

大花型肉饼兜兰无菌播种技术

张英杰, 初美静, 刘学庆, 张京伟, 郭文姣, 刘述河, 孙纪霞

(烟台市农业科学研究院, 山东 烟台 265500)

摘要:大花型肉饼兜兰具有极高的观赏价值和经济价值,但存在种子萌发率低、组培苗成活率低等问题,对大花型肉饼兜兰无菌播种过程中的关键技术进行重点阐述,以期为广大兜兰生产与种植者提供技术支持。

关键词:肉饼兜兰; 无菌播种; 栽培管理; 组织快繁

中图分类号:S682.31 **文献标识码:**B **文章编号:**1002-2767(2017)10-0130-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.10.0130

兜兰属(*Paphiopedilum*)约有 80~85 个种,主要分布于亚洲热带与亚热带地区。兜兰所有野生种都是国际一级珍稀濒危物种,在国际上绝对禁止贸易。我国的 18 种兜兰均为国家的一级珍稀保护物种,尤以硬叶兜兰、杏黄兜兰和栗栗兜兰为最珍贵^[1]。兜兰因其独特的造型、绚丽的色彩和持久的观赏花期而具有极高的观赏价值和经济价值^[2],是国际花卉市场上十分流行的高档花卉。

国际上兜兰的主流商业品种是大花型绿色和红色的肉饼类品种。2016 年大花型黄绿色兜兰(*Paphiopedilum* Emerald Future ‘Galaxy’)一举荣获日本世界兰花展总冠军。我国兜兰市场处于起步阶段,发展空间大,但在我国兜兰栽培生产中,大花型肉饼兜兰存在种子萌发率低、组培苗成活率低、生长周期长、生长速度慢等缺点,导致生产成本较高。该文就大花型肉饼兜兰无菌播种过程中的关键技术进行重点阐述,以期为广大兜兰生产与种植者提供技术支持。

1 兰科植物种子构造及影响种子发芽的因素

兰科植物的种子只有胚和外面一层种皮,没有胚乳或子叶可供植物发芽所需的养分^[3]。兜兰的果荚成熟时,胚发育成圆球胚阶段后呈休眠状态,需经过播种后种子吸收水分和养分再发育成原球茎后分化出生长点。种皮大多由厚壁细胞构

成,随着果荚成熟度的增加,细胞核逐渐消失,细胞壁纤维质化或木质化,厚壁细胞也随之加厚,起到了保护作用,但也造成了不透水的结果。在自然环境下需要有兰菌条件才能帮助吸收水分和养分。在人工播种时,需要以无菌播种的方式,在组培瓶中添加种子萌发所需的养分和水分。因此选择适当的播种时间、提供培养条件和种皮处理是促进兰科种子萌发的重要因素。

2 影响种子萌发的因素

2.1 果荚成熟度

兰科植物最佳的播种期应为圆形胚尚未停止生长,种皮细胞的细胞核仍存在时。因此授粉后的果荚成熟度,是判断何时播种的最佳指标。一般兰科植物在果荚由未成熟的绿色转变为其它颜色且尚未裂开时,采收播种为宜。

目前研究发现,不同兜兰的种与品种的果荚成熟所需时间不同^[4-8]。例如,小叶兜兰在授粉 255 d 后种子萌发率最高(90.71%),该阶段种子仍呈白色但微干燥,种胚刚发育至球形胚阶段,胚柄尚存^[9]。格力兜兰在人工授粉 210 d 后光下培养 35 d 后膨大^[10]。卷萼兜兰在授粉 130 d 后播种暗培养 80 d 后萌发率最高^[11]。目前鲜见关于肉饼类兜兰的采种最佳时间的研究报道,有专利认为来自授粉后 300~360 d 的充分膨大蒴果的种子最好,例如 CN201510565855.3 公开了一种肉饼系列兜兰杂交育种及其种苗快速繁殖的方法,其中采用授粉后 300~360 d 的充分膨大蒴果作为种子。而本课题组试验后发现肉饼兜兰在人工授粉 180~270 d 后进行无菌播种均可萌发(见图 1)。

2.2 播种前种子处理

兰科种子以超声波震荡处理可以将胚震离种皮,用化学药剂处理(KOH 或 NaOH)可以有效提高萌芽率。超声波震荡法需处理 30~

收稿日期:2017-02-24

基金项目:山东省 2017 年度农业重大应用技术创新资助项目;烟台市科技发展计划资助项目(2015NC039)

第一作者简介:张英杰(1987-),女,山东省烟台市人,硕士,农艺师,从事花卉栽培与育种研究。E-mail:zhang-yingjie@163.com。

通讯作者:孙纪霞(1974-),女,硕士,高级农艺师,从事花卉栽培与品种选育研究。E-mail:nkyhhs@163.com。

120 min,化学药剂处理法需用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 处理 30 min,或 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 处理 10 min。不同品种的处理时间不同。研究发现有效氯含量为 0.5% 的次氯酸钠溶液处理同色兜兰的成熟种子 40 min,可将萌发率大幅提高^[12]。果龄 150 d 的硬叶兜兰在 10% 的 84 消毒液处理 11 min 时萌发率最高^[13]。



图 1 肉饼兜兰花、果实与种子的形态结构

3 无菌播种的条件与方法

3.1 无菌播种所需设备、器材及试剂

设备包括灭菌设备、培养设备、实验设备等。器材包括盛装器皿、计量器皿以及其它常用消耗品等。试剂包括组培生产所需的无机盐类、有机物类、植物生长调节剂、消毒剂等。

3.2 无菌播种与组织培养方法

在大花型肉饼兜兰开花时选取生长健壮的母株进行人工授粉,在授粉 180~300 d,取下成熟未开裂的果荚作为外植体。

将外植体放入 75% 的酒精中浸泡 30 s,之后置于 0.1% 的升汞中消毒 20~30 min,用无菌水冲洗 4~5 次之后,切开果荚,将粉末状的成熟种子均匀的撒在播种培养基上。播种培养基: $1/4 \text{ MS} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA} + 100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 椰子汁} + 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 活性炭} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 蔗糖} + 5.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 琼脂}$, pH 为 5.4~5.8,温度为 25~27 °C,光照为 1 000~1 500 lx。40~80 d 后,待种子发育成原球茎后进行增殖培养。

将正常转绿的原球茎转接到继代培养基上,

2~3 个月之后形成带短根的丛生植株苗后进行壮苗生根培养。继代培养基为: $1/2 \text{ MS} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA} + 100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 椰子汁} + 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 活性炭} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 蔗糖} + 5.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 琼脂}$, pH 为 5.4~5.8,温度为 25~27 °C,光照为 1 000~1 500 lx。

将长成的丛生植株分开,接种至壮苗生根培养基上进行培养,90 d 后长成具 2~3 条根、3~4 片叶的完整植株。壮苗生根培养基: $1/2 \text{ MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA} + 100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 椰子汁} + 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 活性炭} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 蔗糖} + 5.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 琼脂}$, pH 为 5.4~5.8,温度为 25~27 °C,光照为 2 000~2 500 lx(见图 2)。



图 2 肉饼兜兰无菌播种

3.3 炼苗与栽培管理

当试管苗长至 4~6 cm 时,转移到自然光下炼苗 20 d,轻轻取出组培苗,放入清水中(水温为 18~20 °C),轻轻洗净组培苗表面的培养基后进行分级,将洗净的组培苗移栽入已装好基质的穴盘中,基质为松鳞(3~7 mm)。栽培环境为:相对湿度 80%。如果相对湿度低于 60%,将会对大花型兜兰的植株生长造成不可逆的不利影响,因此需要在炼苗移栽之后严格将相对湿度控制在 60% 以上。温度条件可以为白天 18~28 °C,夜间 15~18 °C;光照条件为 10 000~15 000 lx;水肥管理条件为每 5~7 d 浇透水一次,单独或者交替施用 N:P:K 为 30:10:10 和 20:20:20 的复合肥,稀释倍数优选为 3 000 倍,施用频率为 14~28 d·次⁻¹,施用方式为根区浇灌或叶面喷施(见图 3)。



图3 组培苗出瓶 30、170 d 后的状态

3.4 兜兰种苗组培快繁

种苗组培快繁规模化生产流程见图 4。

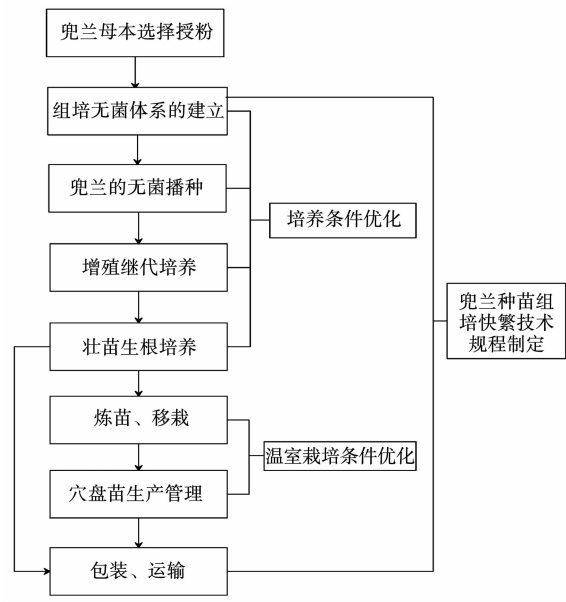


图4 兜兰种苗组培快繁规模化生产流程

参考文献：

[1] 王英强. 中国兜兰属植物生态地理分布[J]. 广西植物, 2000,20(4):289-294.

[2] Luan V Q,Huy N P,Nam N B,et al. Ex vitro and in vitro *Paphiopedilum* delenatii,Guillaumin stem elongation under light-emitting diodes and shoot regeneration via stem node culture[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37 (7): 1-11.

[3] 曾宋君,陈之林,吴坤林,等. 兜兰无菌播种和组织培养研究进展[J]. 园艺学报,2007,34(3):793-796.

[4] 李晖,李勇毅. 果荚成熟度、培养基成分与液体培养对色兜兰原生种种子萌发之影响[M]. 台湾仙履兰专辑 II,1999: 10-12.

[5] 张娟娟,严宁,胡红. 三种兜兰属植物种子发育过程及其与无菌萌发的关系[J]. 植物分类与资源学报,2013,35(1): 33-40.

[6] 王莲辉,魏鲁明,姜运力,等. 白花兜兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2010,44(10):1171-1172.

[7] 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,2009,45(9): 887-888.

[8] 王莲辉,魏鲁明,姜运力,等. 小叶兜兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2010,46(11):1169-1170.

[9] 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.

[10] 周丽,李松克,邓克云,等. 格力兜兰的无菌播种与组培快繁研究[J]. 安徽农业科学,2012(18):9590-9592.

[11] 张娟娟,严宁,胡红. 三种兜兰属植物种子发育过程及其与无菌萌发的关系[J]. 植物分类与资源学报,2013,35(1): 33-40.

[12] 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,2012,39(12):47-49.

[13] 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.

Aseptic Seeding Technique of Big Flower *Paphiopedilum*

ZHANG Ying-jie,CHU Mei-jing,LIU Xue-qing,ZHANG Jing-wei,GUO Wen-jiao,LIU Shu-he, SUN Ji-xia

(Yantai Academy of Agricultural Sciences,Yantai,Shandong 265500)

Abstract:Big flower *Paphiopedilum* cultivars has high ornamental and economic value. However, there are some problems such as low seed germination rate and low seedling survival rate. The key techniques in the a-septic seeding process of big flower *Paphiopedilum* were elaborated,in order to provide technical support for production.

Keywords:*Paphiopedilum*; aseptic seeding; cultivation management; tissue rapid propagation