

# 大雪兰快速繁殖技术的研究

刘 方<sup>1</sup>, 陆 露<sup>1</sup>, 郭仕坛<sup>1</sup>, 杨宏光<sup>1</sup>, 伍建榕<sup>1,2</sup>

(1. 西南林业大学 保护生物学学院, 云南省高校森林灾害预警控制重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 西南林业大学 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南 昆明 650224)

**摘 要:**以大雪兰种子为试材,进行无菌播种试验,找出了最适合大雪兰种子萌发、原球茎增殖分化及生根的培养基。结果表明:利于大雪兰种子萌发的培养基是 1/2MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.2 mg/L+椰子汁(CM) 50 mL/L;利于大雪兰原球茎增殖分化的培养基是 1/2 MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AC 0.5 g/L;利于生根壮苗的培养基是 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+AC 2 g/L。

**关键词:**大雪兰种子;萌发;增殖分化;生根

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0160-03

大雪兰(*Cymbidium mastersii* Griff.)是滇兰中的名品之一,又称“棕根雪白”、“长寿兰”。它株型挺拔、雄健,花色雪白,迎冬而开,花姿俏丽,叶色青翠<sup>[1]</sup>。素心兰是大雪兰的一个变种,整个花被洁白无瑕,属稀有品种,从而引起了广大养兰爱好者的兴趣。为满足广大养兰爱

好者的需求,就需应用组织培养技术来解决这一供需矛盾。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

大雪兰自然生长下未开裂的绿色蒴果(来自越南),并把其种子作为外植体。将 4℃下保存的蒴果在流水下冲洗干净,并修剪其一端的梗,保留 1 cm 左右→放入超净工作台→将蒴果放入 75%酒精浸泡 30 s→再用 0.1%升汞消毒 20 min→无菌水冲洗 4 次→用无菌滤纸吸干蒴果表面的水分→将其置于无菌培养皿中备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子预处理 从蒴果中取出的种子,装入小滤纸袋内,每个蒴果内的种子一般分装在 3 个滤纸袋内(依蒴果大小而定),确保种子能充分接触到 NaOH。将装好的小滤纸袋浸入 0.1 mol/L NaOH 溶液预处理,处理时间设置为 5、10、15、20、25、30、35、40 min,处理后用无

**第一作者简介:**刘方(1985-),女,河南焦作人,在读硕士,研究方向为森林保护学与资源微生物利用。E-mail: liufang528000@163.com。

**通讯作者:**伍建榕(1963-),女,福建清流人,博士,教授,现从事森林病理学及资源微生物利用研究的学科科研工作。E-mail: wujianrong63@yahoo.com.cn。

**基金项目:**国家“十一五”科技支撑计划重点资助项目(2008BAC39B05);国家自然科学基金资助项目(30671717);西南林业大学重点基金资助项目(BC2010FK01);云南省重点学科森林保护学资助项目(XKZ200905)。

**收稿日期:**2010-11-25

## Study on High-frequency Regeneration System of Cotyledon Node in *Morus alba* L

WANG Zhao-yang

(Vocational College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471002)

**Abstract:** Using sterile culture of about 10 days *Morus alba* L, seedlings were cut cotyledon node explants. Using MS medium as the basic medium, screening appropriate concentration of 6-BA, NAA. As well as rooting hormone IBA and NAA the most appropriate concentration were studied, regenerate by organogenesis to set up high-frequency of cotyledon node regeneration system in *Morus alba* L. The results showed that the best hormone combination for induced multiple shoot clumps was 2.0 mg/L 6-BA and 0.15 mg/L IBA; the hormone for the rooting was 2.0 mg/L IBA.

**Key words:** *Morus alba* L; cotyledon node; regeneration

菌水冲洗4次,用无菌滤纸吸干小滤纸袋表面的水分,将种子均匀撒播于1/2MS培养基上。

1.2.2 试验设计 大量试验证明,在1/2MS、MS、Ar、N6、KC、花宝共6种培养基中,1/2MS培养基上兰花的种子萌发率最高。因此该试验将蒴果中取出的种子经NaOH预处理后播于1/2MS培养基上,每个蒴果播15瓶左右,设置不同浓度和种类的激素组合,确定大雪兰无性繁殖的最佳激素组合。培养条件为培养基pH为5.6。培养室温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ,光照强度为1500~2000 lx,相对湿度为80%~90%;从蒴果中取出的种子不经NaOH处理直接播于1/2MS培养基(所设置的激素浓度和种类与试验一均相同)表面,每个蒴果播15瓶左右。培养条件同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 化学方法预处理对种子萌发的影响

3个月后观察种子的萌发率,从图1可知,使用0.1 mol/L NaOH溶液对大雪兰种子做不同时间的预处理,发现对大雪兰种子的萌发作用明显,在处理时间为20~25 min时,种子的萌发率最高,当处理时间高于30 min时萌发率急剧下降,直至不能萌发。

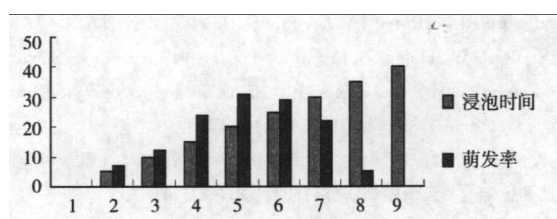


图1 NaOH对种子萌发率的影响

### 2.2 种子经NaOH预处理试验结果

2.2.1 不同激素浓度组合对种子萌发的影响 播于A3培养基中的种子在70 d左右开始萌动,初为乳白色点状膨大,一段时间后转绿且体积迅速增大,进而形成深绿色且颗粒大的原球茎。播种95 d后萌发率达82%,萌发率最高,萌发时间最短。播种95 d后,A1培养基的种子萌发率为45%,原球茎颗粒小;A2培养基的种子萌发率为72%,原球茎颗粒大但颜色偏黄;A4培养基的种子萌发率为70%,原球茎颗粒大但颜色偏黄;A5培养基的种子萌发率为30%,原球茎颗粒小。从表1可看出,6-BA浓度在0.3 mg/L时,随着NAA浓度的增加,大雪兰种子的萌发率最高,原球茎颗粒大且绿。但当6-BA的浓度低于或高于0.3 mg/L时,大雪兰种子的萌发率会降低,原球茎的颗粒小且偏黄。因此试验证明,1/2MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.2 mg/L+椰子汁(CM)50 mL/L+AC 0.3 g/L为种子萌发最佳培养基。

表1 不同激素浓度组合对种子萌发的影响

处理	培养基 /mg·L <sup>-1</sup>	调查 瓶数	萌发情况	生长情况
A1	6-BA 0.5	10	萌发率45%,原球茎颗粒小	++
A2	6-BA 0.4+NAA 0.1	10	萌发率72%,原球茎颗粒大但颜色偏黄	+++
A3	6-BA 0.3+NAA 0.2	10	萌发率82%,原球茎颗粒大且颜色深绿	++++
A4	6-BA 0.2+NAA 0.2	10	萌发率70%,原球茎颗粒大但颜色偏黄	+++
A5	NAA 0.5	10	萌发率30%,原球茎颗粒小	++

注:萌发情况统计在种子播种后的95 d。

### 2.2.2 不同激素浓度组合对原球茎增殖分化的影响

由表2可知,原球茎在NAA浓度为0.2 mg/L,6-BA浓度在0.4 mg/L时的生长情况最好,平均增殖倍数为4.2,分化出的不定芽粗壮且长势好。在NAA浓度为0.1 mg/L时,原球茎增殖分化的量会随着6-BA浓度的增加而增加,说明6-BA对不定芽的产生有一定的促进作用,但不定芽呈淡黄色且纤细,生长情况较差。在NAA浓度为0.2 mg/L时,原球茎增殖分化的量会随着6-BA浓度的增加而增加,不定芽呈深绿色且粗壮,生长情况较好,但当6-BA的浓度为0.5 mg/L时,不定芽的增殖倍数减少,说明6-BA对不定芽的产生有一定的抑制作用。试验表明,1/2MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AC 0.5 g/L为最佳的增殖分化培养基。

表2 不同激素浓度组合对原球茎增殖分化的影响

处理	激素/mg·L <sup>-1</sup>		平均增殖倍数	生长情况
	NAA	6-BA		
B1	0.1	0.3	3.0	+
B2	0.1	0.4	3.3	++
B3	0.1	0.5	3.8	+++
B4	0.2	0.3	3.7	+++
B5	0.2	0.4	4.2	++++
B6	0.2	0.5	4.0	++++

2.2.3 不同激素浓度组合对诱导生根的影响 将分化成具有2~3片叶片和2~3 cm长根的幼苗,转入4组生根壮苗培养基,30 d后4组培养基均诱导出根系。由表3可看出,幼苗在C1、C2中比在C3、C4中的生长状况好,幼苗叶片较大,叶色深绿,茎粗壮,根的条数相对较多。证明NAA比IBA更有利于大雪兰幼苗生根。C1和C2相比,C1内幼苗长势最好,叶片宽且大,叶色深绿,并且幼苗根多、粗壮。证明NAA的浓度在0.5 mg/L时有利于大雪兰幼苗的生根。试验证明,1/2MS+NAA 0.5 mg/L+AC 2 g/L为最佳生根培养基。

表 3 不同激素浓度组合对诱导生根的影响

处理	培养基 /mg · L <sup>-1</sup>	调查 瓶数	幼苗生长情况	生根情况
C1	NAA 0.5	10	叶片宽且大,叶色浓绿, 茎粗壮	4~5 条,根长,长势优
C2	NAA 0.3	10	叶片大,叶色浓绿,茎较 粗壮	3~4 条,根较长,长势 良好
C3	IBA 0.5	10	叶片窄且小,叶色浅,茎 较细	2~3 条,根较细,长势 良好
C4	IBA 0.3	10	叶片窄且小,叶色浅,茎 较细	2~3 条,根较细,长 势差

### 2.3 种子未经 NaOH 预处理试验结果

在播撒 95 d 后观察,发现未经 NaOH 预处理的大雪兰种子没有任何萌发迹象。播撒 120 d 后观察,种子仅有零星的萌发。150 d 后统计播种于 A3 培养基上的种子萌发率为 64%,原球茎颗粒较大且颜色深绿;A2 和 A4 的萌发率为 40%左右,原球茎颗粒小且颜色偏黄;而 A1 和 A5 萌发率都低于 30%,原球茎颗粒小且颜色偏黄。

### 3 结论与讨论

种皮的机械阻力、种胚的发育不全、储存的营养物质过少以及可能存在的抑制物质等一直被认为是阻碍兰花种子萌发的主要原因<sup>[2]</sup>。曾有多位研究人员提出不同的研究方法,来促进种子的萌发。Miyoshi<sup>[3]</sup>利用超声波震荡去除种皮发现萌发率提高;Harvais<sup>[4]</sup>和 Zettler<sup>[5]</sup>等发现经 NaClO 溶液浸泡的种子萌发率明显提高;段金玉等用 0.1 mg/L 的 NaOH 浸泡寒兰、套叶兰等 10~30 min,萌发率可提高 10 倍以上<sup>[6]</sup>。该试验结果有力的证明这一观点,没有经过 NaOH 处理的大雪兰种子萌发率几乎为零,经 NaOH 浸泡的种子,随时间的增加萌发率不断提高,在处理时间为 20~25 min 时,种子的萌发率最高,处理时间一旦高于 30 min 时萌发率急剧下

降,直至不能萌发。章玉平<sup>[7]</sup>曾提出添加外源激素和剪破种皮相结合的办法来促进兰花种子的萌发。该试验中发现 6-BA 和 NAA 均能提高种子的萌发率及缩短萌发时间,且 6-BA 比 NAA 更有利于大雪兰种子的萌发。通过设置不同激素浓度,筛选出促进种子萌发的最优激素浓度,发现单独加入 6-BA 或 NAA 一种激素的效果并没有同时加入两种激素的效果好。6-BA 0.3 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L 时萌发率最高,萌发率为 82%。

在试验中曾让原球茎的增殖分化和生根诱导为同一种培养基,发现原球茎增殖分化培养基同样也能促进幼苗生根,但生根率不够理想,需进一步确定最适的激素浓度。同时发现相同配方的培养基,搁置一段时间变硬后比新鲜的培养基利于原球茎的形成。与陈光禄<sup>[8]</sup>、钟雨薇<sup>[9]</sup>等在兰花无菌播种中发现硬的培养基对原球茎形成有利的结论相同。

### 参考文献

- [1] 杨云. 滇兰综艺(修订版)[M]. 昆明:云南科技出版社,2004:169.
- [2] 陈银龙. 国兰无菌播种技术研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(17):4291.
- [3] Miyoshi K, Mii M. Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture[J]. Scientia Hort, 1988(35):127-130.
- [4] Harvais G, Hadley G. The development of orchis purpurella in asymbiotic and inoculated cultures[J]. New Phytol, 1967(66):217-230.
- [5] Zettler L W, Hofer C J. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications[J]. Environm. Exp. Bot., 1998(39):189-195.
- [6] 段金玉, 谢亚红. 在无菌条件下激素和种子处理对兰属十种植物种子萌发的影响[J]. 云南植物研究, 1982, 4(2):197-201.
- [7] 章玉平. 兰花种子繁殖技术概况[J]. 中国花卉园艺, 2003(4):22-24.
- [8] 陈光禄. 地生兰未成熟种子无菌发芽的研究[J]. 福建农业科技, 1983(6):28-29.
- [9] 钟雨薇. 春兰无菌播种技术研究[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(20):87-88.

## Study on the Quick Multiplication of *Cymbidium mastersii* Griff.

LIU Fang<sup>1</sup>, LU Lu<sup>1</sup>, GUO Shi-tan<sup>1</sup>, YANG Hong-guang<sup>1</sup>, WU Jian-rong<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Forest Disaster Early Warning Control of Yunnan Provincial Universities, Faculty of Conservation Biology, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 2. Key Laboratory of Biodiversity Conservation Southwest China of State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

**Abstract:** The *Cymbidium mastersii* Griff. seeds were used to sow in the aseptic conditions, through which to find out the most suitable nutrient mediums for germination, proliferation and differentiation, rootage of *Cymbidium mastersii* Griff. seeds. The results showed that the nutrient medium for germination was 1/2MS+6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.2 mg/L + pineapple juice (CM) 50 mL/L; the nutrient medium for protocorm was 1/2 MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AC 0.5 g/L; the nutrient medium for rootage was 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+ AC 2 g/L.

**Key words:** *Cymbidium mastersii* Griff. seeds; germination; proliferation and differentiation; rootage