

# 蝴蝶兰组织培养快繁技术研究

张颖<sup>1</sup>, 郭晓东<sup>2</sup>, 王芳<sup>1</sup>, 张楠<sup>1</sup>

(1. 宿迁学院 教育系, 江苏 宿迁, 223800; 2. 哈尔滨工业大学 后勤集团, 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要:**以蝴蝶兰花梗为初次诱导外植体, 对蝴蝶兰的离体繁殖途径进行研究, 建立蝴蝶兰植株再生系统。结果表明: 初代培养基: MS+ 6-BA 5 mg/L+ NAA 0.3 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 6 g/L 的萌芽数最多; 增殖培养基: MS+ 6-BA 7 mg/L+ NAA 1.0 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 6 g/L+ 椰汁 200 mL/L 叶片数和增殖系数最高; 生根诱导培养基: 改良 1/2 KC+ IBA 1 mg/L+ NAA 0.5 mg/L 生根效果最好。

**关键词:** 蝴蝶兰; 花梗; 外源激素; 组织培养

**中图分类号:** S 682.301.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0122-03

蝴蝶兰(*Phalaenopsis hybrid.*)为兰科(Orchidaceae)蝴蝶兰属(*Phalaenopsis*)植物, 原产地为热带和亚热带, 天然分布于亚洲和大洋洲。至今, 全世界发现的野生蝴蝶兰原种有 40 多个, 分布于亚洲和大洋洲热带和亚热带地区<sup>[1]</sup>。现市场上销售的蝴蝶兰多为杂交改良后的新品种。蝴蝶兰色彩丰富、形态优美、花期长, 被列为高档名贵花卉, 有“兰花皇后”的美誉。蝴蝶兰属于单茎性气生兰, 极少发育侧枝, 形成种子少且困难, 不易进行常规繁殖, 因此组织培养成为蝴蝶兰高效繁殖的重要手段<sup>[2]</sup>。该研究以蝴蝶兰花梗为材料进行组织培养, 建立了蝴蝶兰植株再生系统, 为工厂化育苗提供有效途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为红花系蝴蝶兰, 选用 2 种花梗, 已开花花梗(下端带有休眠芽)和花蕊尚未长出但已完全抽出的花梗。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体的选择** 选用 2 种花梗, 已开花花梗(下端带有休眠芽)和花蕊尚未长出但已完全抽出的花梗, 培养基为 MS+ 6-BA 5 mg/L+ NAA 0.3 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 6 g/L, 每处理 10 株, 3 次重复, 30 d 后统计各处理的萌芽率及长势。

**1.2.2 外植体处理** 选择有花梗无病虫害的健壮蝴蝶兰为母株, 于温室之中培养。取材前 7~8 d 停止浇水, 选取已开花花梗(下端带有休眠芽)和花蕊尚未长出但已完全抽出的花梗, 用剪刀从花梗基部切割, 将花梗在流水中冲洗 30 min, 并不断搅动。将冲洗后的花梗用滤

纸擦干, 带入超净工作台, 用 75% 酒精从一端到另一端擦拭 1 遍后切成茎段(茎段长度以能够完全浸入消毒液为宜), 采用 2 次消毒处理方法。首先用 75% 酒精浸泡 30 s, 再用 0.1% 的升汞消毒 7 min, 无菌水冲洗 3 次, 用无菌滤纸吸干水分后再次放入 0.1% 的升汞消毒 7 min, 无菌水冲洗 5 次, 用无菌滤纸吸干水分, 切成 1.5~2 cm 长的茎段, 每茎段留侧芽或茎节, 并将茎段两端接触消毒液的切口剪去。

**1.2.3 外植体接种、芽的诱导** 把灭过菌的已开花花梗外植体按照花梗自然生长方向插入下面配方的培养基中, 配方为 MS 基本培养基, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 6 g/L, 附加 3 个浓度的 6-BA: 3、5、7 mg/L, NAA 的浓度为 0.3 mg/L, 以不加入 6-BA 为对照。每处理 10 株, 3 次重复, 30 d 后统计各处理的萌芽率。

**1.2.4 继代增殖** 选取长为 1 cm 左右, 生长状况一致的单芽作为接种材料进行继代培养。每处理 10 株, 3 次重复。生长素选用 NAA, 浓度分别设为: 0、0.5、1.0、1.5 mg/L; 细胞分裂素选用 6-BA, 浓度设为: 0、5、7、9 mg/L。60 d 后统计各侧芽的增殖系数。

**1.2.5 椰汁添加试验** 继代增殖中添加椰汁, 分别设 5 个浓度水平: 50、100、150、200、250 mL/L, 以不附加椰汁为对照。培养基为 MS 附加 6-BA 7.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L。60 d 后观察统计每个处理的叶片数、增殖系数。

**1.2.6 生根与练苗** 当芽长至 2.0 cm 左右, 2~3 片叶时, 转入生根培养基中, 培养基为 MS+ IBA 1 mg/L+ NAA+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 6 g/L+ 椰汁 100 mL/L+ 活性炭 2 g/L, NAA 设 3 个浓度水平: 0.1、0.5、1.0 mg/L。60 d 后统计各处理的株平均根数和根长, 以此来选择适宜的激素浓度。

第一作者简介: 张颖(1980-), 女, 黑龙江人, 研究方向为植物组织培养。E-mail: ying807812@163.com。

收稿日期: 2009-12-09

1.3 培养条件

试验材料无特殊说明均在植物组培室中培养, 培养温度(25±2)℃, 光照 10~ 12 h/d, 光照强度 1 600~ 2 000 lx, 环境湿度 60%~ 80%。

2 结果与分析

2.1 外植体对蝴蝶兰花梗启动分化的影响

在诱导培养基: MS+ 6-BA 5 mg/L+ NAA 0.3 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 6 g/L 中分别接入蝴蝶兰已开花花梗(下端带有休眠芽)和花蕊尚未长出但已完全抽出的花梗外植体。结果表明, 经过 30 d 的培养后, 已开花花梗(下端带有休眠芽)的萌芽率为 41.3%, 花蕊尚未长出但已完全抽出花梗的萌芽率为 51.1%。由此可知, 不同时期的外植体对花梗腋芽的萌芽率存在差异。在生产中 2 种外植体都可采用, 但由于可从已开花蝴蝶兰的花姿、花色、大小等方面加以辨别, 选出更具有观赏价值的蝴蝶兰, 因此多用已开花花梗为外植体。

2.2 6-BA 浓度对芽诱导的影响

由图 1 可知, 不附加 6-BA 时, 丛生芽数平均为 0.7 个, 当加入 6-BA 后丛生芽数随着 6-BA 浓度的增加而增加, 且各个浓度处理之间在 0.05 显著水平上差异极显著。当 6-BA 浓度为 7 mg/L 时丛生芽数最高, 平均为 8.7 个, 但通过观察此浓度下的丛生芽多数发生畸形变异, 影响下一步的继代增殖及观赏性状。而当 6-BA 浓度为 5 mg/L 时丛生芽数平均为 6.1 个, 仅次于最高丛生芽数, 且发生畸形变异的数量较少, 因此该试验确定芽诱导培养基配方为: MS+ 6-BA 5 mg/L+ NAA 0.3 mg/L+ 蔗糖 30 g/L+ 琼脂 6 g/L。

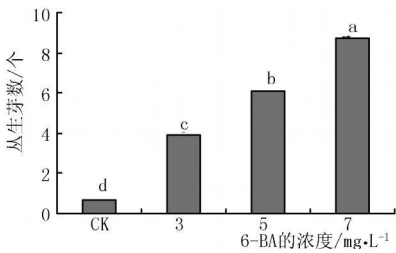


图 1 6-BA 对腋芽萌发的影响

2.3 不同激素及浓度对蝴蝶兰继代增殖的影响

由表 1 可知, 蝴蝶兰单芽的繁殖系数受 6-BA 和 NAA 浓度及其组合的影响, 不同浓度梯度下的差异显著水平不同。当 6-BA 浓度为 0 时, 没有诱导出侧芽, 当 6-BA 浓度相同时(不包括浓度为 0), 增殖系数先随 NAA 浓度的增加而增加, 后随 NAA 浓度的增加而减少, 在 6-BA 浓度为 7.0 mg/L, NAA 浓度为 1.0 mg/L 时增殖系数最高, 为 3.27; 当 NAA 浓度为 0 时, 单芽也能增殖生长, 但增殖缓慢, 当 NAA 浓度相同时(包括浓度为 0), 增殖系数先随着 6-BA 浓度的增加而增加, 后随

6-BA 浓度的增加而减少。因此, 增殖培养以 6-BA 浓度为 7.0 mg/L, NAA 浓度为 1.0 mg/L 时增殖效果最好, 增值系数最高, 为 3.27。

表 1 不同激素对蝴蝶兰单芽繁殖系数的影响

浓度/ mg · L <sup>-1</sup>		增殖系数	显著性	
NAA	6-BA		0.05	0.01
0	0	0	h	J
0	5	1.21	g	HI
0	7	1.54	f	G
0	9	1.00	g	I
0.5	0	0	h	J
0.5	5	1.84	e	F
0.5	7	2.97	b	B
0.5	9	2.07	d	EF
1.0	0	0	h	J
1.0	5	2.52	e	C
1.0	7	3.27	a	A
1.0	9	2.93	b	B
1.5	0	0	h	J
1.5	5	1.50	f	GH
1.5	7	2.19	d	DE
1.5	9	2.47	c	CD

2.4 椰汁用量对蝴蝶兰花梗继代增殖生长的影响

由图 2 可知, 椰汁的加入对蝴蝶兰继代增殖新叶生长数量有显著影响, 椰汁浓度在 0~ 200 mL/L 之间时新叶片数随着椰汁浓度的增加而增加, 在椰汁浓度为 200 mL/L 时新叶数达到最多片数, 为 10.44 片, 极显著地高于其它处理; 但椰汁浓度为 100 mL/L 和 150 mL/L 时, 二者对新叶的生长无显著差异; 当椰汁浓度继续增加到 250 mL/L 时, 新叶片数为 5.85, 低于浓度为 200 mL/L。因此, 椰汁对蝴蝶兰花梗继代增殖新叶片数生长有明显促进作用, 最佳浓度为 200 mL/L。

由图 3 可知, 椰汁的加入对蝴蝶兰继代增殖系数有极显著影响, 椰汁浓度在 0~ 200 mL/L 之间时新叶增殖系数随椰汁浓度增加而增加, 当椰汁浓度为 0 时, 对照的增殖系数为 0, 当椰汁浓度为 200 mL/L 时, 新叶增殖系数达到最大 9.31, 极显著地高于其它处理; 当椰汁浓度继续增加到 250 mL/L 时, 新叶增殖系数为 6.64, 低于浓度为 200 mL/L 时的增殖系数。因此, 椰汁对蝴蝶兰花梗继代增殖新叶增殖系数有明显促进作用, 最佳浓度为 200 mL/L。

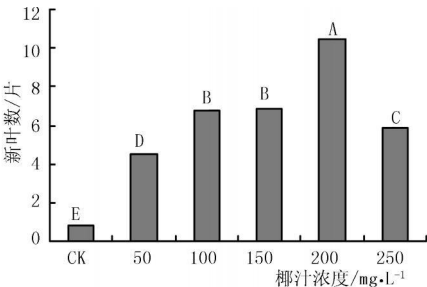


图 2 椰汁对继代增殖叶片数的影响

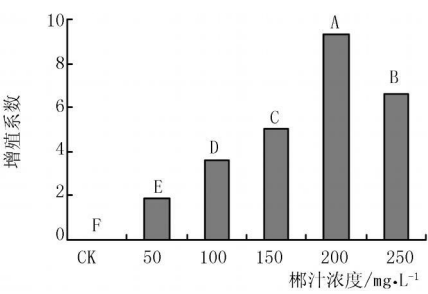


图3 椰汁对继代增殖系数的影响  
注:图中不同大写字母标记0.01 显著水平。

2.5 生根与练苗

由表 2 NAA 对生根的影响可知,3 种不同 NAA 浓度对蝴蝶兰根长度的影响不同,NAA 浓度为 0.5 mL/L 时,蝴蝶兰平均根长最长,此处处理极显著地优于其它处理,而处理 2 和 4 之间差异不显著。在根数方面各个处理之间的差异极显著,以处理 3 的效果最好。因此蝴蝶兰在生根方面适宜的 NAA 浓度为 0.5 mL/L。

生根后将苗置于光照 10 h/d,光强 10 000 lx 的环境下 20 d,加强其瓶苗的质量和种植成活率。当苗高 4 cm 左右,叶片数 3~ 5 片时,即可出瓶种植。

表 2 NAA 对生根的影响				
处理号	IBA/ mL · L <sup>-1</sup>	NAA/ mL · L <sup>-1</sup>	根长/ cm	根数/ 条
1	1.0	0	1.29B	2.40D
2	1.0	0.1	1.33AB	4.15B
3	1.0	0.5	1.42A	4.97A
4	1.0	1.0	1.32AB	3.62C

注:表中不同字母标记为 0.01 显著水平。

3 结论与讨论

自从 1949 年 Rotor 利用无菌培养技术成功地在试管中将蝴蝶兰花梗上的休眠芽培养出完整植株后,国内外学者纷纷对蝴蝶兰的组织培养技术进行相应研究<sup>[3]</sup>。Intuwong 等利用蝴蝶兰的茎尖进行研究,成功地得到完

整植株<sup>[4]</sup>。随着科学技术的进一步发展,国内外以蝴蝶兰茎尖为外植体的研究逐渐增多,尽管茎尖及其周围组织较为幼嫩,容易脱分化并再分化成完整植株,但蝴蝶兰为单茎性植物,摘取其茎尖就有可能损失母株,造成浪费,因此,在实际应用中,蝴蝶兰的茎尖培养可以用其它器官培养代替<sup>[3]</sup>。

蝴蝶兰的繁殖方法主要有无菌播种和诱导原球茎途径,虽然植物组织培养中可获得大量形态、生理特征不变的植株,但通过愈伤组织分化不定芽的方式所获得的再生植株变异率较高,虽然其中有些是有益变异,但更多的是不良变异<sup>[5]</sup>。该试验由蝴蝶兰花梗诱导丛生芽,丛生芽增殖扩繁得到再生植株,此途径简单易行,后代很少发生变异,能够保持母本的优良性状,且母本能正常生长发育,对引进新品种资源做到充分保护利用,避免不必要的浪费,因此,此途径利于蝴蝶兰组织培养及市场销售。

该试验中,在外植体对蝴蝶兰花梗启动分化的观察来看,发现外植体的不同部位对蝴蝶兰萌芽率的影响也不同,当外植体为已开花的花梗时,花梗中部腋芽的萌芽率大于上部腋芽,而上部腋芽又大于下部腋芽;当外植体为未开花的花梗时,上部腋芽的萌芽率大于中部腋芽,中部腋芽的萌芽率大于下部腋芽<sup>[6]</sup>,这与王立娅的研究结果相同。

参考文献

[1] 胡松华. 蝴蝶兰[M]. 广东: 广东科技出版社,1996: 3-5.  
[2] 胡松华. 热带兰花[M]. 北京: 中国农业出版社,2003: 48-50.  
[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] Intuwong O, Sagaus Y. Clone propagation of Phalaenopsis by shoot-tip culture[J]. Amer orchid Soc Bull, 1975, 93: 893-895.  
[5] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 甘肃: 甘肃科学技术出版社,2002: 179-181.  
[6] 王立娅. 蝴蝶兰组织培养技术体系研究[D]. 保定: 河北农业大学,2008.

The Research on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Phalaenopsis* Hybrid

ZHANG Ying<sup>1</sup>, GUO Xiao-dong<sup>2</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, ZHANG Nan<sup>1</sup>  
(1. Department of Education, Suqian College Suqian, Jiangsu 223800; 2. Harbin Institute of Technology Logistics Group, Harbin, Heilongjiang 150001)

**Abstract:** The flower stems of the plant were used as explants primarily induced to study the propagation pathway of *Phalaenopsis* Hybrid cultured *in vitro*, and the regeneration systems of the plant were constructed. The result indicated that the most numbers of the sprouts were observed by using MS medium supplemented with 6-BA 5 mg/L, NAA 0.3 mg/L, Sugar 30 g/L and Agar 6 g/L as primary culture medium; the optimal propagation medium for the highest numbers of leaf and propagation coefficient was MS medium supplemented with 6-BA 7 mg/L, NAA 1.0 mg/L, Sugar 30 g/L, Agar 6 g/L and Coconut juice 200 mL/L; the optimal root medium was half of the modified KC medium supplemented with IBA 1 mg/L and NAA 0.5 mL/L.

**Key words:** *Phalaenopsis* Hybrid; flower stem; growth substance; tissue culture