

云南火焰兰种子无菌萌发和试管育苗

林丹妮^{1,2}, 陈之林¹, 段俊¹, 吴坤林¹, 曾宋君^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:对云南火焰兰进行无菌播种技术试验。结果表明, 适宜萌动的培养基为 1/4MS + 椰子水 20% + 蛋白胨 1 g L^{-1} + 蔗糖 10 g L^{-1} , 播种 30 d 时萌动率可达 93.1%; 适宜萌发的培养基为 VW + 椰子水 10%, 培养 75 d 时萌发率达 36.6%。盐浓度较高的 MS 培养基不适合种子萌发和原球茎生长, 低盐的 KC 培养基上种子能较好地萌发和成苗; 添加椰子水可明显提高种子萌动率, 并有利于原球茎的生长和分化。光培养和暗培养对种子萌动的影响差异不明显, 但暗培养 3 周会对种子后期发育不利。添加 150 g L^{-1} 的苹果匀浆有利于幼苗生长。试管苗移栽成活率在 95% 以上。

关键词:云南火焰兰; 种子; 无菌萌发; 试管育苗

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)01-0083-06

Seed Germination *in vitro* of *Renanthera imschootiana* Rolfe

LIN Dan-ni^{1,2}, CHEN Zhi-lin¹, DUAN Jun¹, WU Kun-lin¹, ZENG Song-jun^{1*}

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Asymbiotic germination of an endangered orchid, *Renanthera imschootiana* Rolfe was achieved through sowing the seeds after pollinating for 145 d on different mediums axenically. In 30 d after sowing, the seed germination rate reached 93.1% on the 1/4MS medium supplemented with 20% (v/v) coconut milk(CM), 1 g L^{-1} peptone and 10 g L^{-1} sucrose. After 75 d, on the VW medium with 10% CM, 36.6% of the seeds formed plantlets. The content and concentration of multi-salt of basic medium has a positive (or great) effect on seed germination and plantlet growing. 1 g L^{-1} peptone increased seed germination rate, while 150 g L^{-1} apple homogenate can enhance plantlet growth. Seed germination rate was found no significant difference when seeds were sowed in light or dark, but 3-weeks culture in dark had a negative effect on developing seedlings after seed germination. More than 95% seedlings were survival after transplanted to the greenhouse.

Key words: *Renanthera imschootiana*; Asymbiotic germination; Propagation *in vitro*

云南火焰兰(*Renanthera imschootiana* Rolfe)是兰科(Orchidaceae)火焰兰属(*Renanthera*)植物, 其花色鲜艳, 着花多, 远观如火焰般艳丽, 是重要的观赏兰花和杂交亲本。据“国际散氏兰花种杂种登记目录”(Sarder's List of Orchid Hybrids)记载, 已与近缘的 12 属杂交出 61 种杂交种。由于其极高的观赏性和杂交亲和性, 野生的云南火焰兰遭到了灭

绝性的采挖, 同时由于原生地环境亦严重恶化等原因, 濒临灭绝, 已被野生濒危动植物国际贸易公约(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES)列入附录 I 保护种类, 严格禁止交易。云南火焰兰是单茎性附生兰花, 传统的方式是扦插繁殖^[1], 但繁殖速度慢, 难以适应物种保护和开发的需要; 应用无菌

收稿日期: 2007-04-24 接受日期: 2007-09-24

基金项目: 市科技计划项目(2004J1-C0201 和 2007Z3-E0631)资助

* 通讯作者 Corresponding author

播种培养，能够在短时间内获得大量种苗，是经济有效的保护兰花野生资源的重要手段之一。有关云南火焰兰的快速繁殖，目前仅有印度利用叶鞘脱分化产生丛生苗，未见规模化生产报道^[2]。开展云南火焰兰的无菌播种人工培养，无疑可以减轻采集压力，对原地和迁地保护以及商业性开发具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

选取栽培于华南植物园温室内的生长健壮的云南火焰兰植株(图版 I :1)做亲本，在开花期间进行人工异株授粉。授粉 145 d 后采下略带黄色的蒴果为试验材料。

1.2 外植体处理

用 70% 酒精的棉球擦拭干净蒴果表面，接着浸泡于 70% 酒精中 30 s，再用 0.1% 升汞消毒 15 min，无菌水冲洗 5 次，最后吸干蒴果表面水分，沿中缝线纵向切开蒴果，刮出种子于无菌水中制成悬浮液。取一滴管悬浮液于体视显微镜下观察种子胚发育情况。播种时，将以上悬浮液摇匀后吸取 1 ml 滴入每瓶培养基上并使之均匀分布。

1.3 种子萌发培养基

Murashige & Skoog (MS)、1/2MS(大量元素减半)、Vacin & Went (VW)、Kundson C (KC)、MS + 椰子水(CM)10% (v/v)、1/2MS + CM 10%、VW + CM 10%、KC + CM 10%，每种培养基附加蔗糖 (Sucrose) 20 g L⁻¹；每处理播种 12–15 瓶，在培养 30 d 和 75 d 分别统计萌动率和萌发率。以上试验

设置培养温度 25 ± 2℃、光照 12 h d⁻¹、光照强度 30–40 μmol m⁻²s⁻¹光培养和完全黑暗培养两种条件。

1.4 最佳萌发和成苗培养基的筛选

根据常见的影响种子萌发的因素，设计四因素三水平 L₉(3⁴)的正交试验，培养基组成如表 1，每种培养基附加蔗糖 20 g L⁻¹；每处理播种 12–15 瓶，在培养 30 d 和 75 d 分别统计萌动率和萌发率。

1.5 育苗和壮苗培养

种子萌发形成绿色桃形原球茎后转入育苗培养基，待分化出 1–2 片完整叶片和初现根时，挑选株高 1.0–1.5 cm 的小苗转入壮苗培养基，每处理 6 瓶，每瓶 5 株，培养 130 d 后统计壮苗结果。

育苗培养基 Z-1: 花宝 2 g L⁻¹ + CM 10% + NAA 1.0 mg L⁻¹ + 活性炭(AC) 2 g L⁻¹ + 蔗糖 15 g L⁻¹。

壮苗培养基 Z-2: VW + AC 2 g L⁻¹ + 蔗糖 20 g L⁻¹ + NAA 0.5 mg L⁻¹。在 Z-2 基础上分别添加不同浓度的香蕉匀浆(BH)、土豆匀浆(PH)和苹果匀浆(AH)，试验天然添加物对壮苗的影响。

所有培养基附加琼脂 0.6% 后调 pH 值 5.4 ± 0.1，在 1.06 kg cm⁻² (121℃) 条件下灭菌 20 min，冷却后备用。以上试验培养条件为温度 25 ± 2℃、光照时间 12 h d⁻¹、光照强度 30–40 μmol m⁻²s⁻¹。

1.6 数据统计与处理

萌发率 = 萌发种子数/胚发育种子数 × 100%；
成苗率 = 桃形原球茎数/胚发育种子数 × 100%。

表 1 正交试验设计表
Table 1 Factors and Levels of orthogonality experiment

培养基编号 Medium no.	基本培养基 Medium	椰子汁(%) Coconut milk	有机添加物 Organic amendment	蔗糖(g L ⁻¹) Sucrose
G-1	MS	5	胰蛋白胍 Tryptone	10
G-2	MS	10	蛋白胍 Peptone	20
G-3	MS	20	酵母提取物 Malt extract	30
G-4	1/2MS	5	蛋白胍 Peptone	30
G-5	1/2MS	10	酵母提取物 Malt extract	10
G-6	1/2MS	20	胰蛋白胍 Tryptone	20
G-7	1/4MS	5	酵母提取物 Malt extract	20
G-8	1/4MS	10	胰蛋白胍 Tryptone	30
G-9	1/4MS	20	蛋白胍 Peptone	10

每处理随机挑选 10 瓶进行统计。

2 结果和分析

2.1 培养基对种子萌发的影响

在体视镜下观察,发现授粉 145 d 的云南火焰兰蒴果内种子有 93.2% 的胚已发育,适合播种。播种后种子吸水膨胀,形成肉眼可见的白色原球体(图版 I :2),之后膨大转绿,形成绿色桃形原球茎,继续发育分化出叶和根从而形成完整植株。以种胚突破种皮、体积明显增大、形成白色原球体为萌动标志,在播种后 30 d 统计云南火焰兰种子的萌动率;以白色原球体转绿,形成桃形原球茎为萌发标志,在播种后 75 d 统计云南火焰兰种子的

萌发率。
培养基对种子萌发影响的统计结果见表 2。种子在较高盐浓度的 MS 培养基上萌发速度最慢,直到 30 d 时才出现白色原球体,75 d 时只有少数萌发;1/2MS 培养基次之,但后期萌发率较萌发快而整齐的 KC 和 VW 培养基要高;KC 和 VW 培养基上种子萌动率较高而萌发率低。从表 2 结果可以看出,培养基中添加 CM,种子萌动率明显上升,KC + CM 10% 的萌动率最高,且种子萌发最快,18 d 即可肉眼观察到白色原球体突起,但后期速度变缓,萌发率不高。至75 d观察,在 VW + CM 10%上的萌发率最高且生长健壮,少部分的原球茎已经出现叶或根。

表 2 培养基对云南火焰兰种子萌动(30 d)和萌发(75 d)的影响
Table 2 Effect of mediums on seed respnson (30 d) and germination (75 d) of *Renanthera imschootiana*

培养基 Medium	萌动率 Responson rate (%)	萌发率 Germination rate (%)	生长状况(75 d) Growth status
MS	52.6 ± 2.18d	7.20 ± 0.49d	大部分种子仅萌动而未能转绿,原球茎体积很小,生长缓慢 Little seeds become protocorms which were small and slowly developped.
1/2MS	65.1 ± 2.38c	16.5 ± 3.07bc	大部分种子萌动后逐渐形成桃形原球茎,体积较大,表面被白毛,颜色鲜绿,生长健壮 Most seeds become protocorms which were big and well developedd with white hair.
VW	72.3 ± 1.69b	10.4 ± 0.73d	部分种子萌动后逐渐形成桃形原球茎,但体积较小,生长一般 Some seeds become protocorms which were small and normally developed.
KC	73.7 ± 1.26b	12.4 ± 1.12cd	部分种子萌动后逐渐形成桃形原球茎,体积较小,少数表面被白毛,生长一般 Some seeds become protocorms which were small and normally developed.
MS + 10% CM	54.4 ± 1.88d	12.70 ± 1.38bcd	大部分种子萌动后逐渐形成桃形原球茎,体积较小,生长一般 Most seeds become protocorms which were small and normally developed.
1/2MS + 10% CM	80.2 ± 1.73a	18.30 ± 2.36b	大部分种子萌动后逐渐形成桃形原球茎,体积很大,表面被白毛,生长健壮 Most seeds become protocorms which were big and well developpedd with white hair.
VW + 10% CM	82.4 ± 1.43a	36.6 ± 6.72a	大部分种子萌动后逐渐形成桃形原球茎,体积较大,表面被白毛,生长健壮 Most seeds become protocorms which were big and well developedd with white hair.
KC + 10% CM	83.2 ± 1.93a	12.8 ± 1.98bcd	部分种子萌动后逐渐形成桃形原球茎,体积较小,部分被白毛,生长较好 Some seeds become protocorms which were small and well developedd with white hair.

同一列数据后不同字母表示显著性差异($P\leq0.05$)。下同。Values followed by the difficult letters within columns are significantly different at $P\leq0.05$. The same for below.

2.2 光暗培养对种子萌发的影响

同光培养相比,暗培养 3 周后观察发现,形成白色原球体的百分数无明显差异(表 3);移到光下后,转绿原球茎的数量明显少于光培养形成的数量,生长状态也差于光培养形成的原球茎,体积较小,分化也较晚。

2.3 四因素三水平正交试验对种子萌发的影响

针对影响兰花种子萌发的无机盐、有机添加物和糖等因素和水平,设计四因素三水平正交试验,以筛选最适合的培养基。由表 3 可以看出,G-9培养基上种子的萌动率和萌发率最高,且生长旺盛,75 d 时部分原球茎已经形成完整小植株(图版I:3)。直观分析正交试验结果可知,在所试的四

表 3 不同培养条件下基本培养基对云南火焰兰种子萌发的影响(30 d)

Table 3 Effect of basic medium on seed germination of *Renanthera imschootiana* cultured for 30 days

培养基 Medium	萌动率 Response rate (%)	
	光 Light	暗 Dark
MS	52.6 ± 2.18d	53.1 ± 1.80d
1/2MS	65.1 ± 2.38c	63.5 ± 1.87c
VW	72.3 ± 1.69b	72.0 ± 1.28b
KC	73.7 ± 1.26b	72.8 ± 1.44b
MS + 10% CM	54.4 ± 1.88d	54.0 ± 1.96d
1/2MS + 10% CM	80.2 ± 1.73a	78.0 ± 1.52a
VW + 10% CM	82.4 ± 1.43a	81.0 ± 1.28a
KC + 10% CM	83.2 ± 1.93a	81.4 ± 1.96a

数据后不同字母表示显著性差异。Values followed by the different letters are significantly different at $P\leq0.05$.

表 4 L9 (3⁴)正交试验对云南火焰兰种子萌动(30 d)和萌发(75 d)的影响

Table 4 Effect of L9 (3⁴) orthogonality experiment on response rate (30 d) and germination rate (75 d) of *Renanthera imschootiana*

培养基编号 No.	萌动率(%) Response rate	萌发率 Germination rate (%)	生长状况 Growth status
G-1	41.3 ± 2.01g	3.5 ± 0.93d	多数种子仅膨大, 未能发育成原球茎 Most seeds failed to become protocorms.
G-2	77.4 ± 2.04c	20.8 ± 2.44b	原球茎体积较小, 表面被白毛, 生长良好 Protocorms were small and well developed with white hair.
G-3	55.0 ± 2.65e	7.5 ± 1.29cd	原球茎体积小, 生长一般 Protocorms were small and normally developed.
G-4	69.4 ± 2.75d	12.9 ± 2.41c	原球茎体积较大, 表面被白毛, 少数已经分化出叶和根 Protocorms were big and well developed with white hair, some of which have differentiated.
G-5	87.4 ± 2.15ab	26.1 ± 4.10ab	原球茎体积较大, 表面被白毛, 颜色鲜绿, 生长良好 Protocorms were big and well developed with white hair.
G-6	45.6 ± 1.58fg	5.1 ± 0.64d	原球茎体积很小, 大部分种子未能发育成原球茎, 生长缓慢 Protocorms were small and slowly developed.
G-7	81.7 ± 1.92bc	22.1 ± 1.00b	原球茎体积很大, 表面被白毛, 多数已经分化出叶 Protocorms were big and well developed with white hair, some of which have differentiated.
G-8	50.0 ± 1.46ef	4.6 ± 1.09d	多数种子仅膨大, 未能发育成原球茎 Most seeds failed to become protocorms.
G-9	93.1 ± 1.19a	30.9 ± 1.39a	原球茎体积很大, 表面被白毛, 大多数已经分化出叶和根 Protocorms were big and well developed with white hair, some of which have differentiated.

素三水平中, 有机添加物因素对结果影响最大, 其次为无机盐、糖以及 CM。

对正交试验结果进行方差分析, 结果显示, 有机添加物在 $\alpha=0.05$ 水平上对云南火焰兰种子萌动率的影响显著, 其余因素差异不显著; 四种因素对云南火焰兰萌发率在 $\alpha=0.05$ 水平上均差异不显著。这表明对于云南火焰兰种子萌动, 影响最大的是有机添加物。进一步对有机添加物各水平进行 Duncan's 多重比较(表 5), 表明胰蛋白胍和蛋白胍与酵母提取物的差异极显著, 蛋白胍和酵母提取物之

间差异不显著, 故可选用蛋白胍作为培养基成分。
由实验结果可以确定最适合云南火焰兰种子萌动和萌发的培养基组合为 1/4MS + CM 20% + 蛋白胍 1 g L⁻¹ + 蔗糖 10 g L⁻¹。

表 5 有机添加物因素各水平的差异显著性
Table 5 The significant difference in factor of organic amendment

	C 因素 Factor C	5%	1%
蛋白胍 Peptone	21.53	a	A
酵母提取物 Malt extract	18.57	a	A
胰蛋白胍 Tryptone	4.40	b	B

2.4 育苗培养

在培养过程中发现,同一培养基上的种子出现生长不一致的情况(图版 I:4),有部分种子萌动后生长变缓,不能迅速转化成绿色桃形原球茎,但将先形成的原球茎及时转入育苗培养基(图版 I:5),余下种子能继续生长发育,否则,不能转绿的膨大种子容易褐死,或停止生长,影响萌发。

2.5 天然添加物对壮苗的影响

小苗接入壮苗培养基 Z-2 后,出现生长缓慢、甚至死亡的现象,而添加天然有机物后,除根径外,鲜重、叶数等指标均显著高于对照,且随着天然添加物浓度增加而增大(表 6)。在所试的 3 种天然添加物中,苹果匀浆对小苗整体生长的促进作用好于其余两种,小苗生长较为整齐、健壮,叶色浓绿,叶片肥厚,根也比较粗壮。

表 6 天然添加物对云南火焰兰壮苗的影响(130 d)
Table 6 Effect of different homogenates on shoots growth of *Renanthera imschootiana* after 130 days

天然添加物(g L ⁻¹)	鲜重 (g)	叶数	叶宽 (cm)	叶长 (cm)	根数	根长 (cm)	根径(mm)
Homogenate	Fresh weight	Number of leaves	Width of leaf	Length of leaf	Number of roots	Length of root	Diameter of root
Control	0.15f	4.0e	0.42e	1.40d	1.0e	0.98e	4.24a
BH 50	0.47d	4.9cd	0.68bcd	2.35bc	2.9bc	2.26cd	2.67bc
BH 100	0.48d	4.7d	0.66bcd	2.63ab	2.9bc	2.21d	2.60bc
BH 150	0.66bc	5.4abc	0.73ab	2.83a	3.8a	2.75bc	2.80b
PH 50	0.33e	4.8d	0.60d	2.16c	2.1d	2.34cd	2.23c
PH 100	0.51d	5.1abcd	0.69abc	2.30c	2.6cd	2.98b	2.64bc
PH 150	0.59cd	5.7a	0.77a	2.40bc	3.3b	2.53bcd	2.69bc
AH 50	0.48d	5.0bcd	0.63cd	2.10c	2.9bc	2.97b	2.86b
AH 100	0.77ab	5.4ab	0.72ab	2.61ab	4.2a	3.57a	2.48bc
AH 150	0.84a	5.4ab	0.73ab	2.62ab	4.1a	3.66a	2.68bc

2.6 出瓶移栽

出瓶前置于温棚中炼苗一周,取出小苗后洗净附着的培养基,将白水苔用 1 000 倍多菌灵浸泡 1 h 后挤干,包裹小苗根部,种植于直径 5 cm 塑料杯中,置于阴凉通风处,期间忌水。2 周后移入温室,进行正常水、肥、药管理,成活率可在 95% 以上(图版 I:4)。

3 结论

一般认为,低盐培养基较适合兰花种子萌发。本试验中,培养基 KC 和 VW 较 MS 更有利于云南火焰兰种子的萌发支持了这一结论,但 KC 培养基上萌发的种子后期生长变缓,而 1/2MS 培养基上种子可发育形成健壮小植株,说明无机盐的组分同样影响云南火焰兰种子萌发和成苗。

本实验采用四因素三水平正交实验设计,筛选出适合云南火焰兰种子萌发和成苗的最佳培养基:1/4MS + CM 20% + 蛋白胨 1 g L⁻¹ + 蔗糖 10 g L⁻¹,萌动率达 93.1%,且生长状况十分良好。

添加有机物对兰花种子的萌发和生长有促进作用^[3-4]。本试验中选择了 3 种不同的有机物,初步结果表明蛋白胨对云南火焰兰种子萌发有显著的促进作用,亦有益于成苗,但最佳的浓度还需进一步试验筛选。

地生兰在黑暗的条件下往往比在光照下具有较好的萌发率和成苗率,而黑暗对附生兰没有太大的影响^[5-6]。本实验中发现附生兰云南火焰兰在黑暗状态下的萌动率与光培养条件下的萌动率差异不大,但萌发率差。

参考文献

[1] 程金水. 园林植物遗传育种学 [M]. 北京:中国林业出版社, 2000:285-286.
[2] Seeni S, Latha P G. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae) [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1992, 29:167-172.
[3] Chen Z L(陈之林), Ye X L(叶秀舜), Liang C Y(梁承邺), et al. Seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum armeniacum* and *P. micranthum* [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2004, 31(4):540-542. (in Chinese)
[4] Wu C H(伍成厚), Ye X L(叶秀舜), Liang H Y(梁承邺). *In vitro* seed germination in *Doritis pulcherrima* [J]. Guihaia(广西植物),

2005, 25(2):149-151. (in Chinese)

[5] Arditti J. Factors affecting the germination of orchid seeds [J]. Bot Rev, 1967, 33:1-97.

[6] St Arnaud M, Lauzer D, Barabe D. *In vitro* germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) [J]. Lindleyana, 1992, 7:22-27.

图版说明

图版 I

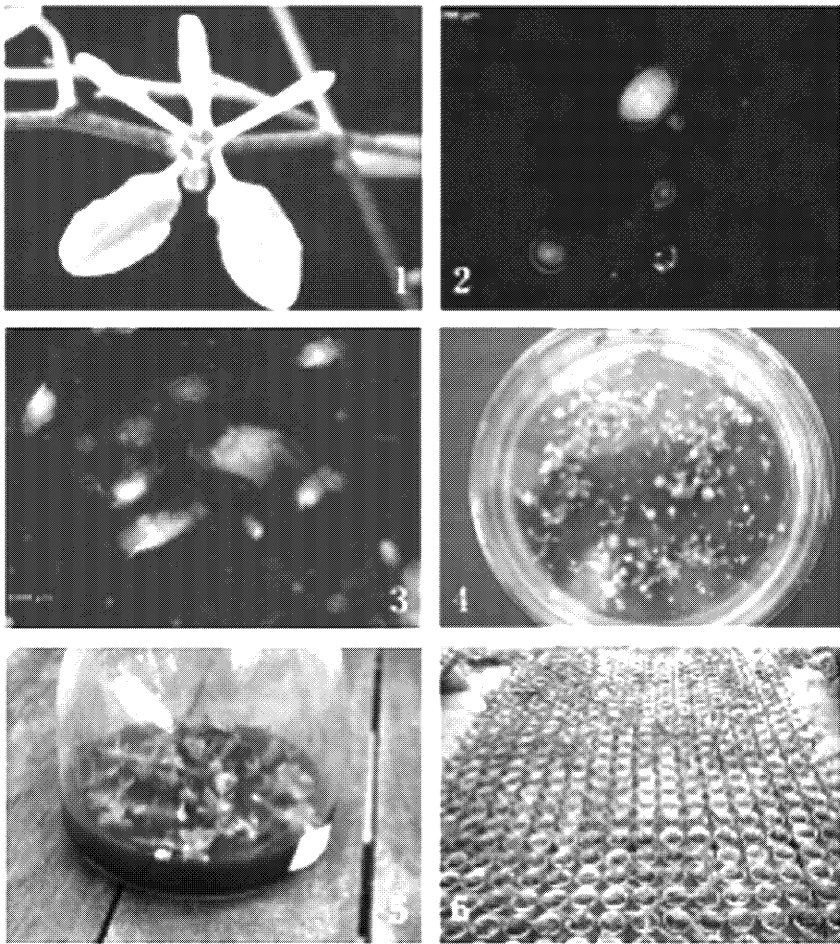
1. 开花的云南火焰兰花朵; 2. 云南火焰兰种子萌发形成白色原球体; 3. 云南火焰兰种子在同一培养基上存在萌发不一致的情

况; 4. 75 d 时, 云南火焰兰种子在 G-9 培养基上的发育情况; 5. 及时转入育苗培养基的云南火焰兰小苗; 6. 移栽成活的云南火焰兰试管苗。

Explanation of plate

Plate I

1. Flower of *R. imschootiana* Rolfe; 2. White protocorm from the seeds of *R. imschootiana* Rolfe germinated; 3. Germinated differently of seed of *R. imschootiana* Rolfe in the same medium; 4. Seedlings on the G-9 medium after sowed 75 d; 5. Plantlets transferred to new medium; 6. The survival seedlings transplanted to the greenhouse.



林丹妮等:图版 I

LIN Dan-ni et al.: Plate I