

硬叶兜兰的无菌播种和试管成苗

张春^{1,2,3}, 李蕾³, 夏念和¹

(1. 中国科学院 华南植物园, 广东 广州 510650; 2. 中国科学院 研究生院 北京 100049; 3. 文山学院 生化系, 云南 文山 663000)

摘要:以硬叶兜兰的种子为试材, 研究种子成熟度、种子预处理以及培养基成分对种子萌发、原球茎分化以及试管成苗的影响。结果表明: 果龄 110~210 d 的种子经处理后均能够萌发, 其中 150 d 的萌发率最高, 达 40%。10% 的 84 消毒液预处理对种子萌发有显著促进作用, 在 5~20 min 范围内, 以 11 min 处理获得最佳萌发效果; 处理时间 20 min 时萌发率最低, 为 11%。1/5MS 基本培养基较花宝培养基有更高的萌发率, 添加 AgNO_3 1 mg/L 利于原球茎分化及试管苗的发育。

关键词: 硬叶兜兰; 无菌播种; 试管成苗

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)05-0115-03

硬叶兜兰(*Paphiopedilum micranthum* T. Tang & F. T. Wang) 为兰科兜兰属植物, 分布于广西西南部、贵州南部和西南部、云南东南部以及越南北部^[1]。列入“野生动植物濒危物种国际贸易公约”(CITES)附录I, 是绝对禁止野生资源贸易的物种。硬叶兜兰花色艳丽, 具有很高的园艺价值, 但其种子在野外需要共生真菌才能萌发, 且自然状态下萌发率极低。兜兰属其它种的无菌萌发技术已有报道^[2-9], 但硬叶兜兰的无菌播种和成苗快速繁殖未见报道。现对硬叶兜兰的无菌萌发及成苗进行研究, 可为该植物的保护及栽培利用提供一定参考价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材为硬叶兜兰种内不同植株间自交 F_1 种子, 引种于文山学院生物园地兰科植物种质资源圃内。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌处理及种子预处理 将采收的蒴果用自来水清洗, 然后在超净工作台上先用 70% 酒精浸泡 30 s, 再转入 0.1% 升汞溶液中浸泡 12 min, 取出蒴果, 吸干水分, 切除蒴果两端后剖开蒴果, 将种子刮入 84 消毒液中处理, 之后用一次性注射器小心吸出液体, 倒入无菌水

清洗种子 2 次, 最后将种子均匀地播在培养基表面。种子分别在培养 4、6、8 周后随机采取 100 粒种子置于解剖显微镜下观察胚的萌发率。萌发标准为胚吸水膨大, 并形成白色原球茎(protocolum)。

1.2.2 培养基与培养条件 种子萌发培养基: (1) 1/5MS; (2) 花宝 1 号(美国 Haponex 公司产品, N:P:K=7:6:19) 3.0 g/L。原球茎增殖和分化成苗培养基: (3) 1/5MS+6-BA 0.5 mg/L(单位下同)+NAA 0.1; (4) 1/5MS+6-BA 0.5+NAA 0.1+ AgNO_3 1.0。壮苗生根培养基: (5) 花宝 1 号 3.0 g/L+10% 香蕉汁+2.0 g/L 活性炭; (6) 花宝 1 号 3.0 g/L+NAA 1.0+ AgNO_3 1.0+10% 香蕉汁+0.5 g/L 活性炭。以上培养基均添加 2.0% 蔗糖, 0.56% 琼脂固化, pH 5.4~5.6。培养基(1)~(4)均添加椰子乳 100 mL/L 以及活性炭 1.0 g/L。培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光强 $30 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光照 10~12 h/d。

2 结果与分析

2.1 蒴果成熟度对萌发率的影响

将果龄 110~210 d 的种子每 10 d 采收 1 次, 每次采 5 个蒴果, 放入(1)号培养基进行培养(130~210 d 的种子均用 10% 的 84 消毒液处理至褐色褪尽), 培养 30 d 后胚明显膨大。培养 56 d 后试验统计结果见表 1。由表 1 可看出, 种子成熟度在 110~150 d 之内种子萌发率无显著差异, 萌发率居于 29%~37% 之间, 其中 150 d 的种子萌发率最高。150 d 后种子萌发率随着蒴果成熟度增加而下降, 在 210 d 时最低萌发率仅为 18%。

2.2 84 消毒液预处理种子对其萌发的影响

将果龄 150 d 的无菌种子用 10% 的 84 消毒液处理时间 5~20 min。在(1)号培养基中培养 56 d 后试验统

第一作者简介: 张春(1974), 男, 在读博士, 讲师, 研究方向为兰科植物资源保护与利用。E-mail: cc_ding@yahoo.com.cn

通讯作者: 夏念和(1963), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为植物分类学和植物资源学。E-mail: nhxia@scib.ac.cn

基金项目: 中国科学院知识创新工程资助项目; 文山学院校级重点学科资助项目(09WSXK02)。

收稿日期: 2010-12-07

计结果见表2。由表2可看出,种子在处理时间为11 min时萌发率最高,达40%。在11 min内,萌发率随处理时间延长而提高;但当处理时间超过11 min以后,种子的萌发率则随处理时间的延长而下降,在处理时间最长时(20 min)得到最低萌发率为11%。

表1 蒴果成熟度对种子无菌萌发的影响

果龄/d	萌发率/%		
	培养4周	培养6周	培养8周
110	17	30	35
120	26	33	37
130	16	22	29
140	17	23	34
150	19	26	37
160	15	21	31
170	17	19	26
180	13	17	27
190	11	15	22
200	9	14	25
210	10	15	18

表2 种子预处理对其萌发的影响

处理时间/min	5	8	11	14	17	20
萌发率/%	21	37	40	32	17	11

2.3 培养基成分对种子萌发率以及试管成苗的影响

将果龄150 d的种子处理11 min之后培养于(1)号和(2)号培养基,56 d之后统计萌发率;转入(3)、(4)号培养基进行分化培养,120 d之后再转入(5)、(6)号培养基进行壮苗生根培养。对比试验结果见表3。由表3可看出,(1)号培养基萌发率为35%,优于(2)的24%,表明低盐浓度更利于种子萌发;添加AgNO₃(1.0 mg/L)对原球茎的分化以及幼苗的生长起到明显的促进作用。

表3 培养基成分对种子萌发率的影响

培养基序号	萌发率/%	原球茎的分化	幼苗的生长
(1)	35	—	—
(2)	24	—	—
(3)	—	+	—
(4)	—	++	—
(5)	—	—	+
(6)	—	—	++

3 小结

兜兰是兰科植物中具有重要开发和保护价值的类群之一,以往的经验表明硬叶兜兰是其中萌发较为困难的种类之一。通过优化培养条件,快速获得了大量无菌试管苗,建立了离体种质保存体系,为进一步开展离体诱导倍性育种以及诱变育种等创造了条件。

试验结果表明,对硬叶兜兰人工授粉150 d后采收蒴果,经无菌处理后再对种子以10%的84消毒液处理11 min更利于种子的萌发。种子萌发的适宜培养基为:1/5MS+CM10%+蔗糖2%+琼脂0.56%+活性炭0.1%;



图1 开花



图2 蒴果



图3 播种萌发



图4 生根苗



图5 出瓶



图6 移栽

在种子萌发培养基的基础上添加AgNO₃(1.0 mg/L)有利于原球茎的分化和成苗;花宝1号3.0 g/L+NAA 1.0+AgNO₃ 1.0+10%香蕉汁+活性炭0.1%可以培育壮苗,在实际生产中具有较强的实用性。

参考文献

[1] Cribb P. The Genus Paphiopedilum[M]. 2nd edn. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo), 1998: 82.

[2] 丁长春 夏念和. 麻栗坡兜兰的无菌播种与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(12): 1201-1202.

[3] 丁长春 虞泓, 刘方媛. 影响杏黄兜兰种子萌发的因素[J]. 云南植物研究 2004 26(6):673-677.

[4] 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]. 植物生理学通讯, 2008, 44(6): 171-172.

[5] 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]. 植物生理学通讯, 2009(9): 887-888.

[6] 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(10): 1011-1012.

[7] 曾宋君 陈之林, 吴坤林, 等. 亨利兜兰的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2010(5): 471-472.

[8] Arditti J. Orchid Biology, Reviews and Perspective II[M]. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1982: 352.

[9] Lee Y L The Asymbiotic Seed Germination of Six Paphiopedilum Species In Relation To the Time of Seed Collection and Seed Pretreatment[J]. Acta Hort. (ISHS), 2007 755: 381-386.

海南百合科野生花卉资源研究

王士泉¹, 马艾鸿², 王 灼¹

(1. 海南师范大学 生命科学学院 海南 海口 571158; 2. 海南师范大学 图书馆, 海南 海口 571158)

摘 要: 调查了海南百合科野生花卉资源的种类和分布。结果表明: 海南百合科野生花卉有 12 属 22 种, 并提出了开发利用和保护建议。

关键词: 海南; 百合科; 野生花卉; 保护

中图分类号: S 681.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2011)05—0117—02

百合科(Liliaceae)植物是人类食用、药用、观赏等的重要来源之一, 具有很多优良基因, 又是栽培植物引种、驯化和育种的优良杂交亲本。野生百合花卉植物除美观外, 重要的是其抗性强、适应性强、生态价值高。我国野生百合科资源主要分布在西南地区的西藏、云南、贵州、秦巴山区及毗邻地区、长白山地区、三峡地区、江浙地区等地。

但近年来, 野生百合科植物赖以生存的生态环境不断遭到人为的破坏, 如开地垦荒、随意放牧、挖掘鳞茎及连续盲目引种, 造成种群毁灭性的灭亡。类似破坏年复一年, 使种群繁殖受到严重威胁^[1]。而且大部分百合科植物是作为食用植物和药用植物开发、研究和利用, 作

为观赏花卉栽培的还很少, 百合科花卉产业目前在海南还没有得到很好的发展。现对海南百合科野生花卉资源的种类、分布进行了调查、分析、评价和研究, 为园林绿化、育种及引种驯化提供理论依据, 同时对野生花卉资源保护与开发利用有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 研究地概况

海南是我国唯一的低纬度热带岛屿, 是典型的热带季风气候。地貌类型多样, 地形中高周低呈环状结构。全岛气候东湿西干, 南暖北凉, 中部有五指山相隔, 形成大环境中地域性和中、小环境的多样化。平均气温 23 ~ 25 ℃, 光温资源特别丰富, 雨量充沛, 干湿明显, 水资源丰富。土地资源丰富多样, 生态环境优良^[2]。海南作为“天然大温室”, 拥有中国最稀缺的热带气候资源, 极具发展热带花卉生产的优越条件和巨大潜力^[3]。特别是自海南提升为国际旅游岛, 大大促进了海南省旅游业的发展, 由此也拉动了海南花卉业的发展。

1.2 研究方法

通过野外调查, 并结合相关资料, 得出海南野生百

第一作者简介: 王士泉(1971-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事植物系统进化研究工作。E-mail: wsqmah@163.com。

基金项目: 海南师范大学博士(教授)资助项目(00203020224); 海南省自然科学基金资助项目(310041); 海南省教育厅资助项目(Hjsk2009-71)。

收稿日期: 2010-12-29

Aseptic Sowing and *in vitro* Seedling Culture of *Paphiopedilum micranthum* T. Tang & F. T. Wang

DING Chang-chun^{1, 2}, LI Lei³, XIA Nian-he¹

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; 3. Department of Biology and Chemistry, Wenshan College, Wenshan, Yunnan 663000)

Abstract: In the report, we studied the effects of seed maturity, seed pretreatments and media component on the asymbiotic germination of *Paphiopedilum micranthum*. The results showed that the timing of seed collection was critical in maximizing germination percentage in this species. The seeds collected from 110 to 210 days after pollination (DAP) was capable for germination, the optimum for culture *in vitro* was 150 days. Pretreatment of the mature seeds with 10% NaOCl for 11 min were optimum for improving the germination percentage. Differentiation of protocorm and further seedling growth was promoted by AgNO₃ (1.0 mg/L).

Key words: *Paphiopedilum micranthum* T. Tang & F. T. Wang; seed germination; seedling growth