

蝴蝶兰花梗腋芽离体快繁控制褐变的研究

余慧琳¹, 王爱武¹, 赵辉², 刘广卿³, 李艳萍³

(¹商丘职业技术学院园林系, 河南商丘 476000; ²信阳市气象局, 河南信阳 464000;

³商丘市农林科学研究所, 河南商丘 476000)

摘要:褐变是蝴蝶兰离体培养中的常见现象, 试验尝试探寻蝴蝶兰花梗腋芽离体快繁过程中有效控制其褐变的方法, 诱导丛生芽。试验证明: 带腋芽花梗节段褐变程度比腋芽要轻; 适当的暗培养有利于减轻外植体的褐变; 细胞分裂素KT比BA的褐变症状要轻, 但丛生芽的诱导率不如BA; 适当添加一定剂量的PVP、活性炭、柠檬酸等可减轻褐变, 柠檬酸、PVP效果比活性炭显著, 为特色花卉的工厂化生产提供参考。

关键词: 蝴蝶兰; 花梗腋芽; 离体快繁; 褐变

中图分类号: S3 **文献标识码:** A

Study of Rapid Propagation Axillary Browning Control about Butterfly Orchids Stems *In vitro*

Yu Huilin¹, Wang Aiwu¹, Zhao Hui², Liu Guangqing³, Li Yanping³

(¹Shangqiu Vocational and Technical College, Shangqiu Henan 476000;

²Xinyang Meteorological Bureau, Xinyang Henan 464000;

³Institute of Agriculture and Forestry Science in Shangqiu, Shangqiu Henan 476000)

Abstract: Browning is a common phenomenon of Phalaenopsis *in vitro* culture, this test attempts to explore the rapid propagation effective way of butterfly orchid stems Axillary process of *in vitro* to control their browning, bud induction. Tests prove that all those with axillary pedicel browning segment are lighter than axillary and Cytokinin KT browning symptoms lighter than BA, Bud induction rate than BA; It may reduce the browning that add the appropriate dose of PVP, activated carbon, citric acid etc, citric acid and PVP significantly make better than activated carbon, which provides a reference for the factory about the production of Characteristics flowers and plants.

Key words: phalaenopsis, pedicel axillary, tissue culture, browning

蝴蝶兰为兰科蝴蝶兰属花卉, 其花形酷似蝴蝶, 花色丰富艳丽, 花期持久, 花形独特, 气质高雅, 花序由数量不等的花朵成队排列犹如一列蝴蝶在空中翩翩起舞, 使人百看不厌, 深受消费者喜爱, 素有“洋兰皇后”之美誉。蝴蝶兰每株只有一个直立茎, 植株上极少发育侧枝, 难以进行传统的无性繁殖。其花梗通常只有4~5个腋芽, 腋芽启动培养的效果直接关系到增殖培养时无菌材料的多少, 从而影响花梗快速繁殖的效率。利用花梗离体培养是当前蝴蝶兰快速繁殖的主要途径^[1-3]。

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^[1]。关于蝴蝶兰花梗培养的报道集中在不定芽和PLB增殖的研究^[2-6], 而对于花梗腋芽培养如何控制褐变的研究很少, 因此此文着重进行了蝴蝶兰花梗腋芽离体快繁如何控制褐变的试验, 旨在为高频率诱导花梗试管苗, 工厂化生产蝴蝶兰提供参考。

1 材料与方法

材料由商丘鑫财花卉公司提供的蝴蝶兰植株, 品

第一作者简介: 余慧琳, 女, 1966年出生, 河南商丘人, 商丘职业技术学院副教授, 硕士学位, 从事生物技术教学与应用研究。通信地址: 476000 河南省商丘市神火大道南段566号, 商丘职业技术学院园林食品加工系, E-mail: huilinyu@163.com。

收稿日期: 2009-03-20, **修回日期:** 2009-03-30。

种为小男孩,取其已过盛花期带休眠芽的花梗作为外植体材料。

取材及消毒:在植株开花后,选取健壮无病虫害蝴蝶兰植株,将花梗剪下,剥除已开放的花朵和花蕾后先用洗衣粉等将花柄清洗干净,用软毛刷轻轻正反两面刷洗,用解剖刀把花梗茎节外面的苞叶剥离,并用解剖刀把节与节相接的地方清除干净,然后用自来水反复小水流动冲洗1~2 h后用无菌水泡洗10 min,在超净工作台上进行表面消毒,即先用75%酒精浸泡15~20 s,用无菌水冲洗2~3次,再用0.1%升汞溶液(加1~2滴吐温-80)浸泡15 min,(在此过程中要不断摇晃灭菌瓶让材料充分消毒),最后用无菌水冲洗4~5次,每次2~3 min,无菌滤纸吸干后切成1~2 cm长的茎段,每段留侧芽或茎节,准备接种。

外植体接种:分别以带腋芽的花梗节段和花梗腋芽为外植体,按生长极性,接种到培养基上。

培养基:以MS、1/2MS、1/3 MS、1/4 MS为基本培养基(注:无机盐大量元素给予不同程度的减少,而无

机盐微量元素和有机物质的含量都不变),蔗糖3.0%,琼脂粉0.7%,调pH为5.5~5.8。激素用BA、KT的组合,培养基用280 ml的组培瓶分装,每瓶30 ml,121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

培养条件:培养室温度为22~25 °C,每天光照14 h,光照强度2000 lx。

2 结果与分析

2.1 外植体不同接种方式对褐变情况的影响

试验采用花梗腋芽和带腋芽花梗节段两种方式接种,每周观察两种外植体的萌芽状况及培养基褐变情况。结果表明:在相同的培养基上(1/3MS+BA3.0 mg/L),带腋芽花梗节段接种一周左右,休眠的腋芽就开始膨大并向上伸长,培养基未出现褐变,四周左右长出小叶,叶片饱满,腋芽的萌发率在80%以上,培养基轻微褐变。花梗腋芽接种两周内变化不大,第三周芽苞开始膨大,培养基出现褐变,4周后腋芽的体积增大约一半,苞片也随之开裂,但是培养基附近褐变严重,腋芽不能正常萌发形成叶片,最终褐化死亡。

表1 不同外植体在两种培养光照下萌芽及发生褐变情况

外植体	培养环境	1周		2周		3周		4周	
		萌芽情况	褐变情况	萌芽情况	褐变情况	萌芽情况	褐变情况	萌芽情况	褐变情况
花梗腋芽	暗培养	—	—	—	—	芽苞开始膨大	培养基出现褐变+	芽苞体积变大	褐变加重++
	2000lx培养	—	3天后出现褐变+	—	褐变加重++	芽苞开始膨大	培养基褐变加重++	芽苞体积增大1半,开裂,无叶片	褐变严重+++
腋芽花梗节段	暗培养	—	无褐变	芽膨大	轻微褐变	芽膨大并伸长	轻微褐变	芽苞体积增大,开裂,小叶长出	轻微褐变+
	2000lx培养	腋芽膨大	无褐变	继续膨大	褐变+	芽膨大并伸长	褐变++	长出小叶,叶片饱满	褐变++

2.2 不同光照对外植体褐变的影响

由表1可见,无论是花梗腋芽还是花梗节段(带腋芽)的外植体暗培养一周后再转入光强2000 lx下正常培养,都比接种后直接放在2000 lx条件下培养,外植体发生褐变症状要轻,有些仅仅是培养基颜色略微发黑,并未影响到外植体的萌芽和分化,并且发生褐变的时间推迟。因此,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^[4]。

2.3 不同培养基对花梗腋芽萌发褐变情况的影响

将基本培养基分别设置为MS、1/2MS、1/3 MS、1/4 MS。各培养基均加BA 3.0 mg/L,外植体采用花后花梗基部上数第3、4节附带腋芽的节段,4周后观察结果见表2。

表2 培养基对蝴蝶兰花梗腋芽萌发的影响

培养基	接种数	萌芽数	芽苗生长情况	培养基褐变情况
MS	10	3	叶片健壮,色浓绿	一周后出现褐变,严重,5周后材料坏死++++
1/2MS	10	7	叶片较小,不很粗壮	二周后出现褐变++
1/3MS	10	9	叶片肥厚,色浓绿,	褐变症状相对较轻++
1/4MS	10	7	叶片稍薄,色黄	褐变症状较轻+

外植体接种1周后,各处理的茎段腋芽膨大并向上升,开始萌动,以后陆续萌芽,长出芽苗。MS培养基上首先出现褐色物质,2周后1/2MS培养基上依次出现褐色现象,但是程度以MS培养基最重。因此低浓度的大量元素能减轻外植体褐变的发生。4周后观察几组萌芽率发现,1/3MS培养基中的外植体萌芽率最高,10个外植体有9个都出现丛芽并且还出现有2~3个丛芽现象。芽苗长势健壮,叶片肥厚,色浓绿,故减少培养基中的大量元素浓度含量可以提高蝴蝶兰花梗腋芽的萌发率,但MS的大量元素继续减少时,花梗腋芽的萌发率又会降低^[5],6周后观察,用低

浓度无机盐处理的腋芽,芽苗生长状态较差,表现在芽苗细小瘦弱,生长停滞,叶端变黄等症状。所以培养过程要及时更换培养基,以防无机营养的不足,而影响苗的生长^[6]。

2.4 不同激素浓度对花梗腋芽萌发褐变的影响

以蝴蝶兰花后带腋芽花梗节段为外植体,以1/3MS为基本培养基,同时添加不同浓度的6-BA和KT,接种培养2周后,观察到诱导蝴蝶兰花梗腋芽的分化随外源激素的种类和浓度配比的不同而产生不同的结果,外植体的褐变也从培养基颜色的深浅上得到充分反映。培养4周后统计结果见表3。

表3 不同激素浓度对花梗腋芽萌发褐变的影响

培养基	接种数	萌芽数	芽苗生长状况	培养基褐变情况
1/3MS(对照组)	10	3	芽苗个体小,色淡黄,长势弱	培养基褐化+
1/3MS+BA1.0	10	27	出现丛生芽,芽苗色黄	培养基褐化+
1/3MS+KT1.0	10	9	芽苗细小瘦弱,叶端变黄	培养基褐化不严重
1/3MS+BA2.0	10	49	有丛芽,芽苗生长正常,色绿	培养基褐化++
1/3MS+KT2.0	10	11	芽苗稍多,芽苗个体小	培养基褐化较少
1/3MS+BA3.0	10	24	颜色嫩绿,芽体健壮,叶片肥厚	培养基褐化+++
1/3MS+KT3.0	10	18	出现丛芽,芽苗生长正常,色绿	培养基褐化较少
1/3MS+BA1.5+KT1.5	10	34	丛芽多,色绿,叶片厚,长势好	培养基褐化++

由表3可见,培养基中不含外源激素时,培养30天也有3.0%的花梗腋芽萌发,但未见丛生芽,且培养基有褐化现象,在培养基中添加BA和KT可提高蝴蝶兰花梗腋芽的萌发率,且可形成2~3个丛生的营养芽,以BA浓度为3.0,KT浓度为3.0萌芽效果好。从表3萌芽个数对比,KT对蝴蝶兰苗的分裂效果远不及BA强,但培养基褐化程度却较浅;BA与KT同时使用,浓度都为1.5时,其蝴蝶兰的增殖率较

单独使用KT3.0高出近2倍,比单独使用BA萌芽效果也显著,且培养基褐化并非十分严重,反应BA+KT有增效作用。

2.5 不同添加剂对花梗腋芽萌发是否褐变的影响

褐化是蝴蝶兰离体培养中的常见现象,进行抗褐化处理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,同样没有达到离体培养的目的。

表4 不同添加剂对花梗腋芽萌发是否褐变的影响

外植体	培养环境	对照		柠檬酸		PVP		活性炭	
		一般	褐化程度	200 mg/L	褐化程度	1 mg/L	褐化程度	500 mg/L	褐化程度
带腋芽花梗节段	暗培养1周	一般	++	较好	++	较好	+	差	+
	常规培养照度2000 lx	差	+++	一般	+++	一般	++	差	++

柠檬酸是褐变抑制剂,活性炭和PVP均为吸附剂,但活性炭是一种无机吸附剂,能吸附各种微小颗粒,PVP是酚类物质的专一性吸附剂^[7]。

由表4可见,加入活性炭后的褐化程度较轻,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^[8]。因此,活性炭并非最佳选择,从表看,

最佳的处理是附加适量柠檬酸或PVP并采用暗培养方式,即在一定程度上抑制了褐化,同时也获得了较好的芽萌发率和增殖效果。

3 讨论

蝴蝶兰花梗培养是开花后取材,可以了解植株的开花性状,又不损伤母株,以花梗为材料建立蝴蝶兰的无性繁殖体系,比采用根尖、茎尖和种子进行蝴蝶兰的快速无性繁殖更有应用价值。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,进行抗褐化处理目的是为了获得芽的高萌发率和增殖倍数。

研究针对褐变问题从四个角度进行试验,尝试探寻蝴蝶兰花梗腋芽培养过程中有效控制其褐变的方法,诱导丛生芽。实验证明:带腋芽花梗节段褐变程度比腋芽要轻;适当的暗培养有利于减轻外植体的褐变;细胞分裂素KT比BA的褐变症状要轻,但从生芽的诱导率不如BA,BA+KT有增效作用;适当添加一定剂量的PVP、活性炭、柠檬酸等可减轻褐变,柠檬酸、PVP效果比活性炭显著,为特色花卉的工厂化生产提供参考。

受试验条件限制,BA+KT增效作用没有进行继续试验,其最佳配比浓度如何等问题为后续研究留下切入点,同时此实验设计到最高激素浓度为3.0,高浓度激素对外植体影响以及细胞分裂素的增效对褐变情况的影响有待进一步研究。

参考文献

- [1] 伍成厚,卞阿娜,梁承邨,等.蝴蝶兰花梗培养的研究[J].漳州师范学院学报:自然科学版,2004,9:70-73.
- [2] 邵双,关丽杰.蝴蝶兰花梗腋芽诱导的影响因素[J].沈阳化工学院学报,2005,2:84-86.
- [3] 魏琪,李凤兰,胡国富,等.蝴蝶兰快速繁殖研究进展[J].园艺学报 2006,33(4):915-920.
- [4] 李洪忠,冯艳秋,张秀丽,等.蝴蝶兰花梗初代培养的研究[J].辽宁农业职业技术学院学报,2006,9:31-33.
- [5] 王玉英,李枝林,余朝秀,等.蝴蝶兰离体快繁技术研究[J].西部林业科学,2006,6:99-101.
- [6] 赵伶俐,葛红,范崇辉,等.不同光照强度对蝴蝶兰组培中外植体褐化的影响[J].北方园艺2006,(4):160-161.
- [7] 胡孔峰.植物组织培养技术及应用[M].郑州:河南科学技术出版社,2006:61-66.
- [8] 卜朝阳.蝴蝶兰高效离体繁殖途径的研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,12:69-72.