

# 胼胝兜兰的组培快繁技术研究

周 丽<sup>1</sup>, 邓克云<sup>2</sup>, 魏春杰<sup>2</sup>

(1. 兴义民族师范学院, 贵州 兴义 562400; 2. 黔西南州绿缘动植物科技开发有限公司 贵州 兴义 562400)

**摘 要:** 胼胝兜兰种子在自然条件下萌发困难, 自然更新能力差。现采用人工授粉的种子, 进行了非共生萌发研究。结果表明: 270 d 胚龄的种子萌发率高 ( $>95\%$ ); 种子萌发最佳培养基为  $1/2\text{RE} + \text{CM}$  100 mL/L + 椰粉 12 g/L + 香蕉泥 70 g/L + 蔗糖 20 g/L + 琼脂粉 5 g/L; 壮苗培养基以  $\text{MS} + \text{NAA}$  1.0 mg/L +  $\text{BA}$  0.4 mg/L + 椰粉 12 g/L + 香蕉 70 g/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂粉 5 g/L 为好, 小苗用松树皮移栽效果好, 移栽成活率  $95\%$  以上。

**关键词:** 种子; 非共生萌发; 培养基; 原球茎

**中图分类号:** S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)24-0154-03

兜兰是兰科兜兰属 (*Paphiopedilum*) 植物, 又称拖鞋兰。主要分布于东南亚至喜马拉雅山至中国西南部, 少数种类到达新几内亚和所罗门群岛。兜兰属所有种属于“野生动植物濒危物种国际贸易公约”(CITES) 附录 I 的保护对象, 目前共有 79 个野生种记录在案<sup>[1]</sup>, 中国野生兜兰也达到 18 种。兜兰叶形秀美, 开花期长, 花朵艳丽, 花形奇特, 具有硕大的兜形唇瓣, 观赏价值极高。由于过度采集、走私猖獗及生长环境受破坏等原因, 近年来数量急剧减少, 濒临灭绝。大力开展兜兰的专业性调查与考察, 利用现代生物学技术对兜兰进行繁育、保育、杂交等将有利于野生资源的有效保护, 为兜兰的回归自然做准备。

胼胝兜兰 (*Paphiopedilum callosum* (Rehb. f.) Stein) 分布于柬埔寨、老挝、越南及中国南部。胼胝兜兰花型美丽端庄, 是“魔帝”类兜兰品种的亲本之一, 种子为分化不完全的胚性细胞团, 无胚乳提供萌发所需营养, 在自然环境中要与真菌共生才能萌发, 自然繁殖系数极低, 人工无菌播种难度较大, 该试验经过对培养基和种子胚龄筛选, 使其播种萌发率在  $95\%$  以上, 并且得到的原球茎能顺利增殖、分化成健壮小苗, 对资源的保护和合理开发利用提供参考, 为兜兰快速繁殖和商业化生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**第一作者简介:** 周丽 (1978-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事观赏和药用兰科植物的快繁保育和杂交育种研究工作。E-mail: zhoulixix@yahoo.com.cn。

**基金项目:** 贵州省教育厅自然科学基金资助项目 (黔教科 2008095)。

**收稿日期:** 2010-10-11

胼胝兜兰大棚内盆栽植株, 人工授粉后剪取种子。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体消毒** 剪刀剪取授粉后生长时间不同的果实, 洗洁精清洗表面后自来水冲洗,  $75\%$  酒精表面消毒 30 s, 浸入  $95\%$  酒精中 1 s, 取出后于酒精灯上点燃, 待表面酒精烧尽即可 (注意不要在酒精灯上烤)。在灭菌滤纸上剖开果实, 取出种子接种于萌发培养基上。

**1.2.2 胚龄对种子萌发的影响** 兰花种子中的胚未完全分化, 没有子叶或胚乳等营养物质供种子萌发, 在胚发育的不同时期进行胚抢救, 萌发率的高低会有所不同。定期取授粉后 6、7、8、9、10 个月的种子显微镜下观察种子情况并播种, 寻找种子萌发的最佳胚龄。

**1.2.3 萌发培养基** 以 Robert Ernst (简称 RE) 为基本培养基,  $1/2\text{RE}$  加入 20 g/L 蔗糖、5 g/L 琼脂粉, 椰粉 12 g/L,  $\text{CM}$  (椰子乳) 100 mL/L, 去皮香蕉 70 g/L, pH 5.8 采用 BA 与 NAA 不同剂量组合配制成萌发培养基 (表 2)。在不同培养基配比中, 用胚龄为 270 d 的种子为材料, 为减少误差将所有果实内的种子取出混匀后播种。启动萌发时间以肉眼可见培养基上种子有明显膨大的原球体为准, 播种 70 d 后统计萌发率。

**1.2.4 增殖培养基** 以 MS 为基本培养基,  $1/3\text{MS} + \text{NAA}$  0.1 mg/L +  $\text{BA}$  0.1 mg/L +  $\text{TDZ}$  0.2 mg/L, 加入  $\text{CM}$  100 mL/L, 香蕉泥 70 g/L, 蔗糖 15 g/L, 琼脂粉 5 g/L、活性炭 0.6 mg/L, pH 5.8。

**1.2.5 生根壮苗培养基**  $\text{MS} + \text{椰粉}$  12 g/L + 香蕉 70 g/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂粉 5 g/L, 在不同的激素配比中寻找最佳组合。

**1.2.6 培养条件** 萌发光照强度为 500 lx, 增殖、生根壮苗时光照强度为 2 000 lx, 光照时间 16 h/d, 培养温度  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

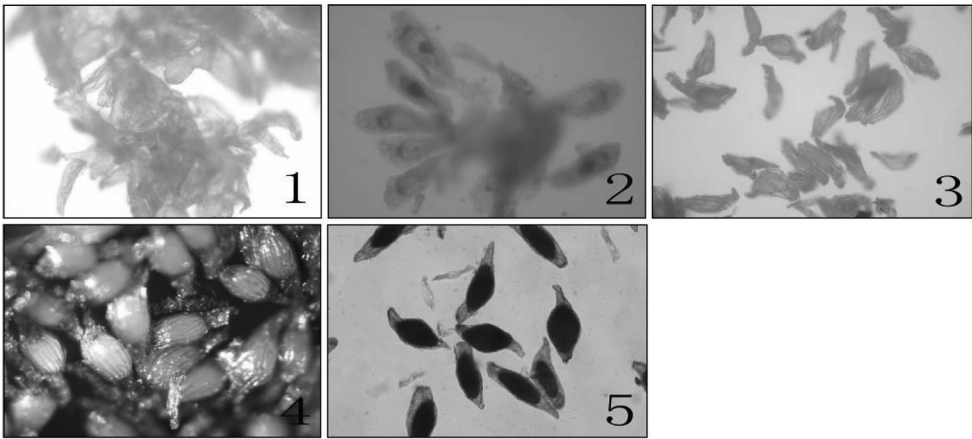


图 1 授粉后不同时间种子的形态  
注: 1. 授粉后 180 d 2. 授粉后 210 d; 3. 授粉后 240 d; 4. 授粉后 270 d 5. 授粉后 300 d.

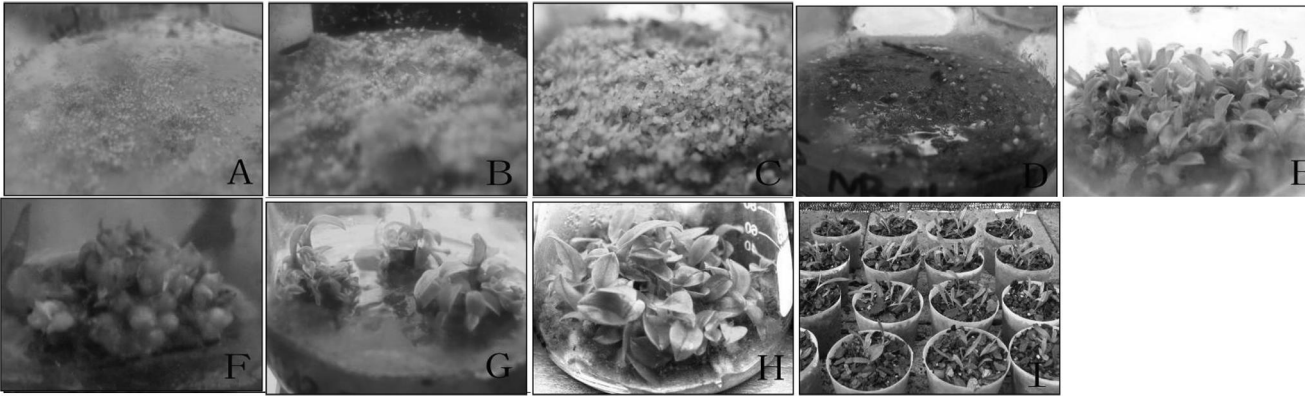


图 2 种子的非共生萌发和试管苗形成  
注: A. 播种 58 d 萌发情况; B. 播种 93 d 形成的原球茎 C. 播种 110 d 原球茎开始分化; D. 播种在 M5 中 110 d 形成的 PLB; E. 播种 206 d 形成的小苗; F. PLB 增殖; G. 增殖后的 PLB 形成小苗; H. 健壮的试管苗; I. 试管苗移栽。

2 结果与分析

2.1 胚龄对杂种萌发的影响

兰科植物的胚, 是一卵形的未分化的细胞团, 不具子叶和胚乳, 缺乏营养物质, 在自然条件下极难萌发<sup>[3]</sup>。自然条件下需要适宜的真菌的感染, 种子从感染的真菌得到了萌发所需的养分才能萌发, 且萌发率很低。采用组培的方法由蔗糖提供能量物质, 在适宜的条件下兰花的种子不需要共生菌也可以萌发。但这个过程对种子发育程度有一定要求。

授粉后不同时期的种子形态(图 1)大不相同, 授粉 180 d 的果实内无种子形成; 授粉 210 d 显微镜下观察到无色透明的空种皮, 极少数种皮内有极小的胚, 播种无萌发迹象; 授粉 230 d 的种子聚生在胎座上, 取下时呈块状, 显微镜下观察可见约 60% 的白色种皮内有不饱满的胚。播种经萌发试验表明后 46 d 开始有萌发, 90 d 后萌发率为 42%; 授粉 270 d 的种子已成熟, 易于从胎座上散落下来, 种皮浅黄褐色, 胚白色, 充满种皮, 种子有较短

的翅, 98% 为饱满种子, 播种后 30 d 便开始萌发, 90 d 后萌发率大于 95%; 授粉 300 d 的种子充分成熟, 种皮呈深褐色, 播种后 76 d 才开始萌发, 90 d 后萌发率仅有 20%。另外, 对于授粉后 230 d 的种子用 0.15 mol/L KOH 处理种皮 10 min 对种子萌发没有促进作用。

表 1 不同胚龄对胼胝兜兰种子萌发的影响

胚龄/ d	起始萌发时间/ d	萌发率/ %
180	—	—
210	—	—
230	46	42
270	30	> 95
300	76	20

2.2 激素组合对种子萌发的影响

由表 2 可知, 在不加任何激素的 M<sub>1</sub> 中具有启动萌发早, 萌发率高, 原球茎呈浅黄色, 早期表面光滑, 后期表面有细绒毛状物产生。随着 NAA 和 BA 浓度添加种子启动萌发时间推迟, 萌发率大大下降。在 M<sub>5</sub> 中萌发时间较晚, 形成的原球茎较大并且易于转绿(图 2-D); 在

M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub> 中萌发时间推迟数量减少,且萌发后形成的原球茎在培养后期易于死亡。

表 2 萌发培养基激素组合及效果

处理	激素组合/ mg · L <sup>-1</sup>		接种瓶数 / 瓶	启动萌发时间 / d	萌发率 / %
	6-BA	NAA			
M <sub>1</sub>	—	—	5	30	95
M <sub>2</sub>	0.4	0.4	5	54	10
M <sub>3</sub>	0.4	1.0	5	56	8
M <sub>4</sub>	1	0.2	5	70	5
M <sub>5</sub>	0.2	0.2	5	52	13

2.3 原球茎的增殖

播种后 110 d 的原球茎已经分化出 2 片子叶,播种后 93 d 的原球茎已有转绿分化的趋向,所以选择播种后 50 d 的原球茎进行增殖试验,因为此时原球茎个体小切割后易于死亡,可采用直接转移的方法转入增殖培养基中进行增殖培养。增殖培养 5 周后即可得到更多的原球茎,此时增殖系数高(图 2-F)。增殖后的原球茎可转入新的培养基中再增殖也可转到壮苗培养基中生根得到健壮试管苗(图 2-G)。

表 3 壮苗培养基对小植株的影响

处理	激素组合/ mg · L <sup>-1</sup>		植株			
	NAA	BA	叶片数/ 片	叶长/ cm	根数/ 条	根长/ cm
R <sub>1</sub>	1.0	0.1	2	0.83	9.30	1.65
R <sub>2</sub>	1.0	0.2	2	1.47	8.57	2.37
R <sub>3</sub>	1.0	0.3	2	2.25	6.28	5.63
R <sub>4</sub>	1.0	0.4	3	2.87	4.29	4.39
R <sub>5</sub>	0.6	0.1	2	1.02	9.21	1.78
R <sub>6</sub>	0.6	0.2	2	2.36	8.59	2.45
R <sub>7</sub>	0.6	0.3	2.5	2.57	7.66	3.75
R <sub>8</sub>	0.6	0.4	3	3.03	5.63	4.62

2.4 激素组合对壮苗生根的影响

将原球茎转入壮苗生根培养基,其表现随着激素组合的不同而有差异,试验表明 NAA 与 BA 的比率对再

生小植株的叶片数量、叶长度、根数量、根长度影响很大。随着培养基中 NAA/BA 的浓度比值增加小苗叶片数和叶片长度减少、根条数增加、根变短。可见较高浓度的 NAA,让原球茎长出过多的较短粗的根,而叶的生长较少,增加 BA 的浓度可使根和叶的生长量相互协调。R<sub>4</sub> 中生长的小苗各方面表现均良好,具有叶片数多,叶片长,根系长,栽培方便,成活率高的特点。

2.5 试管苗移栽

试管苗出瓶前在室温下练苗 1 周,出瓶时要小心不伤根,洗净根表面附着的培养基,用 0.01%高锰酸钾浸泡 3 min,阴凉处晾干表面水分。栽培基质用经消毒处理的颗粒状松树皮,每 14 cm 的小盆中移栽 6~8 株小苗,基质只填充到根茎处 第 1 次浇足水后,1 周内不浇水,经常向小盆周围的地上洒水,保持空气湿度 80%~90%,通风,成活率可达 95%以上。

3 小结

胛胝兜兰种子在授粉后 270 d 直接播种在无激素的 1/2RE 培养基上,萌发率大于 95%,形成的原球茎健壮,有利于增殖成苗。增殖培养基为 1/3MS+NAA 0.1 mg/L+BA 0.1 mg/L+TDZ 0.2 mg/L,壮苗生根培养基中 R<sub>4</sub> 长的小苗壮易于移栽。移栽基质以处理过的颗粒状松树皮为好,透气性好,根系生长良好,成活率高,植株生长量大。该研究实现了胛胝兜兰的快速繁殖,提高了其繁殖系数。

参考文献

[ 1 ] 刘仲健 陈心启 陈利君 等. 中国兜兰属植物[ M ] . 北京: 科学出版社, 2009: 1-3.  
[ 2 ] 胡适宜. 被子植物生殖生物学[ M ] . 北京: 高等教育出版社, 2005: 218-229.

Study on Tissue Culture and Propagation Techniques of *Paphiopedilum callosum*

ZHOU Li<sup>1</sup>, DENG Keyun<sup>2</sup>, WEI Chun-jie<sup>2</sup>

(1. Xingyi Normal University for Nationalities, Xingyi, Guizhou 562400; 2. Southwest Guizhou Luyuan Animal and Plant Technologies Company Limited Xingyi, Guizhou 562400)

**Abstract:** The seeds of *Paphiopedilum callosum* were difficult to germinate under field conditions, which with poor natural regeneration. Investigation of asymbiotic germination were carried out on the seeds of artificial pollination. The results showed that 270-day-embryo-aged-seeds had the highest germination rate; The best medium for germination was 1/2RE+coconut milk 100 mL/L+coconut meat 12 g/L+mashed banana 70 g/L. The strong seeding medium was MS+NAA 1.0 mg/L+BA 0.4 mg/L. Pine bark was best for seeding cultivation. The study achieved rapid propagation of *Paphiopedilum callosum* and it could advance the propagation coefficient, which provide the basis for commercially produce.

**Key words:** seed; asymbiotic germination; medium; protocorm-like body