

文章编号: 1004-3918(2007)01-0073-04

# 红头兰 (*Tuberolabium quisumbingii*)

## 胚培养和快速繁殖

崔波<sup>1</sup>, 马杰<sup>2</sup>, 张仙云<sup>1</sup>

(1. 郑州师范高等专科学校 生物技术研究所, 郑州 450044; 2. 河南省科学院 生物研究所, 郑州 450008)

**摘要:** 以红头兰的胚为材料, 研究了红头兰的胚培养和快速繁殖技术。结果表明: 培养基中无机盐的浓度和激素影响胚的萌发, 在 1/4 MS 培养基加入 0.5 mg/L 的 KT 效果最佳; 培养基中加入椰子水、土豆提取物、蛋白胨和活性炭均有利于胚的萌发; 在继代培养中, 适宜的培养基为 1/3 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.01 mg/L+椰子水 10%+蛋白胨 2 g/L+活性炭 2 g/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 7 g/L; 分化和壮苗培养基为 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+蔗糖 20.0 g/L+AC 2.0 g/L+蛋白胨 2.0 g/L+琼脂 7 g/L。

**关键词:** 红头兰; 胚培养; 圆球茎; 组织培养; 快速繁殖

**中图分类号:** Q 943.1 **文献标识码:** A

红头兰 (*Tuberolabium quisumbingii*) 是兰科 (*Orchidaceae*) 管唇兰属 (*Tuberolabium*) 植物。管唇兰属全球约有 11 种, 分布于东南亚、澳大利亚和太平洋岛屿, 向北到我国台湾和印度阿萨姆。该属植物均为附生兰, 红头兰是该属具有代表性的一个种。红头兰原产菲律宾, 叶厚革质, 花序自叶间长出, 花生于花序具鞘的节上, 具浓烈香味, 花唇瓣白色具红色或紫色的斑点。因其花型独特、花色艳丽、香味浓郁而具有较高的观赏价值。但红头兰的种子由于胚发育不完全, 且无胚乳, 在自然状态下极难萌发。本文采用人工授粉技术, 选用适龄蒴果为材料, 进行无菌胚培养, 获得大量的试管苗, 并利用胚萌发所得到的圆球茎或小苗进行组织培养, 大量扩增其数量, 可成功地开展红头兰种苗的工厂化大批量生产, 具有出苗快、稳定性高、苗壮、品质高、抗性强的特点, 并可为管唇兰属其他种、属内或与其他属间杂种的无菌播种和组织培养提供方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用的材料红头兰 (*Tuberolabium quisumbingii*), 来自郑州师专温室。开花时选取生长健壮的母株, 在同种异株间进行人工授粉。授粉后 120 d 的成熟果实里面的胚作为外植体。

### 1.2 方法

**1.2.1 无菌播种** 蒴果采集后, 先用 75% 的乙醇进行表面灭菌 30~60 s, 再用 0.1% 氯化汞溶液进行表面灭菌 15 min, 于无菌操作台内将蒴果剖开后, 用镊子将种子刮入无菌水中, 摇匀后用吸管将种子吸出, 注在培养基平板上。种子在培养 20 d、40 d、60 d 和 80 d 后, 各随机取出 100 粒左右种子, 置于解剖显微镜下观察胚的萌发率。胚吸水膨大并形成白色圆球茎 (*protocorm*) 为萌发。

**1.2.2 组织培养** 以胚萌发形成的圆球茎为外植体, 植入不同的培养基中, 培养 60 d 后计算其繁殖系数和分化情况。

**1.2.3 培养基组分试验** 实验以 MS 培养基为基本培养基, 均添加蔗糖 20 g/L, 琼脂 7 g/L。其大量元素作了不同比例的减量, 并且添加了蛋白胨、椰子水等有机物和活性炭、不同浓度的激素等。培养基 pH 值均为 5.2~5.4。120 °C 灭菌 25 min。

培养基中无机盐浓度对胚萌发的影响: 将 MS 培养基的大量元素降低为标准浓度的 1/1、1/2、1/4、1/8, 其

收稿日期: 2006-09-08

基金项目: 河南省科技攻关项目 (0524050005)

作者简介: 崔波 (1962-), 男, 河南泌阳人, 研究员。

它成分不变,均加入10%椰子水、2 g/L的活性炭和KT 0.5 mg/L。

不同浓度的激素对胚萌发的影响:基本培养基为1/4 MS分别加入KT 0.1 mg/L、0.5 mg/L, NAA 0.1 mg/L、0.5 mg/L, 6-BA 0.1 mg/L、0.5 mg/L。以不加任何激素的1/4 MS培养基为对照。所用培养基均加2 g/L的活性炭。

有机添加物对胚萌发的影响:基本培养基为1/4 MS加KT 0.5 mg/L和2 g/L的活性炭,添加的有机物分别为椰子水10%,蛋白胨2 g/L,土豆提取液50 g/L。

活性炭对胚萌发的影响:基本培养基为1/4 MS加KT 0.5 mg/L,添加活性炭2 g/L,以不加活性炭的培养基为对照。

培养基中无机盐浓度对圆球茎增殖和分化的影响:分别将无菌播种得到的圆球茎接种到MS、1/2 MS、1/3 MS培养基中,均添加椰子水10%、蛋白胨2 g/L、活性炭2 g/L、6-BA 2 mg/L和NAA 0.01 mg/L。

不同激素的浓度组合对圆球茎增殖和分化的影响:在1/3 MS培养基中添加不同浓度的6-BA和NAA,通过不同浓度的激素组合,筛选适宜的培养基。

1.2.4 分化壮苗培养 将组织培养增殖后已经分化的小苗接种到1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+蔗糖20.0 g/L+AC 2.0 g/L+蛋白胨2.0 g/L培养基上,继续进行培养,形成完整的植株。

1.2.5 瓶苗移栽 当瓶苗培养60~90 d,长至5 cm左右时,转移至自然光下炼苗7~10 d,然后将其从玻璃瓶中取出,洗净根部粘连的培养基后,移入水苔为基质的穴盘或营养钵中,适当遮荫。

1.3 培养条件 所有的培养温度均为(24±2)℃,光照2 500~3 000 lx,光照时间12 h·d<sup>-1</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对胚萌发的影响

红头兰胚的萌发,以1/4 MS最适宜,培养80 d时萌发率高达54.0%,其次为1/8 MS、1/2 MS,以全浓度MS培养基萌发率最低(表1)。不同激素和浓度对胚萌发的影响比较大,以KT 0.5 mg/L的效果最佳(表2)。有机添加物对红头兰胚的萌发有明显的促进影响,效果以椰子水(10%, v/v)最好,土豆(50 g/L)提取液和蛋白胨(2 g/L)也有一定的促进作用(表3)。培养基中添加活性炭,对胚的萌发具有显著的促进作用(表4)。

表1 不同浓度的MS培养基对红头兰胚萌发的影响

Tab.1 Effect of the different concentration of MS macro elements on embryo germination of *Tuberolabium quisumbingii* in vitro

MS 大量元素的浓度	播种天数和萌发率/%			
	20	40	60	80
MS	4.6	8.3	10.7	12.1
1/2 MS	26.8	28.7	32.2	44.3
1/4 MS	38.2	47.4	50.2	54.0
1/8 MS	37.0	42.8	47.3	51.1

表2 不同浓度的激素对红头兰胚萌发的影响

Tab.2 Effect of the different concentration of phytohormone on embryo germination of *Tuberolabium quisumbingii* in vitro

激素的浓度	播种天数和萌发率/%			
	20	40	60	80
CK	0	4.5	7.4	7.8
KT 0.1 mg/L	28.2	37.3	41.8	43.5
KT 0.5 mg/L	39.4	43.5	46.7	48.3
NAA 0.1 mg/L	8.6	17.4	21.8	23.2
NAA 0.5 mg/L	11.5	20.6	27.8	31.5
6-BA 0.1 mg/L	22.6	31.3	33.6	33.9
6-BA 0.5 mg/L	25.4	33.0	37.8	39.0

表3 有机添加物对胚萌发的影响

Tab.3 Effect of organic supplements on embryo germination of *Tuberolabium quisumbingii* in vitro

有机添加物	播种天数和萌发率/%			
	20	40	60	80
CK	28.0	32.3	35.2	42.6
椰子水(10%, v/v)	37.8	46.5	49.0	52.3
蛋白胨 2 g/L	32.3	35.7	40.2	43.7
土豆提取液 50 g/L	31.6	36.3	39.4	42.1

表4 活性炭对胚萌发的影响

Tab.4 Effect of activated charcoal on embryo germination of *Tuberolabium quisumbingii* in vitro

活性炭/(g·L <sup>-1</sup> )	播种天数和萌发率/%			
	20	40	60	80
0	25.3	28.2	31.0	33.2
2	37.4	46.5	47.0	51.8

## 2.2 圆球茎的增殖和分化

将无菌播种获得的圆球茎转接到增殖培养基上,7 d后圆球茎开始萌动,60 d时明显增殖,繁殖系数一般在10~12之间。红头兰圆球茎的增殖相对比较容易,在各个浓度的MS培养基和不同浓度的6-BA和NAA组合中都能增殖,繁殖系数也相差不大。但是圆球茎的分化受MS培养基中大量元素的浓度影响较大,高浓度的培养基中圆球茎较小且致密,很少分化成苗,但大量元素浓度降低后,圆球茎外表比较蓬松,分化率也明显提高(表5)。不同浓度的6-BA和NAA组合均能使圆球茎增殖,但NAA相对量的增加更有利于圆球茎的分化,6-BA相对量的增加有利于圆球茎的增殖(表6)。

表5 不同浓度的MS培养基对红头兰圆球茎增殖和分化的影响

Tab.5 Effect of the different concentration of MS major salts on protocorm propagation and differentiation of *Tuberolabium quisumbingii* in vitro

MS大量元素的浓度	繁殖系数	分化情况
MS	12.9	圆球茎小而致密,少有分化
1/2 MS	10.8	圆球茎中等大小,致密,约有20%分化为苗
1/3 MS	10.4	圆球茎疏松而较大,约有40%分化为小苗

表6 不同激素组合对圆球茎增殖的影响

Tab.6 Effect of different phytohormone combination on protocorm propagation and differentiation

激素组合	繁殖系数	分化率/%
NAA 0.1 mg/L	11.2	24.3
1/3 MS+6-BA 5 mg/L + NAA 0.3 mg/L	12.0	37.5
NAA 0.5 mg/L	12.5	42.0
6-BA 1.0 mg/L	10.1	20.0
1/3 MS+ NAA 0.01 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L	10.3	41.5
6-BA 5.0 mg/L	11.6	35.6

## 2.3 分化壮苗培养和瓶苗移栽

将增殖的圆球茎或小苗切割分离,转入分化壮苗培养基中培养,圆球茎一般30 d左右分化,继续培养60~90 d,形成完整的小植株,待小苗长至高5 cm左右时出瓶,定植于水苔为基质的穴盘中,经常喷水,保持温度18~25℃,空气湿度70%~90%,光照强度3 000~6 000 lx。一个月后统计移栽成活率,达到90%以上。

## 3 讨论

红头兰种子极为细小,胚未分化且不含胚乳,只达到球型胚阶段,无子叶、胚根和胚芽,在原产地需要与

真菌共生方能萌发,但胚在人工培养基上可发育成幼小植株。试验结果显示红头兰的胚比较适宜在较低的无机盐浓度下萌发,1/4 MS 培养基能较好地满足其胚萌发的营养要求,有比较高的萌发率。培养基中添加适量的植物激素能显著地提高红头兰胚的萌发率,以 0.5 mg/L KT 效果最佳。培养基中加入有机添加物也能促进胚的萌发,以添加椰子水的效果最显著,表现为胚萌发较快且整齐。土豆提取物和蛋白胨虽然效果不及椰子水,但圆球茎的颜色浓绿,分化的苗也比较粗壮。活性炭对红头兰胚的萌发也有重要的影响,未添加活性炭不但萌发率低于添加活性炭的,而且圆球茎和小植株易发生褐化现象。

在红头兰圆球茎的培养中,培养基中无机盐的浓度和不同浓度激素的组合对于圆球茎的增殖和分化起着至关重要的作用。虽然在所用的几种培养基上圆球茎均能增殖,但考虑到对下一步种苗的生产的影响,以 1/3 MS 培养基最为有利,圆球茎体积较大,而且比较容易分化为完整的植株。综合比较,适宜红头兰圆球茎增殖继代培养的培养基为 1/3 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.01 mg/L+椰子水 10%+蛋白胨 2 g/L+活性炭 2 g/L。经过进一步的分化和壮苗培养,可得到大量的商业种苗。

#### 参考文献:

- [1] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京:中国林业出版社,1998:18-69.  
[2] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999:374-386.

## Embryo Culture and Rapid Propagation of *Tuberolabium quisumbingii*

CUI Bo<sup>1</sup>, MA Jie<sup>2</sup>, ZHANG Xian-yun<sup>1</sup>

(1. Institute of Biotechnology, Zhengzhou Teacher's College, Zhengzhou, 450044, China;

2. Institute of Biology, Henan Academy of Sciences, Zhengzhou, 450008, China)

**Abstract:** In this paper the embryo culture and rapid propagation of *Tuberolabium quisumbingii* was researched. The results show that the concentration of major salts and the phytohormones in MS medium affect the germinative capacity of the embryos and the suitable medium is 1/4 MS + KT 0.5 mg/L; it is all conducive to germination of embryos to add coconut water, peptone, potato and activated charcoal in MS medium; 1/3 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.01 mg/L + coconut water 10% + peptone 2 g/L + AC 2 g/L + sucrose 20 g/L + agar 7 g/L is the optimum medium for subculture; 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L + sucrose 20.0 g/L + AC 2.0 g/L + peptone 2.0 g/L + agar 7 g/L is the optimum medium for differentiation and plant establishment.

**Key words:** *Tuberolabium quisumbingii*; embryo culture; protocorm; tissue culture; rapid propagation