

兰属植物珍珠矮试管开花技术研究

付双彬, 杨燕萍, 应 震, 高绪勇, 周 庄

(浙江省农业科学院/浙江省亚热带作物研究所, 浙江 温州 325005)

摘 要:为了保护 and 开发利用兰花新种珍珠矮,加快育种进程,本研究通过根状茎直接和再生植株间接的方式来诱导试管开花。结果表明,在含有 1 mg/L 6-BA, 30 g/L 蔗糖以及 2 g/L 蛋白胨的调整 MS 培养基 (165 mg/L NH_4NO_3 , 380 mg/L KNO_3 和 850 mg/L KH_2PO_4) 上直接诱导根状茎获得的正常试管花数量最高,平均为 2.6 个。含有 3 mg/L 6-BA、1 mg/L NAA 和 100 mL/L 椰汁的 MS 或 1/2 MS 培养基最适宜珍珠矮根状茎再生;在含有 3 mg/L 6-BA 和 20 g/L 蔗糖的 MS 培养基间接诱导再生植株获得试管花数量最高,平均为 0.8 个。

关键词: 兰花; 珍珠矮; 根状茎; 再生植株; 试管开花

DOI: 10.16590/j.cnki.1001-4705.2024.07.136

中图分类号: S 682.31

文献标志码: A

文章编号: 1001-4705(2024)07-0136-08

Study on in Vitro Flowering Technology of *Cymbidium* Plant *Cymbidium nanulum*

FU Shuangbin, YANG Yanping, YING Zhen, GAO Xuyong, ZHOU Zhuang

(Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Zhejiang Institute of Subtropical
Crops, Wenzhou Zhejiang 325005, China)

Abstract: In order to protect, develop and utilize the new *Cymbidium* plant *Cymbidium nanulum* and accelerate the breeding process, this study induced in vitro flowering by direct rhizomes and indirect regenerated plants. The results showed that the highest number of normal flowers were obtained by direct induction on the adjusted MS medium containing 1 mg/L 6-BA, 30 g/L sucrose and 2 g/L peptone (165 mg/L NH_4NO_3 , 380 mg/L KNO_3 and 850 mg/L KH_2PO_4), with an average of 2.6. MS or 1/2 MS medium containing 3 mg/L 6-BA, 1 mg/L NAA and 100 mL/L coconut water was the most suitable medium for regeneration of *Cymbidium nanulum* rhizomes. In MS medium containing 3 mg/L 6-BA and 20 g/L sucrose, the number of flowers obtained by indirect induction was the highest, with an average of 0.8.

Key words: orchid; *Cymbidium nanulum*; rhizomes; regenerated seedlings; in vitro flowering

兰花是最大的开花植物之一,以其独特的花形和迷人的色彩而闻名^[1]。作为兰属植物中的一个新种^[2],珍珠矮(*Cymbidium nanulum* Y. S. Wu et S. C. Chen)花色多变,香气纯正,具有很高的观赏价值。然而,由于其体型矮小、分布区域受限、野生资源有限等原因^[3],与同属的其他种相比,一直未被重视。

作为开花植物,花是其价值的关键组成部分,但兰花幼苗期长、开花前生长期长,一定程度上阻碍了兰花花器官相关的研究及其价值的挖掘。而基于组织培养的试管开花技术,可在 6 个月内获得开花植株,缩短了时间、降低了成本,同时也优化了兰花育种所需的空间,这对于兰花育种有很大的帮助^[4]。目前建兰与寒

收稿日期: 2024-02-24

基金项目: 浙江省农业科学院专项项目(2022R26CB002); 温州市科学技术协会项目(kjfw04); 浙江省农业科学院瓯海科创中心项目(2021OHKC0005); 温州农业新品种选育协作组项目(2019ZX004-3)。

作者简介: 付双彬(1989—),男(汉族),河北唐山人;硕士,助理研究员,主要从事兰花组织培养研究(E-mail: shuangbinfu@gmail.com)。

通讯作者: 周 庄(1978—),男(汉族),浙江温州人;硕士,副研究员,主要从事植物分类学与基因组学研究(E-mail: zhuangchow@126.com)。

兰杂交种^[5]、五唇兰和蝴蝶兰杂交种 × Doriella Tiny^[6]、*Cymbidium ensifolium* var. *misericors*^[7]和石斛^[8-10]等都获得了试管花,方法包括调整培养基、植物生长调节剂(Plant growth regulators, PGRs)、光周期、温度和其他条件等^[4]。然而,在上述研究中,所选材料多为试管苗,这对以根状茎为繁殖体,并长期处于此状态^[11]的兰属植物而言,效率并不高。因此,选用根状茎作为材料,直接诱导试管开花来提高效率是有重要意义的。

本研究以根状茎和根状茎产生的再生植株为材料,通过调节 MS 培养基中氮(NH₄NO₃、KNO₃)、磷含量(KH₂PO₄),添加不同浓度的 6-BA、TDZ 添加物以及调整蔗糖浓度来诱导产生试管花,以期建立珍珠矮的试管开花体系,为兰属植物的保护和开发利用提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

外植体选用种子无菌播种产生的根状茎,已增殖继代 5 年。

1.2 方法

1.2.1 根状茎直接诱导试管开花

以正常含量的 MS(NH₄NO₃ 1 650 mg/L、KNO₃ 1 900 mg/L 和 KH₂PO₄ 170 mg/L)^[12],添加 20 g/L 的蔗糖和 7 g/L 的琼脂作为基础(对照)培养基,在此基础上依次调整培养基内植物生长调节剂种类和浓度(表 1)、培养基内 NH₄NO₃、KNO₃ 和 KH₂PO₄ 的含量(表 2)以及蔗糖含量、添加物种类(表 3)。先前的最优值应用到下一步中,即逐步找到每个最优参数。每个组培瓶内接种 5 个根状茎,3 瓶作为 1 个重复,重复 5 次。各试验在 2 个月统计芽数量,8 个月统计正常花数。

表 1 植物生长调节剂试验设计

Table 1 Plant growth regulator test arrangement

编号	6-BA/ (mg/L)	TDZ/ (mg/L)	NAA/ (mg/L)
P1			
P2	1		0.1
P3	1		
P4	3		
P5	5		
P6	10		
P7		0.1	
P8		0.5	
P9		1.0	
P10		0.1	0.1

表 2 营养试验设计

Table 2 Nutrition test arrangement

编号	NH ₄ NO ₃ / (mg/L)	KNO ₃ / (mg/L)	KH ₂ PO ₄ / (mg/L)
N1	1 650	1 900	170
N2	330	380	850
N3	330	380	1 700
N4	165	380	850
N5	165	190	850
N6	0	190	850

表 3 蔗糖和添加物试验设计

Table 3 Sucrose and additives test arrangement

编号	蔗糖/(g/L)	椰汁/(mL/L)	蛋白胨/(g/L)
S1	50		
S2	40		
S3	30		
S4	30	100	
S5	30		2
S6	20		

1.2.2 再生植株诱导试管花

植株再生:将根状茎切成约 1 cm 的小段,接种在不同的培养基上培养(表 4)。各培养基均添加了 20 g/L 的蔗糖和 7 g/L 的琼脂。每个组培瓶内接种 6 个根状茎,3 瓶作为 1 个重复,并重复 5 次。各试验在 2 个月统计芽数量,6 个月统计再生植株数。

表 4 珍珠矮根状茎再生培养基

Table 4 *Cymbidium nanulum* rhizome regeneration media

编号	培养基	TDZ/ (mg/L)	6-BA/ (mg/L)	NAA/ (mg/L)	椰汁/ (mL/L)	蛋白胨/ (g/L)
R1	MS		3	1.0		
R2	MS		3	1.0		2
R3	MS		3	1.0	100	
R4	MS		2	0.1	100	
R5	1/2 MS		3	1.0	100	
R6	1/2 MS		2	0.1	100	
R7	MS	0.1				
R8	MS	0.1				2
R9	MS	0.1			100	
R10	MS	1.0			100	
R11	1/2 MS	0.1			100	
R12	1/2 MS	1.0			100	

再生植株诱导试管花:以再生植株为材料,按照直接诱导试管花的途径进行,每瓶内接种 1 株植株,重复 5 次。各试验在 2 个月统计芽数量,6 个月统计正常花数。

2 数据统计与分析

所有数据处理、分析均采用 R 语言进行,方差分析应用 One way ANOVA(参数)和 Kruskal-Wallis 检验(非参数),多重比较采用 LSD 法(参数)和 Nemenyi 检验(非参数)。绘图采用 OriginPro 2023b Learning edition(Origin lab,USA)软件。

3 结 果

3.1 直接途径

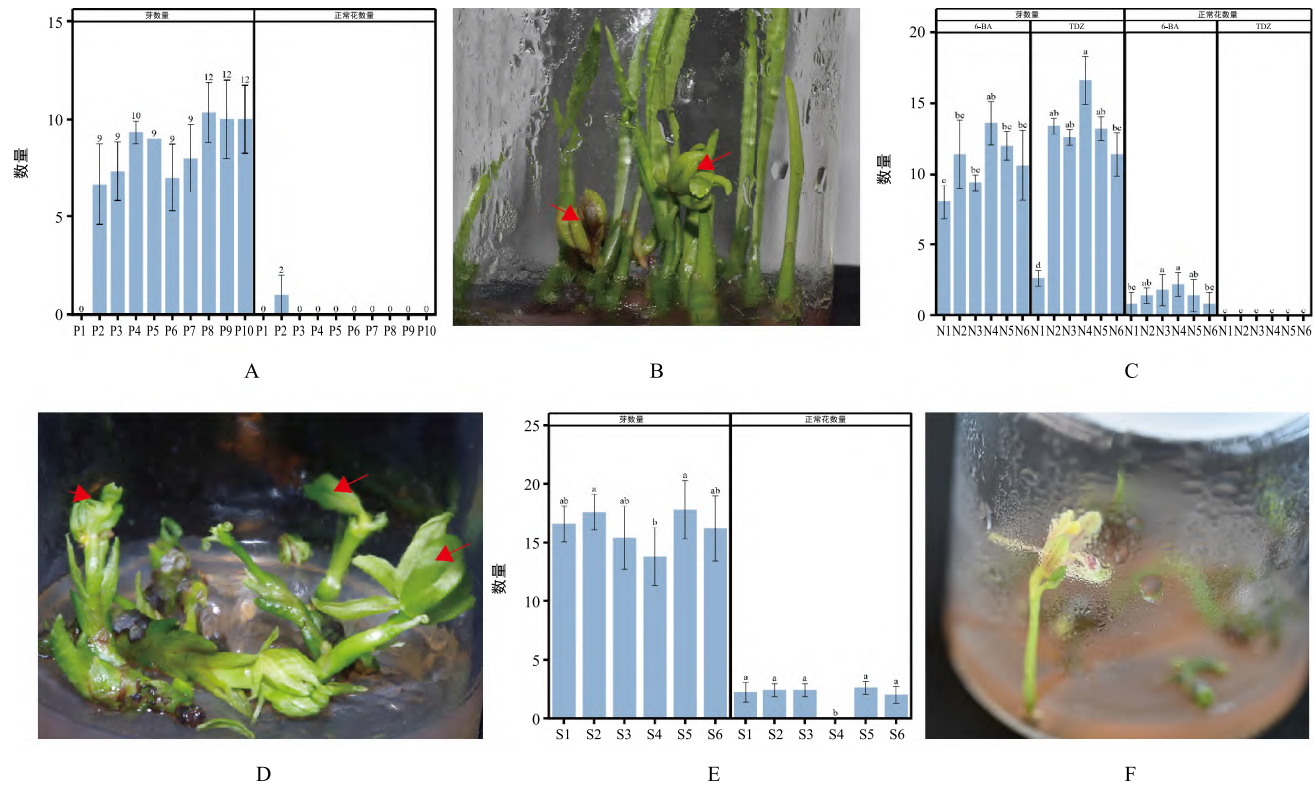
3.1.1 不同类型植物生长调节剂和含量对试管开花的影响

除对照外(P1),当培养基中只添加 6-BA 或 TDZ,或同时添加 0.1 mg/L NAA 时,同增殖培养基相似,根状茎先分化成叶芽,而后分化再生成植株,不同处理间的芽的诱导数量差异不显著(图 1A)。不更换培养基继续培养,8 个月后可以观察到少部分植株有花产生,

但几乎所有的花都是不正常的(图 1B),只有在 P2(含有 1 mg/L 6-BA)培养基上观察到有正常的花产生。

3.1.2 不同营养对试管开花的影响

与对照培养基(N1)相比,通过减少氮的含量和增加磷的含量,芽数量有显著的增加,并且此时诱导的芽几乎都为花芽,正常开花数也有较大提高(图 1C)。而去除氨态氮(NH₄NO₃),花芽数和正常花的数量都会减少。与 6-BA 相比,虽然含有 TDZ 的培养基上诱导产生的花芽数量更多,但在所有含有 TDZ 的培养基上培养的根状茎均未有正常花的出现(图 1D)。因此,在随后的试验中不再添加 TDZ。依据正常花产生数量的结果显示,在添加有 1 mg/L 6-BA 的培养基上培养根状茎时,NH₄NO₃ 165 mg/L、KNO₃ 380 mg/L、KH₂PO₄ 850 mg/L,诱导正常花数量最多,平均为 2.2 个,与 N2、N4、N5 培养基差异不显著。



注:A 为包含不同植物生长调节剂的培养基上诱导产生的芽数量和正常花数量,标签为最大值;
B 为 P2 培养基上诱导产生的试管花;
C 为包含不同 6-BA、TDZ 和不同营养的培养基上诱导产生的芽数量和正常花数量;
D 为 N4 培养基上诱导产生的畸形试管花;
E 为包含不同蔗糖和添加物的培养基上诱导产生的芽数量和正常花数量;
F 为正常的试管花;
相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著。下同。

图 1 根状茎直接诱导试管花

Fig.1 Direct induction of in vitro flowering by rhizomes

3.1.3 不同含量蔗糖和添加物对试管开花的影响

相较于对照培养基(S6),蔗糖含量的增加、额外添加蛋白胨有利于诱导芽数量的增加,但所有试验差异不显著。依据正常花的数量,S5培养基(蔗糖 30 g/L,并添加 2 g/L 的蛋白胨)上诱导产生的正常花数量最多,平均为 2.6 个,但同样,所有试验差异不显著。而额外添加椰汁不利于花芽诱导的影响,并且所有诱导芽均为叶芽,也未有正常花产生(图 1E)。

从试验结果看,通过根状茎直接诱导试管开花,每瓶内正常花只能产生 1 个(图 1F)。

3.2 间接途径

3.2.1 植物再生

经过约 30 d 的培养,所有培养基上的根状茎都出现了芽(图 2A),但数量和再生时间不同。在添加蛋白胨的培养基中,根状茎的芽数量最少(图 2B),质量最低(主要指芽和植株的大小)。相较于蛋白胨,添加椰汁则有利于芽的产生。在所有培养基中,根状茎在含有 TDZ 的培养基上培养,早期出芽较多,但再生植株的数量和质量均低于含有 6-BA 的相同培养基(图 2C、D)。依据再生植株的数量,以 R3 和 R5,即在 MS 或 1/2 MS 培养

基上添加 3 mg/L 6-BA、1 mg/L NAA 以及 100 mL/L 椰汁获得的再生植株最多(两者差异不显著,与其他培养基差异显著)。培养 6 个月后,这些再生植株经炼苗、移栽,几乎所有的植株都能成活(图 2E)。

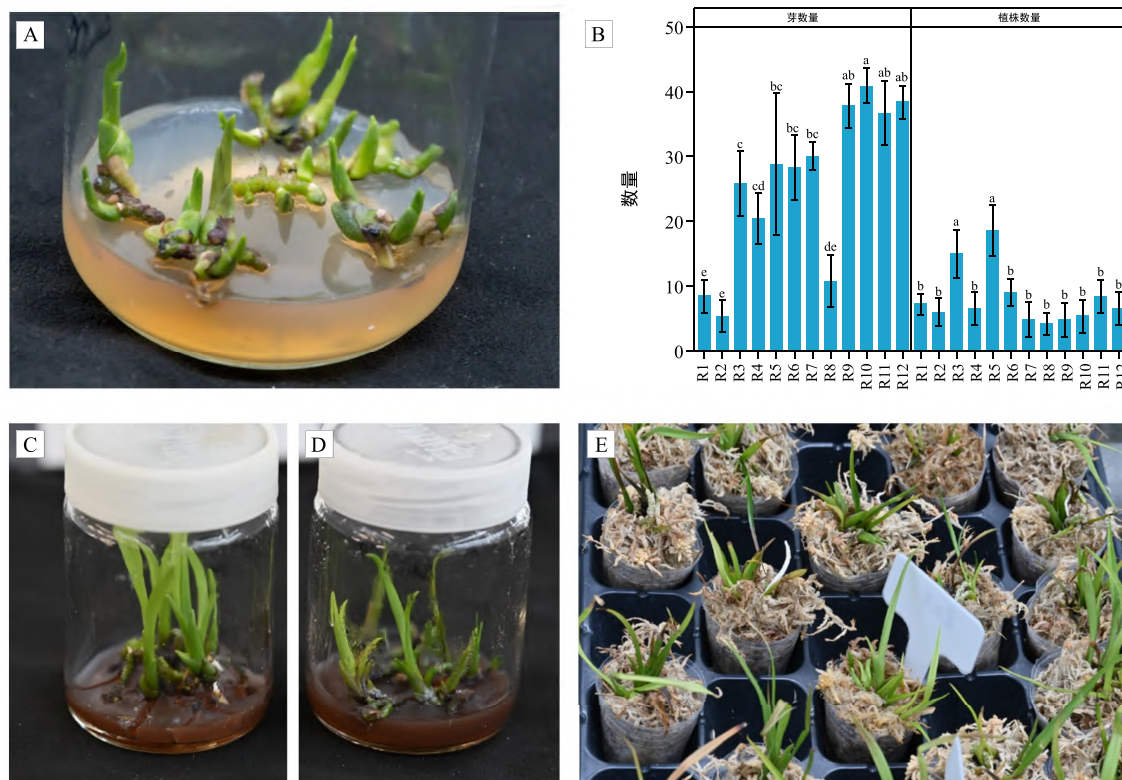
3.2.2 再生植株诱导试管花

根据上述间接诱导试管花的流程,通过再生植株间接诱导试管开花。如图 3A 所示,花芽数随着 6-BA 含量的增加而增加,但达到 5 mg/L 时,数量开始下降。正常花的数量也呈同样的趋势,但同间接诱导相同,1 瓶内只有 1 朵正常花产生(图 3B~E),其中,1、3 mg/L 的 6-BA 是最佳选择,花朵正常开放。添加 TDZ 的培养基上则没有芽和正常花产生。随后,继续调整营养成分、蔗糖和添加物的含量,但正常花的数量并没有增加。

4 讨论

4.1 植物生长调节剂

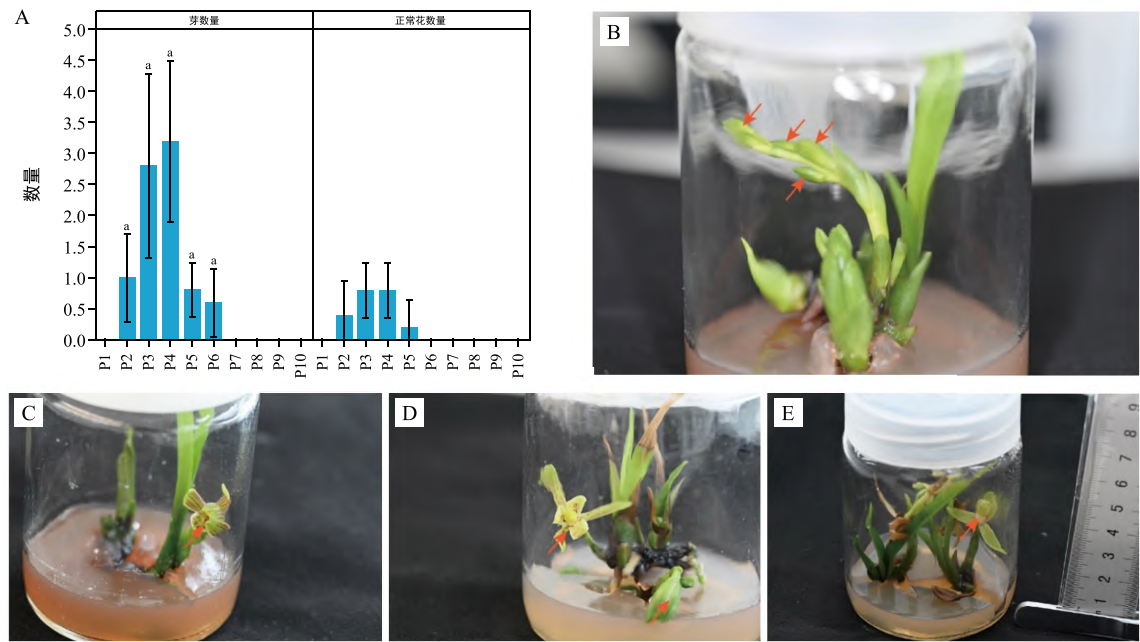
作为试管花诱导试验中常用的细胞分裂素(6-BA),一些兰花包括报春石斛^[13]、× Doriella Tiny^[6]、*Cymbidium niveo-marginatum* Mak^[14] 和 *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*^[7]等,单独使用



注:A 为诱导产生的芽;B 为在不同培养基上诱导产生的芽数量和再生植株数量;C 为在 R5 培养基上诱导产生的再生植株;
D 为在 R10 培养基上诱导产生的再生植株;E 为移栽在水苔中的再生植株。

图 2 诱导珍珠矮根状茎再生

Fig.2 Induction of *Cymbidium nanulum* rhizome regeneration



注:A 为在不同培养基上诱导产生的芽数量和正常花数量;B 为诱导产生的花芽;C、D、E 为在不同培养基上诱导产生的正常花。

图 3 再生植株间接方式诱导试管开花

Fig.3 Indirect induction of in vitro flowering by regenerated seedlings

6-BA 或与其他植物生长调节剂和养分结合使用,成功地诱导出了试管花。在其他物种如荞麦^[15]和豌豆^[16]中,也有关于 6-BA 对试管开花有效的报道。6-BA 在珍珠矮试管花诱导的直接和间接过程中都十分重要,只有在添加了 6-BA 的培养基上才能获得正常花。此外,在研究中,6-BA 的浓度会显著影响正常花的数量而不是花芽的数量,只添加 1 mg/L 的 6-BA 即可诱导正常花,而无需进一步调整培养基。本研究中,适当浓度的 TDZ 在诱导花芽方面优于 6-BA,研究结果显示,低浓度(0.1~0.5 mg/L)的 TDZ 与调整后的培养基结合,花芽和花的诱导率可达到 80% 以上;类似的结果也出现在 *Cymbidium niveo-marginatum* Mak^[14]、*Cymbidium ensifolium* var. *misericors*^[7] 和石斛‘第二爱’^[17] 的花芽诱导中。然而这些诱导的花都是不正常的,只有在添加了 6-BA 的培养基上才能获得正常的花。同样,Zeng 等^[18] 在杂交红色微型玫瑰(Hybrid red miniature rose)试管花诱导研究中,观察到添加 TDZ 的 MS 培养基与其他培养基相比,在试管花中出现了许多异常现象。

在 NAA 的使用上,许多研究主要将 NAA 与 6-BA 结合使用来诱导试管开花,但 NAA 的含量不能超过 6-BA,这与珍珠矮根状茎再生的模式相同。事实上,在许多植物诱导试管花的过程中,添加 NAA 并不是必需的,添加甚至会抑制花的形成^[4]。在本研究中,

添加 0.1 mg/L NAA 对芽的形成没有显著影响,但添加 0.1 mg/L NAA 对正常花的形成有负面影响。

4.2 无机盐含量

养分(无机盐)的含量和比例对试管开花有重要影响^[19-20]。许多研究认为,植物的营养状况会极大地影响主要开花机制的调控^[14, 21-22]。在许多植物试管开花的研究中,低氮是积极的,且往往与高浓度磷相结合。如在调整为低氮和高磷的培养基上, *Cymbidium niveo-marginatum* Mak^[14]、索尼娅石斛¹⁷^[20] 和杂交红色微型玫瑰^[18] 等成功诱导出试管花。珍珠矮在高磷低氮含量的培养基上培养的根状茎表现出花芽数量的爆炸性增长;且在降低氮和提高磷的各试验培养基上,也出现了正常的花,虽然数量仍然较少(1 瓶内只有 1 株正常的花)。后续要提高效率,可能还要在植物生长调节剂和营养两方面作进一步调整。

此外,MS 培养基内铵态氮(NH_4^+)和硝态氮(NO_3^-)之间的比例($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$)也是植物试管开花的重要因素之一^[23]。在许多兰花试管花诱导过程中,当 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比值增加时,试管开花会受到抑制,而当 NH_4^+ 浓度降低时,试管开花又会得到促进^[15, 24]。本研究中,尝试不添加 NH_4^+ ,但结果是负面的,与最佳培养基相比,花芽数量和正常花数都有显著下降,可见 NH_4^+ 的存在在珍珠矮试管花的诱导过程中发挥重要作用。同样, NH_4^+ 的存在对植物的生

长发育至关重要^[4]。

4.3 蔗糖和添加物

影响试管开花的另一个重要因素是糖^[19], 其重要性体现在两个方面。首先, 糖是植物的碳源和能量来源, 也是一种信号分子, 可调节编码酶、转运体和储存蛋白的基因表达^[25]。其次, 糖是诱导某些植物试管开花的决定因素, 由细胞分裂素和矿物质组成的其他因子需要与蔗糖共同作用, 才能启动顶端分生组织从无性状态向生殖状态的转变^[26-27]。在分析蔗糖对试管开花的影响时, 研究使用了 2%~5% 的蔗糖浓度(表 3), 提高蔗糖浓度的确会提高花芽和正常花的数量, 但本研究中, 不同处理间差异不显著。

Sim 等^[8]报道了椰汁对于 *Dendrobium Madame Thong-In* 原球茎顶芽分生组织的营养生长向生殖生长过渡的必要性, 随着椰汁浓度(50~150 mL/L)的增加, 原球茎中带有花序梗的百分比也逐步增加。杂交兰花×*Doriella Tiny* 中也取得了类似的结果, 但单独添加椰汁并不能直接诱导产生花芽^[6]。本研究中, 添加椰汁和蛋白胨, 但在添加椰汁的培养基上产生的芽均为叶芽, 也就未有正常花产生。这与珍珠矮诱导再生的试验一致, 这表明椰汁对于珍珠矮根状茎的影响主要在于促进其向叶芽分化和植株再生。蛋白胨也是兰花组培中常用的添加物, 其作用在于提供有机氮^[1], 而植物组织对于培养基的反应取决于硝态氮和铵的比例^[28]。本研究中, 添加蛋白胨能一定程度上增加正常花的数量, 但与其他未添加蛋白胨的培养基差异不显著。对于蛋白胨在兰科植物试管开花中的作用, 还未有研究报道, 其作用还需进一步研究。

4.4 植物再生

在大多数兰属植物的组织培养过程中, 接种的外植体会逐渐分化成根状茎, 并将长时间处于此状态^[11]。因此, 如何提高根状茎的分化率, 使其分化成芽, 培育出高质量的试管苗, 是兰属植物组织培养再生过程中的关键步骤^[29]。许多研究认为, 细胞分裂素在根状茎分化为芽的过程中起着关键作用。通常情况下在培养基中添加相对较高浓度的细胞分裂素, 如 6-BA 或 TDZ, 并辅以相对较低浓度的生长素, 如 2, 4-D 和 NAA 等, 能促进根状茎分化为芽。在纹瓣兰^[30]、蕙兰^[31]和寒兰^[32]的组培过程中, 使用 6-BA 可促进根状茎外植体不定芽的形成。与 6-BA 相比, TDZ 更利于兰科植物的组培分化, 如在春兰^[29]、洛氏双叶兰(*Dimorphorchis lowii*)^[33]、叉唇角盘兰(*Herminium lanceum* (Thunb. ex Sw.) Vuijk)^[34]的诱导分化过程中, 添加少量的 TDZ 诱导形成了大量的芽。同样, 在

本研究中, 相较于 6-BA, TDZ 增加了诱导芽的数量, 并且芽出现的时间也提前了。然而, 这些优势并没有持续, 6 个月后, 在含有 6-BA 的培养基中长出的植株更大更高, 数量也更多。

椰汁是兰花组培中最常用的添加物之一, 其富含植物激素、氨基酸、酶、维生素等。研究表明, 椰汁的作用方式正是由于细胞分裂素的存在, 而细胞分裂素的作用正是用于诱导组织分化再生^[28]。在许多研究中, 添加椰汁能促进根状茎分化, 如在墨兰‘吴字翠’×墨兰‘红花’杂交根状茎芽分化过程中, 添加 100 mL/L 的椰汁和 7 g/L 蛋白胨的培养基最适宜叶芽分化^[35]; 寒兰根状茎在添加 10% 椰汁的培养基上, 芽分化率高达 98.2%^[36]。本研究中, 单独添加蛋白胨, 诱导芽数量和再生植株数均不如添加椰汁的培养基(差异显著), 这可能单独使用蛋白胨对诱导根状茎起不到促进作用, 而不同添加物组合使用可能会起到好的效果, 如墨兰‘吴字翠’×墨兰‘红花’杂交根状茎分化过程中椰汁和蛋白胨的组合使用; 彩云兜兰(*Paphiopedilum wardii* Sumerh)芽分化的过程, 1 g/L 蛋白胨+10% 椰汁有利于其分化^[37]; 以及在春兰与大花蕙兰杂交后代根状茎分化过程中椰汁和香蕉的组合使用等^[38]。

4.5 畸形花

虽然本研究中再生植株试管正常开花率较高, 但与根状茎直接诱导相比所需时间长(接近 1 年), 空间和成本也有一定增加。根状茎直接诱导开花, 成本、时间等都有节约, 但同样存在问题, 即会产生较多(高)的畸形花(率), 如不能正常开放、过早的凋亡等等。在许多兰科植物试管花诱导过程中, 都遇到过出现畸形花的问题, 如在建兰小桃红与寒兰的杂交后代试管苗、根状茎、根状茎薄层的试管花诱导率分别为 80%、61.67% 和 16.67%, 正常开花率分别为 26.67%、12.50% 和 1.67%^[5]; 在铁皮石斛中, 同时添加腐胺和精胺, 许多花表现出花瓣和唇瓣的畸形^[39]; 在×*Doriella Tiny*^[6]和玫瑰^[18]中也有观察到类似的异常现象。这些试管花形成的异常现象表明, 花的发育可能需要不同的条件^[11]。畸形花的出现以及较高的畸形率是本技术应用的主要阻碍, 还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Lee Y I, Yeung C T. Orchid propagation from laboratories to greenhouses—methods and protocols[M]. Humana press, 2018.
- [2] 吴应祥, 陈心启. 中国兰属两新种[J]. 植物分类学报, 1991, 29(6): 549-552.

- [3]和寿星,薛润光,李兆光,等.兰属新种珍珠矮的组织培养与植株再生[J].植物生理学通讯,2007,43(3):517-518.
- [4]Teixeira da Silva J A, Kerbaui G B, Zeng S J, et al. *In vitro* flowering of orchids[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2014, 34(1):56-76.
- [5]陈达菊,曾瑞珍,杨青,等.建兰与寒兰杂交后代试管花诱导及其形成过程的形态学及细胞学观察[J].热带作物学报, 2015, 36(10):1839-1844.
- [6]Duan J X, Yazawa S. *In vitro* floral development in $\times$ *Doriel-la* Tiny (*Doritis pulcherrima* $\times$ *Kingiella philippinensis*) [J]. Scientia Horticulturae, 1994, 59(3-4):253-264.
- [7]Chang C, Chang W C. Cytokinins promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* *In vitro* [J]. Plant Growth Regulation, 2003, 39(3):217-221.
- [8]Sim G E, Loh C S, Goh C J. High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium* madame thong-in (Orchidaceae) [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26(4):383-393.
- [9]Sim G E, Goh C J, Loh C S. Induction of *in vitro* flowering in *Dendrobium* madame thong-in (Orchidaceae) seedlings is associated with increase in endogenous N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenine (iP) and N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenosine (iPA) levels[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(8):1281-1289.
- [10]Rahman T K B M M. *In vitro* seed germination and flowering of *Dendrobium palpebrae* Lindl. Orchid[J]. Journal of Global Biosciences, 2017, 6(1):4748-4757.
- [11]Khasim S M, Hegde S N, González-Arno M T, et al. Orchid Biology: Recent Trends & Challenges[M]. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2020.
- [12]Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures[J]. Physiologia plantarum, 1962, 15:473-494.
- [13]Deb C R, Sungkumlong. Rapid multiplication and induction of early *In vitro* flowering in *Dendrobium primulinum* Lindl[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2009, 18(2):241-244.
- [14]Kostenyuk I, Oh B J, So I S. Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak *in vitro*[J]. Plant Cell Reports, 1999, 19(1):1-5.
- [15]Kachonpadungkitti Y, Romchatngoen S, Hasegawa K, et al. Efficient flower induction from cultured buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.) node segments *In vitro*[J]. Plant Growth Regulation, 2001, 35(1):37-45.
- [16]Franklin G, Pius P K, Ignacimuthu S. Factors affecting *In vitro* flowering and fruiting of green pea (*Pisum sativum* L.)[J]. Euphytica, 2000, 115(1):65-74.
- [17]Ferreira W M, Suzuki R M, Pescador R, et al. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* second love (Orchidaceae) *In vitro* as affected by sucrose, light, and dark[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2011, 47(3):420-427.
- [18]Zeng S J, Liang S, Zhang Y Y, et al. *In vitro* flowering red miniature rose[J]. Biologia Plantarum, 2013, 57(3):401-409.
- [19]Ziv M, Naor V. Flowering of geophytes *In vitro*[J]. Propagation of Ornamental Plants, 2006, 6(1):3-16.
- [20]Tee C S, Maziah M, Tan C S. Induction of *In vitro* flowering in the orchid *Dendrobium sonia* 17[J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(4):723-726.
- [21]Kerbaui G B. *In vitro* flowering of *Oncidium varicosum* mericlones (orchidaceae)[J]. Plant Science Letters, 1984, 35(1):73-75.
- [22]Hirst P M, Ferree D C. Rootstock effects on the flowering of 'Delicious' apple. II. nutritional effects with specific reference to phosphorus[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1995, 120(6):1018-1024.
- [23]Teixeira Da Silva J A, Yam T, Fukai S, et al. Establishment of optimum nutrient media for *In vitro* propagation of *Cymbidium* Sw. (Orchidaceae) using protocorm-like body segments[J]. Prop. Ornamental Plants, 2005, 5(3):129-136.
- [24]Duan J X, Yazawa S. Floral induction and development in *Phalaenopsis* *In vitro* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 43(1):71-74.
- [25]Lunn J E, MacRae E. New complexities in the synthesis of sucrose[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6(3):208-214.
- [26]Bernier G, Périlleux C. A physiological overview of the genetics of flowering time control[J]. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3(1):3-16.
- [27]Bernier G, Corbesier L, Périlleux C. The flowering process: on the track of controlling factors in *Sinapis alba* [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2002, 49(4):445-450.
- [28]George E F, Hall M A, Klerk G J D. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems[M]//Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008:115-173.
- [29]Park H Y, Kang K W, Kim D H, et al. *In vitro* propagation of *Cymbidium goeringii* Reichenbach fil. through direct adventitious shoot regeneration[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2018, 24(2):307-313.

(下转第 149 页)

- [12] Liu J, Li Z, Hu F, et al. A THz spectroscopy nondestructive identification method for transgenic cotton seed based on GA-SVM[J]. *Optical and Quantum Electronics*, 2015, 47(2): 313-322.
- [13] 吴永清, 唐娜, 黄璐瑶, 等. 可见近红外光谱结合多元统计分析的面粉吸水率检测模型构建[J]. *光谱学与光谱分析*, 2023, 43(9): 2825-2831.
- [14] 许蕾, 朱卫华, 姚红兵, 等. 基于荧光光谱—模拟退火法年份白酒中乙酸浓度预测研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2021, 41(7): 2159-2165.
- [15] 牛芳鹏, 李新国, 白云岗, 等. 遗传算法和连续投影算法结合的土壤有机碳含量高光谱估算模型[J]. *光谱学与光谱分析*, 2023, 43(7): 2232-2237.
- [16] 刘伟, 邓琥, 刘泉澄, 等. 基于太赫兹光谱的乙二醇含水率检测方法研究[J]. *激光与红外*, 2023, 53(10): 1579-1585.
- [17] 蒋萍, 路皓翔, 刘振丙. 随机森林结合 CatBoost 的近红外光谱药品鉴别[J]. *光谱学与光谱分析*, 2022, 42(7): 2148-2155.
- [18] 胡鹏伟, 刘江平, 薛河儒, 等. BP 神经网络结合变量选择方法在牛奶蛋白质含量检测中的应用[J]. *光电子·激光*, 2022, 33(1): 23-29.
- [19] 赵环, 宦克为, 郑峰, 等. 基于变量组合集群分析法的小麦蛋白质近红外光谱变量选择方法研究[J]. *长春理工大学学报(自然科学版)*, 2016, 39(5): 51-54.
- [20] Thijs B, Axel Jan R, Melvin G, et al. Decision trees and random forests[J]. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*; Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics, 2023, 164(6): 894-897.
- [21] Djordjevic D, Cockalo D, Bogetic S, et al. Predicting entrepreneurial intentions among the youth in serbia with a classification decision tree model with the QUEST algorithm[J]. *Mathematics*, 2021, 9(13): 1487.
- [22] 卫辰洁, 王继芬, 曾啸虎. 红外光谱数据融合结合化学计量学无损检测汽车灯罩[J]. *分析测试学报*, 2021, 40(7): 1043-1048.
- [23] Jair C, Garcia-Lamont F, Rodriguez L, et al. A comprehensive survey on support vector machine classification: Applications, challenges and trends[J]. *Neurocomputing*, 2020, 408(7): 189-215.
- [24] Yan C, Zhang T, Sun Y, et al. A hybrid variable selection method based on wavelet transform and mean impact value for calorific value determination of coal using laser-induced breakdown spectroscopy and kernel extreme learning machine[J]. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2019, 154: 75-81.
- [25] Zheng D H, Hong Z, Wang N, et al. An improved LDA-Based ELM classification for intrusion detection algorithm in IoT application[J]. *Sensors*, 2020, 20(6): 1706.

(上接第 142 页)

- [30] Nayak N R, Rath S P, Patnaik S. In vitro propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation[J]. *Scientia Horticulturae*, 1997, 71(3-4): 243-250.
- [31] Chen Y Q, Liu X, Liu Y Q. In vitro plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, 24: 65-71.
- [32] Shimasaki K, Uemoto S. Micropropagation of a terrestrial *Cymbidium* species using rhizomes[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 81: 247-251.
- [33] Jainol J E, Gansau J A. Embryogenic callus induction from leaf tip explants and protocorm-like body formation and shoot proliferation of *Dimorphorchis lowii*: borneon endemic orchid[J]. *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 2016, 39(1): 1-10.
- [34] Singh D K, Babbar S B. In vitro propagation and chemical profiling of *Herminium lanceum* (Thunb. ex Sw.) Vuijk, a medicinally important orchid, for therapeutically important phenolic acids[J]. *Plant Biotechnology*, 2016, 33(3): 153-160.
- [35] 谢娟, 李龙, 邢玥, 等. 墨兰‘吴宇翠’×墨兰‘红花’杂交后代根状茎增殖及芽分化研究[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(5): 985-993.
- [36] 李国平, 杨鹭生. 若干因素对寒兰根状茎诱导、增殖与分化的影响[J]. *赤峰学院学报(自然科学版)*, 2019, 35(8): 26-29.
- [37] Zeng S J, Wu K L, Teixeira Da Silva J A, et al. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 138: 198-209.
- [38] 孙玉芬, 宁惠娟, 张韶伊, 等. 春兰与大花蕙兰杂交后代根状茎增殖与分化条件[J]. *浙江农林大学学报*, 2014, 31(1): 156-161.
- [39] Wang G, Xu Z, Chia T F. In vitro flowering of *Dendrobium candidum* [J]. *Science in China*, 1997, 40(1): 35-42.