

## 蝴蝶兰叶片诱导类原球茎初探

张 玉<sup>1,2</sup>, 李艳敏<sup>2</sup>, 张和臣<sup>2</sup>, 王利民<sup>2</sup>, 王慧娟<sup>2</sup>, 张鸽香<sup>1\*</sup>

(1. 南京林业大学 风景园林学院, 江苏 南京 210037; 2. 河南省农业科学院 园艺研究所, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 以蝴蝶兰杂交品种 H807 无菌苗的叶片为材料, 研究了防褐化物质(柠檬酸、抗坏血酸及活性炭)和细胞分裂素(6-BA 与 TDZ)对类原球茎诱导的影响。结果表明: 在添加 70 mg/L 抗坏血酸的培养基中, 叶片褐化级别仅为 1 级, 防褐化效果最佳; 3 mg/L 的 TDZ 对蝴蝶兰叶片诱导类原球茎的诱导率最高, 为 75.0%。在以 1/2MS 附加 70 mg/L 抗坏血酸的基础上, 激素组合 TDZ 3 mg/L+NAA 1 mg/L 对蝴蝶兰 H807 类原球茎的诱导效果最佳。

**关键词:** 蝴蝶兰; 叶片; 褐化; 类原球茎; 诱导率

**中图分类号:** S682.31      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2012)02-0126-04

## Study on Protocorn-like Body Induced from the Leaves of *Phalaenopsis amabilis*

ZHANG Yu<sup>1,2</sup>, LI Yan-min<sup>2</sup>, ZHANG He-chen<sup>2</sup>, WANG Li-min<sup>2</sup>,  
WANG Hui-juan<sup>2</sup>, ZHANG Ge-xiang<sup>1\*</sup>

(1. College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. Institute of Horticulture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** There are serious browning and low induction rate when the protocorn-like body (PLB) was induced from leaves of *Phalaenopsis amabilis*. Using the grem free leaf of *Phalaenopsis amabilis* H807 as materials, the effects of anti-browning materials(citric acid, ascorbic acid and activated charcoal)and cytokinins (6-BA and TDZ) on the protocorn-like body induction was investigated. The results indicated that the rank of anti-browning only reached the level 1 with 70 mg/L ascorbic acid, which was best to prevent *in vitro* leaves from browning. The protocorn-like body induction rate reached 75.0% with 3 mg/L TDZ. On the medium with 1/2MS+70 mg/L ascorbic acid, hormone combination of 3 mg/L TDZ+1 mg/L NAA was the best for PLB induction.

**Key words:** *Phalaenopsis amabilis*; leaf; browning; the protocorn-like body; induction rate

蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)是多年生草本植物, 属单子叶植物纲, 兰科蝴蝶兰属, 是附生兰的一种。其花姿优美, 颜色华丽, 为热带兰中的珍品, 有“兰中皇后”之美誉, 是兰科植物中栽培最广泛、最受欢迎的种类, 也是世界上最具有商业价值的四大观赏热带兰之一。蝴蝶兰为单茎气生兰, 极少发育侧枝, 形成种子困难, 不易进行常规繁殖, 所以蝴蝶

兰大多采用组织培养方式进行繁殖。但是褐变问题一直是影响蝴蝶兰组培快速发展的障碍, 简便有效地控制蝴蝶兰褐化现象是蝴蝶兰组培中亟待解决的问题。

早期蝴蝶兰的繁殖是利用人工授粉后得到的种子进行非共生萌发的, 这种繁殖方式种苗变异率高, 难以形成品质统一的规模栽培。利用类原球茎分化

收稿日期: 2011-10-20

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(092102110127)

作者简介: 张 玉(1987-), 女, 河南信阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 园林植物与观赏园艺。E-mail: henlycen2@163.com \*

通讯作者: 张鸽香(1967-), 女, 江苏高邮人, 副教授, 博士, 主要从事园林植物的生产、栽培与应用研究。

E-mail: nld-zhang@njfu.com.cn

得到完整植株,是兰花特有的人工繁殖方法。类原球茎是兰科植物组培中的胚性愈伤组织进一步分化形成的一种组织结构,由于其外观和种子萌发的原球茎相似,所以称作类原球茎(PLB)<sup>[1]</sup>。类原球茎具有繁殖系数高、可以作为人工种子、方便进行分子生物学育种研究等特点,所以近年来利用花梗腋芽、叶片、花梗节间、根尖为外植体进行类原球茎诱导的研究逐渐兴起。其中叶片取材方便,对植株伤害小,叶盘转化体系的建立对遗传转化及规模化生产也有重要的意义。鉴于此,以蝴蝶兰杂交品种 H807 无菌苗的叶片为材料,对蝴蝶兰类原球茎诱导及防褐化进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试蝴蝶兰品种为 H807(郑州市农林科学研究所培育),取其无菌苗的叶片进行防褐化及类原球茎诱导的试验。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 防褐化

1.2.1.1 防褐化处理 对幼嫩叶片进行切割处理:先切去其边缘部分,然后从正面每隔 5 mm 进行横切,使其分成数段。培养基为 1/2 MS+6-BA 10 mg/L+NAA 1 mg/L+琼脂 7 g/L+蔗糖 20 g/L+椰汁 20%。防褐化剂分别选用柠檬酸(20 mg/L、50 mg/L、80 mg/L)、抗坏血酸(10 mg/L、40 mg/L、70 mg/L)、活性炭(1 g/L、3 g/L、5 g/L),培养基 pH 值 5.5~5.6,按照单因子试验设计,每个处理 3 片叶,重复 3 次。

1.2.1.2 褐化程度统计方法 将褐化程度分为 4 级,即 0 级:叶片切口及培养基都无明显变化;1 级:叶片切口变色,培养基颜色正常;2 级:叶片变色,叶片周围培养基开始变色;3 级:培养基 1/2 左右的区域变色;4 级:培养基 2/3 左右的区域变色。

1.2.2 不同细胞分裂素对类原球茎诱导的影响 类原球茎诱导基本培养基为 1/2 MS+NAA 1 mg/L+抗坏血酸 70 mg/L+椰汁 20%+蛋白胨 2 g/L+琼脂 7 g/L+蔗糖 20 g/L。针对 2 种细胞分裂素 6-BA 和 TDZ,采用单因子设计方法,6-BA 的质量浓度为 5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L,TDZ 的质量浓度为 1 mg/L、3 mg/L、5 mg/L、7 mg/L,培养基 pH 值 5.5~5.6。每个处理 9 瓶,每瓶 3 片叶。诱导率=诱导出 PLB 的叶片数/接种的叶片数×100%。

以上培养环境温度维持在(25±1)℃,类原球茎诱导期间光照强度为 400~500 lx,光照时间为 12 h/d。试验结果用 SPSS 软件进行分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同物质对蝴蝶兰叶片褐化的抑制效果

蝴蝶兰叶片接入培养基后的第 7 天,开始出现褐化现象。最初是切口处出现褐色,逐渐蔓延至培养基,褐变严重的处理整个培养基变色,培养物变褐死亡。由表 1 可知,3 种防褐化剂都不能完全抑制褐变的发生,只是在褐变程度上有所差异。接种 7 d 后,1、5、6、7 处理中培养物 0 级褐化,效果最好,但是随着培养时间的延长,1、5、7 处理褐变现象逐渐加重,培养 21 d 后都达到 2 级或 3 级褐化,导致培养物褐化死亡,不利于类原球茎的诱导。整个培养过程中,处理 6 防褐化效果最好,培养 7 d 后未发现褐化现象,培养 21 d 后也只是 1 级褐化,即叶片切口处产生褐色物质,并不影响培养物的生长,为防褐化处理的最佳选择。

表 1 不同添加物对培养基中蝴蝶兰叶片褐化程度的影响

| 处理 | 添加物及质量浓度     | 不同培养时间褐化级别 |      |      |
|----|--------------|------------|------|------|
|    |              | 7 d        | 14 d | 21 d |
| 1  | 柠檬酸 20 mg/L  | 0 级        | 2 级  | 3 级  |
| 2  | 柠檬酸 50 mg/L  | 1 级        | 2 级  | 2 级  |
| 3  | 柠檬酸 80 mg/L  | 1 级        | 2 级  | 4 级  |
| 4  | 抗坏血酸 10 mg/L | 1 级        | 1 级  | 2 级  |
| 5  | 抗坏血酸 40 mg/L | 0 级        | 1 级  | 3 级  |
| 6  | 抗坏血酸 70 mg/L | 0 级        | 1 级  | 1 级  |
| 7  | 活性炭 1 g/L    | 0 级        | 2 级  | 2 级  |
| 8  | 活性炭 3 g/L    | 2 级        | 3 级  | 3 级  |
| 9  | 活性炭 5 g/L    | 1 级        | 3 级  | 3 级  |

### 2.2 不同细胞分裂素种类及质量浓度对蝴蝶兰叶片类原球茎诱导的影响

2.2.1 类原球茎产生的时间 在类原球茎诱导试验中,为了减轻褐化对诱导类原球茎的影响,接种后的第 7 天对培养基进行更换,将叶片重新接入新鲜培养基中。14 d 后,最先观察到叶片基部的切口处有绿色突起(图 1),其中 TDZ 3 mg/L 处理最早出现类原球茎(接种后 14 d),TDZ 1 mg/L、TDZ 5 mg/L、TDZ 7 mg/L 处理分别在 17、16、17 d 后出现类原球茎。6-BA 处理较晚出现类原球茎,21 d 后 6-BA 15 mg/L 处理中出现绿色突起,6-BA 5 mg/L、6-BA 10 mg/L、6-BA 20 mg/L 的处理分别在 29 d、36 d、25 d 后出现绿色突起。

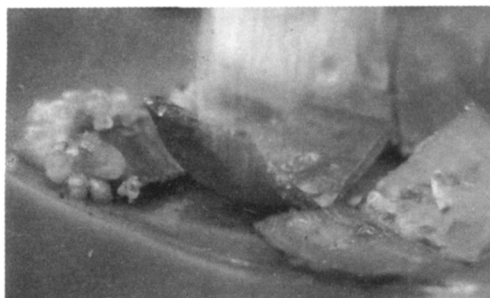


图 1 蝴蝶兰叶片基部切口处产生的类原球茎



图 2 蝴蝶兰叶片不同位置诱导出的类原球茎

2.2.3 不同处理蝴蝶兰叶片类原球茎诱导率 从表 2 可以看出,添加 TDZ 的诱导处理中,随着 TDZ 质量浓度的升高,类原球茎的诱导率上升,3 mg/L 时诱导率最高,为 75.0%,随后,随着 TDZ 质量浓度的升高诱导率开始下降。TDZ 质量浓度为 1 mg/L、5 mg/L、7 mg/L 时的诱导率分别为 62.9%、66.7%、66.7%。6-BA 质量浓度为 5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L 时,类原球茎诱导率分别为 3.7%、14.8%、22.2%、3.7%。随着 6-BA 质量浓度的升高,类原球茎的诱导率提高,6-BA 质量浓度为 15 mg/L 时,诱导率最高达 22.2%,随后诱导率开始下降。

从以上结果可看出,TDZ 诱导类原球茎的效果明显好于 6-BA;添加 TDZ 的培养基诱导率可以达到 75.0%,而添加 6-BA 的培养基诱导率最高仅为 22.2%;TDZ 3 mg/L 处理对蝴蝶兰叶片诱导类原球茎的效果最好,诱导率高达 75.0%;两种细胞分裂素的质量浓度过高或过低,诱导率都会降低。在诱导时间上,添加 TDZ 的处理在较短时间内诱导出类原球茎,最早在接种第 14 天观察到类原球茎,最晚在接种第 17 天;而添加 6-BA 的处理,一般 1 个月左右才会出现类原球茎,最早类原球茎出现时间为接种第 23 天,最晚类原球茎出现时间在接种第 36 天。以上结果表明,在蝴蝶兰叶片诱导类原球茎的组织培养过程中,无论是类原球茎的诱导率和

2.2.2 类原球茎产生的部位 切口位置不同,类原球茎诱导状况就不同,叶片基部切口极易产生类原球茎,叶片中部次之,叶片尖端最难长出;有些类原球茎不经切割处理直接从叶片表面长出。根据类原球茎产生的不同位置,类原球茎主要分 3 类:叶片切口处长出的类原球茎(图 2-1)、类原球茎上再生的类原球茎(图 2-2)、叶片表面长出的类原球茎(图 2-3)。这与张秀清、张雯颖等的研究结果一致<sup>[2-3]</sup>。

诱导时间,TDZ 的效果都明显优于 6-BA。

表 2 不同激素处理对蝴蝶兰叶片类原球茎诱导率的影响

| 处理<br>编号 | 类原球茎<br>出现时间 | 接种叶片<br>数/片 | 诱导数/<br>片 | 诱导率/<br>% |
|----------|--------------|-------------|-----------|-----------|
| 1        | 接种第 17 天     | 27          | 17        | 62.9      |
| 2        | 接种第 14 天     | 28          | 21        | 75.0      |
| 3        | 接种第 16 天     | 27          | 18        | 66.7      |
| 4        | 接种第 17 天     | 27          | 18        | 66.7      |
| 5        | 接种第 28 天     | 27          | 1         | 3.7       |
| 6        | 接种第 36 天     | 27          | 4         | 14.8      |
| 7        | 接种第 23 天     | 27          | 6         | 22.2      |
| 8        | 接种第 25 天     | 27          | 1         | 3.7       |

### 3 结论与讨论

多酚氧化酶(PPO)是引起酚类物质氧化的催化剂。植物组织被切割时,酚、酶的区域化分布被打破,在有氧条件下,释放或合成的 PPO 将组织切口表面的酚类物质氧化成褐色的醌<sup>[4]</sup>。切口处形成的醌类物质导致叶片变褐,进而蔓延到整个培养基,导致培养基变色。

PPO 是一种含铜的蛋白,或以结合态存在,或以游离态存在,其活性依赖于铜的氧化还原作用。因为机械损伤,膜结构被破坏,结合态的 PPO 从膜上被剥离变成具有催化活性的游离态。在以游离态存在时,PPO 才会具有催化活性。柠檬酸是一种金属螯合剂,其与 PPO 发生螯合反应, (下转第 135 页)

- the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis characterisation of 213 strains[J]. Avian Pathology, 1977, 6(4): 285-292.
- [5] Rzewuska M, Kerpinska E, Szeleszczuk P, et al. Isolation of *Gallibacterium* spp. from peacocks with respiratory tract infections [J]. Med Wet, 2007, 63: 1431-1433.
- [6] Gerlach H. Significance of *Pasteurella haemolytica* in poultry[J]. Prakt Tierarzt, 1977, 58: 324-328.
- [7] Mushin R, Weisman Y, Singer N. *Pasteurella haemolytica* found in respiratory tract of fowl[J]. Avian Dis, 1980, 24: 162-168.
- [8] Bojesen A M, Nielsen O L, Christensen J P, et al. In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens[J]. Avian Pathol, 2004, 33(2): 145-152.
- [9] Bojesen A M, Torpdahl M, Christensen H, et al. Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2737-2740.
- [10] Bojesen A M, Christensen H, Nielsen O L, et al. Detection of *Gallibacterium* spp. in chickens by fluorescent 16S rRNA in situ hybridization[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(11): 5167-5172.
- [11] 陈陆, 付仁一, 杨霞, 等. 一种新禽病——禽卡氏杆菌病的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2010, 40 (2): 215-219.
- [12] 王珊, 陈陆, 付仁一, 等. 我国部分地区蛋鸡群鸭源鸡杆菌血清流行病学调查[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(2): 114-117.
- [13] 王川庆, 陈陆, 杨霞, 等. 蛋鸡群卡氏杆菌感染情况的初步研究[J]. 河南农业科学, 2008(3): 97-100.
- [14] Bojesen A M, Nielsen S S, Bisgaard M. Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels[J]. Avian Pathology, 2003, 32(5): 503-510.
- [15] 郑鹿平, 杨霞, 陈陆, 等. 45 株鸡卡氏杆菌的分离鉴定[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(3): 347-351.
- [16] Addo P B, Mohan K. Atypical *Pasteurella haemolytica* type A from poultry[J]. Avian Dis, 1985, 29(1): 214-217.
- [17] Bisgaard M, Dam A. Salpingitis in poultry. II. Prevalence, bacteriology, and possible pathogenesis in egg-laying chickens[J]. Nord Vet Med, 1981, 33(2): 81-89.
- [18] Shaw D P, Cook D B, Maheswaran S K, et al. *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullets and laying hens[J]. Avian Dis, 1990, 34(4): 1005-1008.

(上接第 128 页) 降低 PPO 的活性。抗坏血酸是一种强还原剂, 它抑制了 PPO 的氧化作用, 防褐变效果显著, 酶活抑制效果较好<sup>[5]</sup>。本试验中, 抗坏血酸抑制褐变效果最好, 与赖艳艳等<sup>[5]</sup>的研究结果一致。活性炭是一种吸附剂, 对蝴蝶兰褐变有一定的抑制作用。在此次防褐变试验中, 添加柠檬酸和抗坏血酸的处理均有类原球茎的产生, 而添加活性炭的处理却没有观察到类原球茎, 其原因可能是活性炭吸附了添加的植物生长调节物质, 导致类原球茎诱导失败。诱导类原球茎的过程中, 降低活性炭的质量浓度可能对类原球茎的诱导有促进作用, 但是防褐变效果还有待试验。

在不同的细胞分裂素对叶片诱导类原球茎影响的试验中, TDZ 表现明显好于 6-BA。TDZ 的生理活性强, 可诱导细胞分裂素的合成并抑制内源生长素的降解, 更适合原球茎的诱导。本试验中生长素选用质量浓度为 1 mg/L 的 NAA 与不同质量浓度的 TDZ、6-BA 配合使用, 诱导率最高达到 75.0%。卜朝阳等<sup>[6]</sup>研究认为, 6-BA 10 mg/L + NAA 2 mg/L 诱导效果最好, 诱导率达 83.4%。吴开云等<sup>[7]</sup>选用 2,4-D 与 6-BA 进行大花蕙兰类原球茎的诱导, 认为 2,4-D 质量浓度越低, 诱导率越高, 2,4-D 质量浓度高于 0.6 mg/L 时, 诱导受抑制。但是本

试验并未对生长素种类及质量浓度进行筛选。在蝴蝶兰叶片类原球茎的诱导试验中, 有待于进一步对生长素种类及质量浓度进行筛选, 以找出最适合蝴蝶兰叶片诱导类原球茎的激素种类及质量浓度组合, 从而提高诱导率, 为蝴蝶兰诱导类原球茎奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 熊丽, 吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] 张秀清. 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.
- [3] 张雯颖, 张晓波, 潘刚, 等. 蝴蝶兰叶片诱导类原球茎的研究[J]. 湖北农业科学, 2010(5): 1033-1034.
- [4] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996: 345.
- [5] 赖艳艳, 许传俊, 陈冬茵, 等. 柠檬酸和抗坏血酸对蝴蝶兰叶外植体褐变发生的影响[J]. 生物技术, 2010(2): 70-72.
- [6] 卜朝阳, 蒋慧萍, 满若君. 蝴蝶兰花梗离体培养及叶片诱导类原球茎研究[J]. 江苏农业科学, 2008(3): 147-150.
- [7] 吴开云, 黄敏仁, 王明麻. 大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)试管苗基部切块诱导类原球茎研究[J]. 林业科学研究, 2007, 20(4): 537-541.