



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104351054 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201410649775. 1

(22) 申请日 2014. 11. 14

(71) 申请人 广东省农业科学院环境园艺研究所  
地址 510640 广东省广州市天河区五山路广东省农科院内

(72) 发明人 朱根发 任桂萍 刘海林

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245  
代理人 苏运贞

(51) Int. Cl.  
A01H 4/00 (2006. 01)

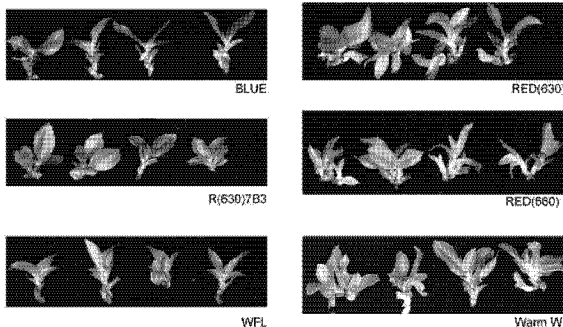
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法

(57) 摘要

本发明属于植物组织培养领域,具体涉及一种利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法。该方法包括如下步骤:(1) 用蝴蝶兰花梗作为外植体,诱导产生丛生芽;(2) 将步骤 (1) 中获得的丛生芽切割分成单芽或簇芽接种至增殖培养基中;(3) 以红光 LED 或暖白光 LED 为光源,将步骤 (2) 已经接种至增殖培养基中的丛生芽置于红光 LED 或暖白光 LED 下培养;该方法可以使丛生芽单芽数量显著提高,干重,鲜重和株高均有增加,并且降低了生产成本,节约能源。



1. 一种利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法,其特征在于包括如下步骤:
  - (1) 用蝴蝶兰花梗作为外植体,诱导产生丛生芽;
  - (2) 将步骤(1)中获得的丛生芽切割分成单芽或簇芽接种至增殖培养基中;
  - (3) 以红光 LED 或暖白光 LED 为光源,将步骤(2)已经接种至增殖培养基中的丛生芽置于红光 LED 或暖白光 LED 下培养;步骤(3)中所述的红光 LED 的波长为 630nm 或 660nm;  
步骤(3)中所述的暖白光 LED 是一种提高了白光中红光比例的复合光 LED,500 ~ 780nm 波段光辐射占全部可见光辐射能的 91.80%。
2. 根据权利要求 1 所述的利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法,其特征在于:  
步骤(3)中所述的红光 LED 额定功率为 11.52W。
3. 根据权利要求 1 所述的利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法,其特征在于:  
步骤(3)中所述的暖白光 LED 额定功率为 17.28W。
4. 根据权利要求 1 所述的利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法,其特征在于:  
步骤(1)中所述的蝴蝶兰为中花系蝴蝶兰‘绿熊’或大花系蝴蝶兰‘大辣椒’。
5. 根据权利要求 1 所述的利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法,其特征在于:  
步骤(3)中所述的培养条件为:培养温度为  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为 50% ~ 60%,光照时间为 12h/d,光照强度为  $20 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光照培养 45 ~ 60 天。
6. 根据权利要求 1 所述的利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法,其特征在于:  
步骤(1)中所述的诱导方式为蝴蝶兰花梗消毒后在花梗腋芽诱导培养基中诱导培养;所述的花梗腋芽诱导培养基的组成为 1/2MS+6-BA 3mg/L+NAA 0.2mg/L 蔗糖 20g/L+椰汁 100mL/L+琼脂 6g/L;所述的花梗腋芽诱导培养基的 pH 值 5.6 ~ 6.0。
7. 根据权利要求 1 所述的利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法,其特征在于:  
步骤(1)中所述的诱导培养条件为培养温度为  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为 50% ~ 60%,光照时间为 12h/d,其中在光照强度为  $5 \pm 1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  的普通组培光环境下培养 7d,然后在光照强度为  $20 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  的普通组培光环境下培养 45 ~ 60d。
8. 根据权利要求 1 所述的利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法,其特征在于:  
步骤(2)中接种方式为将花梗腋芽诱导的丛生芽,切割分成单芽或簇芽,切去并保留芽基部 1/3 的叶片,垂直插入增殖培养基进行扩繁。
9. 根据权利要求 1 所述的利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法,其特征在于:  
步骤(2)中所述的增殖培养基的组成为:1/2MS+NAA 0.05mg/L+6-BA 3.0mg/L+AD 2.0mg/L+蔗糖 20g/L+椰汁 100mL/L+琼脂 6g/L,所述的增殖培养基的 pH 值 5.6 ~ 6.0。

10. 权利要求 1 ~ 9 任一项所述的利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法在植物组织培养领域中的应用。

## 一种利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物组织培养领域,具体涉及一种利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法。

### 背景技术

[0002] 蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* ssp.) 是单子叶植物纲、兰科蝴蝶兰属植物,其花形奇特,姿态优雅,花期长久,素有“洋兰皇后”的美誉,并在国内外花卉市场占有重要的地位。

[0003] 生产上广泛应用的蝴蝶兰繁殖方式是组织培养技术。其常用的途径是从生芽途径,包括外植体诱导丛生芽、丛生芽的增殖、生根壮苗几个阶段,其中丛生芽的增殖扩繁是产生大量幼苗的基础。传统的组培光源是白色荧光灯,其发热量大,大量使用荧光灯作为光源,增加了室内的温度控制的难度;寿命较短,增加生产成本;而且光效低(50%以上光不能被植物所利用),大大浪费了资源。

[0004] 发光二极管 (Light-Emitting Diode, LED) 是一种能发光的半导体电子元件。因其具有光谱性能好、光效高、系统发热少、体积较小、寿命较长等优点,在植物生理或栽培研究领域的应用不断增加。基于这些优点,蝴蝶兰组织培养快中使用 LED 作为光源显得迫不及待。Hsu [Hsing-cheng Hsu, Chiachung Chen (2010). The effect of light spectrum on the growth characteristics of in vitro cultures of phalaenopsis. Propagation of Ornamental Plants 10, 3-8.] 和戴艳娇 [戴艳娇, 王琼丽, 张欢, 代大勇, 文民操, 徐志刚 (2010). 不同光谱的 LEDs 对蝴蝶兰组培苗生长的影响. 江苏农业科学 5, 227-231.] 针对 LED 对蝴蝶兰生根的影响做了研究。由于不同植物在生长发育的不同阶段对光质、光强需求各异, LED 对蝴蝶兰组织培养快速繁殖的影响还未见报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法。

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述方法在植物组培领域中的应用。

[0007] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0008] 一种利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法,包括如下步骤:

[0009] (1) 用蝴蝶兰花梗作为外植体,诱导产生丛生芽;

[0010] (2) 将步骤 (1) 中获得的丛生芽切割分成单芽或簇芽接种至增殖培养基中;

[0011] (3) 以红光 LED 或暖白光 LED 为光源,将步骤 (2) 已经接种至增殖培养基中的丛生芽置于红光 LED 或暖白光 LED 下培养;

[0012] 步骤 (1) 中所述的蝴蝶兰优选为中花系蝴蝶兰‘绿熊’ (Green Bear) 或大花系蝴蝶兰‘大辣椒’ (Big Chilli);

[0013] 步骤 (1) 中所述的诱导方式为蝴蝶兰花梗消毒后在花梗腋芽诱导培养基中诱导培养;

[0014] 所述的花梗腋芽诱导培养基的组成为 1/2MS+6-BA3mg/L+NAA0.2mg/L 蔗糖 20g/L+椰汁 100mL/L+琼脂 6g/L;所述的花梗腋芽诱导培养基的 pH 值 5.6 ~ 6.0;

[0015] 步骤 (1) 中所述的诱导培养条件为培养温度为  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 50% ~ 60%, 光照时间为 12h/d, 其中在光照强度为  $5 \pm 1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  的普通组培光环境下培养 7d, 然后在光照强度为  $20 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  的普通组培光环境下培养 45 ~ 60d;

[0016] 步骤 (2) 中接种方式为将花梗腋芽诱导的丛生芽, 切割分成单芽或簇芽, 切去并保留芽基部 1/3 的叶片, 垂直插入增殖培养基进行扩繁;

[0017] 步骤 (2) 中所述的增殖培养基的组成为: 1/2MS+NAA0.05mg/L+6-BA3.0mg/L+AD2.0mg/L+蔗糖 20g/L+椰汁 100mL/L+琼脂 6g/L, 所述的增殖培养基的 pH 值 5.6 ~ 6.0;

[0018] 步骤 (3) 中所述的培养条件为: 培养温度为  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 50% ~ 60%, 光照时间为 12h/d, 光照强度为  $20 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 光照培养 45 ~ 60 天;

[0019] 步骤 (3) 中所述的红光 LED 的波长为 630nm 或 660nm, 额定功率均为 11.52W;

[0020] 步骤 (3) 中所述的暖白光 LED 是一种提高了白光中红光比例的复合光 LED, 500 ~ 780nm 波段光辐射占全部可见光辐射能的 91.80%, 额定功率为 17.28W;

[0021] 步骤 (3) 中所述的培养条件优选为以暖白光 LED 作为光源, 培养温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 相对湿度 50% ~ 60%, 光照时间 12h/d, 光照强度  $20 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 光照培养 60 天;

[0022] 所述的椰汁为椰果的抽取汁液;

[0023] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0024] 本发明提供了一种利用 LED 光源促进蝴蝶兰丛生芽快速繁殖的方法。该方法以红光或 LED 或暖白光 LED 为光源, 将丛生芽在上述光源下培养扩繁, 其中丛生芽单芽数量显著提高, 干重, 鲜重和株高均有增加, 并且降低了生产成本, 节约能源。且在暖白光 LED 为光源培养下, 增殖系数最高可增殖 3.14 倍, 提高了 53.17%, 丛生芽数大于等于 3 的外植体的比例最多可占 62.16%, 提高了 2.81 倍。丛生芽数不小于 4 的外植体数占的比例最高可达总数的 36.49%, 提高了 4.62 倍。此外, 干重、鲜重和株高分别提高了 19.00%、19.54% 和 7.79%。

## 附图说明

[0025] 图 1 是不同光质的 LED 下蝴蝶兰‘绿熊’丛生芽的生长状况。

[0026] 图 2 是不同光质的 LED 下蝴蝶兰‘大辣椒’丛生芽的生长状况。

[0027] 图 3 是蓝光 (BLUE) 的光谱图。

[0028] 图 4 是 630nm 红光 [RED(630)] 的光谱图。

[0029] 图 5 是 R7B3 的光谱图。

[0030] 图 6 是 660nm 红光 [RED(660)] 的光谱图。

[0031] 图 7 是暖白光 (Warm W) 的光谱图。

[0032] 图 8 是白色荧光 (WFL) 的光谱图。

## 具体实施方式

[0033] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述, 但本发明的实施方式不限于此。

[0034] 实施例中涉及到的培养基：

[0035] 花梗腋芽诱导培养基：1/2MS+6-BA3mg/L+NAA0.2mg/L 蔗糖 20g/L+ 椰汁 100mL/L+ 琼脂 6g/L；其 pH 值 5.6 ~ 6.0；

[0036] 增殖培养基：1/2MS+NAA0.05mg/L+6-BA3.0mg/L+AD2.0mg/L+ 蔗糖 20g/L+ 椰汁 100mL/L+ 琼脂 6g/L；其 pH 值 5.6 ~ 6.0；

[0037] 所述的椰汁为椰果的抽取汁液；

[0038] 实施例 1

[0039] (1) 实验选用购买于广东省农业科学院环境园艺所金颖花卉苗木推广中心的中花系蝴蝶兰‘绿熊’(Green Bear)花梗作为外植体,消毒后,截取带腋芽节段接种于花梗腋芽诱导培养基上诱导分化,诱导培养条件为:培养温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,相对湿度 50% ~ 60%,光照时间 12h/d,其中前一周在遮层报纸的普通组培光环境下培养即在光照强度为  $5 \pm 1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  的普通组培光环境下培养 7d,揭开报纸之后,继续在普通组培光环境下培养 45 ~ 60d 即在光照强度为  $20 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  的普通组培光环境下培养 45 ~ 60d,获得丛生芽;

[0040] (2) 以 240mL 的果酱瓶为培养容器,将步骤 (1) 中分化出的丛生芽分成单芽或簇芽,切去并保留芽基部 1/3 的叶片,分成生长状态基本一致的单芽分别接种到增殖扩繁培养基上进行扩增,每瓶接种 5 个芽,每处理接种 7 瓶,标记并随机置于不同光质组合的灯管状发光二极管(LED)培养架下光照培养,重复试验 3 次。培养条件:培养温度为  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,相对湿度为 50% ~ 60%,光强强度为  $20 \pm 2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光照时间为 12h/d;

[0041] 其中,步骤 (2) 中灯管状发光二极管(LED)培养架,不同光质组合分别为:BLUE(蓝光,波长为 450 ~ 480nm)、RED(630)(红光,波长为 630nm)、R(630)7B3(红光:蓝光 = 7:3(光强比),红光波长为 630nm)、RED(660)(红光,波长为 660nm)、Warm W(暖白光)、WFL(白色荧光灯对照),Warm W 中,500 ~ 780nm 波段光辐射占全部可见光辐射能的 91.80%。其中,图 3 ~ 8 分别为 BLUE、RED(630)、R(630)7B3、RED(660)、Warm W 和 WFL 的光谱图。各光质组合灯管参数及实际耗能如表 1,各个光照条件的实际耗电量结果比对发现各 LED 组合光质均较白色荧光灯省电,BLUE、RED(630)、R(630)7B3、RED(660)、Warm W 各处理较白色荧光灯分别省点 74.22%、80.44%、78.67%、80.44%和 80.89%。

[0042] 表 1 不同光质组合的 LED 灯管参数及实际耗能

[0043]

光处理	灯管额定功率 (W)	灯管数	灯管实际功率 (W)	实际耗电量 (KW·h)	最终光强 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )
BLUE	17.28	4	5.8	0.023	20
RED(630)	11.52	4	4.4	0.018	20
R(630)7B3	11.52/17.28	3+1	4.1/6.9	0.019	20
RED(660)	11.52	4	4.4	0.018	20
Warm W	17.28	4	4.3	0.017	20

[0044]

WFL	30	3	30	0.09	20
-----	----	---	----	------	----

[0045] 生长指标测定:每个处理在上述不同光质组合的灯管状发光二极管(LED)培养架

下光照培养 60 天后,测定株高、根长用游标卡尺(精确度 0.01mm)测量;鲜重、干重(80℃烘箱 48 小时烘干至恒重)用电子天平称量;叶绿素的测定参照王学奎(2006)的方法,称取由上往下第二个叶片 0.5g,减碎,5mL 体积分数为 95%的乙醇研磨,用体积分数为 95%的乙醇定容至 10mL,在波长 665nm 和 649nm 下测定吸光度(OD),用公式  $C_a = 13.95A_{665} - 6.88A_{649}$ 、 $C_b = 24.96A_{649} - 7.32A_{665}$  计算,叶绿体色素的含量(mg/g) =  $C \times V / 1000 \times N / W$  [式中 C 为色素含量(mg/L)、V 为提取液体积(mL)、N 为稀释倍数、W 为样品质量(g)];统计单芽诱导出的 1cm 以上芽的数量,即增殖系数 = 单芽总数 / 接种芽数;实验重复 3 次。数据分析:所以数据使用 Spss13.0 软件,以 Ducan 检验不同处理间的差异显著性,显著水平  $P < 0.05$ 。

[0046] 测定培养 60d 的蝴蝶兰组培苗增殖扩繁结果,结果如下:增殖系数即平均每个单芽经扩繁培养得到的丛生芽中含有的可使用的单芽数目,是蝴蝶兰扩繁实验中最重要指标。在这几个 BLUE、RED(630)、R(630)7B3、RED(660)、Warm W 光质条件下,增殖系数都较对照(WFL)有一定增加(表 2),在 Warm W 处理下最大(3.14),与对照相比提高了 53.17%。在两个波长的纯红光下单芽数目也比对照有显著增加。在 RED(630)、RED(660)、Warm W 三个红光或者红光较多的处理下,单芽数目比 BLUE、R(630)7B3、WFL 均显著增加,且丛生芽数大于等于 3 的外植体的比例均超过 50%,最高达到 62.16%(Warm W),提高了 2.81 倍,而对照仅为 22.08%。同样三个处理下丛生芽数不小于 4 的外植体数也达到了总数的 25%或以上,最高可达总数的 36.49%,提高了 4.62 倍,而对照组仅 6.49%。

[0047] 表 2 不同光质的 LED 对蝴蝶兰‘绿熊’单芽增殖系数的影响

[0048]

光处理	增殖系数	比率(丛生芽数≥3)	比率(丛生芽数≥4)
BLUE	2.27±0.16a	33.33%	14.67%
RED(630)	2.85±0.13b	51.39%	25.00%
R(630)7B3	2.33±0.14 a	36.84%	13.16%
RED(660)	2.80±0.15b	56.25%	25.00%
Warm W	3.14±0.17b	62.16%	36.49%
WFL	2.05±0.12a	22.08%	6.49%

[0049] \*表中结果记为平均值 ± 标准误,数字后面不同字母表示差异显著,  $P < 0.05$

[0050] 如表 3 所示,鲜重和干重在 Warm W 处理下最大,较 BLUE、R(630)7B3、WFL 均有增加,比对照组分别提高了 19.54%和 19.00%,幼苗的株高在 Warm W 处理下比对照提高了 7.79%。

[0051] 表 3 不同光质的 LED 对蝴蝶兰‘绿熊’增殖扩繁培养中形态指标的影响

[0052]

光处理	鲜重(g)	干重(mg)	株高(mm)
BLUE	0.79±0.05a	53.30±3.35ab	39.68±0.89d
RED(630)	0.94±0.05ab	49.56±2.81a	38.16±1.31cd
R(630)7B3	0.84±0.05a	47.30±3.33a	33.15±1.00a
RED(660)	0.83±0.05a	47.80±2.49a	37.41±0.90cd
Warm W	1.04±0.06b	60.25±3.61b	36.37±1.08bc
WFL	0.87±0.06a	50.63±3.17a	33.74±0.83ab

[0053] \*表中结果记为平均值 ± 标准误,数字后面不同字母表示差异显著,  $P < 0.05$

[0054] 结果表明,红光利于蝴蝶兰的芽的增殖, RED(630)、RED(660)、Warm W 三种光质对加强蝴蝶兰增殖效果明显。综合芽增殖效果和形态指标结果,以 Warm W 为光源,作为优选实施方案。

[0055] 实施例 2

[0056] 本实施例与实施例 1 不同的是所采用的实验材料是‘大辣椒’(Big Chilli),其余与实施例 1 相同。

[0057] 不同光质的 LED 对‘大辣椒’增殖扩繁产生的影响结果如下:‘大辣椒’的增殖系数则是在 630nm 的纯红光和 Warm W 下较大,分别比对照组提高了 59.42%和 46.37%。从丛生芽数不小于 3 外植体数量来看,RED(630)、RED(660)、Warm W 处理均达 25%以上(表 4)。

[0058] 表 4 不同光质的 LED 对蝴蝶兰‘大辣椒’单芽增殖系数的影响

[0059]

光处理	增殖系数	比率(丛生芽数≥3)
BLUE	1.66±0.13ab	16.00%
RED(630)	2.20±0.14c	34.55%
R(630)7B3	1.78±0.12b	12.73%
RED(660)	2.00±0.12bc	32.14%
Warm W	2.02±0.12 bc	26.98%
WFL	1.38±0.07a	1.82%

[0060] \*表中结果记为平均值±标准误,数字后面不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

[0061] ‘大辣椒’品种的无根组培苗在 LED 下的鲜重较对照都均有显著增加(表 5),660nm 纯红光处理和 Warm W 下较大,较对照分别提高了 67.92%和 52.83%;干重在各处理下均较对照有增加,在两种波长的纯红光下值较大,在 Warm W 处理下较对照增加 28.14%。结果表明,红光有助于蝴蝶兰干重和鲜重的增加。

[0062] 表 5 不同光质的 LED 对蝴蝶兰‘大辣椒’增殖培养中形态指标的影响

[0063]

光处理	鲜重(g)	干重(mg)	株高(mm)
BLUE	0.74±0.04b	41.88±2.46ab	37.79±1.01b
RED(630)	0.74±0.04b	50.74±5.24ab	42.77±1.11c
R(630)7B3	0.75±0.05b	42.82±2.59ab	34.21±0.99a
RED(660)	0.89±0.05c	53.17±7.59b	42.78±1.26c
Warm W	0.81±0.05bc	41.76±2.27ab	40.70±1.19bc
WFL	0.53±0.03a	32.59±1.60a	31.32±0.98a

[0064] \*表中结果记为平均值±标准误,数字后面不同字母表示差异显著, $P < 0.05$

[0065] 综合以上两个实施例的芽增殖效果和形态指标结果,以 Warm W 为光源,作为优选实施方案,可促进芽快速繁殖,提高幼苗质量,节约能源。

[0066] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。



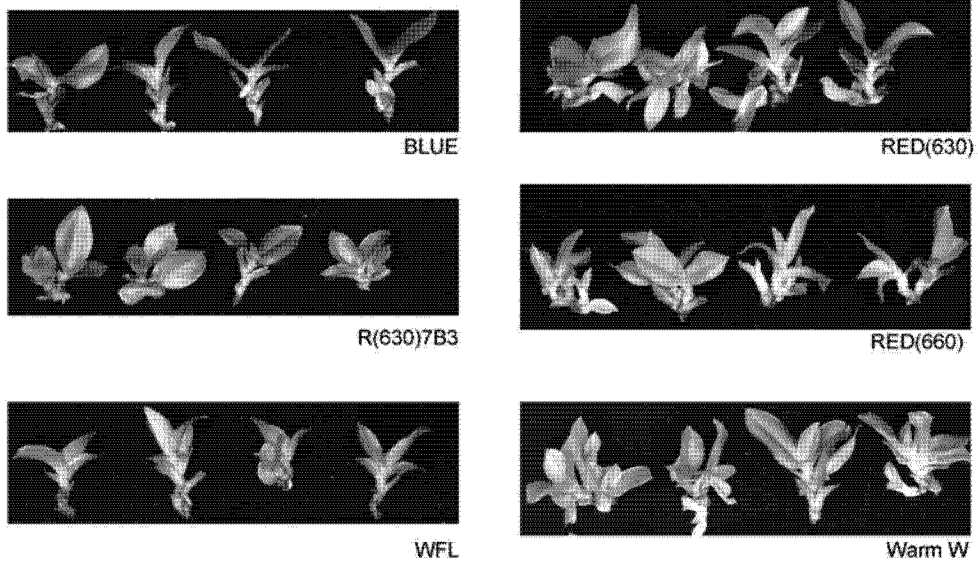


图 1

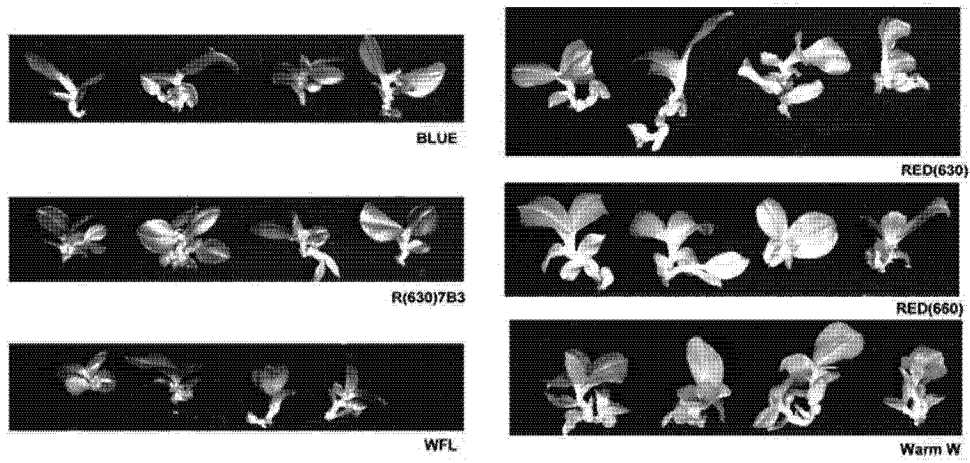


图 2

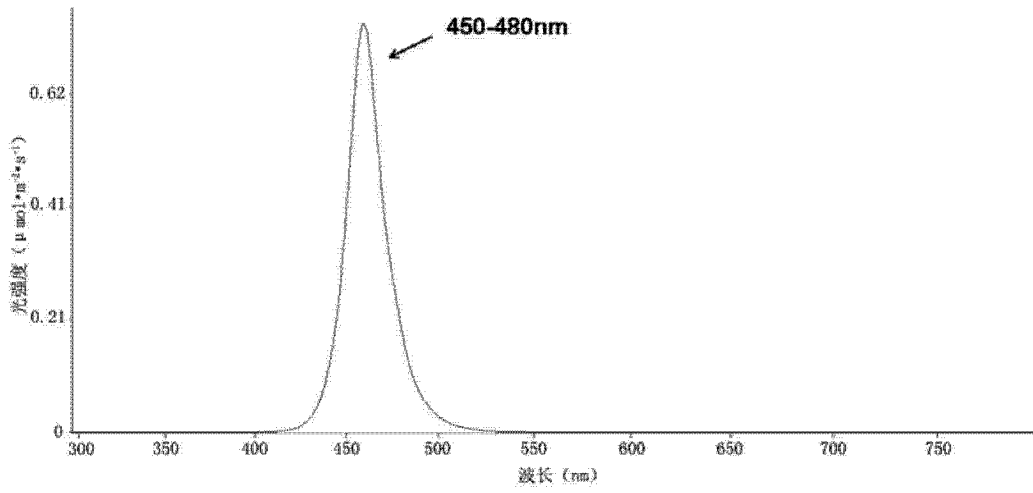


图 3

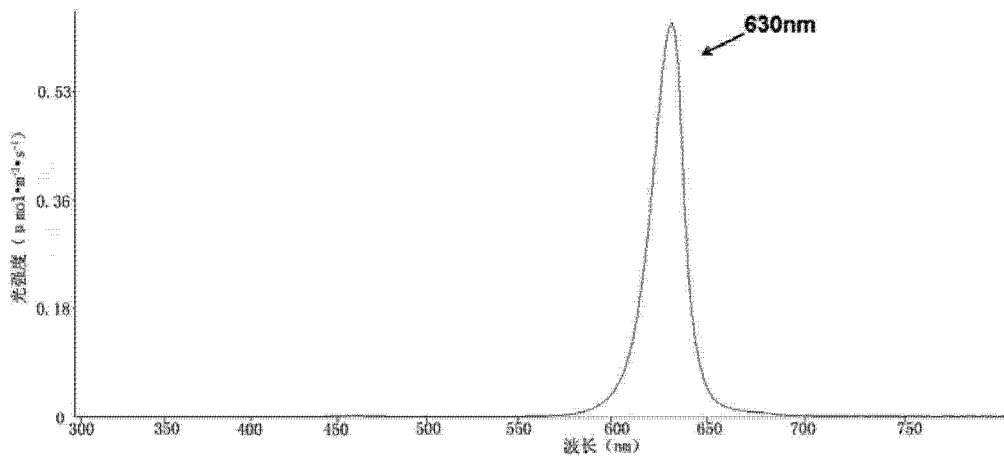


图 4

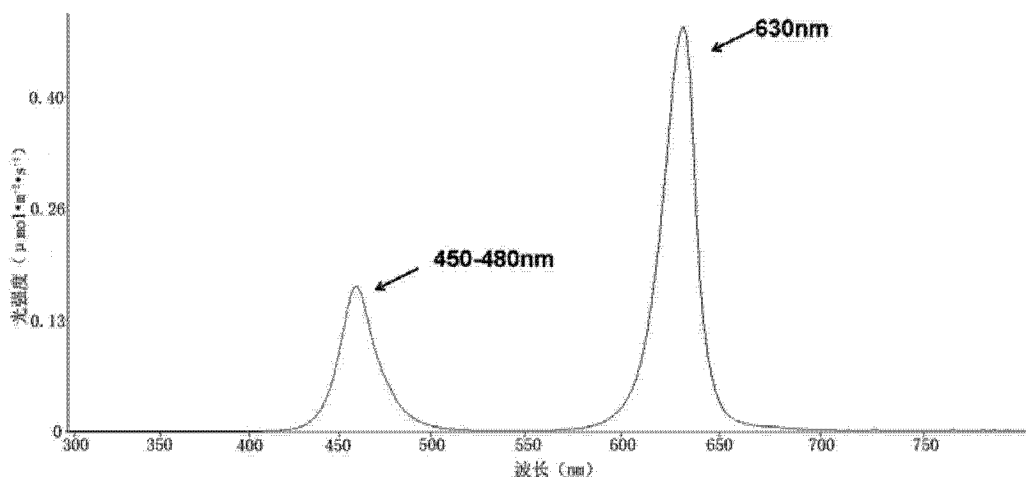


图 5

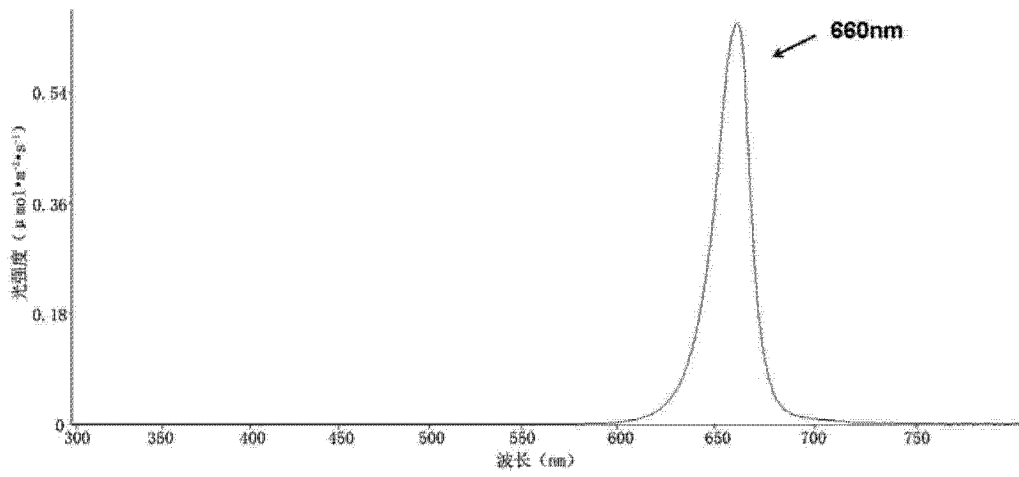


图 6

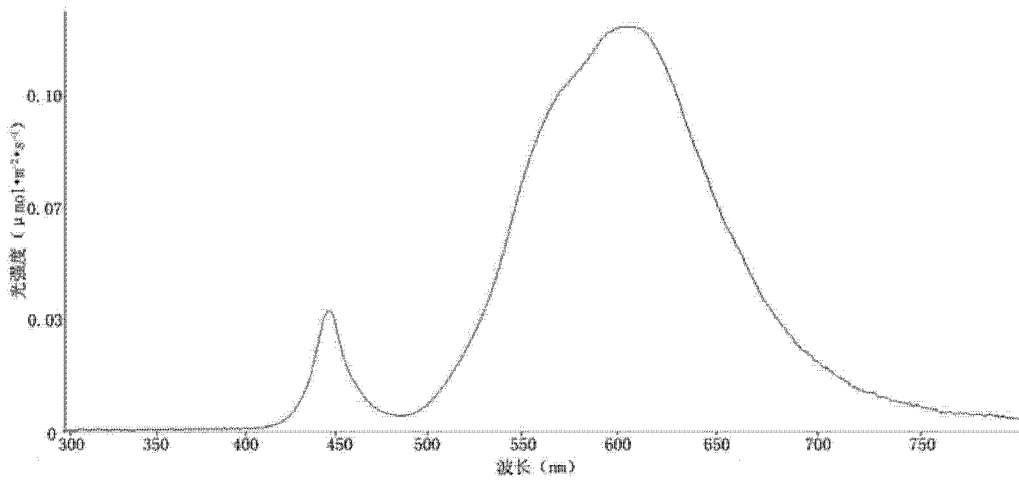


图 7

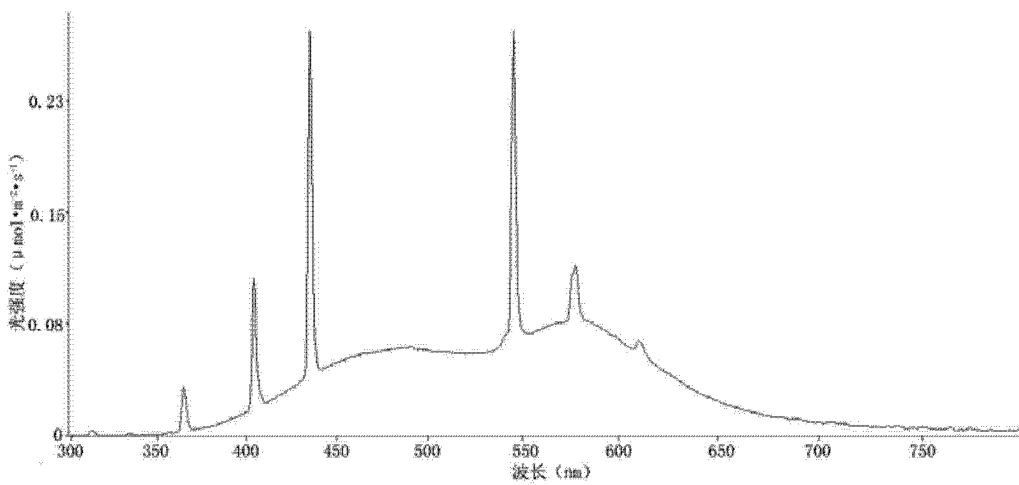


图 8