

## 短距槽舌兰的驯化栽培与快速繁殖

周丽<sup>1\*</sup>, 徐正海<sup>2</sup>, 谭成敏<sup>1</sup>

<sup>1</sup>兴义民族师范学院, 贵州兴义562400; <sup>2</sup>黔西南州绿缘动植物科技开发有限公司, 贵州兴义562400

**摘要:**为促进短距槽舌兰的资源驯化栽培, 本文对其生物学特性、生长发育规律和组织培养快速繁殖技术进行了研究。对开花植株进行人工授粉, 取种子进行观察发现, 授粉后140 d种子才达到成熟状态; 将其接种在无植物生长调节剂的RE培养基上, 萌发率可达90%以上。将萌发的种子转接在RE+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+5 g·L<sup>-1</sup> 椰粉+2 g·L<sup>-1</sup> 水解酪蛋白的培养基上可诱导原球茎大量增殖。最适壮苗生根培养基为RE+0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+80 g·L<sup>-1</sup> 香蕉泥, 生根率100%。试管苗移栽到直径0.3~1.7 cm的小号细树皮盆栽中, 成活率在95%以上, 试管苗栽培6个月后可分化花芽, 这为短距槽舌兰的产业化生产奠定了基础。

**关键词:** 短距槽舌兰; 驯化栽培; 种子; 快速繁殖

## Domestication Cultivation and Rapid Propagation of *Holcoglossum flavescens*

ZHOU Li<sup>1\*</sup>, XU Zheng-Hai<sup>2</sup>, TAN Cheng-Min<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Xingyi Normal University for Nationalities, Xingyi, Guizhou 562400, China; <sup>2</sup>Southwest Guizhou Lvyuan Animal and Plant Technologies Company Limited, Xingyi, Guizhou 562400, China

**Abstract:** This study aimed to improve domestication and cultivation of *Holcoglossum flavescens*. The biological characteristics and growth habit were investigated, as well as optimizing of the technology of rapid micro-propagation with tissue culture. Observation indicated that the seeds of this species would take 140 days to reach mature state after artificial pollination. The mature seeds could germinate on the medium of RE without plant growth regulators with a frequency up to 90%. Transferred germinating seed to the medium of RE+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+5 g·L<sup>-1</sup> coconut powder+2 g·L<sup>-1</sup> casein acid hydrolysate greatly promoted the induction of protocorm proliferation. The optimum medium for seedling growing and rooting was RE+0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+80 g·L<sup>-1</sup> mashed banana, with the 100% rooting rate. The plantlets were transferred to 0.3–1.7 cm diameter pine bark, the survival rate could be up to 95%. After growing in pots for six months, the plantlets could begin to differentiation of flower bud, and be further used for industrial production.

**Key words:** *Holcoglossum flavescens*; domestication cultivation; seed; rapid propagation

短距槽舌兰是兰科槽舌兰属(*Holcoglossum*)微型单轴类植物, 多附生于森林树干上或林下石头上。短距槽舌兰为中国特有种, 属袖珍兰, 其形态优雅, 叶形清秀, 花色艳丽, 带有淡雅清香, 可植于浅盆或悬挂观赏, 十分典雅。在野外由于生存环境丧失、生长缓慢、单轴分枝特性和人为过度采挖等原因, 槽舌兰在中国已属濒危类群。目前, 国内外有关槽舌兰的研究和报道很少, 仅对其系统学、传粉系统变化和濒危状况进行报道(金效华和覃海宁2003a, b; Baker和Baker 2006), 未见有关槽舌兰保育生物学研究和人工繁殖的报道。本文研究了短距槽舌兰人工驯化栽培及与生殖有关的生物学特性, 通过种子瓶播法建立了高效快繁殖体系, 希望能够通过人工培育方法满足人类对其观赏的需求, 进而保护野生濒危资源。

## 材料与方法

### 1 实验材料

2010年从云南省大理白族自治州引种短距槽舌兰[*Holcoglossum flavescens* (Schltr.) Z. H. Tsi]后, 种植于贵州省兴义市纳录村绿缘公司大棚内。

### 2 驯化栽培方法

根据槽舌兰属附生兰的特性设置了中号松树皮(直径为1.5~2 cm)盆栽、小号松树皮(直径为0.3~0.7 cm)盆栽、水苔盆栽和蛇木板悬挂栽培4种方法。栽培盆子为3寸黑色营养钵, 蛇木板为12

收稿 2013-01-24 修定 2014-04-18

资助 贵州省教育厅项目[2011(278)号]和贵州教育厅项目[黔教科(2008095)号]。

\* 通讯作者(E-mail: zhouli@xynun.edu.cn; Tel: 18908599226)。

cm×18 cm, 每种方法30盆, 每盆3苗。大棚采用遮荫度为60%的遮阳网遮荫, 水分处理如下: 春、秋季节每天浇水1次, 早上10点左右进行; 夏季每天浇水2次, 早上7点和下午18点进行; 冬季气温在4~6 °C下每周浇水1次, 中午11点后进行。如果遇到连续下大雨, 空气湿度大时, 根据栽培基质干湿情况而定。

### 3 播种方法和培养条件

盛花期的早上10点进行人工授粉, 每个花序选取子房较大的2朵花授粉, 多余的花剪除。播种时剪取带果柄的果实, 洗净表面, 用75%酒精表面消毒30 s, 浸入95%酒精中1 s, 取出后在酒精灯上点燃, 待表面酒精烧尽即可(注意不要在酒精灯上烤), 剖开果实, 将种子撒播于培养基上。萌发培养基为: RE (Robert Ernst)+100 mL·L<sup>-1</sup>椰乳(CM)+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+7 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉, pH为5.8。培养条件: 光照强度25 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照周期16 h·d<sup>-1</sup>, 培养温度(25±2) °C。萌发率统计方法: 在培养瓶内取4个对角位置挑取一定量种子在显微镜下观察, 统计100粒种子情况, 胚膨大突破种皮者视为萌发。

### 4 原球茎增殖

原球茎增殖培养基为RE+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+7 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉, 其它添加成分见表1, pH为5.8。将播种70 d后萌发形成的原球茎转接在增殖培养基上, 每种培养基接种6瓶, 每瓶20处, 每处3~4个原球茎, 重复3次, 培养2个月后进行观察拍照。

表1 原球茎增殖培养基

Table 1 Media for propagation of protocorm-like body

培养基	有机添加物	6-BA浓度/ mg·L <sup>-1</sup>	NAA浓度/ mg·L <sup>-1</sup>
1	-	0.2	0.2
2	60 g·L <sup>-1</sup> 香蕉泥	0.2	0.2
3	-	0.4	0.4
4	60 g·L <sup>-1</sup> 香蕉泥	0.4	0.4
5	5 g·L <sup>-1</sup> 椰粉+2 g·L <sup>-1</sup> 水解酪蛋白	0.2	0.2
6	5 g·L <sup>-1</sup> 椰粉+2 g·L <sup>-1</sup> 水解酪蛋白	0.4	0.4
7	5 g·L <sup>-1</sup> 椰粉+2 g·L <sup>-1</sup> 水解酪蛋白	0.5	0.3
8	5 g·L <sup>-1</sup> 椰粉+2 g·L <sup>-1</sup> 水解酪蛋白	0.8	0.3

### 5 分化与壮苗培养

增殖的原球茎在分化培养基上培养50 d后, 将分化的小苗接种在不同的壮苗生根培养基进行定

苗培养。分化培养基为RE+0.8 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 添加7 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉、30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖和80 g·L<sup>-1</sup>香蕉泥。壮苗生根培养时, 每个处理接种6瓶, 每瓶接种18株苗, 重复3次, 接种2个月后观察, 5个月后出瓶统计小苗生长情况。所得数据用SAS V8软件进行方差分析。

## 实验结果

### 1 短距槽舌兰的生物学特性及驯化表现

短距槽舌兰茎很短, 仅有1~2 cm, 具6~10片基生的叶。叶肉质或厚革质, 二列, 半圆柱形且V字形对折, 长3.5~9.0 cm, 粗2.5~4.5 mm, 先端锐尖, 基部扩大成鞘(中国科学院中国植物志编辑委员会2006)。总状花序, 1~2个, 从茎基部叶鞘内长出, 短于叶, 花序具花1~3朵, 极少数4朵, 花期3月底至5月底, 花萼片及花瓣纯白色, 唇瓣白色有红紫色条纹, 中部有一黄色胼胝体, 花朵具有淡雅清香, 极具观赏价值(图1-A)。短距槽舌兰生长缓慢, 1年仅生长2~4片叶, 但开花性好, 每年均能开花。每年11月初开始分化出可见花芽, 次年2月中下旬进入抽梗期, 3月下旬进入始花期, 4月中旬进入盛花期, 5月上旬进入谢花期, 在盛花期进行人工授粉, 采用同种异株授粉, 结实率高达91.03% (图1-B)。短距槽舌兰抗寒性强, 在兴义市无加温大棚内, 冬季偶尔夜间低温为-3 °C, 金钗石斛、玫瑰石斛、香花兜兰和德氏兜兰等发生冻害时, 短距槽舌兰仍然可安全越冬。

表2显示, 在几种栽培基质和栽培方式中, 中号和小号树皮盆栽的效果较好。销售时盆栽所用基质以介于中号与小号之间的直径0.8~1.2 cm的松树皮为好, 盆面铺一层水苔, 既美观又能保持基质适宜湿度。

### 2 短距槽舌兰的种子生物学特性及无菌播种

表3显示, 授粉后70 d (70 days after pollination, 70 DAP)时, 果柄长1.5~1.9 cm, 果实长1.95~2.86 cm, 果实宽0.48~0.79 cm, 果实大小趋于稳定, 但是种子还未形成; 90 DAP后开始有肉眼可见的细小种子密生在胎座; 120 DAP以后种子趋于成熟; 140 DAP的种子散播在萌发培养基上, 20 d后可观察到种子有明显膨大, 60 d有绿色原球茎形成(图1-C), 萌发率可达90%以上。

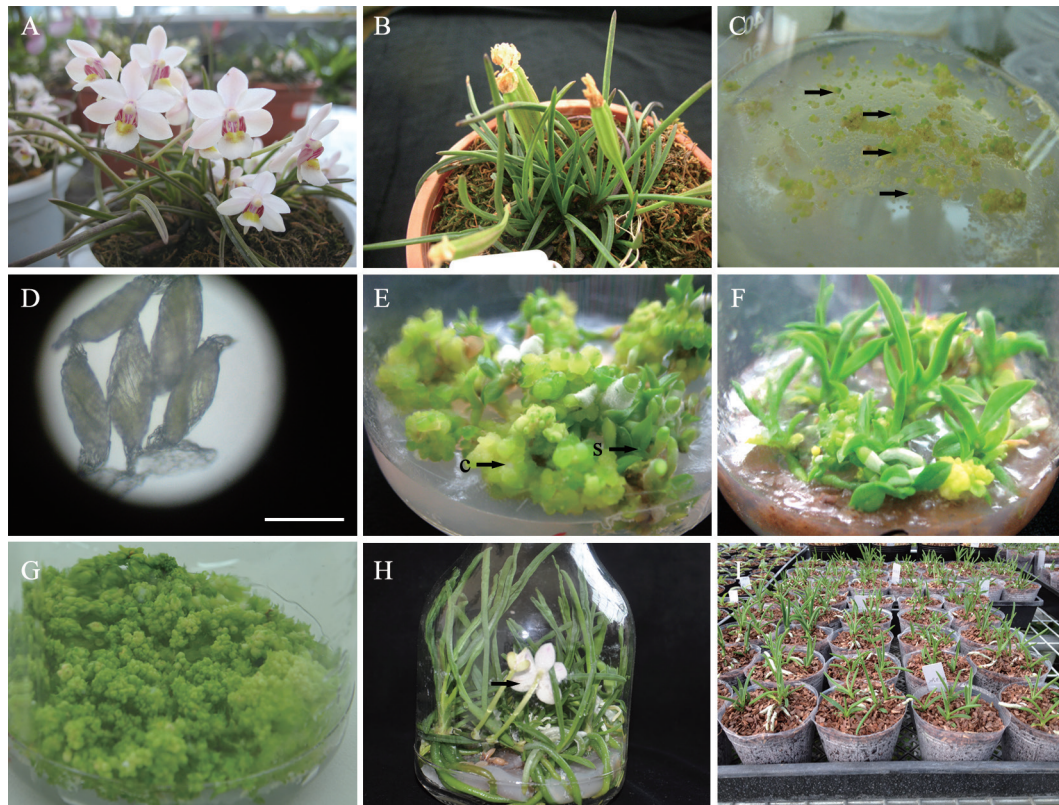


图1 短距槽舌兰的快速繁殖

Fig.1 Rapid propagation of *H. flavescens*

A: 短距槽舌兰开花; B: 短距槽舌兰结果; C: 播种60 d, 萌发较早的原球茎已分化(箭头所示); D: 成熟种子, 比例尺0.1 mm; E: 培养基(1)和(3)上产生愈伤组织(c)和分化生长的小苗(s); F: 培养基(2)和(4)上以小苗生长为主; G: 培养基(5)~(8)上原球茎增殖; H: 试管内分化花芽并开花(箭头所示); I: 试管苗移栽。

表2 栽培基质及方式对驯化栽培的影响

Table 2 Effects of potting media and methods on domestication cultivation

栽培基质及方式	栽培基质的效果
中号松树皮盆栽	基质颗粒较大, 透气性好, 在大棚内栽培较好控制空气湿度, 根系和小苗生长良好, 花分化正常。建议用于生产中的大苗栽培。
小号松树皮盆栽	基质颗粒小, 有一定的透气性, 保水性好, 根系和小苗生长良好。适于生产中小苗或试管苗出瓶栽培使用。
水苔盆栽	基质保水性极好, 但失水后不易重新完全吸水, 在夏季时易造成烂根, 且基质使用周期短, 当水苔开始变白时控水性降低, 就必须及时更换。不建议使用。
蛇木板悬挂栽培	透水极好, 在本实验管理水平下, 因为达不到所需空气湿度, 所以在干热的夏季和干燥的春秋季节, 根系易发干死亡, 花可正常分化。如果采用此法, 需要增加喷水、喷雾次数和时间以提高空气湿度, 所以不适宜在贵州省兴义市采用。

### 3 短距槽舌兰的原球茎增殖研究

接种在培养基(1)和(3)上的原球茎除少数分化形成小苗, 底部接触培养基的原球茎绝大多数产生愈伤组织, 顶部的原球茎膨大并且开始脱分化(图1-E)。培养基(2)和(4)上的原球茎绝大多数继续分化形成完整小苗, 仅产生少量的愈伤组织(图

1-F)。接种在培养基(5)~(8)上的原球茎增殖效果很好, 除培养基(8)中有极少部分原球茎分化形成小苗外, 其它的均在培养基表面形成一层厚厚堆积的原球茎(图1-G)。

原球茎增殖实验表明, 在NAA浓度与6-BA浓度比值相等的情况下, 不含添加物的培养基中可



表3 授粉后不同时期种子的发育程度

Table 3 Development degree of seeds at different stages after pollination

DAP	果实及种子特性	种子发育程度
70	果实外观形态大小稳定, 内部充满细长的无色透明弹丝, 肉眼无法看见种子, 显微镜下可见胎座上细小种子正在发育。	种子仍发育中
90~110	果实内充满白色弹丝, 形成细小的种子, 将其从胎座上刮下于显微镜下观察, 种子内有明显可见胚, 胚较小, 胚与种皮间有间隔。	种子形成, 但未成熟
120~140	种子细小, 种子密生在胎座上较易从胎座上刮下, 种子内胚大小趋于稳定, 胚饱满充满种皮(图1-D)。	种子成熟
150~170	果皮变薄, 内部胎座及弹丝显得干燥, 种子可自行从胎座上散落出来。	种子完全成熟

以产生大量愈伤组织, 但原球茎不能增殖, 出现少量分化小苗的原因在于: 同一个果实内的种子萌发程度有一定的差异, 在转接原球茎时有少部分是已经发生分化的。因此, 这些已经分化的原球茎在培养基(1)和(3)中只能继续分化成小苗。在含有香蕉泥的培养基中, 原球茎以分化成苗为主, 有少部分原球茎形成愈伤组织, 香蕉泥有利于原球茎分化成苗, 继续培养5~6个月后可以出瓶移栽。在添加椰粉和水解酪蛋白并且6-BA与NAA浓度比值相等或接近的培养基(5)、(6)和(7)中, 原球茎增殖效果极好, 没有分化现象发生。在NAA浓度较高的培养基(8)中, 原球茎也可以很好的增殖, 但是有少量分化现象发生。培养基(5)可作为原球茎增殖的最佳培养基, 因为其中植物生长调节剂用量少, 既节约用药, 又可减少多次增殖培养造成生长调节剂在原球茎内的累积。

#### 4 短距槽舌兰的壮苗生根与移栽

增殖原球茎在分化培养基上培养50 d后分化出具有2片叶、2~3条较短根的小苗, 将其转接到壮苗生根培养基上。培养2个月后观察, R<sub>1</sub>中的小苗根短, 根表面密生白色绒毛, 根反翘背向培养基

生长, 叶生长量不大; R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>与R<sub>1</sub>中的表现相似。R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>中根长较长, 叶也较长, 总体表现优良。R<sub>4</sub>中根长得最短最粗, 叶生长量相对较小, 表现不佳。R<sub>7</sub>中根叶分化正常。在壮苗生根培养基上生长5个月, 各类培养基中均能得到可移栽小苗(表4), 但是R<sub>1</sub>、R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>中的单株生长量低, 根系在培养基表面交错网结, 再加上根表面的绒毛粘结在一起, 出瓶时操作不方便而且容易伤根。R<sub>4</sub>中单株重量较低, 而且根生长量大于叶生长量, 可见过高浓度NAA使其根又短又粗, 不利于壮苗生根。R<sub>7</sub>中根叶生长量相当, 且叶长得较宽。壮苗生根表现最好培养基是R<sub>3</sub>, 在根长、叶长和单株重等方面均为最优。总体看来, 试管苗在根条数和叶宽度这两个指标上差异不是很大, 这是物种本身特性的体现。壮苗生根培养6个月时, 一些大的苗在试管内出现分化花芽和开花现象(图1-H)。

试管苗出瓶移栽时用小号细树皮栽植于3寸透明营养钵中, 每盆4苗, 加强水分管理, 成活率在95%以上(图1-I)。1个月后每周施用1 000倍“花多多11号”(美国施可得公司) 1次。当年5月出瓶的小苗, 栽培6个月后有70%的大苗相继分化出花芽。

表4 生长调节剂对短距槽舌兰壮苗生根的影响

Table 4 Effects of plant growth regulators on the rooting of the plantlets of *H. flavescens*

培养基	6-BA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	NAA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	生根数/条	根长/cm	根粗/mm	叶数/片	叶长/cm	叶宽/mm	单株重/g
R <sub>1</sub>	0.2	0.1	6.67 <sup>B</sup>	3.77 <sup>C</sup>	2.75 <sup>BC</sup>	5.17 <sup>BC</sup>	3.38 <sup>C</sup>	2.53 <sup>B</sup>	1.54 <sup>D</sup>
R <sub>2</sub>	0.2	0.4	7.17 <sup>B</sup>	4.90 <sup>B</sup>	2.99 <sup>B</sup>	5.83 <sup>B</sup>	3.98 <sup>C</sup>	2.57 <sup>B</sup>	2.32 <sup>BC</sup>
R <sub>3</sub>	0.2	0.6	10.50 <sup>A</sup>	6.88 <sup>A</sup>	2.66 <sup>C</sup>	6.83 <sup>A</sup>	6.34 <sup>A</sup>	2.65 <sup>AB</sup>	4.23 <sup>A</sup>
R <sub>4</sub>	0.2	1.0	7.50 <sup>B</sup>	2.39 <sup>D</sup>	3.57 <sup>A</sup>	6.00 <sup>AB</sup>	3.38 <sup>C</sup>	2.94 <sup>A</sup>	1.93 <sup>CD</sup>
R <sub>5</sub>	0.3	0.1	7.50 <sup>B</sup>	3.58 <sup>C</sup>	2.76 <sup>BC</sup>	5.67 <sup>BC</sup>	3.26 <sup>C</sup>	2.97 <sup>A</sup>	1.83 <sup>CD</sup>
R <sub>6</sub>	0.3	0.2	11.50 <sup>A</sup>	3.92 <sup>BC</sup>	2.91 <sup>BC</sup>	6.83 <sup>A</sup>	4.83 <sup>B</sup>	2.80 <sup>AB</sup>	2.95 <sup>B</sup>
R <sub>7</sub>	0.4	0.4	8.00 <sup>B</sup>	4.52 <sup>BC</sup>	2.67 <sup>C</sup>	4.83 <sup>C</sup>	3.30 <sup>C</sup>	2.91 <sup>A</sup>	2.00 <sup>CD</sup>

同一列中不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

## 讨 论

本文表明,短距槽舌兰成熟种子细小,呈卵圆形,形态饱满,翅极短,播种于无生长调节剂的培养基上萌发率可达90%以上。短距槽舌兰成熟种子萌发率高,原球茎在增殖培养基上有形成愈伤组织、原球茎增殖和分化成苗3种发育方式。同一培养基上既能诱导愈伤组织又能分化成苗的原因是:同一果实内种子成熟度存在差异,在萌发培养基上萌发早的种子较早进入分化状态,转入本实验的增殖培养基后继续分化成苗;刚萌发的还处于未分化状态的原球茎转入增殖培养基后,可增殖产生更多原球茎或产生愈伤组织。种子萌发后所处的状态对其在增殖培养基中是分化生长还是形成增殖的原球茎有重要影响。

兰属、兜兰属的瓶播试管苗栽培3~4年后才

能开花,生产周期较长。短距槽舌兰在壮苗生根培养基上生长5~6个月后,形成具8~10片5~6 cm长叶片的大苗时,便可分化花芽。试管苗栽培后当年可分化花芽,便于规模化生产时的花期调控,可大大缩短商品生产周期。

## 参考文献

- 金效华,覃海宁(2003a). 槽舌兰属高山组植物的物种形成. 中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编. 北京: 中国植物学会, 31
- 金效华,覃海宁(2003b). 中国槽舌兰属的濒危状况调查. 中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编. 北京: 中国植物学会, 32~33
- 中国科学院中国植物志编辑委员会(2006). 中国植物志(第19卷). 北京: 科学出版社, 425~426
- Baker C, Baker M (2006). *Holcoglossum flavescens*: a miniature Chinese orchid for growing in diffused light. *Orchid*, 75 (5): 382~384