



# 一种高效的蝴蝶兰花梗诱导丛生芽体系

王丽娜,金 勋,李泽宇,顾 鑫,齐国超

(黑龙江省农业科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163316)

**摘要:**为提高蝴蝶兰组织培养效率,分别以幼嫩花梗和已开花蝴蝶兰花梗腋芽为外植体,采用两种消毒剂  $\text{HgCl}_2$ 、 $\text{NaClO}$ ,3种消毒方式 0.1%  $\text{HgCl}_2$ ,10 min;10%  $\text{NaClO}$ ,10 min;5%  $\text{NaClO}$ ,10 min 为处理,以 VW(大量)+MS(微量、铁盐、有机)+100  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  马铃薯+0.1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Ga}_3(\text{PO}_4)_2$ +6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+0.2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 为诱导基本培养基;VW(大量)+MS(铁盐、有机、微量)+100  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  马铃薯+3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+0.2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 为增殖分化培养基;1/2MS+0.1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 为生根培养基诱导丛生芽,拟建立以蝴蝶兰花梗腋芽为外植体的高效丛生芽诱导体系。结果表明:在 0.1%  $\text{HgCl}_2$ ,10 min 消毒方式下,幼嫩花梗腋芽的污染率为 0,丛生芽诱导率为 95.6%;增殖率为 216%;在生根培养基 1/2MS+0.1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 上生根率为 95.6%,建立了高效的蝴蝶兰幼嫩花梗腋芽诱导丛生芽。

**关键词:**花梗腋芽;诱导;增殖和分化;蝴蝶兰

蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*),又名蝶兰,为兰科蝴蝶兰属植物,其花型优美酷似蝴蝶、花色艳丽、花瓣醇厚、花期持久,深受消费者喜爱,已成为当今人们生活中家喻户晓,最受欢迎的年销花之一。蝴蝶兰为单茎性气生兰,难以实现传统的分株繁殖,因种子小,萌发条件苛刻,不能直接播种于基质,且无菌播种后代分化现象明显<sup>[1]</sup>。花梗腋芽诱导丛生芽技术能够从根本上解决植株繁育的难题,具有取材不伤害植株本身、易于诱导、

操作简单、保持亲本的优良性状、稳定遗传、变异率低、缩短成苗期的特点,已成为蝴蝶兰种苗大规模繁育的主要手段。不同的蝴蝶兰品种的花梗腋芽诱导丛生芽差异显著<sup>[2]</sup>。本研究所采用的诱导增殖分化的培养基是经过长期试验筛选出来的最佳配方,与以往研究不同的是该培养基中添加  $\text{Ga}_3(\text{PO}_4)_2$  试剂,研究表明  $\text{Ga}^{2+}$ 、 $(\text{PO}_4)^{2-}$  能够有效提高细胞膜离子交换及营养物质的吸收,对丛生芽诱导有促进作用<sup>[3]</sup>。在诱导培养基中丛生芽的诱导、增殖及分化处于同步阶段,而在增殖分化培养基中丛生芽主要趋向于增殖。本试验分别以幼嫩和已开花的蝴蝶兰花梗为外植体,采用  $\text{HgCl}_2$  和  $\text{NaClO}$  两种不同的消毒试剂,3种消毒方式,在基本培养基中进行花梗腋芽丛生芽的诱导。比较消毒剂浓度、消毒剂类型的消毒效果,并统计两

收稿日期:2018-03-01

基金项目:大庆市指导性科技计划资助项目(zd-2016-118)。

第一作者简介:王丽娜(1983-),女,硕士,助理研究员,从事植物组织培养及生理生化研究。E-mail: dqnkywln@163.com。

通讯作者:金勋(1962-),男,博士,研究员,从事作物分子育种研究。E-mail: jinxun6268@126.com。

**Abstract:** In order to research the characteristics of wax gourd resistant to low temperature, taking 15 wax gourd varieties treated with low temperature at seedling stage as the materials to assess their low temperature tolerance and select the indicators by correlation analysis, principal component analysis, membership function analysis, cluster analysis and regression analysis. A total of 5 indicators including seedling height, stem diameter, leaf area, fresh matter and dry matter were measured after low temperature stress at seedling stage. The results showed that the relative height had significant difference with relative stem diameter, relative leaf area and relative fresh weight. The two principal components were screened out by principal component analysis, and the cumulative contribution rate was 77.622%. The cold resistance of the 15 wax gourd materials was distinctly different, by comparing the comprehensive evaluation values. One resistant variety and 3 intolerant varieties were selected out through cluster analysis. A tolerance equation of wax gourd seedlings was established by stepwise regression analysis. Five morphological indexes of wax gourd seedling were sensitive to low temperature and could be used as identification index.

**Keywords:** wax gourd; low temperature tolerance; morphological index; principal component analysis; membership function value; cluster analysis

种外植体的污染率及腋芽存活率。花梗接种培养基后统计丛生芽诱导率,增殖率,计算增殖系数等并比较分析,建立适合于蝴蝶兰花梗腋芽诱导丛生芽的快速繁殖体系,为实现高效工厂化育苗提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

蝴蝶兰花梗由黑龙江省农业科学院大庆分院温室提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体的采集 选择健康的蝴蝶兰植株,分别剪切含有4~5个芽胞的幼嫩花梗和已开花的花梗底含有2~3个芽胞的花梗作为诱导的外植体。

1.2.2 外植体的消毒 将采集的花梗带到试验室,使用75%的酒精轻轻擦拭表面,切记不要破坏腋芽,利用消毒后的剪刀以含一个腋芽数为单位剪成2~3 cm小段,自来水冲洗30 min后淋干,开始进行无菌消毒处理。消毒方式为3种:0.1% HgCl<sub>2</sub>, 10 min; 5% NaClO, 10 min; 10% NaClO, 10 min, 无菌水冲洗3~4次,并用无菌滤纸吸干水分后剥掉苞叶顺势转接到诱导培养基中,观察消毒效果。

1.2.3 丛生芽诱导分化及增殖 花梗腋芽诱导丛生芽培养基: VW(大量)+MS(微量、铁盐、有机)+100 g·L<sup>-1</sup> 马铃薯+0.1 g·L<sup>-1</sup> Ga<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>+6 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖, 6.5 g·L<sup>-1</sup> 琼脂, pH5.4。每处理接种30株花梗,重复3次。

丛生芽增殖和分化培养基: VW(大量)+MS(铁盐、有机、微量)+马铃薯 100 g·L<sup>-1</sup>+6-BA 3 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>, 蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>, 琼

脂 6.5 g·L<sup>-1</sup>, pH5.4。每处理接种30个丛生芽,重复3次。

培养条件: 温度(25±2)℃, 光/暗周期16 h/8 h, 光照强度2 000~3 000 lx, 每14 d转接1次, 待丛生芽高2 cm左右, 用于生根培养。56 d后分别统计腋芽诱导率、增殖率、计算增殖系数。

1.2.4 诱导生根 诱导生根培养基: 1/2MS+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>, 蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>, 琼脂 6.5 g·L<sup>-1</sup>, pH5.7。培养条件温度(25±2)℃, 光/暗周期16 h/8 h, 光照强度2 500~3 500 lx, 28 d后统计生根率。

1.2.5 驯化和移栽 待丛生芽诱导出3条以上的气生根后, 将培养瓶敞口于温室中驯化7 d, 并用10%多菌灵浸泡消毒4 h后水草甩到不滴水作为栽培基质, 清水冲洗掉无菌幼苗根部培养基, 根部包裹水草, 移栽到10%多菌灵浸泡的多孔穴盘中, 进行育苗。

1.2.6 数据分析 采用Excel 2000进行数据的统计及分析。

2 结果与分析

2.1 消毒方式对外植体诱导丛生芽的影响

由于蝴蝶兰植株自身携带内生菌, 常规消毒方式不能彻底达到无菌的效果, 因此消毒方法的选择是花梗诱导丛生芽成功与否的关键<sup>[4]</sup>。从表1可看出, 两种外植体在相同消毒时间下0.1% HgCl<sub>2</sub>, 10 min组合消毒效果最好, 污染率为0, 存活率达到100%。5% NaClO、10 min组合相对次之, 幼嫩花梗和已开花花梗的污染率分别为9%和15.1%, 存活率分别为91.1%和84.9%。而10% NaClO、10 min对两种外植体腋芽生存率的影响最大, 可能因NaClO浓度过高毒性大损伤腋芽从而影响植株正常生长。

表 1 消毒方式对外植体消毒效果的比较

Table 1 Comparison of disinfection methods on sterilizing effect of external explants

外植体 Explant	消毒剂类型 Disinfectant type	消毒剂浓度/% Disinfectant concentration	消毒时间/min Disinfectant time	污染率/% The pollution rate	存活率/% Fraction surviving rate
幼嫩花梗 Young pedicel	HgCl <sub>2</sub>	0.1	10	0	100.0
		5	10	9.0	91.1
	NaClO	10	10	6.7	35.5
已开花花梗 Flowering pedicel	HgCl <sub>2</sub>	0.1	10	0	100.0
		5	10	15.1	84.9
	NaClO	10	10	12.2	59.0

## 2.2 基本培养基对花梗诱导丛生芽及增殖分化的影响

由表 2 可知,幼嫩花梗的丛生芽诱导率、增殖率都高于已开花花梗,增殖系数为已开花花梗的 2 倍,可见幼嫩腋芽的组织活力较强,适合于丛生芽的诱导。

表 2 两种外植体的诱导及增殖情况

Table 2 Induction and proliferation of two explants			
外植体 Explant	诱导率/% Inductivity rate	增殖率/% Reproducibility rate	增殖系数 Multiplication coefficient
幼嫩花梗 Young pedicel	95.6	216	3.0
已开花花梗 Flowering pedicel	84.5	183	1.5

## 2.3 基本培养基对生根的影响

利用 1/2MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA 诱导丛生芽

生根,在诱导腋芽增殖及分化的过程中,发现培养基的营养成分同时也促进根的生长,但伸长的速度远小于在生根培养基上的伸长速度。由表 3 可知,两种外植体的生根率分别达到了 95.6%、86.7%,说明选择的培养基更适合幼嫩花梗的生根。

表 3 两种外植体的生根情况

Table 3 The rooting of two explants	
外植体 Explant	生根率/% The rooting percentage
幼嫩花梗 Young pedicel	95.6
已开花花梗 Flowering pedicel	86.7

图 1a-1e 呈现的是幼嫩蝴蝶兰花梗腋芽诱导丛生芽到培养成小苗的过程。图 1a 为消毒后的花梗茎段,图 1b 为花梗叶芽诱导的丛生芽,图 1c 为丛生芽的分化,图 1d 为丛生芽的增殖,图 1e 为丛生芽的生根,图 1f 为瓶苗经过驯化后移栽到多孔穴盘中待培养为成苗。

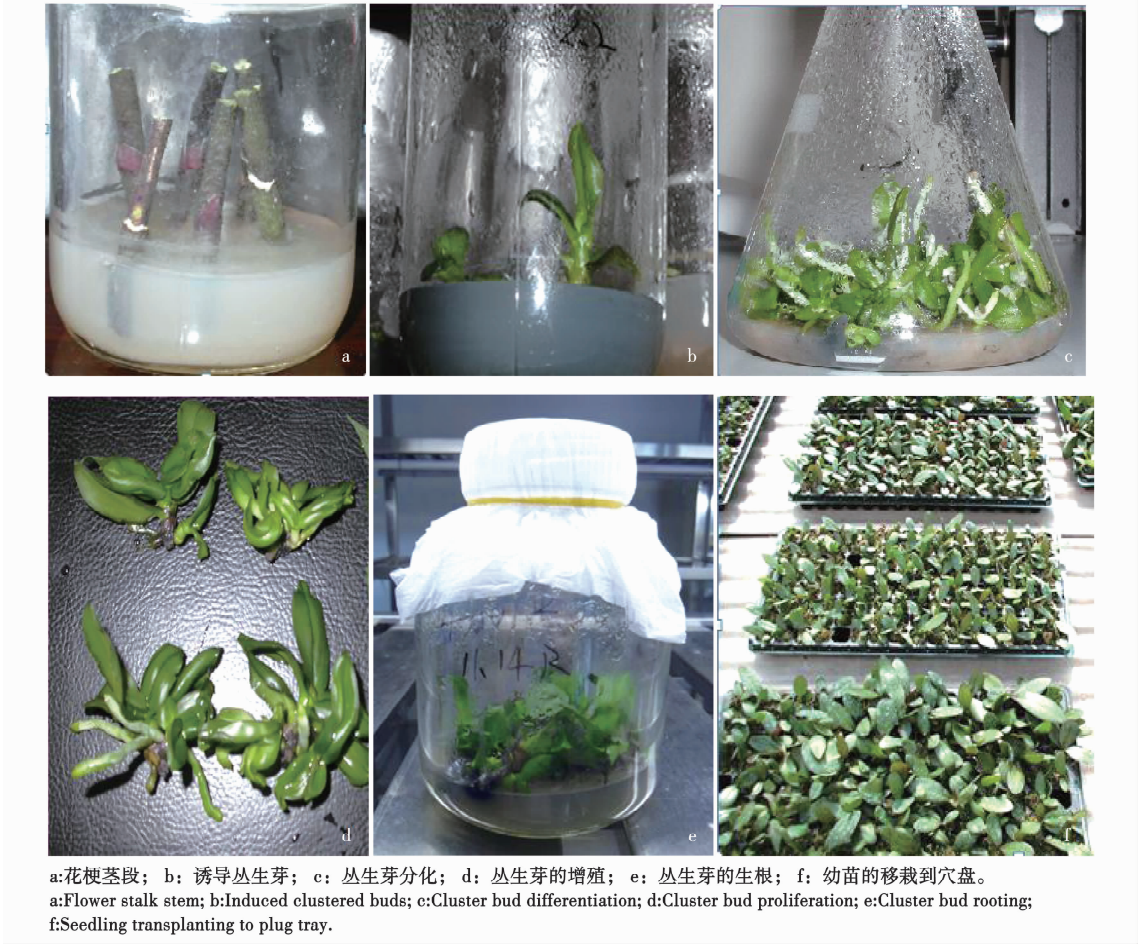


图 1 蝴蝶兰幼嫩花梗腋芽诱导丛生芽  
Fig. 1 Inducing tufted buds of axillary bud on orchid Young pedicel

### 3 结论与讨论

用于蝴蝶兰植株组培快繁的外植体取材是多样的,可用茎尖、根尖、叶片、花瓣、顶芽、花梗腋芽等进行组织培养<sup>[5]</sup>。而蝴蝶兰的花梗腋芽具有取材灵活、成本低、植株损伤小、诱导时间短,繁殖速度快的特点<sup>[6]</sup>。研究表明,以花梗腋芽诱导的丛生芽的诱导率为 80%<sup>[7]</sup>。而本研究中幼嫩花梗丛生芽诱导率达到了 95.6%。已开花的花梗丛生芽诱导率达到 84.5%,说明该研究所使用的诱导培养基为最佳。采用已开花花梗的目的是为节省成本的投入,实现凋谢的花朵再利用的意义。从研究中可看出,幼嫩花梗丛生芽诱导率高于开花花梗,该结果与前人获得开花后的花梗是诱导芽的良好材料说法不相符合<sup>[8]</sup>,这可能与不同基因型品种诱导机制不同有关。以往关于蝴蝶兰组织培养及再生体系建立的试验中一般都采用 MS、1/2MS、KC、VW、花宝 1 号等作为诱导基本培养基<sup>[9-10]</sup>,本研究首次采用“VW + MS +  $\text{Ga}_3(\text{PO}_4)_2$ ”组合为基本培养基,诱导效果及增殖系数明显优于其它。本研究建立的蝴蝶兰花梗诱导丛生芽技术,不仅能够有效地利用花梗资源节约成本的投入,而且还能从根本上提高丛生芽诱导率及增殖率,这将为实现蝴蝶兰花梗腋芽高效

繁殖及工厂化育苗提供坚实的技术依据。

#### 参考文献:

- [1] 段文武. 蝴蝶兰“大红袍”组培快繁技术研究[D]. 娄底:湖南人文科技学院,2014.
- [2] 谈静,张英杰,郭文姣,等. 大花型红花蝴蝶兰花梗腋芽诱导的影响因素[J]. 中国农学通报,2016,32(16):87-92.
- [3] 陈传红,蔡奇英,管毕财,等. 多效唑在生姜组织培养中的应用研究[C]. 第二届全国植物组织培养、脱毒快繁及工厂化生产学术研讨会,2004:43-44.
- [4] 潘丽晶,陈继敏,张妙彬,等. 蝴蝶兰根内生细菌的分离及可分泌 IAA 细菌的筛选[J]. 中国农学通报,2014,30(16):148-152.
- [5] 陈桂敏,郑羽书,杨佩华,等. 不同外植体对蝴蝶兰组培快繁的影响[J]. 中国园艺文摘,2013(11):15-16.
- [6] 张彩玲. 蝴蝶兰花梗组织培养与快速繁殖的研究[J]. 中国林副特产,2010(5):42-44.
- [7] 柏峰,高如宾,柏杨,等. 蝴蝶兰组培快繁的应用研究[J]. 唐山师范学院学报,2007,29(2):41-42.
- [8] 王仁睿,李明福,韩林波,等. 蝴蝶兰组织培养体系的建立及其关键技术研究[J]. 中国农学通报,2010,26(10):197-201.
- [9] 吕永杰,李仕贵,周晓禾. 观赏兰科植物组培快繁及遗传转化的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(10):42-46.
- [10] 章玉平,刘成运,胡鸿钧,等. 蝴蝶兰无菌萌发技术的研究[J]. 植物科学学报,2004,22(1):82-86.

## An Efficient System for Inducing Cluster Buds of *Phalaenopsis* Pedicels

WANG Li-na, JIN Xun, LI Ze-yu, GU Xin, QI Guo-chao

(Daqing Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China)

**Abstract:** In order to improve the efficiency of tissue culture of *Phalaenopsis*, we used the axillary buds of young and flowering butterfly orchids as explants, and adopted two disinfectants ( $\text{HgCl}_2$  and  $\text{NaClO}$ ), and three disinfection methods (0.1%  $\text{HgCl}_2$ , 10 min; 10%  $\text{NaClO}$ , 10 min; 5%  $\text{NaClO}$ , 10 min) to compare the disinfection effects. The mediums were as follows, VW (A large number of elements) + MS (trace, iron, organic) +  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  potato +  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Ga}_3(\text{PO}_4)_2$  +  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA as the basic medium, VW (A large number of elements) + MS (trace, iron, and organic) +  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  potato +  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA as proliferation and differentiation medium, and 1/2MS +  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA induced clustered buds for rooting medium. The results showed that the induction rates of pollution rate was 0, the young shoots of axillary buds were 95.6%, the reproducibility rate was 216%, and the rooting rate of 1/2MS +  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA in the rooting medium was 95.6%, under 0.1%  $\text{HgCl}_2$  10 min disinfection method indicated the use of two kinds of medium, disinfection methods and induced proliferation and differentiation, was suitable for inducing shoots of axillary buds of young peduncle.

**Keywords:** pedicel axillary buds; induction; proliferation and differentiation; *Phalaenopsis amabilis*