

DOI:10.11937/bfyy.201622025

## 带叶兜兰非共生萌发试验

陈 尔, 陈宝玲, 杨舒婷, 王华新, 龚建英, 苏莉花

(广西壮族自治区林业科学研究院, 广西 南宁 530002)

**摘 要:**以带叶兜兰同种异株授粉的果实为试验材料,采用正交实验设计,研究了非共生条件对带叶兜兰种子萌发的影响,以期对带叶兜兰的快速繁殖并最终实现产业化生产提供技术参考。结果表明:基本培养基的种类是带叶兜兰非共生萌发的主要影响因素,初步筛选出种子非共生萌发较适宜培养基为  $1/2MS+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{NAA}+0.75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{AC}+2.5\%$ 蔗糖+ $0.46\%$ 琼脂+ $100\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 椰汁;果实的成熟度影响种子萌发所历经的胚龄、原球茎的颜色及其后续发育,果龄过短或过长都不利于种子发育,带叶兜兰离体培养的最佳时间为果龄 180 d。

**关键词:**带叶兜兰;非共生萌发;果龄;果实成熟度

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)22-0100-04

带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)属兰科(Orchid)兜兰属(*Paphiopedilum*)植物,属地生或半附生兰,分布于云南东南部、贵州西南部、广西西北部;印度东北部、老挝、缅甸、泰国北部和越南北部等地<sup>[1]</sup>,多生于林缘石缝或湿润土壤中<sup>[2]</sup>。其花型奇特,叶片带状、飘逸,可花叶共赏。然而,由于人为过度采挖,其野生资源正在逐渐减少,开展人工无菌播种繁殖是保护和开发其资源的一个有效途径。

**第一作者简介:**陈尔(1978-),女,广西陆川人,硕士,高级工程师,现主要从事园林花卉等研究工作。E-mail:chenr@sina.cn.

**责任作者:**王华新(1969-),男,陕西周至人,博士,高级工程师,现主要从事园林花卉等研究工作。E-mail:wanghuaxin@163.com.

**基金项目:**广西自然科学基金资助项目(2015GXNSFB139053);广西林业科技资助项目(桂林科研[2015]第39号)。

**收稿日期:**2016-08-04

与其它的兰科植物一样,带叶兜兰种子的胚发育不全,缺少胚乳,在自然界中难以自主萌发,需要与特定的真菌形成共生关系才能成功萌发。关于带叶兜兰非共生萌发试验的研究并不多,曾宋君等<sup>[3]</sup>、尤佳妍<sup>[4]</sup>对带叶兜兰种子无菌萌发进行了培养基筛选试验。该研究采用正交实验探讨带叶兜兰种子萌发的影响因素,并对不同龄期蒴果的种子萌发进行比较,旨在为带叶兜兰的快速繁殖并最终实现产业化生产提供技术参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

供试果实来自广西林科院园林花卉研究所温室大棚内引种驯化的野生带叶兜兰植株。于2013、2014年3月底4月初在植株开花期进行同种异株人工授粉,根据试验设计方案分别采收果龄120、150、180、210、240 d

**Abstract:** The influence of IBA, ABT1 and *Agrobacterium rhizogenes* on the softwood cutting of *Tilia platyphyllos* Aurea was studied during rooting while the mechanism of their effects on the rooting was discussed. The results showed that the rooting rate, average root number, root length were significantly increased ( $P < 0.01$ ) and the rooting time decreased after treatment with IBA, ABT1 and *Agrobacterium rhizogenes*. IBA, ABT1 and *Agrobacterium rhizogenes* also increased significantly the contents of  $\text{GA}_3$ , IAA and the ration of IAA/ABA ( $P < 0.01$ ), the variation of soluble sugars and total N contents were the same, the contents of soluble sugars and total N rised firstly and fell lastly, no significant difference. The contents of ABA and hydroxybenzene reduced during the rooting period, and promoted remarkably rooting of softwood cutting. It showed that the treatment with  $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ABT1 and *Agrobacterium rhizogenes* was the best. The rooting percentage, quantity of root and root length of the cutting after treatment with ABT1+*Agrobacterium rhizogenes* increased by 112.36%, 112.61% and 64.95%, while the rooting period was shortened by eight days compared with control.

**Keywords:** *Tilia platyphyllos* Aurea; softwood cutting; *Agrobacterium rhizogenes*; endogenous hormone; nutritive material; hydroxybenzene content

的果实(注:果龄是以植株授粉当天算起到果实采收时种子发育所经历的天数)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 果实的预处理和消毒 采收的果实先用蘸有少量 75%酒精的棉球清洁表面,再用毛刷蘸上适量洗涤液清洁果皮表面附着物,于自来水下反复冲洗以去掉多余的洗涤液,并置流动的自来水下冲洗 30 min,待用。

1.2.2 播种方法 在超净工作台上,先用 75%酒精溶液浸泡 30 s,再用 0.1%升汞处理 10~12 min,无菌水冲洗 8~10 次,取出蒴果,置托盘上,用无菌滤纸吸干果皮表面的水分。用解剖刀横切,将果实分为两半,用镊子夹起果实,于播种培养基上方轻轻抖动,尽量将种子撒播均匀,盖好瓶盖。每个处理配方接种 5 瓶,重复 3 次,共计 15 瓶。

1.2.3 种子萌发试验 以果龄 180 d 的果实为试验材料,采用正交实验设计,在查阅文献的基础上,确定了 4 个参试的因素:基本培养基、细胞分裂素 6-BA、生长素 NAA 和活性炭(AC)。该试验不考虑因素间的交互作用,各因素随机排列,采用  $L_9(3^4)$  正交表进行 4 因素 3 水平正交实验(表 1),共 9 个处理。以上培养基均添加 2.5%蔗糖,0.46%琼脂,pH 5.6~5.8,椰汁 100 mL·L<sup>-1</sup>。试验结果以萌发率为定量评价指标。

1.2.4 不同果龄种子萌发试验 以果龄 120、150、180、210、240 d 的果实为试验材料,以 1.2.3 种子萌发试验筛选的培养基为基本培养基,基本培养基另添加 2.5%蔗糖,0.46%琼脂,pH 5.6~5.8,椰汁 100 mL·L<sup>-1</sup>。

1.2.5 培养条件 播种后的培养瓶置于光照培养室内,暗培养 10 d 后进行光照培养。培养室内气温(25±1)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间为 12 h·d<sup>-1</sup>。

表 1 带叶兜兰种子萌发正交实验设计

Table 1 Orthogonal design of embryo germination of *Paphiopedilum hirsutissimum*

水平 Level	因素 Factor			
	A 基本培养基 Minimal medium	B 细胞分裂素 Cytokinin 6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	C 生长素 Auxin NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	D 活性炭 Active carbon /(mg·L <sup>-1</sup> )
1	1/2MS	0.5	0.2	0.25
2	White	1.0	0.4	0.50
3	MS	1.5	0.6	0.75

## 1.3 项目测定

培养 3 d 后开始对种子萌发的生长动态进行观察,并记录观察结果。由于带叶兜兰种子非常细小,难以统计出具体的数量,故以目测法统计种子膨大、种子膨大程度、种子转绿的初始时间及种子萌发率。种子萌发率按每个培养瓶内萌发的种子量占该培养瓶播种量的比例计算。

## 1.4 数据分析

统计结果经 Excel 2007 电子表格处理后,再用 DPS

软件进行直观分析和方差分析,多重比较采用邓肯新复极差检验法(Duncan's Multiple Ranger Test,DMRT)。

## 2 结果与分析

### 2.1 成熟种子萌发培养基筛选

由表 2 可知,各处理的萌发率存在一定的差异,处理 3 的萌发率最高(1/2MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.75 mg·L<sup>-1</sup> AC),为 53.8%,经邓肯新复极差检验法进行多重比较,其处理 7 和处理 8 的差异达到显著水平,而处理 4 和处理 5 的差异达到显著及极显著水平。其次为处理 1 和处理 2,种子萌发率分别为 42.5%和 46.7%。获得较高的萌发率的 3 个处理均是以 1/2MS 为基本培养基,说明 1/2MS 能有效促进带叶兜兰种子的萌发。萌发率的极差结果显示,1/2MS 的极差最高,为 32.77,其次是 6-BA,而 NAA 和 AC 的极差最小,说明基本培养基是带叶兜兰种子萌发的主要影响因素。

表 2 带叶兜兰成熟种子萌发正交实验结果

Table 2 Orthogonal experimental results of embryo germination of *Paphiopedilum hirsutissimum*

处理 Treatment	试验因素 Experimental factor				60 d 萌发率 Germination rate of 60 days /%
	A 基本培养基	B 6-BA	C NAA	D AC	
1	1/2MS	0.5	0.2	0.25	42.5ABa
2	1/2MS	1.0	0.4	0.50	46.7ABa
3	1/2MS	1.5	0.6	0.75	53.8Aa
4	White	0.5	0.4	0.75	3.0Bc
5	White	1.0	0.6	0.25	5.0Bc
6	White	1.5	0.2	0.50	36.7ABab
7	MS	0.5	0.6	0.50	10.0ABbc
8	MS	1.0	0.2	0.75	12.5ABbc
9	MS	1.5	0.4	0.25	33.5ABab
k1	47.67	18.50	30.57	27.00	
k2	14.90	21.40	27.73	31.13	
k3	18.67	41.33	22.93	23.10	
R	32.77	22.83	7.63	8.03	
主次顺序		A>B>D>C			

注:小写字母 k 为某因素中某一水平的指标平均值;R 为极差。小写英文字母和大写英文字母分别表示 Duncan 多重比较法检测结果差异显著性(P=0.05,P=0.01)。下表同。

Note:The minuscule k is the index average of certain factors in a certain level;R is the range. Lowercase and capital letters show respectively significant and very significant difference by Duncan's Multiple Ranger Test. The same below.

从极差结果可知,6-BA 是影响带叶兜兰种子萌发的次要因素,以 White 和 MS 为基本培养基的各个处理中,均以添加了 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 的萌发率最高,分别是 36.7%和 33.5%,由此可见,带叶兜兰种子萌发对植物生长调节剂 6-BA 的浓度有一定的要求,且需要较高浓度的 6-BA,浓度降低,种子的萌发率随之下降。

对 9 个处理的带叶兜兰种子萌发动态做定性描述,由表 3 可知,9 个处理种子膨大的初始时间和膨大种子的数量存在一定的差异,但不明显。培养 36 d,膨大的

种子相继转绿,颜色为浅绿色、嫩绿色及黄绿色。60 d 后,各处理间的膨大种子的数量表现出较明显差异,处理 3 的种子前期发育较缓慢,种子膨大启动时间较其它

晚 1~3 d,但是种子在后期发育较快,培养 60 d 种子萌发率达 53.8%,膨大的原球茎浅绿色,后续培养能正常分化成小苗。

表 3

不同处理对带叶兜兰种子萌发的影响

Table 3

Effects of different treatment on seed germination of *Paphiopedilum hirsutissimum*

处理 Treatment	种子膨大初始时间 Initial time of seed expands/d	膨大种子的数量 Number of seed expands	36 d 原球茎的颜色 Color of protocorm after 36 days	60 d 膨大种子的数量 Number of seed expands after 60 days
1	15	++	浅绿色	+++
2	17	++	浅绿色	+++
3	18	+	浅绿色	++++
4	17	+	黄绿色	+
5	15	+	黄绿色	+
6	15	++	黄绿色	+++
7	17	++	黄绿色	++
8	17	++	黄绿色	++
9	17	+	嫩绿色	+++

注:十表示膨大种子的数量,十为极少数,++为少数,+++为一般,++++为较多。下表同。

Note: + is the number of seed expands, + is rarely, ++ is a few, +++ is normal, ++++ is many. The same below.

综合正交实验结果及种子发育动态,确定处理 3 为该研究后续试验中带叶兜兰不同果龄种子非共生萌发的适宜培养基。

## 2.2 不同果龄种子萌发试验

由表 4 可知,果实的成熟度影响种子萌发历经的胚龄、原球茎的颜色及其后续发育,果龄过短或过长都不利于种子发育。果龄在 120~180 d,随着果龄的增加,种子萌发历经的胚龄相应缩短,但是,果龄增加到 210 d 和 240 d 时,种子萌发历经的胚龄较果龄 120、150、180 d 种

子萌发所历经的胚龄要长得多。种子成熟度不够或过度成熟都会使原球茎产生严重的白化现象,白化的原球茎大多数都不能正常分化,仅极少数能转为绿色并分化成苗,经后期培养,白化的原球茎逐渐褐化、死亡。在 5 个龄期中,180 d 的种子萌发历经的胚龄最短,原球茎最早分化出叶原基所需的时间也最短,种子发育最好,萌发整齐且极少出现白化现象,经后期培养,分化的小苗能正常生长。因此,带叶兜兰离体培养的最佳时间为果龄 180 d。

表 4

不同果龄对带叶兜兰种子萌发的影响

Table 4

Effects of different fruit ages on seed germination of *Paphiopedilum hirsutissimum*

果龄 Fruit ages/d	胚龄 Embryo ages/d	膨大种子的数量 Number of seed expands	原球茎的颜色 Color of protocorm	原球茎发育 Growth of protocorm
120	40	+	全为白色	白色原球茎只膨大,不分化,后期褐化;120 d 极少量绿色原球茎分化
	83	++	全为白色	
	120	++	多数白色,极少绿色	
150	28	+	多数白色,极少绿色	白色原球茎继续膨大,不分化;85 d 绿色原球茎初现叶原基
	60	++	多数白色,极少绿色	
	85	++	多数白色,极少黄绿色	
180	18	+	黄色	45 d 绿色原球茎初现叶原基,且整齐,极少数白化
	45	++	浅绿色	
	60	++++	黄绿色	
210	77	+	多数白色,极少绿色	白色原球茎不分化;120 d 绿色原球茎叶原基初分化 1 叶
	120	++	多数白色,少数绿色	
	150	++	多数白色,少数绿色	
240	66	+	多数白色,极少绿色	白色原球茎只膨大,不分化;90 d 绿色原球茎初现叶原基
	90	++	多数白色,少数绿色	
	120	++	多数白色,少数绿色	

## 3 结论与讨论

该研究结果表明,培养基种类是影响带叶兜兰种子非共生萌发的主要影响因素,其种子的非共生萌发需要较高浓度的植物生长调节剂 6-BA、NAA 和 AC 对种子的非共生萌发的影响较小,因此,在日后的试验中可考虑适当减少二者的用量,既可弱化 NAA 对 6-BA 的干扰作用,也可减少 AC 对植物生长调节剂的吸附作用。研

究结果表明,带叶兜兰种子萌发对培养基的种类有较强烈的选择性,前人的研究也得出类似的结果,但是同属不同种的兜兰种子的非共生萌发对基本培养基的要求各不相同<sup>[5-10]</sup>。

植物生长调节剂常被用于兰科植物生长发育的各个阶段,不同植物或同一植物的不同发育阶段对其种类和浓度的需求不相同<sup>[11-14]</sup>。针对植物生长调节剂对兜

兰属植物种子非共生萌发影响的研究并不多,曾宋君等<sup>[3]</sup>在对带叶兜兰进行种子无菌萌发培养基筛选试验中,并未提及其无菌萌发对植物生长调节剂有需求;周丽等<sup>[8]</sup>研究发现,报春兜兰‘金州报春’种子对植物生长调节剂的要求并不高,较高浓度的 6-BA 和 NAA 种子的萌发起抑制作用,降低萌发率。该研究表明,带叶兜兰种子非共生萌发需要较高浓度的 6-BA,研究结果的差异可能是由于种子不同的生理结构造成。

兰科植物中地生种类的种子非共生萌发较为困难<sup>[15]</sup>,兜兰属植物属于其中之一。兜兰属植物种子的发育阶段影响着种子的萌发率,兜兰属不同植物的种子离体培养的最佳果实采收期有差异<sup>[5-8,10,16-18]</sup>。该研究通过对带叶兜兰 5 个果龄的种子萌发对比试验得出,不同果龄的种子萌发所历经的胚龄、原球茎的发育程度均有差异,果龄过短或过长都不利于种子的萌发及其后续发育。前人的研究对产生这一现象的主要原因进行了较详细的阐述:果龄过短,种子内缺少正常的胚,造成萌发率极低;果龄过长,种皮细胞加厚、透水性差、胚内抑制萌发物质的积累,从而导致萌发率降低<sup>[6-8,10,17]</sup>。

#### 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,2009:1-100.
- [2] 王晓国,卢家仕,周主贵,等. 带叶兜兰菌根真菌分离和初步鉴定[J]. 西南农业学报,2016,29(2):316-320.
- [3] 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.
- [4] 尤佳妍. 几种兜兰的种子发育及无菌萌发研究[D]. 北京:北京林业大学,2014.
- [5] 陈之林,叶秀葵,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.
- [6] 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.
- [7] 刘其府,傅燕艳,曾宋君,等. 同色兜兰种子非共生萌发试验[J]. 广东农业科学,2012(12):47-49.
- [8] 周丽,邓克云,徐正海. ‘金州报春’兜兰的非共生萌发与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2013,49(11):1250-1254.
- [9] 周艳,周洪英,朱立,等. 硬叶兜兰的无菌播种和离体快速繁殖[J]. 贵州科学,2013,31(5):79-82.
- [10] 尤佳妍,张毓,刘岩,等. 小叶兜兰的种子发育和无菌萌发[J]. 植物生理学报,2014,50(3):275-282.
- [11] ROY A R, PATEL R S, PATEL V V, et al. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 128:325-331.
- [12] ABRAHAM S, AUGUSTINE J, THOMAS T D. Asymbiotic seed germination and *in vitro* conservation of *Coeloglyne nervosa* A. Rich. an endemic orchid to Western Ghats[J]. Physiological and Molecular Biology of Plants, 2012, 18(3):245-251.
- [13] SUZUKI R M, MOREIRA V C, PESCADOR R, et al. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina* [J]. In Vitro Cellular Developmental Biology Plant, 2012, 48:500-511.
- [14] BEKTAS E, CUCE M, SOKMEN A. *In vitro* germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey[J]. Turkish Journal of Botany, 2013, 37:336-342.
- [15] ARDITTI J, ERNST R. Micro propagation of Orchids[M]. New York: J Wiley and Sons, Inc, 1993.
- [16] 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.
- [17] 陈莹,范旭丽,高江去. 白旗兜兰种子非共生萌发与试管苗快速繁育[J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(5):611-615.
- [18] 王亚平,谭志勇,张乐萍,等. 兜兰无菌播种技术研究[J]. 现代农业科技, 2012(18):157, 171.

## Test on Asymbiotic Germination of *Paphiopedilum hirsutissimum*

CHEN Er, CHEN Baoling, YANG Shuting, WANG Huaxin, GONG Jianying, SU Lihua  
(Guangxi Zhuang Autonomous Region Forestry Research Institute, Nanning, Guangxi 530002)

**Abstract:** Taking the fruits of *Paphiopedilum hirsutissimum* from the allogeneic pollination as materials, under the condition of asymbiotic germination, the test had been done of the seed germination of *P. hirsutissimum* by the orthogonal test, in order to provide the basis of the rapid propagation and industrial production of *P. hirsutissimum*. The results showed that the asymbiotic germination of *P. hirsutissimum* was mostly influenced by the basic medium, and the better medium for asymbiotic germination was  $1/2MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA} + 0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AC} + 2.5\% \text{ sucrose} + 0.46\% \text{ agar} + 100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \text{ coconut juice}$ ; the embryo ages, the protocorm color and the protocorm growth were affected by the fruit maturity, the fruit age was harmful to the seed germination, which was too young or too old, and the 180-day-old fruit was the optimal *in vitro* cultivation of *P. hirsutissimum*.

**Keywords:** *Paphiopedilum hirsutissimum*; asymbiotic germination; fruit age; fruit maturity