

# TDZ 高效诱导蝴蝶兰叶片不定芽及植株再生

程强强<sup>1</sup>, 庄东红<sup>1,2\*</sup>, 许大熊<sup>3</sup>, 李军<sup>3</sup>, 杨志娟<sup>3</sup>, 杜虹<sup>1</sup>

(1. 汕头大学生物系, 广东汕头 515063; 2. 韩山师范学院生物系, 广东潮州 521041; 3. 汕头市农业科学研究所, 广东汕头 515021)

**摘要:**以蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)无菌幼苗叶片为材料,研究添加 TDZ(噻重氮苯基脲)条件下不同基因型、激素组合、叶片大小、暗培养时间对不定芽发生和再生植株的影响。结果表明:在相同培养条件下,不同基因型外植体芽诱导率差异显著,‘红天使’最高,达 81.5%,‘汕农姑娘’等 2 个品种为 0,‘满天红’等 4 个品种为 9.2% ~ 34.9%;添加 TDZ 芽诱导率显著高于 6-BA;单独添加 TDZ 或 6-BA 芽诱导率显著高于 NAA 与 TDZ 或 6-BA 的组合。叶片越小不定芽诱导率越高;短时间暗处理有利于不定芽的发生。以 1~2 cm 长叶片为材料、15 d 暗处理、在 1/2 MS 添加 3 mg/L TDZ 培养基中,‘红天使’的叶片外植体芽诱导率和平均不定芽数分别可达 100.0% 和 18.2 个。研究发现,在继代培养中 TDZ 对芽的伸长有抑制作用。

**关键词:**蝴蝶兰; 叶片培养; 噻重氮苯基脲; 不定芽; 基因型; 植株再生

**中图分类号:** S682.31; Q943.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 2095-0837(2011)04-0524-07

## The High-frequency Induction of Adventitious Shoots and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Phalaenopsis* with Added Thidiazuron

CHENG Qiang-Qiang<sup>1</sup>, ZHUANG Dong-Hong<sup>1,2\*</sup>, XU Da-Xiong<sup>3</sup>,  
LI Jun<sup>3</sup>, YANG Zhi-Juan<sup>3</sup>, DU Hong<sup>1</sup>

(1. Department of Biology, Shantou University, Shantou, Guangdong 515063, China; 2. Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521041, China; 3. Shantou Agricultural Science Research Institute, Shantou, Guangdong 515021, China)

**Abstract:** The effects of different genotypes, plant growth regulators (PGRs) combination, leaf size and dark treatment on adventitious shoot formation and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis* with thidiazuron (TDZ) added were studied. The difference in the induction rate of adventitious shoots among different genotypes with same induction conditions was significant, for example, the ‘Red Angel’ was the highest, up to 81.5%, *Doritaenopsis* Shannong ‘Lassie’ and one other were 0, *Doritaenopsis* Queen Beer ‘Red Sky’ and two others were up to 9.2%–34.9%. The adventitious shoots induction rate under TDZ treatment was significantly greater than that in the 6-BA with the same genotype. The adventitious shoots induction rate with 6-BA or TDZ added alone was superior to the combination of 6-BA or TDZ with NAA. When the leaves were younger, the adventitious shoots induction rate was higher. Short dark treatment was propitious to highly significant on adventitious shoot formation. Using 1–2 cm leaves as material, with 15 days of dark treatment and the 3 mg/L TDZ treatment in 1/2 MS culture medium, the explants induction rate and average number of adventitious shoots of ‘Red Angel’ reached 100% and 18.2, respectively. This study showed that bud elongation was obviously inhibited by TDZ treatment in subculture medium.

**Key words:** *Phalaenopsis*; Leaf culture; Thidiazuron; Adventitious shoots; Genotypes; Plant regeneration

收稿日期: 2010-10-18, 修回日期: 2010-12-27。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2003C2011045); 汕头市重点攻关计划项目(200543)。

作者简介: 程强强(1984–), 男, 硕士研究生, 研究方向为蝴蝶兰种质创新研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: zdh@hstc.edu.cn)。

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 为兰科中最具观赏性的花卉之一, 在兰花家族中有“兰花皇后”的美称, 由于其极高的观赏价值而受到普遍关注。我国研究者开展蝴蝶兰组织培养方面的研究始于 20 世纪 80 年代初<sup>[1]</sup>, 相对国外同行研究起步较晚<sup>[2,3]</sup>。此前较多研究常用的激素种类, 如细胞分裂素 BA、2,4-D、Ad<sup>[4-7]</sup>, 生长素 NAA、IBA 等对诱导再分化的影响, 对噻重氮苯基脲 (TDZ) 的研究较少见<sup>[8,9]</sup>。自 1982 年 TDZ 首次被报道具有细胞分裂素活性以来<sup>[10]</sup>, 已被成功用于多种植物的体外诱导不定芽形成和促进腋芽增生, 特别是对难以诱导的木本植物其效果尤为明显<sup>[11-16]</sup>。本研究拟通过探索 TDZ 对蝴蝶兰叶片诱导分化不定芽的影响, 建立高效的再生体系, 为蝴蝶兰高效微繁殖和种质创新奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

材料为蝴蝶兰无菌分生苗幼嫩叶片, 由汕头市农业科学研究所提供。供试品种有: 外引品种 (系) ‘满天红’ (*Doritaenopsis* Queen Beer ‘Red Sky’), ‘荷黄’ (*Phalaenopsis* Hehuang), ‘夕阳红’ (*P. Taida Salu*), ‘红天使’ (*P. Tailin* ‘Red Angle’), ‘兄弟女孩’ (*P. ‘Brother Girl’*), ‘283’; 自育品种 (系) ‘汕农姑娘’ (*Doritaenopsis* Shannong ‘Lassie’), ‘0377-2’ (*P. Shangnong* ‘Angel’), ‘460’ (*P. Sogo* ‘Beach’)。其中 ‘0377-2’ 是 ‘红天使’ 和 ‘283’ 杂交后选育而成的品系。

### 1.2 方法

取无菌分生苗幼嫩叶片, 横切成 0.5 cm × 1 cm 大小, 上表面朝上置于培养基上。基本培养基为 1/2 MS<sup>[17]</sup>, 略有修改: 含蛋白胨 1000 mg/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 170 mg/L, 肌醇 100 mg/L, 烟酸 0.5 mg/L, 盐酸吡哆辛 0.5 mg/L, 盐酸硫胺素 0.1 mg/L, 甘氨酸 2.0 mg/L, 添加蔗糖 20000 mg/L<sup>[18]</sup> 及琼脂粉 6000 mg/L。植物激素 6-BA、TDZ、NAA 均高压灭菌前添加。培养基 pH 调至 5.4, 121℃ 高压灭菌 15 min。培养物于 24℃ ~ 26℃ 培养室中暗培养 1 个月 (特别注明除外) 后光照培养, 光周期 12 h/d, 光照强度 800 lx。

#### 1.2.1 不同基因型处理

选取 ‘满天红’、‘夕阳红’、‘红天使’、‘荷黄’、‘兄弟女孩’、‘283’ 等 6 个品种和 ‘汕农姑娘’、

‘460’、‘0377-2’ 等 3 个自育杂交品系, 分别取无菌苗顶端纵长小于 3 cm 的幼嫩叶片, 横切成片段, 接种在 1/2 MS 添加 1 mg/L 6-BA 或 1 mg/L TDZ 的培养基中。

#### 1.2.2 无菌苗的叶片大小处理

分别从无菌苗上选取纵长小于 1 cm 和 1 ~ 2 cm、2 ~ 3 cm、3 ~ 4 cm 等 4 种规格的叶片, 横切片, 接种于 1/2 MS + 3 mg/L TDZ 的培养基中。供试品种为 0377-2。

#### 1.2.3 暗培养时间处理

以 ‘0377-2’ 为试材, 取纵长 1 ~ 2 cm 的叶片, 横切片, 接种于 1/2 MS + 3 mg/L TDZ 的培养基中, 分别暗培养 0、15、30、45 d, 再转入光照条件培养。

#### 1.2.4 6-BA、TDZ 单独添加或与 NAA 配合处理

以 ‘红天使’ 为试材, 取纵长 1 ~ 2 cm 的叶片, 横切片, 接种于单独添加 TDZ、6-BA 或 TDZ、6-BA 与 NAA 配合的培养基中, 暗培养 15 d 后光照培养。

以上试验均重复 3 次, 每次 5 瓶, 每瓶 4 个外植体, 共 60 个。培养 2 个月后统计试验结果。

### 1.3 组培苗继代

自育品系 ‘0377-2’ 的叶片外植体在 1/2 MS + 3 mg/L TDZ 培养基中培养 2 个月后, 切取其上生长均匀的幼芽, 分别接种于单独添加 3 mg/L TDZ 或 200 mL/L 椰汁 (CW), 或两者组合 (3 mg/L TDZ + 200 mL/L CW) 的 1/2 MS 培养基中。以无添加物的 1/2 MS 培养基为对照。培养 45 d 后, 观察并记录试验结果。

### 1.4 幼苗生根、炼苗及移栽

将获得的 ‘0377-2’ 幼苗接种于 1/2 MS 添加 1 mg/L IBA 或 1 mg/L TDZ 的生根培养基中, 诱导生根。待长出 2 ~ 3 条根, 根长 3 ~ 4 cm 时, 将幼苗置于光照强度 8000 ~ 10000 lx、光照时间 8 ~ 12 h/d 的环境条件下炼苗 15 d 后, 移栽至大棚中生长。

### 1.5 数据分析

所有数据均采用 SPSS 软件进行邓肯新复极差法分析。不定芽诱导率 = 分化不定芽叶片总数 / 叶片外植体总数 × 100%, 平均不定芽数 = 总不定芽数 / 分化不定芽叶片数。

## 2 结果与分析

2.1 不同基因型对叶片培养诱导不定芽分化的影响  
试验结果表明, 不同品种 (基因型) 对培养的反

应不同,说明蝴蝶兰叶片的不定芽再生能力很大程度上受遗传因素影响(表 1)。*‘红天使’*无论在添加 TDZ 还是添加 6-BA 培养基中都得到最高不定芽诱导率,分别为 81.5% 和 38.3%,表明该品种是容易诱导再分化的基因型。*‘满天红’*、*‘夕阳红’*、*‘荷黄’*、*‘283’*、*‘汕农姑娘’*等品种(系)的离体叶片在培养中先后出现较严重的褐化现象,芽诱导率在 6-BA 或在 TDZ 培养基中为 0,表明这些品种(品系)属于离体培养再生困难的基因型。*‘0377-2’*的芽诱导率是 34.9%,介于其两个亲本*‘红天使’*和*‘283’*之间,提示了遗传因素的决定作用。同一品种对不同激素的反应不同,*‘红天使’*、*‘0377-2’*、*‘460’*、*‘满天红’*等在 TDZ 培养基中诱导率远高于 6-BA 培养基;反之,*‘汕农姑娘’*在 TDZ 培养基中芽诱导率为 0,在 6-BA 培养基中诱导率为 2.8%。从总体上看,对于蝴蝶兰不同基因型,TDZ 诱导再分化的作用大于同一浓度的 6-BA。

2.2 叶片大小对离体培养诱导不定芽分化的影响

试验结果表明,无菌苗的叶片越小越易诱导不定芽分化(表 2)。纵长小于 1 cm 的叶片,芽诱导率可达 66.7%。随着叶片的长大和发育成熟,再分化能力降低,3~4 cm 长的叶片芽诱导率仅 20.0%。平均不定芽数也有着相同的趋势,越小的

叶片平均芽数越多。小于 1 cm 的叶片诱导再分化时间短,15 d 左右可见叶片切口长出芽点(图 1:A),45 d 时出现大量不定芽,在上表面和非切口部也有不定芽产生(图 1:B)。而 3~4 cm 纵长叶片的外植体在培养 30 d 时才看到少数芽分化。说明小于 1 cm 幼嫩叶片内细胞还处于较低分化水平,具有很高的脱分化和再分化潜能。

2.3 暗培养时间对叶片培养诱导不定芽分化的影响

试验结果表明,暗培养 15 d 芽诱导率最高,达 100.0%(表 3)。随着暗培养时间加长,不定芽诱导率下降,暗培养 45 d 芽诱导率只有 43.8%。平均芽数也以暗培养 15 d 的最高,为 9.2 个,与未经暗处理之间没有统计学意义的差别。表明较短的暗培养时间更有利于提高叶片芽诱导率和芽的增殖。

2.4 激素 6-BA、TDZ 单独添加或与 NAA 配合对诱导叶片不定芽分化的影响

试验结果表明,不添加任何激素的培养基不能诱导蝴蝶兰叶片不定芽分化;单独使用 TDZ 或 6-BA,明显优于单独使用 NAA 或 NAA 与 6-BA、TDZ 组合的培养基(表 4)。其中,单独添加 1 mg/L 或 3 mg/L TDZ,芽诱导率都可达 100.0%;单独添加 6-BA 3 mg/L 时芽诱导率最高,为 70.0%。不同浓度的 6-BA 和 NAA 组合芽诱导率均未超过 33.3%,其中 1.0 mg/L 6-BA +3.0 mg/L NAA 组合最低,

表 1 不同基因型对诱导蝴蝶兰叶片不定芽分化的影响

| 品种或品系<br>Cultivars                               | 6-BA (mg/L)                                       |                                                    | TDZ (mg/L)                                        |                                                    |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                                                  | 不定芽诱导率(%)<br>Adventitious shoot<br>induction rate | 平均不定芽数<br>No. of adventitious<br>shoot per explant | 不定芽诱导率(%)<br>Adventitious shoot<br>induction rate | 平均不定芽数<br>No. of adventitious<br>shoot per explant |
| 460<br><i>Phalaenopsis</i> Sogo ‘Beach’          | 3.8 ± 1.4a                                        | 1.6 ± 0.3b                                         | 26.7 ± 7.9bc                                      | 2.2 ± 0.1d                                         |
| 0377-2<br><i>P. Shangnong</i> ‘Angel’            | 14.5 ± 5.4a                                       | 2.0 ± 0.5b                                         | 34.9 ± 10.1c                                      | 2.1 ± 0.2d                                         |
| 满天红<br><i>Doritaenopsis</i> Queen Beer ‘Red Sky’ | 0a                                                | 0a                                                 | 9.2 ± 4.4ab                                       | 1.1 ± 0.1b                                         |
| 汕农姑娘<br><i>D. Shannong</i> ‘Lassie’              | 2.8 ± 1.1a                                        | 1.1 ± 0.1ab                                        | 0a                                                | 0a                                                 |
| 283                                              | 0a                                                | 0a                                                 | 0a                                                | 0a                                                 |
| 红天使<br><i>P. Tallin</i> ‘Red Angle’              | 38.3 ± 1.6b                                       | 6.0 ± 1.2c                                         | 81.5 ± 4.5d                                       | 2.6 ± 0.1e                                         |
| 夕阳红<br><i>P. Taida</i> Salu                      | 0a                                                | 0a                                                 | —                                                 | —                                                  |
| 荷黄<br><i>P. Hehuang</i>                          | 0a                                                | 0a                                                 | —                                                 | —                                                  |
| 兄弟女孩<br><i>P. ‘Brother Girl’</i>                 | —                                                 | —                                                  | 18.3 ± 5.3abc                                     | 1.5 ± 0.3c                                         |

注: 数值为 3 次重复的平均值 ± SE, 相同字母表示经邓肯氏新复极差法检测无显著差异 ( $p < 0.05$ ), 下同。“—”代表无数据。  
Notes: Values are means ± SE of 3 repeats, and the same letters indicate no significant difference at  $p < 0.05$  by Duncan’s test (The same below). “—” represents no data.

表 2 叶片大小对诱导不定芽分化的影响  
Table 2 Effects of leaf size on adventitious shoot differentiation from the leaves of *Phalaenopsis*

| 叶片纵长(cm)<br>Leaf size | 不定芽诱导率(%)<br>Adventitious shoot induction rate | 平均不定芽数<br>No. of adventitious shoot per explant |
|-----------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <1                    | 66.7a                                          | 4.1a                                            |
| 1~2                   | 58.3ab                                         | 3.8a                                            |
| 2~3                   | 48.3b                                          | 3.3b                                            |
| 3~4                   | 20.0c                                          | 1.4c                                            |

表 3 暗培养时间对诱导不定芽分化的影响  
Table 3 Effects of dark culture time on adventitious shoot differentiation from the leaves of *Phalaenopsis*

| 暗培养时间(d)<br>Dark culture time | 不定芽诱导率(%)<br>Adventitious shoot induction rate | 平均不定芽个数<br>No. of adventitious shoot per explant |
|-------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 0                             | 93.8ab                                         | 10.4a                                            |
| 15                            | 100.0a                                         | 9.2a                                             |
| 30                            | 87.5b                                          | 4.4b                                             |
| 45                            | 43.8c                                          | 3.1b                                             |

培养 60 d 后仅为 5.0%。不同浓度的 TDZ 和 NAA 组合,芽诱导率都在 50% 以上,其中 3 mg/L TDZ +

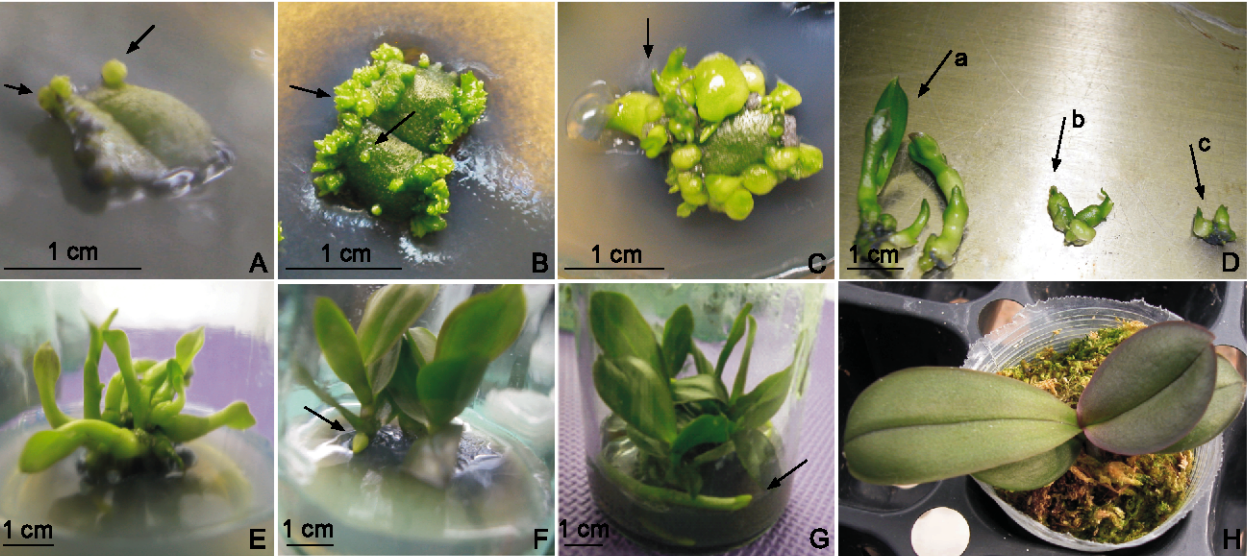
3 mg/L NAA 达 96.7%,表明 TDZ 无论单独使用还是与 NAA 配合都能明显的促进芽分化。平均芽数也是含单一 TDZ 培养基最高,达 18.2 个,远高于单一含 6-BA 培养基的 5.3 个。单一含有 NAA 的培养基也可以诱导叶片分化不定芽,最高诱导率为 31.6%。

2.5 继代培养中添加 TDZ 对不定芽生长的影响

继代培养中,幼芽的生长和叶片伸展伸长,以添加 200 mL/L 椰汁(CW)培养基中 fastest,无添加物的 1/2 MS 培养基次之,3 mg/L TDZ + 200 mL/L CW 组合的较慢,单独添加 3 mg/L TDZ 的最慢(图 1: D、E)。表明 TDZ 虽然对蝴蝶兰叶片离体培养再分化有显著促进作用,但对幼芽的生长伸长却表现为一定的抑制作用,这与 Huettelman<sup>[19]</sup>报道的结果相似。

2.6 幼苗生根

在 1/2 MS + 1 mg/L IBA 生根培养基中培养 1 个月,可见幼嫩根尖从幼苗基部长出(图 1: F);幼苗长出 2~3 条根时(图 1: G),炼苗 1 周后移栽入



A: 培养 15 d 出现芽点(箭头示); B: 培养 45 d 出现大量不定芽(箭头指外植体叶片表面长出芽); C: 培养 60 d 后的不定芽(箭头示); D: 3 种不同培养基培养继代培养 45 d 后的芽(箭头 a: 1/2 MS + 200 mL/L CW; 箭头 b: 1/2 MS + 200 mL/L CW + 3 mg/L TDZ; 箭头 c: 1/2 MS + 3 mg/L TDZ); E: 在 1/2 MS + 200 mg/L CW 培养基中生长的试管苗(继代 45 d); F: 试管苗产生幼嫩根尖(箭头示根尖); G: 含多条根试管苗(7 个月, 箭头示); H: 试管苗移栽入大棚 45 d。  
A: Adventitious shoot produced from leaf segments after 15 d of culture (shown by arrow); B: Adventitious shoots from the leaf segments after 45 d of culture (shown by arrow); C: Adventitious shoots from the leaf segments after 60 d of culture (shown by arrow); D: The shoots of different 3 culture mediums after 45 d of subculture (arrow a: 1/2 MS + 200 mL/L CW; arrow b: 1/2 MS + 200 mL/L CW + 3 mg/L TDZ; arrow c: 1/2 MS + 3 mg/L TDZ); E: Adventitious shoot after 45 d of culture in 1/2 MS + 200 mL/L CW; F: Root tip of regeneration plants (shown by arrow); G: Regeneration plantlets including roots (7 months, shown by arrow); H: Survived plants transplanted into glasshouse after 45 d.

图 1 蝴蝶兰叶片诱导不定芽的发生以及植株再生

Fig. 1 Plant regeneration via adventitious shoot from leaf explants of *Phalaenopsis*

表 4 6-BA、TDZ 单独添加或与 NAA 配合对叶片培养诱导不定芽分化的影响  
Table 4 Effect of 6-BA, TDZ and NAA at different concentrations on adventitious shoot differentiation from the leaves of *Phalaenopsis*

| 组合<br>Disposal | 6-BA<br>(mg/L) | TDZ<br>(mg/L) | NAA<br>(mg/L) | 不定芽诱导率 (%)<br>Adventitious shoot<br>induction rate | 平均不定芽数<br>No. of adventitious<br>shoot per explant |
|----------------|----------------|---------------|---------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1              | 0              | 0             | 0             | 0 a                                                | 0 a                                                |
| 2              | 0.5            | 0             | 0             | 58.3 ±3.3 f g                                      | 3.4 ±0.3 bcdef                                     |
| 3              | 1.0            | 0             | 0             | 68.3 ±3.3 gh                                       | 3.4 ±0.4 bcdef                                     |
| 4              | 3.0            | 0             | 0             | 70.0 ±5.8 fh                                       | 5.3 ±0.2 fghi                                      |
| 5              | 0              | 0.5           | 0             | 96.6 ±3.3 j                                        | 15.6 ±0.4 k                                        |
| 6              | 0              | 1.0           | 0             | 100.0 ±0.0 j                                       | 13.8 ±0.9 k                                        |
| 7              | 0              | 3.0           | 0             | 100.0 ±0.0 j                                       | 18.2 ±1.4 l                                        |
| 8              | 0              | 0             | 0.5           | 1.7 ±1.7 ab                                        | 0.3 ±0.3 a                                         |
| 9              | 0              | 0             | 1.0           | 31.7 ±4.4 de                                       | 2.2 ±0.1 abcde                                     |
| 10             | 0              | 0             | 3.0           | 18.3 ±3.3 bcde                                     | 2.8 ±1.0 abcdef                                    |
| 11             | 0.5            | 0             | 0.5           | 8.3 ±4.4 ab                                        | 4.3 ±2.3 cef                                       |
| 12             | 0.5            | 0             | 1.0           | 31.6 ±4.4 de                                       | 1.6 ±0.1 abcd                                      |
| 13             | 0.5            | 0             | 3.0           | 26.7 ±6.0 cde                                      | 1.5 ±0.3 abc                                       |
| 14             | 1.0            | 0             | 0.5           | 6.7 ±1.7 ab                                        | 4.0 ±1.2 bcdef                                     |
| 15             | 1.0            | 0             | 1.0           | 16.7 ±1.7 abcd                                     | 7.8 ±0.6 ij                                        |
| 16             | 1.0            | 0             | 3.0           | 5.0 ±2.9 ab                                        | 1.2 ±0.6ab                                         |
| 17             | 3.0            | 0             | 0.53          | 3.3 ±1.6 e                                         | 5.5 ±0.9fghi                                       |
| 18             | 3.0            | 0             | 1.0           | 13.3 ±8.8 abc                                      | 2.2 ±1.1abcde                                      |
| 19             | 3.0            | 0             | 3.0           | 10.0 ±7.6 ab                                       | 1.5 ±0.8ab                                         |
| 20             | 0              | 0.5           | 0.5           | 83.3 ±4.4 hij                                      | 5.4 ±0.8 fghi                                      |
| 21             | 0              | 0.5           | 1.0           | 85.0 ±2.9 hij                                      | 8.7 ±0.6 j                                         |
| 22             | 0              | 0.5           | 3.0           | 91.6 ±6.0 j                                        | 8.0 ±1.2 i                                         |
| 23             | 0              | 1.0           | 0.5           | 86.7 ±7.2 ij                                       | 7.2 ±0.4ghi                                        |
| 24             | 0              | 1.0           | 1.0           | 70.0 ±10.4 gh                                      | 4.2 ±0.2cdef                                       |
| 25             | 0              | 1.0           | 3.0           | 51.6 ±9.3 f                                        | 7.4 ±1.9hij                                        |
| 26             | 0              | 3.0           | 0.5           | 68.3 ±6.0 gh                                       | 8.5 ±1.0 j                                         |
| 27             | 0              | 3.0           | 1.0           | 73.3 ±3.3 ghi                                      | 4.5 ±1.0 defg                                      |
| 28             | 0              | 3.0           | 3.0           | 96.7 ±1.7 j                                        | 4.8 ±0.2 fgh                                       |

大棚(图 1: H),移栽成活率可达 80%。而在含有 TDZ 生根培养基中,持续培养 2 个月均未见诱导出根。

3 讨论

研究表明蝴蝶兰不同基因型再分化能力差异显著。在其他植物中也存在这种现象。如在同一诱导条件下,不同品种大白菜不定芽再生率最高为 68.2%,低的仅 9.8%<sup>[20]</sup>;不同品种甜土豆胚状体诱导率最高达 69%,最低为 0<sup>[21]</sup>;不同品种花生胚状体诱导率最高 76.6%,低的 10.3%<sup>[22]</sup>。有研究者认为这与材料的基因组不同有关,如在芸苔属植物中大白菜离体培养的低再生频率与含 AA 型基因组有关<sup>[23]</sup>。还有研究者认为可能不同品种的差异是由于控制植株再生的不同基因之间存在复杂的相互作用引起的<sup>[22]</sup>。本次试验中,自育品种‘0377-

2’芽诱导率为 34.9%,介于亲代‘红天使’(81.5%诱导率)和‘283’(0 诱导率)之间,说明某种遗传因素决定着叶片外植体的再分化能力。庄东红等<sup>[24]</sup>研究发现,‘满天红’、‘夕阳红’、‘兄弟女孩’、‘荷黄’等品种染色体组中都含有大染色体和小染色体,而‘红天使’只含有小染色体。相对于‘红天使’,含有大染色体的这几个品种都难诱导叶片再分化,由此推测:蝴蝶兰叶片的离体再生能力可能与染色体组中是否含大染色体有关。这还有待于进一步的研究。

TDZ 是一种人工合成的不同于腺嘌呤型细胞分裂素的化合物,其功能依赖于它本身完整的分子结构<sup>[10]</sup>。TDZ 主要是通过调节内源激素起作用,或是诱导胁迫的结果<sup>[25]</sup>。有研究指出,TDZ 比 6-BA 能更好地诱导不定芽发生,关键因素是由于 TDZ 诱

导外植体产生了高水平的内源性 IAA 含量和 IAA/ABA 比值<sup>[15]</sup>。本研究中,对于一些品种,TDZ 相比于 6-BA 能显著提高外植体芽诱导率和平均不定芽数,单一使用 3 mg/L TDZ 最高可获 100% 的芽诱导率和 18.2 的平均芽数,这与康乃馨<sup>[14]</sup>、茼蒿<sup>[15]</sup>、花生<sup>[16]</sup>等为材料的研究结果相似。同时添加 TDZ 与 NAA,芽诱导率也可达 90% 以上,但平均芽数远少于单独使用 TDZ 的。这可能是由于外源性激素 NAA 抑制了 TDZ 诱导内源性生长素积累,从而一定程度上抑制了外植体的不定芽发生。在石斛兰和文心兰的研究中也已发现,外源生长素对外植体叶片诱导胚状体有抑制作用<sup>[26-28]</sup>。从本试验结果还可见,TDZ 对蝴蝶兰不同品种(系)的诱导效果并不一样,差异显著。杨海芸等报道蝴蝶兰品系 RSW1 离体叶片在 1.5 mg/L TDZ 培养基不定芽诱导率为 60.9%<sup>[8]</sup>,本研究最高芽诱导率为 100% 的结果与之有差异。提示在使用 TDZ 之时有必要预先测试其效果。此外,对于离体培养再生困难的蝴蝶兰品种,还需进一步探索合适的培养条件。

单一使用 NAA 也能够诱导不定芽发生,说明 NAA 也可能是诱导蝴蝶兰叶片不定芽发生的一个因素。但 NAA 与 TDZ 或 6-BA 组合诱导效果明显差于单独使用 TDZ 和 6-BA,这与 Chen 等<sup>[29]</sup>的研究结果一致。说明 NAA 与 TDZ 或 6-BA 组合并没有对诱导不定芽发生起到协调促进作用,可能 NAA 同样也具有抑制作用,准确原因有待进一步深入研究。

短时间或不经暗培养有利于诱导不定芽的发生,这与前人<sup>[8,30]</sup>报道的 21 d 和 2 个月较长暗培养时间更有利于蝴蝶兰不定芽和胚状体发生的结果不同。长时间的暗培养虽然有利于保持外植体叶片新鲜状态,不容易产生褐化,但也延缓了诱导不定芽发生的时间。本试验结果表明,选取合适品种的幼嫩叶片为外植体,在添加 TDZ 的 1/2 MS 培养基中暗培养 15 d 诱导不定芽产生,再分别以添加 CW 和 IBA 的培养基促芽、促根生长,即能在 5~6 个月时间内从一株无菌幼苗获得几十株乃至百余株的再生植株。这一培养流程为蝴蝶兰无性快繁和工厂化生产提供了一个有效途径。

#### 参考文献:

- [1] 王怀宇,陈明昭. 蝴蝶兰花梗腋芽的离体培养[J]. 植物生理学通讯,1984(1): 40.
- [2] Potor G. Method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* stem cuttings[J]. *Amer Orchid Soc Bull*, 1949(18): 739-742.
- [3] Intuwong O, Sagawa Y. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot-tip culture[J]. *Amer Orchid Soc Bull*, 1974(43): 893-895.
- [4] 王怀宇. 蝴蝶兰的快速无性繁殖[J]. 园艺学报, 1989, 16(1): 73-77.
- [5] 李军, 柴向华, 曾宝, 张秀珊, 王细燕, 詹海洋, 朱饱卿. 蝴蝶兰组培工厂化生产技术[J]. 园艺学报, 2004, 31(3): 413-414.
- [6] 崔广荣, 侯喜林, 张子学, 张从宇, 胡能兵, 刘跃成. 蝴蝶兰叶片离体培养胚状体的发生及组织学观察[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 431-436.
- [7] 秦凡, 周吉源. 不同植物生长调节剂对蝴蝶兰快速繁殖的影响[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(5): 452-456.
- [8] 杨海芸, 吴震, 王广东, 韦月仙. 不同培养条件对蝴蝶兰离体叶片不定芽发生的影响[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(1): 44-49.
- [9] 周全, 周翔, 唐兴国, 宋鹏飞. 蝴蝶兰原球茎和丛生芽增殖条件优化[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(3): 595-598.
- [10] Mok M C, Mok D W S, Armstrong D J. Cytokinin activity of N-phenyl-N-1, 2, 3-thiadiazol-5-yl urea (Thidiazuron) [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21: 1509-1511.
- [11] Ma X F, Yu C M, Tang S W, Wang Y Z, Zhu A G, Zhu S Y, Gong B H, Xiong H P. High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from hypocotyl of ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.] [J]. *Philipp Agric Scientist*, 2010, 93(1): 121-125.
- [12] Kim M K, Sommer H E, Bongarten B C, Merkle S A. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 536-540.
- [13] Corredoira E, Ballester A, Vieitez M. Thidiazuron-induced high-frequency plant regeneration from leaf explants of *Paulownia tomentosa* mature trees. [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2008, 95: 197-208.
- [14] Lu C Y. The use of the thidiazuron in tissue culture [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1993, 29: 92-96.

[1] 王怀宇,陈明昭. 蝴蝶兰花梗腋芽的离体培养[J]. 植

- [15] Ma G, Guo J P. Effects of thidiazuron and N6-benzylaminopurine on endogenous hormone levels during regeneration of *Brassica campestris* ssp. *Rapifera* [J]. *J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci)*, 2010, 36(3): 237–245.
- [16] Chengalrayan K, Mhaske V B, Hazra S. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 783–786.
- [17] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473–497.
- [18] Kuo Huel-lan, Chen Jen-tsung, Chang Wei-chin. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'little steve' [J]. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant*, 2005, 41: 453–456.
- [19] Huetteman Carl A, Preece John E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, 33: 105–119.
- [20] 王洋, 崔继哲, 李翠玲. 大白菜高频再生体系的建立及策略 [J]. *园艺学报*, 2005, 32(4): 701–703.
- [21] Triqui Z, Guédira A, Chlyah A, et al. Effect of genotype, gelling agent, and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) [J]. *C R Biologies*, 2008, 331: 198–205.
- [22] Chengalrayan K, Mhaske V B, Hazra S. Genotypic control of peanut somatic embryogenesis [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 522–525.
- [23] 杜虹, 庄东红, 黄文华. AgNO<sub>3</sub> 对大白菜子叶芽再生的促进作用 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2000, 8(2): 109–112.
- [24] 庄东红, 曲莹, 许大熊, 李军, 陈志玲. 蝴蝶兰若干品种(系)的染色体数和形态分析 [J]. *园艺学报*, 2007, 34(5): 1257–1262.
- [25] 陈肖英, 叶庆生, 刘伟. TDZ 研究进展 [J]. *亚热带植物科学*, 2003, 32(3): 59–63.
- [26] Chen J T, Chang W C. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Grower Ramsey' [J]. *Plant Growth Regul*, 2010, 34: 229–232, 29.
- [27] Chung H H, Chen J T, Chang W C. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* Chiengmai Pink and subsequent plant regeneration [J]. *In Vitro Plant*, 2005, 41: 765–769.
- [28] Chung H H, Chen J T, Chang W C. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium* [J]. *Biol Plant*, 2007, 51: 346–350.
- [29] Cheng J T, Chang W C. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis* [J]. *Biologia Plantarum*, 2006, 50(2): 169–173.
- [30] Gow W P, Chen J 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.

(责任编辑: 张平)