

多花兰种子无菌萌发及离体快繁研究

唐凤鸾¹, 江海涛², 赵志国¹, 付传明¹, 石云平¹, 黄宁珍^{1*}

(1. 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 2. 广西国有维都林场, 广西 来宾 546100)

摘要: 以多花兰种子为材料, 研究了无机盐浓度、植物生长调节剂和光照条件对多花兰种子非共生萌发的影响, 在此基础上, 通过研究原球茎增殖和分化、芽苗壮苗和生根的培养基配方及培养条件, 建立多花兰组培快繁技术体系。结果表明: 多花兰种子萌发培养基为 $1/6$ MS+NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +马铃薯泥 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +AC $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 光照度为 $1.25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 萌发率 63.6%; 原球茎增殖继代培养基为 $1/4$ MS+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +AC $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +PE $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 繁殖倍数 6.5 倍/60 d, 芽分化率 60.2%; 再生芽分化培养基为 $1/4$ MS+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +AC $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +PE $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 繁殖倍数 4.0 倍/60 d, 芽分化率 85.0%; 芽苗壮苗和生根培养基为 $1/6$ MS+6-BA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +AC $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +PE $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1/4$ MS+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +AC $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +PE $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 生根率达 100%, 生根苗移栽成活率 90%。此技术可用于多花兰种苗繁育和种质资源保护。

关键词: 多花兰; 原球茎; 增殖与分化; 无机盐浓度; 植物生长调节剂

中图分类号: Q945.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2012)06-0793-07

Germfree germination of seeds and rapid proliferation *in vitro* of *Cymbidium floribundum*

TANG Feng-Luan¹, JIANG Hai-Tao², ZHAO Zhi-Guo¹,
FU Chuan-Ming¹, SHI Yun-Ping¹, HUANG Ning-Zhen^{1*}

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2. Guangxi Wei Du State-owned Forest Farm, Laibin 541000, China)

Abstract: *Cymbidium floribundum* seeds were used to investigate the effects of salt contents, plant growth regulators and light on seed asymbiotic germination. Based on this, the tissue culture and rapid propagation technical system of *C. floribundum* were established, by investigating the medium formula and culture conditions of proliferation and redifferentiation of protocorm, strong seedlings and rooting of bud. The optimal medium for asymbiotic germination of *C. floribundum* seeds was $1/6$ MS+NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + meshed potato $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +AC $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; the light-intensity of culture was $1.25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; the seed germination rate was 63.6%. The optimal medium for sub-culture for protocorm multiplication was $1/4$ MS+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +AC $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +PE $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; the proliferation coefficient was 6.5/60 d; the bud redifferentiation rate was 60.2%. The optimal medium for bud redifferentiation was $1/4$ MS+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +AC $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +PE $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; the prolifera-

收稿日期: 2012-04-21 修回日期: 2012-09-05

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 10100012-5); 广西林业厅项目(桂林科字[2011]第 07 号); 桂林市科技开发项目(20120113-4); 广西植物研究所基本业务费(桂植业 11007) [Supported by the Technologies R & D Program of Guangxi (10100012-5); Program of Guangxi Forestry Department(2011-07); Scientific Research and Technology Development Program of Guilin(20120113-4); Fundamental Research Fund of Guangxi Institute of Botany(11007)]

作者简介: 唐凤鸾(1978-), 女, 广西全州人, 助理研究员, 主要从事生物技术研究工作, (E-mail) tangfengluan@yahoo.com.cn.

* 通讯作者: 黄宁珍, 研究员, 从事兰科植物保护与繁育研究, (E-mail) huangnz@gxib.cn.

tion coefficient was 4.0/60 d; the bud redifferentiation rate was 85.0%. The optimal medium for strong seedlings and rooting were 1/6 MS+6-BA 3.0 mg · L⁻¹+NAA 1.0 mg · L⁻¹+AC 1.0 g · L⁻¹+cane sugar 20 g · L⁻¹+PE 200 g · L⁻¹ and 1/4 MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+NAA 1.2 mg · L⁻¹+AC 1.0 g · L⁻¹+cane sugar 20 g · L⁻¹+PE 200 g · L⁻¹, respectively. The rooting percentage was 100%, and transplants survival rate reached 90%. This technology could be used to seedling breeding and germ-plasm protection of *C. floribundum*.

Key words: *C. floribundum*; protocorm; proliferation and differentiation; salt concentration; plant growth regulator

多花兰(*Cymbidium floribundum*)为兰科兰属附生类植物,属《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录Ⅱ物种,为我国二级保护植物。多花兰主要分布于云南、广西、广东、福建等我国长江以南各省;生于海拔100~3 300 m的林中、林缘树上,或沿溪谷岩壁上。其叶带型革质、具有光泽,抗旱防寒力强;花带香气,花期较长,花色繁丽多姿,具有较高的观赏价值,是较理想的盆栽花卉之一(中国科学院中国植物志编辑委员会,2006)。

多花兰在株型、花朵数以及花色等方面均有丰富的变异,适应性广,在新品种培育中具有重要应用价值(卢思聪等,2005)。据国际兰花新品种登录机构“RHS Orchid Register”的资料显示,以多花兰作为亲本的第1代杂交组合已达249个。一些热销大花蕙兰品种是由多花兰与其它品种经过不断地杂交培育而成(Li等,2007)。目前,国内对多花兰种子非共生萌发和组培快繁技术研究不多(丁长春等,2011;吴梅,2006)。为此,本文通过对非共生萌发培养基中的无机盐含量、植物生长调节剂及光照等培养条件的研究,探讨影响多花兰种子非共生萌发的因素,建立多花兰种子非共生萌发技术体系;并在此基础上,通过研究筛选原球茎增殖和分化、芽苗壮苗和生根培养基配方及培养条件,建立多花兰组培快繁技术体系。研究结果为多花兰种质资源保护和种苗繁育提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料

多花兰(*Cymbidium floribundum*)种子,采自广西植物研究所兰科植物种质园。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒及接种 将采集的蒴果用自来水冲洗干净,于无菌操作台上先用75%的酒精浸泡2 min,后用0.1% HgCl₂液消毒15 min,无菌水冲洗3次,滤干果皮表面水份,划破果皮将种子均匀撒在培养基上。

1.2.2 多花兰种子非共生萌发 (1)培养基:以MS、1/2MS、1/4MS、1/6MS为基本培养基,添加不同浓度的植物生长调节剂 NAA(0.1、0.5、1.0)mg · L⁻¹、6-BA(0.5、1.0、2.0)mg · L⁻¹,附加20 g · L⁻¹的蔗糖、5.5 g · L⁻¹的琼脂、50 g · L⁻¹马铃薯泥,pH值为5.4。(2)培养条件:播种后在温度(26±2)℃、光照时间12 h · d⁻¹日光灯下培养,光照强度分别为25 μmol · m⁻² · s⁻¹、12.5 μmol · m⁻² · s⁻¹、6.25 μmol · m⁻² · s⁻¹、1.25 μmol · m⁻² · s⁻¹、0 μmol · m⁻² · s⁻¹。(3)种子萌发统计:播种120 d后,每处理随机抽取3瓶,统计种子萌发数量并计算萌发率。由于多花兰种子非常小,为了准确计数,先向培养瓶内加50 mL水稀释成悬浮液,混合均匀后吸取1~5 mL,铺在白布和黑布上进行计数。

1.2.3 多花兰原球茎增殖、分化、壮苗和生根培养

(1)培养基:以MS、1/2MS、1/4MS、1/6MS为基本培养基。(2)根据实验目的添加不同种类和浓度的植物生长调节剂为 NAA 0.2、0.5、0.8、1.0、1.2、1.6 mg · L⁻¹;6-BA 1.0、2.0、3.0、4.0、8.0 mg · L⁻¹;IBA 0.5 mg · L⁻¹;IAA 0.5 mg · L⁻¹;KT 1.0 mg · L⁻¹;TDZ 0.2 mg · L⁻¹;T-ZT 0.05 mg · L⁻¹;附加AC 1 g · L⁻¹,蔗糖20 g · L⁻¹,琼脂5.5 g · L⁻¹,及200 g · L⁻¹的PE(马铃薯水煮液)、椰汁、香蕉或2.0 g · L⁻¹的ACH(酸水解酪蛋白)、PT(蛋白胨);pH5.4(表3~5)。(3)培养条件:接种后在温度(28±2)℃、光照时间12 h · d⁻¹、光照强度25 μmol · m⁻² · s⁻¹的培养室中培养。(4)结果观测和统计:培养50~60 d后,每处理随机抽取3瓶,观测增殖系数、芽分化率、根分化率、苗高、苗形态等参数。综合各项参数,筛选适合多花兰原球茎增殖、芽分化、芽苗壮苗及生根的培养基配方。

1.2.4 多花兰试管苗移栽 将长好根的试管苗炼苗2~3 d,洗净根际培养基,用500倍甲基托布津溶液浸沾1~2 min,晾干后移栽至由碎火砖块和腐质土按1:1混拌制成的移栽基质上,在75%荫蔽度的大棚中培养,40~50 d统计成活率。

2 结果与分析

2.1 多花兰种子非共生萌发条件研究

2.1.1 多花兰种子萌发及生长特性 多花兰种子萌

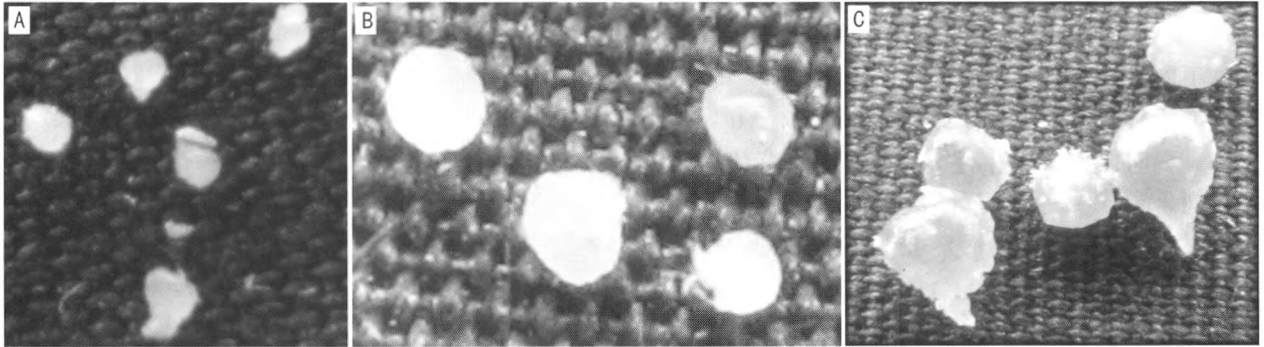


图 1 多花兰种子的萌发过程 A. 白色的球形胚; B. 淡黄绿色的原球茎; C. 绿色的原球茎。

Fig. 1 Germinated process of *C. floribundum* seeds A. white and round embryos; B. pistachio protocorms; C. green protocorms.

基部可观察到纤细白色绒毛。

2.1.2 不同盐浓度对多花兰种子无菌萌发的影响

在含盐量不同的培养基中添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA, 研究无机盐浓度对多花兰种子无菌萌发的影响(表 1)。表 1 结果表明不同无机盐浓度对多花兰种子萌发影响较大, 萌发率差异显著($P < 0.05$), 在一定范围内种子萌发率随盐浓度的降低而升高, 其中 1/6MS 培养基上种子的萌发率达 $(46.30 \pm 9.28)\%$, 较 1/2MS 培养基提高 2 倍, 且原球茎生长快质量好; 而 MS 与 1/2MS 培养基上种子的萌发效果相当, 萌发率均较低, 这说明高盐浓度的培养基不利于多花兰种子的萌发。

表 1 不同盐浓度对种子萌发的影响

Table 1 Effects of different salt concentrations on seed germination of *C. floribundum*

盐浓度 Salt concentration	萌发率 Germination rate (%)
MS	$22.17 \pm 1.62\text{c}$
1/2MS	$18.90 \pm 3.04\text{c}$
1/4MS	$35.78 \pm 4.53\text{b}$
1/6MS	$46.30 \pm 9.28\text{a}$

2.1.3 NAA、6-BA 对多花兰种子无菌萌发的影响

在 1/6MS 中添加不同浓度的 NAA、6-BA, 研究植物生长调节剂对多花兰种子萌发的影响(表 2)。表 2 结果表明 NAA、BA 的使用浓度对多花兰种子萌发影响也较大, 其中低浓度的 NAA 不利于种子萌

发所需时间较长, 从播种到胚开始转绿需要 90 d。种子在培养基上先膨大形成无色透明的圆球形, 然后发育成白色胚, 在 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照的刺激下, 胚颜色逐渐加深, 呈淡黄绿色, 后继续生长膨大, 形成绿色的原球茎, 培养 120 d 时在部份原球茎

发, 当浓度达到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 能显著提高萌发率; 此外多花兰种子萌发率随 6-BA 浓度的升高而增加, 当浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时萌发率可达 $(63.56 \pm 5.98)\%$, 但与 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 浓度处理的差异不显著, 为了减少高浓度植物生长调节剂导致植物材料产生变异, 可适当选用较低浓度。

表 2 不同浓度 NAA 和 6-BA 对多花兰种子萌发的影响

Table 2 Effects of different concentrations of NAA and 6-BA on seed germination of *C. floribundum*

生长调节剂种类 Growth regulator	生长调节剂用量 Dosage of growth regulator ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	萌发率 (%) Germination rate
NAA	0.1	$35.37 \pm 7.59\text{b}$
	0.5	$48.80 \pm 2.30\text{a}$
	1.0	$47.60 \pm 3.61\text{a}$
6-BA	0.5	$40.53 \pm 6.72\text{b}$
	1.0	$55.02 \pm 3.40\text{a}$
	2.0	$63.56 \pm 5.98\text{a}$

2.1.4 不同光照强度对多花兰种子萌发的影响

灭菌后的多花兰种子接种于 1/6MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 培养基上, 在不同的光照强度下培养。结果表明: 光照强度对多花兰种子的萌发率有显著影响 ($F = 2.781, P < 0.05$), 在 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光强下培养的种子不发芽; 当光强为 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时部分种子能萌发, 但萌发速度慢且萌发率低, 仅为 $(16.75 \pm 2.47)\%$; 当光强

为 $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,萌发率迅速上升到 $(33.91 \pm 6.28)\%$,增加约 1 倍; $1.25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光强最有利于多花兰种子萌发,发芽率高达 $(55.60 \pm 9.20)\%$,且萌发速度快(图 2)。

2.2 多花兰原球茎继代增殖和分化培养条件研究

2.2.1 无机盐浓度对多花兰原球茎增殖和分化的影响 表 3 结果表明在 MS、1/2MS、1/4MS、1/6MS 四种不同盐浓度的培养基中,以 1/4MS 对多花兰原球茎的繁殖和芽分化最好,而且芽苗的长势好,粗壮整齐。说明低盐浓度有利于多花兰原球茎的增殖、分化和生长。

2.2.2 细胞分裂素对多花兰原球茎增殖和分化的影响 表 3 结果显示,在 A(A1~A4)、B(B1~B4)、

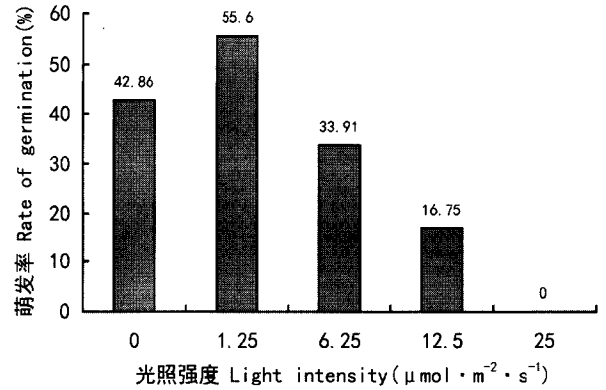


图 2 光照强度对种子萌发的影响
Fig. 2 Effects of light intensity on seed germination of *C. floribundum*

表 3 无机盐、6-BA 和 NAA 浓度对多花兰原球茎增殖和分化的影响

Table 3 Effects of concentrations of salt, NAA and 6-BA on protocorm proliferation and differentiation of *C. floribundum*

编号 Code	无机盐 Salt	6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	繁殖倍数 Proliferation multiple	芽分化率(%) Rate of bud differentiation	根分化率(%) Rate of root differentiation	苗高度(cm) Height of seedling	苗形态 Shape of seedling	评价 Score	用途 Purpose
A1	MS	1.0	0.5	1.5 g	5.0 i	3.0	2.5	黄、中	差	
A2	1/2MS	1.0	0.5	2.0 f	5.0 i	3.2	1.0	绿、中	差	
A3	1/4MS	1.0	0.5	2.0 f	15.0 h	8.0	2.0	绿、中	中上	
A4	1/6MS	1.0	0.5	2.0 f	15.0 h	7.0	2.0	绿、中	中上	
B1	MS	2.0	0.2	2.0 f	71.6 b	29.8	2.0	黄、细	差	
B2	1/2MS	2.0	0.2	2.5 e	72.0 b	30.0	1.8	黄、细	差	
B3	1/4MS	2.0	0.2	4.0 c	85.0 a	80.0	2.5	绿、齐	优	芽分化
B4	1/6MS	2.0	0.2	3.5 cd	64.0 c	24.0	1.5	绿、齐	中上	
C1	MS	2.0	0.5	1.5 g	43.2 e	18.2	0.8	黄、中	差	
C2	1/2MS	2.0	0.5	2.0 f	50.0 d	18.0	1.8	绿、中	中	
C3	1/4MS	2.0	0.5	6.5 a	60.2 c	26.0	1.9	绿、壮	优	球茎增殖
C4	1/6MS	2.0	0.5	5.5 b	53.5 d	63.5	1.8	绿、壮	中上	
D1	1/4MS	2.0	1.0	5.0 b	29.6 g	8.5	0.9	绿、中	中	
D2	1/4MS	4.0	1.0	5.5 b	67.5 bc	60.3	1.5	绿、壮	优	球茎增殖
D3	1/4MS	8.0	1.0	2.5 e	62.7 c	33.9	1.8	绿、中	中	
E1	1/4MS	2.0	0.8	3.0 d	70.2 b	68.4	2.5	绿、壮、齐	优	壮苗培养
E2	1/4MS	2.0	1.2	3.0 d	38.9 f	29.5	1.5	绿、壮、齐	优	壮苗培养
E3	1/4MS	2.0	1.6	3.0 d	43.8 e	43.8	2.0	绿、壮、齐	中上	

C(C1~C4)三组不同培养基中,从原球茎的繁殖倍数、芽和根的分化率、芽苗的高度和长势上看,6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 显著优于 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基表明,在一定范围内较高的 6-BA 水平($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)更利于多花兰原球茎的增殖、分化和生长。D 组(D1~D3)和 E 组(E1~E3),在 6-BA 浓度为 $2.0 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,多花兰原球茎繁殖倍数相对较高,由原球茎分化成的芽苗粗壮、整齐,长势也相对较好。以细胞分裂素 KT、TDZ、T-ZT 代替 C3 号培养基中的 6-BA 进行实验,结果发现对多花兰原球茎的繁殖、分化和生长,KT 稍好于 6-BA,6-BA 则明

显好于 TDZ 和 T-ZT。综合增殖倍数、芽的分化率、芽苗生长情况及药品成本等因素,这说明多花兰原球茎增殖和分化培养基中的细胞分裂素以 6-BA 为好,使用浓度 $2.0 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 生长素对多花兰原球茎增殖和分化的影响

A、B、C 三组实验结果(表 3)表明,NAA 对多花兰原球茎增殖和分化的影响方式与 6-BA 有所不同。低浓度的 NAA($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)利于多花兰原球茎分化成苗,在 NAA 浓度较低($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 B 组实验中,原球茎分化芽的效率普遍较高,为 $64.0 \sim 85.0\%$;NAA 浓度提高至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (C 组),原球

茎分化芽的效率降低,繁殖倍数则提高,最高达 6.5 倍/60 d。D 组和 E 组试验也证明了这一结果。而以同样浓度的 IAA 或 IBA 代替 C3 号培养基中的

NAA,多花兰原球茎的繁殖系数和芽分化率显著降低,苗的长势也明显变差。因此利于多花兰原球茎增殖和分化的生长素种类为 NAA,使用浓度 0.2~

表 4 有机添加物对多花兰原球茎增殖和分化的影响

Table 4 Effects of organic additives on protocorm proliferation and differentiation of *C. floribundum*

编号 Code	有机添加物 Organic additives (g · L ⁻¹)	繁殖倍数 Proliferation multiple	芽分化率 (%) Rate of bud differentiation	根分化率 (%) Rate of root differentiation	苗高度 Seedling height (cm)	苗形态 Shape of seedling	评价 Score
F1	椰汁 200	2.0 c	58.9a	52.2	2.5	细、弱	差
F2	香蕉 200	2.0 c	42.9c	34.7	2.5	细、弱	差
F3	ACH 2	0 d	0 d	0	0	死亡	极差
F4	PT 2	0 d	0 d	0	0	死亡	极差
C3	PE 200	6.5 b	60.2a	26.0	1.9	绿、壮	优

注:各培养基的基础配方为 1/4MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.5 mg · L⁻¹+AC 1 g · L⁻¹+蔗糖 20 g · L⁻¹,培养天数 60 d。

Note: Media components in the table are 1/4MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.5 mg · L⁻¹+AC 1 g · L⁻¹+ sucrose 20 g · L⁻¹, and incubation time was 60 d.

表 5 不同培养基对多花兰壮苗及生根的影响

Table 5 Effects of different media on seedlings growing and rooting of *C. floribundum*

编号 Code	无机盐 Salt	6-BA (mg · L ⁻¹)	NAA (mg · L ⁻¹)	繁殖倍数 Proliferation multiple	苗高度 (cm) Height of seedling	生根率 (%) Rooting rate	苗形态 Shape of seedling	评价 Score	用途 Purpose
D1	1/4 MS	2.0	1.0	1.0 d	3.5	100	绿、中	中	
D2	1/4 MS	4.0	1.0	1.2 c	3.0	100	绿、壮、齐	优	
D3	1/4 MS	8.0	1.0	1.4 b	2.7	100	绿、壮	中上	
E1	1/4 MS	2.0	0.8	1.2 c	3.0	100	绿、壮、齐	优	
E2	1/4 MS	2.0	1.2	1.4 b	3.0	100	绿、壮、齐	优	壮苗及生根
E3	1/4 MS	2.0	1.6	1.2 c	3.0	100	绿、壮	中上	
G1	1/6 MS	1.0	1.0	1.0 d	3.0	100	绿、壮	中上	
G2	1/6 MS	2.0	1.0	1.2 c	3.0	100	绿、壮	中上	
G3	1/6 MS	3.0	1.0	1.7 a	3.0	100	绿、壮、齐	优	壮苗及生根

注:培养基中的其它添加物为 AC 1 g · L⁻¹、蔗糖 20 g · L⁻¹、PE 200 g · L⁻¹,培养 50 d。

Note: Other additive media of components in the table are AC 1 g · L⁻¹, sucrose 20 g · L⁻¹, PE 200 g · L⁻¹, and incubation time is 50 d.

0.5 mg · L⁻¹。

2.2.4 有机添加物对多花兰原球茎增殖和分化的影响 1/4MS+6-BA2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.5 mg · L⁻¹+AC 1.0 g · L⁻¹为基础培养基,研究不同有机添加物对多花兰原球茎增殖和分化的影响(表 4)。表 4 结果表明,对多花兰原球茎增殖、分化和生长最好的有机添加物为 PE,原球茎增殖率和芽分化率均较高,分化形成的芽苗较壮;椰汁和香蕉为其次,增殖率和分化率中等,分化形成的芽苗高但细弱;最差的是 ACH 和 PT,培养过程中原球茎大半死亡。因此利于多花兰原球茎增殖、分化和生长的有机添加物为 PE,使用浓度 200 g · L⁻¹。

综合表 3 和表 4 的结果,多花兰原球茎的增殖培养基为 1/4 MS+6-BA2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.5 mg · L⁻¹+AC 1.0 g · L⁻¹+PE 200 g · L⁻¹,繁殖倍

数 6.5 倍/60 d,芽的分化率 60.2%;原球茎分化成芽的培养基为 1/4 MS+6-BA2.0 mg · L⁻¹+NAA 0.2 mg · L⁻¹+AC 1.0 g · L⁻¹+PE 200 g · L⁻¹,繁殖倍数 4.0 倍/60 d,芽分化率 85.0%。

2.3 多花兰壮苗和生根培养研究

以多花兰小芽苗为材料,进行壮苗和生根培养,50 d 后的结果见表 5。从苗的长势、整体形态及繁殖倍数看,G3 和 E2 培养基整体表现较好。因此培养基(1/6MS+6-BA 3.0 mg · L⁻¹+NAA 1.0 mg · L⁻¹+AC 1.0 g · L⁻¹+PE 200 g · L⁻¹和 1/4MS+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+NAA 1.2 mg · L⁻¹+AC 1.0 g · L⁻¹+PE 200 g · L⁻¹)可用于多花兰芽苗的壮苗和生根培养。

2.4 多花兰组培苗的移栽

当生根苗长至 3~5 cm、叶片 3~4 片时,打开

培养瓶盖,在室内通风处练苗 2~3 d;后将生根苗取出洗净培养基,用 500 倍甲基托布津溶液浸沾根部并晾干,再移栽到碎火砖块:腐质土 1:1 的基质

上,在 75% 荫蔽度的大棚中培养,50 d 后统计,成活率达 90%。多花兰原球茎增殖、分化、壮苗、生根及移栽结果见图 3。

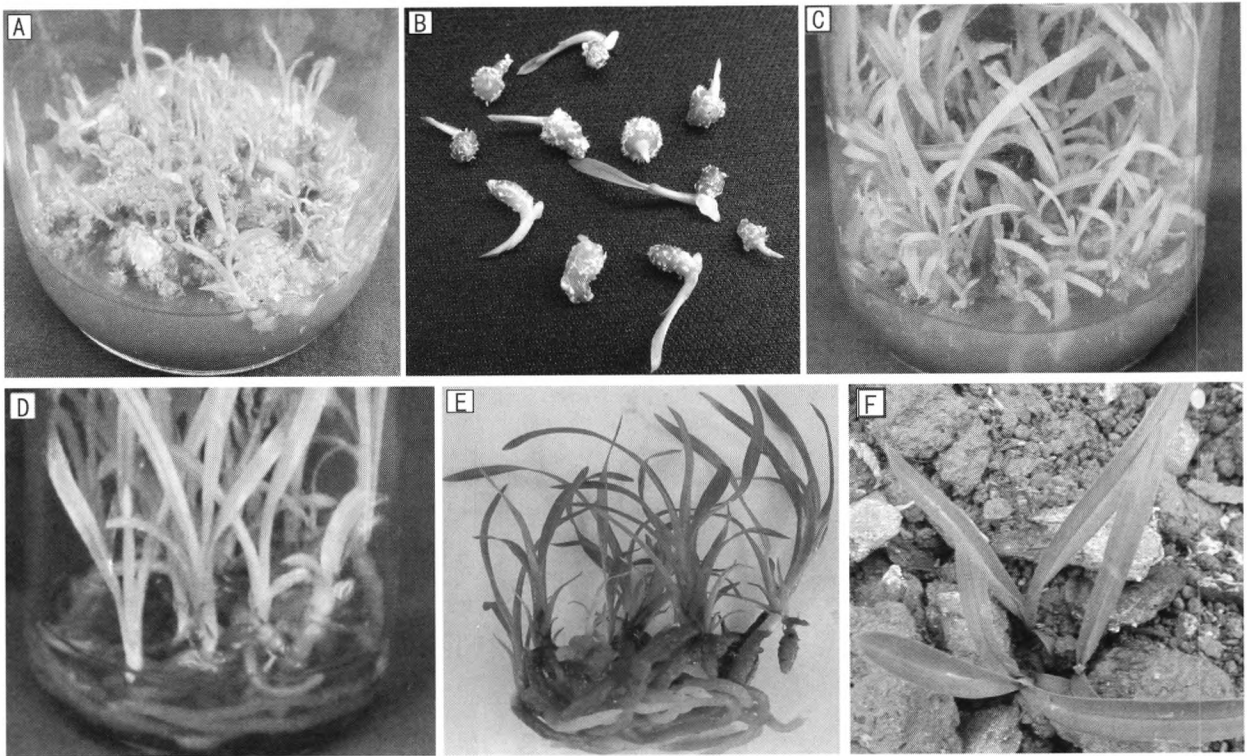


图 3 多花兰离体快繁过程 A. 原球茎增殖与分化; B, C. 原球茎分化成芽; D. 壮苗生根; E. 生根苗; F. 移栽苗。

Fig. 3 Process of in vitro culture and rapid propagation of *C. floribundum* A. Culture for proliferation and differentiation of protocorm; B, C. Buds differentiation from protocorm; D. Culture for strong and rooting seedlings; E. Rooting seedlings; F. Plantlets transplanted.

3 结论与讨论

兰科植物种子萌发对光照具有特殊要求,且具有种的特异性(Rasmussen, 1995)。有些兰花种子的萌发受光抑制(Stewart & Kane, 2006),有些则被光促进(Whitlow, 1996),还有一些不受光影响(Takahashi 等, 2000)。本研究结果表明,强光抑制多花兰种子萌发,弱光则提高其萌发率并缩短萌发时间。这与文慧婷等(2008)对香草兰、姚丽娟等(2004)对蝴蝶兰的研究结果相似。此外还发现,多花兰萌发后增加光照强度,可促进类原球茎向原球茎转化。

无机盐浓度对兰科植物种子萌发影响较大。本研究结果显示,低无机盐浓度更利于多花兰种子萌发,如在 MS 培养基中萌发率仅(22.17±1.62)%,而 1/6MS 培养基为(46.30±9.28)%,且萌发所需

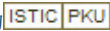
时间短,原球茎的质量好。这与丁长春等(2011)对多花兰和孙崇波等(2008)对蕙兰(*C. faberi*)等研究结果相似。通过研究我们还发现,低无机盐浓度同样利于多花兰原球茎增殖、分化、壮苗及生根等整个离体培养过程。但也有相反的实验结果,如余慧琳等(2009)研究发现,MS 和 1/2MS 比 1/4MS 更利于蝴蝶兰种子的萌发。因此无机盐浓度对兰科植物种子萌发和离体快繁的影响,要根据具体的物种区别对待。

植物生长调节剂可以代替植物激素,通过成分和浓度的变化,调控植物细胞分裂、分化和脱分化、种子萌发、器官发生和形成等一系列生长发育过程。本研究发现,在培养基中添加合适浓度的 6-BA(2.0 mg·L⁻¹)和 NAA(0.5 mg·L⁻¹)可有效提高多花兰种子的萌发率。在多花兰原球茎增殖和分化阶段,相对较高的 6-BA 浓度(2.0~4.0 mg·L⁻¹)更利于原球茎的增殖、分化和生长;而 NAA 的作用则不

同,低浓度($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)利于原球茎分化成苗;中等浓度($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)利于提高繁殖倍数;高浓度($1.0 \sim 1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)则利于壮苗和生根。在其它兰科植物的同类研究中,Shiau 等(2005)发现,NAA 能促进血叶兰(*Haemaria discolor* via)原球茎的诱导,并有益于幼苗生长;余迪求等(1996)发现,高浓度的 NAA($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)可使建兰种子萌发率高达 92.30%。但也有相反的观点和实验结果,如 Van Waes(1984)认为,生长素对陆生兰种子萌发的作用不大。这些结果显示,植物生长调节剂对兰花种子萌发和生长发育的生理作用具有种的特异性(Arditti & Ernst, 1984);其作用效果还因发育阶段不同而不同,如 6-BA 能促进沼兰种子萌发,但抑制原球茎的形成(Miyoshi & Mii, 1995)。这可能与不同的兰科植物种子,其内源激素种类和含量存在差异有关。

参考文献:

- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 2006. 中国植物志(第 18 卷)[M]. 北京:科学出版社:19
- 文慧婷,张翠玲,吴刚. 2008. 香草兰的组织培养试验[J]. 广东农业科学,11:35-36
- 卢思聪,石雷. 2005. 大花蕙兰[M]. 北京:中国农业出版社:2
- 朱泉,田甜,杨澍,等. 2009. 兰科植物种子的非共生萌发研究进展[J]. 江苏农业科学,4:205-208
- 陈心启,刘仲健,罗毅波,等. 2008. 中国兰科植物鉴别手册[M]. 北京:中国林业出版社:131
- 陈心启,吉占和. 1998. 中国兰花全书[M]. 北京:中国林业出版社:70-102
- 吴梅. 2006. 多花兰的组培繁殖[J]. 四川林勘设计,3:60-61
- 姚丽娟,徐晓薇,林绍生,等. 2004. 蝴蝶兰无菌播种技术[J]. 北方园艺,4:82-83
- 董芳. 2009. 几种兰科植物菌根真菌的筛选及种子萌发条件的研究[D]. 北京:北京林业大学
- Arditti J, Ernst R. 1984. Physiology of Germinating Orchid Seeds [M]//Arditti J(ed). Orchid Biology: Reviews and Perspectives III. New York: Cornell University Press, Ithaca, 3:176-222
- Ding CC(丁长春), Li L(李蕾), Xia NH(夏念和). 2011. Research on the in vitro seed germination of *Cymbidium Florbundum* L and its plantlet formation (多花兰的离体萌发和试管成苗技术研究)[J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 39(7): 3 837-3 838
- Kitsaki CK, Zygouraki S, Ziobora M, et al. 2004. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys species* (Orchidaceae)[J]. *Plant Cell Rep*, 23:284-290
- LI DM, YE QS, Zhu GF. 2007. Analysis of the germplasm resources and genetic relationships among Hybrid *Cymbidium* Cultivars and native species with RAPD markers [J]. *Agric Sci Chin*, 6(8):922-929
- Miyoshi K, Mii M. 1998. Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed in vitro [J]. *Physiol Plant*, 102:481-486
- Miyoshi K, Mii M. 1995. Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture [J]. *Sci Hortic*, 63:263-267
- Rasmussen HN. 1995. Terrestrial Orchids; from Seed to Mycotrophic Plant [M]. New York: Cambridge University Press:52-55
- Shiau YJ, Nalawade SM, Hsai CN, et al. 2005. Propagation of haemaria discolor via in vitro seed germination [J]. *Biol Plant*, 49:341-346
- Takahashi K, Ogiwara I, Hakoda N. 2000. Seed germination of *Habenaria (pecteilis) radiata* (Orchidaceae) in vitro [J]. *Lindleyana*, 15:59-63
- Sun CB(孙崇波), Liu M(刘玫), Shi JS(施季森), et al. 2008. Aseptic germination of *Cymbidium faberi* seeds and in vitro plant regeneration(蕙兰种子无菌萌发及植株再生)[J]. *Acta Agric Zhejiang* (浙江农业学报), 20(4):231-235
- Stewart SL, Kane ME. 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid [J]. *Plant Cell Tiss & Org Cult*, 86:147-158
- The international orchid register [EB/OL]. 2012-2-11. http://apps.rhs.org.uk/horticultural_database/orchid_register
- Thomas TD, Michael A. 2007. High-frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchostylis retusa*, an exquisite orchid [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 1:243-249
- Van Waes J. 1984. In vitro Studie Van de Kiemingsfysiologie Van Westeuropese Orchideen. [D]. Belgium: Rijksuniversiteit Gent
- Whitlow CE. 1996. Mass production of *Calopogon Tuberosus* [M]//Allen C(ed). North American Native Terrestrial Orchids Propagation and Production. North American Native Terrestrial Orchid Conference, Germantown, Maryland:5-10
- Yu HL(余慧琳), Hu YH(胡月华), Zhu YY(朱一仪). 2009. Study on propagation of protocorm of phalenopsis by induction in Asepsis Sowing(蝴蝶兰种子无菌播种诱导增殖原球茎试验研究)[J]. *Northern Hortic* (北方园艺), 4:188-190
- Yu DQ(余迪求), Yang ML(杨明兰), Li BJ(李宝健). 1996. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture(建兰原球茎发生及其无性繁殖系建立)[J]. *Sun Yatsen Univ Forum* (中山大学学报论丛), 2:13-18

作者: 唐凤鸾, 江海涛, 赵志国, 付传明, 石云平, 黄宁珍, TANG Feng-Luan, JIANG Hai-Tao, ZHAO Zhi-Guo, FU Chuan-Ming, SHI Yun-Ping, HUANG Ning-Zhen
作者单位: 唐凤鸾, 赵志国, 付传明, 石云平, 黄宁珍, TANG Feng-Luan, ZHAO Zhi-Guo, FU Chuan-Ming, SHI Yun-Ping, HUANG Ning-Zhen (广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林, 541006), 江海涛, JIANG Hai-Tao (广西国有维都林场, 广西来宾, 546100)
刊名: 广西植物 
英文刊名: Guihaia
年, 卷(期): 2012, 32(6)
被引用次数: 1次

参考文献(26条)

1. 《中国科学院中国植物志》编辑委员会 中国植物志(第18卷) 2006
2. 文慧婷, 张翠玲, 吴刚 香草兰的组织培养试验[期刊论文]-广东农业科学 2008(11)
3. 卢思聪; 石雷 大花蕙兰 2005
4. 朱泉, 田甜, 杨澍, 何卫星, 崔瑾 兰科植物种子的非共生萌发研究进展[期刊论文]-江苏农业科学 2009(4)
5. 陈心启; 刘仲健; 罗毅波 中国兰科植物鉴别手册 2008
6. 陈心启; 吉占和 中国兰花全书 1998
7. 吴梅 多花兰的组培繁殖[期刊论文]-四川林勘设计 2006(3)
8. 姚丽娟, 徐晓薇, 林绍生, 陈中林, 游聚斌 蝴蝶兰无菌播种技术[期刊论文]-北方园艺 2004(4)
9. 董芳 几种兰科植物菌根真菌的筛选及种子萌发条件的研究[学位论文] 2008
10. Arditti J; Ernst R Physiology of Germinating Orchid Seeds 1984
11. 丁长春, 李蕾, 夏念和 多花兰的离体萌发和试管成苗技术研究[期刊论文]-安徽农业科学 2011(7)
12. Kitsaki CK; Zygouraki S; Ziobora M In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several Ophrys species (Orchidaceae) 2004
13. LI Dong-mei, YE Qing-sheng, ZHU Gen-fa Analysis of the Germplasm Resources and Genetic Relationships Among Hybrid Cymbidium Cultivars and Native Species with RAPD Markers[期刊论文]-中国农业科学(英文版) 2007(8)
14. Miyoshi K; Mii M Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed in vitro 1998
15. Miyoshi K; Mii M Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture 1995
16. Rasmussen HN Terrestrial Orchids: from Seed to Mycotrophic Plant 1995
17. Shiao YJ; Nalawade SM; Hsai CN Propagation of *haemaria discolor* via in vitro seed germination 2005
18. Takahashi K; Ogiwara I; Hakoda N Seed germination of *Habenaria (pecteilis) radiata* (Orchidaceae: Orchideae) in vitro 2000
19. 孙崇波, 刘玫, 施季森, 郭方其, 黎侠 蕙兰种子无菌萌发及植株再生[期刊论文]-浙江农业学报 2008(4)
20. Stewart SL; Kane ME Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid 2006
21. The international orchid register 2012
22. Thomas TD; Michael A High-frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchostylis retusa*, an exquisite orchid 2007
23. Van Waes J In vitro Studie Van de Kiemingsfysiologie Van Westeuropese Orchideen 1984
24. Whitlow CE Mass production of *Calopogon Tuberosus* 1996
25. 余慧琳, 胡月华, 朱一仪 蝴蝶兰种子无菌播种中诱导增殖原球茎试验研究[期刊论文]-北方园艺 2009(4)
26. 余迪求; 杨明兰; 李宝健 建兰原球茎发生及其无性繁殖系建立 1996

引证文献(1条)

1. 付传明, 冼康华, 黄宁珍, 赵志国, 唐凤鸾, 石云平, 何金祥 铁皮石斛与钩状石斛杂交及种子无菌播种快繁研究[期刊论文]-种子 2013(09)

引用本文格式: 唐凤鸾. 江海涛. 赵志国. 付传明. 石云平. 黄宁珍. TANG Feng-Luan. JIANG Hai-Tao. ZHAO Zhi-Guo. FU Chuan-Ming. SHI Yun-Ping. HUANG Ning-Zhen 多花兰种子无菌萌发及离体快繁研究[期刊论文]-广西植物 2012(6)