

罗氏蝴蝶兰的无菌播种与快速繁殖

黄歆怡¹, 谢振兴¹, 陆祖正¹, 於艳萍¹, 罗清¹, 毛立彦¹, 蒋宏^{2*}

¹广西壮族自治区亚热带作物研究所, 南宁530001

²云南省林业和草原科学院/国家林业和草原局云南珍稀濒危森林植物保护和繁育重点实验室, 昆明650204

摘要: 罗氏蝴蝶兰(*Phalaenopsis lobbii*)是珍稀濒危植物, 被列为国家极小种群野生植物。组培快繁技术是保护植物的有效方法。本文以授粉后发育成熟的罗氏蝴蝶兰种子为材料进行无菌播种研究, 探究罗氏蝴蝶兰快繁体系的最适条件。实验结果表明: 罗氏蝴蝶兰种子萌发不需要黑暗处理, 最适合种子萌发的培养基为1/4MS+0.1%活性炭+70 g·L⁻¹香蕉汁, 种子萌发率为77.20%; 低浓度6-BA和较高浓度NAA对丛生芽诱导有利, 最适诱导培养基为1/3MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ NAA+0.1%活性炭+70 g·L⁻¹香蕉汁; 适合生根壮苗的培养基为1/3MS+70 g·L⁻¹香蕉汁或1/3MS+70 g·L⁻¹马铃薯汁。通过无菌播种研究, 成功获得了一批罗氏蝴蝶兰幼苗。

关键词: 罗氏蝴蝶兰; 种子; 无菌播种; 快速繁殖; 极小种群

罗氏蝴蝶兰(*Phalaenopsis lobbii*)为兰科(Orchidaceae)蝴蝶兰属植物。气生根长而扁平, 附生于海拔150~900 m疏林中的树干或树枝上。茎短, 叶片1~5片, 总状花序, 萼片和花瓣乳白色, 合蕊柱白色, 唇瓣黄色, 3裂, 极具欣赏价值, 也是蝴蝶兰杂交育种的良好亲本。罗氏蝴蝶兰国内分布于广西、云南, 国外分布于印度、不丹、缅甸、越南(Chen和Wood 2009), 数量十分稀少, 自然条件下结实率低, 野外条件自然更新困难, 随时濒临灭绝。物种的灭绝会造成不可估量的损失, 为全球最严重的生态问题之一, 威胁人类社会的可持续发展(Pimm等2014)。罗氏蝴蝶兰被列入世界自然保护联盟(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN)红色名录中, 同时被列为国家优先开展拯救保护的极小种群野生植物。据国家林业局颁布的《全国极小种群野生植物拯救保护实施方案(2010~2015)》报道该物种野生居群数量不足50株, 《广西极小种群野生植物拯救保护项目实施方案(2012)》中则记载其植株数量不足10株。开展罗氏蝴蝶兰的抢救保护研究刻不容缓。

蝴蝶兰属植物为单茎附生兰, 自然条件下难以分株繁殖, 且种子不具胚乳极难萌发(Park等2002), 组织培养是目前生产中广泛应用的繁殖方式。有关杂交蝴蝶兰的快速繁殖有较多的报道, 主要通过无菌播种(陈春满等2018; 李淑英等2015)、原球茎途径(朱娇等2017; 黄歆怡等2018)和丛生芽途径(黄丹等2017; 王丽娜等2018)等获得大量的组培苗,

实现蝴蝶兰工厂化生产; 对原生蝴蝶兰的繁殖研究较少, 报道的主要有海南蝴蝶兰(*P. hainanensis*) (潘学峰和黄凤娇1997; 欧阳英和刘燕2019)和版纳蝴蝶兰(*P. mannii*) (方中明等2008)的快速繁殖研究, 均是通过无菌播种途径来实现的快速繁殖。

目前对罗氏蝴蝶兰仅限于地理分布的研究(叶晓霞等2010; 覃海宁和刘演2010), 其快繁技术尚无报道。兰科植物可以采用无菌播种和组织培养的方式来扩大种群数量。由于罗氏蝴蝶兰种群数量稀少, 利用茎尖、叶片、花梗等外植体诱导培养会对植株产生伤害, 故进行人工无菌播种繁殖是保护资源的一个有效途径, 对野生资源的保护和开发有着重要意义。本研究以罗氏蝴蝶兰种子作为外植体进行无菌播种, 比较不同培养条件下的萌发率、植物生长调节剂对诱导丛生芽的影响、有机添加物对生根壮苗的影响等, 探讨组培快繁技术, 为建立罗氏蝴蝶兰保育研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料为云南省林业和草原科学院兰科植物种质资源圃内引种驯化的罗氏蝴蝶兰[*Phalaenopsis lobbii* (H. G. Reichenbach) H. R. Sweet]果实。罗氏

收稿 2019-12-04 修定 2020-03-06

资助 广西科技计划项目(桂科AB16380060)和广西壮族自治区亚热带作物研究所基本科研业务费专项(桂热研201802)。

* 通讯作者(orchidchina@hotmail.com)。

蝴蝶兰植株营养生长和生殖生长情况良好, 人工授粉后生长良好, 产生可育种子。

1.2 实验方法

1.2.1 果荚采集

对开花时间在7~10 d的罗氏蝴蝶兰进行人工授粉, 在果荚趋于成熟未开裂期间, 采集果龄为295 d (时间从授粉日期开始计算)的果荚(图1-A)。

1.2.2 播种方法与培养条件

果荚用自来水冲洗, 经过中性洗涤剂洗涤后, 无菌水再冲洗3~4次, 备用。

在超净工作台上, 先用75%酒精溶液浸泡果荚30 s, 再用0.1%升汞处理10~12 min, 无菌水冲洗8~10次, 取出蒴果, 置于托盘中。用解剖刀纵切(图1-B), 采用撒播法, 用镊子夹起果实, 撒播于培养基上, 盖好瓶盖。每个处理培养基接种3瓶, 重复5次, 共计15瓶。

培养室温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 光照12 h/黑暗12 h, 光照强度 $30\sim 40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 根据实验需要, 部分实验设计为全黑暗处理。

1.2.3 培养基对罗氏蝴蝶兰种子萌发的影响

将种子分别接种于改良的1/2MS、1/3MS、1/4MS和MS基本培养基中, 并分别添加0.1%活性炭和 $70\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉汁。每个处理配方接种3瓶, 重复5次。观察并统计种子萌发数目和原球茎生长情况, 筛选出适宜罗氏蝴蝶兰种子萌发的培养基。判断种子的萌发依据为胚突破种皮发育成为绿色原球茎(Zeng等2012; 付传明等2018)。

1.2.4 光照对罗氏蝴蝶兰种子萌发的影响

以1/4MS为基本培养基, 添加 $70\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的香蕉汁和0.1%活性炭, 研究光照对罗氏蝴蝶兰种子萌发的影响。分别置于正常光周期条件(光照12 h/黑暗12 h)下和黑暗条件下培养, 暗处理30 d后再转入正常光周期条件下培养。每个处理接种5瓶, 重复5次。定期观察、统计罗氏蝴蝶兰种子的萌发情况。

1.2.5 丛生芽的诱导

以1/3MS基本培养基作为丛生芽的诱导培养基, 探究不同浓度的植物生长调节剂[6-苄氨基嘌呤(6-BA)和萘乙酸(NAA)]对罗氏蝴蝶兰原球茎诱导丛生芽的影响。设计不同实验配比的6-BA浓度(0.5、1.0和 $2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)以及NAA浓度(0.2、0.5、

1.0和 $2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 各个处理配方接种罗氏蝴蝶兰原球茎30个, 重复5次, 分别对各处理组诱导出的芽苗数进行统计。

1.2.6 生根壮苗

以1/3MS基本培养基作为生根壮苗的培养基, 将分化出1~2片小叶的小苗转接于生根壮苗培养基继续培养。比较添加不同有机物马铃薯汁(35 和 $70\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和香蕉汁(35 和 $70\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)对罗氏蝴蝶兰生根壮苗的影响。设计空白对照, 每个处理组各接种小苗10株, 重复5次。观察并统计生根壮苗阶段罗氏蝴蝶兰小苗的叶片数量与长度及根数与根长。

1.2.7 瓶苗移栽

将长出2~4片小叶、3~6条根, 根长在2~5 cm的瓶苗进行炼苗移栽。在自然光照下放置3~5 d, 后松口瓶口1 d, 开瓶盖1 d, 然后移栽至水苔的培养基质中, 观察小苗移栽后的适应状况。

1.2.8 数据处理分析

采用Excel 2007对记录的实验数据进行整理, SPSS 21.0进行方差分析。

2 实验结果

2.1 不同培养基对罗氏蝴蝶兰种子萌发的影响

用镊子将罗氏蝴蝶兰种子均匀撒播在配制好的MS、1/2MS、1/3MS和1/4MS培养基中, 每5 d进行一次观察, 记录培养瓶中种子的萌发情况。60 d后在显微镜下取不同的视野, 统计100粒种子的萌发数目, 观察原球茎生长情况。结果见表1, 各培养基中罗氏蝴蝶兰的种子萌发率不同, 差异较为显著。其中MS培养基中种子萌发率最低, 原球茎较小, 颜色为淡黄色; 1/2MS与1/3MS培养基中萌发率差异不明显, 原球茎较MS培养基中的大, 颜色为黄绿色; 1/4MS培养基中的种子萌发率最高, 原球茎较大, 颜色为绿色(图1-C)。因此, 最适合罗氏蝴蝶兰种子萌发的培养基是1/4MS+0.1%活性炭+ $70\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉汁。

2.2 光照对罗氏蝴蝶兰种子萌发的影响

对比正常光周期条件(对照)与暗处理条件对罗氏蝴蝶兰种子萌发时间和萌发率的影响, 正常光周期条件下25 d培养瓶中种子微泛黄色, 60 d后萌发率为77.20%。暗处理条件下29 d培养瓶中种子

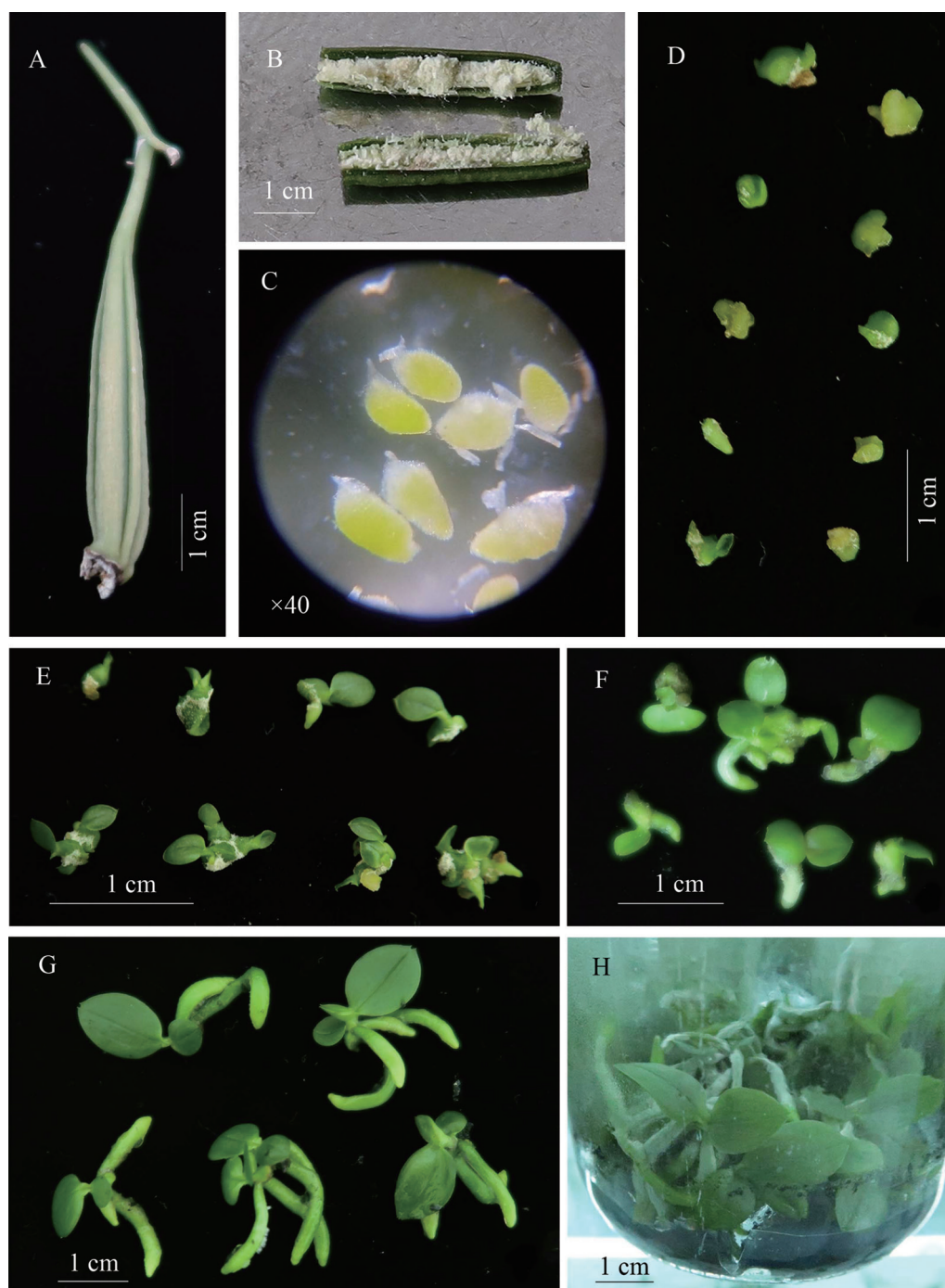


图1 罗氏蝴蝶兰的无菌播种与快速繁殖

Fig.1 Aseptic seeding and rapid propagation of *P. lobbii*

A: 295 d的果荚; B: 果荚解剖图; C: 放大40倍的60 d的原球体; D: 原球茎; E: 丛生芽; F: 叶片的生长及根的分化; G: 壮苗与生根; H: 可以出瓶的小苗。

微泛黄色, 60 d后萌发率为65.40%; 即播种后暗处理30 d与正常光周期培养条件下种子的萌发时间

差异不大, 而萌发率在正常光周期下稍高。实验结果说明罗氏蝴蝶兰种子萌发不需要进行暗处理。

表1 不同培养基对罗氏蝴蝶兰种子萌发和原球茎生长的影响

Table 1 Effect of different media on seed germination and protocorm formation of <i>P. lobbii</i>		
培养基	种子萌发率/%	原球茎生长情况
MS	47.60±0.03 ^c	较小, 淡黄色
1/2MS	68.00±0.02 ^b	中等, 黄绿色
1/3MS	67.20±0.02 ^b	中等, 黄绿色
1/4MS	77.20±0.02 ^a	较大, 绿色

表中数据为平均值±标准差; 同列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

2.3 不同浓度的植物生长调节剂对诱导罗氏蝴蝶兰丛生芽的影响

原球茎(图1-D)经过丛生芽诱导培养基的培养后, 诱导分化出丛生芽(图1-E)。60 d后对分化出的丛生芽数目进行统计(表2)可知, 罗氏蝴蝶兰丛生芽的诱导受不同浓度比例的植物生长调节剂的影响, 数量差异显著。6-BA浓度一定时, 诱导的丛生芽数量随着NAA浓度升高而增多; NAA浓度一定

时, 低浓度的6-BA诱导的丛生芽数量较多。实验结果表明, 低浓度6-BA和较高浓度NAA的浓度配比对罗氏蝴蝶兰丛生芽的诱导较为有利。比较10、11与12号培养基诱导的丛生芽数量, 差异不显著, 而10号培养基中诱导的丛生芽数量平均值稍高, 成本相对略低, 优于11、12号培养基。故诱导罗氏蝴蝶兰丛生芽的最适培养基为10号培养基, 即1/3MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ NAA+0.1%活性炭+70 g·L⁻¹香蕉汁。

2.4 不同添加物对罗氏蝴蝶兰生根壮苗的影响

诱导出的芽经过生根壮苗培养基后, 成长为小苗并分化出根(图1-F)。30 d后统计小苗的叶片数量与长度、生根数量与根长(图1-G和H), 结果见表3。分析表中数据可知, 在不同组分培养基中, 罗氏蝴蝶兰小苗的叶片数量差异不显著, 而在叶长、根数和根长上差异显著。与空白对照的培养基比较, 分别添加35 g·L⁻¹马铃薯汁和香蕉汁的培养基中, 叶长、根数差异不显著, 而根长差异显著;

表2 不同植物生长调节剂组合对罗氏蝴蝶兰丛生芽诱导的影响

Table 2 Effect of different plant growth regulator combinations on induction of multiple shoots of <i>P. lobbii</i>				
培养基编号	植物生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹		接种原球茎数	分化的芽数
	6-BA	NAA		
1	0.5	0.2	30	53.8±2.4 ^{efg}
2	1.0	0.2	30	51.8±1.5 ^{fg}
3	2.0	0.2	30	48.6±2.0 ^g
4	0.5	0.5	30	64.0±1.6 ^{cd}
5	1.0	0.5	30	59.4±2.2 ^{de}
6	2.0	0.5	30	56.8±1.7 ^{ef}
7	0.5	1.0	30	69.4±2.0 ^{bc}
8	1.0	1.0	30	67.0±2.0 ^{bc}
9	2.0	1.0	30	64.8±3.0 ^{cd}
10	0.5	2.0	30	77.4±2.7 ^a
11	1.0	2.0	30	73.4±1.4 ^{ab}
12	2.0	2.0	30	70.2±1.8 ^{bc}

表3 不同有机添加物对罗氏蝴蝶兰生根壮苗的影响

Table 3 Effect of different organic supplements on seedling growth of <i>P. lobbii</i>				
处理	叶数	叶长/cm	根数	根长/cm
空白对照	2.5±0.2 ^a	0.57±0.04 ^b	3.4±0.3 ^b	1.05±0.08 ^c
35 g·L ⁻¹ 马铃薯汁	2.5±0.2 ^a	0.60±0.03 ^b	3.5±0.2 ^b	1.38±0.09 ^b
35 g·L ⁻¹ 香蕉汁	2.6±0.2 ^a	0.63±0.04 ^b	4.0±0.3 ^{ab}	1.51±0.06 ^b
70 g·L ⁻¹ 马铃薯汁	2.6±0.2 ^a	0.66±0.04 ^{ab}	4.3±0.3 ^a	1.59±0.11 ^{ab}
70 g·L ⁻¹ 香蕉汁	2.9±0.2 ^a	0.75±0.05 ^a	4.6±0.2 ^a	1.74±0.05 ^a

分别添加70 g·L⁻¹马铃薯汁和香蕉汁的培养基, 叶片长度、根的数量及根的长度差异显著。实验结果表明罗氏蝴蝶兰在添加了马铃薯汁和香蕉汁的培养基中生长较好, 且随着添加物浓度的增大, 长势越旺。因此, 在罗氏蝴蝶兰的生根壮苗阶段添加马铃薯汁或者香蕉汁有利于小苗的生长。

2.5 罗氏蝴蝶兰移栽后的表现

水苔疏松透气, 有一定的保水能力, 是蝴蝶兰商业生产中移栽常用的培养基质。罗氏蝴蝶兰组培苗经过生根壮苗培养, 炼苗驯化后移栽至疏松的水苔基质中, 移栽1个月后, 植株健壮, 叶片呈现深绿色, 成活率达98%。

3 讨论

3.1 基本培养基

蝴蝶兰组织培养以MS基本培养基最为常用, 其中的盐成分与浓度对种子萌发和发育生长起重要作用, 全量MS培养基盐浓度高, 对蝴蝶兰种子发芽有抑制作用(余慧琳等2009), 适当减少大量元素和部分微量元素有利于原球茎的增殖(王海娟2011)。本次种子萌发实验使用较低盐浓度的培养基, 即1/4MS+0.1%活性炭+70 g·L⁻¹香蕉汁较适合罗氏蝴蝶兰种子的萌发, 种子萌发率达77.20%。不同种类的蝴蝶兰最适宜的培养基类型不同, 田甜(2015)研究表明1/2MS培养基利于蝴蝶兰种子的萌发; 陈春满等(2018)以1/3MS培养基作为基本培养基时种子的萌发率高于以1/2MS和1/4MS为基本培养基时的萌发率; 欧阳英和刘燕(2019)也发现最适合海南蝴蝶兰种子萌发的培养基为1/4MS培养基。本实验与欧阳英和刘燕(2019)的研究结论相一致, 可能是因为原生蝴蝶兰在野外适应了较为艰苦的自然环境, 种子发芽能适应的浓度范围较小。

3.2 光照条件

一些兰科植物在进行无菌播种实验时进行黑暗处理能够加速萌发, 如春兰的种子在黑暗条件下培养5个月可以大量萌发(董芳2008)。不同兰科植物所需要的萌发条件不同, 本次实验播种后暗处理与正常光周期培养条件下种子的萌发时间差异不明显, 萌发时不需要黑暗处理。在对同色兜

兰的种子萌发实验中, 也得到了相似的结论(李秀玲等2016)。

3.3 植物生长调节剂

植物生长调节剂常被用于兰科植物生长发育的各阶段, 不同植物或同一植物的不同发育阶段对其种类和浓度的需求不同(Roy等2011)。此次诱导丛生芽的实验中, 以1/3MS作为基本培养基, 最有利于诱导丛生芽的植物生长调节剂浓度组合为低浓度的6-BA (0.5 mg·L⁻¹)与高浓度的NAA (2.0 mg·L⁻¹)。本次实验结果与方中明等(2008)的研究结论相似, 即低浓度6-BA和高浓度NAA的实验组合利于原球茎的分化。而曾宋君等(2000)在对蝴蝶兰的快繁研究中发现添加低浓度的6-BA时原球茎繁殖速度较快, NAA的作用不明显; 余慧琳等(2009)则认为6-BA与NAA的浓度差加大更有利于蝴蝶兰原球茎的增殖。虽然都为蝴蝶兰属植物, 但可能各个物种的内源激素不同, 对植物生长调节剂需求不一样。

3.4 有机添加物

生根壮苗是蝴蝶兰的组织培养中关键时期之一, 马铃薯、香蕉等有机添加物能促进细胞的增殖和生长, 利于蝴蝶兰的生根及壮苗(郝永丽等2017; 杜云安2014; 丘亮伟等2009; 王冬云等2007)。本次实验结果与前人的研究结论相似, 添加了有机物后植株的根茎叶生长更好, 且随浓度的增大, 植株更为健壮。

参考文献(References)

- Chen CM, Zhang SX, Fan JQ, et al (2018). Effects of different culture medium on the growth of hybrid seeds of *Phalaenopsis amabilis* by aseptic seeding. *Guangdong Agric Sci*, 45 (5): 36–41 (in Chinese with English abstract) [陈春满, 张善信, 范俊强等(2018). 不同培养基对蝴蝶兰杂交种子无菌播种生长的影响. *广东农业科学*, 45 (5): 36–41]
- Chen XQ, Wood JJ (2009). *Orchidaceae*. In: Chen XQ, Liu ZJ, Zhu GH, et al (eds). *Flora of China*. Vol. 25. Beijing: Science Press, 481
- Dong F (2008). Screen several orchid mycorrhizal fungi and preliminary test on the seed germination condition (dissertation). Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese with English abstract) [董芳(2008). 几种兰科植物菌根真菌的筛选及种子萌发条件的研究(学位论文).

- 北京: 北京林业大学]
- Du YA (2014). Effects of several addendum on the growth of *Phalaenopsis* at seedling stage. *Bull Agric Sci Technol*, (5): 120–123 (in Chinese) [杜云安(2014). 几种附属添加物对蝴蝶兰分生苗壮苗期生长的影响. 农业科技通讯, (5): 120–123]
- Fang ZM, Wu KL, Chen ZL, et al (2008). Tissue culture and propagation of *Phalaenopsis mannii* Rchb. F. *Plant Physiol Commun*, 44 (3): 519–520 (in Chinese) [方中明, 吴坤林, 陈之林等(2008). 版纳蝴蝶兰的组织培养与快速研究. 植物生理学通讯, 44 (3): 519–520]
- Fu CM, Xian KH, Su J, et al (2018). Species source characteristics and influence factors of aseptic sowing germination of Guangxi *Anoectochilus roxburghii*. *Mol Plant Breed*, 16 (12): 4016–4022 (in Chinese with English abstract) [付传明, 洗康华, 苏江等(2018). 广西金线莲种源特性及无菌播种萌发的影响因素. 分子植物育种, 16 (12): 4016–4022]
- Hao YL, Gao B, Hu HB (2017). Research on rapid propagation of *Phalaenopsis amabilis*. *J Northern Agric*, 45 (3): 94–96 (in Chinese with English abstract) [郝永丽, 高博, 胡海波(2017). 蝴蝶兰快速繁殖技术研究. 北方农业学报, 45 (3): 94–96]
- Huang D, Chen HM, Lü FB (2017). Advances in clusterd buds tissue culture of *Phalaenopsis*. *Guangdong Agric Sci*, 44 (10): 19–24 (in Chinese with English abstract) [黄丹, 陈和明, 吕复兵(2017). 蝴蝶兰丛生芽组织培养研究进展. 广东农业科学, 44 (10): 19–24]
- Huang XY, Qin Q, Xie ZX, et al (2018). Research status of *Phalaenopsis* plants. *Agric Res Appl*, 31 (1): 42–47 (in Chinese with English abstract) [黄歆怡, 覃茜, 谢振兴等(2018). 蝴蝶兰属植物及其现状研究. 农业研究与应用, 31 (1): 42–47]
- Li SY, Dong FJ, Zhang Y, et al (2015). Preliminary on cross breeding of *Phalaenopsis*. *Heilongjiang Agric Sci*, (4): 1–5 (in Chinese with English abstract) [李淑英, 董凤军, 张颖等(2015). 蝴蝶兰杂交育种初探. 黑龙江农业科学, (4): 1–5]
- Li XL, Huang CY, Song Q, et al (2016). *In vitro* asymbiotic germination and propagation of *Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitz. *Plant Sci J*, 34 (1): 127–134 (in Chinese with English abstract) [李秀玲, 黄昌艳, 宋倩等(2016). 同色兜兰的非共生萌发与快速繁殖研究. 植物科学学报, 34 (1): 127–134]
- Ou YY, Liu Y (2019). Aseptic geimination of *Phalaenopsis hainanensis* seeds. *Seed*, 38 (8): 97–99 (in Chinese with English abstract) [欧阳英, 刘燕(2019). 海南蝴蝶兰种子无菌萌发研究. 种子, 38 (8): 97–99]
- Pan XF, Huang FJ (1997). A study on the tissue culutre of *Phalaenopsis hainanensis*. *J Hainan Univ (Nat Sci Edn)*, 15 (3): 206–211 (in Chinese with English abstract) [潘学峰, 黄凤娇(1997). 海南蝴蝶兰的组织培养研究. 海南大学学报(自然科学版), 15 (3): 206–211]
- Park SY, Murthy HN, Pack KY (2002). Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 38: 168–172
- Pimm SL, Jenkins CN, Abell R (2014). The biodiversity of species and their rates of extinction, the population structure and distribution pattern of distribution, and protection. *Science*, 344 (6187): 1246752
- Qin HN, Liu Y (2010). A Checklist of Vascular Plants of Guangxi. Beijing: Science Press, 466 (in Chinese) [覃海宁, 刘演(2010). 广西植物名录. 北京: 科学出版社, 466]
- Qiu LW, Wang J, Xiao LH, et al (2009). A highly effective propagation technology for *Phalaenopsis*. *J Southern Agric*, 40 (12): 1523–1525 (in Chinese with English abstract) [丘亮伟, 王建, 肖丽红等(2009). 蝴蝶兰无菌播种及快繁技术研究. 南方农业学报, 40 (12): 1523–1525]
- Roy AR, Patel RS, Patel VV, et al (2011). Asymbiotic seed germination, mass propagation and seeding development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): an *in vitro* protocol for an endangered orchid. *Sci Hortic*, 128: 325–331
- Tian T (2015). Preliminary report on tissue culture and rapid propagation of *Phalaenopsis*. *South China Agric*, 9 (31): 23–24 (in Chinese) [田甜(2015). 蝴蝶兰组织培养快繁技术研究初报. 南方农业, 9 (31): 23–24]
- Wang DY, Wang JY, Cai H, et al (2007). Optimization of tissue culture condition on proliferation adventitious buds of *Phalaenopsis* Bl. spp. *J Huazhong Agric Univ*, 26 (6): 856–858 (in Chinese with English abstract) [王冬云, 汪建亚, 蔡桁等(2007). 蝴蝶兰组培不定芽增殖条件的优化. 华中农业大学学报, 26 (6): 856–858]
- Wang HJ (2011). Research progress on *Phalaenopsis* of tissue culture. *Beijing Agric*, (30): 25–26 (in Chinese with English abstract) [王海娟(2011). 蝴蝶兰组培的研究进展. 北京农业, (30): 25–26]
- Wang LN, Jin X, Li ZY (2018). An efficient system for inducing cluster buds of *Phalaenopsis* pedicels. *Heilongjiang Agric Sci*, (5): 17–20 (in Chinese with English abstract) [王丽娜, 金勋, 李泽宇等(2018). 一种高效的蝴蝶兰花梗诱导丛生芽体系. 黑龙江农业科学, (5): 17–20]
- Ye XX, Huang YS, Nong DX, et al (2010). New records of *Phalaenopsis* (Orchidaceae) from Guangxi, China. *Guihaia*, 30 (6): 827–828 (in Chinese with English abstract) [叶晓霞, 黄俞淞, 农东新等(2010). 广西蝴蝶兰属(兰科)新资料. 广西植物, 30 (6): 827–828]
- Yu HL, Hu YH, Zhao H (2009). *Phalaenopsis amabilis* sterile planting seedling breeding technology in the north. *Hubei*

- Agric Sci, 48 (5): 1045–1047 (in Chinese with English abstract) [余慧琳, 胡月华, 赵辉(2009). 北方地区蝴蝶兰无菌播种繁育实生苗技术. 湖北农业科学, 48 (5): 1045–1047]
- Zeng SJ, Peng XM, Zhang JL, et al (2000). A study on tissue culture and rapid propagation of *Phalaenopsis* hybrids. J Wuhan Bot Res, 18 (4): 344–346 (in Chinese with English abstract) [曾宋君, 彭晓明, 张京丽等(2000). 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖. 武汉植物学研究, 18 (4): 344–346]
- Zeng SJ, Wu KL, da Silva JAT, et al (2012). Asymbiotic seed germination, seeding development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh, an endangered terrestrial orchid. Sci Hortic, 138: 198–209
- Zhu J, Ma L, Liu F, et al (2017). Establishment and optimization of regeneration system for virus-free shoot tip of *Phalaenopsis amabilis*. Shandong Agric Sci, 49 (6): 60–63 (in Chinese with English abstract) [朱娇, 马蕾, 刘芳等(2017). 蝴蝶兰茎尖脱毒再生体系建立与优化. 山东农业科学, 49 (6): 60–63]

Aseptic seeding and rapid propagation of *Phalaenopsis lobbii*

HUANG Xinyi¹, XIE Zhenxing¹, LU Zuzheng¹, YU Yanping¹, LUO Qing¹, MAO Liyan¹, JIANG Hong^{2,*}

¹Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning 530001, China

²Yunnan Academy of Forestry and Grassland / Yunnan Laboratory for Conservation of Rare, Endangered & Endemic Forest Plants, National Forestry and Grassland Administration, Kunming 650204, China

Abstract: *Phalaenopsis lobbii* is a rare and endangered plant, which is included in the wild plant species with extremely small populations in China. Tissue culture and rapid propagation is an effective method to protect the plant. In this study, we used the mature seeds of *P. lobbii* after pollination as materials to explore the optimal condition of the aseptic seeding. The results showed that the seed germination didn't need dark treatment. The most suitable medium for the seed germination was 1/4MS + 0.1% activated carbon + 70 g·L⁻¹ banana juice, and the seed germination rate was 77.20%. Low concentration of 6-BA and high concentration of NAA were beneficial to the induction of multiple shoot, and the optimal medium was 1/3MS + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 2.0 mg·L⁻¹ NAA + 0.1% activated carbon + 70 g·L⁻¹ banana juice. Added juices of potato or banana in the medium was helpful to the plant growth, and the suitable medium was 1/3MS + 70 g·L⁻¹ potato juice or 1/3MS + 70 g·L⁻¹ banana juice. Through the aseptic seeding research, we successfully obtained a batch of tissue culture seedlings of *P. lobbii*.

Key words: *Phalaenopsis lobbii*; seed; aseptic seeding; rapid propagation; extremely small populations

Received 2019-12-04 Accepted 2020-03-06

This work was supported by Guangxi Science and Technology Program (AB16380060), and Guangxi Subtropical Crops Research Institute Basic Scientific Research Operating Expenses Special Project (201802).

*Corresponding author (orchidchina@hotmail.com).