

# 蝴蝶兰组培苗快繁高效安全技术

束冰<sup>1</sup>, 张金云<sup>1\*</sup>, 谢光坤<sup>2</sup>, 杨大庆<sup>3</sup> (1. 安徽省农业科学院园艺研究所, 安徽合肥 230031; 2. 安徽省兰君园艺有限公司, 安徽合肥 230031; 3. 安徽省桐城市农业行政执法大队, 安徽桐城 231400)

**摘要** [目的]建立蝴蝶兰组培苗的快繁工厂化生产体系。[方法]以蝴蝶兰的花梗为外植体进行组织培养,并进行继代培养、壮苗培养、生根培养、炼苗、出瓶培养,最后分别包装、标识、运输。[结果]试验获得了无菌的蝴蝶兰芽苗,经8代继代培养后,进行壮苗培养和生根培养,而后进行炼苗与出瓶培养,最后按照大、中、小3个规格的苗龄分级出圃,对出圃的组培苗按级分别包装、标识、运输,形成了一套完整的详细的蝴蝶兰组培苗快繁工厂化生产体系。[结论]该方法建立了蝴蝶兰组培苗的快繁工厂化生产体系,为蝴蝶兰的进一步开发利用提供了依据。

**关键词** 蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*);组培;快繁;外植体

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)19-06170-02

## Rapid Propagation and High Efficient Safety Technology of *Phalaenopsis amabilis* Tissue Culture Plantlet

SHU Bing, ZHANG Jin-yun et al (Horticulture Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

**Abstract** [Objective] To establish rapid propagation production system of *Phalaenopsis amabilis* tissue culture plantlet. [Method] With stalk of *P. amabilis* explant, tissue culture, subculture, strong seedling culture, rooting culture, exercising seedling, flask culture, packaging, identifying and transportation were conducted. [Result] Sterile butterfly orchid bud seedling was obtained, after 8 generation propagation, strong seedling culture, rooting culture, exercising seedling, flask culture were conducted. At last, outplanting was carried out according to three grade of large, medium and small. The tissue culture seedlings were packaged, identified and transported, a complete rapid propagation production system for *P. amabilis* was formed. [Conclusion] The rapid propagation production system of *P. amabilis* tissue culture plantlet was established, which will provide basis for further development and utilization of *P. amabilis*.

**Key words** *Phalaenopsis amabilis*; Tissue culture; Rapid propagation; Explant

蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)为兰科蝴蝶兰属,原产于泰国、缅甸、菲律宾、马来西亚、印度尼西亚,及中国台湾亚热带雨林地区,为附生性兰花。其株型美观、色彩艳丽、花期持久,蝴蝶兰植株从叶腋中抽出长的花梗,并且开出形如蝴蝶飞舞般的花朵,深受爱花者的青睐,素有“洋兰王后”之称,是兰科植物中栽培最广泛、最普及的种类之一。但由于蝴蝶兰是单茎性气生兰,很难进行分株繁殖,常规情况下种子发育不完全,极难萌发,因此世界上多采用组织培养来繁殖种苗。台湾及东南亚一些国家利用组织培养技术对蝴蝶兰进行了工厂化生产,并出口欧美获得了较大的经济效益<sup>[1]</sup>。近年来随着我国经济快速发展,生产和科学技术的进步、精神文明程度的提高、生活质量不断改善,人们对花卉消费需求逐年增加,而多样化、高档次、优质化的花卉品种则给消费者提供了较大选择余地,满足了不同消费者的需要。笔者以蝴蝶兰的花梗作外植体进行蝴蝶兰的组培快繁,以期为我国蝴蝶兰的组培苗快繁生产者提供参考。

## 1 材料选择

**1.1 外植体选择** 蝴蝶兰组培快繁中以花梗做外植体,在与胚培养相同的基本培养基上进行离体培养,花梗在MS培养基上的效果最好<sup>[2]</sup>。所选花梗需健壮生长旺盛开花或开花后带腋芽,通常带3~6朵花;花梗花朵无畸形、无病虫害、无严重机械损伤、严重脱水等现象;花型花色完全符合本品种特性,花色均一、花朵排序整齐。花梗在采切前需适当控水控肥和增强光照。采集时用利刀从基部切下,将花梗切成

3~5 cm长的小段,每段外植体要带1~2个腋芽<sup>[3]</sup>。

**1.2 外植体建档** 对采集好用于作外植体的花梗首先进行生产编号、病毒检测等,建立健全接种外植体的档案,如品种正式登录名(别名)、父母本登录名、品种来源、照片资料,育种者全名、植株规格、植株生长状况、株型、花色(排序、花朵大小、朵间距、花型描述、花色描述、花梗高度、花梗数量、叶幅大小、养护难易及注意要点、催花难易及注意要点)、组培各阶段表现(诱导、增殖1-N代表表现、壮苗生根、定植)。

**1.3 外植体消毒** 将采集的花梗保湿迅速带回实验室,切成1~2 cm长的单芽茎段,用肥皂水洗2遍。在超净工作台上将洗好的单芽茎段放在消毒的广口瓶内,加入2倍花梗体积的5%双氧水进行表面消毒,消毒时间为20 min左右,然后用无菌水冲洗2~3遍后,用无菌滤纸吸干材料表面水分,然后用枪形镊剥除苞叶。剥掉苞叶的花梗再放入一个无菌广口瓶中,加入花梗2倍体积的0.1%升汞进行消毒,消毒过程中不断摇晃瓶子,使消毒液充分接触花梗,消毒时间为10 min左右。然后再用无菌水冲洗3~4次,以彻底冲洗掉外植体上残留的消毒液。最后将消毒完的花梗放在无菌滤纸上吸干多余的水分,备用。

## 2 培养基

**2.1 初代培养基配制** MS + 3~5 mg/L 6-BA + 0.3~0.5 mg/L NAA + 20 g/L 蔗糖 + 7~8 g/L 琼脂, pH为5.2~5.8。

**2.2 继代培养基** MS + 3~5 mg/L 6-BA + 0.3~0.5 mg/L NAA + 20 g/L 蔗糖 + 7~8 g/L 琼脂, pH为5.2~5.8。6-BA少数品种需继续加大浓度。

**2.3 壮苗培养基** MS + 20 g/L 蔗糖 + 7~8 g/L 琼脂 + 1 g/L 活性炭, pH为5.2~5.8。

**2.4 生根培养基** MS + 0.2 mg/L IBA + 0.1~0.2 mg/L NAA

**基金项目** 安徽省盆栽花卉工程技术研究中心(201206G01005)。

**作者简介** 束冰(1982-),男,安徽六安人,实习研究员,硕士,从事园艺作物育种及栽培研究。\*通讯作者,副研究员,从事园艺作物育种及栽培研究。

**收稿日期** 2014-06-05

+15 g/L 蔗糖 + 7~8 g/L 琼脂 + 1 g/L 活性炭, pH 为 5.2~5.8。

### 3 培养基灭菌

将配好的培养基趁热分装于 100 ml 组培瓶中, 每瓶约 30 ml。待培养基冷却凝固后, 盖上组培盖, 或盖上封口膜并用棉线扎牢, 然后在高压灭菌锅中 121 °C 下灭菌 20 min。取出组培瓶放在桌子上, 冷却后备用。接种操作所需的一切用具如镊子、解剖刀、剪刀及灭菌水等需同时灭菌。

### 4 外植体的接种与转代

**4.1 外植体的接种** 在超净工作台上, 用手术刀在芽上端 0.5 cm 处平切, 芽下端 1.0 cm 处斜切以使芽体与培养基充分接触, 然后接入初代培养的培养基中, 接种时需注意芽的方向。初代培养时每瓶不宜接种太多, 以防污染造成巨大损失, 通常每瓶宜接种 2~3 个外植体。接种后, 在瓶子的下角用记号笔标记接种材料、培养基、操作人员的编号以及接种时间等信息。

**4.2 初代培养条件** 培养温度为  $(22 \pm 2)$  °C。所使用的温度计都必须经过校正, 每个温度计上都要标明校正值及温度范围。培养前期 7~10 d 需暗培养, 待有芽萌发后转入光下培养, 光照强度为 1 000 lx, 光照时间 8~10 h/d。

### 4.3 转代

**4.3.1 继代培养。**以初代培养的无菌芽苗上的幼叶或茎尖、腋芽长到 2.0~3.0 cm, 营养芽的 2 个叶片开始展开时, 即可进行增殖培养。增殖培养接种的密度不宜过大或过小, 密度过大, 芽苗扩增的空间和营养受限, 继代时间短, 密度过小, 使生产成本增加。对于 500 ml 的培养瓶, 一般每瓶以接种 30 个左右的芽为宜。每次接种完后需在瓶子下方标记好接种材料编号、继代次数、操作人员编号以及接种日期等信息。增殖培养一般进行 8 代继代培养。

**4.3.1.1 继代培养条件。**培养温度为  $(25 \pm 2)$  °C, 光照强度 1 500 lx, 光照时间 10~12 h/d。

**4.3.1.2 壮苗培养。**切去芽丛基部褐化组织以及老叶和黄化叶, 剔除变异苗包括玻璃花苗、莲座体、双叶脉、叶片畸形等, 将 1.0 cm 以上的芽苗分成单株进行壮苗培养。

**4.3.1.3 壮苗培养条件。**培养温度为  $(25 \pm 2)$  °C, 光照强度 1 500 lx, 光照时间 12~14 h/d。

### 4.3.2 生根。

**4.3.2.1 生根培养。**进一步剔除变异苗包括玻璃花苗、莲座体、双叶脉、叶片畸形等以及细弱苗。筛选生长健壮、长势一致的无根苗进行生根培养。用于生根培养的芽苗一般茎段长度为 1.5 cm 左右, 叶长 2.5 cm 左右。具体方法为: 去除褐化组织及老化、黄化的叶片, 以及褐化组织, 叶基部如有与茎段脱离的苞叶, 则将该苞叶去除干净。操作过程中严禁伤到需保留的叶片。

**4.3.2.2 生根培养条件。**培养温度为  $(25 \pm 2)$  °C, 光照强度 1 500 lx, 光照时间 8 h/d。

### 5 组培苗分级

根据叶片颜色深绿、浅绿、叶片张开幅度等, 结合苗高, 生产中可将蝴蝶兰组培种苗分为小苗、中苗、大苗和等外级

即不合格苗, 通常小苗苗高 2.5~3.0 cm, 中苗苗高 3~4 cm, 大苗苗高 4 cm 以上, 2.5 cm 以下的为等外级苗。

### 6 炼苗与出瓶

**6.1 炼苗** 当组培种苗苗高 2.5~4.0 cm, 具有 3~4 片叶和 2~3 条根时, 便可移栽。为了保证其成活率, 常在瓶苗出瓶以前, 先在炼苗大棚内把培养瓶盖全部打开或半打开, 打开时间为培养基不发霉为止。一般为 7 d 左右。

**6.2 出瓶** 经炼苗后, 用镊子将组培苗从培养基中取出, 放在托盘中, 洗掉基部培养基和枯叶, 在大棚内或温室中栽植于经过消毒处理的水苔中。环境的昼夜温度分别是 25~29 °C 和 22~24 °C。相对湿度保持在 80%~90%; 移栽初期 20 d 内光照强度控制在 2 000~3 000 lx, 45 d 后光照强度控制在 6 000~8 000 lx, 90 d 后光照强度控制在 10 000~20 000 lx, 小苗出瓶 5 d 后可开始喷施叶面肥, 可喷施兰花专用叶面肥, 每 5 d 喷施 1 次, 20 d 后施第 1 次肥料, 施用肥料 N:P:K=20:20:20, 浓度为 3 000~4 000 倍灌根, 施肥次数为每隔 10~15 d 一次。

### 7 出圃

**7.1 小苗出圃** 组培苗出瓶后, 栽种在直径 4 cm 的塑料透明营养袋中, 经过 4~5 个月, 小苗长至两叶距 10~15 cm, 叶宽 4~5 cm, 叶数 4~5 片, 叶子肥厚, 叶片坚挺, 叶色浓绿, 叶片间已开始互相遮挡; 根系较密集, 有些盘旋于盆底, 有部分已长出盆外, 此时为小苗俗称 1.5 寸苗可出圃。

**7.2 中苗出圃** 小苗经换盆, 栽种在直径 6.5 cm 的塑料透明营养袋中, 约 6~7 个月, 长至两叶距 16~22 cm, 叶宽 4~6 cm, 叶片数 4~6 片, 叶片肥厚, 挺立, 叶色浓绿, 叶片开始互相遮挡。盆中根系已达盆底, 有部分根已长出盆外, 此时为中苗俗称 2.5 寸苗可出圃。

**7.3 大苗出圃** 中苗经换盆, 栽种在直径 9 cm 的塑料透明营养袋中, 经过 4~5 个月, 两叶距 28~35 cm, 叶宽 8~10 cm, 叶数 4~6 片, 叶色浓绿, 叶片肥厚挺立, 单轴茎较饱满。盆中根系已基本饱满, 根系粗壮有活力, 此时为大苗俗称 3.5 寸苗可出圃。

### 8 包装、标识、运输

#### 8.1 包装

**8.1.1 小苗包装。**用 92.5 cm × 31.5 cm × 12 cm 开孔纸盒作内包装, 用 95 cm × 32.5 cm × 65 cm 开孔纸箱作外包装, 每盒 150 株。每箱 5 盒共 750 株。包装方法可将小苗竖直摆放并让叶片按对角线排列于纸盒中, 一盆挨一盆摆放, 最后在上面盖上一层软纸后封箱。

**8.1.2 中苗包装。**用 92.5 cm × 31.5 cm × 12 cm 开孔纸盒作内包装, 用 95 cm × 32.5 cm × 65 cm 开孔纸箱作外包装, 每盒 56 株, 每箱 5 盒共 280 株。分 2 层 4 排, 叶片上下排列, 花盆底部贴近长边, 并用透明胶纸固定。

**8.1.3 大苗的包装。**大苗用 72 cm × 49 cm × 39 cm 纸箱按每箱 72 株包装, 包装时将苗平放, 叶片按上下或左右同方向排列, 分 2 排 4 层重叠, 花盆底部贴近长边, 并用透明胶纸固定。

壮,可见唐菖蒲试管苗增殖培养基中,以 50 g/L 白糖作碳源是可行的。

表 1 生长素对试管苗的影响

培养基组成	切段数	发芽	40 天后增殖	差异性	苗高(CM)
	个	数//个	倍数//倍	(0.5%)	长势
MS//mg/L	30	45	1.5A	5.3	最弱
MS + 1.0//mg/L KT	30	60	2.0B	5.9	较弱
MS + 0.5//mg/L	30	72	2.4B	6.4	弱
6-BA					
MS + NAA 0.5 +	30	162	5.4C	9.6	强
6-BA 1.0 mg/L					
MS + NAA 0.5 +	30	153	5.1C	8.3	较强
6-BA 0.5 mg/L					
MS + NAA 0.5 +	30	123	4.1D	7.9	中
KT 1.0 mg/L					
MS + NAA 0.1 +	30	135	4.5C	8.1	中
KT 0.5 mg/L					

注:试管苗长势标准:长势好的植株直径大于 2 mm,正常绿色;长势中为植株直径在 2.0 ~ 2.5 mm,浅绿色;长势差的植株直径 1 ~ 2 mm,颜色发黄。

表 2 不同碳源对试管苗增殖的影响

糖种类 g/L	切段数	发芽数	苗高	40 d 后增殖	0.5%
	个	个	cm	倍数//倍	差异性
蔗糖 40	25	127	7.5	5.1	A
白糖 40	25	90	5.6	3.6	B
白糖 50	25	130	7.4	5.2	A
白糖 60	25	99	6.5	4.0	B

表 4 活性炭对芽的影响

0.2% 活性炭	接种数	芽数	株高	增殖率	差异显著性
	个	个	cm	倍数	(0.1%)
有	20	30	11.0	1.5	A
无	20	100	9.7	5.0	B

注:培养基为 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA。

在培养基中加入 0.2% 活性炭和未加入活性炭相比较得知,当加入活性炭或芽增殖倍数明显降低(表 4)在 20 d 时才有芽的少量分化,经 40 d 的培养,芽增殖倍数仅为 1.5,株高

(上接第 6171 页)

**8.1.4 瓶苗包装。**包装纸箱规格 95.5 cm × 42 cm × 39 cm。瓶苗用三角玻璃瓶培养,一般每瓶 22 株,每箱 76 瓶。瓶间用折叠纸板方格隔开,上下层用纸板隔开,防止运输碰烂。

**8.2 标识** 每一包装上应标明产品名称、标准编号、商标、生产单位(或企业)名称、产地、规格、净含量、包装日期和认证号。纸箱上面印有“严禁重压,切勿倒置”字样,侧面应标有明显的方向箭头。

**8.3 运输** 发货装箱前注意控制水分适度。发货装箱前注意控制水分适度。种苗数量大时,可用专车运送,量较少时空空运,也可采用火车和汽车运输。种苗抵达目的地后,应立即打开包装,将种苗分开平置于阴凉通风处,喷水,使其恢

在接种后 30 d 内增加迅速,株高为 11 cm,比未加活性炭的高出 1.3 cm,主要表现在节间的增长上,并且长势弱,苗细长,叶色发黄,在 30 d 后株高增加相对于前期下降,随着时间的推移。加活性炭和不加活性炭的植株株高趋于相等。

从试验结果看活性炭对唐菖蒲试管苗芽的分化有抑制作用,是因为活性炭对生长调节剂起来吸附作用,大量文献表明活性炭可以抵消生长调节剂的作用,故苗长势弱,分化强度非常小。在培养前唐菖蒲试管苗株高增加迅速,主要是活性炭吸附了琼脂中的杂质及蔗糖在高温灭菌过程中降解产生的 5-羟甲基糠醛等的杂质,从而造成苗的徒长,后期由于上述作用减弱,徒长消除,所以株高与未加入活性炭的培养基上的株高趋于相等。试验说明 0.2% 的活性炭对芽增殖无作用。

### 3 结论

唐菖蒲试管苗分化不仅时间长,而且量大,这是快繁的优势所在,但在继代培养过程中弱势化苗的出现也不容忽视。

从市场效益分析,市售白糖可以替换化学蔗糖作培养基的碳源,替换的最佳组合为 50 g 白糖替换 40 g 蔗糖,这样的话试管苗培育的成本降低 90% 以上,对唐菖蒲的快繁作用很大。

试验中,对活性炭的作用只作初步的研究,其浓度为 0.2% 是从大量资料查得,至于浓度是否得当有待于以后的试验研究。

### 参考文献

- [1] 刘慧民,胡水. 花卉类植物组织培养技术发展概述[J]. 北方园艺,2000(1):62.
- [2] 师素恩. 唐菖蒲体细胞胚发生和植株再生[J]. 北方园艺,1997(3):61-62.
- [3] 刘文萍. 脱毒唐菖蒲的微繁技术[J]. 中国林副特产,1997(4):32.
- [4] 赵秀梅,王红梅. 唐菖蒲利用花瓣组织快繁试验初报[J]. 甘肃农业科技,1999(6):44-45.
- [5] 曾小龙. 不同培养基对虎头兰原球茎器官分化的影响[J]. 广东农业科学,1998(5):21-22.
- [6] 黄家平,戴思兰. 兰花组织培养研究综述[J]. 广东园林,1997(2):28-31.

复,并尽快安排种植。

### 9 结论

试验以蝴蝶兰的花梗为外植体进行组织培养,获得无菌的蝴蝶兰芽苗,并以无菌芽苗上的幼叶或茎尖、腋芽进行继代培养;经 8 代增殖培养后,再进行壮苗培养和生根培养,而后进行炼苗与出瓶培养,最后按照大、中、小 3 个规格的苗龄分级出圃,对出圃的组培苗按级分别包装、标识、运输,形成了一套完整的详细的蝴蝶兰苗快繁工厂化生产体系。

### 参考文献

- [1] 卢思聪. 中国兰与洋兰[M]. 北京:金盾出版社,1994:96-104.
- [2] 曾宋君,彭晓明,张京丽,等. 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖[J]. 武汉植物学研究,2000,18(4):344-346.
- [3] 任惠,陈冠南,王宏. 蝴蝶兰的组织培养[J]. 热带农业工程,2012,36(6):8-11.