

## 文山兜兰白变种的无菌播种和试管成苗

黄玮婷<sup>1,2</sup>, 曾宋君<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院华南植物园植物种质资源保存和可持续利用重点实验室, 广州 510650; <sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100039

## Asymbiotic Seed Germination and *in vitro* Seedling Development of *Paphiopedilum wenshanense* f. *album* Gruss & Petchl

HUANG Wei-Ting<sup>1,2</sup>, ZENG Song-Jun<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; <sup>2</sup>Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

**1 植物名称** 文山兜兰白变种(*Paphiopedilum wenshanense* f. *album* Gruss & Petchl)。

**2 材料类别** 种子。

**3 培养条件** 种子萌发和继代培养基: (1) 1/2MS; (2) 1/2MS+1 g·L<sup>-1</sup> 活性炭; (3) 1/2MS+1 g·L<sup>-1</sup> 活性炭+100 mL·L<sup>-1</sup> 椰子乳; (4) 1/2MS+1 g·L<sup>-1</sup> 活性炭+100 mL·L<sup>-1</sup> 椰子乳+NAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup> (单位下同); (5) 2 g·L<sup>-1</sup> 花宝1号(美国 Haponex 公司产品, N:P:K=7:6:19)+2 g·L<sup>-1</sup> 蛋白胨+1 g·L<sup>-1</sup> 活性炭+NAA 1.0+50 mL·L<sup>-1</sup> 椰子乳; (6) 2 g·L<sup>-1</sup> 花宝1号+2 g·L<sup>-1</sup> 蛋白胨+1 g·L<sup>-1</sup> 活性炭+NAA 1.0+50 mL·L<sup>-1</sup> 香蕉汁。壮苗培养基: (7) 1 g·L<sup>-1</sup> 花宝1号+1 g·L<sup>-1</sup> 花宝2号(美国 Haponex 公司产品, N:P:K=20:20:20)+2 g·L<sup>-1</sup> 蛋白胨+1.5 g·L<sup>-1</sup> 活性炭+NAA 1.0+50 g·L<sup>-1</sup> 土豆汁; (8) 1 g·L<sup>-1</sup> 花宝1号+1 g·L<sup>-1</sup> 花宝2号+2 g·L<sup>-1</sup> 蛋白胨+1.5 g·L<sup>-1</sup> 活性炭+NAA 1.0+50 g·L<sup>-1</sup> 香蕉汁; (9) 1 g·L<sup>-1</sup> 花宝1号+1 g·L<sup>-1</sup> 花宝2号+2 g·L<sup>-1</sup> 蛋白胨+1.5 g·L<sup>-1</sup> 活性炭+NAA 1.0+100 g·L<sup>-1</sup> 香蕉汁。以上培养基均附加 20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖和 6.5 g·L<sup>-1</sup> 琼脂, pH 5.2~5.4。培养温度为(25±2) °C, 光照强度为 30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照时间为 12 h·d<sup>-1</sup>。

### 4 生长与分化情况

**4.1 材料的无菌处理** 收取文山兜兰白变种人工授粉 180 或 240 d 的黄绿色荚果, 在超净工作台上用 75% 酒精的棉球擦拭干净蒴果表面, 用 75% 酒精浸泡 30 s, 再用 0.1% 升汞消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 次。用无菌滤纸吸干蒴果表面水分, 剪除上下两端, 纵向切开蒴果, 将灰色粉末状种子散落到播种培养基上。

**4.2 种子萌发和原球茎分化** 在光照培养条件下, 人

工授粉 180 d 的种子在所有播种培养基上均表现出比授粉 240 d 的种子具有高的萌发率, 适合于播种繁殖。人工授粉 180 d 的种子在培养基(1)~(6)中均能萌发; 在培养基(6)中萌发率低, 即使萌发, 种子发育形成的原球茎大部分也随后死亡, 其原因可能是香蕉汁中含有不利于种子萌发和早期生长的营养物质。在培养基(1)~(5)中, 培养基(1)中无活性炭, 种子萌发较快, 但萌发率较低, 40 d 左右形成白色原球茎, 50 d 左右转绿, 萌发率约为 30%, 但随后部分原球茎死亡, 在同样的培养基上继代培养, 根粗而长, 小苗生长不佳。培养基(2)中, 45 d 左右形成白色原球茎, 55 d 左右转绿, 萌发率约为 40% (图 1)。培养基(3)和(4)中由于加入了椰子乳和 NAA, 萌发率与培养基(2)相当, 均为 40% 左右, 但萌发后小苗生长状况较好; 特别是培养基(4)中由于加入了 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 的 NAA, 小苗生长较快。



图 1 文山兜兰白变种无菌萌发

收稿 2010-07-08 修定 2010-07-29

资助 国家科技支撑计划课题(2008BAC39B05)和广东省农业攻关项目(2009B020201009)。

\* 通讯作者 (E-mail: zengsongjun@scib.ac.cn; Tel: 020-37252990)。

**4.3 继代培养** 将萌发后 90 d 左右的无根小苗转移到相同的培养基中培养, 在培养基(5)的效果最好, 90 d 后小苗能生长至 1.5~2.0 cm (图 2); 而在培养基(3)和(4)中, 120 d 后小苗能生长至 1.5~2.0 cm; 在培养基(1)和(2)中的小苗生长效果较差; 而在培养基(6)中仍有部分小苗死亡。



图2 文山兜兰白变种继代培养

**4.4 壮苗培养** 将分化出具有 2~3 片叶、株高 1.5~2.0 cm 的小苗转入壮苗培养基(7)~(9)上培养, 培养基(8)的效果最好, 90 d 左右能形成 3~4 cm 高的植株, 生根率达 100%, 每株有 3~4 条根, 平均根长 3~4 cm; 而培养基(9)中由于含有 100 g·L<sup>-1</sup> 香蕉汁仍会引起大量小苗死亡, 成活的植株根系粗壮, 小苗生长差; 培养基(7)中用土豆汁代替(8)中的香蕉汁, 植株的生长状况明显较培养基(8)差。

**4.5 出瓶移栽** 当小苗长至 3~4 cm 高时, 将培养瓶置于温室中炼苗 1 周后, 从培养瓶中取出生根苗, 洗净根部附着的培养基, 采用进口智利水苔包裹或水浸泡过的树皮、碎椰壳和兰石(体积比为 1:1:2)的混合基质中种植, 种植器皿为口径 5 cm 的塑料营养杯。种植后, 对植株和基质表面喷施 800 倍多菌灵杀菌液, 置于通风的温室中栽培。移栽后, 注意保持适宜的湿度和温度, 7 d 内不要浇水, 随后进行正常水、肥和农药管理, 30 d 左右植株恢复生长, 种植 4 个月后统计, 小苗移栽成活率在进口水苔中可达 90% 以上, 而在树皮、碎椰壳和兰石的混合基质中为 82%。8 个月后可换至直径为 8.4 cm 的塑料营养杯中栽培(图 3)。

**5 意义与进展** 文山兜兰属于兰科兜兰属, 是珍稀的观赏植物, 属于“野生动植物濒危物种国际贸易公约”(CITES)附录 I 的保护对象而被禁止贸易。文山兜兰原产我国云南东南部文山县等地方, 生长于海拔 1 000~1 300 m 有茂密灌丛和草层的山坡上。它是巨瓣兜兰的近缘种, 萼片和花瓣上有紫褐



图3 文山兜兰白变种移栽成活的试管苗

色斑点, 但其退化雄蕊上有尾尖。它的白变种花瓣白色或淡黄色(图 4), 观赏价值更高, 同时还是十分珍稀的育种亲本, 扩大文山兜兰白变种的种群数量具有重要的科研价值和应用价值。文山兜兰白变种的常规繁殖可采用分株, 但由于母株少, 繁殖速度慢, 繁殖率低; 同时, 由于其种子无胚乳, 在野外需与真菌共生才能萌发, 发芽率极低。通过无菌播种能获得大量种苗。同属植物中的杏黄兜兰、硬叶兜兰、带叶兜兰、同色兜兰、彩云兜兰和长瓣兜兰的离体培养已有过报道(陈之林等 2004; 丁长春等 2005; 王莲辉等 2008, 2009; 曾宋君等 2006, 2009), 但文山兜兰及其白变种的种子离体快速繁殖尚未见报道。



图4 文山兜兰白变种母株

## 参考文献

- 陈之林, 叶秀胤, 梁承邨, 段俊(2004). 杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子试管培养. 园艺学报, 31 (4): 540~542
- 丁长春, 虞泓, 刘方媛, 魏兴强(2005). 杏黄兜兰胚培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 41 (1): 55~56
- 王莲辉, 姜运力, 余金勇, 罗在柒, 陈景艳(2008). 同色兜兰的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 44 (6): 1171~1172
- 王莲辉, 姜运力, 余金勇, 罗在柒, 陈景艳(2009). 长瓣兜兰的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 45 (9): 997~888
- 曾宋君, 陈之林, 段俊(2006). 带叶兜兰的无菌播种和离体快速繁殖. 植物生理学通讯, 42 (2): 247
- 曾宋君, 陈之林, 吴坤林, 段俊(2009). 彩云兜兰的离体快速繁殖. 植物生理学通讯, 45 (10): 1011~1012