理的SPAD值最高为27.32,与其余各组差异显著;其余各组间无显著差异;F处理的SPAD值最低,植株表现为叶色暗淡,叶片小而薄。各处理平均鲜重相差很大,A处理最重,F处理最轻,两处理均与其余各组差异显著;各处理平均鲜重高低依次为A>B>D>C>E>F。综合来看,水苔(A处理)是最佳移栽基质;椰糠(E处理)可作为第二移栽基质;泥炭:珍珠岩=1:1(B处理)虽然能够使幼苗有较高鲜重,但成活率略低;松树皮(C处理)和椰丝(D处理)效果一般;椰块(F处理)效果最差,不适合作为移栽基质(图6、图7)。

表4 不同移栽基质对蝴蝶兰生长的影响

基质处理	成活率 (%)	叶片含氮量 (mg/g)	SPAD值	植株平均鲜重 (g)	生长描述
A	93.18a	1.88a	27.32a	7.17a	生长快,长势均匀,叶片肥厚有光泽
B	79.55ab	1.75b	25.59b	5.52b	生长快,长势均匀,叶片有光泽
C	72.72bc	1.73b	25.17b	4.46c	植株小,但长势均匀
D	75.00abc	1.76b	25.61b	5.08bc	生长慢,叶片无光泽
E	86.36ab	1.77b	25.36b	4.08c	生长速度中等,长势不均匀,叶片无光泽
F	59.09c	1.70b	24.75b	1.53d	生长最差,植株矮小,叶片黯淡无光泽

3 结论与讨论

目前生产中蝴蝶兰多为杂交种,利用种子播种繁衍的后

代性状分离严重,不能建立规格统一的商品苗,以蝴蝶兰花梗腋芽为材料建立的无性繁殖体系,可保留母本优良性状,适合商品苗的生产。本试验表明,花宝1号3.0 g/L诱导腋芽萌



图6 不同基质下移栽苗的表现



图7 不同基质下蝴蝶兰的生根

发不定芽效果优于 MS、1/2MS、KC 和 VW,这与多数前人研究的 MS 和 1/2MS 更适合蝴蝶兰花梗腋芽诱导不定芽的结论^[6-7]不一致。不定芽诱导时,所接花梗腋芽无死亡污染现象出现,说明 0.1% 氯化汞溶液消毒 12 min 对外植体具有很好的杀菌消毒效果。试验中发现,花宝 1 号培养基在灭菌冷却后凝固效果不及其他培养基好,可通过配置时稍微调高 pH 值或卡拉胶含量来控制。

本试验采用 $L_{16}(4^4)$ 正交设计来研究影响蝴蝶兰不定芽增殖的基本培养基、BA、NAA、蔗糖 4 种因素和水平。本试验中增殖培养基的宜选择 MS + BA 8.0 mg/L + NAA 0.8 mg/L + 蔗糖 20 g/L,增殖倍数可达到 2.83 倍。其中,BA 是影响不定芽增殖的主要因素,NAA 次之,基本培养基和蔗糖浓度影响最小。BA 8.0 mg/L + NAA 0.8 mg/L 的激素配比组合与李金雨等认为适宜增殖的 BA 8.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 组合相似,但增殖率不及其 506% 的优异表现^[8]。潘学峰等研究发现 ZT 比 BA 有着更好的不定芽增殖效果,双芽接法也优于单芽接法,增殖系数可达到 3.85 倍,可能与切口面积与体积比值小有关^[5]。

多效唑是 20 世纪 80 年代研制成功的三唑类植物生长调节剂,是内源赤霉素合成的抑制剂,具有促进生根的作用。本试验研究发现多效唑可提高生根率,促进组培苗根系的生长,但浓度不宜过高,否则会容易出现地上部分与地下部分不平衡,造成植株畸形。适宜的多效唑浓度为 0.4 mg/L,与部分学者多效唑对蝴蝶兰小苗生根影响不显著^[9]和 1.5 mg/L 多效唑更适合蝴蝶兰生根^[10]观点不同。

基质是影响蝴蝶兰生根苗移栽的重要因子。本研究结果表明,不同栽培基质对蝴蝶兰组培苗移栽成活有明显的影响。以水苔作为基质时,移栽苗不仅有较高的成活率,达到 93.18%,其植株鲜重、叶片含氮量、叶绿素含量均较高。水苔

具有很好的保水保肥能力,是蝴蝶兰移栽基质的首选,王月英等也得出过相似的结论^[11-12]。以椰糠为基质的组培苗成活率为 86.36%,最接近水苔,虽植株鲜重却偏低,可能与其较差的保水能力有关,但仍不失为良好的移栽基质。泥炭:珍珠岩 = 1:1 (体积比)混合基质成活率接近 80%,但表现性状欠佳,仍需继续改进。以树皮、椰丝、椰块为基质时,组培苗成活率均低于 80%,不适宜作为移栽基质。有研究表明,以椰丝作为移栽基质,成活率可以达到 96%,而椰糠处理仅有 62%,可能与供试品种和水肥管理方法等不同有关^[13]。

蝴蝶兰在组培过程中,容易存在褐化问题,主要原因是在多酚氧化酶的作用下,材料伤口分泌出酚类化合物转变成醌类物质,需在培养中注意防止褐化对材料造成伤害。本试验中未对有机物添加进行专门试验。但在准备培养基的过程中也尝试了一些添加物,如椰汁、香蕉、马铃薯、苹果汁等。经验表明,在诱导阶段可不添加有机物,在增殖和生根阶段添加有机物会有很好的效果,这 2 个阶段最好添加不同的有机物,但具体选择哪种有机物和其适宜浓度还需进一步试验。

参考文献:

- [1] Gow W P, Chen Jen T, Chang W C. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids[J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31:363 - 369.
- [2] Ali M B, Khatun S, Hahn E J, et al. Enhancement of phenylpropanoid enzymes and lignin in *Phalaenopsis* orchid and their influence on plant acclimatization at different levels of photosynthetic photon flux[J]. Plant Growth Regul, 2006, 49:137 - 146.
- [3] 潘学峰, 王安石, 李海珠. 蝴蝶兰组培快繁技术的研究进展[J]. 热带林业, 2005, 33(1):45 - 47.
- [4] Young P S, Murthy H N, Yoeup P K, et al. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2000, 63(1):67 - 72.
- [5] 潘学峰, 王安石, 李海珠. 利用从芽途径快速繁殖蝴蝶兰的研究[J]. 海南大学学报:自然科学版, 2005, 23(1):47 - 52, 60.
- [6] 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.
- [7] 王家福. 花卉组织培养与快繁技术[M]. 北京:中国林业出版社, 2006.
- [8] 李金雨, 洪丽萍. 蝴蝶兰丛生芽途径的组织培养技术[J]. 热带作物学报, 2010, 31(4):610 - 613.
- [9] 林宗铿, 黄德贵. 应用正交设计方法探讨蝴蝶兰丛生芽生根壮苗的条件[J]. 福建热作科技, 2002, 27(1):4 - 5, 11.
- [10] 杨美纯, 周歧伟, 许鸿源. 蝴蝶兰的种子培养[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(4):258 - 260.
- [11] 王月英, 陈义增, 曾爱平. 栽培基质对蝴蝶兰苗木生长的影响[J]. 福建热作科技, 2003, 28(4):9, 14 - 15.
- [12] 伦君, 张元国, 崔秀花, 等. 蝴蝶兰试管苗驯化及移栽技术研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(5):319 - 321.
- [13] 李金雨, 陈丽璇, 林丽仙, 等. 蝴蝶兰组培苗移植技术研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(8):1309 - 1311.