

田凡,颜凤霞,姜运力,等.带叶兜兰种子无菌萌发及试管成苗技术研究[J].江苏农业科学,2017,45(9):30-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.008

带叶兜兰种子无菌萌发及试管成苗技术研究

田凡,颜凤霞,姜运力,王莲辉
(贵州省林业科学研究院,贵州贵阳 550005)

摘要:为初步建立带叶兜兰组织培养快速繁殖体系,对带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)成熟种子进行无菌萌发、原球茎分化及根诱导研究。结果表明:有机添加物香蕉对原球茎的诱导与分化有较好的促进作用;培养基配比为:1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2.0%葡萄糖+0.5%琼脂+0.05%活性炭,对原球茎的诱导和增殖有明显的促进作用;不同浓度配比的6-BA和NAA对芽增殖影响不明显,但低浓度的NAA对芽的分化影响显著;1/2 MS+IBA 0.2 mg/L对带叶兜兰的根诱导效果最为理想;碎树皮为栽培基质的移栽成活率达96%。

关键词:带叶兜兰;无菌萌发;快繁;试管成苗;培养基

中图分类号:S682.310.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)09-0030-04

兜兰属(*Paphiopedilum*)隶属于兰科(Orchidaceae)植物,主要分布于我国贵州、广西和云南^[1]。兜兰具有很高的观赏价值,十分珍贵,野生资源遭到过度采掘,已经到了濒临灭绝的边缘,被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》的保护对象^[2]。兜兰种子没有胚乳,在自然环境中须与真菌共生才能萌发,且萌发率极低^[3]。而兜兰的克隆增殖是世界性难题,即使能诱导出愈伤组织或幼芽,增殖率仍很低^[4]。目前,利用种子非共生无菌萌发成苗是兜兰植物规模化快繁的唯一途径,是解决其保育问题的重要手段。

带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)是兜兰属地生或半附生草本植物,是兰科中最原始的类群之一,株形娟秀,花朵造型独特,花期持久,被誉为兜兰中的“美娇娘”^[5]。目前,关于兜兰属其他植物的种质保护与无菌苗快繁技术已有很多报道^[6-10],但与带叶兜兰相关的研究鲜有报道^[11-12]。研究了带叶兜兰种子无菌播种与试管快速成苗体系,探讨带叶兜兰组培快繁技术,以期带叶兜兰人工快繁的规模化和产业

化提供科学依据和技术支持,为最终实现带叶兜兰种质资源的保育及可持续开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)植株为贵州省林业科学研究院种质资源。5月盛花期进行人工同种异株授粉(图1);当年9月左右,种子干燥接近成熟,从授粉到蒴果成熟开裂需要120 d左右(图2)。

1.2 试验方法

1.2.1 种子预处理 先将带叶兜兰种子荚流水冲洗5 h后移入超净工作台,用75%乙醇浸泡10 min,0.1%次氯酸钠浸泡15 min,后用无菌水冲洗3~5次。用无菌滤纸吸干多余水分,切开种皮,将种子撒落在所配制的各种固体琼脂培养基上。

1.2.2 培养基 以1/2 MS为基本培养基。培养基中加葡萄糖30 g/L(生根为20 g/L)和琼脂6 g/L作为固定剂,加热完全融化后调至pH值5.2~5.4,分别装40 mL到培养瓶中,用瓶盖封口,每一个处理接种15~20瓶,放在蒸汽高压锅(120℃,20 min)内灭菌,室温冷却后待用。

1.2.2.1 不同有机添加物对原球茎诱导与分化的影响 将种子分别接种到5种培养基:(M1)1/2MS+10%马铃薯+2.0%葡萄糖+0.4%琼脂+0.1%活性炭;(M2)1/2MS+10%椰乳+2.0%葡萄糖+0.4%琼脂+0.05%活性炭;(M3)

收稿日期:2016-01-30

基金项目:贵州省科技厅农业攻关项目(编号:黔科合NY字[2010]3029号);贵州省林业厅青年人才基金(编号:黔林科合J[2013]2号)。

作者简介:田凡(1985—),女,贵州铜仁人,硕士,助理研究员,主要从事兰科植物保育研究。E-mail:tianfan850507@126.com。

通信作者:王莲辉,研究员,主要从事兰科植物保育及快繁技术研究。E-mail:gzwanglianhui@163.com。

根生成,在不添加任何激素的MS培养基中能较好生根;直接用花泥进行瓶外生根,生根率达到90%以上。生产上,可以采用此法,降低生产成本,缩短育苗时间。

参考文献:

- [1]史建林,曹骏.长寿花栽培养护技术[J].上海农业科技,2012(2):94-94.
- [2]贺爱利,黄海帆.长寿花组织培养研究进展[J].河南农业,2012(14):44-45.

- [3]颜俊.长寿花品种选择与盆花生产[J].中国花卉园艺,2005(16):12-15.
- [4]林玉玲,赖钟雄,林菁,等.4个品种长寿花试管苗的增殖与生根培养[J].热带作物学报,2007,28(2):80-86.
- [5]孙利娜.长寿花嫩叶片的组织培养研究[J].西部林业科学,2011,40(2):48-51.
- [6]孙新政,李庆伟,梁明勤.白花长寿花组培快繁技术研究[J].中国农学通报,2006,22(3):39-42.
- [7]刘红美,夏开德,方小波,等.长寿花高繁殖组培体系及瓶外生根技术[J].安徽农业科学,2010,38(12):6112-6115.



图1 带叶兜兰果实



图2 种子萌发为原球茎

1/2MS + 10% 香蕉 + 2.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭; (M4) 1/2MS + 10% 苹果汁 + 2.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭; (M5) 1/2MS + 15% 椰乳 + 2.0% 葡萄糖 + 0.4% 琼脂。

1.2.2.2 不同浓度 6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 简称 6-BA) 和萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, 简称 NAA) 对芽增殖分化的影响 前期试验分别对 6-BA、NAA 进行激素组合及配比试验, 筛选增殖分化有效培养基配方: (N1) 1/2MS + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 1.0 mg/L + 2.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭; (N2) 1/2MS + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 2.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭; (N3) 1/2MS + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭; (N4) 1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + 0.1 mg/L NAA + 2.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭; (N5) 1/2MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭。

1.2.2.3 不同浓度 6-BA、NAA 及有机添加物对芽增殖分化的影响 (L1) 1/2MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 3.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭 + 10% 马铃薯; (L2) 1/2MS + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 3.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭 + 10% 马铃薯; (L3) 1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 3.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭 + 10% 马铃薯; (L4) 1/2MS + NAA 0.1 mg/L + 3.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭; (L5) 1/2MS + NAA 0.1 mg/L + 3.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭 + 10% 马铃薯; (L6) 1/2MS + NAA 0.01 mg/L + 3.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭 + 5% 椰乳。

1.2.2.4 生根培养基 设置 3 种不同激素的生根培养基: (B1) 1/2MS + 吲哚丁酸(indole-3-butyric acid, 简称 IBA) 0.2 mg/L; (B2) 1/2MS + NAA 0.2 mg/L; (B3) 1/2MS + IAA

0.4 mg/L。将分化出具有 2~3 张叶、高 1.5 cm 左右的小苗从培养瓶中取出转入生根壮苗培养基 B1~B3 上。

1.2.3 培养条件

1.2.3.1 种子萌发、原球茎诱导及增殖评价方法 培养室温度维持在 23~25 ℃ 之间。接种后先暗培养 3 周, 观察种子吸胀膨大, 有白色原球体长出, 每个处理随机调查 50 粒种子。萌发后置于光照强度 1 500~2 000 lx, 12 h/d。待种子萌发后, 观察原球茎转绿, 有叶原基出现, 以白色的原球茎膨大到转绿色小芽的多少统计萌发率(图 3、图 4)。种子在培养基上培养 3 个月后, 调查萌发数(由于种子极其细小且数量很大, 很难记数, 因播种方法一致, 每瓶播种的种子数量可视为一致, 所以本研究只统计每瓶萌发的种子数量)。根状茎切段在增殖培养基中培养 60 d 后调查增殖情况。每种处理调查 50 个外植体, 对调查结果进行差异显著性分析。



图3 带叶兜兰瓶苗移栽



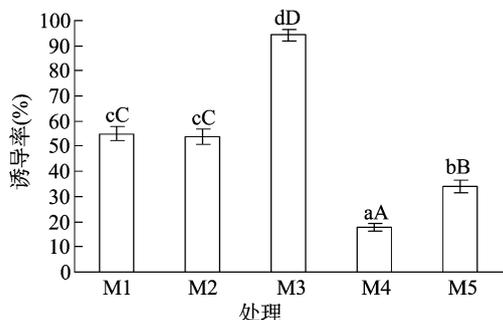
图4 带叶兜兰开花植株

1.2.4 炼苗与移栽 将瓶苗从培养室(恒温室)移至与外界相通的室内放置 1 d 后, 去瓶盖炼苗 3~7 d(培养基有轻微污染)后, 洗净瓶苗根部的培养基, 用稀释 1 000 倍的甲基硫菌灵或多菌灵浸泡组培苗根部, 放置于通风阴凉处晾干水分至根系发白变软, 即可用于移栽。选择碎树皮、泥炭土、田园土 3 种基质为瓶苗栽培基质。

2 结果与分析

2.1 有机添加物对带叶兜兰原球茎诱导与分化的影响

在兰科植物的无菌播种过程中, 添加适量的不同有机添加物, 通常会促进植物的生长与发育。试验选用马铃薯、椰乳、香蕉、苹果汁对带叶兜兰原球茎进行对比试验。由图 5 可知, 在培养基中添加香蕉对带叶兜兰的种子萌发均具有显著的促进作用, 种子萌发率达 95%, 且均变绿; 由图 6 可知, 添加马铃薯和香蕉的培养基中, 原球茎的褐化率都较低, 彼此间没有显著差别; 由图 7 可知, 在添加了香蕉的培养基中, 兜兰原球茎分化率略大于其他 3 种添加物。可见, 香蕉对带叶兜



图中不同大、小写字母表示在0.01、0.05水平上差异显著,采用SPSS 17.0中s-n-k模块利用皮尔逊系数双侧检验,下图同

图5 不同有机添加物对原球茎诱导率的影响

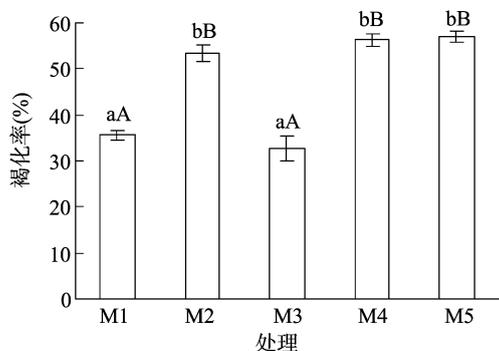


图6 不同有机添加物对原球茎褐化率的影响

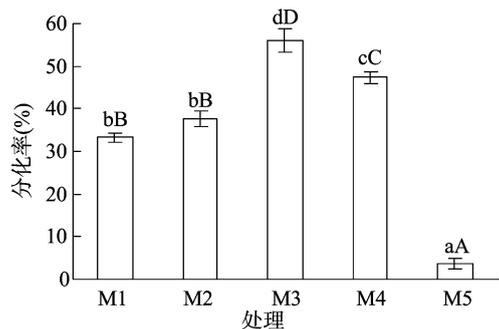


图7 不同有机添加物对原球茎分化率的影响

兰原球茎诱导与分化具有促进作用,生长状况最好。

2.2 植物生长调节剂对芽增殖分化的作用

由图8可知,不同浓度配比的6-BA和NAA对带叶兜兰芽的增殖率影响差异不显著,增殖率均在40%~48%;但是,不同浓度培养基对芽分化率的影响差异显著。由图9可知,N4培养基在5个培养基激素配对比组中,具有显著促进分化作用。结果表明,5个不同浓度配比的培养基均具有增殖作用,但是增殖效果不明显,不具有差异性,但是以6-BA 1.0 mg/L和NAA 0.1 mg/L为浓度的培养基(N4)对分化具有明显促进作用,分化率达48%,而N2培养基的芽分化率只有5%,说明高浓度的6-BA和低浓度的NAA利于其分化。为了更好地促进芽的增殖与分化,本试验设计了不同有机添加物和6-BA及NAA浓度对芽褐化与分化的影响的处理(图10、图11)。由图10可知,N5和N6培养基的褐化率最低,只有27%,处理中NAA浓度分别为0.1、0.01 mg/L,都是低浓度,说明低浓度的NAA利于芽的分化。

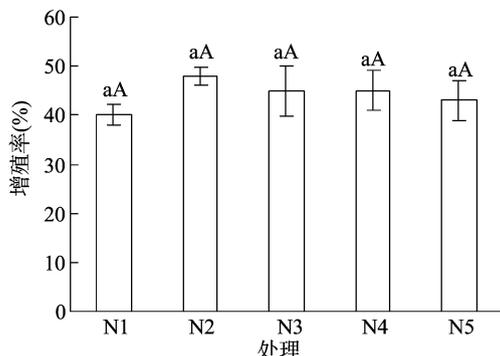


图8 不同浓度6-BA和NAA对芽增殖率的影响

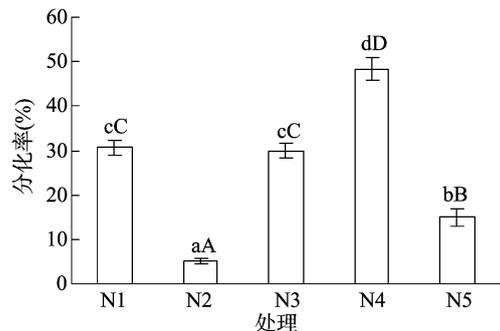


图9 不同浓度6-BA和NAA对芽分化率的影响

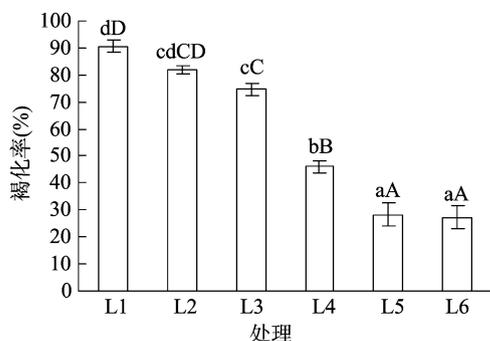


图10 不同浓度6-BA、NAA及有机添加物对芽褐化率的影响

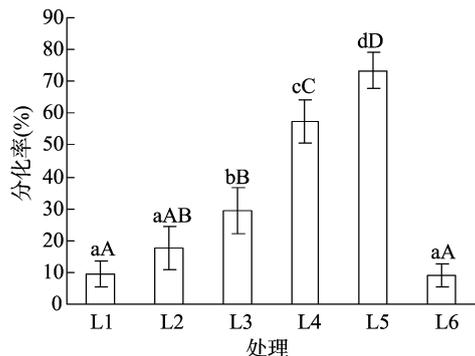


图11 不同浓度6-BA、NAA及有机添加物对芽分化率的影响

2.3 植物生长调节物质对壮苗生根培养的影响

本试验将分化出具有3~4张叶、高2 cm左右的小苗从培养瓶中取出,分别转入不同激素及浓度配比的培养基上进行生根诱导。结果表明,诱导生根率达89%及其以上,但生根数量、生长长度及长势之间有一定的差异。从表1可知,培养基B2的生根率最高,达到95%,但植株根系长势弱,部分

叶片偏黄;培养基 B3 中根系较细;培养基 B1 植株生长健壮,根系健壮,12 周后长成 3~4 条肉质根。所以,IBA 所用浓度为 0.2 mg/L 作为生根诱导壮苗培养基最好。

表 1 不同激素对诱导生根的影响

| 序号 | 基本培养基 | 不同激素浓度(mg/L) | 接种数(株) | 生根数(株) | 生根率(%) |
|----|-------|--------------|--------|--------|--------|
| B1 | 1/2MS | IBA 0.2 | 200 | 186 | 93 |
| B2 | 1/2MS | NAA 0.2 | 200 | 190 | 95 |
| B3 | 1/2MS | IAA 0.4 | 200 | 178 | 89 |

2.4 不同栽培基质对带叶兜兰成活率的影响

栽培时先将栽培基质和腐殖土混合放入栽培容器内,深度达容器的 1/3 高,将长出 4~5 张叶片、根长 2 cm 以上并具有 3~4 条根的兜兰幼苗放入栽培容器内,用碎树皮及苔藓将苗的根颈部以下填实,让容器和栽培基质紧密接触。带叶兜兰根系最忌通气不良和积水,盆栽和苗床上种植时,床下部须垫一层颗粒状的小石块,以利排水。每 2~3 周追施 1 次液体肥料,秋末气温降低后停止施肥。从表 2 可知,植株在田园土的适应过程较慢,碎树皮栽培基质的移栽成活率最高,达 97%,最适合带叶兜兰试管苗的生长(图 4)。

表 2 不同栽培基质对带叶兜兰幼苗成活率的影响

| 序号 | 栽培基质 | 栽植数(株) | 成活数(株) | 成活率(%) |
|----|------|--------|--------|--------|
| 1 | 碎树皮 | 200 | 194 | 97 |
| 2 | 泥炭土 | 200 | 138 | 69 |
| 3 | 田园土 | 200 | 124 | 62 |

3 结论与讨论

兜兰是兰科植物中极具开发价值的重点保护种群之一^[13],以往的研究表明,带叶兜兰是萌发较为困难的种类之一,通过综合各试验阶段,快速获得大量带叶兜兰无菌试管苗,初步建立一套完整的带叶兜兰组织培养快速繁殖体系,为进一步开发利用带叶兜兰奠定基础。

培养基的盐分组成和浓度是影响兜兰种子萌发的重要因素^[14],已报道的大部分兜兰种类在高盐浓度 MS 培养基上萌发均受到抑制,而在 1/2、1/4 的 MS 培养基上较为适宜。由于兜兰种类的不同最终选用的培养基类型也就不同,本试验中带叶兜兰在 1/2MS 培养基中萌发最佳,此结果和其他兜兰属植物相吻合。但在播种过程中,要注意种子的成熟度、无菌播种等因素,以免造成种子发芽率低。培养基中添加适当的有机物椰乳、香蕉、马铃薯和活性炭等均有利于兰科植物种子的萌发和生长。一般认为,在培养基中加入适量的椰乳对种子萌发有促进作用^[15],添加马铃薯对兜兰种子萌发也有较明显的促进作用,且原球茎的颜色呈浓绿色,而香蕉泥对兜兰种子的萌发反而有抑制作用^[16]。

本试验以成熟种子为外植体,研究以 1/2MS 为基本培养基,添加不同激素配比和有机物对带叶兜兰的种子萌发、原球茎及芽增殖、分化和生根诱导的影响,从中筛选出适合各个培养阶段的培养基配方。结果表明:添加有机物香蕉的培养基对种子萌发有显著促进作用;在原球茎继代增殖阶段,NAA

和 6-BA 组合对原球茎继代增殖的作用显著,通过 NAA 及 6-BA 浓度配比试验,以 6-BA 与 NAA 浓度比为 10:1 时效果最佳,即原球茎继代增殖培养基为:1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2.0% 葡萄糖 + 0.5% 琼脂 + 0.05% 活性炭;在芽增殖及分化阶段,不同浓度配比的 6-BA 和 NAA 对芽增殖影响不明显,但低浓度的 NAA 对芽的分化影响显著;在生根诱导培养基阶段,以 1/2MS 为主的基本培养基,IBA 浓度为 0.2 mg/L 时生根效果最好,植株生长健壮,说明低浓度的 IBA 有利于根的生长。这与前期试验中白花兜兰种子无菌萌发及试管成苗研究中的生根诱导试验结果一致^[17]。在不同栽培基质对带叶兜兰移栽成活率的影响试验中,碎树皮的移栽成活率达 97%,生根整齐,长势良好。

参考文献:

- [1] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京:中国林业出版社,1997:255-256.
- [2] 王贞,丛磊,刘燕. 兜兰属植物研究现状[J]. 林业科学,2006,42(7):113-119.
- [3] 曾宋君,陈之林,吴坤林. 兜兰无菌播种和组织培养研究进展[J]. 园艺学报,2007,34(3):793-796.
- [4] Arditti J. Orchid biology: reviews and perspective II [M]. Ithaca: Cornell University Press,1982:352.
- [5] 沐建华. 文山州兜兰属植物多样性研究[J]. 文山学院学报,2010,23(3):124-131.
- [6] 丁长春,虞泓,刘方媛,等. 杏黄兜兰胚培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2006,41(1):55.
- [7] 曾宋君,陈之林,段俊. 带叶兜兰的无菌播种和离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2006,42(2):247.
- [8] 曾宋君,陈之林,吴坤林,等. 彩云兜兰的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2009,45(10):10-11.
- [9] 王莲辉,姜运力,余金勇,等. 同色兜兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2008,44(6):1171-1172.
- [10] 王莲辉,姜运力,余金勇,等. 长瓣兜兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2009,45(9):887-888.
- [11] 曾宋君,陈之林,段俊. 带叶兜兰的无菌播种和离体快速繁殖[J]. 植物生理学报,2006,42(2):247.
- [12] 尤佳妍. 几种兜兰的种胚发育及无菌萌发研究[D]. 北京:北京林业大学,2014.
- [13] 丁长春,李蕾,夏念和. 硬叶兜兰的无菌播种和试管成苗[J]. 北方园艺,2011(5):115-117.
- [14] Lee N, Lee Y I. Effect of capsular maturity, medium composition and liquid culture on seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum* spp.: *Paphiopedilum* in Taiwan II [M]. Taiwan: Paphiopedilum Society, 1999:10-12.
- [15] 陈之林,叶秀,梁承邨,等. 杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子试管培养[J]. 园艺学报,2004,31(4):540-542.
- [16] 李勇毅,李晖. 果荚成熟度、培养基成分与液体培养对芭菲丽鞋兰属之 *Paphiopedilum primulinum* 种子发芽之影响[J]. 中国园艺,2001,47(2):147-156.
- [17] 田凡,姜运力,罗在柒,等. 白花兜兰种子无菌萌发及试管成苗技术研究[J]. 贵州林业科技,2014,42(3):34-38.