

西藏虎头兰种子无菌萌发及试管成苗技术研究

王莲辉*, 颜凤霞, 田凡, 杨林

贵州省林业科学研究院, 贵阳 550005

摘要:本研究以西藏虎头兰种子为外植体,探讨培养基对种子胚萌发的诱导、外源激素对继代增殖、生根培养的影
响,并进行移栽试验。结果表明:1/2MS 对原球茎的诱导有较好的促进作用;1/2MS + TDZ 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/
L。对芽的诱导和增殖起明显的促进作用;1/2MS + IBA 0.2 mg/L 对西藏虎头兰的壮苗生根起关键性作用因素;碎
树皮为栽培基质的移栽成活率达 96%。试验对西藏虎头兰种苗快繁奠定了基础。

关键词:西藏虎头兰;种子;无菌萌发;试管成苗技术

中图分类号:

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019) Suppl-0075-04

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.011

Asymbiotic germination and *in vitro* seedling culture of *Cymbidium tracyanum* L.

WANG Lian-Hui*, YAN Feng-xia, TIAN Fan, YANG Lin

Guizhou Forestry Academy Guiyang, Guizhou 550005, China

Abstract: Using the seeds of *Cymbidium tracyanum* L. as the explant, the effects of different medium component on induction of protocorm, and plant growth regulators on the tissue culture and rapid propagation were studied in this paper. The result showed that:1/2MS affected the induction rate of protocorm;The best Culture medium for obviously enhanced the induction and proliferation of buds was 1/2MS + TDZ0.5 mg/L + NAA0.1 mg/L;The Culture medium of 1/2MS + IBA0.2 mg/L played the key role in the process of rooting and seedling growth;Culture medium selection was a critical factor greatly influencing, the survival rate reached 96% of the transplants. The study laid the foundation for rapid propagation of *Cymbidium tracyanum* L. .

Key words: *Cymbidium tracyanum* L.; seed;asymbiotic germination; *in vitro* seedling

西藏虎头兰(*Cymbidium tracyanum* L.) 又称大虎头兰、西姆比兰、新美娘兰、东亚兰、蝉兰,属兰科兰属多年生常绿草本植物,分布于中国、缅甸和泰国,在我国主要分布于贵州西南部、云南和西藏东南部^[1]。具有植株优美、花朵硕大、花形端庄、花香怡人等特点,并且栽培简便,在市场上很受消费者欢迎,用于盆栽,也可作切花,象征高尚富贵,为兰花中栽培广泛的种,具有很高的观赏价值^[2]。

在自然条件下兰科植物种子萌发率极低,主要

靠分株繁殖,但繁殖速度慢^[3]。研究西藏虎头兰种子无菌播种与试管快速成苗体系,探讨西藏虎头兰组培快繁技术,以期为实现西藏虎头兰人工快繁的规模化和产业化提供科学依据和技术支持,为最终实现西藏虎头兰种质资源的保育及可持续开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料的获取:选取贵州省林业科学研究院温室栽培的西藏虎头兰生长强健的植株,待花开放 7 天后进行人工授粉,480 天后取成熟尚未开列朔果。

无菌材料的获得:朔果经自来水洗净后,滤纸吸干水份,在超净工作台上,置于山农 I 型(一种用 1/4MS 培养基稀释浓度为 50% 的组培专用消毒液)中消毒 10 min,最后用无菌水冲洗 4~5 次。将洗净的成熟朔果置于灭菌滤纸上吸干水分,用解剖刀切开

收稿日期:2019-03-08 接受日期:2019-04-02

基金项目:贵州省科技厅项目(黔科合 SY 字[2015]3019 号);贵州省科技厅项目(黔科合 NY 字[2010]3029 号);贵州省科技厅项目(黔科合支撑[2017]2524);贵州省科技厅项目(黔科合平台人才[2016]5711);贵州省科技厅项目(黔林科合[2013]02);贵州省科技厅项目(黔科合支撑[2017]2523);贵州省科技厅项目(黔科合 NY 字[2006]3062 号);贵州省林业科研项目(黔林科合[2018]08 号)

* 通信作者 Tel:86-851-83921038; E-mail: gwabflianhui@163.com

蒴果,将种子均匀地撒到以下配制的各种培养基表面上。

1.2 方法

1.2.1 种子萌发

在培养基成分的研究中,种子萌发分别以 1/2MS、MS、WPM、1/2 WPM 和花宝 3 号(3 g/L) 5 种培养基为基本培养基,并添加 100 mg/L 的洋芋;培养基均加 2.0% 蔗糖和 0.6% 琼脂,pH5.2 ~ 5.4。培养温度为 25 ± 2 °C,光照强度为 $30 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间为 8 h/天。

1.2.2 原球茎分化

选取萌发好的原球茎,接种在以 MS 为基本培养基(添加 100 mg/L 的洋芋),并添加不同激素的培养基上,每瓶接种 5 个原球茎,每种接种 10 瓶,培养 90 天后,统计原球茎的分化率。

1.2.3 生根培养

将分化出的芽转接在生根培养基上,记录生根时间和根数及根长,筛选较合适的生根培养基。

1.2.4 移栽

将生根瓶苗炼苗后,从培养瓶中取出生根苗,洗净附着的培养基,分别栽入已消毒的水苔、碎树皮、泥炭土、田园土四种栽培基质中,每一种基质栽种 200 株,90 天后统计移栽成活情况。

2 结果与分析

2.1 不同培养基成分对西藏虎头兰萌发的影响

将西藏虎头兰种子(图 1A)分别播种于 1/2MS、

MS、WPM、1/2WPM 和花宝 3 号培养基上,每一种培养基各接种 20 瓶,接种 8 周左右,可见虎头兰种子肿胀继而呈乳白色原球体状(图 1B),继续培养 8 周后原球茎转绿,有叶原基出现,原球茎之间有白色绒毛黏连,原球茎出现两片小叶,从白色的原球茎到膨大转绿出芽的多少来统计萌发率,以 1/2MS 培养基萌发率最高为 95% 以上(图 1B),且最先长出原球茎,原球茎大小均匀;花宝 3 号(3g/L)上萌发率为 90% 以上,但原球茎大小不一;MS 培养基上基萌发率最低,只有 30% 左右。西藏虎头兰种子萌发的适合培养基为 1/2MS + 洋芋。

2.2 植物生长调节剂对原球茎分化的作用

将西藏虎头兰小芽转移至以下 6 种诱导芽分化的培养基上,每瓶培养基接种 5 个原球茎分化继代增殖培养。从表 2 可以看出,在不同浓度 BA 和 NAA 配比的 MS 添加洋芋的培养基上均可分化出植株,当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,每个原球茎的平均增值分化数最大为 4 个,随这 6-BA 浓度的增加,增值数降低;在不同浓度 TDZ 和 NAA 配比的 MS 添加洋芋的培养基上均可分化出植株,NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,TDZ 浓度为 0.5 mg/L 时,每个原球茎的平均增值分化数最大为 5 个(图 1C),随这 TDZ 浓度的增加,增值数降低。西藏虎头兰种子萌发的原球茎增值分化的适合培养基为 1/2MS + 洋芋 + TDZ0.5 mg/L + NAA0.1 mg/L。



图 1 西藏虎头兰种子无菌萌发

Fig. 1 Asymbiotic germination of *Cymbidium tracyanum* L.

注:A:种子;B:原球茎;C:原球茎分化;D:移栽苗;Noet:A:seed; B: protocorm; C: procorm differentiation; D: transplanting seedlings

表 1 不同培养基成分对种子萌发的影响

Table 1 Effects of different mediums on induction of seed germination

培养基 Culture mediums	接种瓶数 Bottle	污染瓶数 Bottle pollution	原球茎形成 平均时间 Average time(days)	萌发率 Germination rate(%)
1/2MS	20	0	40	95
MS	20	0	60	30
WPM	20	0	55	40
1/2 WPM	20	0	50	60
花宝 3 号	20	1	50	90

表 2 添加不同浓度的激素对芽增殖的影响

Table 2 Effects of different concentrations of hormone on bud proliferation

序号 No.	培养基 Culture medium	TDZ (mg/L)	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种原球茎数 Number of inoculated protocorms	平均增值数 Mean multiplication number
1	MS + 100mg/L 洋芋	0.1	0	0.1	50	3
2	MS + 100mg/L 洋芋	0.5	0	0.1	50	5
3	MS + 100mg/L 洋芋	1.0	0	0.1	50	2
4	MS + 100mg/L 洋芋	0	0.5	0.1	50	3
5	MS + 100mg/L 洋芋	0	1.0	0.1	50	4
6	MS + 100mg/L 洋芋	0	2.0	0.1	50	1

2.3 植物生长调节物质对壮苗生根培养的影响

为探索西藏虎头兰壮苗生根的合适培养基,本实验设置了 3 种不同的培养基(表 3),将较大的无根苗分别转入以下 3 种生根培养基上培养,其培养与诱导、分化的培养条件相同,每瓶接种 5 株,每种培养基接种 50 株,培养 6 周后,统计生根情况,结果

表明:IBA 0.2 mg/L 时生根率最高,为 92%;当 IBA 浓度高于或低于 0.2 mg/L 时,生根率反而下降,因此说 IBA 为 0.2 mg/L 时有利于根的产生,IBA 浓度过高或过低时对根的生根有抑制作用,因而研究中采用 IBA 0.2 mg/L 作为生根壮苗培养基为宜。

表 3 不同浓度 IBA 对诱导生根的影响

Table 3 Effects of different concentrations of IBA on rooting

序号 No.	培养基 Culture medium	IBA (ml · L ⁻¹)	接种数 Number of vaccination	生根数 Take root number	生根率 Rooting percentage(%)	培养结果 Result
1	1/2MS + 洋芋	0.1	50	31	60	小苗粗壮,根系较多
2	1/2MS + 洋芋	0.2	50	46	92	小苗粗壮,根系较多
3	1/2MS + 洋芋	0.4	50	28	56	小苗较弱,根系少

2.4 不同栽培基质对西藏虎头兰移栽成活率的影响

移栽成活情况见表 4。结果表明:以碎树皮的移栽成活率最高,为 96%,西藏虎头兰生长旺盛,叶子翠绿(图 1D);田园土的移栽成活率最低为 54%;最适的移栽基质为树皮。

3 结论

兰科植物商业生产目前多采用无菌播种试管成苗技术^[4]。不同培养基成分对西藏虎头兰萌发的

影响,本实验结果表明 1/2MS 为基本培养基时,种子萌发率最高,说明低盐浓度对西藏虎头兰种子萌发有促进作用。这与同为兰科植物的兜兰种子萌发一致^[5,6]。

植物激素对于植物组织的分化有影响,本研究中 TDZ 和 6-BA 对西藏虎头兰原球茎增殖分化有一定的促进作用,但其浓度过高过低都有抑制分化的作用。本试验仅采用两种促进细胞分裂的激素对西藏虎头兰进行原球茎分化的初步研究,分化系数最

表4 不同栽培基质对西藏虎头兰成活率的影响

Table 4 Effects of different transferring substrate on the survival rate in *Cymbidium tracyanum* L.

序号 No.	栽培基质 Culture medium	栽植株数 Number of vaccination	成活株数 Survival number	成活率 Rate of Survival(%)
1	水苔	200	135	68
2	碎树皮	200	191	96
3	泥炭土	200	125	63
4	田园土	200	108	54

高为5,下一步研究将进行多种激素多种浓度实验,以期获得更大的分化系数。

参考文献

- Lan TY, Wu TG, Liu SY, et al. Study on tissue culture of wild *Cymbidium tracyanum* L. castler [J]. J Fujian Forest Sci Tech(福建林业科技), 2010, 37(1): 77-79.
- Wang LH, Jiang YL, Yu JY, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Cymbidium tracyanum* L. castler [J]. Plant Physiol Communic(植物生理通讯), 2009, 45(1): 45-46.
- Cheng HM, Lyu FB, Li Z, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Cymbidium tracyanum* L. castler [J]. Advan Ornam Horticult China(中国观赏园艺研究进展), 2015: 253-255.
- Luo YB, Jia JS, Wang CL. Conservation strategy and potential advantages of the Chinese paphiopedilum [J]. Biodiver Sci(生物科学), 2003, 11: 491-498.
- You JY, Zhang Y, Liu Y, et al. Seed development and asymbiotic germination of *Paphiopedilum barbigerum* Tang et Wang [J]. J Plant Physiol(植物生理学报), 2014, 50: 275-282.
- Li XL, Huang CY, Song Q, et al. *In vitro* asymbiotic germination and propagation of *Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitz [J]. J Plant Sci(植物科学学报), 2016, 34: 127-134.
- Fang W, Ruan JL, Wang Z, et al. Studies on chemical constituents of *Arachniodes rhomboidea* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33: 649-550.
- Cheng YX, Zhou J, Tan NH. The chemical constituents of *Parakmeria yunnanensis* [J]. Acta Bot Yunnan(云南植物研究), 2001, 23: 352-356.
- Zhou ZH, Yang CR. Chemical constituents of crude green tea, the material of Pu-er tea in Yunnan [J]. Acta Bot Yunnan(云南植物研究), 2000, 22: 343-350.
- Zhou ZH, Zhang YJ, Yang CR. Saluenin, a new flavonol glycoside from *Camellia saluenensis* [J]. Acta Bot Yunnan(云南植物研究), 2000, 22: 90-96.
- Park BJ, Matsuta T, Kanazawa T, et al. Phenolic compounds from the leaves of *Psidium guajava* II. Quercetin and its glycosides [J]. Chem Nat Compd, 2012, 48: 1653-1657.
- Yin PJ, Wang JS, Wang PR, et al. Sesquiterpenes and lignans from the fruits of *Illicium simonsii* and their cytotoxicities [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2012, 10: 383-387.
- Ning DS, Fu YX, Chen L, et al. Research on chemical constituents of chloroform extract from *Illicii Cortex* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2017, 40: 2093-2097.
- Hungerford NL, Sands DPA, Kitching W. Isolation and structure of some constituents of the Australian medicinal plant *Tinospora smilacina* ('Snakevine') [J]. Aust J Chem, 1998, 51: 1103-1111.
- Wang L, Yang J, Chi YQ, et al. A new myrsinol-type diterpene polyester from *Euphorbia dracunculoides* Lam [J]. Nat Prod Res, 2015, 29: 1406-1413.
- Zheng YF, Zhong LQ, Wang XW. Advances on antioxidant and hypolipidemic and hypoglycemic effects of camellia [J]. Mod Food(现代食品), 2017, 9: 42-44.

(上接第74页)