

独蒜兰组培快繁技术体系的优化

张丽娜, 桂阳, 王沁, 罗安阔, 毛伟胜, 朱国胜*

(贵州省农业科学院/贵州省农作物品种资源研究所, 贵州 贵阳 550006)

摘要 目的:优化独蒜兰组培快繁技术体系,缩短组培周期。方法:以独蒜兰种子为外植体,进行不同采收期种子萌发、壮苗生根的培养基筛选。在初步筛选出的最佳配方基础上,进行培养基配方改良优化。结果:授粉后200 d的种子萌发率最高,萌发最快;B5+0.5 mg/L NAA最适种子萌发和生长;改良配方 MSN+1.2 mg/L NAA+100 g/L 土豆汁能较好地促进独蒜兰幼苗生长。结论:该优化的独蒜兰组织培快繁技术体系,能缩短组培周期,降低种苗生产成本。

关键词 独蒜兰;组织培养;原球茎;培养基

中图分类号:R282.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-4454(2017)12-2777-04

DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2017.12.007

独蒜兰 *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe 为兰科独蒜兰属多年生草本植物,一般为陆生、岩生或附生,在中国长江流域及以南地区的海拔 630~3 000 m 的密林下腐殖质丰富的土壤上或沟谷旁有苔藓覆盖的石壁上,常见大片野生独蒜兰分布^[1]。其假鳞茎为传统中药山慈菇的主要来源^[2]。由于独蒜兰的种子很细小,自然状态下不能独立萌发成苗,需要共生菌根真菌提供养分^[3,4]。目前生产上主要采用分株法进行繁殖,一般一个假鳞茎一年只生长 1~3 个新球茎,并且新球茎长成后,老球茎因养分耗尽而死亡,因此其无性繁殖系数极低。此外,独蒜兰的生长周期较长,子球需 2~3 年才能够开花,而以种子繁殖,需时更长达 4~5 年,因此种群数量在自然状态下增殖很慢^[5]。一直以来其主要靠野生资源供作药用,随着市场需求量的增加和价格的升高,资源遭到毁灭性的采挖,如今已经列为珍稀濒危药用植物。独蒜兰一个蒴果中有几万粒种子,利用种子进行萌发可以达到大规模繁殖的目的。已有文献^[6-8]对独蒜兰的组培快繁技术开展过研究,笔者在前人研究的基础上,对不同组培阶段进行配方筛选优化,旨在缩短组培周期,降低种苗生产成本。

1 材料与方法

1.1 材料 采自贵州省雷山县独蒜兰授粉后 120 d、150 d、170 d、200 d 的未开裂蒴果。蒴果先用 75% 酒精擦拭消毒,用消毒脱脂棉包裹好,装入牛皮纸袋,封好口,再放入 4℃ 冰箱中暂存备用。

1.2 方法

1.2.1 无菌播种 将独蒜兰蒴果表面先用 75% 的酒精擦拭 2~3 次,然后在超净工作台上用 95% 酒精擦

拭蒴果表皮后,用消毒过的镊子夹住蒴果在酒精灯外焰处来回快速烧 2~3 秒。无菌条件下用消毒后的解剖刀将消毒处理的蒴果一端切开一个小口,将种子均匀撒播于萌发培养基上。不同采收时间的蒴果统一用 B5 培养基进行萌发。种子萌发培养基筛选均采用授粉后 200 d 的种子。在种子大量萌发的次周,在显微镜下统计萌发率,每个处理统计 5 个视野,取平均值。

1.2.2 培养基设计:(1)种子萌发培养基的筛选:① MS;② 1/2MS;③ B5;④ B5+0.5 mg/L NAA;⑤ B5+1.0 mg/L NAA。(2)壮苗基本培养基的筛选:将种子萌发 3 个月后形成的无根幼苗,分成单棵苗,选择大小均匀、颜色鲜绿的幼苗转接在 MS、1/2MS、B5 与 KC 这四种基本培养基上,每瓶 15 棵,每种培养基 60 瓶。2 个月后进行统计观察,观察生根情况,测量转接前后原球茎鲜重,每 10 个球茎为一组称重,重复三次,取平均值,计算出单株球茎重量和增重率。(3)激素筛选:以 1/2MS 和 B5 基本培养基,在其中分别添加不同浓度的 NAA (0.4 mg/L、0.8 mg/L、1.2 mg/L、1.6 mg/L)。将在基本培养基上培养的幼苗进行第二次转接,选择大小一致的幼苗转接到添加了不同浓度 NAA 的培养基上,3 个月后进行统计观察,观察株高、生根数、原球茎增大情况。每个配方选取 10 株幼苗测量株高、球茎直径、生根数。(4)配方优化:① 1/2MS+1.2 mg/L NAA+100 g/L 土豆汁;② MSN+1.2 mg/L NAA+100 g/L 土豆汁,MSN 是在 MS 基础上改良的基本培养基,MSN 培养基包括硝酸钾 KNO₃: (950 mg/L),硝酸铵 NH₄NO₃ (375 mg/L),磷酸二氢钾 KH₂PO₄ (162.5 mg/L),

收稿日期:2017-02-16

基金项目:贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(黔科合 SY 字[2014]3031-1 号,黔科合 SY 字[2014]3031-2 号)

作者简介:张丽娜(1984-),女,硕士,研究方向:中药材资源收集与栽培;E-mail:zln1984@126.com。

* 通讯作者:朱国胜,E-mail:zgsah@yahoo.com.cn。

硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (190mg/L), 氯化钙 CaCl_2 (220 mg/L); MSN 微量元素、有机物和铁盐的组成成分和浓度和 1/2MS 相同。将种子萌发后 3 个月形成的无根幼苗, 选择大小一致的苗子转接到两种培养基上, 3 个月后进行统计观察, 观察株高、叶宽、总根长、球茎直径。每个配方选取 10 株幼苗测量株高、球茎直径、生根数。

所有培养基均添加琼脂粉 6.5 g/L、蔗糖 20 g/L、活性炭 0.5 g/L, 调 pH 5.8。1/2MS 指大量元素、微量元素、铁盐、有机物浓度均减半。

1.2.3 培养条件: 种子播种后置于培养室培养, 培养温度为 20 ℃ 左右, 光照强度为 2 000Lx, 光照时间为 12 h/d。

1.2.4 数据处理及分析: 采用 SPSS 20.0 进行数据分析, 邓肯法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同采收期种子萌发情况比较 不同采收期种子活力不同, 萌发效果也有很大差异(表 1)。通过观察发现授粉 120~200 d 内, 天数越多种子萌发率越高。不同采收期的种子活力测定表明授粉 170 d, 种子成熟度已经较高, 有活力胚率达 90% 以上。授粉 200 d 与 170 d 的蒴果比较, 种子活力变化不大, 但萌发率更高, 萌发更快。

表 1 不同采收期种子萌发情况

授粉天数 /d	TTC 测活/%	开始萌发 时间/周	大量萌发 时间/周	萌发率/%
120	70	9	12	43.50 ^c
150	80	4	7	62.75 ^{bb}
170	92	4	5	80.09 ^{aA}
200	91	3	5	83.38 ^{aA}

注: 同列不同大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著

2.2 不同培养基对种子萌发的影响 播种 3 周后, 培养基 1/2MS、B5、B5+0.5 mg/L NAA、B5+1.0 mg/L NAA 开始有少量种子萌发, 继续培养 1~2 周, 种子大量萌发, 6~7 周时开始有叶的分化, 长势均较好, 其中 B5+0.5 mg/L NAA 在 6 周时就开始出现叶的分化。MS 在播种 7 周后才开始萌发, 萌发缓慢且萌发率低, 10 周后才开始有少量叶的分化, 并

且长势十分缓慢。随着培养时间延长, 各培养基上的独蒜兰长势开始出现差异(表 2), 其中 B5+0.5 mg/L NAA 长势最好, MS 长势最差, 很少有叶的分化, 而其他培养基均出现大量叶的分化。说明相比 MS, 1/2MS 和 B5 更适合独蒜兰种子萌发, 但是 B5 对萌发后的生长更具优势。加入少量激素 NAA 对种子萌发后的生长更有利。试验结果表明, 激素 NAA 促使种子萌发和生长的最佳浓度为 0.5 mg/L, 浓度过高达 1.0 mg/L 时, 虽然对萌发影响不大, 但对后期生长不利, 反而不如不加 NAA 激素的 B5 的生长。

表 2 不同培养基对种子萌发的影响

培养基	开始萌发 时间/周	大量萌发 时间/周	开始长叶 时间/周	生长势
MS	7	7	10	+
1/2MS	3	5	7	++++
B5	3	5	7	++++
B5 + 0.5 mg/L NAA	3	5	6	+++++
B5 + 1.0 mg/L NAA	3	5	7	++

注: “+”表示长势极差, “++”表示长势差, “+++”表示长势一般, “++++”表示长势较好, “+++++”表示长势最好

2.3 不同基本培养基对幼苗生长的影响 幼苗经过 1 次转接, 3 个月的培养后, 在各种培养基上的生长情况出现很大差异(表 3)。在 B5 培养基上培养后少量植株叶片发黄, 大部分呈黄绿色, 有原球茎的膨大生长, 原球茎增重最多, 幼苗的根数最多最壮, 长势较好。在 1/2MS 培养基上培养后, 叶呈深绿色, 叶大而宽, 株高叶茂, 原球茎有明显的增大, 增重率仅次于 B5。从株高和叶片看 1/2MS 培养的幼苗长势最好, 株高显著高于其他配方, 但是从原球茎的生长和生根情况看, B5 比 1/2MS 更好。在 MS 基本培养基上随培养时间的延长, 植株叶片逐渐变黄大量死亡, 少数成活的植株叶片呈黄绿色, 叶尖干枯, 叶片狭小, 原球茎生长缓慢, 没有根, 长势最差。在 KC 基本培养基上培养后, 植株逐渐变成黄色, 部分幼苗有原球茎的膨大生长, 但球茎较小, 无根, 长势较差。

2.4 不同激素浓度对幼苗生长的影响 在 B5 和 1/2MS 基本培养基中分别加入不同浓度的 NAA, 幼

表 3 不同基本培养基对丛生苗生长的影响

培养基	转入球茎重/g	培养后球茎重/g	增重率/%	株高/cm	根数/条	生长势
MS	0.0485	0.0617	27.22 ^{dd}	1.49 ^{cc}	0	+
1/2MS	0.0485	0.0880	81.44 ^{bb}	3.35 ^{aA}	0~4	++++
B5	0.0485	0.0950	95.88 ^{aA}	2.15 ^{bb}	0~5	+++
KC	0.0485	0.0743	53.20 ^{cc}	1.57 ^{cc}	0	++

注: “+”表示长势差, “++”表示长势一般, “+++”表示长势较好, “++++”为长势最好。同列不同大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著

表 4 不同激素浓度对丛生苗生长的影响

培养基	株高/cm	球茎/cm	根数/条	生长势
1/2MS+0.4 mg/L NAA	4.70 ^{cCd}	0.275 ^{cdBC}	3~7	++
1/2MS+0.8 mg/L NAA	6.20 ^{bB}	0.37 ^{bcBC}	3~8	+++
1/2MS+1.2 mg/L NAA	8.25 ^{aA}	0.645 ^{aA}	4~8	++++
1/2MS+1.6 mg/L NAA	5.30 ^{cBC}	0.245 ^{dC}	0~3	+
B5+0.4 mg/L NAA	4.45 ^{dC}	0.445 ^{bBC}	3~7	++
B5+0.8 mg/L NAA	5.95 ^{bB}	0.675 ^{aA}	5~8	+++
B5+1.2 mg/L NAA	4.55 ^{dC}	0.445 ^{bB}	4~8	++
B5+1.6 mg/L NAA	3.50 ^{eD}	0.275 ^{cdBC}	0~3	+

注:“+”表示长势差,“++”表示长势一般,“+++”表示长势较好,“++++”表示长势最好。同列不同大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著

苗经过二次转接,培养 3 个月后,在不同培养基上生长差异较大(表 4)。从表 4 中可以看出,在一定范围内,NAA 浓度越高,幼苗生长越好,达到一定高度,生长变差,NAA 浓度达到 1.6mg/L 时,随着培养时间变长,很多幼苗开始变黄,甚至死亡。比较 8 个配方,在 1/2MS+1.2 mg/L NAA 培养基上株高显著高于其他配方,球茎较大,生根情况也较好,生长势最佳。培养基 B5+0.8 mg/L NAA 对球茎的生长十分有利,生根情况较好,生长势也较佳,但是株高一般。综合考虑株高、球茎、生根情况及整体生长势,1/2MS+1.2 mg/L NAA 最适合独蒜兰幼苗生长。

表 5 MSN 培养基和 1/2MS 培养基培养的独蒜兰幼苗的生长情况差异

培养基	株高/cm	叶宽/cm	球茎直径/cm	根数/条	生长势
①1/2MS+1.2 mg/L NAA+100 g/L 土豆汁	7.58 ^{aA}	0.54 ^{bA}	0.467 ^{bB}	4~8	良好
②MSN+1.2 mg/L NAA+100 g/L 土豆汁	6.52 ^{aA}	1.04 ^{aA}	0.767 ^{aA}	4~10	良好

注:同列不同大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著

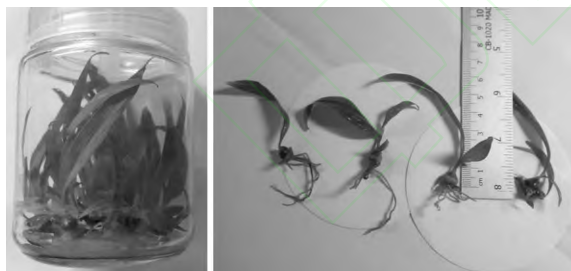


图 1 MSN+1.2 mg/L NAA+100 g/L 土豆汁培养的独蒜兰幼苗



图 2 1/2 MS+1.2 mg/L NAA+100 g/L 土豆汁培养的独蒜兰幼苗

3 讨论

3.1 适时采收种子播种能有效提高萌发率 实验结果表明,独蒜兰种子最佳采收期应该在授粉后 200 d 左右,即在 10 月中下旬采收较好。种子采收后要尽快播种,因为在放置过程中种子活力不断下降,影响萌发,黄永会等^[11]的研究也表明新鲜采集的独蒜兰种子萌发率可以高达 98%。此外,放置时间长,种子外壳极易裂开,导致播种时消毒困难而污

染严重。

3.2 少量激素能促进种子萌发后的生长 1/2MS 和 B5 都适合独蒜兰种子的萌发,但是随着培养时间延长,B5 促进原球茎生长的优势更明显。在 B5 培养基中添加少量激素 NAA 对前期的萌发影响不大,但是对萌发后原球茎的生长十分有利。

3.3 改良培养基更适合独蒜兰壮苗生根 独蒜兰的

根系不发达,组培苗也是如此,很难长根,这可能也是造成独蒜兰生长缓慢的原因之一。本实验比较了MS、1/2MS、B5与KC四种基本培养基对独蒜兰壮苗生根和原球茎生长情况的影响,其中MS和KC培养基不利于幼苗和原球茎的增长,随着培养时间延长,幼苗逐渐变黄枯死,进而导致球茎生长缓慢以至停滞。1/2MS和B5均能明显促进独蒜兰幼苗和原球茎的健壮生长,1/2MS培养基对地上部分茎叶生长有利,但是B5培养基对球茎和根的生长更有利,这可能与其营养元素含量有关,1/2MS培养基的成分中N含量高于B5培养基,而P和K的含量少于B5。在1/2MS和B5基本培养基中添加一定浓度的NAA能促进幼苗生长,其中1/2MS+1.2 mg/L NAA最适合独蒜兰幼苗生长。但是1/2MS培养基上培养的幼苗经常出现地上植株太过繁茂的现象,改良的MSN配方避免了地上枝叶繁茂徒长的问题,更有利于球茎膨大,并且改良的配方(MSN+1.2 mg/L NAA+100 g/L 土豆汁)只需要将萌发的幼苗转接一次,培养3个月后即可进行移栽,和以往报道的相

比,减少一次转接,培养周期缩短了3个月,大大降低了生产成本。

参 考 文 献

- [1] 刘虹,吴瑞云,陈雁.独蒜兰[J].生物学通报,2010,45(12):50.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2015:32-33.
- [3] 朱国胜,桂阳,刘作易.独蒜兰共生菌根真菌动态变化研究[J].湖北农业科学,2009,48(10):2484-2487.
- [4] 杨友联,刘作易,朱国胜.独蒜兰种子共生萌发研究[J].微生物学通报,2008,35(6):909-912.
- [5] 唐荣平,苏汉林.丽江山慈菇的濒危机制和保护对策探讨[J].中国野生植物资源,2009,28(3):19-20.
- [6] 黄成林,项艳,吴泽民,等.独蒜兰快繁技术的研究[J].安徽农业大学学报,2004,31(1):100-103.
- [7] 黄永会,朱国胜,毛堂芬,等.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.
- [8] 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.