

林夏斌,黄华达,黄怀妹,等. 白花拟万代兰(*Vandopsis undulata*)组培苗的增殖、生根与炼苗[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):56-59.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.015

白花拟万代兰(*Vandopsis undulata*)组培苗的增殖、生根与炼苗

林夏斌,黄华达,黄怀妹,彭东辉,翟俊文,吴沙沙

(福建农林大学园林学院,福建福州 350002)

摘要:白花拟万代兰(*Vandopsis undulata*)花大素雅,具芳香,有很高的观赏价值,并有很大的市场前景。为缩短白花拟万代兰从无菌播种到成苗的时间并保证组培苗移栽成活率,以无菌播种获得的白花拟万代兰小苗为材料,合并其增殖和生根阶段最适培养基的筛选,继而对最适移栽基质进行了筛选研究。结果表明,丛生芽增殖的最佳培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA+250 mL/L 椰子汁,平均增殖系数达3.57;丛生芽生根培养的最佳培养基为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+50 mL/L 椰子汁;所用移栽基质中,泥炭土和木屑对白花拟万代兰栽培成活率有显著影响,最优的基质体积配比为:苔藓:泥炭土:珍珠岩:木屑=1:3:2:2。

关键词:白花拟万代兰;组织培养;移栽基质;6-BA;NAA

中图分类号:S682.310.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)02-0056-04

白花拟万代兰(*Vandopsis undulata*)为兰科(Orchidaceae)拟万代兰属典型的热带附生兰,产中国云南南部至西北部(勐海、腾冲和怒江河谷)、西藏东南部(墨脱、背崩),生于海拔1 800~2 200 m的林中树干上,尼泊尔、锡金、不丹和印度东北部也有分布^[1]。在兰科植物中,拟万代兰属约5种,目前,均未实现工厂化生产供应市场,野外资源急需保护和人工扩繁^[2]。白花拟万代兰花大素雅,具芳香,有很高的观赏价值,并有很大的市场前景。拟万代兰属约有5种,中国仅有拟万代兰(*V. gigantea*)和白花拟万代兰2个种。兰科植物单个果实种子量大是其显著优势,利用种子进行大规模繁殖是对保护兰科植物的重要手段^[3]。兰花种子又称种胚,其细如粉尘,只有在显微镜下才能看清,没有胚乳,处于原胚阶段,缺乏营养^[4-5],多数兰科植物依靠其自身营养则难于萌发,因此外源营养对兰花种子的萌发显得尤其重要^[6]。传统的繁殖方式,繁殖系数低、速度慢^[7],不能满足日益增长的市场需要。找到一个快速繁殖种苗的方法对其种质资源的保护和开发利用将具有重要的现实和理论意义。

本试验采用不同培养基配方、栽培基质,对白花拟万代兰增殖、生根及组培苗移栽成活率进行了研究,探讨在无菌培养、移栽过程中不同因素对其成活、生长发育的影响,以期获得最适宜的无菌培养配方和移栽条件,为提高白花拟万代兰的繁殖系数,获得大量优质组培苗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2013年9月,对购自云南腾冲的白花拟万代兰植株上未开裂果荚内的种子进行无菌播种,所用培养基为:MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+8 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖+2 g/L 活性炭。丛生芽的增殖与生根培养材料来源于无菌播种90 d的无根种胚苗。炼苗所用植物材料为生根培养90 d的组培苗。

1.2 试验方法

1.2.1 丛生芽的增殖与生根 以无菌播种90 d后,芽长为0.5~1.0 cm尚未生根的白花拟万代兰小苗为材料,采用L₉(3⁴)正交试验研究不同基本培养基、6-BA、IAA、椰子汁(新鲜椰子汁)对丛生芽增殖和生根的影响(表1)^[8]。每瓶接种7株(图1-A),每个处理30瓶,3次重复。培养条件为:温度(25±2)℃,相对湿度70%~80%,光照度1 000~1 500 lx,光照时间12 h/d。培养30 d后统计增殖数、生根数、叶片数,测量根长,并对每个处理中随机选择的10株植物进行生长状况评分,以1~4分计:1表示植株长势差,增殖数

收稿日期:2015-09-08

基金项目:福建省特色花卉品种创新与种苗设施繁育产业(编号:2014S1477-7)。

作者简介:林夏斌(1990—),男,硕士研究生,主要从事园林植物应用研究。E-mail:xiabinlin1916@126.com。

通信作者:吴沙沙,博士,讲师,从事园林植物资源与应用研究。E-mail:shashawu1984@126.com。

[5]唐新华. 贴梗海棠育苗技术[J]. 林业实用技术,2005(11):24-25.

[6]张秀省,黄勇. 贴梗海棠的栽培及花期调控技术[J]. 农村实用工程技术,2001(10):13.

[7]封丙军. 贴梗海棠乔木化嫁接技术[J]. 农村科技,2007(4):56-57.

[8]邓运川,沙刚. 贴梗海棠的栽培管理[J]. 中国花卉园艺,2010(14):34-35.

[9]陈昱,叶景丰,马冬菁,等. 贴梗海棠组培快繁技术研究[J]. 北方园艺,2008(8):186-187.

[10]袁秀秀,张仙云,马杰. 贴梗海棠组培快繁技术研究[J]. 河南科学,2009(2):175-177.

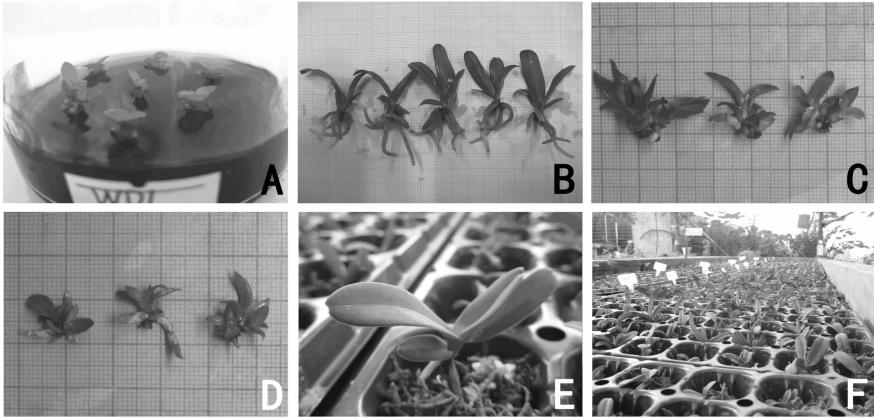
表 1 白花拟万代兰增殖与生根培养基配方正交设计 $L_9(3^4)$

水平	因素			
	A: 基本培养基	B: 椰子汁 (mL/L)	C: 6-BA (mg/L)	D: IAA (mg/L)
1	KC	50	0.5	0.2
2	VW	150	1.0	0.5
3	MS	250	2.0	1.0

少,出现褐化;2 表示长势整齐,但增殖数少或植株欠健壮;3 表示长势整齐,植株根系健壮,茎叶生长良好;4 表示长势整齐,植株健壮,新生芽多而饱满。根据统计分析结果,筛选适合白花拟万代兰丛生芽增殖和生根的最适培养基。

1.2.2 炼苗移栽 将生根壮苗后的组培苗放置于人工气候

箱中进行炼苗,培养条件为:温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照度 $1\,000 \sim 1\,500\text{ lx}$,光照时间 12 h/d 。选择大小适合的组培苗,将其在人工气候箱中闭瓶培养 10 d ,开瓶培养 1 d 后^[9],从培养瓶中取出幼苗,用清水洗净培养基,再用 $1\,000$ 倍 75% 可湿性多菌灵溶液浸泡处理 12 h ,自来水冲洗后备用(图 1-B)。以苔藓、泥炭土、珍珠岩、木屑 4 种基质为 4 个因素,每因素 1、2、3 3 个体积比例作为 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计配置移栽基质研究其对白花拟万代兰组培苗移栽成活率的影响。移栽后置于温室中培养,温室环境条件为:温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照度 $1\,000 \sim 1\,500\text{ lx}$,光照时间 12 h/d , 60 d 后统计白花拟万代兰组培苗移栽成活率。



A—接种;B—炼苗;C—生根;D—丛生芽增殖;E、F—移栽后的培养。

图 1 白花拟万代兰生长发育过程

1.2.3 数据处理方法 用 SPSS 19.0 统计分析软件对数据进行方差分析和多重比较^[10];采用以下公式进行原球茎的增殖系数、生根率、平均根长、平均叶片数的计算。

增殖系数 = 增殖后芽数/接种外植体数^[11];
生根率 = (生根植株总数/接种植株总数) $\times 100\%$;
平均根长 = 所有植株总根长/总根数;
平均叶片数 = 植株叶片总数/总株数。

2 结果与分析

2.1 不同处理对丛生芽增殖的影响

丛生芽增殖试验结果表明,MS 作为基本培养基,添加 1.0 mg/L 6-BA、 0.2 mg/L IAA、 250 mL/L 椰子汁时,丛生芽的增殖系数达到最高水平,为 3.57,且生长状况良好,植株大小整齐,植株根茎健壮,新生芽多(图 1-C)。根据各因素 R 值大小可知,4 种因素对增殖系数的影响强弱表现依次为基本培养基类型 > 椰子汁 > IAA > 6-BA(表 2)。白花拟万代兰丛生芽增殖培养的最佳培养基为:MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA + 250 mL/L 椰子汁;最不理想培养配方为:KC + 2.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L IAA + 250 mL/L 椰子汁。二者的差别在于基本培养基和激素浓度,MS 基本培养基更有利于白花拟万代兰的增殖,适宜的激素浓度有利于白花拟万代兰的增殖,过高的激素浓度反而抑制白花拟万代兰的增殖。

不同处理对白花拟万代兰增殖系数的影响差异较大,6-BA 对白花拟万代兰增殖系数的影响小。方差分析结果,培养基 F 值为 24.902、椰子汁 F 值为 14.016、IAAF 值为

12.319,对白花拟万代兰丛生芽增殖的影响显著,6-BAF 值为 0.081,对丛生芽增殖的影响不显著(表 3)。

表 2 不同培养因素对白花拟万代兰增殖培养的影响

编号	A: 培养基	B: 椰子汁 (mL/L)	C: 6-BA (mg/L)	D: IAA (mg/L)	增殖系数	生长状况打分
1	KC	50	0.5	0.2	1.32	1
2	KC	150	1.0	0.5	1.67	1
3	KC	250	2.0	1.0	1.11	1
4	VW	50	1.0	1.0	1.22	2
5	VW	150	2.0	0.2	2.65	3
6	VW	250	0.5	0.5	2.67	3
7	MS	50	2.0	0.5	2.00	2
8	MS	150	0.5	1.0	2.44	3
9	MS	250	1.0	0.2	3.57	4
k_1	1.37	1.51	2.14	2.51		
k_2	2.18	2.25	2.15	2.11		
k_3	2.67	2.45	1.92	1.59		
R	1.30	0.94	0.23	0.92		

表 3 不同培养基配方方差分析

方差来源	F 值			
	增殖系数	平均根长	平均根数	平均叶片数
培养基	24.902 *	3.137	5.853	19.996 *
椰子汁	14.016 *	16.397 *	2.517	8.341
6-BA	0.081	1.699	0.397	0.254
IAA	12.319 *	0.589	13.138 *	3.938

注: $F_{0.01} = 29.5$; $F_{0.05} = 9.28$; $F_{0.10} = 5.93$; * 表示差异达 0.05 显著水平。

2.2 不同处理对丛生芽生根的影响

从表 4 可以看出,当椰子汁含量为 50 mL/L、IAA 0.5 ~ 1.0 mg/L 时,生根数和根长均达到较高值,当 IAA 浓度低于 0.5 mg/L 时则不利于生根。通过比较 R_a 值可知,不同因素对白花拟万代兰丛生芽根长的影响主次关系依次为:椰子汁 > 基本培养基类型 > 6-BA > IAA。不同因素对白花拟万代兰丛生芽生根数量的影响主次关系依次为:IAA > 基本培养基类型 > 椰子汁 > 6-BA。在基本培养基为 VW,添加 1.0 mg/L 6-BA、1.0 mg/L IAA、50 mL/L 椰子汁的培养基中,白花拟万代兰组培苗平均根长最长,为 0.48 cm。当基本培养基为 KC、6-BA 质量浓度达到 2.0 mg/L、IAA 质量浓度达到 1.0 mg/L、椰子汁浓度达到 250 mL/L 时,平均生根数达最多,为 2 条(图 1-D)。白花拟万代兰生根培养的最佳配方处理为:MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+50 g/L 椰子汁。

不同处理对白花拟万代兰丛生芽生根数量的影响差异较大,6-BA 对白花拟万代兰丛生芽生根的影响最小。方差分析表明,椰子汁 F 值为 16.397,对丛生芽根长的影响显著;IAA F 值为 13.138,对丛生芽生根的影响显著;6-BA F 值为 0.397,对丛生芽根长的影响不显著(表 3)。椰子汁对白花拟万代兰丛生芽新生根系数量有一定的促进作用。

表 4 不同培养因素对增殖培养的花白拟万代兰诱导根生长的影响

编号 A:培养基	B:椰子汁 (mL/L)	C:6-BA (mg/L)	D:IAA (mg/L)	平均根长 (cm)	生根数 (条)
1	KC	50	0.2	0.30	1.2
2	KC	150	0.5	0.13	1.5
3	KC	250	1.0	0.26	2.0
4	VW	50	1.0	0.48	1.6
5	VW	150	0.2	0.25	0.5
6	VW	250	0.5	0.25	0.7
7	MS	50	0.5	0.42	1.8
8	MS	150	1.0	0.16	1.7
9	MS	250	1.0	0.18	0.8
k_{a1}	0.23	0.40	0.24	0.24	
k_{a2}	0.33	0.18	0.26	0.27	
k_{a3}	0.25	0.23	0.31	0.30	
k_{b1}	1.54	1.55	1.18	0.83	
k_{b2}	0.95	1.21	1.30	1.33	
k_{b3}	1.44	1.17	1.44	1.77	
R_a	0.10	0.22	0.07	0.06	
R_b	0.59	0.38	0.26	0.94	

注: K_a 表示平均根长, K_b 表示生根数。

2.3 不同处理对叶片数量的影响

根据各因素 R 值大小可知,4 种因素对白花拟万代兰叶片数量的影响强弱依次表现为:基本培养基类型 > 椰子汁 > IAA > 6-BA。促进白花拟万代兰植株生长的最佳培养配方处理为:KC+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA+50 mL/L 椰子汁,其平均叶片数量最多,达 3.92(表 5)。方差分析结果,基本培养基类型 F 值为 19.996 对白花拟万代兰长叶影响显著,椰子汁 F 值为 8.341 对白花拟万代兰长叶有一定的作用。

2.4 不同基质对比对白花拟万代兰移栽成活率的影响

炼苗移栽的试验结果(表 6)表明,白花拟万代兰组培苗移栽成活率达 92% 以上。其中 5 个试验组合成活率达 100%

表 5 不同培养因素对白花拟万代兰叶片数量的影响

编号	A:培养基	B:椰子汁 (g/L)	C:6-BA (mg/L)	D:IAA (mg/L)	平均叶片数 (片)
1	KC	50	0.5	0.2	3.92
2	KC	150	1.0	0.5	3.20
3	KC	250	2.0	1.0	3.40
4	VW	50	1.0	1.0	3.64
5	VW	150	2.0	0.2	2.79
6	VW	250	0.5	0.5	2.75
7	MS	50	2.0	0.5	2.61
8	MS	150	0.5	1.0	2.77
9	MS	250	1.0	0.2	2.28
k_1	3.51	3.39	3.15	3.00	
k_2	3.06	2.92	3.04	2.85	
k_3	2.55	2.81	2.93	3.27	
R	0.96	0.58	0.22	0.42	

(图 1-E、图 1-F),所选用的基质对白花拟万代兰的栽培成活均表现出很好的效果,但在栽培试验过程中有一部分植株出现了烂根现象。根据各因素 R 值大小可知,4 种因素对白花拟万代兰栽培成活率的影响强弱依次表现为泥炭土 > 木屑 > 苔藓 > 珍珠岩。

表 6 不同基质对白花拟万代存活率的影响

编号 A:苔藓	B:泥炭土	C:珍珠岩	D:木屑	成活率 (%)	$X = \arcsin \sqrt{P}$
1	1	1	1	98	78.52
2	1	2	2	100	90.00
3	1	3	3	100	90.00
4	2	1	2	96	73.74
5	2	2	3	92	66.93
6	2	3	1	100	90.00
7	3	1	3	100	90.00
8	3	2	3	96	73.74
9	3	3	1	100	90.00
k_1	86.17	80.75	80.75	78.48	
k_2	76.89	76.89	84.58	90.00	
k_3	84.58	90.00	82.31	79.16	
R	9.28	13.11	3.83	11.52	

方差分析结果(表 7)表明,泥炭土 F 值为 12.255、木屑 F 值为 11.278,对白花拟万代兰假植成活率的影响显著,苔藓 F 值为 6.654、珍珠岩 F 值为 0.150,对白花拟万代兰假植成活率的影响不显著。最优的基质体积配比为苔藓:泥炭土:珍珠岩:木屑=1:3:2:2。

表 7 各基质配方方差分析

方差来源	F 值(成活率)
苔藓	6.654
泥炭土	12.255 *
珍珠岩	0.150
木屑	11.278 *

注: $F_{0.01} = 29.5$; $F_{0.05} = 9.28$; $F_{0.10} = 5.93$; * 表示差异达 0.05 显著水平。

3 结论与讨论

目前,国内还没有对白花拟万代兰的组培进行系统的研

究,对拟万代兰属的相关研究也很少。本试验与常规的兰花组织培养相比,将增殖培养和生根培养同时进行,所筛选的培养基配方对白花拟万代兰增殖和生根均有较好的效果,从而缩短了白花拟万代兰成苗的时间。白花拟万代兰为附生兰,主要通过其特有的气生根,从空气中吸收水分和营养元素,或从根周围的残存物质中吸收水分和营养,为适应附生生活,减少水分损耗,它们一般都具有由茎的一部分膨大而形成的肉质假鳞茎,叶片革质^[12]。附生兰科植物不仅对附生环境要求严格,而且多数生长缓慢,每个生长轴1年中仅产生1个芽,需要较长的时间才能进入成熟繁育期^[13]。

基本培养基 MS、1/2MS、VW、BS、KC 及它们的改良型已经普遍应用于兰花的组织培养中^[14]。在蝴蝶兰的组织培养中,相关学者认为,采用 1/2MS 基本培养基较适合蝴蝶兰的生长^[15]。激素对诱导植株再生和增殖有显著的影响^[16-17], IAA 能够钝化体细胞的形成,抑制体细胞胚的形成^[18],椰子汁含有多种营养和激素,经过高压灭菌后与兰花组培培养基的其他活性物质相容性高,能够刺激愈伤组织或者原球茎的形成,提高细小片段外植体的存活率,调整兰花花芽和类原球茎的分化过程^[19]。本试验结果表明,基本培养基类型、IAA、椰子汁对白花拟万代兰丛生芽增殖的影响显著。试验筛选出适宜丛生芽增殖的培养基为 MS + 6 - BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L + 椰子汁 250 mL/L。

有机物和天然物质如椰子汁、土豆泥、香蕉匀浆等已经被普遍用于兰花组培中。在许多兰花品种的培养基中加入有机添加剂(如椰子汁、土豆泥、香蕉匀浆)对兰花生长增殖有促进作用^[20]。本试验结果表明,椰子汁对丛生芽根长的影响显著,与李正民等对蝴蝶兰的研究结果^[21]相似。试验筛选出适宜丛生芽生根培养的培养基为 MS + 6 - BA 2.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L + 椰子汁 50 g/L。

白花拟万代兰的根为肉质根,因而需要栽培基质透水性好,且具有一定保水保肥能力,容易进行灭菌处理,组培苗移栽还要根据兰花的品种选用适宜的植料^[22]。栽培试验过程中出现一部分植株烂根现象,可能与栽培植料的持水性过高有关,与杨振华对蝴蝶兰栽培基质的研究^[23]相似。试验结果表明,泥炭土、木屑对白花拟万代兰栽培成活率的影响显著,最优的基质体积配比为:苔藓:泥炭土:珍珠岩:木屑 = 1:3:2:2。

参考文献:

- [1] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书[M]. 2版. 北京:中国林业出版社,1997:220.
- [2] Yonzon R, Lama D, Bhujel R B, et al. Epiphytic orchid species diversity of Darjeeling Himalaya of West Bengal India[J]. Asian Journal of Pharmacy and Life Science, 2011, 1(4): 449 - 465.

- [3] 罗毅波,贾建生,王春玲. 初论中国兜兰属植物的保护策略及其潜在资源优势[J]. 生物多样性, 2003, 11(6): 491 - 498.
- [4] 郭顺星,徐锦堂. 兰科植物种子无菌萌发的研究[J]. 种子, 1990(5): 36 - 37, 58.
- [5] Yam T W, Arditti J. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology[J]. Plant Biotechnology Reports, 2009, 3(1): 1 - 56.
- [6] 明兴加,张笑逸,伍淳操,等. 兰科植物种子的营养萌发[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2012, 14(5): 2077 - 2081.
- [7] 安运华. 兰花组织培养研究进展[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(1): 122 - 124.
- [8] 洪伟,吴承祯. 试验设计与分析——原理·操作·案例[M]. 北京:中国林业出版社, 2004: 95 - 115.
- [9] 陈勇,林开县,王君晖. 蝴蝶兰的快速繁殖和规模化栽培技术研究[J]. 浙江大学学报:理学版, 2004, 31(1): 84 - 87, 97.
- [10] 张力. SPSS 在生物统计中的应用[M]. 厦门:厦门大学出版社, 2008: 68 - 71.
- [11] 卓孝康,兰思仁,彭东辉,等. 大苞鞘石斛胚组织培养及植株再生研究[J]. 福建林学院学报, 2014, 34(4): 289 - 296.
- [12] 刘广福,臧润国,丁易,等. 海南霸王岭不同森林类型附生兰科植物的多样性和分布[J]. 植物生态学报, 2010, 34(4): 396 - 408.
- [13] Zotz G. Demography of the epiphyte orchid, *Dimerandra emarginata* [J]. Journal of Tropical Ecology, 1998, 14: 725 - 741.
- [14] 汤久顺. 蝴蝶兰组织培养与花期调控技术研究[D]. 扬州:扬州大学, 2008.
- [15] 王玲,陈发棣,陈凤,等. 不同培养基及不同添加物对蝴蝶兰花梗芽增殖生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(1): 56 - 57, 103.
- [16] 杨冉,黄萍,祁珊珊,等. 柳枝稷种子组培快繁技术[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 46 - 48.
- [17] 于红梅,赵密珍,钱亚明,等. 海沃德猕猴桃带芽茎段的组织培养快繁技术[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 78 - 79.
- [18] Chen J T, Chang W C. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey' [J]. Plant Growth Regulation, 2001, 34(2): 229 - 232.
- [19] Chugh S, Guha S, Rao I U. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 122(4): 507 - 520.
- [20] 刘仲健,张玉婷,王玉,等. 铁皮石斛(*Dendrobium catenatum*)快速繁殖的研究进展——兼论其学名与中名的正误[J]. 植物科学学报, 2011, 29(6): 763 - 772.
- [21] 李正民,王安石,王健. 蝴蝶兰组织培养研究进展[J]. 广东农业科学, 2012, 39(15): 19 - 22.
- [22] 李丽容,郑德龙,卢松茂,等. 提高兰花组培苗移栽成活率的技术研究[J]. 福建热作科技, 2009, 34(2): 12 - 14.
- [23] 杨振华. 蝴蝶兰栽培基质的研究[D]. 北京:北京林业大学, 2008.