

蝴蝶兰组织培养及水培移栽技术

杨少辉, 季 静, 王 罡, 宋英今, 王洁华

(天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072)

摘要: 为探讨水培法移栽蝴蝶兰组培苗的可行性及其最佳营养液配方, 以蝴蝶兰叶片为外植体, 建立了植株再生系统, 并分析 5 种配方营养液对蝴蝶兰组培苗生长的影响. 结果表明, 实验中最佳蝴蝶兰类原球茎诱导培养基为 [MS + 0.4 mg/L α -萘乙酸 (NAA) + 6 mg/L 6-苄基氨基嘌呤 (6-BA)]. 自制营养液 IV 培养的蝴蝶兰植株生长势最强, 其大量元素配方为 [Ca (NO₃)₂ · 4H₂O 354 mg/L + KNO₃ 177 mg/L + KH₂PO₄ 57.5 mg/L + MgSO₄ · 7H₂O 185 mg/L]. 因此, 蝴蝶兰组培苗适宜用水培法进行移栽, 自制营养液 IV 及栽培管理技术能满足蝴蝶兰组培苗生长发育的需求.

关键词: 蝴蝶兰; 类原球茎; 组织培养; 水培; 营养液

中图分类号: R338.8

文献标志码: A

文章编号: 0493-2137 (2008) 06-0709-05

Tissue Culture of *Phalaenopsis* and Transplantation Technique by Water Culture

YANG Shao-hui, JI Jing, WANG Gang, SONG Ying-jin, Wang Jie-hua

(School of Agriculture and Biological Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: In order to study the feasibility of transplantation technique by water culture and the optimal nutrient formulation of *Phalaenopsis* tissue culture seedlings, the regeneration system from leaf explants of *Phalaenopsis* was developed, and the effects of five kinds of nutrient solution on the growth of seedlings were analyzed. The results show that the optimum protocorm-like bodies (PLBs) induction medium is [MS + 0.4 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA) + 6 mg/L 6-benzylaminopurine (6-BA)]. The growth vigor was the best of *Phalaenopsis* transplants in nutrient solution IV, in which the macro-elements included [Ca (NO₃)₂ · 4H₂O 354 mg/L + KNO₃ 177 mg/L + KH₂PO₄ 57.5 mg/L + MgSO₄ · 7H₂O 185 mg/L]. Therefore, it is suitable to transplant *Phalaenopsis* tissue culture seedlings by water culture using nutrient solution IV and the cultivating technique can meet the requirements of growth and development of seedlings.

Keywords: *Phalaenopsis*; protocorm-like body; tissue culture; water culture; nutrient solution

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*), 又名蝶兰, 兰科蝴蝶兰属多年生草本植物, 原产我国台湾、菲律宾等热带亚洲地区. 目前, 主要的蝴蝶兰品种均从台湾地区引进内陆. 蝴蝶兰花形似蝴蝶, 形态独特优雅, 色彩丰富, 花期长, 是近年最受欢迎的洋兰之一, 不仅是重要的室内盆栽花卉, 也是良好的切花材料. 但由于蝴蝶兰属于热带单茎附生兰, 植株极少发育侧枝, 对其进行常规无性繁殖, 增殖速度慢, 从而使得组培技术成为其大量繁殖的重要手段. 而且, 良好的植株再生

系统有助于保持优良性状, 维护种质资源, 还可进行细胞无性系筛选优良突变体等研究^[1-3].

水培花卉是继 20 世纪 60 年代世界农业“绿色革命”之后兴起的一场新的“种植革命”. 水培花卉属于无土栽培中的一种非固体介质型的静止水培、栽培的水陆均能生长的“两栖植物”, 是新型、环保、清洁的花卉栽培方式. 目前, 世界上仅有荷兰等少数几个国家在研究和种植水培花卉, 我国同类研究还处于探索阶段. 而关于蝴蝶兰组培苗的水培技术研究, 国内

收稿日期: 2006-07-31; 修回日期: 2008-01-02.

基金项目: 天津市农业科技成果转化与推广基金资助项目 (04260); 天津市科技发展计划基金资助项目 (06YFGZNC01700); 科技部农业科技成果转化基金资助项目 (2006GB2A100013).

作者简介: 杨少辉 (1977—), 女, 博士, 讲师.

通讯作者: 季 静, jijingtjdx@163.com.

外尚未见报道。

为了建立优良的蝴蝶兰再生系统,探讨水培法移栽蝴蝶兰组培苗的可行性,本文实验以蝴蝶兰叶片为外植体,比较不同浓度的 6-BA 对类原球茎的诱导情况,分析 5 种配方营养液对蝴蝶兰组培苗生长的影响,筛选其适宜的营养液配方。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验于 2005 年 3 月至 2007 年 3 月在天津大学农业与生物工程学院植物基因工程研究中心进行。供试蝴蝶兰品种(17#)由本实验室保存提供。

1.2 实验方法

1.2.1 类原球茎诱导培养

取盆栽小苗叶片用 10%次氯酸钠溶液进行常规灭菌,或利用无菌苗切取叶片,在无菌条件下用解剖刀切成约 1 cm × 1 cm 的小块作为外植体。

为研究激素 6-BA 对蝴蝶兰叶片类原球茎的诱导,实验中设计了 5 种培养基处理,培养基配方为

[MS + 0.4 mg/L NAA +
(0 mg/L、2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L、8 mg/L、
10 mg/L) 6-BA]。

所有培养基琼脂含量均为 8 g/L、蔗糖 30 g/L, pH 值 5.4 ~ 5.6。将外植体接种至 5 种培养基中,每瓶 5 个外植体,每处理 20 瓶,3 次重复。接种后移入培养室培养,温度为 (25 ± 2)℃。诱导培养的前 10 天先采用黑暗预处理,以后光照 16 h/d,光强 2 000 Lux。60 d 后调查原球茎诱导情况。

1.2.2 类原球茎增殖培养

将从叶片诱导出来的类原球茎用解剖刀沿桑果状沟裂分切,每一块块粒径约 2 mm,倒置入增殖培养基

[MS + 4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 40 mL/L 椰汁 + 60 mg/L 香蕉 + 2 mg/L 活性炭]

温度 (25 ± 2)℃,光照 16 h/d,光强 2 000 Lux。

1.2.3 植株再生

将出芽的类原球茎继代培养于

[1/2 MS + 60 mg/L 香蕉 + 2 g/L 活性炭]

温度 (25 ± 2)℃,光照 16 h/d,光强 2 000 Lux。

1.2.4 水培移栽

当蝴蝶兰组培苗长到 3 ~ 4 叶、6 cm 高、2 ~ 3 条根时,炼苗 7 ~ 10 d 后从容器中取出进行水培移栽。培养条件为白天 26℃,晚上 20℃,湿度 75%,光强 11 000 Lux。

根据蝴蝶兰的生物学特性和相关资料^[4-6],本实验设计 5 种营养液配方,包括霍格兰营养液配方^[7]、日本园试配方^[7]和 3 种自制营养液,清水为对照,比较不同营养液中植株的生长情况,以筛选蝴蝶兰水培的最适营养液配方。每处理选用 30 株大小和长势基本一致的植株,每周更换 1 次营养液,同时每天早晚各搅拌一次营养液,保持溶解氧含量。实验中采用 1 mol/L 的 H₂SO₄ 和 NaOH 调节营养液的 pH 值,使其稳定在 pH 5.4~5.6 之间。实验开始前对供试幼苗的叶展、叶片数、根条数和鲜重 4 个指标进行测量,培养 40 d 后再次测定移栽苗的生长情况并进行对比分析。

表 1 供试营养液配方

Tab. 1 Chemical composition of nutrient solution

营养液配方		化合物组成/(mg · L ⁻¹)						
		Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	KNO ₃	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ · 7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ H ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃
大量元素	I	945.0	607.0		493.0		115.0	
	II	945.0	809.0		493.0		153.0	
	III	945.0	404.0	340.0	493.0	132.0		
	IV	354.0	177.0	57.5	185.0			
	V	142.0	222.0	136.0	222.0			80
微量元素配方		FeSO ₄ · 7H ₂ O	EDTA-2Na	H ₃ BO ₃	MnSO ₄ · 4H ₂ O	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	CuSO ₄ · 5H ₂ O	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O
		27.8	37.2	2.86	2.13	0.22	0.08	0.02

注: I 为霍格兰营养液配方; II 为日本园试配方; III ~ V 为自制营养液。各配方中微量元素含量相同。

2 结果与讨论

2.1 类原球茎的产生、增殖及植株再生

类原球茎是兰科植物组织培养中所产生的特有现象,也是兰花快繁技术中的一个重要形式。Ishii

等^[8]对蝴蝶兰组织培养中产生的类原球茎进行组织学研究时观察发现,该类原球茎的解剖结构与体细胞胚的结构相似,即类原球茎为体细胞胚。

叶片外植体放入类原球茎诱导培养基后,第 3 天便可观察到培养物伤口附近开始褐化。有关研究

表明,导致褐化的主要原因是多酚氧化酶作用于天然底物酚类物质形成醌引起的^[9-10]。多酚氧化酶属于植物体内末端氧化酶系统,光照会促进此酶的活性。所以,为减轻褐化影响,诱导培养的前 10 天先采用黑暗预处理,培养 30 天后,即发现切口处陆续产生浅绿色的类原球茎状小突起,小突起是叶的近轴面叶肉和表皮细胞分裂增生形成的,这些细胞具有旺盛的分生能力,很快发育成为类原球茎,用镊子轻轻拨动即可使原球茎状体与外植体分离。

类原球茎形成 1 个月后,把单个或丛生的类原球茎从外植体上分离下来,移至增殖培养基中,1 个月后,类原球茎周围有成团的第 2 代类原球茎 (protocorm-like bodies, PLBs) 产生,增殖倍数可达数 10 倍 (见图 1)。把肉眼可见,具有 1~2 片叶原基的类原球茎 (见图 2)转入植株再生培养基中,2~

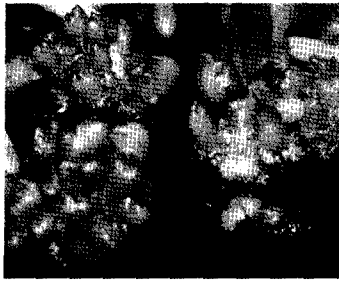


图 1 类原球茎的增殖
Fig.1 Reproagation of PLBs



图 2 具叶原基的类原球茎
Fig.2 PLBs with leaf primordium

3 个月后可长成具 3 叶片 4 条粗根的蝴蝶兰小苗。

研究发现,蝴蝶兰叶片外植体在类原球茎诱导培养基中培养时具有极性现象,正面向上放置的叶片外植体类原球茎的诱导率明显高于反放和斜插在培养基上的叶片外植体,反放和斜插的叶片在培养中几乎不能诱导出类原球茎。因此,在蝴蝶兰组织培养接种时应注意叶片外植体的摆放方向以利于类原球茎的诱导。

2.2 6-BA 浓度对蝴蝶兰类原球茎诱导的影响

通过观察,类原球茎在接种后培养的前 20 d 内并无明显变化。培养 20~30 d 后,6-BA 质量浓度为 4 mg/L 以上的处理均陆续有类原球茎形成,类原球茎数分别为 3~9 个。

表 2 6-BA 浓度对蝴蝶兰叶片类原球茎诱导的影响
Tab.2 Effects of 6-BA on PLBs formation in *Phalaenopsis* leaves

6-BA/ (mg · L ⁻¹)	外植体总数	产生 PLBs 的外植体数/个	产生 PLBs 总数/个	诱导率/%*	平均 PLBs 直径/cm
0	300	0	0	0	0
2	300	18	32	6	2.53
4	300	33	94	11	2.98
6	300	75	317	25	3.12
8	300	87	431	29	1.52
10	300	99	589	33	0.97

注:*诱导率 (%) = 产生类原球茎的外植体数/外植体总数 × 100 %.

由表 2 可知,不同浓度的 6-BA 对类原球茎诱导率及原球茎大小的影响比较明显。含不同浓度 6-BA 的各组培养基中,6-BA 质量浓度为 2 mg/L 和 4 mg/L 两组的类原球茎诱导率较低 (6%和 11%),而且每个叶片外植体上产生的类原球茎数也较少,但类原球茎颗粒较大,直径为 2~3 mm,以后均能发育成具有根、叶的正常小苗。随着 6-BA 质量浓度提高,类原球茎诱导率逐渐提高。当 6-BA 质量浓度为 8 mg/L 和 10 mg/L 时,类原球茎诱导率高达 29%和 33%,每个外植体上产生的类原球茎数量多,但类原球茎细弱,

直径一般在 1~1.5 mm,若不及时转入无 6-BA 培养基中,则多数类原球茎会玻璃化,最后变褐死亡,很难进一步增殖生长成正常植株。

在本实验条件下,当 6-BA 质量浓度为 6 mg/L 时,既能获得较高的类原球茎诱导率 (25%)和类原球茎 (平均直径为 3.12 cm)又能继续生长,发育成具根、叶的正常小苗。因此在原球茎的诱导实验中,选择 6-BA 的最佳质量浓度为 6 mg/L。

2.3 不同营养液对蝴蝶兰组培苗移栽生长的影响

为探讨蝴蝶兰对水培的适应性及最适宜的营养

液配方,进行了蝴蝶兰不同营养液配方水培比较实验. 实验中取相同长势的组培苗,进行不同营养液配方的水培实验,实验结果见表 3.

表 3 不同配方营养液对蝴蝶兰组培苗生长的影响

Tab.3 Effects of different nutrient solutions on the growth of *Phalaenopsis* tissue culture seedlings

培养天数/d	处理	成活率/%	叶展增量/cm	新叶数/片	新根数/条	鲜重增量/g	相对平均值/%
40	CK	100	0.06 (±0.02) e	0 e	0.02 (±0.01) d	1.23 (±0.04) d	27.7 e
40	I	100	1.31 (±0.09) cd	0.21 (±0.06) bc	0.32 (±0.05) b	2.86 (±0.12) bc	72.06 e
40	II	100	1.96 (±0.12) ab	0.23 (±0.04) b	0.30 (±0.08) b	3.28 (±0.81) ab	80 bc
40	III	100	1.01 (±0.05) d	0.12 (±0.02) d	0.21 (±0.03) e	2.56 (±0.13) e	57.82 d
40	IV	100	2.43 (±0.05) a	0.32 (±0.01) a	0.48 (±0.03) a	3.86 (±0.09) a	100 a
40	V	100	1.66 (±0.04) bc	0.18 (±0.01) c	0.23 (±0.03) e	2.86 (±0.22) bc	69.31 c
70	CK	97.78	0.13 (±0.03) e	0 d	0.38 (±0.06) d	3.05 (±0.19) d	35.49 e
70	I	97.78	2.44 (±0.13) d	0.55 (±0.08) b	0.75 (±0.02) b	6.59 (±0.44) b	76.72 e
70	II	98.89	3.65 (±0.19) b	0.49 (±0.09) b	0.89 (±0.06) a	8.01 (±0.24) a	86.50 b
70	III	97.78	2.62 (±0.13) cd	0.35 (±0.06) c	0.58 (±0.03) c	5.84 (±0.35) e	66.37 d
70	IV	98.89	4.95 (±0.08) a	0.69 (±0.02) a	0.92 (±0.07) a	8.81 (±0.12) a	100 a
70	V	97.78	3.07 (±0.04) bc	0.34 (±0.04) c	0.52 (±0.02) e	6.94 (±0.36) b	69.09 cd
100	CK	91.11	0.15 (±0.02) d	0 e	0.69 (±0.12) d	5.56 (±0.38) d	35.80 d
100	I	94.44	5.63 (±0.22) b	0.75 (±0.12) b	1.13 (±0.08) b	11.72 (±0.56) b	79.46 b
100	II	97.78	5.98 (±0.38) b	0.68 (±0.05) bc	1.43 (±0.07) a	12.08 (±0.42) b	84.26 b
100	III	96.67	4.06 (±0.19) c	0.46 (±0.04) d	0.89 (±0.08) c	8.21 (±0.52) e	62.34 e
100	IV	96.67	7.69 (±0.06) a	1.01 (±0.06) a	1.45 (±0.04) a	15.79 (±0.12) a	100 a
100	V	95.56	5.86 (±0.07) b	0.65 (±0.05) c	1.12 (±0.07) b	11.32 (±0.43) b	77.71 b

注:表中括号内数字为标准差;同一列后标有不同字母表示达 5% 显著性差异水平,相对平均值指同一培养天数不同营养液处理间与最高测试指标比值的平均值.

从表 3 可以看出,蝴蝶兰组培苗移栽后在参试的 5 种营养液及对照中均可生长,但从成活率、叶展增量、新叶数、新根数、鲜重增量等 5 个指标综合分析,发现水培的最佳营养液均为自制营养液 IV,其次是日本园试配方 (II) 和霍格兰营养液配方 (I),在清水中生长最为缓慢.

采用不同营养液处理,移栽苗成活率差异不显著,尤其在移栽培养前 40 d,所有移栽苗均能正常存活,这可能是由于比较适宜水培移栽,而且在蝴蝶兰水培条件下,除了保证适宜的空气湿度外,根系还能吸收充足的水分满足移栽后缓苗期的水分需求,符合蝴蝶兰这种亚热带植物对水分的需求特点.随着培养时间延长,对照处理中蝴蝶兰叶片变黄凋落、部分根系腐烂,甚至有些植株开始死亡,而且在整个实验过程中,无新叶产生,叶展增量、萌发新根数及植株鲜重增量也较少.

从 3 次测定移栽苗的生长情况分析,自制营养液 IV 对叶展增量、新叶数、新根数和鲜重增量 4 个指标的影响最佳.从外观看,营养液 IV 培养的蝴蝶兰植株生长势最强,根系生长旺盛,萌发新根和新叶数最

多,新叶生长速度较快,叶展变化最大,植株鲜重增量最多,结果表明,营养液 IV 中的营养元素及配比情况适合蝴蝶兰生长发育的需求.

3 结 论

(1) 筛选了适于蝴蝶兰叶片为外植体的再生条件,建立了再生系统,即

类原球茎诱导培养基为 [MS+0.4 mg/L NAA + 6 mg/L 6-BA];

类原球茎增殖培养基为 [MS+4 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 40 mL/L 椰汁 + 60 mg/L 香蕉 + 2 mg/L 活性炭];

植株再生培养基为 [1/2 MS + 60 mg/L 香蕉 + 2 g/L 活性炭].

(2) 蝴蝶兰叶片外植体在类原球茎诱导培养基中培养时具有极性现象,正面向上放置的叶片外植体类原球茎的诱导率最高.

(3) 蝴蝶兰组培苗适宜用水培法进行移栽,最适营养液为自制营养液 IV,其大量元素配方为

[Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 354 mg/L+KNO₃ 177 mg/L+KH₂PO₄ 57.5 mg/L+MgSO₄ · 7H₂O 185 mg/L].

参考文献:

- [1] Chen Y H, Tsai Y J, Huang J Z, et al. Transcription analysis of pelory mutants of *Phalaenopsis orchids* derived from tissue culture [J]. *Cell Research*, 2005, 15 (8): 639-657.
- [2] Park S Y, Yeung E C, Hakrabary D. An efficient direct induction of protocorm-like-bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis hybrid* using thin-section culture [J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 21 (1): 46-51.
- [3] Obaidul I, Syoichi I, Shuichiro M. Control of growth and development of protocorm like body derived from callus by carbon sources in *Phalaenopsis* [J]. *Plant Biotechnology*, 1998, 15 (4): 183-187.
- [4] 陈元镇. 花卉无土栽培的基质与营养液 [J]. 福建农业学报, 2002, 17 (2): 128-131.
Chen Yuanzhen. Medium substance and nutrient solution of soilless cultural flowers [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2002, 17 (2): 128-131 (in Chinese).
- [5] Tanaka T, Kume M, Kajimoto R, et al. Effects of N-form and time of fertilizer application on growth and flowering of a *Phalaenopsis hybrid* [J]. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University*, 1998, 45 (1/2): 43-46.
- [6] 刘晓荣, 王碧青, 朱根发, 等. 影响蝴蝶兰生长发育的环境因子及花期调控研究进展 [J]. 西北农业学报, 2005, 14 (4): 81-85.
Liu Xiaorong, Wang Biqing, Zhu Genfa, et al. Research advance on factors affecting growth and flowering regulation of *Phalaenopsis orchid* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2005, 14 (4): 81-85 (in Chinese).
- [7] 王华芳. 水培花卉 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
Wang Huafang. *Flower Water Culture* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002 (in Chinese).
- [8] Ishii Y, Takamura T, Goi M, et al. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17 (6/7): 446-450.
- [9] Wei Tang, Newton R J. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana Mill*) [J]. *Plant Science*, 2004, 167 (3): 621-628.
- [10] Elia N, Mercado S E. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 33 (3): 275-283.