

# 安诺兰无菌播种组培快繁技术研究

潘学峰, 翁宝实, 王小精

(海南大学 生命科学与农学院, 海南 海口 570228)

**摘 要:** 安诺兰 (*Anota hainanensis*) 种子无菌播种试验表明: 在 MS + 6-BA 0.1mg/L 培养基上种子能形成原球茎团; 1/2MS 培养基有利于原球茎增殖, 加 6-BA 1.0mg/L + NAA 0.1mg/L 原球茎增殖效果较佳, 增殖率达 793.3%; 在 1/2MS + IBA 1.0mg/L + 2.0g/L 活性碳 + 100g/L 香蕉匀浆 + 100ml/L 椰子水的培养基上, 试管苗生根效果最好; 试管苗移栽至椰糠上, 成活率达 91.4%。

**关键词:** 安诺兰; 种子; 原球茎; 组织培养

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-7791(2007)04-0027-03

## Technology of Aseptic Seeding and *in Vitro* Propagation of *Anota hainanensis*

PAN Xue-feng, WENG Bao-shi, WANG Xiao-jing

(College of Life Science and Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, Hainan China)

**Abstract:** The techniques for aseptic germination of *Anota hainanensis* seeds were studied. The results showed that in medium of MS + 6-BA 0.1mg/L, protocorm could form from seeds of *Anota hainanensis*; 1/2MS supplemented with 6-BA 1.0mg/L + NAA 0.1mg/L was suitable for proliferation of protocorm, and the rate of proliferation was 793.3%; the medium of 1/2MS + IBA 1.0 mg/L + 0.2% active carbon + 10% banana serum+ 10% coconut milk gave the best result for rooting of tube plants. When transplanted on coconut bran, the survival rate of tube plant reached 91.4%.

**Key words:** *Anota hainanensis*; seed; protocorm; tissue culture

安诺兰(*Anota hainanensis*)又称无耳兰,是海南陆生兰科植物特有种<sup>[1]</sup>,分布于 19°N 附近,海拔 150~1 000m 的森林中,常附生于榕树、枫树和橡胶树上,为热带气生兰。安诺兰叶片肥厚、翠绿,一穗多花,花朵秀丽,密集而芳香<sup>[2]</sup>(图 1)。其生长适应性强,易栽培,又值春节前后开花,是极好的新春贺岁花卉,颇受人们青睐<sup>[3]</sup>。近年来,随着土地不断开发利用,野生安诺兰大量栖息地被垦用,生存条件恶化,加之过度采挖,野生资源受到极大破坏<sup>[4]</sup>,安诺兰已处于濒危状态<sup>[2]</sup>。野生安诺兰以分株繁殖为主,增殖系数极低。目前,国内有关安诺兰组培快繁的报道很少<sup>[4,5]</sup>。为了保护 and 开发安诺兰,我们对其进行无菌播种试验,并获得成功。



图 1 安诺兰开花植株

## 1 材料与方法

供试材料为长 3~4cm,成熟度约八成的安诺兰蒴果。蒴果用 0.15% 升汞灭菌 15min,无菌水冲洗 4~5 次,置于无菌钢盘上。在无菌条件下,将蒴果剖开,取出种子,在无菌水中摇匀,将种子转移至培养基上,均匀分布。本试验以 MS 为基本培养基,卡拉胶 0.8%,蔗糖 3%,pH5.8,在不同培养阶段

收稿日期: 2007-06-30

作者简介: 潘学峰 (1963-),男,海南文昌人,高级实验师,从事植物组织培养教学与研究工作。

加入不同种类和配比的植物生长调节剂及其它添加成分, 常规方法配制<sup>[6]</sup>。培养室温度 (25±2) ℃, 光照强度 1 200 ~ 1 500 lx, 光照 10h/d。移栽基质为椰糠。

## 2 结果与分析

### 2.1 原球茎产生

在培养基 MS + 6-BA 0.1mg/L 上培养 20d 左右, 种子由米色粉状开始转为淡绿色; 再培养 15d, 发育成绿色圆球形的原球茎团。兰花原球茎生命力强, 遗传性状稳定, 对快繁及种质资源保存极为有利。因此, 在此阶段需及时切割转瓶, 进行增殖, 否则, 再过 50d 原球茎便开始发芽分化成幼苗。

### 2.2 原球茎增殖

原球茎增殖期是兰花大量增殖的有利阶段, 是提高繁殖系数的核心<sup>[7]</sup>。因此, 在原球茎形成后 20d 左右, 将绿色圆球形的原球茎团割成小块, 移入含不同浓度无机盐的 MS 培养基和不同生长调节剂配比的培养基中进一步培养, 以便找到适合安诺兰原球茎增殖的最佳无机盐浓度和最佳生长调节剂配比。

**2.2.1 不同浓度无机盐对原球茎增殖的影响** 将原球茎接种在无机盐浓度为全量 MS、3/4MS 及 1/2MS 等培养基上, 生长调节剂配比均为 6-BA 0.5mg/L + NAA 0.1mg/L。30d 后的调查结果见表 1。

从表 1 可知, 不同浓度无机盐对安诺兰原球茎的增殖有不同影响。原球茎在全量 MS 培养基中增殖率最低, 仅为 570.0%; 而在 1/2MS 中增殖率最高, 为 753.3%。亦即在供试的 MS 无机盐浓度范围内, 原球茎增殖率随着无机盐浓度的降低而升高, 较低浓度无机盐有利于安诺兰原球茎的增殖。

表 1 不同浓度无机盐对原球茎增殖的影响

| 无机盐浓度 | 接种原球茎数 | 增殖原球茎数 | 增殖率 (%) |
|-------|--------|--------|---------|
| MS    | 30     | 171    | 570.0   |
| 3/4MS | 30     | 189    | 630.0   |
| 1/2MS | 30     | 226    | 753.3   |

**2.2.2 不同浓度 6-BA 对原球茎增殖的影响** 将原球茎转接到以 1/2MS 为基本培养基, 附加 NAA 0.1mg/L 和不同浓度 6-BA (设 7 个浓度: 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mg/L) 的培养基中, 接种 30d 后调查原球茎的成活率及增殖率, 结果见表 2。

从表 2 可见, 在 1/2MS 中不加任何生长调节剂, 原球茎也能增殖, 但增殖率不高。加入生长调节剂后, 当 NAA 为 0.1mg/L 时, 6-BA 浓度 0.2 ~ 1.0mg/L 范围内, 原球茎成活率均为 100%, 原球茎增殖率随 6-BA 浓度升高而提高, 并在 1.0mg/L 时增殖率达到最高, 为 793.3%; 当 6-BA 浓度大于 1.0mg/L 时, 随着浓度的升高, 原球茎成活率随之降低, 且增殖率也降低; 当 6-BA 浓度升至 3.0mg/L 时, 原球茎增殖率降至 330.0%, 低于不加生长调节剂的培养基。显然, 在安诺兰原球茎的增殖培养中,

表 2 不同生长调节剂比对原球茎增殖的影响

| 生长调节剂(mg/L)    | 接种数 | 成活数 | 增殖数 | 成活率(%) | 增殖率(%) |
|----------------|-----|-----|-----|--------|--------|
| 1/2MS          | 30  | 30  | 103 | 100    | 343.3  |
| 6-BA0.2+NAA0.1 | 30  | 30  | 193 | 100    | 643.3  |
| 6-BA0.5+NAA0.1 | 30  | 30  | 225 | 100    | 750.0  |
| 6-BA1.0+NAA0.1 | 30  | 30  | 238 | 100    | 793.3  |
| 6-BA1.5+NAA0.1 | 30  | 29  | 181 | 96.7   | 603.3  |
| 6-BA2.0+NAA0.1 | 30  | 29  | 177 | 96.7   | 590.0  |
| 6-BA2.5+NAA0.1 | 30  | 27  | 113 | 90.0   | 376.7  |
| 6-BA3.0+NAA0.1 | 30  | 26  | 99  | 86.7   | 330.0  |

注: 1/2MS 为基本培养基。

### 2.3 原球茎萌发

将增殖后的原球茎转到含 NAA 0.05mg/L 的 MS 培养基上。在原球茎少量增殖的同时, 原球茎顶端在接种后 14d 左右开始分化芽, 形成既有原球茎又有芽的丛生体。50d 后, 小芽长成具有 1 ~ 2 片叶的幼苗, 叶片淡绿色。

### 2.4 完整植株诱导

活性炭具有强大的吸附能力, 对形态和器官的形成有良好效应<sup>[7]</sup>; 香蕉匀浆、椰子水等含有氨基酸、激素和酶等有机物, 是成分较为复杂的天然复合物, 对细胞和组织的增殖分化有明显的促进作用,

对幼苗生长发育也有一定的促进作用<sup>[8]</sup>。因此,本试验采用以上物质配置 6 种不同的生根培养基,每种培养基接种 30 株大小基本一致的无根苗,培养 50d 后统计结果(表 3)。

由表 3 看出,1.0mg/L IBA 对安诺兰生根有一定的促进作用。在不含 IBA 的 1/2MS 培养基中,安诺兰也能生根,但生根效果差,生根率低,仅为 10.0%;加入 IBA 后,生根率迅速提高,如果配合其它添加物,效果更好,其中添加 2.0g/L 活性炭 + 100g/L 香蕉匀浆 + 100ml/L 椰子水最适宜安诺兰生根、壮苗,生根率达 100%,且根多,叶色浓绿,植株健壮。结果表明,安诺兰较适宜的生根培养基是 1/2MS + IBA 1.0mg/L + 2.0g/L 活性炭 + 100g/L 香蕉匀浆 + 100ml/L 椰子水。

表 3 不同生根培养基对安诺兰生根的影响

| 序号 | 培养基   | IBA(mg/L) | 活性炭(g/L) | 椰子水(ml/L) | 香蕉匀浆(g/L) | 生根率(%) | 根数  | 植株长势    |
|----|-------|-----------|----------|-----------|-----------|--------|-----|---------|
| 1  | 1/2MS | 0         | 0        | 0         | 0         | 10.0   | 1.0 | 正常,叶色淡绿 |
| 2  | 1/2MS | 1.0       | 0        | 0         | 0         | 60.0   | 1.7 | 正常,叶色绿  |
| 3  | 1/2MS | 1.0       | 2.0      | 0         | 0         | 76.7   | 2.0 | 正常,叶色绿  |
| 4  | 1/2MS | 1.0       | 2.0      | 100       | 0         | 80.0   | 2.0 | 健壮,叶色绿  |
| 5  | 1/2MS | 1.0       | 2.0      | 0         | 100       | 100.0  | 2.3 | 健壮,叶色绿  |
| 6  | 1/2MS | 1.0       | 2.0      | 100       | 100       | 100.0  | 2.5 | 健壮,叶色浓绿 |

## 2.5 试管苗移栽

兰花试管苗自养能力差,移栽养护难度大,在培养壮苗的基础上应注意温、光、营养、介质等因素与兰花生物学特性相协调,使移栽兰花逐渐由异养向自养过渡。因此,在移栽前应先将试管苗放在有 4h/d 左右自然光照射的地方炼苗 3~4d,并在移栽前一天打开瓶盖。移栽时,将生根试管苗取出,用清水洗去培养基,再用多菌灵 1 000 倍液浸苗 10min,然后种于椰糠上,浇透水。安诺兰喜温暖湿润、半荫环境,移栽后幼苗应放在通风良好的地方,避免强光,适时淋水和定期喷洒杀菌剂,20d 左右即可成活(图 2),成活率达 91.4%。



图 2 移栽成活的小苗

## 3 小 结

海南安诺兰属厚叶兰,气孔少,呼吸作用弱,夜间可吸收大量 CO<sub>2</sub>,在室内栽植有利于空气净化;且安诺兰花姿秀丽、芳香,花期长,又正逢春节,因此,具有广阔的开发前景。安诺兰种子小,每一蒴果具有大量种子,故用种子进行无菌播种,可达到快速和大量繁殖的目的,且不伤害植株。本试验结果表明,安诺兰种子在 MS + 6-BA 0.1mg/L 培养基上,35d 后能形成原球茎团。较低浓度无机盐的培养基有利于原球茎增殖,在本研究所试的 MS 无机盐浓度中,以 1/2MS 效果较佳;高浓度 6-BA 抑制原球茎增殖,6-BA 1.0mg/L + NAA 0.1mg/L 对安诺兰原球茎的增殖效果较佳,增殖率达 793.3%。在生根培养中,含有活性炭、香蕉匀浆、椰子水添加物的培养基有利于安诺兰的生根壮苗,尤以 1/2MS + IBA 1.0mg/L + 2.0g/L 活性炭 + 100g/L 香蕉匀浆 + 100ml/L 椰子水的培养基生根壮苗效果较佳。试管苗移栽在椰糠上,成活率可达 91.4%。

## 参考文献:

- [1] 广州植物研究所. 海南植物志(第四卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 258-259.
- [2] 刘雄忠. 无耳兰[J]. 花卉, 1996(5): 13.
- [3] 陈云池. 海南安诺兰的栽培[J]. 海南省农业科技, 1990(2): 33.
- [4] 凌绪柏,等. 安诺兰花梗离体快繁[J]. 植物杂志, 1997(2): 26.
- [5] 潘梅,等. 安诺兰的快速繁殖技术研究[J]. 热带林业, 2005(2): 45-46.
- [6] 曹改义,等. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2002: 183-185.
- [7] 谭文澄,等. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 268-277.
- [8] 何松林,等. 碳源和有机添加物对文心兰原球茎增殖的影响[J]. 河南农业大学学报, 2003,37(2): 257.