

大花独蒜兰无菌萌发及幼苗栽培基质研究

赵黎明¹, 蒋宏², 孔继君², 向振勇^{2*}

¹云南省林业和草原科学院树木园, 云南 昆明

²云南省林业和草原科学院/云南珍稀濒危森林植物保护和繁育国家林业和草原局重点实验室, 云南 昆明
Email: *xzy6106@qq.com

收稿日期: 2020年12月25日; 录用日期: 2021年1月19日; 发布日期: 2021年1月27日

摘要

对大花独蒜兰种子无菌萌发进行了研究, 建立了一套大花独蒜兰组织培养的快速繁殖体系, 并初步对大花独蒜兰幼苗期的栽培基质进行了筛选。以大花独蒜兰的种子为外植体, 研究了6-BA和2,4-D两种激素不同质量浓度对比对大花独蒜兰小苗形成和生长的影响, 并将发育较好的原球茎分别栽培于水苔、水苔和木屑、木屑与泥炭土的组合上, 以确定较为适宜大花独蒜兰小苗生长的基质。结果表明: 大花独蒜兰原球茎萌发生长最适培养基为1/2 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA, PH5.8。幼苗生长较适宜的栽培基质为带透明盖的育苗箱 + 2~4 mm木屑: 泥炭土(1:1)。

关键词

大花独蒜兰, 组培快繁, 栽培基质

Study on Aseptic germination and Seedling Cultivation Substrate of *Pleione grandiflora*

Liming Zhao¹, Hong Jiang², Jijun Kong², Zhenyong Xiang^{2*}

¹Arboretum of Yunnan Academy of Forestry and Grassland, Kunming Yunnan

²Yunnan Laboratory for Conservation of Rare, Endangered & Endemic Forest Plants, National Forestry and Grassland Administration, Yunnan Academy of Forestry and Grassland, Kunming Yunnan
Email: *xzy6106@qq.com

Received: Dec. 25th, 2020; accepted: Jan. 19th, 2021; published: Jan. 27th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 赵黎明, 蒋宏, 孔继君, 向振勇. 大花独蒜兰无菌萌发及幼苗栽培基质研究[J]. 农业科学, 2021, 11(1): 54-59. DOI: 10.12677/hjas.2021.111008

Abstract

The aseptic germination of *Pleione grandiflora* seeds was studied, a set of rapid propagation system for tissue culture was established, and the culture medium at seedling stage was screened. Using the seeds of *pleione grandiflora* as explants, the effects of different concentrations of 6-BA and 2,4-D on the formation and growth of seedlings were studied, and the well-developed protocorms were cultivated on water moss and the combination of water moss and sawdust, the combination of sawdust and peat soil respectively to determine the suitable substrate for the growth of seedlings. The results showed that the optimum medium for protocorm germination and growth was 1/2 MS+ 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA, PH 5.8. The suitable substrate for seedling growth was nursery box with transparent cover + 2~4 mm sawdust: peat soil (1:1).

Keywords

Pleione grandiflora, Tissue Culture and Rapid Propagation, Cultivation Substrate

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

大花独蒜兰(*Pleione grandiflora* Rolfe)是独蒜兰属(*Pleione*)春花独蒜兰组(Sect.Humiles)的一种岩生或附生草本,多生长于林下或林缘等地有苔藓覆盖的岩石上,也有部分生长在有苔藓覆盖的树干上[1]。该种是独蒜兰属中观赏价值很高的种,适宜用作小型盆栽花卉[2] [3],其花型似卡特兰,花期4~5月,华葶从无叶的老假鳞茎基部发出,直立,长达10~15cm;花单生,偶有双生,花色丰富,具有白色、粉色、粉红色、紫色等多种颜色,花朵较大,长度能达到5~5.5cm,宽3~4cm。大花独蒜兰只有1枚叶片,该种与同属其它种相比,主要区别在于花朵唇瓣上的褶片是片层状且呈不规则撕裂状,通常5~7条褶片。主要分布在云南省的腾冲、大理、临沧、景东、蒙自、元阳、西藏墨脱、越南北部,海拔大约2600~2900m的山林[1] [4]。大花独蒜兰的种子细小,不具有胚乳,种子萌发成苗比较困难,自然状态下,有性繁殖率低,主要是以假鳞茎分株繁殖的无性繁殖方式来延续后代,繁殖速度慢且数量有限。

目前,独蒜兰属中已有一些种的无菌萌发方面的研究报道。在MS培养基上,低浓度的细胞分裂素(6-BA或KT)对独蒜兰(*Pleione bulbocodioides*)种子萌发有良好的促进作用;生根培养基是1/2 MS + IBA 1.0 + AC 1 g/L最好[5] [6] [7]。毛唇独蒜兰(*Pleione hookeriana*)在TH + NAA 0.2 mg/L + 6-BA 1 mg/L下丛生芽的出芽率93%,增殖倍数比1/2 MS多[8]。秋花独蒜兰(*Pleione maculate*)种子在B5液体培养基中诱导的原球茎最多,其快速增殖培养基为:花宝0.3% + 糖2% + BA 0.5 mg/L [9] [10]。生长激素NAA、2,4-D对云南独蒜兰(*Pleione yunnanensis*)种子无菌萌发具有促进作用,激素组合6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L有利于原球茎的增殖与生长[11] [12] [13]。白花独蒜兰(*Pleione albiflora*)在KC + CM 100 mg/L + AC 2 g/L的培养基上进行种子萌发,在MS + NAA 1.0 + 6-BA 0.2的培养基上进行原球茎增殖,在花宝2号(N:P:K = 20:20:20) 2 g/L + NAA 0.5 g/L + 香蕉匀浆 100 ml/L + AC 2 g/L培养基上生根和移栽[14]。二叶独蒜兰(*Pleione scopulorum*)的无菌种子萌发培养基为:MS + NAA 0.2 mg/L [15]。

综上所述,从独蒜兰属中已发表的无菌萌发条件来看,各个种的无菌培养条件差异较大,从种子萌

发、原球茎增殖、生根培养基诱导根系生成、萌发过程中生长激素的使用和使用激素的种类等都各有不同。大花独蒜兰的无菌萌发未见报道,同时幼苗栽培基质亦未见报道。本文就大花独蒜兰(*Pleione grandiflora*)的无菌萌发体系进行了研究,并尝试采用不同培养基质来培育大花独蒜兰幼苗,期望建立和完善大花独蒜兰的人工繁育技术提供科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料来源及材料预处理

试验材料采自云南省林业和草原科学院兰花种质资源收集与保存温室。待大花独蒜兰蒴果变成黄色成熟后,采收回实验室,经自然稍稍干燥,用解剖刀切开果荚,小心的取出种子,装入称量纸做成的种子干燥袋中,将干燥袋放置于密封的干燥皿内经氯化锂缓慢脱水干燥后,将种子保存于 Astone 高硼硅玻璃密封样品瓶中,再将样品瓶放置于带变色硅胶的密封盒子中,保存备用。

2.2. 试验方法

2.2.1. 试验材料无菌化处理

用称量纸做成种子包,从密封的种子瓶中取出少量的大花独蒜兰种子装入种子包,将种子包密封后,在超净工作台上,放入装有 75%酒精的烧杯中,灭菌 5~10 s,无菌水冲洗 3~5 次,然后在 10% NaClO 溶液中消毒 7 min,再次用无菌水冲洗 3~5 次。在无菌条件下,取出种子包,用消过毒的无菌剪刀,剪开种子包,放入无菌水中,摇匀,制成无菌的种子溶液,该溶液在显微镜下,大概 1 ml 溶液中含 1000~1200 粒种子。

2.2.2. 无菌播种处理

在超净工作台上,用一次性大号的注射器吸取种子溶液,将种子溶液尽可能少的均匀的转移到无菌萌发培养基上,轻轻晃动 5 mm 培养皿,使得种子均匀分散开。为测定种子萌发情况,设置不同的处理。1): 1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L(单位下同); 2): 1/2 MS + 6-BA 1.0 + 2,4-D 1.0; 3): 1/2 MS + 6-BA 2.0 + 2,4-D 1.0; 4): 1/2 MS + 6-BA 3.0 + 2,4-D 1.0; 5): 1/2 MS + 6-BA 0.5 + 2,4-D 2.0; 6): 1/2 MS + 6-BA 1.0 + 2,4-D 2.0; 7): 1/2 MS + 6-BA 2.0 + 2,4-D 2.0; 8): 1/2 MS + 6-BA 3.0 + 2,4-D 2.0。每个处理均添加 20 g/L 蔗糖和 0.2%的活性炭,PH 5.8。完成接种以后,在温度为 25(±1)℃,光照强度 1200~1500 lx,光照 12 h/d 下进行培养。待培养皿中原球茎变绿,统一在播种 60 d 后数百粒种子萌发率,以明显变绿,可见到颗粒状小原球茎记为萌发。

$$\text{萌发率}(\%) = \text{可见绿色原球茎} / 100 \text{粒种子} * 100\%$$

2.2.3. 原球茎发育过程的形态学观察

将萌发的大花独蒜兰种子挑入载玻片上,在种子上滴入甘油固定种子,稍稍用超声波排出气泡,在体式荧光显微镜下观察拍照,观察原球茎的不同发育阶段。

2.2.4. 幼苗移栽基质

待原球茎长到球体直径达到 6 mm 时,需对大粒的原球茎进行移栽入带透明盖子的育苗箱,育苗箱内基质为(9):水苔;(10):底部 0.2~0.4 cm 松树皮 + 上部水苔。每隔 20~25 d 用喷雾水壶喷洒花宝 5 号水雾给幼苗补充水分和营养。

2.3. 数据统计与分析

播种 30 d 后统计萌发率,实验数据采用 Excel 2016、SPSS 19.0 软件进行统计分析和 LSD 多重比较。

3. 结果与分析

3.1. 不同基本培养基对大花独蒜兰原球茎诱导的影响

以培养皿中种子形成绿色记为种子萌发，待生长 3 个月后计数 100 粒种子中长成颗粒状的原球茎数量，以 100 粒种子中的原球茎数量计算原球茎诱导率。结果如表 1，配方 2 能够使得大花独蒜兰原球茎生长较好且快。

Table 1. Effects of different media formulas on *Pleione grandiflora* protocorm induction

表 1. 不同培养配方对大花独蒜兰原球茎诱导的影响

培养基编号 Medium No.	培养基组分 Medium component			原球茎诱导率(%) Protocorm induction rate	生长情况 Growth situation
	基础培养基 Medium type	6-BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)		
1	1/2 MS	0.5	1.0	62.33 ± 1.53 e	3 周变绿，原球茎分化少，生长缓慢
2	1/2 MS	1.0	1.0	92.33 ± 4.16 a	3 周变绿，形成的原球茎较多，颜色深绿色，幼根形成，幼叶萌发生长较快
3	1/2 MS	2.0	1.0	64.33 ± 2.08 c	4 周变绿，形成的原球茎多，颜色浅绿，纤毛多，生长快
4	1/2 MS	3.0	1.0	61.33 ± 3.51 b	4 周变绿，形成的原球茎多，颜色绿色，纤毛多，原球茎膨胀生长快
5	1/2 MS	0.5	2.0	32.00 ± 1.00 e	6 周变绿，形成的原球茎少，可见种子萌发变绿后生长缓慢
6	1/2 MS	1.0	2.0	26.67 ± 1.53 d	6 周变绿，形成的原球茎少，生长慢
7	1/2 MS	2.0	2.0	43.33 ± 2.08 c	8 周变绿，形成原球茎多，生长快
8	1/2 MS	3.0	2.0	43.33 ± 1.53 c	8 周变绿，形成的原球茎多，生长快

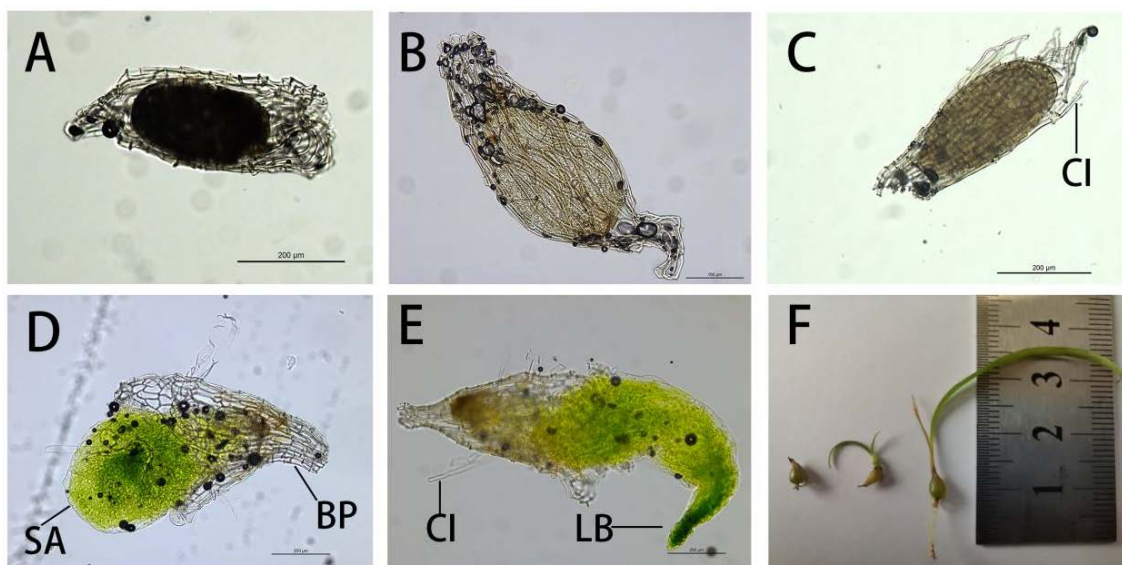
注：同列不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著性差异。

3.2. 大花独蒜兰原球茎的形成和发育

大花独蒜兰种胚突破种皮到长成 3~4 mm 以上原球茎幼苗大约需要 3~4 个月。种子经过吸胀后，胚会先膨大起来，在荧光显微镜 50 倍目镜下观察，可以看到有纤毛状的细丝首先从种子基部长出来(图 1(C))，这些细丝可以长到种子长度的 3~5 倍，肉眼可见，形成长有“纤毛”的原球茎。然后，原球茎的茎尖开始膨大，种皮破开，叶绿素开始合成(图 1(D))，慢慢有绿色显露出来，茎尖进一步发育成为叶芽，纤毛会发育成为幼根，最终长成一个小小的原球茎(图 1(E))，原球茎慢慢的膨大，最终长成幼苗(图 1(F))。

3.3. 大花独蒜兰幼苗的栽培基质

将大花独蒜兰栽培到装有 3 种基质的带透明盖子的育苗箱中，盖好盖子。这 3 种基质分别是：(12) 水苔；(13)：1/3 底部放置 2~4 mm 直径的木屑，木屑上部覆盖一层薄薄的水苔。(14)树皮和泥炭土按 1:1 比例均匀混合。大约 2 周左右即可看到大花独蒜兰原球茎上有纤毛状的幼根生长出来。每隔 30~35 d，用装有花宝 5 号水液的喷水瓶向育苗箱中稍稍喷洒水雾，补充水分和营养。经过 3 个月的生长，使用水苔和树皮、树皮和泥炭土混合为基质的大花独蒜兰原球茎成活率可达 94% 和 96%，生根数量在 2~4 条，整个植株生长发育也更健壮(表 2)。



注: BP: 基部; CI: 纤毛; LB: 叶芽; SA: 茎尖, Note: BP: Basal portion; CI: Cilium; LB: Leaf bud; SA: Shoot apex.

Figure 1. Developmental stages of *Pleione grandiflora* from seed to seedling. A: Ungerminated seed; B: Enlarged embryo after absorbing water; C: A Protocorm with cilium; D: Small globular protocorm; E: Preliminary formation of seedlings; F: Seedling

图 1. 大花独蒜兰从种子到幼苗的发育阶段。A: 未萌发种子; B: 种胚吸水膨大; C: 长有“纤毛”的原球茎; D: 小球体状原球茎; E 幼苗初步形成; F: 幼苗

Table 2. Survival rate of *Pleione grandiflora* seedlings in different substrates and cultivation methods

表 2. 大花独蒜兰幼苗在不同栽培基质及栽培方式中的成活率

	种植数量	生根数	成活率(%)
水苔	100	1~2	35 ± 5.5 b
水苔和树皮	100	2~3	94 ± 1.28 a
树皮和泥炭土	100	2~4	96 ± 1.1 a

4. 讨论与结论

1) 大花独蒜兰种子在 MS, 1/2 MS 和 KC 培养基上均能够萌发, 且均有原球茎形成, 并长大到可以移栽成苗的程度, 但结合原球茎在不同培养基上的生长发育表现情况, 发现大花独蒜兰原球茎快速萌发且长大的培养基为 1/2 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA。

2) 大花独蒜兰种子萌发是在种子的一端先长出长长的纤毛状根, 然后另一端才突破种皮开始分化出叶芽, 原球茎变绿后, 慢慢地膨大, 长出子叶, 随着原球茎的进一步发育, 才会长出叶子, 这个时期可以看到其幼苗具有 2 片叶片, 其中短小的一片叶子通常只能生长到 1 cm 左右就停止发育, 应是叶鞘, 剩下的另一片叶子才是正常的叶片。

3) 大花独蒜兰原球茎栽培时, 应先用自来水浸泡水苔和树皮, 待充分吸水后, 树皮晾干到不滴水, 水苔以手握紧而不滴水为止, 也可将树皮与泥炭土混合后栽培。大花独蒜兰在合适的基质中根系生长较快, 发育良好。

基金项目

云南金线兰等兰科药用植物快繁技术研究 MS2019-10。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第三十八卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 376-377.
- [2] 刘虹, 吴瑞云, 陈雁. 独蒜兰[J]. 生物学通报, 2010, 40(12): 50.
- [3] 张燕, 李思锋, 黎斌. 独蒜兰属植物研究现状[J]. 北方园艺, 2010(10): 232-234.
- [4] Chen, X.Q., Cribb, P.J. and Gale, S.W. (2009) Orchidaceae. In: Flora of China Editorial Committee Ed., *Flora of China*, Vol. 25, Science Press, Beijing; Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 325-333.
- [5] 张燕, 李思锋, 黎斌. 独蒜兰种子无菌萌发过程观察和萌发培养基筛选[J]. 西北农业学报, 2010, 19(1): 136-139. <http://dx.chinadoin.cn/10.3969/j.issn.1004-1389.2010.01.030>
- [6] 涂艺声, 刘如龙, 黄文敏. 井冈山独蒜兰再生体系构建研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(9): 3931-3932. <http://dx.chinadoin.cn/10.3969/j.issn.0517-6611.2009.09.033>
- [7] 李洪林, 付志惠, 杨波. 独蒜兰的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 632.
- [8] 于晓娟, 纳海燕, 胡晓丽, 魏兴强, 范昆, 刘方媛. 毛唇独蒜兰的离体快速繁殖研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2007, 44(4): 891-894. <http://dx.chinadoin.cn/10.3969/j.issn.0490-6756.2007.04.035>
- [9] 古碧珠, 刘柏涛, 何嘉碧, 梁红. 兰花种子的原球茎诱导及其生长分化研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13511-13513. <http://dx.chinadoin.cn/10.3969/j.issn.0517-6611.2008.31.026>
- [10] 胡晓丽, 成倩, 王莹莹, 魏兴强, 张健, 纳海燕. 秋花独蒜兰原球茎液体快速增殖和分化培养研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2009, 46(2): 504-508. <http://dx.chinadoin.cn/10.3969/j.issn.0490-6756.2009.02.049>
- [11] 吴丽芳, 张素芳, 杨春梅, 李树发. 滇独蒜兰的组织培养研究[J]. 云南农业大学学报, 2005, 21(5): 749-752. <http://dx.chinadoin.cn/10.3969/j.issn.1004-390X.2005.05.035>
- [12] 黄家林, 胡虹, 李树云. 云南独蒜兰的种子无菌萌发研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(2): 313. <http://dx.chinadoin.cn/10.3321/j.issn:0513-353X.2005.02.037>
- [13] 黄永会, 朱国胜, 毛堂芬, 刘作易, 杨友联. 云南独蒜兰原球茎诱导与增殖的研究[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(7): 16-18. <http://dx.chinadoin.cn/10.3969/j.issn.1001-3601.2009.07.006>
- [14] 陈之林, 叶秀麟, 梁承邨, 段俊. 白花独蒜兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(4): 455.
- [15] 屈云慧, 李进昆, 张婷, 张艺萍. 野生花卉二叶独蒜兰的离体培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 309.