

杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子试管培养

陈之林 叶秀琳* 梁承邨 段俊

(中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 杏黄兜兰 (*Paphiopedilum armeniacum*) 和硬叶兜兰 (*P. micranthum*) 受粉后 120 d 和 180 d 的种子接种到 1/4 MS, MS, R, KC, VW 和花宝 1 号培养基上进行试管培养。低盐浓度的培养基较适宜兜兰种子萌发, R 培养基效果最好, 萌发率可达 30% 以上; 果荚采收的时间对种子萌发有重要的影响; 添加 200 mL · L⁻¹ 的椰子乳可促进种子萌发。育苗培养基中添加活性炭 2 mg · L⁻¹ 和香蕉匀浆 100 g · L⁻¹ 有利于种子苗生长。

关键词: 兜兰; 杏黄兜兰; 硬叶兜兰; 试管培养

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 04-0540-03

Seed Germination in Vitro of *Paphiopedilum armeniacum* and *P. micranthum*

Chen Zhilin, Ye Xiulin*, Liang Chengye, and Duan Jun

(South China Botany Garden, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The seeds take from capsules harvested 120 days and 180 days after pollination of *Paphiopedilum armeniacum* and *P. micranthum*. These were inoculated on 1/4MS, MS, R, KC, VW and "Hyponex 1" media. All the germination was recorded in 120 days after pollination for both two species. The higher germination rate get in lower salt concentration medium than higher salt concentration medium. R medium is the best for germination in test. Coconut milk stimulate germination. The addition of activated charcoal 2 g · L⁻¹ and banana homogenate 100 g · L⁻¹ is benefit for growth and development of seedlings.

Key words: *Paphiopedilum*; *P. armeniacum*; *P. micranthum*; Germination in vitro

1 目的、材料与方法

杏黄兜兰 (*Paphiopedilum armeniacum*) 和硬叶兜兰 (*P. micranthum*) 是我国特有的兜兰原生种, 是国家一级重点保护的濒危物种, 具有极高的观赏价值。兰科植物种子没有胚乳, 萌发时需要共生真菌提供营养, 在自然条件下萌发困难, 利用人工培养基可以代替共生真菌使种子萌发。兜兰属是兰科植物中种子试管培养最困难的属之一, 目前国内未见杏黄兜兰和硬叶兜兰种子培养的报道, 开展这两种兜兰的试管培养, 有利于其保护和开发。

试验材料为华南植物园温室栽培的杏黄兜兰和硬叶兜兰。种子萌发培养基分别为 1/4MS、MS、R^[1]、KC、VW 和花宝 1 号 (3 g/L) 无机盐成分, 附加 B5 维生素成分 (肌醇 100 mg · L⁻¹ + V_{B1} 10 mg · L⁻¹ + V_{B6} 1 mg · L⁻¹ + 烟酸 1 mg · L⁻¹), 蔗糖 15 g · L⁻¹, Gellan gum 3 g · L⁻¹, pH 5.4。其中 KC 培养基再分别加入椰子乳 200 mL · L⁻¹、胰蛋白胨 1 g · L⁻¹、酵母提取物 1 g · L⁻¹。育苗培养基为 R 萌发培养基。壮苗培养基为育苗培养基中加入活性炭 2 g · L⁻¹、香蕉匀浆 100 g · L⁻¹、NAA 1 mg · L⁻¹。

于 2000 年 3 月选取生长强健、整齐的植株在花开放 1 d 后进行自花授粉, 分别在授粉后 120 d 和 180 d 时取下果荚置于 70% 酒精浸泡 30 s, 0.1% 升汞灭菌 15 min, 无菌水清洗 5 遍, 切开果荚, 将种

收稿日期: 2003-09-20; 修回日期: 2003-11-17

基金项目: 广东科技厅科技计划项目 (c20304、2002A2040801、2003A2010401); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (kscx2-sw-319)

* 通讯作者 Author for correspondence

子均匀地撒到培养基表面。培养条件: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 暗培养 3 周后转到光下培养, 光照 12 h/d , 光照强度 $1500 \sim 2000 \text{ lx}$ 。种子培养 4 周后, 在解剖镜下观察, 以种子膨大形成白色原球茎为发芽标准, 进行萌发率统计, 待原球茎转绿出芽后, 将原球茎转入育苗培养基中培养, 在小苗出现两片叶后, 转到壮苗培养基上培养, 3~4 个月后出瓶栽培。

2 结果与讨论

2.1 果荚成熟度和培养基对兜兰种子萌发的影响

两种兜兰种子在 R 培养基上萌发率最高, 硬叶兜兰 (图版, 1) 和杏黄兜兰分别可达 32.4% 和 25.2%; 在 MS 培养基上萌发率最低, 硬叶兜兰仅有极少种子萌发, 而杏黄兜兰没有萌发; 但采用 1/4MS 培养基则分别有 11.0% 和 8.1% 的萌发率。可见培养基的盐分组成和盐浓度是影响种子萌发的重要因素。果荚采收的时间对种子萌发有重要的影响, 生长 120 d 的种子可萌发, 而 180 d 的种子, 果荚已近开裂, 种子为黑色, 在本试验中没有萌发, 这可能是由于完全成熟的种子进入了休眠期或产生了某些抑制物质的原因。胚的发育阶段对种子萌发的影响有待进一步研究。试验结果表明授粉 120 d 后播种, 杏黄兜兰的萌发率在各供试培养基上较硬叶兜兰的低 (表 1)。

种子萌发后形成原球茎, 播种 3 周后可见白色原球茎出现, 及时转到光下培养, 多数原球茎长大并转绿。8 周后有芽长出。如种子萌发后不及时转到光下培养而继续暗培养 4 周, 则原球茎可生长膨大, 颜色为白色, 转到光下后大多数原球茎不能转绿成苗。这可能是在兜兰种子萌发过程中需要光的缘故。部分萌发的种子出现褐死现象, 推测供试培养基仍然不是其最佳生长培养基所致。

2.2 有机添加物对兜兰种子萌发的影响

一般认为在兰花及其它植物的胚培养基中加入适量的椰子乳对种子的萌发有利, 本试验中 $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 椰子乳对两种兜兰种子的萌发都有较好的促进作用, 但在后期成苗时会产生一胚多苗现象, 部分苗生长不正常。椰子乳中含有大量的植物激素, 可能引起种子形态发育的改变。胰蛋白胨和酵母提取物的添加对种子的萌发没有显著的影响, 但种子的萌发和苗的生长较快。试验表明, 在培养基中添加适当的有机添加物有利于兜兰种子的萌发和生长 (表 2)。在兰科植物组织培养时常常添加各种有机物, 促进培养物的生长与分化, 虽然添加物的成分复杂, 难以确定其有效因素, 但效果显著, 在生产上有较高的应用价值。

2.3 育苗与移栽

在兜兰原球茎转绿出芽后进行 1 次转瓶, 培养基采用萌发效果最好的 R 萌发培养基, 1 个月后可见兜兰叶片伸展及有根长出 (图版, 2)。及时转移到壮苗培养基上, 添加活性炭 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和香蕉匀

表 1 果荚成熟度和培养基对兜兰种子萌发的影响

Table 1 Effect of capsule's maturity and medium composition on seed germination in vitro of *Paphiopedilum* spp. (%)

培养基 Medium	硬叶兜兰 <i>Paphiopedilum micranthum</i>		杏黄兜兰 <i>Paphiopedilum armeniacum</i>	
	120 d 果龄 Fruit growth time 120 d	180 d 果龄 Fruit growth time 180 d	120 d 果龄 Fruit growth time 120 d	180 d 果龄 Fruit growth time 180 d
MS	$2.9 \pm 1.5\text{aA}$	0	0aA	0
1/4MS	$11.0 \pm 1.2\text{bB}$	0	$8.1 \pm 0.8\text{cC}$	0
VW	$17.3 \pm 1.6\text{cD}$	0	$7.2 \pm 1.0\text{bcBC}$	0
R	$32.4 \pm 4.1\text{dE}$	0	$25.2 \pm 2.5\text{eE}$	0
KC	$16.1 \pm 3.0\text{cC}$	0	$11.6 \pm 1.4\text{dD}$	0
花宝 1 号 Hyponex 1	$9.5 \pm 1.0\text{bB}$	0	$5.9 \pm 1.0\text{bB}$	0

注: 数字后不同大、小写字母表示差异达 0.01、0.05 显著水平, 下同。

Note: The different capital and small letter after figures indicated significance at $P=0.05$ or 0.01 level, respectively. The same below.

表 2 椰子乳、胰蛋白胨和酵母提取物对兜兰种子萌发率的影响

Table 2 The effect of coconut milk, tryptone and yeast extract on germination rate of *Paphiopedilum* spp. (%)

有机添加物 Organic supplement	硬叶兜兰 <i>P. micranthum</i>	杏黄兜兰 <i>P. armeniacum</i>
对照 Control	$16.1 \pm 3.0\text{abA}$	$11.6 \pm 1.4\text{bA}$
椰子乳 Coconut milk ($200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)	$28.3 \pm 1.8\text{cB}$	$23.1 \pm 1.7\text{cB}$
胰蛋白胨 Tryptone ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$19.2 \pm 4.1\text{bA}$	$12.9 \pm 2.1\text{bA}$
酵母提取物 Yeast extract ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$13.2 \pm 2.5\text{aA}$	$8.5 \pm 1.6\text{aA}$

注: 基本培养基为 KC 培养基。Note: Use KC medium as base medium.

浆 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 有利于小苗的生长, 3 个月后长成为出瓶移栽的壮苗 (表 3)。在不加生长素的壮苗培养基上, 兜兰小苗也可正常生根, 加入 NAA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上苗的根较粗壮, 植株健壮 (图版, 3)。

出瓶前将培养瓶置栽培温室中炼苗 2 周, 取出小苗, 将培养基洗去, 栽培在“植金石”和火山石混合配制成的基质中, 保持较高的空气湿度, 成活率可达 70% 以上 (图版, 4)。

表 3 培养基中添加香蕉浆、活性炭和 NAA 对育苗的影响

Table 3 The effect of Banana, active C and NAA on grow of *Paphiopedilum micranthum*

添加物 Supplement ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均株高 Plant height (cm)	平均根数 No. of root	平均鲜样质量 Fresh mass (g)
对照 Control	$3.19 \pm 0.34 \text{aA}$	$4.06 \pm 1.25 \text{aA}$	$0.63 \pm 0.18 \text{aA}$
香蕉浆 Banana100 + AC 2	$4.35 \pm 0.47 \text{bB}$	$4.18 \pm 0.88 \text{aA}$	$1.14 \pm 0.18 \text{bB}$
香蕉浆 Banana100 + AC 2 + NAA0.001	$4.2 \pm 0.52 \text{bB}$	$4.19 \pm 1.10 \text{aA}$	$1.33 \pm 0.17 \text{bC}$

注: 基本培养基为 B 培养基

Note: Use B medium as base medium.

参考文献:

- 1 Joseph Arditti. Orchid Biology, reviews and perspective II. Cornell University press, 1982. 271 ~ 275



图版说明: 1. 硬叶兜兰种子萌发, 形成原球茎; 2. 在 R 培养基上硬叶兜兰形成植株; 3. 硬叶兜兰在壮苗培养基上生根、生长; 4. 移栽成活的硬叶兜兰小苗。

Explanation of plates: 1. Seeds germination and protocorm formed of *P. micranthum*; 2. *P. micranthum* plantlet formed on R medium; 3. *P. micranthum* seedlings rooting on grow medium; 4. Transplanted plantlets of *P. micranthum*.

欢迎购阅下列新书

- | | | |
|----------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 4-1 《花卉无上栽培》23 元 | 4-18 《中国果树志·荔枝卷》67 元 | 5-1 《中国蔬菜病虫害原色图谱》(第三版·无公害) 69 元 |
| 4-2 《花卉组织培养》23 元 | 4-19 《中国果树志·龙眼、枇杷卷》80 元 | 5-3 《中国果树病虫害原色图谱》60 元 |
| 4-3 《花卉化学控制》23 元 | 4-20 《中国果树志·梅卷》68 元 | 5-4 《中国花卉病虫害原色图鉴》(上、下) 158 元 |
| 4-4 《花卉贮藏保鲜》23 元 | 4-21 《中国果树志·苹果卷》134 元 | 5-5 《中国果树病虫害原色图谱》(第二版) 101 元 |
| 4-14 《中国果树志·枣卷》56 元 | 4-22 《中国果树志·桃卷》110 元 | ※ 《园艺学报》2000 增刊 10 元 |
| 4-15 《中国果树志·李卷》100 元 | 4-29 《中国果树志·杏卷》165 元 | ※ 《园艺学报》2001 增刊 10 元 |
| 4-16 《中国果树志·核桃卷》76 元 | 4-23 《中国木本植物种子》200 元 | ※ 《园艺学报》2002 增刊 10 元 |
| 4-17 《中国果树志·山楂卷》56 元 | | |

以上价格已含邮资。购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号《园艺学报》编辑部, 邮编: 100081。