

# 宽叶红门兰组织培养育苗研究

周鑫

(黑龙江林业职业技术学院 黑龙江 牡丹江 157011)

**摘要:**以花梗腋芽为外植体,筛选出宽叶红门兰组织培养育苗的适宜培养基配方。结果表明:宽叶红门兰最佳诱导培养基MS+BA 2.0 mg/L,增殖培养基MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L,生根培养基1/2MS+BA 0.1 mg/L+NAA 1.0 mg/L。

**关键词:**宽叶红门兰;花梗腋芽;组织培养

**中图分类号:**S 682.310.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)05-0177-03

宽叶红门兰(*Orchis latifolia* Linn.)为兰科红门兰属多年生草本植物,总状花序,花紫红色或粉红色,具有退化的雄蕊,蒴果。在我国主要分布在黑龙江、内蒙古、西藏等省,全草入药,具有强心、补肾、生津、止渴、健脾胃的功效。栽培种为名贵观赏植物,盆栽或作为花坛、花境植物。在我国北方园林应用前景广阔,但常规繁殖方法增殖速度较慢,不能满足市场需求。组织培养为宽叶红门兰优良品种快速繁殖提供了有效途径,有利于宽叶红门兰的新品种培育和次生代谢的研究,对兰科植物的研究并探索其发育规律起到促进作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

刚形成的花梗作为外植体材料。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体的消毒** 采集外植体材料用自来水冲洗后,用70%的乙醇消毒5~10 s,将乙醇倾去,用无菌水冲洗外植体。在超净工作台上用0.1%的氯化汞溶液分别浸泡外植体4、6、8、10 min后,注入适量的无菌水,反复冲洗5~8遍,每次3 min,接着把消过毒的外植体用无菌纱布吸干水分,放于灭菌的培养皿上,切段,每段至少有1个芽,接种到MS+BA 1.0 mg/L培养基上。

**1.2.2 基本培养基、生长调节剂** 外植体在MS+BA 1.0 mg/L上培养,待腋芽萌发后转移到MS、1/2MS、KC为基本培养基,附加BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L、BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L、KT 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L、KT 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L的培养基上培养,每种培养基接种20个外植体,4次重复。

**1.2.3 诱导培养基** 在1.2.2基础上,将外植体接种在以MS为基本培养基,细胞分裂素BA浓度分别为4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.1 mg/L的培养基上培养,每种培养基接种20个材料。

**1.2.4 增殖培养基** 将诱导产生的芽接种在以MS为基本培养基,细胞分裂素BA,浓度分别为2.0、1.5、1.0、0.5 mg/L,生长素选用NAA,浓度分别为0.5、0.3、0.1、0.0 mg/L的培养基上培养,每种培养基接种20个材料。

**1.2.5 生根培养基** 将2 cm以上芽接种到生根培养基,以1/2MS为基本培养基,生长素选用NAA,浓度分别为2.0、1.5、1.0、0.5 mg/L。细胞分裂素BA,浓度分别为0.5、0.3、0.1、0.0 mg/L的培养基上培养,每种培养基接种20个材料。

### 1.3 培养条件

培养基含糖3%,琼脂7 g/L, pH 5.8,环境温度(25±2)℃,光照2 000 lx,每天光照时间10~12 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 消毒处理时间对外植体消毒效果的影响

外植体在培养基MS+BA 1.0 mg/L培养2周后观测结果(表1、图1),表明升汞消毒作用明显,消毒效果随时间增加而加强,外植体消毒10 min时已经没有污染,消毒8 min开始外植体出现药害,随组织成熟的程度不同危害程度不同,10 min时死亡率明显增高,危害程度严重;外植体成活率在4~8 min区间随着时间增加上升,但是8 min后随时间延长而下降,消毒时间以8 min时污染较少,药害较轻,死亡较少,成活最高。因此,用0.1%升汞消毒外植体8 min效果最好。

表1 外植体消毒时间与消毒效果相关性统计

| 消毒时间<br>/min | 接种数 | 污染数 | 污染率<br>/% | 死亡数 | 死亡率<br>/% | 成活数 | 成活率<br>/% |
|--------------|-----|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|
| 4            | 40  | 17  | 42.5      | 0   | 0         | 23  | 57.5      |
| 6            | 40  | 9   | 22.5      | 0   | 0         | 31  | 77.5      |
| 8            | 40  | 2   | 5         | 3   | 7.5       | 35  | 87.5      |
| 10           | 40  | 0   | 0         | 25  | 62.5      | 15  | 37.5      |

**作者简介:**周鑫(1969-),男,硕士,副教授,现主要从事植物组织培养和园林苗圃的教学与生产及科研工作。E-mail: shw\_mdjlk@163.com。

**收稿日期:**2010-12-14

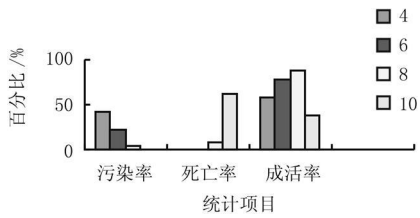


图1 外植体的时间消毒与效果相关性图

2.2 基本培养基、生长调节剂选择结果

外植体萌发后的芽转接后, 培养4周观测结果(表2), 通过方差分析(表3)表明, 不同培养基、不同生长调节剂以及培养基与生长调节剂组合交互效应对芽增殖影响显著, 基本培养基增殖效果依次是MS>1/2MS>改良MS>KC(表4、图2), 生长调节剂组合增殖效果依次是1号>2号>4号>3号(表5、图3), 因此, 宽叶红门兰组培基本培养基采用MS效果最好, 细胞分裂素采用BA最好, 生长素采用NAA效果最好。

表2 芽增殖倍数统计表

| 基本培养基 | 生长调节剂/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 1   | 2   | 3   | 4   |
|-------|--|-----|-----|-----|-----|
| MS    | BA 1.0+NAA 0.1                         | 4.0 | 4.1 | 3.9 | 4.0 |
|       | BA 1.0+IBA 0.1                         | 3.2 | 2.2 | 2.9 | 2.0 |
|       | KT 1.0+IBA 0.1                         | 0.6 | 1.0 | 0.8 | 0.9 |
|       | KT 1.0+NAA 0.1                         | 1.1 | 1.4 | 1.1 | 1.5 |
| 1/2MS | BA 1.0+NAA 0.1                         | 2.6 | 3.2 | 2.0 | 2.5 |
|       | BA 1.0+IBA 0.1                         | 2.1 | 2.3 | 2.1 | 1.7 |
|       | KT 1.0+IBA 0.1                         | 1.0 | 0.7 | 1.1 | 1.4 |
|       | KT 1.0+NAA 0.1                         | 1.2 | 1.2 | 1.4 | 0.9 |
| 改良MS  | BA 1.0+NAA 0.1                         | 2.2 | 2.0 | 2.4 | 2.1 |
|       | BA 1.0+IBA 0.1                         | 1.3 | 1.5 | 1.7 | 1.5 |
|       | KT 1.0+IBA 0.1                         | 1.0 | 0.9 | 1.3 | 1.1 |
|       | KT 1.0+NAA 0.1                         | 1.2 | 1.3 | 1.2 | 1.4 |
| KC    | BA 1.0+NAA 0.1                         | 1.5 | 1.2 | 1.1 | 1.6 |
|       | BA 1.0+IBA 0.1                         | 1.0 | 1.1 | 1.2 | 1.3 |
|       | KT 1.0+IBA 0.1                         | 1.2 | 1.3 | 0.0 | 1.0 |
|       | KT 1.0+NAA 0.1                         | 1.6 | 1.4 | 1.4 | 1.4 |

注: 增殖倍数 $\geq 0.5\text{cm}$ 芽总数/接种材料数。

表3 增殖倍数方差分析表

| 变异来源        | 平方和    | 自由度 | 均方    | F       | Sig. |
|-------------|--------|-----|-------|---------|------|
| 基本培养基       | 7.849  | 3   | 2.616 | 35.269  | .000 |
| 生长调节剂       | 22.437 | 3   | 7.479 | 115.029 | .000 |
| 基本培养基*生长调节剂 | 11.916 | 9   | 1.324 | 12.840  | .000 |

注: 线性回归的复相关系数等于0.999, 方差分析中Sig<0.05表明处理间差异显著。

表4 培养基对增殖倍数影响统计

| 培养基    | MS   | 1/2MS | 改良MS | KC  |
|--------|------|-------|------|-----|
| 平均增殖倍数 | 2.16 | 1.7   | 1.5  | 1.2 |

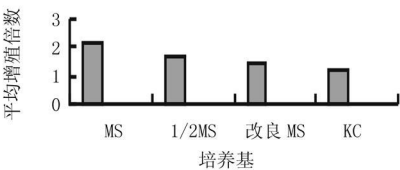


图2 培养基对增殖倍数影响

表5 生长调节剂对增殖倍数影响统计

| 生长调节剂组合<br>$/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | BA 1.0+<br>NAA 0.1 | BA 1.0+<br>IBA 0.1 | KT 1.0+<br>IBA 0.1 | KT 1.0+<br>NAA 0.1 |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 培养基编号                                       | 1                  | 2                  | 3                  | 4                  |
| 平均增殖倍数                                      | 2.5                | 1.8                | 1.0                | 1.3                |

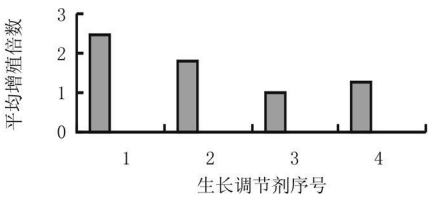


图3 生长调节剂对增殖倍数影响

2.3 最佳诱导培养基选择结果

由表6可知, BA浓度超过3.0 mg/L形成愈伤组织, 低于0.5 mg/L时, 生长缓慢, 外植体在MS+BA 2.0 mg/L上诱导芽生长最适宜。

表6 外植体诱导生长情况

| 培养基            | 生长情况                       |
|----------------|----------------------------|
| MS+BA 4.0 mg/L | 1周芽开始萌动, 外植体出现大量愈伤组织       |
| MS+BA 3.0 mg/L | 1周芽开始萌动, 2周后外植体基部出现愈伤组织    |
| MS+BA 2.0 mg/L | 1周芽开始萌动, 3周芽高生长2.0cm, 生长正常 |
| MS+BA 1.0 mg/L | 2周芽开始萌动, 4周芽高2.0cm, 生长正常   |
| MS+BA 0.5 mg/L | 3周芽开始萌动, 6周芽高2.0cm, 生长缓慢   |
| MS+BA 0.1 mg/L | 1周后无明显变化, 4周后外植体死亡         |

2.4 增殖培养基选择

诱导芽在增殖培养基生长4周后观测结果(表7、图4), BA浓度对比组中BA 1.5 mg/L时增殖倍数明显高于其它组, 在BA 1.5 mg/L组中NAA 0.3 mg/L增殖倍数最高, 因此, 增殖最佳培养基选择MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L。

表7 不同培养基的芽增殖倍数

| NAA 浓度<br>$/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | BA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ |     |     |     |
|--|--|-----|-----|-----|
|  | 0.5                                    | 1.0 | 1.5 | 2.0 |
| 0  | 2.2                                    | 2.6 | 3.1 | 1.5 |
| 0.1  | 1.8                                    | 3.0 | 4.5 | 1.6 |
| 0.3  | 1.1                                    | 3.3 | 4.8 | 1.9 |
| 0.5  | 1.1                                    | 2.2 | 4.0 | 2.4 |

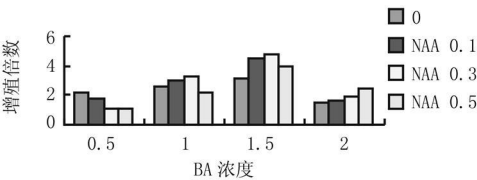


图4 不同培养基芽增殖倍数

2.5 生根培养基选择

分化苗转接到生根培养基培养, 最早1周开始生根, 4周后观测结果(表8、图5), NAA浓度1.0~1.5 mg/L, BA 0.1~0.3 mg/L, 生根效果较好, 生根率为64.9%~93.4%, 最佳生根培养基为1/2MS+BA 0.1 mg/L+NAA 1.0 mg/L, 生根率为93.4%。

表 8 生长调节剂浓度对生根率的影响 %

| BA 浓度<br>/mg · L <sup>-1</sup> | NAA 浓度/mg · L <sup>-1</sup> |      |      |      |
|--------------------------------|-----------------------------|------|------|------|
|                                | 0.5                         | 1.0  | 1.5  | 2.0  |
| 0                              | 43.9                        | 69.8 | 52.7 | 41.0 |
| 0.1                            | 45.8                        | 93.4 | 64.9 | 42.3 |
| 0.3                            | 29.2                        | 85.3 | 72.8 | 55.5 |
| 0.5                            | 10.9                        | 73.2 | 68.7 | 57.9 |

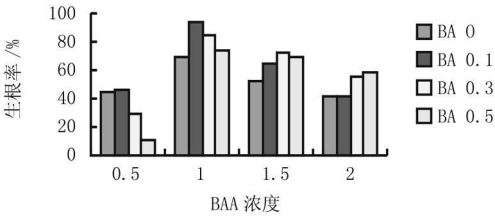


图 5 生长调节剂浓度对生根率的影响

2.6 练苗与移栽

当试管苗生长至 3~5 cm 左右, 根 2~3 条时可以进行练苗, 将试管苗连同培养容器一起移到温室, 5 d 后打开瓶塞 2~3 d, 取出试管苗用自来水冲洗掉根部附着的培养基, 定植于苔藓(珍珠岩或蛭石)中, 保持 90% 以上的相对湿度, 并通风, 温度 20~25 ℃, 3 周后相对湿度

逐渐降低至 65%。每周浇 1 次 10% 的 MS 培养基大量元素 200 mL/m<sup>2</sup>。4 周试管苗长出新根可以进行移栽。

3 小结

宽叶红门兰组织培养以花梗为外植体时, 0.1% 升汞消毒 8 min 效果较好。最佳培养基配方为: 芽诱导培养基 MS+BA 2.0 mg/L, 增殖培养基为 MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L, 生根培养基 1/2MS+BA 0.1 mg/L+NAA 1.0 mg/L。

参考文献

[1] 曹汝义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 1 版. 兰州: 甘肃科学技术出版社 1996.  
[2] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社 2000.  
[3] 谷瑞升. 植物离体培养器官发生调控机制的研究进展[J]. 植物学通报, 1999(3): 238-244.  
[4] 刘庆昌, 吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 北京: 中国农业大学出版社 2005: 35-37.  
[5] 沈海龙. 植物组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社 2005: 56-57.  
[6] 周以良. 黑龙江省植物志[M]. 第 11 卷. 哈尔滨: 东北林业大学出版社 1993.

Study on Tissue Culture of *Orchis latifolia* Linn.

ZHOU Xin

(Heilongjiang Forestry Vocation Technical College, Mudanjiang, Heilongjiang 157011)

**Abstract:** Taking pedicle axillary buds as explants and researched the best culture conditions for *Orchis latifolia* Linn.. The results showed that the optimal induction medium was MS+BA 2.0 mg/L, multiplication medium was MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L, rooting medium was 1/2MS+BA 0.1 mg/L+NAA 1.0 mg/L.

**Key words:** *Orchis latifolia* Linn.; pedicle axillary buds; tissue culture

冬季农药保存注意事项

- 1 存放农药的地方, 温度应不超过 25 ℃, 更要注意远离火源, 以防药剂高效分解。低温要注意防冻, 温度保持在 1℃以上。防冻的常用办法是用碎柴草、糠壳或不用的棉被覆盖保温。
- 2 发挥性强的农药要注意密封, 避免挥发降低药效, 污染环境, 危害人体健康; 对已失效或剩余的少量农药不可在田间地头随地乱倒, 更不能倒入池塘、小溪、河流或水井。也不能随意加大浓度后使用, 应采取深埋处理, 避免污染环境。
- 3 农药要集中存放在一个地方, 做好标记。瓶装农药如若破裂, 要换好包装, 贴上标签, 以防误用。
- 4 粉剂农药要放在干燥处, 以防受潮结块而失效。
- 5 农药不能与粮油、豆类、种子、蔬菜、食物以及动物饲料等同室存放, 特别注意不要放在小孩可接触的地方。
- 6 分类贮存。按化学成分, 农药可分为酸性、碱性、中性三大类。这三类农药要分别存放, 距离不要太近, 防止农药变质; 也不能和碱性物质、碳铵、硝酸铵等同时存放在一起。
- 7 不要把农药和易燃易爆物品存放在一起, 如烟熏剂、汽油等, 防止引起火灾。
- 8 防止日晒。用棕色瓶子装着的农药一般需要避光保存。需避光保存的农药, 若长期见光曝晒, 就会引起农药分解变质和失效。例如乳剂农药经日晒后, 乳化性能变差, 药效降低。所以在保管时必须避免光照日晒。