

蝴蝶兰组织培养与快速繁殖技术研究进展

肖丽红, 黄鑫文, 陈创国

(梅州市农业科学研究所, 广东 梅州 514071)

摘要:采用组织培养方法对蝴蝶兰种苗进行繁殖,具有增殖率高,速度快,不受季节限制,可周年生产,易去除病毒等优点。该法主要利用种子无菌播种萌发形成实生苗,利用外植物诱导出丛生萌芽,通过切割培养使丛生芽不断增殖,从而解决蝴蝶兰繁殖中的各种问题。

关键词:蝴蝶兰;组织培养;快速繁殖;研究进展

中图分类号:S682.304⁺.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-874X(2007)03-0039-04

Research progress on tissue culture and rapid propagation of *Phalaenopsis*

XIAO Li-hong, HUANG Xin-wen, CHEN Chuang-guo

(Meizhou Research Institute of Agricultural Science, Meizhou 514071, China)

Abstract: Used the tissue culture method to carry on the reproduction of *Phalaenopsis* seedling, had advantages of the high reproducibility, the quick speed, not season limit, but the anniversary production, easy to remove merits and so on virus. This law mainly formed the seedling using the seed asepsis sowing seeds germination, use the plant induced grew the seed, caused through the cutting raise multiply unceasingly, thus in solution of each question about butterfly blue reproduction.

Key words: *Phalaenopsis*; tissue cultute; rapid propagation; research progress

蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)属于热带气生兰,其形态美妙、色彩艳丽、花期持久,素有“兰花皇后”的美称,具有极高的观赏价值和经济价值。蝴蝶兰为单轴兰花,植株上极少发育侧枝,很难采用常规分株法进行大量的无性繁殖,而且其种子不含为胚萌发提供营养的胚乳或其他组织,在自然条件下萌发率极低,也难以利用一般的种子播种方式进行有性繁殖。蝴蝶兰采用组织培养方法进行种苗繁殖,具有增殖率高、速度快、不受季节限制、可周年生产及容易去除病毒等优点,是大规模种苗生产的唯一途径。

兰花的组织培养在国外研究较早。据报道,1949年利用花梗休眠芽在无菌条件下发育成完整的植株,此法经改进后曾一度成为蝴蝶兰的主要繁殖方式,但因限于外植体数量繁殖系数难以提高^[1];1960年Morel最先成功进行了兰花的茎尖培养并得到小植株,在此基础上Wenda进一步研究了较容易的无性繁殖兰花苗的方法,1956年后在美国、法国、日本先后出

现了利用组培繁殖兰花的专业种苗商^[2];1974年Intuwong等^[3]利用蝴蝶兰茎尖诱导出原球茎状体,再分化成植株;1975年日本学者田中^[4]以兰花实生苗叶片为外植体诱导出原球茎,然后形成再生苗;1992年Kundson^[1]首次使兰花种子在无菌条件下发芽并良好生长。这些研究都为以后通过组织培养快繁蝴蝶兰打下了基础。此后兰花的快繁技术发展很快,目前已有70个属200~300种兰花可通过组织培养方式进行快速繁殖,形成了规模宏大的“兰花工业”。

国内对蝴蝶兰的组织培养研究起步较晚,20世纪80年代才开始有少量报道,近年来出现了不少以蝴蝶兰的茎尖、花梗、叶片、根尖等外植体进行组培快繁的报道,但快繁效果不甚理想,尚有许多环节需要改进。本文概述了近年蝴蝶兰的组织培养与快繁的研究进展,以期对蝴蝶兰的生产发展提供参考。

1 无菌播种繁殖研究

无菌播种一般在蝴蝶兰果实即将成熟但尚未开裂时进行,太早播种种胚发育不良,萌发率低;过晚播种则果皮开裂,果实内的种子易受污染,难以消毒。播种

收稿日期:2006-12-29

作者简介:肖丽红(1970-),女,农艺师

一般掌握在授粉后4个月后进行,但不同品种、不同气候条件播种时间有所不同,同一品种在气温较高的条件下授粉至果实成熟历时短,果实成熟度高,接种容易操作,萌发率高且萌发后的生长状况也好。播种时应考虑种子发芽的群体效应,单位面积种子越多,萌发越快,生长越好。蝴蝶兰无菌播种培养的培养条件一般为温度22~28℃,光照强度1 000~3 000 lx,每天光照10~18 h。

1.1 培养基选择

采用合适的培养基是蝴蝶兰种子萌发的关键, KC、MS、V&W、KYOTO等多种基本培养基都可使种子萌发,但萌发所需的时间、萌发率及小苗长势不同。杨美纯等^[5]研究发现MS培养基最适合蝴蝶兰种子萌发,王慧俞等^[6]认为KC为最适宜培养基,曾宋君等^[7]以花宝一号、花宝二号为主要成分自制成G₃培养基的播种效果优于1/2MS、MS和KC等培养基。不同的蝴蝶兰品种对培养基的要求不同,我们在改良KC培养基上附加适量蛋白胨和香蕉汁,对多种蝴蝶兰品种进行胚培养取得良好效果,但对一些小花、多花品种却基本无效。

1.2 激素及其他附加物对种子萌发的影响

蝴蝶兰种子在基本培养基上也可萌发,但附加适当比例的激素或其他有机无机附加物可显著促进萌发。曾宋君^[7]等研究认为低浓度6-BA利于蝴蝶兰种胚萌发,6-BA浓度超过1 mg/L时则有抑制作用;低浓度NAA(<1.0 mg/L)可促进已萌发的蝴蝶兰原球茎生长,但对胚萌发的作用不明显;蝴蝶兰种子萌发的激素浓度配比以6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.5 mg/L为佳。杨美纯等^[5]以MS为基本培养基并附加不同浓度的6-BA进行诱导蝴蝶兰种子萌发试验,结果发现6-BA浓度在1~5 mg/L范围时其萌发率均在70%以上,其中在MS + 6-BA 3 mg/L + NAA 0.05 mg/L培养基上的萌发率高达100%。我们以KC为基本培养基附加15%香蕉汁和各种激素配比,发现低浓度的GA₃和KT对诱导蝴蝶兰种子萌发有促进作用,但效果不如6-BA,而不同浓度的NAA和2,4-D对蝴蝶兰种子萌发都有抑制作用,且浓度越高抑制越明显。

研究还表明,培养基中添加适量的椰子汁、蛋白胨、香蕉汁、番茄汁、苹果汁等营养物质,对蝴蝶兰种子萌发和生长都有明显的促进作用;添加适量活性炭可防止褐变,对幼苗成长有利,但对种子萌发无明显影响。

1.3 生根培养与移栽

有关研究表明,一般在不加激素的播种培养基上

蝴蝶兰种苗会自动生根,但添加椰汁、香蕉汁、活性炭等对生根有明显促进作用,而添加激素对生根影响极大。据试验,添加较高浓度6-BA(>1.0 mg/L)对生根有明显抑制作用,低浓度6-BA(<0.5 mg/L)对生根有一定促进作用,而NAA对生根有明显促进作用,蝴蝶兰无根实生苗在KC + 10%香蕉汁 + 0.2%白糖 + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 3 mg/L培养基上培养生根较好。此外,研究表明加入MET(多效唑)1.5 mg/L可抑制小苗根、茎、叶的伸长,增加根数和根粗,使叶片变厚变短变绿、植株健壮、移栽成活率高。其中,将适龄生根苗置于室温下开盖炼苗1周,然后洗去根部培养基,用低浓度KMnO₄或多菌灵浸泡后进行移栽,其栽培基质以水苔为佳。

蝴蝶兰的种子极小,采用无菌播种方法进行快繁具有操作简单、繁殖速度快等优点,至今仍是蝴蝶兰种苗繁殖的一个重要方式。但因无菌播种方法为有性繁殖,其获得的植株与母株基因型不同,分离现象严重,有可能出现大量劣质种苗而造成损失,所以在选择母本进行杂交时应特别注意,尽量了解亲本的遗传规律,增加无菌播种后代性状的预见性,减少市场风险。

2 原球茎增殖研究

原球茎繁殖(proto-corm-like body)是兰花植物组织培养的特有现象,是其组培快繁的主要形式。通常情况下从兰花成苗的叶片和根等成熟组织很难进行脱分化形成原球茎,而以兰花的茎尖分生组织为外植体可以诱导原球茎。但因茎尖深埋于叶丛之中,易被污染,成功率低,而且会牺牲母株,一般先取花梗侧芽,经常规消毒后接种于MS + 6-BA 3~6 mg/L培养基上,在较高温度(25~30℃)下待侧芽萌发成花梗苗,再取其组织诱导原球茎。这样既可以避免对母株造成损失,又可以免去消毒这一环节,诱导分化的成功率高。目前以蝴蝶兰的叶片、根尖、茎尖、茎段等为外植体诱导原球茎已获得成功,但培养基及培养效果有差异。

2.1 外植体的选择

2.1.1 叶片诱导原球茎 早在1975年日本的田中道男^[4]便利用不同的花宝培养基和MS培养基,附加鲜苹果汁或椰乳或胰蛋白胨等及高浓度的NAA和KT进行蝴蝶兰实生苗叶片诱导原球茎试验,结果表明幼叶比老叶的诱导率高、叶中部比叶顶和叶基部的诱导率高,叶片不切割比切割的诱导率高,诱导培养条件为培养温度25℃、光强500 lx,每天光照16 h,黑暗或低温(20℃)不能诱导原球茎。张秀清等^[8]以蝴蝶兰实生苗叶片接种在MS + 6-BA 3 mg/L培养基上进行培养,结果未经切

割的幼叶诱导率高达90%，叶基部比叶中部和叶尖切块的诱导率高，叶片表面朝下几乎诱导不出原球茎。黄恩平等^[9]以叶片作外植体，接种于以MS附加不同浓度KT和NAA的培养基中诱导原球茎，但诱导率较低。曾宋君等^[7]认为叶片诱导原球茎最佳基本培养基为B₅，6-BA附加浓度为3~5 mg/L时诱导的原球茎最多、速度最快，而NAA对叶片诱导原球茎无明显作用，低浓度2,4-D(<0.5 mg/L)可促进愈伤组织形成、但抑制原球茎分化。杨美纯等^[10]研究认为6-BA是决定叶片原球茎发生的主要因子，无附加6-BA的情况下则诱导不出原球茎；6-BA浓度为1~3 mg/L时叶片原球茎诱导率低，叶片上出现的原球茎颗粒少，但个体比较大；随着6-BA浓度的升高，原球茎诱导率也升高，但个体较小，其中以6-BA 5mg/L的诱导效果为佳，浓度太高容易出现玻璃化现象导致原球茎变褐死亡。有研究认为，以MS作基本培养基，附加苹果汁、香蕉汁、椰乳可明显促进原球茎形成，在MS+6-BA 5 mg/L+15%椰子汁培养基上培养的叶片原球茎诱导率可达61.1%，而添加适量活性炭可有效防止外植体叶片褐变死亡。

2.1.2 根诱导原球茎 目前有关以蝴蝶兰根诱导原球茎的报道较少。其中，日本的长谷川、古川仁朗等曾有过报道，但诱导率很低。我国台湾的林瑞松在1981年将蝴蝶兰实生苗的根尖接种在B₅ 5 mg/L + 肌醇 100 mg/L + 烟酸 + VB₆ 1 mg/L + VB₁ 100 mg/L + 蔗糖 30 g/L + KT 10 mg/L + NAA的培养基上，原球茎诱导率达65%~70%。张秀清等^[8]在MS+6-BA 0.5 mg/L培养基上获得75%的根尖原球茎诱导率，但在根尖分生区以外的根段上诱导不出原球茎，且根尖过小易褐化死亡。李进进等^[11]将大棚蝴蝶兰苗根段接种在B₅ + NAA 1.5 mg/L + KT 0.2 mg/L + CM 150 mg/L培养基上诱导原球茎获得成功。曾宋君^[7]等研究认为MS培养基最适宜蝴蝶兰根尖原球茎诱导，6-BA浓度为5 mg/L较好，低浓度(0.5 mg/L)的2,4-D可明显促进PLB形成，NAA则对根原球茎诱导无明显效果，剪取根尖对母体影响甚微，外植体多，取材不受季节限制，是最理想的外植体来源。

2.1.3 茎尖诱导原球茎 茎尖是细胞分裂最旺盛部分，诱导成功率较高。例如，谭文澄等^[4]将蝴蝶兰花梗苗茎尖接种于MS+6-BA 3 mg/L培养基上可诱导出原球茎。张秀清等^[12]研究认为在MS+6-BA 0.5 mg/L + 15%香蕉汁培养基上诱导蝴蝶兰茎尖及外围组织形成原球茎的效果较好，诱导率与外植体接种密度成正比，密度大则诱导率高，但NAA对原球茎形成无明显效果。黄恩平等^[9]和王荣钦^[13]研究认为

茎尖诱导球茎要求较高的细胞分裂素浓度。胡海英等^[14]将蝴蝶兰花梗苗茎尖接种在MS+6-BA 3.0 mg/L+10%椰乳+5%马铃薯培养基上，原球茎诱导率达65%。秦凡等^[15]研究认为蝴蝶兰花梗苗茎尖诱导原球茎的细胞分裂素浓度以6-BA 3.0 mg/L最佳，高浓度(大于6.0 mg/L)会出现褐化死亡。袁全国等^[16]在MS+GA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L培养基上培养蝴蝶兰茎尖也获得原球茎。曾宋君等^[7]研究认为低浓度2,4-D(0.5 mg/L)对原球茎的形成有明显促进作用。

2.1.4 花梗诱导原球茎 曾宋君等^[7]研究认为将花梗切段接种在MS培养基上诱导原球茎的效果最好，6-BA浓度为1~20 mg/L都可诱导出原球茎，但以5~10 mg/L范围内的效果最佳。刘福林等^[17]在MS+6-BA 1~2 mg/L培养基上诱导花梗切片产生原球茎，诱导率高达77%。鲁雪华^[18]将幼嫩花梗节间切片接种在MS或1/2MS附加6-BA 5~7.5 mg/L、NAA 0.5~1 mg/L、15%椰子汁的培养基上，原球茎诱导率高达88.5%，其诱导率明显高于茎尖、根尖等外植体；研究还表明，切片反极性接种则诱导不出原球茎，附加椰子汁可明显增加原球茎发生、增殖及壮根。

蝴蝶兰原球茎一般在原诱导培养基上进行切割即可增殖，切块太小易褐化死亡；接种密度越大增殖效果越好，表现出明显的群体效应。增殖培养基中添加苹果汁、香蕉汁、椰乳可加快原球茎增殖，其中以椰乳的效果最佳。原球茎在增殖的同时也有一些分化成小苗。张秀清等^[8]研究认为MS培养基利于增殖，而KC培养基利于原球茎分化成芽。马子骏等^[19]认为原球茎的快速增殖与分化可以用6-BA来调控，高浓度(≥1.0 mg/L)能明显促进原球茎增殖，低浓度(0.4 mg/L)可促进分化，在改良KC培养基上其增殖量是KC培养基的2.5倍以上，且成本低、易配制，十分适合生产应用。曾宋君等^[7]认为原球茎在G₃上的增殖效果最好，6-BA浓度以2 mg/L为佳，0.5 mg/L的NAA可促进原球茎增殖。叶晓青等^[2]认为同时附加6-BA和NAA比单独使用更利于蝴蝶兰原球茎增殖，低浓度6-BA对原球茎增殖启动有利，而NAA利于增殖速度的维持。李向英^[20]认为在基本培养基中加入活性炭可减少原球茎污染，并明显减轻原球茎的钙化程度，防止褐变；而加入马铃薯汁可保持原球茎表面湿润，利于增殖和生长。王荣钦^[13]以含胶质的果菜汁替代椰乳，在不加任何激素的情况下原球茎的增殖效果仍很好。胡海英等^[14]研究发现，原球茎在KC+5%椰乳+6-BA 3 mg/L+10%马铃薯培养基上的增

殖倍数达 24.2 倍。杨美纯等^[10]认为 MS 培养基比 KC、KYOTO 培养基更利于原球茎增殖,原球茎在 MS + 6-BA 5 mg/L + 15% 椰乳 5 mg/L 上的增殖倍数达 10~15 倍。

2.2 壮苗、生根与移栽

有关研究认为,降低原球茎增殖培养基中的 6-BA 浓度可促进原球茎分化成完整植株,添加苹果汁、香蕉汁,椰乳可明显促进壮苗和生根,低浓度生长素利于生根,加入 MET(多效唑)可促进壮苗生根,提高移栽成活率。当生根苗长至 3~5cm 时可进行炼苗,炼苗后洗去根部培养基,用低浓度的多菌灵、KMnO₄ 等杀菌剂消毒后移植于大棚,栽培基质以水苔最佳。

3 不定芽增殖研究

通过蝴蝶兰的茎尖、幼苗等外植体直接诱导不定芽的产生,再切割丛生芽进行繁殖是蝴蝶兰快速繁殖的一种新途径。不定芽增殖率较低,但能保持母株性状,操作也比较容易,成功率高。王怀宇^[21]从蝴蝶兰营养芽诱导产生不定芽,但增殖系数低。林宗铿等^[22]花梗苗切去展开叶接种在花宝 1 号 3g + NAA 0.2 mg/L + 6-BA 5 mg/L + Ad 10 mg/L + 10% 椰子汁 + 肌醇 100 mg 培养基上诱导丛生芽,切去茎尖后增殖率明显提高,随着 6-BA 浓度的提高,丛生芽增殖率显著升高,但丛生芽变小、褐化率也增加,其中以 6-BA 5 mg/L 最合适。陈之林^[23]研究报道在较低温度(24℃)和较高浓度 6-BA 中蝴蝶兰花梗侧芽能诱导产生花萼,将花萼切片成 1~2 mm 后接种在 MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 5 mg/L 培养基上可诱导不定芽,培养基添加的糖浓度以 15 g/L 为宜,每年每个花萼可增殖约 2 万株小苗。

我们在培养基中附加较高浓度的 6-BA,用花梗苗尖诱导出不定芽,继代时缩短增殖周期 2 个月以上,且生长良好。

4 结语

目前对于蝴蝶兰组培快繁中的一些技术问题许多研究结果还不一致,甚至互相矛盾,这一方面说明蝴蝶兰不同品种、不同外植体部位对培养基和培养条件的要求不同,另一方面更说明蝴蝶兰的组培快繁仍有很多难题需要解决。

现今关于蝴蝶兰的组培快繁和栽培生理的研究较多,有关新品种的选育研究很少,我国栽培的蝴蝶兰新品种主要依靠从国外引进,市场上多为陈旧品种。因此,应加强育种工作,培育观赏性状较高、生长快、易于

栽培的蝴蝶兰新品种。此外,目前蝴蝶兰组培快繁大多以植物幼嫩部分为外植体,而采用成苗的器官或组织诱导脱分化研究很少、难度很大,今后亦应加强这方面的试验研究。

参考文献:

- [1] 鲁涤非. 花卉学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 298-300.
- [2] 叶晓青, 谢东. 不同激素水平对蝴蝶兰原球茎状体增殖影响[J]. 江苏林业科技, 2000, 27(增刊): 42-44.
- [3] 彭立新, 王姝, 孟广云. 蝴蝶兰组织培养快繁研究[J]. 天津农业科学, 1999, (5): 27-29.
- [4] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991, 247-258.
- [5] 杨美纯, 周岐伟, 许鸿源. 蝴蝶兰的种子培养[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(12): 258-260.
- [6] 王慧瑜, 张晓申, 杨录军, 等. 蝴蝶兰的胚培养技术和快速繁殖研究[J]. 北方园艺, 2003, 5: 57.
- [7] 曾宋君, 彭晓明, 张京丽, 等. 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖[J]. 武汉植物学研究, 2000, 18(4): 344-346.
- [8] 张秀清, 王志武, 王春英, 等. 蝴蝶兰实生苗原球茎诱导研究[J]. 莱阳农学院学报, 1995, 12(1): 44-46.
- [9] 黄恩平, 张云峰. 蝴蝶兰无性繁殖初探[J]. 云南教育学院学报, 1995, 11(5): 63-65.
- [10] 杨美纯, 周岐伟, 许鸿源, 等. 外部因子对蝴蝶兰叶片原球茎状体发生的影响[J]. 广西植物, 2000, 20(1): 42-46.
- [11] 李进进, 廖俊杰. 蝴蝶兰根段的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2003, 36(1): 37.
- [12] 张秀清, 王志武, 刘玉敬, 等. 蝴蝶兰实生苗不同器官的离体培养[J]. 植物学通报, 1996, 13(1): 50.
- [13] 王荣钦. 外植体部位激素浓度对卡特兰、蝴蝶兰原球茎形成与增殖的影响[J]. 福建热作科技, 2000, 25(1): 31-32.
- [14] 胡海英, 王建宇. 蝴蝶兰的离体培养和快繁技术研究[J]. 宁夏大学学报, 2002, 23(4): 367-369.
- [15] 秦凡, 周吉源. 蝴蝶兰的组织培养研究[J]. 生物学杂志, 2003, 20(3): 19-21.
- [16] 袁全国, 庞冉崎. 蝴蝶兰的组培快繁技术[J]. 北方园艺, 2002, 4: 61.
- [17] 刘福林, 李淑萍. 蝴蝶兰花梗的组织培养与植株再生[J]. 商丘师范学院学报, 2001, 17(6): 98-99.
- [18] 鲁雪华. 蝴蝶兰花梗节间段培养繁殖的初步研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(5): 491-492.
- [19] 马子骏, 王鲁彤. 蝴蝶兰工厂化生产技术研究[J]. 浙江林学院学报, 1998, 15(2): 192-196.
- [20] 李向英. 蝴蝶兰的快速繁殖及栽培管理研究[J]. 山东农业科学, 2000(4): 13-14.
- [21] 王怀宇. 蝴蝶兰的快速繁殖研究[J]. 园艺学报, 1989, 16(1): 73-77.
- [22] 林宗铿, 黄德贵. 蝴蝶兰花梗的组织培养及快速繁殖[J]. 福建热作科技, 2001, 26(1): 6-9.
- [23] 陈之林. 蝴蝶兰花萼的离体培养[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 242-244.