

# 文山红柱兰组培技术研究\*

徐凌彦<sup>1</sup>, 王玉英<sup>2</sup>, 李枝林<sup>1</sup>

(1. 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业职业技术学院, 云南 昆明 650212)

**摘要:** 以文山红柱兰种子为外植体, 进行了种子无菌萌发, 球茎丛生芽继代增殖、无根苗生根培养等的组培技术研究。其研究表明: 在 1/2 MS + 0.2 mg/LBA + 0.2 mg/LNAA 的培养基上文山红柱兰种子的萌发效果最好; 在 1/2 MS + BA1.5 mg/L + NAA0.2 mg/L + 80 g/L 香蕉泥 + 1 g/L 花宝 4 号培养基上进行增殖培养效果较好, 在 1/2 MS + 0.6 mg/LNAA + 0.2 mg/LBA + 0.3 % 活性炭培养基的生根培养效果较好。苗高 6 ~ 8 cm 时可出瓶炼苗。

**关键词:** 文山红柱兰; 组培技术; 种子外植体

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 - 8246 (2008) 03 - 0023 - 05

## Studies on Tissue Culture Technique of *Cymbidium wenshanense*

XU Ling-yan<sup>1</sup>, WANG Yu-ying<sup>2</sup>, LI Zhi-lin<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agriculture University, Kunming Yunnan 650201, P. R. China;

2. Yunnan Agricultural Vocation-Technical College, Kunming Yunnan 650212, P. R. China)

**Abstract:** Using seeds as explants, tissue culture technique of *C. wenshanense* including sterile seed germination, regeneration and rooting was experimented and studied. The experiment results showed that the sterile seed germination medium was 1/2 MS + 0.2 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA, the medium for regeneration was 1/2 MS + 1.5 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA + 80 g/L mashed banana + 1 g/L Huabao No. 4, the medium for root inducing was 1/2 MS + 0.6 mg/L NAA + 0.2 mg/L BA + 0.3 % AC. The tissue culture plants of 6 to 8 cm high could be transplanted.

**Key words:** *Cymbidium wenshanense*; tissue culture technique; explant

文山红柱兰 (*Cymbidium wenshanense*)<sup>[1]</sup> 又名彩蝶玉兰, 是我国兰花专家吴应祥先生和刘方近年发表的新种, 因原产云南省文山县而得名, 为我国特有的兰花物种。文山红柱兰是兰科兰属大花亚属的一种多年生附生草本植物, 主要分布在云南东南部, 越南北部<sup>[2]</sup>。文山红柱兰的叶片呈带状, 叶色浓绿稍带黄、厚而有光泽; 花序斜出, 有花 3 ~ 10 朵, 由于其萼片外面为浅褐色, 因此花蕾也呈浅褐色, 花径 6 ~ 9 cm, 花瓣白色, 有不明显的淡红褐色脉纹, 唇瓣白色, 有红褐色脉和斑点, 盛花期具有淡雅的清香, 花期 1 ~ 3 月<sup>[3]</sup>。此种兰花由

于叶形飘逸带浓绿色, 花朵硕大, 色洁白淡雅, 并有淡淡的清香, 而具有较好的市场开发前景。

近十多年来, 兰花的快繁技术发展较快。目前部分品种的培育已进入产业化生产阶段, 已建立起蝴蝶兰 (*Phalaenopsis amabilis*)<sup>[4]</sup>、大花蕙兰 (*C. hybridum*)<sup>[5-10]</sup>、墨兰 (*C. sinense*)<sup>[11]</sup> 等的快繁体系。植物的无性快繁技术, 大大带动了兰花的产业化生产, 且对于抢救那些处于濒危的野生兰花物种具有重大的作用<sup>[12]</sup>。目前, 已有 70 个属的兰花可采用离体培养方法扩繁其后代<sup>[13]</sup>。文山红柱兰由于发现较晚, 因此极少看到有关其快繁研究的

\* 收稿日期: 2008 - 03 - 24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30760155)。

第一作者简介: 徐凌彦 (1983 -), 女, 云南昆明人, 硕士研究生, 主要从事兰花生物技术方面的研究。

通讯作者简介: 李枝林 (1955 -), 男, 云南大理人, 教授, 主要从事观赏植物资源利用及创新方面的研究。

报道。仅有文山师范高等专科学校,生物资源开发研究中心的丁长春等对文山红柱兰组织快繁体系进行了初探性的研究<sup>[14]</sup>。本项研究较丁长春等人从使用不同培养激素上对以文山红柱兰种子为外植体的组培技术作了深入的研究,其中在BA激素对文山红柱兰种苗增殖率的影响方面做了系统的研究。并在其增殖培养基中首次添加了花宝4号作为有机附加物。为文山红柱兰快繁体系的建立增添了新的内容。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

应用云南农业大学花卉研究所引种栽培的云南省文山州野生文山红柱兰植株,于2006年3月在温室进行文山红柱兰的自交授粉,2~7天后其授粉植株花蕊蕊柱的顶端下卷,并盖住蕊腔(柱头),花瓣开始萎蔫,整个花朵开始收缩,一周后子房开始膨大。11月从其兰花蒴果中收集种子作为外植体进行其种子的无菌萌发。

### 1.2 培养基和培养条件

文山红柱兰的种子萌发、继代和生根培养均以改良MS为其基础培养基。种子萌发培养基附加30%蔗糖、0.7%琼脂,肌醇100 mg/L。增殖培养基附加蔗糖20%、琼脂0.7%、肌醇100 mg/L、花宝4号1 g/L、香蕉泥8%,培养基的pH值为5.8;其生根和壮苗培养基附加蔗糖30%、琼脂0.7%、肌醇100 mg/L、碳粉3 g/L, pH值为5.8。在不同的培养阶段,附加不同种类和浓度的植物激素。培养温度控制在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,光照强度为1500 Lux,每天光照12 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对种子萌发的影响

在进行文山红柱兰种子无菌萌发实验所用的基本培养基中,设置了添加不同浓度的BA及NAA激素7个配方。以此组成其种子萌发实验的7种培养基。种子培养40天后观察其萌发情况,结果见表1。

表1 不同培养基的文山红柱兰种子无菌萌发状况

Tab. 1 Seed germination of *C. wenshanense* on different tested media

培养基号	基本培养基	激素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		萌发率/%	中间繁殖体长势	培养基褐变程度
		BA	NAA			
1		0.2	0.2	95	长势粗壮	无
2		0.4	0.4	93	较为粗壮	无
3		0.6	0.6	86	长势一般	无
4	1/2MS	0.8	0.8	75	长势稍瘦弱	无
5		1.0	1.0	88	稍粗壮	稍褐化
6		1.5	1.5	80	长势一般	轻微褐化
7		2.0	2.0	80	长势一般	轻微褐化

由表1看出,文山红柱兰自交种的萌发较易,不仅种子萌发较快,且种子的萌发率较高。以其成熟种子为外植体通过组织培养的方式接种到含不同激素组合(配方)培养基上的试验结果表明:在其基本培养基都为低盐的1/2 MS时,所添加的激素BA和NAA的浓度组合组成的培养基对文山红柱兰种子的萌发尤为重要。1号配方种子萌发形成的中间繁殖体长势最好;其次是2号配方对其种子的萌发较为有利。当BA和NAA的浓度大于2时,培养基出现轻微褐化,随着组培温度的升高和光照

的加强,其褐化程度有可能加重。文山红柱兰种子萌发后,放置的时间不宜过长,否则将会影响萌发后原球茎(PLB)的发育。因此文山红柱兰的种子经暗培发芽后,见光培养10余天便可作再转接培养。

### 2.2 不同培养基继代增殖培养效果

在文山红柱兰原球茎发育成小苗时接种到含0.2 mg/L NAA激素与不同浓度BA激素组合的培养基上作继代增殖培养,60天后观察其增殖情况,结果见表2。

表 2 不同培养基的文山红柱兰丛生芽增殖状况

Tab. 2 Bud regeneration of *C. wenshanense* on different tested media

培养基号	基本培养基	激素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		有机附加物	丛生芽数/个	增殖率/%	苗生长情况
		BA	NAA				
1 (CK)		0			6	12	植株细长, 叶淡绿有根长出
2		0.5		80 g/L 香蕉泥	56	112	植株细长, 叶浓绿
3		1.0			70	140	长势正常, 叶浓绿
4	1/2MS	1.5	0.2	1 g/L 花宝 4 号	97	194	长势正常, 叶浓绿
5		2.0			80	160	长势正常, 叶浓绿
6		2.5			78	156	植株粗壮, 叶浓绿
7		3.0			70	140	植株粗壮, 叶浓绿
8		3.5			65	130	植株粗壮, 叶浓绿
9		4.0			60	120	植株粗壮, 叶浓绿

注: 接种数为 50 个, 丛生芽数为已减去母株后增殖的芽数。

在兰花的继代增殖中, 香蕉泥对兰花的增殖有影响, 已为许多试验所证实<sup>[15-16]</sup>。花宝是美国的一种综合性化学肥料, 其的使用已风行世界数十年。花宝有 5 种配方, 适用范围不同。花宝 4 号的 N : P : K 的配比为 25 : 5 : 20。主要功能是能强壮植物的根、茎、叶, 使其分芽和根群增多, 茎部健壮。本试验所用的培养基中在添加香蕉泥的基础上, 又加入了 1 g/L 的花宝 4 号, 使之加强了对其幼苗的扶壮作用。从表 2 可看出, 在其培养基所含的激素 NAA 浓度相同的条件下, 文山红柱兰原球茎丛生芽的增殖率随激素 6-BA 浓度的升高而增高, 达到 1.5 mg/L 时增殖率最高, 可达 194%, 且苗株长势正常, 叶色浓绿。激素 6-BA 浓度再

高时, 其增殖率又逐渐下降。试验结果还表明, 在未加激素 6-BA 的培养基中, 其增殖率低, 苗株细长, 长势较弱, 叶片微有发黄, 在规定的观察时间内没有增殖芽, 反而有较多的根长出, 约在 80 条左右, 有小芽长出; 在高浓度的 6-BA 培养基中, 苗株较为粗壮, 节间缩短, 但长势较慢。

另在增殖培养中, 对文山红柱兰苗株细长的茎进行切段增殖培养试验, 试验结果其大部分茎段能长出原球茎并分化成为丛生芽, 长势正常; 而另一部分在其茎节间生长出愈伤组织, 经对其愈伤组织作培养, 亦能够分化成丛生芽。由此证明在文山红柱兰种苗的继代增殖中, 可采用茎段分段诱导增殖的方式, 以提高其增殖效率。

表 3 不同培养基的文山红柱兰苗株生根状况

Tab. 3 Rooting status of *C. wenshanense* on different tested media

培养基号	基本培养基	激素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		转接时根数/条	总根数/条	生根情况		
		BA 或 KT	NAA			平均根数/条	平均根长/cm	平均根粗/cm
1			0	0	28	3	2.8	0.3
2			0.2	0	34	3	2.4	0.3
3			0.4	0	44	3	3.0	0.4
4		BA0.2	0.6	0	62	3	2.7	0.4
5			0.8	0	56	2	2.6	0.6
6			1.0	0	48	4	3.6	0.5
7			1.5	0	34	3	3.2	0.4
8	1/2MS		2.0	0	33	3	3.1	0.4
9			0	0	12	2	3.3	0.2
10			0.2	0	53	2	2.7	0.3
11			0.4	0	54	2	2.4	0.3
12		KT0.2	0.6	0	46	2	2.4	0.4
13			0.8	0	53	2	2.15	0.4
14			1.0	0	51	2	2.4	0.3
15			1.5	0	57	3	3.0	0.4
16			2.0	0	42	2	2.7	0.4

注: 有机附加物为碳粉 (AC) 3 g/L。

### 2.3 不同培养基的生根培养效果

选择株高约为 5 cm 的文山红柱兰无根苗株, 接种在添加不同 NAA 浓度和相同浓度的 6-BA 和 KT, 以及添加活性炭的生根培养基中进行对比试验, 50 天后观察其苗株的生根状况, 结果见表 3。

NAA 激素广泛用于苗株的生根培养中, 其与细胞分裂素相互作用能促进苗株的生长。活性炭在兰花的组织培养中具有促进苗株生根的作用, 其机理一般认为与活性炭减弱光照, 抑制 IAA 的光氧化有关<sup>[17-18]</sup>。花宝 5 号的 N : P : K 配比是 30 : 10 : 10, 其主要作用是促进各类幼苗的快速生长。花宝 5 号为国兰与洋兰新芽的初期生长提供了营养。在参试的生根培养基的 16 组配方中, 明显地突出了激素 NAA 的作用。此试验结果表明, 在 NAA 与 KT 和 BA 组合的生根培养基中, NAA 与 BA 组合的苗株生根效果优于 NAA 与 KT 的组合。随着培养基中 NAA 浓度的提高, 其苗株的生根情况呈现出缓慢上升的趋势, 但其生根总数并没有随着激素浓度的增加不断上升, 在达到一定浓度后, 反而呈现下降的趋势, 有部分苗株死亡。在试验初期, 培养基中还加入了花宝 5 号, 希望能有促进生根, 壮苗的效果, 但在培养 30 天左右时, 绝大多数的文山红柱兰苗株出现叶片萎蔫, 叶绿素消失, 叶片卷曲, 植株生长畸形等现象, 且导致大部分苗株最后死亡, 在相同的培养基中去除花宝 5 号后, 此现象消失。说明在文山红柱兰苗株生根培养过程中添加花宝 5 号不利于其生长。当其生根的培养基中所添加 BA 激素的浓度为 0.2 mg/L, NAA 激素的浓度为 0.6 mg/L 时, 文山红柱兰苗株的生根效果最佳。

### 3 炼苗移栽技术

当文山红柱兰组培苗的根长达 1 cm 左右时, 可将其苗木移出培养室, 置于温室中继续培养 7 天左右。将文山红柱兰组培苗根部的培养基洗净, 选择灭菌苔藓作其炼苗用的基质, 在专用温室中进行炼苗。炼苗期间光照不宜过强, 保持温室的温度为 20℃ ~ 25℃, 每天用喷头进行喷雾, 以保持其苗根部的湿润, 使其空气相对湿度达 75% ~ 85%, 并注意病虫害防治。炼苗 2 个月左右苗木长出新根, 可上盆栽植。

### 4 结语

(1) 文山红柱兰组培技术的研究, 通过采用其种子为外植体, 获取了种子无菌萌发球茎丛生芽继代增殖, 无根苗的生根培养以及炼苗移栽等的组培配套技术, 为文山红柱兰的种苗培育提供了新途径。

(2) 文山红柱兰的种子萌发较易, 萌发率高。以低盐度的 1/2MS 为基本培养基加入浓度为 0.2 mg/L 的激素 BA 和浓度为 0.2 mg/L 的激素 NAA 作为培养基对文山红柱兰种子的萌发较为有利。当所添加的激素浓度大于 2 mg/L 时, 培养基出现轻微褐化, 表明此期间所用的此两种激素的浓度不宜过高。另外, 种子萌发之后要注意及时转接, 以免影响其种苗后期的生长。

(3) 以低盐度的 1/2MS 为基本培养基加入 1.5 mg/L 的 BA 和 0.2 mg/L 的 NAA 为增殖培养基对文山红柱兰球茎丛生芽的诱导效果最好, 添加这两种激素的浓度过高或过低都会降低其诱导效果。试验发现培养时间的长短也是影响其丛生芽增殖率的一个因素, 时间过短不能达到预期的增殖数量, 过长影响苗株后期长势, 使苗株变得瘦弱, 还会影响后期生根效果。此期的培养时间以 60 ~ 70 天为好。

(4) 在文山红柱兰组培苗的增殖培养过程中, 要注意保持充足的光照。此间若光照不足, 使其苗株出现徒长、节间增多且细长, 叶片发黄等现象。其苗株还会出现白化现象, 将严重影响其增殖效果。

(5) 在文山红柱兰组培苗的生根试验中, 以低盐度的 1/2MS 为基本培养基, 分别添加激素 BA、KT 与 NAA 组合作为其生根培养基。其试验结果表明添加 BA 较 KT 明显。在 1/2MS 基本培养基中加入 0.6 mg/L 的 NAA、0.2 mg/L 的 BA 和 0.3% 活性炭, 最适合文山红柱兰无根苗的生根培养。经试验表明, 在文山红柱兰组培苗的生根培养期间, 加花宝 5 号对其苗的生根不利。

#### 参考文献:

- [1] 吴应祥, 刘方. 云南兰属新种[J]. 云南植物研究, 1990, 12(3): 291-292.

- [2]陈心启,吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京: 中国林业出版社,1998.
- [3]丁燕芬,王 岩,龙春林. 中国兰花组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(8):2247-2248,2250.
- [4]王怀宇. 蝴蝶兰的快速无性繁殖[J]. 园艺学报,1989,16(10):73-77.
- [5]丁 兰. 兰花生物工程研究进展[J]. 西北师范大学学报(自然科学版),2000,36(3):111-116.
- [6]张树珍,曾宪松,张银东,等. 大花蕙兰的组织培养[J]. 热带农业科学,1995(4):26-28.
- [7]杨玉珍,孙天洲,孙 廷,等. 大花蕙兰组织培养和快速繁殖技术研究[J]. 北京林业大学学报,2002,24(2):86-88.
- [8]吴晓霞,姜敦云,崔月花,等. 大花蕙兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2002,28(2):141.
- [9]秘彩莉,霍晨敏,冯全义,等. 大花蕙兰快速繁殖技术初报[J]. 河北师范大学学报(自然科学版),2002,26(2):190-192.
- [10]朱 艳,胡 军. 大花蕙兰快速繁殖技术研究[J]. 中国野生植物资源,2000,19(6):57-59.
- [11]陈 刚,张远能. 中国兰花茎尖组织培养研究[J]. 花卉,1998(1):13.
- [12]曾碧玉,朱根发,刘海涛. 兰花育种研究进展[J]. 园艺学报,2005,32(3):551-556.
- [13]陈兴发. 兰花繁殖技术研究进展[J]. 福建农林大学学报,2002,31(4):476-479.
- [14]丁长春,刘 铁,刘方媛. 文山红柱兰组织快繁技术的研究[J]. 文山师范高等专科学校学报,2005,18(3):225-226.
- [15]何松林,王 献,鲁 琳,等. 培养基和添加物对蝴蝶兰原球茎分化幼苗的影响[J]. 中南林学院学报,2003,23(5):11-13.
- [16]MAO B Z, LIN W H, QIAN X H. et al. Effects of Some Factors on the Growth and Differentiation of Cymbidium Ensifolium Protocorm[J]. Journal of Zhoiang A cultural University,1997,23(5):547-550.
- [17]沈海龙. 植物组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社,2005.
- [18]陈 贤,龚元圣,杨 德,等. 野生柱穗醉鱼草嫩芽的组培技术研究[J]. 西部林业科学,2007,36(4):75-78.