



杨利平,陈丽文,王华宇,等.三种兜兰属植物无菌播种及快繁技术研究[J].黑龙江农业科学,2019(11):102-105.

三种兜兰属植物无菌播种及快繁技术研究

杨利平¹,陈丽文¹,王华宇²,王鹏良²,何贵整¹,陈乃明¹,杨 琼¹

(1.钦州市林业科学研究所,广西 钦州 535011;2.北部湾大学,广西 钦州 535011)

摘要:为不断完善兜兰属植物人工繁育技术体系,本文以白花兜兰、小叶兜兰和亨利兜兰自然成熟的果荚为材料,进行无菌播种和快繁技术研究。结果表明:常规的组培快繁消毒技术,对3种兜兰的果荚消毒具有较好的效果;培养基1/2MS+土豆汁100 mg·L⁻¹+活性炭1 g·L⁻¹比较适合白花兜兰种子的萌发,小叶兜兰和亨利兜兰也能有较好的萌发效果;无菌播种后,前期的暗培养有利于白花兜兰的萌发;相较小叶兜兰和亨利兜兰,白花兜兰的种子萌发一致性较差,在继代过程中极易出现死亡现象。本研究对兜兰属植物的保护和人工繁育具有一定的参考价值。

关键词:兜兰;果荚;无菌播种;快繁

兜兰属(*Paphiopedilum*)隶属兰科(Orchidaceae)杓兰亚科,原产于亚洲热带和亚热带地区,全世界记录在案的野生种有79个,其中约有1/3产自中国^[1]。兜兰属植物因特化、硕大的唇瓣和绚丽的花色而闻名,又名仙履兰、拖鞋兰,具有极高的观赏价值,是全球最受喜爱的兰科植物之一。兜兰目前已经在全球广泛栽培,在英国皇家园艺协会(RHS)登录的杂交种已有两万多个^[2]。但由于长期以来过度的人为采集、贸易、生境破坏等原因^[3],导致了兜兰野生资源的迅速减少和甚至灭绝,兜兰属的所有种均已被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约(CITES)》附录I中,禁止进行国际贸易。

兜兰属植物的自然繁殖主要通过无性繁殖和有性生殖两种方式进行。但无性繁殖的侧芽萌发或根状茎萌芽途径繁殖效率较低,而有性生殖产生的种子缺少胚乳,在自然环境中需要和特定真菌共生才能自然萌发,且萌发率非常低^[4],这限制了种群的快速恢复和扩大,无法满足保护和开发的需求。与自然状态下的共生萌发相对应,在人工培养基上无需真菌侵染就可以使种子萌发,即为非共生萌发,非共生萌发技术在兰花工业生产中显得尤为重要^[5]。通过采集兜兰适宜成熟期的果荚,在无菌条件下进行非共生萌发和培育已成

为兜兰属植物人工繁育的主要途径。近十多年来,许多兜兰种类的人工繁育技术得到了快速发展,长瓣兜兰、带叶兜兰、硬叶兜兰、亨利兜兰等均已实现初步的产业化^[6-13]。但总体来讲,兜兰属是兰科植物中无菌播种和组织培养最困难的种类之一,尤其是一些种类完全成熟的种子萌发困难,且种间差异大^[4,14-15]。本研究基于对白花兜兰(*Paphiopedilum emersonii*)、小叶兜兰(*Paphiopedilum barbigerrum*)和亨利兜兰(*Paphiopedilum henryanum*)无菌播种和组织培养过程中的观察对比,探寻人工繁育过程中的规律和种间差异,旨在为兜兰属植物的保护和开发利用提供参考,为推进白花兜兰和小叶兜兰的规模化繁育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2016-2018年在果期分别采集3种野生兜兰自然授粉的果荚,以外观浅绿色至黄绿色且未开裂的果荚为佳。白花兜兰、小叶兜兰果荚来源为广西木论国家级自然保护区,亨利兜兰果荚来源为云南富宁县。培养基中椰汁来源:选用新鲜的椰子,把外层的椰棕剥开,可见3个孔型,然后用筷子或小刀把离中心最近位置的孔戳穿,将里面的椰子水倒出,备用。土豆汁来源:取新鲜土豆去皮后切碎并用适量清水煮沸,然后倒入果汁机打碎,备用。

1.2 方法

1.2.1 果荚处理及消毒 将采回的3种兜兰的果荚带回实验室后,剪去基部果柄,自来水下流水冲洗30 min。在浓度1%洗洁精溶液中浸泡

收稿日期:2019-05-08

基金项目:国家林业局2017年中央本级项目(2130211);广西林业厅项目(桂林护预2016003)。

第一作者简介:杨利平(1984-),女,硕士,高级工程师,从事植物组培及种苗繁育研究。E-mail:278291930@qq.com。

通讯作者:王华宇(1981-),男,硕士,高级工程师,从事濒危植物保护与资源开发利用研究。E-mail:371841833@qq.com。

5 min,用软毛刷轻轻刷洗果荚表面,再冲洗15~20 min;然后置于超净工作台上,将果荚在75%酒精中浸泡消毒30 s后转至0.1%升汞溶液中(加入2滴吐温)消毒15 min,再用无菌水冲洗3~4次,备用。

1.2.2 不同培养基对白花兜兰种子无菌播种萌发效果的影响 将上述经消毒处理的白花兜兰果荚置超净工作台上,用手术刀切去果荚两端,纵向剖开果荚,将内部种子均匀地撒至5种不同的萌发培养基表面,每个处理选5个果荚,由于果荚大小和饱满程度存在差别,每个果荚可接种3~7瓶。5种培养基分别为:①1/2MS+椰汁100 mg·L⁻¹;②1/2MS+椰汁100 mg·L⁻¹+活性炭1 g·L⁻¹;③1/2MS+土豆汁100 mg·L⁻¹;④1/2MS+土豆汁100 mg·L⁻¹+活性炭1 g·L⁻¹;⑤1/2MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+椰汁100 mg·L⁻¹+活性炭1 g·L⁻¹。上述培养基均添加3%蔗糖和0.6%琼脂粉,pH5.8~6.0。培养条件为:温度:(25±2)℃,光照:10~12 h·d⁻¹,光照强度1 500~3 000 lx。90~120 d后统计白花兜兰发芽情况。

1.2.3 三种兜兰种子在同种培养基上萌发的差异表现 分别将白花兜兰、亨利兜兰、小叶兜兰消毒的种子播种在1.2.2中④号培养基上,每个兜兰品种选5个果荚,每个果荚可播3~7瓶。每组培养基均添加3%蔗糖和0.6%琼脂粉,pH5.8~6.0。培养条件为:温度:(25±2)℃,光照:10~12 h·d⁻¹,光照强度1 500~3 000 lx。90 d后统计3种兜兰发芽情况。

1.2.4 不同光照条件对白花兜兰种子无菌播种萌发的影响 选用1.2.2中④号培养基,将白花兜兰消毒后的种子播入培养基内,接种20瓶分为2个处理,每个处理10瓶。处理1始终置于正常光(1 500~3 000 lx)下培养;处理2先暗培养14 d,(即用黑布遮盖),然后置于弱光下(600~1 200 lx)下再培养90 d后观察种子萌发和幼苗生长情况。

1.2.5 继代和壮苗培养 将获得的幼苗和原球茎转移至⑥号分化培养基上,⑥号培养基为:1/2MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+椰汁100 mg·L⁻¹+活性炭1 g·L⁻¹,培养基添加3%蔗糖和0.6%琼脂粉,pH5.8~6.0。培养条件:温度为:(25±2)℃,光照为10~12 h·d⁻¹,光照强度1 500~3 000 lx。

壮苗培养亦选用⑥号培养基,将继代培养获得的幼苗在超净工作台上用镊子轻轻夹起以单株形式转入⑥号培养基进行培养,培养条件同继代培养。兜兰生根容易,无需进行生根培养,在壮苗培养过程中可产生完整根系。

1.2.6 移栽 瓶苗高度达3~5 cm并已形成完整根系时,洗干净基部培养基,移栽入植金石(直径0.5~1.0 cm)、泥炭、松树皮1:1:1搅拌均匀的混合基质中,容器选用72孔穴盘。松树皮和植金石需提前隔夜浸泡,并用浓度0.5%高锰酸钾溶液浸泡消毒30 min。移栽完成后,置于阴凉通风处,加强水分管理,根系生长良好后进行上盆。

2 结果与分析

2.1 无菌材料的获得

按照1.2.1的操作方法,根据果荚大小和饱满程度差别,每个果荚可接种3~7瓶,各处理中白花兜兰、小叶兜兰、亨利兜兰均没有出现大批量污染,按照瓶数统计,3种兜兰的霉菌和细菌污染率基本可控制在10%以内,为2.9%~10.8%。

2.2 不同萌发培养基对白花兜兰发芽的影响

不同萌发培养基及植物生长调节剂组合对白花兜兰萌发状况的影响见表1。从发芽瓶数的统计来看,白花兜兰种子的发芽率基本可以达到73%以上;但从实际各瓶的萌发按效果来看,种子萌发不均匀,一部分种子萌发较为均匀,一部分接种瓶中只有少数萌发;从不同培养基和植物生长调节剂的组合效果来看,④号培养基所用的1/2MS+土豆汁100 mg·L⁻¹+活性炭1 g·L⁻¹发芽情况较好,分化的原球茎和幼苗也较健壮,而添加椰汁的①号、②号和⑤号培养萌芽和原球茎数量均较少。

2.3 同种培养基上三种兜兰发芽情况比较

利用④号培养基,对白花兜兰、小叶兜兰和亨利兜兰分别进行诱导培养,结果如表2所示。3种兜兰均能较好萌发,但从萌发效果来看,不同果荚对应的瓶苗差异均比较明显,相较而言,小叶兜兰种苗一致性较好,发芽率较高,成苗快;亨利兜兰分化有较多的原球茎和幼苗,也具有较高的发芽率;白花兜兰发芽率较前两种明显偏低。

2.4 不同光照条件对白花兜兰发芽的影响

白花兜兰种子接种后前两周的遮光处理和不遮光处理结果显示:遮光处理的瓶苗一致性较好,发芽率也稍高于不遮光种子。说明无菌播种前期适当的遮光处理有利于白花兜兰种子的萌发。

表 1 不同培养基组合对白花兜兰发芽情况影响

Table 1 Effects of different culture medium combinations on germination of *Paphiopedilum emersonii*

培养基组合 Culture medium combinations	果荚数/个 Fruit pod	接种数/瓶 Inoculation number	污染数/瓶 Pollution number	发芽数/瓶 Germination number	发芽率/% Germination rate	萌发状况 Germination condition
①	5	26	2	19	73.1	原球茎和芽数量少,苗较瘦弱
②	6	37	4	28	75.7	原球茎和芽数量少,苗较瘦弱
③	5	29	2	23	79.3	原球茎和芽分化数量较多,粗壮
④	6	34	1	29	85.3	原球茎和芽分化数量较多,粗壮
⑤	5	28	1	23	82.1	原球茎和芽均有,数量少,苗较瘦弱

注:污染包括霉菌污染和细菌污染,下同。
Note:Pollution includes fungal and bacterial contamination,the same below.

表 2 同种培养基组合对 3 种兜兰发芽情况的影响

Table 2 Effects of the same medium combination on the the germination of three species
of *Paphiopedilum*

种类 Types	果荚数/个 Fruit pod number	接种数/瓶 Inoculation number	污染数/瓶 Pollution number	发芽数/瓶 Germination number	萌发状况 Germination condition
白花兜兰	6	34	1	29	原球茎和苗较粗壮,一致性较差
小叶兜兰	3	16	0	12	成苗快,一致性好
亨利兜兰	9	44	5	33	分化较多,芽较粗壮,一致性较好

2.5 继代和壮苗培养

三种兜兰的继代和壮苗培养均采用⑥号培养基,培养过程中可根据生长状况,适当调整 6-BA 和 NAA 的浓度。3 种兜兰试管苗均生长较慢,平均继代周期在 56~84 d,并且在继代过程中极易出现生长不良和死亡的情况,以白花兜兰最为显著。继代培养过程中,主要是无菌实生苗的生长为主,侧芽萌发较少。继代培养 2~3 个周期之后,部分种苗高度可到 3~5 cm,可以选取根系良好的种苗进行移栽。

3 结论与讨论

通常认为,通过人为快繁途径是实现濒危野生植物保护和资源开发利用的有效手段,这对具有极高科研和观赏价值的兜兰属植物显得尤为重要。由于兰科植物普遍存在的物种濒危、种子微小、发芽率低等问题,因此关于兰科植物的组培快繁多年来一直是研究的热点,其中铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite*)等很多兰科植物实现了产业化。兜兰属植物的组培快繁技术研究相对较晚,包括白花兜兰在内的部分植物保护形势很严峻,种苗的产业化繁育尚未成熟,因此大力开展兜

兰属植物的人工繁育技术研究很有必要。

常规的组培快繁消毒技术,对 3 种兜兰的果荚消毒具有较好的效果。由于兜兰属植物的种子非常微小,难以按照种子数量进行污染率和发芽率的统计。粗略地按照接种前后的瓶数进行统计,污染率基本可以控制在 10% 以下,说明采用常规消毒程序对果荚消毒可以达到较好的效果。也有学者利用 NaCl 溶液^[16]、84 消毒液^[10]、KOH 溶液^[17]等分别对同色兜兰、硬叶兜兰、巨瓣兜兰、海伦兜兰等种子进行预处理,发现在合适的浓度下均可提高种子的萌发率。酒精和升汞的浓度和消毒时间对种子萌发的伤害程度如何,利用何种消毒液进行果荚的预处理尚需要进一步研究。

培养基 1/2MS+土豆汁 100 mg·L⁻¹+活性炭 1 g·L⁻¹比较适合白花兜兰种子的萌发,小叶兜兰和亨利兜兰也能有较好的萌发效果。相较添加椰汁而言,添加土豆汁的培养基上原球茎和小芽分化均比较粗壮,萌发率也较好。前人对白花兜兰、小叶兜兰的研究表明^[18-20],添加椰汁更有利于种子的萌发,可能由于不同的培养体系所致。无菌播种后,前期的暗培养有利于白花兜兰的萌发,这与陈之林等^[21]的杏黄兜兰和硬叶兜兰等研

究结果相一致。

相较小叶兜兰和亨利兜兰,白花兜兰的种子萌发一致性较差,在继代过程中极易出现死亡现象,难度较大,这可能主要物种的自身特性有关。在继代过程中,通过适当延长培养周期、丛芽继代等方式可以得到有效缓解。与小叶兜兰和亨利兜兰相比,白花兜兰的野外分布和种群数量最为狭窄和稀少,尚未有关于其野外实生苗的研究和报道。在相关的科研和生产实践中,白花兜兰的种苗生产尚未实现成熟的产业化可能与此有关。因此,进行更深入的白花兜兰的无菌播种技术研究很有必要。

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.

[2] 曾宋君,田瑞雪,陈之林,等. 兜兰属植物杂交育种研究进展[J]. 热带亚热带植物学报,2010,18(2):459-468.

[3] 罗毅波,贾建生,王春玲. 初论中国兜兰属植物的保护策略及其潜在资源优势[J]. 生物多样性,2003,11(6):491-498.

[4] 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.

[5] 朱泉,田甜,杨澍,等. 兰科植物种子的非共生萌发研究进展[J]. 江苏农业科学,2009(9):205-208.

[6] 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.

[7] 曾宋君,陈之林,段俊,等. 带叶兜兰的无菌播种和离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2007,42(2):247.

[8] 田凡,颜凤霞,姜运力,等. 带叶兜兰无菌萌发及试管成苗技

术研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(9):30-33.

[9] 陈尔,陈宝玲,杨舒婷,等. 带叶兜兰非共生萌发试验[J]. 北方园艺,2016(22):100-103.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 李春华,邓克云,李柯澄. 兜兰的工厂化栽培(上)[J]. 花木盆景:花卉园艺,2016(5):38-40.

[13] 李春华,邓克云,李柯澄. 兜兰的工厂化栽培(下)[J]. 花木盆景:花卉园艺,2016(6):36-38.

[14] Arditti J, Clements G, Fast G, et al. Orchid seed germination and seedling culture-a manual in orchid biology: Reviews and perspectives[M]. New York: Comstock Publishing Associates,1982: 244-370.

[15] Rasmussen H N. Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant [M]. New York: Cambridge University Press,1995: 30-45.

[16] 刘其府,傅燕艳,曾宋君,等. 同色兜兰种子非共生萌发实验[J]. 广东农业科学,2012(12): 47-49.

[17] 胡琦敏,李勇毅,黄云峰,等. 海伦兜兰的无菌播种与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2016,52(9):1443-1448.

[18] 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]. 植物生理学通讯,2010,46(10):1071-1072.

[19] 张梅,胡瑾,周艳,等. 白花兜兰的无菌播种和离体快速繁殖[J]. 种子,2019,38(3):45-49.

[20] 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]. 植物生理学通讯,2010,46(11):1169-1170.

[21] 陈之林,叶秀舞,梁承邺,等. 杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子试管苗培养[J]. 园艺学报,2004,31(4):540-542.

Sterile Germination and Rapid Propagation Technique of Three Species of *Paphiopedilum*

YANG Li-ping¹, CHEN Li-wen¹, WANG Hua-yu², WANG Peng-liang², HE Gui-zheng¹, CHEN Nai-ming¹, YANG Qiong¹

(1. Qinzhou Forestry Research Institute, Qinzhou 535011, China; 2. Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China)

Abstract: In order to improve the artificial breeding technology system of the genus polygonu, in this article, the naturally matured pods of *Paphiopedilum emersonii*, *P. barbigerrum*, *P. henryanum* were collected for sterile germination and rapid propagation. The results showed that: regular disinfection technology of tissue culture and rapid propagation had good performance. The media 1/2MS+potato juice 100 mg·L⁻¹+ acticarbon 1 g·L⁻¹ was suitable for seed germination of *P. emersonii*, and it also had good germinating effect on *Paphiopedilum microphylla* and *Paphiopedilum henryi*. Keeping darkness in the early stage of the seed germination was good for *P. emersonii*. Compared to *P. barbigerrum* and *P. henryanum*, it was relatively hard to cultivate *P. emersonii*, including problems as germination inconsistency and seedling death in the secondary culture stage. This research had some reference value for *Paphiopedilum* in conservation and artificial breeding.

Keywords: *Paphiopedilum*; pod; sterile germination; rapid propagation