

## 云南蜂腰兰的快速繁殖和离体保存

李春芳, 李爱花, 程治英, 杨俊波\*

中国科学院昆明植物研究所, 西南野生生物种质资源库, 昆明650204

### Rapid Propagation and *in vitro* Conservation of *Bulleyia yunnanensis* Schltr

LI Chun-Fang, LI Ai-Hua, CHENG Zhi-Ying, YANG Jun-Bo\*

Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, The Germplasm Bank of Wild Species in Southwest China, Kunming 650204, China

**1 植物名称** 云南蜂腰兰(*Bulleyia yunnanensis* Schltr)。

**2 材料类别** 新鲜种子和干冷保存种子(-20 °C、空气湿度 15% 条件下 130 d, 然后转入 10 °C、湿度为 37% 条件下保存 3、5、21 个月), 试管苗的小芽和假鳞茎切段。

**3 培养条件** 种子萌发培养基: (1) 花宝 1 号(美国 Haponex 公司产品, N:P:K=7:6:19) 3 g·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup> (单位下同)+ 活性炭 500, (2) 1/2MS+6-BA 3+NAA 5; 继代增殖和分化成苗培养基: (3) 1/2MS+6-BA 1+NAA 0.5; 试管苗小芽和假鳞茎丛生芽诱导培养基: (4) 1/2MS+6-BA 2+NAA 0.5; 拟原球茎诱导培养基: (5) 1/2MS+6-BA 0.2+NAA 0.2+矮壮素(CCC) 10; 生根壮苗培养基: (6) MS+NAA 2+香蕉泥10%+土豆泥 2%+ 活性炭 500。以上培养基均附加 0.56% 琼脂固化, 蔗糖浓度为 2%, pH 5.5~5.8。培养温度 (25±2) °C; 光照强度为 20 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** 取新鲜未开裂的荚果, 在无水酒精中浸透后取出, 迅速在酒精灯上过一下, 等火焰熄灭后放入无菌水中, 取出荚果用灭过菌的滤纸吸干水分, 切开荚果, 将种子抖入培养基上。将在低温干燥下保存的种子(荚果已开裂)抖入灭过菌的擦镜纸上, 包好后用 70% 酒精消毒 30 s, 0.1% 升汞溶液消毒 10 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 将种子接种至培养基上。

**4.2 种子萌发** 新鲜种子接种到培养基(1)上, 约 12 d 萌发形成原球茎, 萌发率达到 90% 以上, 随后转绿; 40 d 左右原球茎上端冒出叶尖, 60~90 d 形成小苗。在干冷条件下保存 3 个月的种子, 在培养基(1)上, 210 d 初始萌发数粒种子; 干冷条件下保存 5 个月的

种子在培养基(1)上, 240 d 开始萌发, 萌发率仅 5% 左右; 干冷条件下保存 21 个月的种子, 在培养基(1)上一直未萌发, 转到培养基(2)上培养 300 d 才开始有个别萌发。

**4.3 继代增殖和分化成苗** 种子萌发后在培养基(1)上继代培养 60 d 或 90 d, 90% 原球茎分化成小芽, 在培养基(1)上小苗可以增殖成为丛生芽, 但要费时半年左右; 若把小苗转入(3)上培养 30 d, 增殖的丛生芽可达 1:10 (图1), 剩余的少量原球茎也有增加, 但增殖率仅为 1:2。



图1 云南蜂腰兰丛生芽

**4.4 试管苗的芽和假鳞茎的丛生芽诱导** 将试管苗的芽切段和假鳞茎切段(长度约 0.5 cm)接种到培养基(4)上, 经过 90 d 左右的培养, 假鳞茎切段可形成数个不定芽, 芽切段可以增殖为丛生芽状(每块有 1~3 个芽或更多) (图 2)。此种方法可用于无种子情况下建立离体保存用的无性系, 但增殖率较低, 不适宜用于大量的快速繁殖。

收稿 2010-10-25 修定 2010-11-02

资助 中国西南野生生物种质资源库(0802261411)。

\* 通讯作者(E-mail: jbyang@mail.kib.ac.cn; Tel: 0871-5223139)。



图2 云南蜂腰兰诱导丛生芽分化

**4.5 拟原球茎的诱导** 用试管苗的芽段作外植体, 接种在培养基(5)上, 培养50 d后, 在芽段的基部开始形成拟原球茎; 又经过30 d的培养, 拟原球茎增殖加快, 增殖率可达到1:2~1:6 (图3)。将这些拟原球茎继代到培养基(1)上, 3~5 d即可分化小苗。

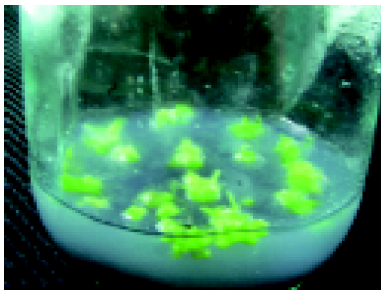


图3 云南蜂腰兰拟原球茎

**4.6 壮苗和生根培养** 将高度为2~3 cm的小苗转移到培养基(6)上, 小苗在长高、长壮的同时, 根数增多且增粗, 30 d后平均每株根数3~5条, 生根率达到100% (图4)。

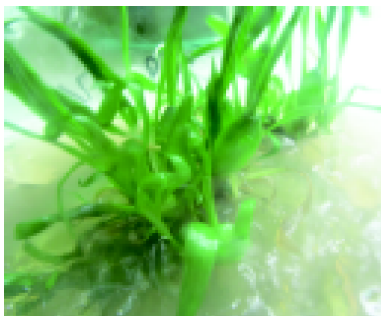


图4 云南蜂腰兰生根

**4.7 试管苗的移栽** 待组织培养苗高度达到7 cm左右时, 将培养瓶置于温棚中炼苗7 d; 取出试管苗, 用流水洗去根系上粘附的琼脂, 注意不要伤及苗的叶片和根尖; 试管苗用0.1%多菌灵浸泡10 min, 每丛2~3个苗种植于已消过毒的培养基质中(1 cm大小砖渣放入小盆底中, 占盆深的一半, 其上为苔藓或腐叶土+树皮=1:1), 浇足定根水, 保持苗的湿度在80%左右和温度在25 °C左右, 1周不浇水, 期间忌阳光直射。待20 d左右移栽苗长出新叶尖和新根后, 可以正常管理。成活率为90%以上(图5)。

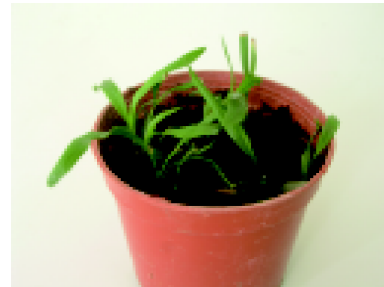


图5 云南蜂腰兰移栽苗

**5 离体保存** 种子萌发实验表明, 云南蜂腰兰最好的保存方式是离体保存, 它可以直观地看到物种活力, 克服种子保存成活率检测困难的问题。将云南蜂腰兰的离体培养物室温保存在培养基(1)上, 可以保存10~12个月; 采用低温保存(温度为12 °C, 湿度为70%), 可保存18个月以上(瓶盖用保鲜膜封口); 若瓶盖用石蜡封口, 目前已保存2~3年, 实验仍在进行中。

**6 意义与进展** 云南蜂腰兰为兰科单种属植物, 特产于云南西北部和东南部, 生于海拔1 300~2 500 m的林中树干上或荫蔽岩壁上。1992年被列为国家重点保护的野生植物, 1997年被国际上列入绝对禁止贸易的物种。它的花序长30~66 cm, 有花20朵左右, 具有较高的观赏价值和育种价值。兰科植物种子无胚乳, 在自然界与真菌共生才能萌发, 且发芽率极低(不到5%), 人工栽培常规的分株繁殖速度也较慢。本文建立了云南蜂腰兰的快速繁殖技术和保存方法, 为这一物种持续利用提供了保证。目前该植物的快速繁殖和离体保存尚未见报道。