

## ‘金州报春’兜兰的非共生萌发与快速繁殖

周丽<sup>1,\*</sup>, 邓克云<sup>2</sup>, 徐正海<sup>2</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:** 收集授粉后不同时期报春兜兰栽培品种‘金州报春’的种子, 观察种子形态特征和萌发过程, 建立了高效快繁体系。试验结果表明种子萌发的最佳培养基为RE+0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA +0.1mg·L<sup>-1</sup> 6-BA +100 mL·L<sup>-1</sup> 椰子乳(体积比); 授粉162 d后的种子萌发率较高并且无白化现象, 授粉203 d的种子播种后萌发率可达94.33%; 分化后的原球茎在壮苗培养基上培养4个月后可得到有5~6片叶、高3~5 cm的健壮试管苗。

**关键词:** 种子; 非共生萌发; 培养基; 白化苗

## *In vitro* Asymbiotic Germination and Propagation of *Paphiopedilum primulinum* ‘Jinzhoubaochun’

ZHOU Li<sup>1,\*</sup>, DENG Ke-Yun<sup>2</sup>, XU Zheng-Hai<sup>2</sup>

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

**Abstract:** In this experiment, we collected different embryo-aged-seeds of *Paphiopedilum primulinum* ‘Jinzhoubaochun’, observed the structure and the process of seed germination, and established an effective regeneration system. The results showed that the better medium for germination was Robert Ernest (RE)-based media containing 100 mL·L<sup>-1</sup> coconut water, 0.3 mg·L<sup>-1</sup> NAA and 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA. 162 DAP (day after pollination) seeds had higher germination rate and without albino seedling, germination rate of 203 DAP seeds were 94.33%. Transferred differentiation protocorns on optimum rooting medium, after 4 months, the healthy robust seedlings were 3–5 cm tall and had 5–6 leaves.

**Key words:** seed; asymbiotic germination; medium; albino seedling

兜兰又称拖鞋兰, 是兰科兜兰属(*Paphiopedilum*)植物, 中国野生兜兰有18种(刘仲健等2009), 其中有不少是优良的杂交亲本, 但是多数为单花类, 多花系列仅发现长瓣兜兰和飘带兜兰两种, 缺少继花类。兜兰花型、花色变化多端, 是奇特美丽的名贵观赏花卉, 野生条件下许多种类濒临灭绝。在对我国兜兰进行繁育、保育的同时引进国外优良品种与国内优良兜兰原生种进行人工杂交, 进行种质新资源创新, 有利于野生资源的有效保护和合理开发利用。

报春兜兰(*Paphiopedilum primulinum*)为地生兜兰, 产于印度尼西亚海拔100~400 m的石灰岩山石上, 植株丛生, 叶4~7枚, 狭矩圆状椭圆形, 叶绿色无斑纹; 花序直立, 花7~10朵相继开放, 花绿黄色, 花期春夏季(刘仲健等2009)。报春兜兰是继花类绿叶种兜兰, 其花绿黄色相对其有色型变种浅紫兜兰(*Paphiopedilum primulinum* var. *purpurascens*)来说属于白变种(Koopowitz 2008)。

## 材料与方法

### 1 实验材料

报春兜兰栽培品种‘金州报春’(*Paphiopedilum primulinum* ‘Jinzhoubaochun’)种植于绿缘公司大棚, 盆栽植株叶生长、小苗分化、开花情况均良好(图1-O), 人工授粉后产生可育种子。

### 2 播种方法和培养条件

兰科植物在授粉后至胚形成所需时间有较大差异(伍成厚等2004; 张毓等2010), 在文中对种子成熟度的表示以从授粉时间算起到采收时所经历的天数来算(day after pollination, 简称DAP)。蒴果用75%酒精表面擦拭后全部浸入95%酒精中2 s, 取

收稿 2013-07-01 修定 2013-08-01

资助 贵州省科技厅项目[黔科合SY字(2012) 3030号]和贵州省教育厅项目[2011 (278)号]。

\* 通讯作者(E-mail: zhoulizxx@aliyun.com; Tel: 189085-99226)。

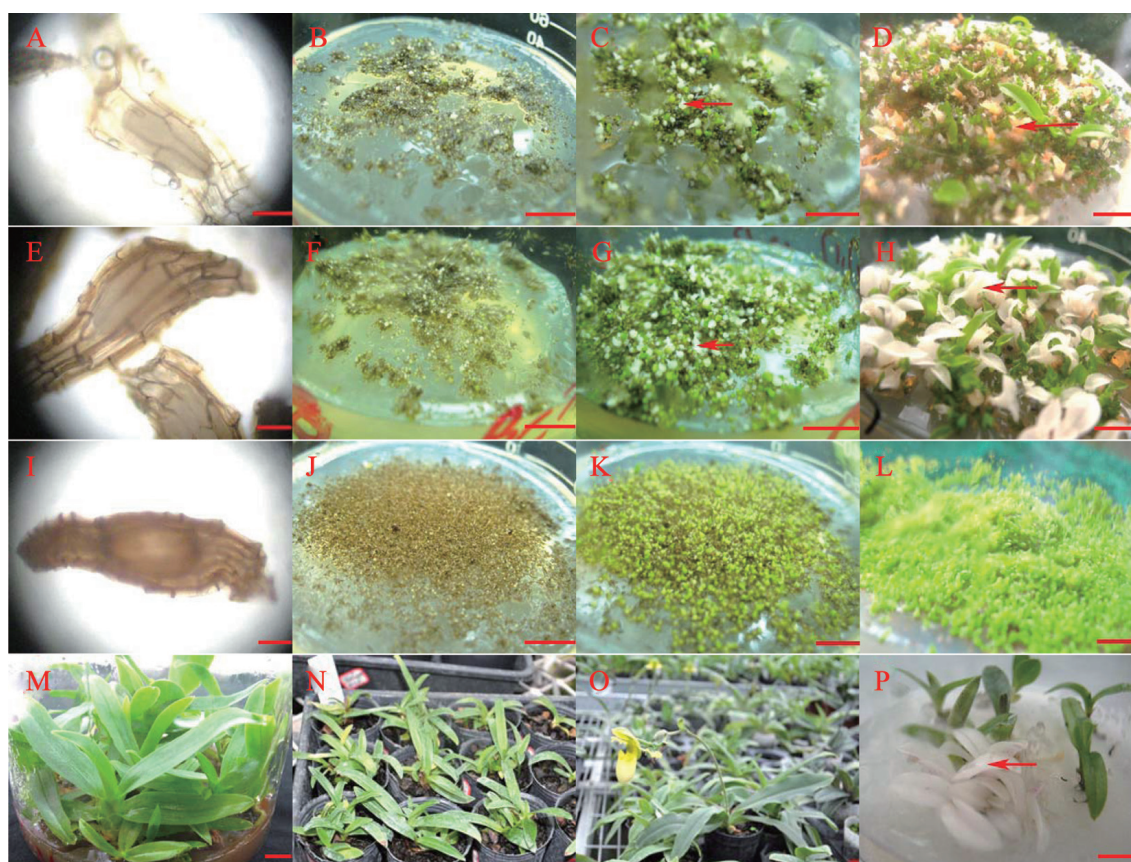


图1 '金州报春'兜兰不同成熟期种子及萌发过程

Fig.1 Seed of different maturation periods and germination process of *Paph. primulinum* 'Jinzhoubaochun'

A: 134 DAP的种子; B: 134 DAP 的种子播种84 d; C: 134 DAP的种子播种107 d, 明显可见白化原球茎(箭头所示); D: 134 DAP的种子分化小苗, 白化原球茎死亡(箭头所示); E: 148 DAP的种子; F: 148 DAP 种子播种84 d; G: 148 DAP的种子播种107 d, 可见白化原球茎(箭头所示); H: 148 DAP的种子分化小苗, 白化原球茎分化出白化小苗(箭头所示); I: 162 DAP的种子; J: 162 DAP的种子播种84 d萌发状况; K: 162 DAP的种子播种107 d, 萌发分化好无白化现象; L: 162 DAP的种子分化小苗, 无白化苗产生; M: 健壮的试管苗; N: 试管苗移栽; O: 报春兜兰开花; P: 文山兜兰白化苗(箭头所示)。(A, E, I图中标尺=0.1 mm; 其余为1 cm)。

出后于酒精灯上点燃, 待表面酒精烧尽后切开果实将种子均匀撒于培养基表面。培养条件: 光照强度 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 光照周期 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ , 培养温度 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$ 。

### 3 种子萌发培养基的筛选

用授粉180 d种子, 以Robert Ernst (简称RE)为基本培养基, 加入 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂粉,  $100 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ CM (椰子乳), 不同浓度生长调节剂, 制成萌发培养基, pH调到5.8。接种后观察种子萌发及生长情况, 筛选萌发适宜培养基。启动萌发时间以肉眼可见种子中有明显膨大的原球20个左右为准。萌发率的统计, 播种100 d后在超净工作台上, 随机挑取种子置于载玻片上, 于显微镜下观察不同视野, 统计100粒种子情况, 萌发以胚突破种皮

形成原球茎为准, 若有启动萌发后原球茎褐化或死亡的视为褐化原球茎。实验结果录入Excel中, 用SAS v8软件进行方差分析。

### 4 胚龄对种子萌发的影响

取授粉后不同时期的种子于显微镜下观察种子结构和胚发育情况并接种于最佳萌发培养基 $M_7$ 上, 对萌发情况进行定期观察统计。

### 5 分化与壮苗

播种后200 d原球茎开始分化小芽后, 将带芽原球茎接种在壮苗生根培养上培养, 壮苗培养基为基本培养基RE, 添加 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂粉、 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉泥, 生长调节剂配比为 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA, 壮苗培养时已分化的带有较大小芽的可直接定苗, 每630 mL的培养瓶内接种20苗。

## 实验结果

### 1 种子萌发培养基的筛选

授粉后180 d的种子种皮浅褐色, 胚长椭圆形较饱满, 种子全长约1 mm, 胚长约0.4 mm, 单侧翅长约0.3 mm。从表1可以看出在不同的培养基中报春兜兰启动萌发所需要的时间差异不大, 基本培养基为RE和1/2RE的两大类培养基的萌发率和褐化率的差异不显著。方差分析结果表明, 不同生长调节剂组合对萌发率和褐化率影响显著,  $M_7$ 为 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA +  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA组合, 萌发率最高, 达到93.2%, 褐化率为0;  $M_5$ 中萌发率最低, 仅为17.4%, 且萌发后原球茎褐化率高达7.4%。在不添加任何生长调节剂的 $M_1$ 和 $M_6$ 两种培养基中种子的萌发率也比较高, 可见报春兜兰种子萌发对植物生长调节剂的要求不高, 较高浓度的生长调节剂

不仅会降低萌发率, 而且会导致萌发后约7%的原球茎褐变甚至死亡。

### 2 胚龄对萌发的影响

兰科植物的胚, 是一个卵形的未分化的细胞团, 不具子叶和胚乳, 缺乏营养物质, 在自然条件下极难萌发(胡适宜2005)。兰科植物种子在自然条件下, 需要有共生菌的感染才能萌发, 且萌发率很低, 在组织培养条件下可进行非共生萌发, 萌发率与种子的成熟度有密切关系。所以种子成熟度对种子的萌发、分化、成苗等有着重要的影响。

120 DAP的种子, 蒴果剖开后可见种子白色、细小密生在胎座上, 在显微镜下可见种子两侧具翅、呈梭形, 种皮膜质、无色透明且有许多皱折, 看不到有明显存在的胚, 罕有1~2个种子内有直径约0.1 mm的圆形胚, 位于种子中部, 说明种子极度

表1 不同培养基对种子萌发的影响

Table 1 Effect of different medium on seed germination

培养基	基本培养基	激素组合/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		接种瓶数/瓶	启动萌发时间/d	萌发率/%	褐化率/%
		6-BA	NAA				
$M_1$	RE	-	-	5	63	67.4 <sup>C</sup>	0.4 <sup>D</sup>
$M_2$	RE	0.1	0.3	5	70	90.8 <sup>AB</sup>	0 <sup>D</sup>
$M_3$	RE	0.2	0.6	5	56	58.8 <sup>C</sup>	1 <sup>CD</sup>
$M_4$	RE	0.3	0.8	5	63	29.8 <sup>DE</sup>	2 <sup>C</sup>
$M_5$	RE	0.4	1.0	5	77	17.4 <sup>F</sup>	7.4 <sup>A</sup>
$M_6$	1/2RE	-	-	5	56	85.6 <sup>B</sup>	0 <sup>D</sup>
$M_7$	1/2RE	0.1	0.3	5	56	93.2 <sup>A</sup>	0 <sup>D</sup>
$M_8$	1/2RE	0.2	0.6	5	56	58.6 <sup>C</sup>	1.2 <sup>CD</sup>
$M_9$	1/2RE	0.3	0.8	5	56	38.6 <sup>D</sup>	3.4 <sup>BC</sup>
$M_{10}$	1/2RE	0.4	1.0	5	70	24.8 <sup>EF</sup>	6.2 <sup>AB</sup>

同列数字旁不同的大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

表2 不同胚龄对报春兜兰‘金州报春’种子萌发的影响

Table 2 Effect of different embryo ages on the embryo sprouting of *Paph. primulinum* ‘Jinzhoubaochun’

胚龄/d	起始萌发时间/d	萌发率/%		
		播种84 d	播种107 d	播种121 d
120	-	0 <sup>d</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
134	35	31.83 <sup>b</sup>	44.33 <sup>d</sup>	46.33 <sup>c</sup>
148	49	54.50 <sup>a</sup>	72.33 <sup>b</sup>	83.83 <sup>b</sup>
162	77	6.17 <sup>c</sup>	84.00 <sup>a</sup>	94.17 <sup>a</sup>
203	91	0 <sup>d</sup>	63.67 <sup>c</sup>	94.33 <sup>a</sup>
237	98	0 <sup>d</sup>	22.00 <sup>e</sup>	36.33 <sup>d</sup>

同列数字旁不同的小写字母表示差异极显著( $P < 0.05$ )。

不成熟, 播种后一直没有萌发现象, 萌发率始终为0; 134 DAP的种子, 蒴果剖开可见有种子有两种颜色, 一部分为浅土黄色种子, 大部分仍为白色, 种子仍然密生于胎座上, 显微镜下见种皮略带浅土黄色, 65%左右的种子内具有长0.35 mm, 宽0.16 mm的长椭圆形胚, 胚不能完全充满种皮的长边两侧(图1-A), 种子还不完全成熟, 种皮透水性好, 种子启动萌发快, 但是萌发低(图1-B), 萌发形成的原球茎产生白化现象(图1-C), 未白化的原球茎可正常成苗, 大部分白化原球茎在分化时期死亡(图1-D); 148 DAP的种子, 种皮完全变为浅土黄色, 胚

大小稍有增加(图1-E), 种子着生在胎座上, 用刀片轻轻刮下后, 在培养基中能很好分散开, 种子趋于成熟, 播种后启动萌发较快(图1-F), 萌发率达83.33%, 存在大量的白化原球茎(图1-G), 白化原球茎可以分化成小苗, 小苗也可以生长一段时间, 但在后期培养中不会转绿、不能长大也不易生根(图1-H), 所以为无效苗, 只有没白化的小苗能正常成苗; 162 DAP的种子, 种皮黄褐色, 剖开果皮后种子易于自动散落下来, 显微镜下可见种皮为均匀的浅黄褐色, 胚为长约0.51 mm, 宽约0.29 mm的椭圆形, 充满种皮中部位置, 种子成熟(图1-I); 203 DAP的种子, 种皮黄褐色, 胚饱满, 种子充分成熟, 162 DAP至203 DAP的种子成熟, 启动萌发所需要时间较长(图1-J), 但萌发率高达94.33%, 萌发后原球茎生长、分化正常(图1-K), 无白化现象(图1-L), 是种子离体繁殖取材的最佳时期; 237 DAP的种子, 种皮褐色、胚饱满成熟, 种子过于成熟, 萌发所需时间加长, 萌发率仅为36.33%。

### 3 壮苗生根及移栽

原球茎在萌发培养基可很好地分化, 若不是接种太密可等第一对小叶长出再转入壮苗培养基中, 120 d后可得到健壮试管苗(图1-M)。小苗移栽用直径2~3 mm的细树皮颗粒, 栽植于2寸育苗杯中, 加强水分管理, 成活率在90%以上(图1-N)。

## 讨 论

本实验表明, 报春兜兰'金州报春'种子适宜在较低的植物生长调节剂配比中萌发, 其中以 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA +  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA萌发率最高, 在NAA大于 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 6-BA大于 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的配比下萌发率下降, 且形成的原球茎会产生膨大、难分化、褐化、死亡等现象。

种子成熟度对种子萌发的影响很大, 120 DAP的种子内无正常胚, 不能萌发, 随着胚龄的增加, 134~203 DAP这段时间的种子渐渐成熟, 胚也不断饱满充实, 种子萌发率逐渐增加, 授粉203 d后的种子过度成熟, 萌发所需时间增加, 萌发率下降, 这主要是由于种子成熟后, 种皮和胚内累积萌发抑制物质以及种皮透水性降低所致。所以播种的时间应该是种子成熟, 但种皮及胚内萌发抑制物质未大量积累前。授粉后生长期少于162 d的种子虽

然启动萌发所需时间短, 但是萌发后会大量产生白化原球茎, 导致后来出现白化苗, 而授粉162 d后的种子播种后无白化现象产生。早期有研究人员对不同兜兰进行快速繁殖研究, 如带叶兜兰(曾宋君等2006)、亨利兜兰(曾宋君等2010)、文山兜兰白变种(黄玮婷和曾宋君2010)、白花兜兰(王莲辉等2010a)、小叶兜兰(王莲辉等2010b), 均未报道有白化现象, 在本研究中发现的幼龄种子萌发白化现象对进一步研究兰科植物叶艺的形成和退艺有所启示。

白化是植物叶色突变的常见类型之一, 白化现象广泛存在于植物界中, 引起研究人员的重视和深入研究, 如大豆(刘昭军等2005)、矮牵牛(张汉尧等2005)、油菜(赵云等2001)、蝴蝶兰(顾德峰等2007)等。白化最典型的特征是叶绿体不能正常发育, 进而表现出芽黄、子叶浅绿、迟绿、叶色呈条纹、花斑甚至整株失绿等现象。报春兜兰'金州报春'在授粉134~148 d这段时间, 胚成熟度不够, 产生50%以上的白化原球茎和白化小苗。白化原球茎的分化能力弱, 或者分化后可形成全株白色的小苗, 但小苗不易长大, 白化的形成在培养过程中仅表现为不可逆现象, 白化原球茎和小苗最终都玻璃化死亡, 成为无效萌发(图1-D、H); 而未发生褐化的原球茎的分化和生长均正常, 这说明在同一蒴果内的种子成熟度存在差异。采用授粉162 d以后的种子播种可完全消除白化现象的产生(图1-L), 所以在易产生白化的兜兰播种繁育中一定要选用成熟度适宜的种子, 如果产生白化小苗, 应该完全弃之。作者在石斛、兜兰的播种繁育中发现, 在生长繁茂的培养瓶内偶尔会产生极少量的叶片缺绿导致的花叶现象, 但是这种花叶, 在转入新的培养基上后, 新长叶可转绿, 可见这种花叶现象是营养元素缺乏导致的可逆变化, 在文山兜兰(*Paph. wenshanense*)的瓶播试验中也发现存在相似的未成熟胚萌发后形成不可逆白化幼苗现象(图1-P), 其产生原因有待进一步从叶绿体突变的分子机理方面加以研究。

## 参考文献

- 顾德峰, 刘喆, 宋彦君, 赵春莉, 王奇(2007). 蝴蝶兰类原球茎玻璃化产生的原因及恢复效果研究. 北方园艺, (8): 183~185  
胡适宜(2005). 被子植物生殖生物学. 北京: 高等教育出版社,

- 218~229
- 黄玮婷, 曾宋君(2010). 文山兜兰白变种的无菌播种和试管成苗. 植物生理学通讯, 46 (10): 1069~1070
- 刘昭军, 李希臣, 刘丽艳, 刘琦, 李铁, 陈伊里(2005). 大豆白化致死突变系的发现与分析. 大豆科学, 24 (3): 229~231
- 刘仲健, 陈心启, 陈利君, 雷嗣鹏(2009). 中国兜兰属植物. 北京: 科学出版社, 324~325
- 王莲辉, 魏鲁明, 姜运力, 潘德权, 冯育才(2010b). 小叶兜兰的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 46 (11): 1169~1170
- 王莲辉, 魏鲁明, 姜运力, 玉屏, 余登利, 潘德权(2010a). 白花兜兰的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 46 (10): 1071~1072
- 伍成厚, 李冬妹, 梁承邳, 叶秀淼(2004). 五唇兰珠被细胞的超微结构观察. 亚热带植物科学, 33 (3): 4~6
- 曾宋君, 陈之林, 段俊(2006). 带叶兜兰的无菌播种和离体快速繁殖. 植物生理学通讯, 42 (2): 247
- 曾宋君, 陈之林, 吴坤林, 张建霞, 段俊(2010). 亨利兜兰的离体快速繁殖. 植物生理学通讯, 46 (5): 471~472
- 张汉尧, 刘小珍, 杨宇明(2005). 矮牵牛组培白化苗与正常苗叶绿体DNA多态性研究. 湖北农业科学, (2): 15~16
- 张毓, 张启翔, 赵世伟, 凌春英(2010). 濒危植物大花杓兰胚与珠被发育的研究. 园艺学报, 37 (1): 72~76
- 赵云, 杜林方, 杨胜洪, 李世崇, 张义正(2001). 缺乏叶绿素的油菜突变体的叶绿体组成和结构变化. 植物学报, 43 (8): 877~880
- Koopowitz H (2008). Tropical Slipper Orchids: *Paphiopedilum* and *Phragmipedium* Species and Hybrids. London: Timber Press Inc, 165~166