

# 独花兰组织培养研究

刘国顺<sup>1</sup>, 杨丽<sup>1</sup>, 董卉卉<sup>1</sup>, 哈登龙<sup>2</sup>, 琚煜熙<sup>2</sup>, 王晶<sup>3</sup>, 马冠男<sup>1</sup> (1. 信阳市林业科学研究所, 河南信阳 464031; 2. 鸡公山国家级自然保护区管理局, 河南信阳 464133; 3. 信阳农林学院, 河南信阳 464000)

**摘要** [目的]研究独花兰的组织培养方法。[方法]以独花兰假鳞茎为外植体,以1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA为芽诱导培养基,以1/2MS+1.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA为生根培养基,研究外植体的芽诱导和生根情况。[结果]外植体消毒的最佳方式为75%酒精30 s+0.2% HgCl<sub>2</sub> 6~7 min;试验外植体的污染率、诱导率、死亡率、成活率、生根率分别为14.3%、57.1%、28.6%、50.0%、33.9%。[结论]该研究为独花兰的规模化生产提供了技术指导。

**关键词** 独花兰;组织培养;假鳞茎;快速繁殖

**中图分类号** S682.1<sup>+</sup>9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)22-09195-02

## Study on Tissue Culture of *Changnienia amoena*

LIU Guo-shun et al (Xinyang Forestry Science Institute, Xinyang, Henan 464031)

**Abstract** [Objective] The aim was to study the tissue culture method of *Changnienia amoena*. [Method] Using the pseudobulb of *C. amoena* as explant, the 1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA as bud induction medium and the 1/2MS+1.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA as rooting medium, the conditions of bud induction and rooting of the explants were studied. [Result] The best sterilized method of the explants was 75% alcohol for 30 s and 0.2% HgCl<sub>2</sub> 6-7 min; the contamination rate, induction rate, mortality rate, survival rate and rooting rate of the explants were 14.3%, 57.1%, 28.6%, 50%, 33.9% respectively. [Conclusion] The study provided technical guidance for the large-scale production of *C. amoena*.

**Key words** *Changnienia amoena*; Tissue culture; Pseudobulb; Rapid propagation

独花兰(*Changnienia amoena* Chien)属兰科(Orchidaceae)独花兰属(*Changnienia*),是我国特有的单种属珍稀植物,仅生长在长江中、下游及陕西南部的山地林下及沟谷中<sup>[1-3]</sup>。它是一种优良的野生花卉与珍贵的药用植物,其假鳞茎是治疗疮毒与蛇伤的良药,具有较高的经济价值。由于独花兰对生态环境要求较严,适生范围较窄,自然结实率低,且近年来其生境不断受到各种人为活动的胁迫(如林木过度采伐及人类的过度采挖等),使该物种的自然分布区日渐缩小,已被《中国植物红皮书——稀有濒危植物(第一册)》列为稀有种,也被列为国家二级保护植物。由于独花兰花器构造特殊及传粉昆虫缺乏等而不能正常传粉受精与结实<sup>[2]</sup>,导致其自然情况下的繁殖转为困难,而采用组织培养技术,可最终达到保护独花兰种质资源,保存其物种和遗传多样性,开发和利用独花兰的目的。

近年来,我国也有一些学者对独花兰进行了研究,但专门针对独花兰进行组织培养的研究极少(仅有高丽等对其进行了研究报道<sup>[4]</sup>),而对其在组织培养试验中生长情况的详细报道目前尚未见到。由于独花兰植株仅一叶一花,具假鳞茎状地下茎,种子正常结实率极少,因此该试验采用假鳞茎作为外植体对独花兰进行组织培养研究,旨在为独花兰的种质资源保护和工业化生产提供技术指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 外植体的选择。**独花兰的假鳞茎具节,淡黄白色,顶生1枚叶,叶具柄,于每年9月中下旬地下假鳞茎萌动并开

始展叶,根据这一生活习性,依据外植体在生长开始的季节选取最佳<sup>[5]</sup>这一规律,在9月初选择独花兰的假鳞茎作为外植体对独花兰进行组织培养。

**1.1.2 主要试剂。**试验所用药品均为国产分析纯,主要用于配制MS、NAA、6-BA等。

**1.1.3 培养基。**芽诱导培养基:1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3%蔗糖+0.8%琼脂(pH 5.8);生根培养基:1/2MS+1.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3%蔗糖+0.8%琼脂(pH 5.8)。

### 1.2 方法

**1.2.1 芽诱导培养。**取独花兰的假鳞茎用洗洁精清洗干净后,置于流水下冲洗60 min,然后在超净工作台上用75%酒精消毒30 s,无菌水冲洗5次,再用0.2% HgCl<sub>2</sub>分2~3次共消毒6~7 min,每次以无菌水漂洗6次后,用消毒滤纸吸干表面水分,接种到芽诱导培养基中,接种60瓶左右,每瓶接一个假鳞茎(过大假鳞茎可分成2~3段),将其置于培养箱中,培养箱设置为光照6级,温度25℃,时间13 h,夜间模式温度23℃,时间11 h。

**1.2.2 生根培养。**将诱导出的幼芽从假鳞茎上切下,转接入生根培养基中培养,培养箱设置为光照6级,温度25℃,时间13 h,夜间模式温度23℃,时间11 h。

**1.2.3 数据统计与分析。**在材料接种后,定期观察记录生长情况,依据主要统计指标及计算公式<sup>[6]</sup>进行分析:

污染率(%) = 污染的外植体数/接种的外植体总数 × 100

诱导率(%) = 萌发出叶片的外植体数/接种的外植体总数 × 100

死亡率(%) = 死亡的外植体数/接种的外植体总数 × 100

成活率(%) = 成活的外植体数/接种的外植体总数 × 100

生根率(%) = 生根的外植体数/接种的外植体总数 × 100

**基金项目** 信阳市科技计划项目(KJGG1110)。

**作者简介** 刘国顺(1983-),男,河南淮阳人,工程师,硕士,从事林业科研及科技推广工作,E-mail:guoshunliu@163.com。

**收稿日期** 2013-02-07

## 2 结果与分析

试验共接种 56 瓶,每瓶接一个假鳞茎,经观察共有 8 瓶污染(4 瓶褐化,3 瓶细菌性污染,1 瓶真菌性污染),成功诱导出芽 32 瓶,死亡 16 瓶,最终成活 28 瓶,生根 19 瓶,得到污染率、诱导率、死亡率、成活率、生根率分别为 14.3%、57.1%、28.6%、50.0%、33.9%。

**2.1 外植体消毒情况分析** 独花兰的假鳞茎生长在地下,与各种菌类接触较多,灭菌有一定的困难。一般试验所用的 0.1% HgCl 灭菌效果不佳,而浓度较高的 HgCl 又易使外植体失去活性,抑制芽的诱导,而该试验中采用 0.2% HgCl 消毒能较好的起到灭菌作用而又对其活性影响较小。在 HgCl 消毒时间上,经多次试验,6~7 min 最佳,随着 HgCl 消毒时间的延长,污染率降低,但会对外植体造成伤害,致使死亡率升高,当时间超过 8 min 时,诱导出芽数很少,而低于 6 min 时,污染率很高。酒精灭菌采用最常用的 75% 酒精消毒 30 s,同时采用交替灭菌和多次灭菌的方式,能更好地提高灭菌效果。综合考虑死亡率、污染率和成活率,独花兰假鳞茎的最佳消毒处理方案为 75% 酒精消毒 30 s + 0.2% HgCl 消毒 6~7 min。

**2.2 诱导芽生长情况分析** 在芽诱导培养基中培养约 10 d,假鳞茎芽点处开始萌动,每个假鳞茎出现 2~3 个白色突起;20 d 后逐渐长出浅绿色幼芽,幼芽基部粗壮为白色,芽尖绿色;30 d 后芽长至 1 cm 左右,40 d 后芽长至 1.5 cm,这时可进行下一个阶段诱导生根培养。

**2.3 诱导根生长情况分析** 当诱导芽长至 1.5~2.0 cm 时,在无菌条件下,将诱导出的幼芽从假鳞茎上切下,假鳞茎部分切除,幼芽带黑色部分也切除,只留生长旺盛部分,转接入

生根培养基中,20 d 左右开始生根,每苗根数可达 2~3 条,根长 2~3 cm,根系粗壮。

## 3 结论

(1)独花兰为我国特有的单种属稀有植物,由于其不能正常传粉受精与结实,自然结实率低,种子繁殖困难,一般所采用的分株繁殖,此法繁殖系数极低,远不能满足市场需求。而采用组织培养技术可快速繁殖大量优质种苗,实现规模化生产,具有很高的经济价值,同时可有效解决中药材来源匮乏的问题,缓解野生资源遭受严重破坏的压力,对独花兰野外植物资源的有效保护和可持续利用具有重要意义。

(2)植物组织培养的困难之一是建立无菌材料,文中以独花兰的假鳞茎作外植体,筛选出最佳的灭菌方式为:75% 酒精消毒 30 s + 0.2% HgCl 消毒 6~7 min,此时成活率最高。

(3)在芽诱导试验中,利用芽诱导培养基(1/2MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA)可有效诱导出芽,芽诱导率为 57.1%;在根诱导试验中,增加 6-BA 浓度,即利用根诱导培养基(1/2MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA)可有效的诱导出根,生根率为 33.9%。由于独花兰组织培养处于初步阶段,芽诱导率和生根率偏低,还需进一步对培养基进行改进。

## 参考文献

- [1] 颜容,刘红霞,蔡怀颖,等.独花兰菌根的初步研究[J].北京林业大学学报,2006,28(2):112-117.
- [2] 熊治廷,吴剑,李奕,等.独花兰野生种群研究——开花与营养体状态的关系[J].植物学通报,2002,19(1):87-91.
- [3] 张玉武,杨传东.贵州兰科一新纪录属种(独花兰属:独花兰)[J].种子,2010,29(4):65-66.
- [4] 高丽,杨波,李洪林.独花兰组织培养与快速繁殖(简报)[J].亚热带植物科学,2010,39(3):79.
- [5] 王振龙.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2007:55-56.
- [6] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986:24-74.
- [7] 苏农业科学,2012,40(8):277-279.
- [8] 施江,辛莉,郭永新,等.现代生物学基因研究进展[J].生物学通报,2009,44(4):4-7.
- [9] 张成,刘定富,易先达.全球转基因作物商业化进展及现状分析[J].湖北农业科学,2011,50(14):2819-2823.
- [10] 转基因作物的安全之争[EB/OL]. [2013-07-15]. <http://www.biobioscience.com/topic/hot/148.html>.
- [11] 刘仲齐,薛俊,张要武.番茄分子连锁图谱的发展和分子标记辅助育种[J].天津农业科学,2004,10(1):37-40.
- [12] JAMES C. Global status of commercialized biotech /GM crops: 2012[R]. New York: ISAAA, 2013.
- [13] 许智宏.现代生物技术的宣传与普及:科学家的职责[J].华中农业大学学报:社会科学版,2010,90(6):1-3.
- [14] 何玲.普斯陶伊(Pusztai)事件及其思考[J].自然辩证法研究,2004,20(8):91-95.
- [15] 泰里·拉尼,普拉布·平加利.转基因农业能养活地球?[J].环球科学,2007(10):46-54.
- [16] 吕选忠,于宙.现代转基因技术[M].北京:中国环境科学出版社,2005:107.
- [17] 罗玲玲,王刚.农作物转基因技术的三重价值分析[J].东北大学学报:社会科学版,2012,14(5):377-381.
- [18] 张杰伟,张中保,陈亚娟,等.中国转基因作物产业化分析[J].安徽农业科学,2013,41(10):4250-4251,4254.
- [19] 黄司思,程在全.转基因植物及产品检测技术研究综述[J].西南农业学报,2011(3):1203-1208.
- [20] 林敏.农业转基因技术研究和应用将造福人类[J].湖南农业科学,2012,(14):14-17.

(上接第 9194 页)

基因和生物新品种,在科学评估、依法管理基础上,推进转基因新品种产业化”。目前,我国已制定了针对不同生物安全问题的法律、法规和政策,各级政府部门开始步入规范管理的轨道,建立并有效实施了安全评价和审批程序等。虽然目前已建立了针对转基因生物安全的各项政策措施,但还不够细致完善,可操作性小,执行力度低。但任何事物的发展都有一个完善的过程,我国的转基因生物安全管理仍需进一步完善,来适应我国特有的经济、社会发展形式。笔者认为,首先,应继续完善转基因生物安全管理机制,健全监管机制,提高安全评价工作的行业支撑技术水平,增强政策法规的可操作性;第二,规范转基因植物产品的释放、种植和投放,强化监管和督查力度,确保转基因产业的健康发展;第三,大力宣传转基因技术科普教育,消除心理障碍,提高我国大众对转基因生物及其产品的认知水平,开展法规培训和科普宣传,努力提高研发者、经营者和管理者的安全意识和管理水平。

## 参考文献

- [1] 张启发.转基因作物:研发、产业化、安全性与管理[J].中国大学教学,2003(3):35-40.
- [2] 徐文君,周玮,徐春祥.国内外转基因作物及其安全性评价进展[J].江