



五唇兰的组织培养和快繁技术研究

陈喜蓉, 陈显臻, 钟剑峰, 林芳能

(海南省林业科学研究所, 海南海口 571100)

摘要: 目前野生兰花资源不断减少, 部分品种濒临灭绝; 本研究是从野生五唇兰植株直接切取茎尖进行离体组织培养, 以五唇兰试管苗的原球体和幼苗作为试验材料, 在 13 种培养基上进行增殖快繁与生根试验。结果表明, M4 是有利于外植体诱导形成原球茎的培养基, M6 是有利于原球体增殖生长的培养基; M9 是既适于原球体增殖生长又适于幼苗根生长的培养基; M12 是幼苗生根最适的培养基, 在同一栽培基质中, 试管苗经过斜射太阳光炼苗 60d 左右, 污染率较低且移栽成活率较高。

关键词: 五唇兰; 茎尖; 组织培养; 原球体; 快速繁殖

中图分类号: S682.31

文献标识码: B

据了解, 五唇兰 (*Doritis pulcherrima* lindl.) 为兰科濒危物种, 在我国只分布于海南省, 目前全岛野生五唇兰仅存几百株。我国共有 1200 多种兰科植物, 其中 200 多种处于濒危状态。造成这种状态的一个重要原因便是人类活动对兰花生境的严重破坏, 由于五唇兰具有很高的观赏价值, 在利益驱动下, 盗采滥挖行为猖獗, 致使这一品种濒临灭绝。而且在自然条件下, 因五唇兰种子十分微小, 胚很细弱, 种子几乎没有储藏营养物, 绝大多数种子会在发芽过程中夭折, 只有少数种子遇到菌根才能萌发。五唇兰种子繁殖困难, 采用组织培养的方法进行五唇兰的无性繁殖, 可在一定程度上解决上述问题。本试验采用组织培养技术对五唇兰进行离体快繁技术研究, 现将研究报告如下:

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料由位于海南乐东县尖峰岭的中国林科院热带林业研究所试验站提供的野生种苗。

1.2 地点

试验于 2004 年 12 月至 2006 年 4 月在省林科所生物技术研究室进行。

1.3 方法

1.3.1 茎尖的培养

在超净工作台上将五唇兰植株除去叶片, 按常规消毒, 切取茎尖, 将获得的外植体接种到 1/2 MS 或改良 V & W 培养基上, 在 $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 1200 ~ 2000 LX 光照下, 光照培养 $8 \sim 12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 经过 60d 左右的培养可获得诱导原球茎球状体。以 6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.1 mg/L 为基本激素, 以 MS 空白不加激素作为对照, 比较几个不同基本培养基对外植体诱导形成原球茎的影响, 将外植体材料分别接种在 M1 ~ M4 培养基上, 每处理接种 15 个, 重复 4 次。培养基组成部分 (见表 1)

表 1 培养基组成部分

培养基	组 成 部 分
M1 (CK)	MS + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M2	改良 KC + 6-BA 1.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M3	改良 V&W + 6-BA 1.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M4	1/2MS + 6-BA 1.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M5	1/2MS + 6-BA 2.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M6	1/2MS + 6-BA 3.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M7	1/2MS + 6-BA 4.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M8	1/2MS + 6-BA 5.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M9	1/2MS + 6-BA 3.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 香蕉汁 5% + 活性炭 0.2% + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M10	1/2MS + 6-BA 3.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 香蕉汁 5% + 活性炭 0.2% + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M11	1/2MS + 6-BA 3.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 椰子汁 5% + 活性炭 0.2% + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M12	1/2MS + IBA 3.0mg/L + NAA 0.1mg/L + 活性炭 1% + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L
M13	花宝 1号 3.0 mg/L + 活性炭 1% + 卡拉胶 8.0g/L + 蔗糖 20g/L

注: 以上培养基都是 pH = 5.2 ~ 5.4。

1.3.2 原球体增殖

在无菌条件下分离五唇兰原球体、幼苗, 将分离



所得的单个材料分别接种在 M1~M11 培养基上,每瓶接种 15 个,重复 4 次,在 1500~2000LX 的光照条件下,培养温度 28~30℃,光照 8~10h/d。

1.3.3 成苗与生根培养

选择大小一致的丛生小苗分成单株分别移到 M8~M13 几种不同的成苗、生根培养基上进行壮苗、生根培养,经过一个月的培养后,比较已经成苗(即带根长叶)植株的生根与生长速度。

1.3.4 试管苗的移栽

以松树皮的碎屑加少量瓦粒或水苔为基质,比较炼苗不同时间对试管苗移栽成活的影响。

2 结果分析

2.1 不同基本培养基对外殖体诱导形成原球茎的影响

将五唇兰外殖体接种在 M1~M4 共 4 种不同基本培养基上,培养 60d,不同配方的培养基在相同时间内,五唇兰外殖体诱导形成原球茎增殖倍数不同,从表 2 可以看出,M4 培养基有利于五唇兰外殖体诱导原球茎的形成,原球茎形成数为 22.5,其次是 M3,原球茎形成数为 14.6,M1 为最差。M1 为高盐成分培养基,M2、M3 为低盐成分培养基,M4 是 M1 高盐成分减半后的培养基,根据表 2 说明五唇兰植株的培养适合于低盐成分培养基,而且 M4 为最佳培养基。

表 2 不同基本培养基对外殖体诱导形成原球茎的影响

培养基	M1	M2	M3	M4
培养数	15	15	15	15
原球茎形成数	3	11.3	14.6	22.5

2.2 不同培养基对原球体增殖的影响

接种后 1~2 个月培养的茎尖即可形成原球茎球状体,以后即发芽生根长叶。在其发芽前把它切成小块进行转移,让它不断地形成原球茎球状体,这样连续的进行继代培养,短时间可以得到大量的原球茎球状体。但原球茎的生长繁殖速度在不同浓度的激素作用下不同,因此以 1/2 MS 为基本培养基,在 NAA0.1mg/L 不变的水平下,比较不同浓度的 6-BA(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mg/L)、对原球体增殖的影响,将五唇兰原球体接种在 M1~M11 共 11 种培养基上,培养 60d,不同配方的培养基在相同时间内,

五唇兰原球体增殖倍数不同,从表 3 可以看出,M6 培养基有利于五唇兰原球体的增殖形成,增殖倍数为 46.7 倍,其次是 M7 培养基,增殖倍数为 43.2 倍,M8 培养基增殖倍数下降,说明分裂激素 6-BA 的浓度宜在 1.0~5.0 之间,不宜超过 5.0,也不宜低于 1.0,6-BA 的浓度 3.0 为最佳浓度。

表 3 不同培养基对原球体增殖的影响

培养基	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
培养数	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
增殖倍数	2	5.7	6.3	23.1	26.3	46.7	43.2	18.7	30.7	23.0	18.3

2.3 添加 5% 不同天然有机物的培养基对原球体增殖、成苗的影响

由表 1 可知,M9、M10、M11 培养基为 M6 培养基添加不同天然有机物后演变的培养基,原球体增殖培养基添加天然有机物和 0.2% 的活性炭后,原球体形成后有一部分形成了带根的小苗,所以 M9、M10、M11 培养基原球体增殖倍数小于 M6 培养基原球体增殖倍数,添加不同天然有机物的培养基原球体增殖倍数顺序为 M9>M10>M11,说明添加天然有机物 5% 番茄汁为最佳,既适于幼苗根生长又适于原球体增殖生长,其次为香蕉汁,椰子汁差些。

2.4 不同培养基对幼苗根生长的影响

为了确定根生长的最佳激素组合,我们设置了不同激素组合的培养基。将五唇兰幼苗分别接种在 M9~M13 共 5 种培养基上,培养 60d,从表 4 可以看出,不同激素组合的培养基在相同培养数量、相同时间内,生根能力不同,M9、M11、M12 培养基的污染率为 0,M12、M13 培养基是最适根生长的培养基,生根数最多,达 15 根,生根率 100%,根长在 0.1~2.0cm 的范围;其次是 M10 培养基;M9、M11 培养基不利于根的生长,说明激素 IBA 与 NAA 组合或兰花专用花肥配成母液都有利于生根,天然有机物香蕉汁对生根也具有促进作用。

表 4 不同培养基对幼苗根生长的影响

培养基(mg/l)	培养数(株)	污染数	生根数	根长范围(cm)
M9	15	0	5	0.1~0.3
M10	15	2	10	0.1~0.8
M11	15	0	6	0.1~0.5
M12	15	0	15	0.1~2.0
M13	15	2	15	0.1~1.0

2.5 试管苗的炼苗和移栽



试管繁殖最大困难是已生根试管苗移栽成活率的问题,由于受外界环境条件的影响比较大,生根试管苗由瓶内移到苗圃,很难适应外移过程中的环境变化,极易失水萎蔫枯死。因此,试管瓶苗移栽之前必须经过斜射太阳光的锻炼,生根培养 30d 以后,不定根长至 1cm 时,将五唇兰生根瓶子移至斜射太阳光 8000LX ~ 12000LX 下,带瓶盖继续培养 60d 左右,此法可使试管苗幼茎更加充实,发育健壮,有利于提高适应能力和抗病性,闭瓶锻炼结束后,除去瓶盖继续锻炼 2 ~ 3d,使叶片适应低湿环境,但必须在培养基表面出现大量杂菌前进行移栽,从瓶内取出经过锻炼的生根试管苗,除去根部的培养基,移栽到松树皮碎屑加少量瓦粒的基质或水苔基质中,比较不同炼苗时间对试管苗移栽成活的影响,由表 5 可见,试管瓶苗经过太阳斜射光的锻炼,随着时间的增加,污染数加大,但是苗的生长势较强,锻炼时间以 60d 为最好,污染数少而移栽成活数最多,未经锻炼的试管苗时间短,污染数虽少,但移栽成活数也少,苗生长势最弱。

表 5 以水苔为基质比较不同炼苗时间对试管苗移栽成活的影响

瓶苗锻炼天数(d)	培养数(瓶)	污染数(瓶)	成活数(株)	植株生势
0	30	0	61	叶片淡绿根细长
30	30	2	126	叶片浓绿根略壮
60	30	3	285	叶片浓绿根粗壮
90	30	6	220	叶片浓绿根粗壮
120	30	8	215	叶片浓绿根粗壮

注:每瓶培养 10 株生根苗

3 结论

根据培养基组成部分及观察结果分析,五唇兰幼苗、原球茎在 1/2MS 培养基上都形成原球体,幼苗也能生根;以 1/2MS 培养基作为基本培养基,附加 BA3.0mg/l 和 NAA0.1mg/l 时,有利于五唇兰原球体的增殖;或添加天然有机物 5% 番茄汁,既适于幼苗的形成又适于原球体增殖生长,其次为香蕉汁,椰子汁差些;附加 IBA3.0mg/l、NAA0.1mg/l 时,有利于生根,生根试管苗经过太阳斜射光 60d 的锻炼,移栽成活数比较多。五唇兰茎尖培养成功,利用组培技术使这一优良濒危品种在较短时间内,由一株繁殖至几万株甚至更多,从根本上改变了野生兰花濒临灭绝的处境,这一技术的推广应用,可实现五唇兰工厂化生产,为丰富们的精神文化生活及海南生态省建设作出贡献。

参考文献

- [1] 曹致义,刘国民主编.实用植物组织培养技术教程.甘肃科学技术出版社,1999.84 ~ 85
- [2] 李任珠,刘国民,潘学峰,等.杂种石斛兰组织培养的研究[J].海南大学学报自然科学版,1995,13(4):315 ~ 318

(上接第 42 页)形成一条树木景观长廊,或形成复层、多彩的绿化景观。树木配置既要体现绿化带的形式美,又要体现不同地域的自然美。而在公路交叉路口要根据不同土地条件,建成乔灌结合、林草结合,形成四季常青,春花、夏绿、秋色、冬姿的美景与自然背景,可使途中旅客达到近观园林景色、远眺自然风光,心情愉悦、减少旅途疲劳的效果,还可以使驾驶人员心情舒畅、精神集中,确保交通安全。

4.4 做好科学规划设计,提高工程建设质量

通过本次检查验收结果,对原作业设计不合理或无作业设计的部分,应由省林业调查规划院派出专业技术人员,统一进行科学、合理的规划作业设计,把任务落实到有关单位,制定完成任务时间、要求,同时加强监督检查,保证工程建设质量。

4.5 建设好样板,推动全省绿色通道建设的发展

深汕高速公路是我省较早建成通车的高速公路之一,沿线所经区域是改革开放的前沿,也是对外开发的窗口。建设好深汕高速公路绿色通道,不仅起到改善沿线森林生态环境的作用,还可以提升我省绿色生态文明形象。因此,通过本次检查验收,根据工程未完成的项目,尽快建好、建美,树立深汕公路绿色通道建设样板,推动全省绿色通道建设工程迅速发展。

参考文献

- [1] 深汕高速公路绿色通道建设工程竣工验收报告.广东省林业调查规划院,2004,11
- [2] 辽宁省绿色通道建设的现状与思考.辽宁林业科技第 2 期