

· 小方法 ·

## 一种芽孢杆菌促进春兰等种子萌发试验方法初报

庞惠仙\*

昆明市林业科学研究所, 昆明 650223

春兰 [*Cymbidium goeringii* (Rchb. f.) Rchb. f.] (中国科学院植物研究所2006; 和积鉴1990) 又称朵朵香、草兰、山兰等, 本实验用的春兰品种有‘黄花春兰’、‘宽叶朵朵香’和‘荷瓣春兰’; 豆瓣兰 [*Cymbidium goeringii* (Rchb. f.) Rchb. f. var. *serratum* (Schltr.) Y. S. Wu et S. C. Chen] (和积鉴1990) 即线叶春兰, 本实验用的豆瓣兰品种是‘绿豆瓣’; 莲瓣兰 (*Cymbidium tortisepalum* Fukuyama) (潘光华2006) 又称小雪兰、卑亚兰, 本实验用的莲瓣兰品种有‘大花莲瓣’、‘白花莲瓣’和‘红莲瓣’。上述3种植物均为兰属 (*Cymbidium*) 植物中的地生种 (卢思聪2002)。

以通过人工授粉得到的‘黄花春兰’×‘绿豆瓣’ (组合1)、‘大花莲瓣’×‘绿豆瓣’ (组合2)、‘宽叶朵朵香’×‘荷瓣春兰’ (组合3)、‘白花莲瓣’×‘红莲瓣’ (组合4) 4种杂交组合、果实生长至八九分成熟、发育良好的蒴果为材料, 采用无菌播种方法进行处理, 即: 清理干净蒴果枯残花瓣, 蘸洗衣粉水仔细刷洗, 自来水下冲洗干净; 超净工作台上用酒精棉球擦拭消毒, 再浸入0.1%升汞液中消毒15 min, 无菌水洗2遍, 无菌纱布擦干蒴果表面水分; 在灭菌培养皿里切掉蒴果两头, 沿蒴果脊线切开果壳, 掰开将种子全部取出, 置于另一培养皿里, 用播种勺充分拌匀, 最后分别将种子均匀播种于配制好的培养基中, 各瓶的播种量尽量一致 (约1500粒), 培养瓶为6.5 cm×8.0 cm的罐头瓶。

种子萌发培养基采用1/2MS+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+1 g·L<sup>-1</sup>AC+8 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉固体培养基, pH值5.6, 其中组合1培养基未加AC; 采用无菌萌发的, 播种后每瓶滴入适量无菌水, 以润湿种子; 与芽孢杆菌共生萌发的, 用吸管滴入菌液10滴, 并向各方倾斜, 促使菌液均匀分布。其中1、4组合播种后随即接种Bs芽孢杆菌; 2、3组合在播种一年半后才接种Bs芽孢杆菌, 即在无菌萌发无效情况下接种Bs芽孢杆菌。

芽孢杆菌来源于本单位组培室, 即2005年初在观察春兰等种子萌发时偶然发现的: 受一种细菌感染1瓶种子萌发率特别高, 且萌发整齐, 随后将这瓶带细菌的培养基接种到其他4瓶无菌萌发培养瓶中进行验证, 种子萌发效果特别好, 萌发率高出无菌萌发的10倍以上。后经西南林学院杨斌先生初步鉴定为一种芽孢杆菌即: *Bacillus* sp. (以下简称Bs芽孢杆菌)。接种用芽孢杆菌在1/2MS+50 g·L<sup>-1</sup>马铃薯提取液+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖 (pH值5.6) 的液体培养基中, 常温下培养48 h后置于冰箱中低温保存待用。

接种后的培养瓶置于温度(23±3) °C培养室的培养架上, 不补充光照, 在室内散射光下进行萌发试验。定期观察种子变化及萌动情况, 及时分批将肉眼可见萌发小球或小根状茎在超净台上取出, 处理和转接, 并记录, 直至种子萌发完或确定该瓶种子不再萌发为止。试验期间, 培养基中水分蒸发后及时添加无菌水, 得到以下结果 (表1、2)。

(1) 4个杂交组合种子中, 除4组合外, 其余3个组合的种子无菌播种后基本上没有萌发 (表1)。

(2) Bs芽孢杆菌促进春兰杂交种子的萌发, 组合2的效果最好, 组合1和3的萌发效果也好; 而组合4的效果相对较差, 接种12个月后其种子才开始萌发, 但与Bs芽孢杆菌共生萌发时, 杂交种子的萌发率提高, 种子萌发所需时间缩短 (表2)。

(3) 接菌3 d后, Bs芽孢杆菌就在培养基表面形成一层雾状膜, 以后细菌逐渐向下扩散; 加入活性炭的培养基表面可见到灰白色菌膜; 不加活性炭的培养基表面有一层米汤样菌液, 并随着培养基中

收稿 2009-11-10 修定 2009-12-23

致谢 本文工作曾得到西南林学院杨斌先生、云南大学生态学与地植物学研究所苏文华先生和张光飞先生的帮助和指导。

\* 通讯作者 (E-mail: Panghx593@sohu.com; Tel: 0871-5159190)。

表1 无菌播种萌发情况

| 组合编号 | 播种日期(年-月-日) | 播种数/瓶 | 开始萌发时间/月 | 萌发总数/粒 | 萌发情况          |
|------|-------------|-------|----------|--------|---------------|
| 1    | 07-09-12    | 15    |          | 0      | 无萌发迹象         |
| 2    | 06-10-21    | 10    | 25       | 2      | 污染2瓶, 其余无萌发迹象 |
| 3    | 05-12-07    | 12    | 21       | 1      | 污染3瓶, 其余无萌发迹象 |
| 4    | 05-09-27    | 16    | 19       | 41     | 萌发仍在陆续进行      |

种子萌发形成的小球或小根状茎数量为种子萌发数(下同)。

表2 接种Bs芽胞杆菌后的萌发情况

| 组合编号 | 播种日期<br>(年-月-日) | 接菌日期<br>(年-月-日) | 接种数/<br>瓶 | 开始萌发<br>时间/月 | 萌发总数/<br>粒·瓶 <sup>-1</sup> | 萌发率/<br>% | 萌发情况        |
|------|-----------------|-----------------|-----------|--------------|----------------------------|-----------|-------------|
| 1    | 07-09-12        | 07-09-12        | 5         | 8            | 303                        | 20.2      | 污染2瓶, 萌发未结束 |
| 2    | 06-10-21        | 08-08-08        | 3         | 6            | 约417                       | 27.8      | 萌发尚未结束      |
| 3    | 05-12-07        | 07-05-11        | 3         | 4            | 354                        | 23.6      | 萌发尚未结束      |
| 4    | 05-09-27        | 05-09-27        | 3         | 12           | 138                        | 9.2       | 已萌发完毕       |

除组合4种子萌发完毕外, 其余3个组合的种子萌发尚未结束, 因此这3个组合的萌发率不是最终的萌发率。

水分的蒸发, 培养基色泽略显浑浊, 但不能明显分辨出培养基里有菌还是无菌, 而种子逐渐受细菌侵染, 呈灰白色湿润状, 一直持续至种子萌发。种子萌发时, 种胚逐渐膨大呈小颗粒状, 肉眼可见到白色亮点, 以后由小球逐渐发育成绿色棒状小根状茎。不同组合种子萌发时的形态不同, 组合1、组合3和组合4的萌发后呈棒状; 组合2萌发后多为球状, 无论何种形态, 最后都发育为分叉的丛状根状茎。组合1的种子刚开始萌发时萌发数量较少(平均每瓶仅有5粒), 2个月后逐渐增加, 至6个月时每瓶23粒; 10个月的萌发数量最多(每瓶达200粒), 以后萌发数量呈下降趋势。组合2、3的种子萌发很整齐、集中, 每次每瓶都能挑出上百个小球或小根状茎; 组合4的萌发过程与组合1的相似。

(4)带菌萌发形成的小根状茎, 经过灭菌后可进行无菌培养。方法是: 先将带菌根状茎用无菌水涮洗2~4次, 去除部分细菌后, 再根据根状茎的大小, 用0.1%升汞消毒液浸泡4~8 min, 充分摇晃几次, 最后用无菌水涮洗5~6次即可。生长势旺盛的杂交组合也可以带菌培养, 但培养基中不宜添加香蕉、马铃薯和椰乳。

#### 参考文献

- 和积鉴(1990). 昆明种子植物要览. 昆明: 云南大学出版社, 654  
 卢思聪(2002). 兰花栽培入门. 北京: 金盾出版社, 37~67  
 潘光华(2006). 兰属新宠莲瓣兰. 首届云南省兰文化学术研讨会文集, 玉溪兰花, 12(1): 10~11  
 中国科学院植物研究所主编(2002). 中国高等植物图鉴(第五册). 北京: 科学出版社, 746