

蝴蝶兰‘大辣椒’组培快繁技术体系的优化

高壮壮, 娄倩, 刘雅莉*

(西北农林科技大学旱区作物逆境生物学家重点实验室, 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 陕西 杨陵 712100)

摘要:探索优化蝴蝶兰组培快繁技术体系,以蝴蝶兰‘大辣椒’半木质化花梗为试验材料,研究消毒剂、基础培养基、植物生长调节剂配比及浓度对蝴蝶兰不定芽诱导、增殖和生根过程的影响。结果表明:1)先用2% H₂O₂溶液处理15 min,再用10% NaClO溶液处理10 min,消毒效果良好,花梗污染率低,为26.6%;2)不定芽诱导最适培养基为花宝1号+花宝2号+6-BA 3 mg/L+NAA 0.05 mg/L,出芽率为78.9%;3)不定芽增殖最适培养基为花宝1号+6-BA 5 mg/L+NAA 0.05 mg/L,增殖系数为3.60;4)幼苗生根最适培养基为1/2MS+NAA 0.2 mg/L,生根率为73.7%。本研究旨在优化‘大辣椒’品种的组培快繁技术体系,为进一步建立蝴蝶兰再生体系和工厂化生产提供技术支持。

关键词:蝴蝶兰;不定芽;增殖;生根;快速繁殖

中图分类号:S682.31

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2020)04-0095-06

Optimization of the Tissue Culture and Rapid Propagation of *Phalaenopsis* Cultivar ‘Big Chili’

GAO Zhuang-zhuang, LOU Qian, LIU Ya-li*

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Horticultural Plant Biology and Germplasm Innovation, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: In order to develop and optimize the technique system of tissue culture and rapid propagation of *Phalaenopsis aphrodite*, semi-lignified peduncles of a *P. aphrodite* cultivar ‘Big Chili’ were used as test materials to study the effects of disinfectant, basic medium, plant growth regulator on the induction and proliferation of adventitious buds, proliferation, and rooting process. The results showed that 1) the infection rate of peduncles was low (26.6%) after they were treated by 2% H₂O₂ for 10 min and 10% NaClO for 15 min; 2) The optimal medium for adventitious bud induction was Hyponex No. 1+Hyponex No. 2+6-BA 3 mg/L+NAA 0.05 mg/L, the germination rate was 78.9%; 3) The optimal medium for adventitious bud proliferation was Hyponex No. 1+6-BA 5 mg/L+NAA 0.05 mg/L, the multiplication coefficient was 3.60; 4) The optimum medium for rooting was 1/2MS+NAA 0.2 mg/L, the rooting rate was 73.7%. The results of this study could be used as the technical support for the rapid propagation of *P. aphrodite* in large scale.

Key words: *Phalaenopsis aphrodite*; adventitious bud; proliferation; rooting; rapid propagation

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite*) 是兰科蝴蝶兰属的重要花卉,其开花能持续数月之久,有很高的生态、经济、观赏和科研价值,受到国内外消费者的

推崇^[1]。目前全世界已发现蝴蝶兰原生种达70多个,其中中国原产有4种,杂交品种约有3万种以上,广泛应用于生产生活中^[2]。蝴蝶兰属于单茎性

收稿日期:2020-03-20 修回日期:2020-05-02

基金项目:国家自然科学基金(31471905,31701962)。

作者简介:高壮壮,研究方向:园林植物遗传育种。E-mail:Gaoz4207@163.com

*通信作者:刘雅莉,硕士,博士生导师。研究方向:园林植物遗传育种。E-mail:lyl6151@126.com

兰花,几乎不萌发侧枝,难以进行自身无性繁殖,人工繁殖方式主要以花梗催芽繁殖和切茎繁殖为主,种子繁殖成活率低且变异率高^[3],不适用于大量生产。蝴蝶兰自然生长周期较长,很大程度上限制了优良品种的工厂化生产和推广,也限制了利用分子生物技术进行花色育种的进展,因此,需要建立一套快速稳定的蝴蝶兰繁殖体系。

蝴蝶兰组织培养在迁地保护和工厂化生产中发挥着重要作用^[4]。目前,常见的快速繁殖方法有2种,一种是利用根尖、茎尖、幼嫩叶片为外植体诱导原球茎,再进行多次增殖分化后形成不定芽从而实现快速繁殖;另一种则以花梗为外植体诱导产生不定芽,该方法能稳定遗传母本性状,减少后代变异,繁殖速度较快^[5]。花梗腋芽诱导有2种不同的发育机制,一种是营养芽经增殖分化出更多幼芽,另一种则由花芽生长分化出二次花梗,温度和高浓度植物激素可能是引起发育途径发生变化的重要因素,但二次花梗不利于后续增殖^[6]。花梗取材部位会直接影响不定芽诱导率,采用半木质化的花梗为材料污染率低,出芽率高^[7]。基础培养基提供了植物生长发育所需的营养元素,培养基的物质组成和配比很大程度上决定了组培苗的生长情况^[8],VW、KC、MS和花宝系列是蝴蝶兰组织培养中常用的基础培养基,并且在使用中加入一定量的植物生长调节剂能有效地促进生长^[9]。另外,添加部分附加物可以减少褐化污染,提高不定芽的增殖系数,常用的附加物有:土豆泥、香蕉汁、椰汁等。

‘满天红’‘丽影’‘红韵’等优良品种利用花梗进行快速繁殖技术已经成熟^[10-11],但是不同品种间诱导率差异大、增殖系数不高、植物生长调节剂的种类、浓度配比不固定,从而导致不同品种快繁体系的关键技术存在差异。因此,有必要针对特定优良品种建立相应的组培快繁技术体系。本研究以蝴蝶兰‘大辣椒’半木质化花梗为试验材料,研究花梗消毒方式、基本培养基、6-BA和NAA的配比及浓度对不定芽诱导、增殖、生根的影响,确立‘大辣椒’组培快繁过程中不同时期的最适培养条件,从而优化蝴蝶兰的组培快繁技术体系,为蝴蝶兰优良品种的工厂化生产和推广提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

试验品种为蝴蝶兰‘大辣椒’(*P. ‘Big Chili’*),植株购买于西安卉杉生态科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒处理 选取长势良好的蝴蝶兰

(图1,A),在母株上剪取带有腋芽的花梗(图1,B),洗净表面去除将腋芽外部苞片,把花梗切至1~2 cm大小,分段,每段含1个腋芽,冲洗6~8 h^[12]。随后,将花梗移至超净工作台,用体积分数75%酒精处理30 s,经无菌水冲洗后将外植体先后浸入2% H₂O₂溶液10% NaClO溶液中消毒处理,在H₂O₂溶液和NaClO溶液中处理时间分别为10、15 min,无菌水冲洗4次后放至无菌滤纸上,待多余水分被吸干后,将花梗插入诱导培养基中,露出腋芽位置,每个处理接种25个花梗段,重复3次,培养15 d后统计花梗污染率。培养室温度设置为(24±2)℃,光/暗周期14 h/10 h。

$$\text{污染率} = \text{污染数} / \text{接种数} \times 100\%$$

1.2.2 不定芽诱导 分别以MS、花宝1号、花宝1号+花宝2号为基础培养基,加入不同梯度浓度的植物生长调节剂6-BA、NAA,6-BA梯度浓度设置为1、3、5 mg/L,NAA梯度浓度设置为0、0.05、0.1 mg/L。另培养基中分别添加蔗糖30 g/L、植物凝胶3 g/L,土豆泥400 g/L,活性炭500 mg/L,pH 5.8。每个处理接种20个花梗段,重复3次,采用正交试验方法设计正交表(表1),接种20 d后统计出芽率。

$$\text{出芽率} = \text{出芽数} / \text{接种数} - \text{污染数} \times 100\%$$

表1 因素及水平

Table 1 Factors and levels

| 因素 | 水平 | | |
|---------------------------|----|------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| 基础培养基 | MS | 花宝1号 | 花宝1号+ 花宝2号 |
| 6BA/(mg·L ⁻¹) | 1 | 3 | 5 |
| NAA/(mg·L ⁻¹) | 0 | 0.05 | 0.1 |

1.2.3 不定芽增殖培养 以花宝1号+花宝2号为基础培养基,加入不同梯度浓度的植物生长调节剂6-BA、NAA,6-BA梯度浓度设置为1、3、5 mg/L,NAA梯度浓度设置为0、0.5、1 mg/L,另培养基中分别添加蔗糖30 g/L、植物凝胶3 g/L,土豆泥400 g/L,活性炭500 mg/L,pH 5.8。每个处理接种20个不定芽,重复3次,接种25 d后统计不定芽增殖系数。

$$\text{增殖系数} = \text{形成丛生芽数} / \text{接种数}$$

1.2.4 蝴蝶兰生根培养 以1/2MS为基础培养基,加入不同梯度浓度的植物生长调节剂6-BA、NAA,6-BA梯度浓度设置为0、1、2 mg/L,NAA梯度浓度设置为0、0.1、0.2 mg/L,另培养基中添加蔗糖15 g/L、植物凝胶3 g/L,土豆泥400 g/L,活性炭500 mg/L,pH 5.8。每个处理接种20株蝴蝶兰幼

苗,重复3次,接种45 d后统计生根率。

$$\text{生根率} = \frac{\text{生根数}}{\text{接种数} - \text{污染数}} \times 100\%$$

1.3 数据处理与分析

应用SPSS 20.0软件对花梗污染率、不定芽诱导率、增殖率和生根率进行方差分析,并计算单因子主效应分析。

2 结果与分析

2.1 消毒剂种类和消毒时间处理对外植体的影响

消毒剂种类的选择和适当的消毒时间对于获得无菌外植体有重要影响,既要保证消毒彻底,又不能损害外植体正常生长。由表2得出,消毒剂仅使用

表2 消毒剂种类和消毒时间对外植体的影响

Table 2 Effects of disinfectant types and disinfection time on explants

| 序号 | 消毒剂种类 | 消毒时间/min | 接种花梗数/个 | 污染率/% |
|----|---|----------|---------|-------|
| 1 | 10% NaClO | 10 | 25 | 94.6 |
| 2 | 10% NaClO | 15 | 25 | 70.6 |
| 3 | 2% H ₂ O ₂ +10% NaClO | 10+10 | 25 | 52.0 |
| 4 | 2% H ₂ O ₂ +10% NaClO | 10+15 | 25 | 41.3 |
| 5 | 2% H ₂ O ₂ +10% NaClO | 15+10 | 25 | 26.6 |
| 6 | 2% H ₂ O ₂ +10% NaClO | 15+15 | 25 | 33.3 |

表3 消毒剂种类和消毒时间对外植体影响的方差分析

Table 3 Analysis of variance of the effects of disinfectant types and disinfection time on explants

| 影响源 | Ⅲ型平方和 | 自由度 | 均方 | F | Sig |
|-------|-----------|-----|---------|---------|-------|
| 消毒剂种类 | 863.936 | 2 | 268.362 | 118.365 | 0.029 |
| 消毒时间 | 1126.222 | 2 | 375.407 | 105.583 | 0.034 |
| 误差 | 7.638 | 4 | 5.286 | | |
| 总计 | 42135.264 | 9 | | | |
| 校正总计 | 1836.69 | 8 | | | |

注: $R^2=0.996$ (调整 $R^2=0.994$)。

2.2 基础培养基和6-BA、NAA对不定芽诱导的影响

在诱导培养基上接种消毒后的花梗,培养10~15 d腋芽开始萌发,30 d左右逐渐长出小叶。表4结果表明,花梗在消毒后初次接入诱导培养基中污染较高,不同培养基组合上的不定芽长势不同,花宝1号+花宝2号作为基础培养基时出芽率明显高于MS和花宝1号;同时,出芽率随着6-BA浓度的升高而升高,生长越快(图1,C-D),但不定芽易畸形生长,出现二次花梗。

根据方差分析结果表明(表5),基础培养基对诱导出芽率呈极显著影响($\text{Sig}=0.002, P<0.01$),6-BA对诱导出芽率呈极显著影响($\text{Sig}=0.007, P<0.01$),NAA对诱导出芽率影响不显著($\text{Sig}=0.066, P>0.05$),3个基本因素中对花梗诱导出芽率影响的大小依次是基本培养基、6-BA、NAA。

根据单因素影响不定芽诱导结果表明(表6),对于提高花梗诱导出芽率,基础培养基应为花宝1号+花宝2号(均值最大,为71.200),6-BA浓度应

10% NaClO溶液时,污染率极高,当混合使用2% H₂O₂溶液和10% NaClO溶液时,污染率明显降低,且先使用2% H₂O₂溶液处理15 min后,再使用10% NaClO溶液处理10 min,污染率降到最低,为26.6%,消毒作用最明显。所以,花梗消毒最佳方法为:先用2% H₂O₂溶液处理15 min,再用10% NaClO溶液处理10 min。

根据方差分析结果表明(表3),消毒剂种类对花梗污染率呈显著影响($\text{Sig}=0.029, P<0.05$),消毒时间对花梗污染率呈显著影响($\text{Sig}=0.034, P<0.05$),2个基本因素中对花梗污染率影响的大小依次是消毒剂种类、消毒时间。

为3 mg/L(均值最大,为57.207),NAA浓度应为0.05 mg/L(均值最大,为52.327)。因此,利用花梗诱导不定芽的最佳培养基组合为花宝1号+花宝2号+6-BA 3 mg/L+NAA 0.05 mg/L。

2.3 6-BA、NAA对不定芽增殖的影响

将花梗诱导产生的不定芽切开后转入增殖培养基,10 d左右不定芽基部萌发形成类原球茎块,20 d左右时逐渐长出小叶,叶色由黄绿逐渐转为淡绿、浓绿(图1E~图1F)。根据表7得知,6-BA的浓度越高,类原球茎块越大,褐化污染越多,同时出现叶片生长易玻璃化,叶片脆嫩。综合来看,增殖系数最高的组合为花宝1号+6-BA 5 mg/L+NAA 0.05 mg/L,增殖系数为3.60。

根据方差分析结果表明(表8),6-BA对增殖系数呈显著影响($\text{Sig}=0.047, P<0.05$),NAA对增殖系数呈显著影响($\text{Sig}=0.022, P<0.05$),2个基本因素中对增殖系数影响的大小依次是6-BA、NAA。

表 4 基础培养基、6-BA 和 NAA 对花梗不定芽诱导的影响

Table 4 Effect of basal medium, 6-BA and NAA on the induction of adventitious buds of pedicels

| 序号 | 因素 1 | 因素 2 | 因素 3 | 接种数/个 | 污染数/个 | 出芽数/个 | 出芽率/% |
|----|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 20 | 4 | 2 | 12.5 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 20 | 2 | 6 | 33.3 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 20 | 2 | 7 | 38.8 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 20 | 3 | 7 | 41.1 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 20 | 1 | 10 | 52.6 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 20 | 1 | 9 | 52.9 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 20 | 2 | 11 | 61.1 |
| 8 | 3 | 2 | 2 | 20 | 1 | 15 | 78.9 |
| 9 | 3 | 3 | 1 | 20 | 1 | 14 | 73.6 |

表 5 基础培养基、6-BA 和 NAA 对花梗不定芽诱导影响的方差分析

Table 5 Analysis of variance of the effects of basal medium, 6-BA and NAA on the induction of adventitious buds of pedicel

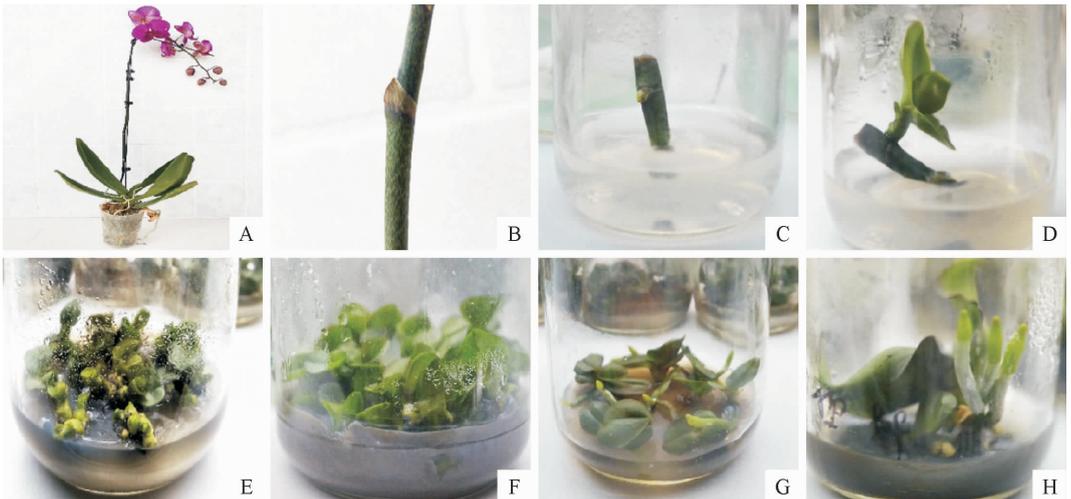
| 影响源 | Ⅲ型平方和 | 自由度 | 均方 | F | Sig |
|-------|------------|-----|-----------|---------|-------|
| 基础培养基 | 2 839.056 | 2 | 1 419.528 | 661.750 | 0.002 |
| 6-BA | 568.548 | 2 | 284.274 | 132.522 | 0.007 |
| NAA | 60.998 | 2 | 30.494 | 14.215 | 0.066 |
| 误差 | 4.290 | 2 | 2.145 | | |
| 总计 | 25 286.190 | 9 | | | |
| 校正总计 | 3 451.202 | 8 | | | |

注: $R^2=0.998$ (调整 $R^2=0.995$)。

表 6 单因素影响不定芽诱导统计

Table 6 Statistics of adventitious buds induced by single factor

| 因素 | 水平 | 均值 | 标准误差 | 均值 95% 的置信区间 95% | |
|------------------------------|---------------|--------|-------|------------------|--------|
| | | | | 下限 | 上限 |
| 基础培养基 | MS | 27.700 | 1.001 | 24.062 | 31.338 |
| | 花宝 1 号 | 48.867 | 1.001 | 45.228 | 52.505 |
| | 花宝 1 号+花宝 2 号 | 71.200 | 1.001 | 67.562 | 74.838 |
| 6-BA/(mg · L ⁻¹) | 1 | 38.233 | 1.001 | 34.595 | 41.872 |
| | 3 | 57.207 | 1.001 | 47.902 | 56.512 |
| | 5 | 52.327 | 1.001 | 53.022 | 61.632 |
| NAA/(mg · L ⁻¹) | 0 | 44.627 | 1.001 | 40.322 | 48.932 |
| | 0.05 | 52.807 | 1.001 | 48.502 | 57.112 |
| | 0.1 | 50.333 | 1.001 | 46.695 | 53.972 |



注: A. 大辣椒植株; B. 带腋芽的花梗; C. 消毒后的花梗; D. 花梗诱导不定芽; E. 不定芽增殖前; F. 不定芽增殖后; G. 蝴蝶兰初生根; H. 蝴蝶兰生根后。

图 1 ‘大辣椒’组培快繁技术体系优化过程

Fig. 1 The optimization process of *Phalaenopsis* cultivar ‘Big Chili’ rapid propagation technology system

根据单因素影响不定芽增殖结果表明(表9),对于提高不定芽增殖系数,6-BA浓度应为5 mg/L(均值最大,为2.583),NAA浓度应为0.05 mg/L

(均值最大,为2.733)。因此,不定芽增殖的最佳培养基组合为花宝1号+6-BA 5 mg/L+NAA 0.05 mg/L。

表7 6-BA、NAA对不定芽增殖的影响

Table 7 Effects of 6-BA and NAA on adventitious bud proliferation

| 序号 | 6BA/(mg·L ⁻¹) | NAA/(mg·L ⁻¹) | 接种数/株 | 形成丛生芽/株 | 增殖系数 | 生长情况 |
|----|---------------------------|---------------------------|-------|---------|------|-----------|
| 1 | 1 | 0 | 20 | 22 | 1.10 | 叶片小,颜色淡绿 |
| 2 | 3 | 0 | 20 | 32 | 1.60 | 叶片小,颜色淡绿 |
| 3 | 5 | 0 | 20 | 36 | 1.80 | 叶片小,颜色墨绿 |
| 4 | 1 | 0.5 | 20 | 39 | 1.95 | 叶片较大,颜色墨绿 |
| 5 | 3 | 0.5 | 20 | 53 | 2.65 | 叶片较大,颜色浓绿 |
| 6 | 5 | 0.5 | 20 | 72 | 3.60 | 叶片大,颜色浓绿 |
| 7 | 1 | 1 | 20 | 36 | 1.80 | 叶片较大,颜色浓绿 |
| 8 | 3 | 1 | 20 | 45 | 2.25 | 叶片大,颜色翠绿 |
| 9 | 5 | 1 | 20 | 47 | 2.35 | 叶片大,颜色浓绿 |

表8 6-BA、NAA对不定芽增殖影响的方差分析

Table 8 Analysis of variance of 6-BA and NAA on adventitious bud proliferation

| 影响源 | Ⅲ型平方和 | 自由度 | 均方 | F | Sig |
|------|--------|-----|-------|--------|-------|
| 6-BA | 1.411 | 2 | 0.705 | 7.182 | 0.047 |
| NAA | 2.282 | 2 | 1.141 | 11.621 | 0.022 |
| 误差 | 0.366 | 4 | 0.098 | | |
| 总计 | 44.620 | 9 | | | |
| 校正总计 | 4.086 | 8 | | | |

注:R²=0.904(调整R²=0.808)

表9 单因素影响不定芽增殖统计结果

Table 9 Statistical results of single factor affecting adventitious bud proliferation

| 因素 | 水平 | 均值 | 标准误差 | 均值95%的置信区间95% | |
|----------------------------|------|-------|-------|---------------|-------|
| | | | | 下限 | 上限 |
| 6-BA/(mg·L ⁻¹) | 1 | 1.617 | 0.181 | 1.114 | 2.119 |
| | 3 | 2.167 | 0.181 | 1.644 | 2.669 |
| | 5 | 2.583 | 0.181 | 2.081 | 3.086 |
| NAA/(mg·L ⁻¹) | 0 | 1.500 | 0.181 | 0.998 | 2.002 |
| | 0.05 | 2.733 | 0.181 | 2.231 | 3.236 |
| | 0.1 | 2.133 | 0.181 | 1.631 | 2.636 |

2.4 6-BA、NAA对蝴蝶兰生根的影响

增殖后的不定芽叶片长至2 cm左右时,将不定芽接种到生根培养基,15 d左右逐渐有小根长出,根基部粗壮且颜色浓绿,此后根迅速生长,逐渐从培养基中长出,伸向空气中,30 d左右根长势旺盛且数量较多(图1G~图1H)。表10表明,6-BA对于蝴蝶兰生根作用不明显,但是NAA会促进生根,生根率最高的组合为1/2MS+NAA 0.2 mg/L,生根率为73.7%。

根据方差分析结果表明(表11),6-BA对蝴蝶兰生根的影响不显著(Sig=0.070, P>0.05),NAA对出芽率呈极显著影响(Sig=0.001, P<0.01)。

根据单因素影响蝴蝶兰生根结果表明(表12):对于提高蝴蝶兰生根率,NAA浓度应为0.2 mg/L(均值最大,为69.033)。因此,蝴蝶兰生根的最佳培养基组合为1/2MS+NAA 0.2 mg/L。

3 结论与讨论

外植体的选择是优化蝴蝶兰快繁技术体系的基础,黄磊等^[13]、Li等^[14]以蝴蝶兰幼嫩叶片为外植体

表10 6-BA、NAA对蝴蝶兰生根的影响

Table 10 Effects of 6-BA and NAA on *Phalaenopsis* rooting

| 序号 | 6BA/(mg·L ⁻¹) | NAA/(mg·L ⁻¹) | 接种数/株 | 污染数/株 | 生根数/株 | 平均根长/cm | 生根率/% |
|----|---------------------------|---------------------------|-------|-------|-------|---------|-------|
| 1 | 0 | 0 | 20 | 2 | 8 | 2.13 | 44.4 |
| 2 | 1 | 0 | 20 | 0 | 9 | 1.81 | 45.0 |
| 3 | 2 | 0 | 20 | 3 | 7 | 1.65 | 41.2 |
| 4 | 0 | 0.1 | 20 | 1 | 12 | 2.92 | 63.1 |
| 5 | 1 | 0.1 | 20 | 0 | 12 | 2.07 | 60.0 |
| 6 | 2 | 0.1 | 20 | 1 | 11 | 2.34 | 57.9 |
| 7 | 0 | 0.2 | 20 | 1 | 14 | 3.09 | 73.7 |
| 8 | 1 | 0.2 | 20 | 2 | 12 | 2.86 | 66.7 |
| 9 | 2 | 0.2 | 20 | 2 | 12 | 2.16 | 66.7 |

表 11 6-BA、NAA 对蝴蝶兰生根的方差分析

Table 11 Analysis of Variance of *Phalaenopsis* rooting with 6-BA and NAA

| 影响源 | Ⅲ型平方和 | 自由度 | 均方 | F | Sig |
|------|------------|-----|---------|---------|-------|
| 6-BA | 40.247 | 2 | 20.123 | 5.569 | 0.070 |
| NAA | 1 008.180 | 2 | 504.090 | 139.508 | 0.001 |
| 误差 | 8.964 | 4 | 3.613 | | |
| 总计 | 30 957.290 | 9 | | | |
| 校正总计 | 1 062.880 | 8 | | | |

注: $R^2=0.986$ (调整 $R^2=0.973$)。

表 12 单因素影响蝴蝶兰生根统计结果

Table 12 Statistical results of single factors affecting *Phalaenopsis* rooting

| 因素 | 水平 | 均值 | 标准误差 | 均值 95% 的 置信区间 95% | |
|---|-----|--------|-------|----------------------|--------|
| | | | | 下限 | 上限 |
| 6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 0 | 60.400 | 1.097 | 57.353 | 63.447 |
| | 1 | 57.233 | 1.097 | 54.186 | 60.280 |
| | 2 | 55.267 | 1.097 | 52.220 | 58.314 |
| NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 0 | 43.533 | 1.097 | 40.486 | 46.580 |
| | 0.1 | 60.333 | 1.097 | 57.286 | 63.380 |
| | 0.2 | 69.033 | 1.097 | 65.986 | 72.080 |

诱导出原球茎,再通过原球茎分化后获得大量不定芽;本研究采用半木质化花梗为材料,通过诱导获得较多的不定芽,与尚宏芹^[15]和 PARK^[16]的研究结果一致。

目前常见的花梗消毒处理方式是采用 0.1% 升汞浸泡^[17],优点是方法简单,消毒效率高,缺点是安全性低。付镇芳等^[18]将 NaClO 溶液和升汞的消毒效果进行比较,发现 NaClO 溶液的消毒杀菌作用远不如升汞好。本试验采用 2% H_2O_2 溶液和 10% NaClO 溶液组合方式杀毒,研究发现,先用 2% H_2O_2 溶液处理 15 min,再用 10% NaClO 溶液处理 10 min,污染率能降到 26.6%,与报道的 0.1% 升汞消毒效果基本相同,对于工厂化安全生产具有重要参考价值。

基础培养基、植物生长调节剂种类和浓度配比对蝴蝶兰的生长起到重要作用。武爱龙等^[19]采用花宝 1 号为基本培养基,在诱导、增殖过程中效果良好,周利利^[20]认为 5 mg/L 的 6-BA 有利于诱导不定芽,低浓度的 NAA 会促进蝴蝶兰的增殖和生根,含盐量较少的 MS 同样也能促进蝴蝶兰的生根。本试验通过研究发现,利用花梗诱导不定芽最适培养基组合为花宝 1 号+花宝 2 号+ 6-BA 3 mg/L+NAA 0.05 mg/L,出芽率达 78.9%;增殖最适培养基组合为花宝 1 号+ 6-BA 3 mg/L+NAA 0.05 mg/L,增殖系数为 3.60;生根最适培养基组合为: 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L,生根率达 73.7%。试验

中褐化污染伴随着蝴蝶兰整个生长过程,尤以增殖过程中居多,推测可能是对不定芽切割形成伤口,分泌出大量的酚类物质,造成培养基污染。酒立君等^[21]在培养基中添加 0.1 mmol/L 的水杨酸对褐化抑制明显,季元祖等^[22]采用添加 200 mg/L 的 PVP 并重复转接培养基 3 次后,褐化污染明显减少。本试验参考 M. M. Belarmino 等^[23]的防褐化方法在培养基中加入土豆泥 400 g/L,活性炭 500 mg/L,污染率有所降低。本研究最终确立了‘大辣椒’组培快繁过程中不同时期的最适培养条件,从而优化了蝴蝶兰的组培快繁技术体系,为蝴蝶兰优良品种的工厂化生产和推广提供技术支持。

参考文献:

- [1] 崔波,王洁琼,宋彩霞,等. 蝴蝶兰 SOC1 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种,2016,14(3):548-553.
- [2] 朱根发. 蝴蝶兰种质资源及杂交育种进展[J]. 广东农业科学,2015,42(5):31-38.
- [3] 张伟,乔保建,李冰冰,等. 蝴蝶兰高效组培快繁及温室移栽技术[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):83-86.
- [4] A. KHODDAMZADEH, U. SINNIH, M. KADIR, et al. In vitro induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from Leaf Segments of *Phalaenopsis bellina* Christenson[J]. Plant Growth Regul,2011,65(2):381-387.
- [5] CHEN, Y H, TSAI, et al. Transcription analysis of peloric mutants of *Phalaenopsis orchids* derived from tissue culture[J]. Cell Research,2008,15(8):639-657.
- [6] 曾碧玉,许传俊,张文惠,等. 蝴蝶兰花梗初代培养研究[J]. 福建农业学报,2013,28(2):124-128.
ZENG B Y, XU C J, ZHANG W H, et al. Culturing Flower-stalks of *Phalaenopsis*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences,2013,28(2):124-128.
- [7] 王玲,陈发棣,陈凤,等. 蝴蝶兰花梗芽的初代诱导[J]. 江苏农业科学,2012,40(12):68-71.
- [8] 孟路,刘勇,贺国鑫,等. 楸树优良品种‘朝霞’增殖及生根培养的研究[J]. 西北林学院学报,2019,34(1):119-123,156.
MENG L, LIU Y, HE G X, et al. Multiplication and rooting culture of catalpa bungei ‘Zhaoxia’[J]. Journal of Northwest Forestry University,2019,34(1):119-123,156. (in Chinese)
- [9] 崔波. 农杆菌介导的蝴蝶兰、萼脊兰 ACC 氧化酶反义基因遗传转化研究[D]. 郑州:河南农业大学,2010.
- [10] 曾德华,郁培义,陈伟玉,等. ‘满天红’蝴蝶兰花梗组培快繁技术研究[J]. 热带林业,2014,42(1):46-49.
- [11] 曾武清,陈柳婵,曾瑞珍,等. 丽影和红韵蝴蝶兰快速繁殖试验[J]. 广东农业科学,2017,44(8):55-60.
- [12] 吕世佳,张虹,虎娟,等. 康乃馨‘白雪公主’叶片培养植株再生[J]. 西北林学院学报,2014,29(6):114-118.
LYU S J, ZHANG H, HU J, et al. Establishment of a regeneration system for dianthus caryophyllus cultivar white diana from leaf explant[J]. Journal of Northwest Forestry University,2014,29(6):114-118. (in Chinese)

- [3] 江泽慧,费本华,王喜明,等. 桉树木材干燥特性与工艺及其皱缩研究现状[J]. 木材工业,2002,16(4):3-6.
- [4] 刘媛,卢翠香,黄腾华,等. 桉树无性系大径材干燥特性分析[J]. 南方农业学报,2017,48(5):896-900.
LIU Y, LU C X, HUANG T H, *et al.* Drying characteristics of *Eucalyptus* clones with large-diameter[J]. Journal of Southern Agriculture 2017, 48(5): 896-900. (in Chinese)
- [5] 殷亚方,任海青,骆秀琴,等. GB/T 1927-2009 木材物理力学试材采集方法[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [6] 蔡家斌,孙照斌,陆瑞新. 相思树木材干燥特性及干燥工艺初探[J]. 木材工业,2002,16(6):25-30.
- [7] 何清慧. 木材干燥基准简易确定法——百度试验法[J]. 木材工业,1998(6):39-41.
- [8] 刘媛,卢翠香,苏勇,等. 大花序桉木材干燥特性研究[J]. 桉树科技,2016,33(2):39-43.
- [9] 任世奇,罗建中,谢耀坚,等. 不同桉树无性系及树干高度木材的干缩特性研究[J]. 西北林学院学报,2012,27(1):232-237.
REN S Q, LUO J Z, XIE Y J, *et al.* Dry shrinkage properties of different *Eucalypt* clones and stem heights[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(1): 232-237. (in Chinese)
- [10] 李大纲,顾炼百. 木材高温干燥过程中的弹性应变[J]. 木材工业,2000(2):15-17.
- [11] 王喜明. 木材干燥学[M]. 北京:中国林业出版社,2007.
- [12] 刘树东,王喜明,李雪琦. 俄罗斯樟子松木材干燥特性的研究[J]. 内蒙古农业大学学报:自然科学版,2010,31(1):200-204.
LIU S D, WANG X M, LI X Q. Research on drying characteristics of *Pinus sylvestris*[J]. Journal of Inner Mongolia Agri-
- cultural University: Natural Sciences Edition, 2010, 31(1): 200-204. (in Chinese)
- [13] 韦鹏练,廖克波,符韵林,等. 山白兰木材干燥特性研究[J]. 西北林学院学报,2012,27(1):229-231.
WEI P L, LIAO K B, FU Y L, *et al.* A study of drying characteristics of *Paramichelia baillonii*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(1): 229-231. (in Chinese)
- [14] 苗平. 马尾松木材高温干燥的水分迁移和热量传递[D]. 南京:南京林业大学,2000.
- [15] 杜国兴. 木材的干缩特性及其干裂势的研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,1993,17(1):55-60.
- [16] 武国峰,陈鹤予,杨春宵,等. 化学浸渍处理对木材干燥特性的影响[C]. 浙江:全国木材干燥学术研讨会,2011.
- [17] 杜洪双,唐朝发,李杉,等. 百度试验确定干燥基准在铁木上的应用[J]. 木材加工机械,2003,14(4):19-23.
DU H S, TANG C F, LI S, *et al.* Defining the drying schedule being used in hop-hornbeam with 100°C test method[J]. Wood Processing Machinery, 2003, 14(4): 19-23. (in Chinese)
- [18] 顾炼百. 木材干燥理论在木材加工技术中的应用分析[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2008,32(5):27-31.
GU L B. Application of wood drying theory in lumber processing[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2008, 32(5): 27-31. (in Chinese)
- [19] 贾潇然,刘珊杉,周雅菲,等. 循环风速对桦木干燥速度影响的研究[J]. 森林工程,2019,35(6):42-47.
JIA X R, LIU S S, ZHOU Y F, *et al.* Study on the effect of circulation velocity on drying rate of birch[J]. Forest Engineering, 2019, 35(6): 42-47. (in Chinese)

(上接第100页)

- [13] 黄磊,陈之林,吴坤林,等. 切割方式和外植体大小对蝴蝶兰叶片诱导类原球茎的影响[J]. 热带亚热带植物学报,2009,17(3):261-266.
HUANG L, CHEN Z L, WU K L, *et al.* Effects of cutting and explant size on PLB induction from *Phalaenopsis amalis* leaves[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2009, 17(3): 261-266. (in Chinese)
- [14] WANG G D, LIU S, LI J L, *et al.* Efficient protoplast isolation and transient gene expression system for *Phalaenopsis hybrid cultivar* "Ruili Beauty" [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant; Journal of the Tissue Culture Association, 2018, 54(1): 87-93.
- [15] 尚宏芹. 蝴蝶兰离体再生条件的优化[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(7): 1547-1549.
- [16] PARK S Y. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis hybrid* using thin-section culture [J]. Plant Cell Reports, 2002, 21(1): 46-51.
- [17] CHEN Y C, CHANG W C. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant; Journal of the Tissue Culture Association, 2000, 36(5): 420-423.
- [18] 付镇芳,何博,马杰,等. 蝴蝶兰“大辣椒”花梗组织快繁技术研究[J]. 林业科技通讯,2017(5):66-69.
- [19] 武爱龙,吴建阳,卓海容,等. 蝴蝶兰“大辣椒”组织培养与快速繁殖[J]. 福建农业学报,2015,30(11):1075-1081.
WU A L, WU J Y, ZHUO H R, *et al.* Tissue culture and rapid propagation of big chili *Phalaenopsis* [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, 30(11): 1075-1081. (in Chinese)
- [20] 周利利. 蝴蝶兰组培快繁体系的建立[D]. 杭州:浙江农林大学,2017.
- [21] 酒立君,易盼盼,王飞,等. 不同浓度水杨酸处理对蝴蝶兰组培褐变的影响[J]. 西北林学院学报,2015,30(3):127-131.
JIU L J, YI P P, WANG F, *et al.* Effects of salicylic acid treatment with different concentrations on tissue browning of *Phalaenopsis* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(3): 127-131. (in Chinese)
- [22] 季元祖,雷颖,李晓玲,等. 唐古特瑞香愈伤组织培养与再生体系建立[J]. 西北林学院学报,2018,33(6):94-99.
JI Y Z, LEI Y, LI X L, *et al.* Establishment of the tissue culture and regeneration system of *daphne tangutica* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2018, 33(6): 94-99. (in Chinese)
- [23] BELARMINO M M, MII M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *phalaenopsis orchid* [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(5): 435-442.