

## 兰科蒙自兰快速繁殖和试管开花的研究

邵 丽<sup>1</sup>, 曾歆花<sup>1</sup>, 黄卫昌<sup>1,2\*</sup>

1. 上海辰山植物园/华东野生濒危资源植物保育中心, 上海 201602; 2. 福建农林大学艺术园林学院, 福建福州 350002

**摘要:** 以蒙自兰种子作为试验材料, 研究不同浓度配比的生长调节剂对蒙自兰的无菌播种、快速繁殖和试管开花的影响。结果表明: 人工授粉后 105 d 的蒙自兰种子活力强, 萌发率高, 1/2MS+0.6 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA 培养基较适合种子萌发; 丛芽增殖适宜用含 2.0 mL/L 6-BA 的培养基, 不添加 NAA; 生根壮苗用 1/2MS+1.0 mL/L NAA+30 g/L 土豆匀浆最佳; 在 1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L PP<sub>333</sub> 培养基上蒙自兰开花率最高。研究结果为蒙自兰的物种保护、可持续利用以及野外种群的恢复和重建提供重要材料和技术支持。

**关键词:** 蒙自兰; 无菌播种; 快速繁殖; 试管开花

中图分类号: S682.31 文献标识码: A

## Rapid Multiplication and *in vitro* Flowering of *Mengzia foliosa* (King & Pantl.) W.C. Huang, Z.J. Liu & C. Hu (Orchidaceae)

SHAO Li<sup>1</sup>, ZENG Xinhua<sup>1</sup>, HUANG Weichang<sup>1,2\*</sup>

1. Shanghai Chenshan Botanical Garden / Eastern China Conservation Centre for Wild Endangered Plant Resources, Shanghai 201602, China; 2. College of Landscape Architecture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

**Abstract:** In this study, the effects of different concentration and ratio of growth regulators on seed germination, rapid propagation and *in vitro* flowering of *Mengzia foliosa* were studied. The results showed that the seeds had strong activity and high germination rate at 105 days after artificial self-pollination, and 1/2MS+0.6 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA medium was more suitable for seed germination. Meanwhile, 2.0 mL/L 6-BA without NAA was more suitable for cluster bud proliferation; and 1/2MS+1.0 mL/L NAA+30 g/L potato homogenate medium was the best for rooting and hardening-off. In addition, 1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L PP<sub>333</sub> medium had the highest flowering rate. Our results not only contribute to the conservation and sustainable use of the species, but also provide important materials and technical support for wild population restoration and reconstruction.

**Keywords:** *Mengzia foliosa*; aseptic sowing; rapid propagation; *in vitro* flowering

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.012

蒙自兰 [*Mengzia foliosa* (King & Pantl.) W.C. Huang, Z.J. Liu & C. Hu], 是兰科蒙自兰属多年生草本植物, 主要分布于中国云南南部、泰国的山坡林下。基于前期形态学和分子系统学的分析结果, 华白及 [*Bletilla sinensis* (Rolfe) Schltr.] 区别于兰科龙嘴兰族的白及属和其他属植物。因此, 以华白及作为模式种, 建立兰科新属——蒙自兰属<sup>[1]</sup>。

当前, 由于生境破坏和人为干扰, 蒙自兰野外居群和植株数量极少, 目前已被列为国家保护的濒危植物<sup>[2]</sup>。此外, 蒙自兰在引种栽培和繁育过程中也存在生长缓慢、开花少和结实困难等问题, 这极不利于蒙自兰野外种群的恢复和重建。兰科植物种子数量巨大, 一个果荚内含有成千上万粒种子, 通过无菌播种技术能快速繁殖大量种苗;

收稿日期 2023-06-28; 修回日期 2023-07-25

基金项目 上海市科学技术委员会项目 (No. 19390743600); 国家自然科学基金项目 (No. 32271740); 上海市绿化和市容管理局 2023 年科学技术项目 (No. G232408)。

作者简介 邵 丽 (1989—), 女, 学士, 工程师, 研究方向: 兰科植物快速繁育。\*通信作者 (Corresponding author): 黄卫昌 (HUANG Weichang), E-mail: huangweichang@csnbgsh.cn。

此外, 通过试管开花技术能打破天气、季节和地域的限制, 可提高植物开花率和结实率, 从而满足植物资源保护和可持续开发利用所需的植物材料。目前, 国内外对兰科植物组培快繁和试管开花的研究有较多报道, 如春兰<sup>[3]</sup>、建兰<sup>[4]</sup>、寒兰<sup>[5]</sup>、铁皮石斛<sup>[6]</sup>、梳唇石斛<sup>[7]</sup>、春石斛<sup>[8]</sup>、虎舌兰<sup>[9]</sup>、报春石斛<sup>[10]</sup>和扇形文心兰<sup>[11]</sup>等。而濒危兰科植物蒙自兰由于稀缺的野外材料, 其无菌播种繁殖、药效和试管开花等相关研究均处于空白状态。为加快该物种的保护和开发利用, 亟需开展蒙自兰的快速繁育和试管开花研究。

本研究通过研究不同浓度 6-BA、NAA、营养物质对蒙自兰生长的影响, 以及 6-BA、NAA、TDZ、2,4-D、PP<sub>333</sub> 对试管开花的影响, 筛选出最佳培养基配方, 建立一套高效的快繁技术体系。不但可以为该物种的种群回归和恢复等保育生物学研究提供帮助, 还能为其开花调控机理研究和缩短育种周期提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试材料取自云南人工授粉的蒙自兰未开裂果荚。

### 1.2 方 法

1.2.1 种子消毒灭菌 将蒙自兰蒴果在流水下冲洗 0.5 h, 然后用吸水纸将种荚表面水分吸干后转入无菌操作台。参照王丽等<sup>[12]</sup>的方法, 用 75% 酒精浸泡 30 s, 然后用含少许吐温 20 的 0.1% 升汞溶液震荡消毒 10~15 min, 无菌水冲洗 5 遍, 滤纸吸干表面水分后待用。

1.2.2 种子萌发 (1) 不同成熟度种子的萌发。播种不同成熟程度的蒴果, 成熟度为从自交到播种的天数分别为 85、95、105、115 d。剖开消毒过的蒴果, 将种子均匀接种于含 0.5 mg/L NAA、30 g/L 蔗糖、6.5 g/L 琼脂、0.2 g/L 活性炭, pH 为 5.8 的 1/2MS 培养基上。共 4 组处理 A<sub>1</sub>~A<sub>4</sub>, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶约 100 粒种子, 分别记录萌发时间和统计种子萌发数, 并计算萌发率。萌发率=萌发种子数量/接入种子总数×100%。

(2) 不同培养基对种子萌发的影响。基本培养基以 MS 和 1/2MS 为对照, 添加不同浓度的 NAA 和 6-BA, 采用 L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>) 正交表设计 (表 1)。设置 16 组样本 B<sub>1</sub>~B<sub>16</sub>, 每组接种 5 瓶, 每瓶 100 粒种子, 待种子萌发后统计萌发种子数, 计算萌发率。

表 1 播种正交试验表

Tab. 1 Orthogonal test table of sowing

水平 Level	培养基 Mmedium	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )
1	MS	0	0
2	1/2MS	0.2	0.5
3		0.6	1.0
4		1.0	1.5

1.2.3 丛芽增殖 将萌发后长小叶的蒙自兰小苗接种至不同培养基, 基础培养基为 1/2MS, 添加不同浓度 NAA 和 6-BA, NAA 的浓度梯度设置为 0、0.2、0.5 mg/L, 6-BA 的浓度梯度设置为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L, 不添加任何激素的作为对照组 (CK)。15 个处理 C<sub>1</sub>~C<sub>15</sub>, 每组处理 10 个重复 150 芽, 60 d 后统计增殖率。

1.2.4 生根壮苗 将增殖后约同等大小的蒙自兰小苗接种至不同的生根壮苗培养基。基础培养基是 1/2MS, 添加不同浓度生长素和营养物质匀浆, 设置 L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>) 正交试验表 (表 2)。不添加任何生长调节剂和营养物的培养基作为对照组 (CK), 16 个处理 D<sub>1</sub>~D<sub>16</sub>, 每组 10 个重复共 100 苗, 60 d 后测量生根数量、根长和苗高<sup>[13]</sup>。

表 2 生根壮苗正交试验表

Tab. 2 Orthogonal test table of rooting and strengthening

水平 Level	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	营养物 Nutrient	营养物浓度 Nutrient concentration/(g·L <sup>-1</sup> )
1	0	香蕉	10
2	0.2	椰子水	30
3	0.5	土豆	50
4	1.0		100

1.2.5 试管开花 将从芽增殖后约同等大小的蒙自兰幼苗接种至不同的催花培养基。以 1/2MS 为基础培养基, 添加不同浓度的细胞分裂素 6-BA (1.0、2.0 mg/L)、TDZ (0.1、0.5 mg/L) 和生长素 NAA (0.2、0.5 mg/L)、2,4-D (0.2、0.5 mg/L), 两两配比, 另添加多效唑 PP<sub>333</sub> 1.0 mg/L, 以不添加 PP<sub>333</sub> 的处理作为对照组 (CK), 16 个处理 E<sub>1</sub>~E<sub>16</sub>, 每组 5 个重复共 25 苗, 90 d 后统计开放花朵数, 计算开花率和正常花率。开花率=开放花朵数/接种外植体数×100%; 正常花率=正常花朵数/开放花朵数×100%。

1.2.6 培养条件 通过预试验发现蒙自兰从萌发到幼苗生长各阶段在 1/2MS 培养基上均生长良好, 因此设置丛芽增殖、生根壮苗、试管开花试

验的基本培养基均为 1/2MS。各培养基中均加入 0.2 g/L 活性炭、6.5 g/L 琼脂、30 g/L 蔗糖，催花培养基中另外添加 30 g/L 香蕉匀浆，pH 均调为 5.8。培养室温度控制在(25±1)℃，光照时长为 12 h/d，光照强度为 2000 lx。

### 1.3 数据处理

使用正交设计助手 II v3.1 软件设置正交试验表，运用 SPSS16.0 软件进行数据处理。采用单因素方差分析比较不同种子成熟度对种子萌发率的影响；采用多因素方差分析比较不同培养基对种子萌发率，以及不同激素浓度配比对丛芽增殖率、根长、苗高、根数量、花芽分化率和正常开花率的影响。采用 Tukey HSD 方法比较不同实验组的显著性差异 ( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同成熟度对蒙自兰种子萌发的影响

蒙自兰种子的成熟度对其萌发率有显著影响 (表 3)。授粉后 85~105 d 的种子呈白色，萌发所需时间均在 30 d 左右，随着种子成熟时间的延长其萌发率递增，A<sub>3</sub> 与 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 间呈显著差异。105 d 的种子萌发率最高为 87.00%，显著高于 115 d 的种子萌发率，且萌发出原球茎后叶片分化快。授粉 115 d 的种子颜色略深，萌发时间最短，但萌发率明显降低，且萌发后的原球茎叶分化率低。

表 3 不同成熟度种子的萌发率

Tab. 3 Germination rate of different maturity seeds

处理 Treatment	授粉后天数 Days after pol- lination	萌发所需天数 Days required for germination	萌发率 Germination rate/%
A <sub>1</sub>	85	29	58.00±3.40 <sup>b</sup>
A <sub>2</sub>	95	30	63.00±6.05 <sup>b</sup>
A <sub>3</sub>	105	31	87.00±1.14 <sup>a</sup>
A <sub>4</sub>	115	13	14.00±3.85 <sup>c</sup>

注：同列不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

### 2.2 不同培养基对蒙自兰种子萌发的影响

成熟度为 105 d 的蒙自兰种子播种于不同培养基上，供试的 16 组培养基均能萌发，但各组萌发率有显著差异 (表 4)。B<sub>15</sub> 处理的培养基 (1/2MS+0.6 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA) 的萌发率最高，为 97.00%。在 16 组处理中，当 NAA 浓度相同时，萌发率随 6-BA 浓度的升高而增加；

而当 6-BA 浓度相同时，较低 NAA 浓度的萌发率较高，其中 B<sub>9</sub> 和 B<sub>15</sub> 的萌发率接近，且 B<sub>9</sub> 的萌发率仅次于 B<sub>15</sub>；当 NAA 浓度为 1.0 mg/L 时，MS 培养基的萌发率较低，B<sub>4</sub> 和 B<sub>8</sub> 的萌发率分别为 5.00% 和 9.40%；当 6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时，1/2MS 培养基的萌发率有所降低。从表 5 中可知，基础培养基、NAA、6-BA 对蒙自兰种子萌发的影响均存在显著性差异 ( $P<0.05$ )，对比三因素的  $F$  值发现，影响种子萌发率的大小顺序为基础培养基 > NAA > 6-BA。

表 4 不同培养基对蒙自兰种子萌发的影响

Tab. 4 Effects of different medium on seed germination of *M. foliosa*

处理 Treatment	基础培养基 Basic medium	NAA (mg·L <sup>-1</sup> )	6-BA (mg·L <sup>-1</sup> )	萌发率 Germination rate/%
B <sub>1</sub>	MS	0	1.5	87.20±3.60 <sup>ab</sup>
B <sub>2</sub>	MS	0.2	1.0	41.20±8.05 <sup>de</sup>
B <sub>3</sub>	MS	0.6	0.5	15.20±6.70 <sup>fg</sup>
B <sub>4</sub>	MS	1.0	0	5.00±3.16 <sup>g</sup>
B <sub>5</sub>	MS	0	0.5	77.80±5.38 <sup>abc</sup>
B <sub>6</sub>	MS	0.2	0	35.60±6.53 <sup>ef</sup>
B <sub>7</sub>	MS	0.6	1.5	65.00±4.46 <sup>bcd</sup>
B <sub>8</sub>	MS	1.0	1.0	9.40±4.77 <sup>g</sup>
B <sub>9</sub>	1/2MS	0	1.0	96.40±0.60 <sup>a</sup>
B <sub>10</sub>	1/2MS	0.2	1.5	93.40±1.86 <sup>a</sup>
B <sub>11</sub>	1/2MS	0.6	0	5.20±3.25 <sup>g</sup>
B <sub>12</sub>	1/2MS	1.0	0.5	57.40±5.59 <sup>cde</sup>
B <sub>13</sub>	1/2MS	0	0	89.40±4.99 <sup>a</sup>
B <sub>14</sub>	1/2MS	0.2	0.5	62.40±4.86 <sup>cd</sup>
B <sub>15</sub>	1/2MS	0.6	1.0	97.00±2.00 <sup>a</sup>
B <sub>16</sub>	1/2MS	1.0	1.5	79.40±4.61 <sup>abc</sup>

注：同列不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

表 5 种子萌发主体间效应检验

Tab. 5 Testing of inter subject effects of seed germination

源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	$F$	$P$
基础培养基	18 635.513	1	18 635.513	31.640	0.000
NAA	28 840.438	3	9 613.479	16.322	0.000
6-BA	4132.813	1	4 132.813	7.017	0.010
误差	43 584.425	74	588.979		

### 2.3 不同激素浓度对蒙自兰丛芽增殖的影响

蒙自兰种子播种后约 30 d 萌发形成原球茎。将其转接至增殖分化培养基中发现原球茎会分化

成苗，但增殖形成的愈伤组织并未分化且逐渐发黄死亡。因此在原球茎分化出叶片后再进行丛芽增殖处理。将 1/2MS 作为基本培养基，观察 NAA 和 6-BA 对丛芽增殖的影响（表 6）。结果显示，各处理的蒙自兰丛芽均具有不同程度的增殖，未添加 NAA 和 6-BA 的 CK 组的增殖率显著低于添加激素处理组；C<sub>2</sub> 和 C<sub>4</sub> 显著高于其他处理，2 组处理均未添加 NAA；C<sub>4</sub> 处理的增殖率最大，为 47.33%，其 6-BA 添加浓度为 2.0 mg/L；添加激素处理组中，C<sub>5</sub> 的增殖率最低为 18.01%，其 6-BA 添加浓度为 2.5 mg/L，C<sub>4</sub> 和 C<sub>5</sub> 处理均未添加 NAA。主体效应分析显示（表 7），不同浓度的 NAA 对丛芽增殖的影响差异不显著（ $P>0.05$ ），而不同浓度的 6-BA 对丛芽增殖的影响差异显著（ $P<0.05$ ）。

### 2.4 不同浓度 NAA 及营养物对蒙自兰生根壮苗的影响

将蒙自兰丛芽接种到不同培养基上，观察 NAA 和不同营养物质对蒙自兰生根壮苗的影响。结果表明，D<sub>15</sub> 培养基 1/2MS+1.0 mg/L NAA+30 g/L 土豆匀浆处理的蒙自兰生长状况最佳，苗高、根长和根的数量均显著高于其他处理（表 8）。由表 9 可知，各因素间呈显著性差异（ $P<0.05$ ）。营养物对蒙自兰根长和根数量的影响大于 NAA，30 g/L 土豆匀浆处理的生根效果最佳，其次是浓度 10 g/L，土豆匀浆超过 30 g/L 反而抑制生根；30、50 ml/L

表 6 不同激素浓度对蒙自兰丛芽增殖的影响  
Tab. 6 Effects of different hormone concentration on cluster buds proliferation of *M. foliosa*

处理 Treatment	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	增殖率 Proliferation rate/%
C <sub>1</sub>	0	0.5	21.34±3.41 <sup>ab</sup>
C <sub>2</sub>	0	1.0	43.98±7.70 <sup>a</sup>
C <sub>3</sub>	0	1.5	18.68±7.50 <sup>ab</sup>
C <sub>4</sub>	0	2.0	47.33±11.90 <sup>a</sup>
C <sub>5</sub>	0	2.5	18.01±5.71 <sup>ab</sup>
C <sub>6</sub>	0.2	0.5	19.99±4.87 <sup>ab</sup>
C <sub>7</sub>	0.2	1.0	38.67±7.81 <sup>ab</sup>
C <sub>8</sub>	0.2	1.5	30.66±11.12 <sup>ab</sup>
C <sub>9</sub>	0.2	2.0	26.02±5.83 <sup>ab</sup>
C <sub>10</sub>	0.2	2.5	36.00±4.99 <sup>ab</sup>
C <sub>11</sub>	0.5	0.5	37.34±5.72 <sup>ab</sup>
C <sub>12</sub>	0.5	1.0	20.00±4.44 <sup>ab</sup>
C <sub>13</sub>	0.5	1.5	20.01±5.26 <sup>ab</sup>
C <sub>14</sub>	0.5	2.0	32.01±9.48 <sup>ab</sup>
C <sub>15</sub>	0.5	2.5	37.99±8.78 <sup>ab</sup>
CK			6.00±1.84 <sup>b</sup>

注：同列不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

表 7 从芽增殖主体间效应检验

Tab. 7 Testing of inter subject effects of cluster buds proliferation

源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P
NAA	15.920	2	7.960	0.014	0.986
6-BA	7927.236	5	1585.447	2.854	0.017
误差	84 426.832	152	555.440		

表 8 不同浓度 NAA 及营养物对蒙自兰幼苗生长的影响

Tab. 8 Effects of different concentration of NAA and nutrients on seedling growth of *M. foliosa*

处理 Treatment	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	营养物 Nutrient	营养物浓度 Nutrient concentration/(g·L <sup>-1</sup> )	根长 Root length/cm	苗高 Plant height/cm	根数量 Number of roots
D <sub>1</sub>	0	香蕉	10	2.96±0.90 <sup>de</sup>	4.83±1.33 <sup>b</sup>	5.85±2.66 <sup>bc</sup>
D <sub>2</sub>	0	椰子水	30	3.34±1.05 <sup>cd</sup>	4.80±1.63 <sup>bc</sup>	6.45±2.35 <sup>b</sup>
D <sub>3</sub>	0	土豆	50	1.64±0.67 <sup>i</sup>	3.09±1.61 <sup>gh</sup>	3.21±1.43 <sup>e</sup>
D <sub>4</sub>	0	香蕉	100	3.94±1.13 <sup>ab</sup>	4.43±1.56 <sup>bcd</sup>	5.10±2.04 <sup>cd</sup>
D <sub>5</sub>	0.2	香蕉	30	3.02±1.27 <sup>cde</sup>	3.26±1.53 <sup>fgh</sup>	3.91±1.57 <sup>efg</sup>
D <sub>6</sub>	0.2	椰子水	10	2.60±1.01 <sup>efg</sup>	2.24±0.63 <sup>ij</sup>	3.49±1.36 <sup>fg</sup>
D <sub>7</sub>	0.2	土豆	100	2.36±0.83 <sup>fgh</sup>	4.24±2.07 <sup>bcd</sup>	4.71±2.05 <sup>de</sup>
D <sub>8</sub>	0.2	香蕉	50	2.57±1.20 <sup>efg</sup>	4.17±1.73 <sup>bcd</sup>	3.68±1.39 <sup>fg</sup>
D <sub>9</sub>	0.5	香蕉	50	2.50±0.85 <sup>efgh</sup>	4.26±1.53 <sup>bcd</sup>	3.82±1.39 <sup>efg</sup>
D <sub>10</sub>	0.5	椰子水	100	2.89±0.99 <sup>def</sup>	2.97±1.09 <sup>hi</sup>	3.73±1.41 <sup>efg</sup>
D <sub>11</sub>	0.5	土豆	10	4.04±0.85 <sup>ab</sup>	3.98±1.77 <sup>cdef</sup>	4.93±2.20 <sup>cd</sup>
D <sub>12</sub>	0.5	香蕉	30	2.18±1.14 <sup>ghi</sup>	3.88±1.45 <sup>defg</sup>	4.24±1.27 <sup>defg</sup>
D <sub>13</sub>	1.0	香蕉	100	2.86±1.23 <sup>def</sup>	2.83±1.07 <sup>hi</sup>	3.69±1.80 <sup>fg</sup>
D <sub>14</sub>	1.0	椰子水	50	3.53±1.16 <sup>bc</sup>	6.81±1.03 <sup>a</sup>	5.00±1.46 <sup>cd</sup>
D <sub>15</sub>	1.0	土豆	30	4.34±0.97 <sup>a</sup>	6.91±2.21 <sup>a</sup>	9.90±3.04 <sup>a</sup>
D <sub>16</sub>	1.0	香蕉	10	2.01±0.82 <sup>hi</sup>	3.44±1.43 <sup>efgh</sup>	3.04±1.25 <sup>e</sup>
CK				0.88±0.07 <sup>j</sup>	1.67±0.10 <sup>j</sup>	1.71±0.10 <sup>h</sup>

注：同列不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

表 9 生根壮苗主体间效应检验  
Tab. 9 Testing of inter subject effects of rooting and strengthening

指标 Index	源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P
根长	NAA	49.439	3	16.480	16.516	0.000
	营养物	319.573	4	79.893	80.071	0.000
	误差	1340.015	1343	0.998		
苗高	NAA	425.283	3	141.761	63.212	0.000
	营养物	542.129	4	135.532	60.435	0.000
	误差	3011.834	1343	2.243		
根数量	NAA	491.185	3	163.728	49.255	0.000
	营养物	1266.742	4	316.685	95.269	0.000
	误差	4464.272	1343	3.324		

椰子水和 100 g/L 香蕉匀浆也有利于生根, 但效果比土豆匀浆差。NAA 对苗高的影响大于营养物, 1.0 mg/L 的 NAA 有利于幼苗茎叶生长, D<sub>14</sub>、D<sub>15</sub> 处理组的苗高显著高于其他处理。

### 2.5 不同激素浓度对蒙自兰试管开花的影响

在蒙自兰生根壮苗试验中发现, 添加 30 g/L 香蕉匀浆的培养基上幼苗有部分开花现象, 故在试管开花试验培养基中以添加 30 g/L 香蕉匀浆来促进其开花, CK 组不添加。将生长健壮、苗高基

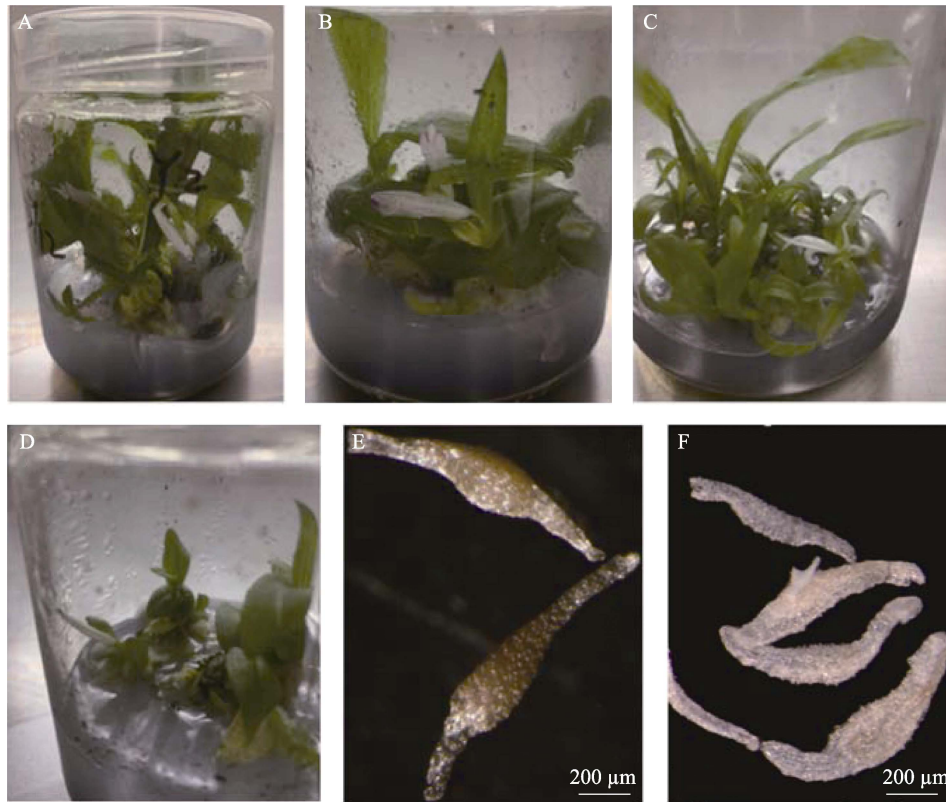
本一致的蒙自兰幼苗接种到不同培养基上, 观察不同激素对幼苗花芽分化和开花的影响。从表 10 可知, 在添加 PP<sub>333</sub> 的条件下, E<sub>2</sub> 处理的花芽分化率和正常开花率均显著高于其他处理, 是最优催花培养基。观察花芽分化情况发现(图 1), E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub> 培养基的花梗均较长且大多植株开 2~4 朵花(图 1A), 而其他培养基处理的开花株均为 1 梗 1 朵(图 1B); 与 E<sub>1</sub> 对比发现, 未添加 PP<sub>333</sub> 的 CK 培养基幼苗无花芽分化; 当添加相同浓度的 6-BA 时, 除 E<sub>6</sub> 未开花, NAA 与 6-BA 组合处理的花芽分化率显著优于 2,4-D 与 6-BA 组合处理, 且花朵畸形率也较低; 含 2,4-D 的培养基处理中, 除 E<sub>16</sub> 外, 花芽分化率均显著低于其他处理, 且花朵畸形率较高; TDZ 对蒙自兰花芽分化也有促进作用, 0.5 mg/L TDZ 处理的作用效果明显高于 0.1 mg/L TDZ, 但其花朵畸形率高于含 6-BA 的培养基处理, 可见添加 TDZ 会增加蒙自兰花朵畸形率, 而 2,4-D 对蒙自兰花芽分化有一定的抑制作用。添加 0.5 mg/L TDZ 和 0.5 mg/L NAA 的 E<sub>12</sub> 处理培养基上幼苗的开花状态为花梗短且花瓣卷曲(图 1C); 添加 0.1 mg/L TDZ 和 0.5 mg/L 2,4-D 的 E<sub>14</sub> 处理培养基上幼苗的开花状态为花梗短且花朵呈闭合状态直至凋谢(图 1D)。

表 10 不同激素浓度对蒙自兰试管开花的影响  
Tab. 10 Effects of different hormone concentration on *in vitro* flowering of *M. foliosa*

处理 Treatment	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	TDZ /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	2,4-D /(mg·L <sup>-1</sup> )	PP <sub>333</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	花芽分化率 Flower bud differentiation rate/%	正常开花率 Normal flowering rate/%
E <sub>1</sub>	1.0		0.2		1.0	20.00±8.94 <sup>cde</sup>	60.00±24.49 <sup>ab</sup>
E <sub>2</sub>	1.0		0.5		1.0	132.00±4.90 <sup>a</sup>	84.29±6.97 <sup>a</sup>
E <sub>3</sub>	2.0		0.2		1.0	40.00±10.95 <sup>bcd</sup>	70.00±20.00 <sup>ab</sup>
E <sub>4</sub>	2.0		0.5		1.0	32.00±10.20 <sup>bcd</sup>	63.33±18.56 <sup>ab</sup>
E <sub>5</sub>	1.0			0.2	1.0	8.00±4.90 <sup>de</sup>	0 <sup>c</sup>
E <sub>6</sub>	1.0			0.5	1.0	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>
E <sub>7</sub>	2.0			0.2	1.0	8.00±4.90 <sup>de</sup>	20.00±20.00 <sup>bc</sup>
E <sub>8</sub>	2.0			0.5	1.0	4.00±4.00 <sup>de</sup>	20.00±20.00 <sup>bc</sup>
E <sub>9</sub>		0.1	0.2		1.0	4.00±4.00 <sup>de</sup>	20.00±20.00 <sup>bc</sup>
E <sub>10</sub>		0.1	0.5		1.0	4.00±4.00 <sup>de</sup>	20.00±20.00 <sup>bc</sup>
E <sub>11</sub>		0.5	0.2		1.0	64.00±4.00 <sup>b</sup>	80.00±8.16 <sup>a</sup>
E <sub>12</sub>		0.5	0.5		1.0	12.00±4.90 <sup>de</sup>	20.00±20.00 <sup>bc</sup>
E <sub>13</sub>		0.1		0.2	1.0	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>
E <sub>14</sub>		0.1		0.5	1.0	8.00±8.00 <sup>de</sup>	20.00±20.00 <sup>bc</sup>
E <sub>15</sub>		0.5		0.2	1.0	8.00±4.90 <sup>de</sup>	40.00±24.50 <sup>abc</sup>
E <sub>16</sub>		0.5		0.5	1.0	52.00±17.44 <sup>bc</sup>	52.00±22.45 <sup>abc</sup>
CK	1.0		0.2			0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



A: 一梗多花; B: 正常开花; C~D: 花朵畸形; E: 105 d 种子; F: 115 d 种子。

A: A stalk with several flowers; B: Normal flower; C~D: Flowers malformation; E: Seeds of 105 days; F: Seeds of 115 days.

图 1 蒙自兰种子及试管开花状态

Fig. 1 Seeds and *in vitro* flowering of *M. foliosa*

### 3 讨论

蒙自兰在野生状态和人工栽培条件下生长缓慢, 利用无菌种子培养可有效解决分株繁殖系数低、繁殖周期长的问题。本研究表明, 在 1/2MS 培养基上, 蒙自兰从种子萌发到壮苗的各阶段均能较好生长, 生长调节剂对生长各阶段起到的促进或抑制作用各有差异。

种子成熟度对种子萌发有着重要影响<sup>[14]</sup>。通过解剖镜观察种子发现, 蒙自兰 105 d 的种子胚圆润饱满(图 1E), 而 115 d 的种子胚缩小、种皮变厚(图 1F)。用 TTC 溶液对种子进行染色发现, 85、95、105 d 的种子很快被染色, 而 115 d 的种子只有少数种子被染色, 且染色所需时间较长。因此, 115 d 的种子萌发率低可能与种子活性低、胚龄长或种皮变厚有关。蒋雅婷等<sup>[15]</sup>研究发现, 无距虾脊兰种子胚龄为 120 d 时萌发率最高, 随后逐渐降低, 到 210 d 时, 萌发率降为 0。蒙自兰野外植株数量少, 组培苗养护难度高且开花难, 目前能得到的果荚数量有限, 因此尚未观察到其果荚自然开裂的时间和状态。种子在 115 d 以后

的萌发率是否会降到 0 以及果荚自然开裂的时间后续还需进一步试验加以验证。1/2MS 培养基的种子萌发率均较高, 说明低盐分培养基有利于蒙自兰种子萌发, 这与漆子钰<sup>[3]</sup>对春兰种子的萌发研究结果一致。NAA 和 6-BA 的不同浓度组合也影响种子萌发, 1/2MS+0.6 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA 的培养基萌发率最高为 97.00%, 而 105 d 的种子在 1/2MS+0.5 mg/L NAA 培养基中的萌发率为 87.00%, 在 NAA 浓度接近的情况下, 其萌发率相对较低的原因可能是未添加 6-BA。可见, 培养基配方对蒙自兰种子萌发起着关键作用。

蒙自兰种子萌发后原球茎会快速进入叶分化阶段, 在分化之前可以通过添加生长调节剂对原球茎进行增殖处理, 但增殖出的愈伤组织未能分化成苗, 可能增殖出的愈伤为非胚性愈伤组织。而对已分化出叶片的幼苗进行丛芽增殖发现均为有效增殖, 且丛芽健壮, 未发现徒长、弱化或玻璃化现象。在植物组织培养中, 细胞分裂素可刺激细胞分裂, 促进芽分化和生长<sup>[3]</sup>。不同品种兰科植物所需的生长调节剂种类、组合和浓度也不

同。蒙自兰丛芽增殖试验结果表明, 2.0 mg/L 6-BA 对丛芽增殖效果最佳, 这与滇金石斛<sup>[13]</sup>、血叶兰<sup>[16]</sup>丛芽增殖所需的分裂素一致, 但浓度不同, 且滇金石斛还需添加 NAA, 血叶兰还需添加 NAA 和 TDZ。而杜鹃兰丛芽增殖需要 2.0 mg/L TDZ 和 0.2 mg/L IAA<sup>[17]</sup>, 与蒙自兰不同。生长素 NAA 能促进试管苗生长、生根和壮苗。除生长调节剂外, 一些天然营养物质, 如椰青、香蕉、土豆、苹果、酵母浸出物等, 对某些植物器官组织有一定的促进生长作用。椰青、香蕉和土豆被广泛应用于兰科植物的组织培养。1.0 mg/L NAA 和 30 g/L 土豆为蒙自兰幼苗生根壮苗的最优组合, 这与三褶虾脊兰<sup>[18]</sup>幼苗生长所需的添加物和生长调节剂种类一致, 三褶虾脊兰需要 100 g/L 土豆泥和 0.1 mg/L NAA。

蒙自兰试管开花试验发现, 生长调节剂和营养物质对幼苗开花均有一定促进作用。部分开花植株矮小, 且球茎大、叶片宽, 可能是 PP<sub>333</sub> 抑制植株茎的生长, 刺激其提前开花的原因。这与李杰等<sup>[19]</sup>在霍山石斛花芽诱导试验中 TDZ 与 PP<sub>333</sub> 组合处理的畸形花比率高的结果一致。蒙自兰幼苗在 90 d 内陆续开花, 这与梳唇石斛<sup>[7]</sup>试管开花状态一致, 但梳唇石斛开花可持续半年以上。蒙自兰单朵花期在 7~10 d 左右, 90 d 后花芽分化结束, 这可能与培养基中营养成分的消耗有关。本研究结果显示, 蒙自兰试管开花的最佳培养基为 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L PP<sub>333</sub>+30 g/L 香蕉。6-BA 与 NAA 组合处理的诱导效果最佳, 这与梳唇石斛<sup>[7]</sup>的开花诱导结果一致。霍山石斛<sup>[19]</sup>在花芽诱导培养基中也添加了香蕉匀浆物。但蒙自兰开花时间不统一, 个别植株从播种到开花仅需 145 d。兰科植物开花受多种因素的影响, 除培养基成分外, 还受环境因子的调控, 如温度、光照强度、光照时长等<sup>[20]</sup>。本研究取得蒙自兰试管开花的初步结果, 但如何提高试管开花率和花朵品质, 以及诱导开花的机理仍有待进一步探索。

## 参考文献

- [1] HUANG W C, LIU Z J, JIANG K, LUO Y B, JIN X H, ZHANG Z, XU R H, MUCHUKU J K, MUSUNGWA S S, YUKAWA T. Phylogenetic analysis and character evolution of tribe Arethuseae (Orchidaceae) reveal a new genus *Mengzia*[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2022, 167: 107362.
- [2] 覃海宁, 杨永, 董仕勇, 何强, 贾渝, 赵莉娜, 于胜祥, 刘慧圆, 刘博, 严岳鸿, 向建英, 夏念和, 彭华, 李振宇, 张志翔, 何兴金, 尹林克, 林余霖, 刘全儒, 侯元同, 刘演, 刘启新, 曹伟, 李建强, 陈世龙, 金效华, 高天刚, 陈文俐, 马海英, 耿玉英, 金孝锋, 常朝阳, 蒋宏, 蔡蕾, 臧春鑫, 武建勇, 叶建飞, 赖阳均, 刘冰, 林秦文, 薛纳新. 中国高等植物受威胁物种名录[J]. *生物多样性*, 2017, 25(7): 696-744.  
QIN H N, YANG Y, DONG S Y, HE Q, JIA Y, ZHAO L N, YU S X, LIU H Y, LIU B, YAN Y H, XIANG J Y, XIA N H, PENG H, LI Z Y, ZHANG X, HE X J, YIN L K, LIN Y L, LIU Q R, HOU Y T, LIU Y, LIU Q X, CAO W, LI J Q, CHEN S L, JIN X H, GAO T G, CHEN W L, MA H Y, GENG Y Y, JIN X F, CHANG C Y, JIANG H, CAI L, ZANG C X, WU J Y, YE J F, LAI Y J, LIU B, LIN Q W, XUE N X. List of threatened species of higher plants in China[J]. *Biodiversity Science*, 2017, 25(7): 696-744. (in Chinese)
- [3] 漆子钰. 春兰(*Cymbidium goeringii*)组培快繁及其试管开花影响因素研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2017.  
QI Z Y. Rapid micro-propagation and *in vitro* flowering influence of *Cymbidium goeringii*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017. (in Chinese)
- [4] 王熊, 张菊野, 连宏坤, 龚颂福, 金于荣. 素心建兰无性繁殖系的建立及其开花[J]. *园艺学报*, 1988, 15(3): 205-208.  
WANG X, ZHANG J Y, LIAN H K, GONG S F, JIN Y R. Studies on *Cymbidium ensifolium* Susin clonal propagation and floral bud differentiation by means of tissue culture[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1988, 15(3): 205-208. (in Chinese)
- [5] 朱国兵, 杨柏云, 敖爱艳. 寒兰的组织培养与试管开花[J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(3): 513-514.  
ZHU G B, YANG B Y, AO A Y. Tissue culture and *in vitro* flowering of *Cymbidium kanran* Makino[J]. *Plant Physiology Communications*, 2008, 44(3): 513-514. (in Chinese)
- [6] 王光远, 许智宏, 蔡德发, 蔡南海. 铁皮石斛的离体开花[J]. *中国科学(C辑)*, 1997, 27(3): 229-234.  
WANG G Y, XU Z H, CAI D F, CAI N H. Flowering *in vitro* of *Dendrobium officinale*[J]. *Science in China (Series C)*, 1997, 27(3): 229-234. (in Chinese)
- [7] 赵大克, 李春芳, 程治英, 杨俊波. 梳唇石斛试管开花诱导和离体保存[J]. *亚热带植物科学*, 2012, 41(1): 48-50.  
ZHAO D K, LI C F, CHENG Z Y, YANG J B. *In vitro* flowering and conservation of *Dendrobium strongylanthum* Rchb.f[J]. *Journal of Subtropical Plant Science*, 2012, 41(1): 48-50. (in Chinese)
- [8] 李璐, 翁浩, 赖钟雄. 植物细胞和组织培养研究[M]. 北京:

- 中国科学技术出版社, 2009.
- LI L, WENG H, LAI Z X. Research on plant cell and tissue culture[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2009. (in Chinese)
- [9] YAGAME T, YAMATO M, MII M, IWASE A S. Developmental processes of achlorophyllous orchid, *Epipogium roseum*: from seed germination to flowering under symbiotic cultivation with mycorrhizal fungus[J]. Journal of Plant Research, 2007, 120: 229-236.
- [10] RANJAN D C, SUNGKUMLONG. Rapid multiplication and induction of early *in vitro* flowering in *Dendrobium primulinum* Lindl[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2009, 18(2): 241-244.
- [11] VAZ A P A, FIGUEIREDO-RIBEIRO R D C L, KERBAUY G B. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(5): 411-415.
- [12] 王丽, 解兰, 李义. 紫花三叉白芨快繁技术研究[J]. 亚热带植物科学, 2022, 51(3): 227-232.
- WANG L, XIE L, LI Y. Tissue culture system of purple three-pronged *Bletilla striata*[J]. Subtropical Plant Science, 2022, 51(3): 227-232. (in Chinese)
- [13] 熊文哲, 黄清俊. 滇金石斛组织培养和再生体系的建立[J]. 植物生理学报, 2022, 58(8): 1537-1542.
- XIONG W X, HUANG Q J. Tissue culture and establishment of regeneration of *Flickingeria albopurpurea*[J]. Plant Physiology Journal, 2022, 58(8): 1537-1542. (in Chinese)
- [14] 曾宋君, 郭贝怡, 孔鑫平, 房林, 李琳, 陈砚, 符稳群, 吴坤林. 兜兰离体快繁技术研究进展[J]. 热带作物学报, 2020, 41(10): 2080-2089.
- ZENG S J, GUO B Y, KONG X P, FANG L, LI L, CHEN X, FU W Q, WU K L. Advances in propagation *in vitro* of *Paphiopedilum*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(10): 2080-2089. (in Chinese)
- [15] 蒋雅婷, 段国敏, 杜会聪, 田敏, 王彩霞, 张莹. 濒危植物无距虾脊兰种子无菌萌发与幼苗形成[J]. 林业科学研究, 2019, 32(2): 123-130.
- JIANG Y T, DUAN G M, DU H C, TIAN M, WANG C X, ZHANG Y. Seed aseptic germination and seedling formation of the endangered plant *Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang[J]. Forest Research, 2019, 32(2): 123-130. (in Chinese)
- [16] 朱桥, 丁俊伟, 杨学文, 梁廉, 邵玲. 血叶兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报, 2014, 50(6): 805-809.
- ZHU Q, DING J W, YANG X W, LIANG L, SHAO L. Tissue culture and rapid propagation of *Ludisia discolor*[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(6): 805-809. (in Chinese)
- [17] 刘思佳, 高燕燕, 杨宁线, 田莉, 彭思静, 张明生. 杜鹃兰丛生芽诱导发生的适宜条件[J]. 分子植物育种, 2021, 19(9): 3022-3028.
- LIU S J, GAO Y Y, YANG N X, TIAN L, PENG S J, ZHANG M S. Appropriate condition for cluster buds induction of *Cremastra appendiculata*[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(9): 3022-3028. (in Chinese)
- [18] 罗远华, 黄敏玲, 叶秀仙, 林兵. 三褶虾脊兰无菌播种快繁技术研究[J]. 南方农业学报, 2011, 42(7): 708-711.
- LUO Y H, HUANG M L, YE X X, LIN B. A rapid micro propagation technology for *Calanthe triplicate* and generation of aseptic seedlings[J]. Journal of Southern Agriculture, 2011, 42(7): 708-711. (in Chinese)
- [19] 李杰, 章金辉, 朱根发, 王再花. 生长调节剂诱导霍山石斛试管开花研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(1): 127-131.
- LI J, ZHANG J H, ZHU G F, WANG Z H. Effect of growth regulators on flowering *in vitro* of *Dendrobium huoshanense*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(1): 127-131. (in Chinese)
- [20] 曾艳华, 龙蕾宇, 何荆洲, 李秀玲, 范继征, 卜朝阳. 春兰×‘寒香梅’试管开花诱导及其生理基础[J]. 亚热带植物科学, 2021, 50(4): 245-250.
- ZENG Y H, LONG Q Y, HE J Z, LI X L, FAN J Z, BU Z Y. *In vitro* flowering and basic physiological research of *Cymbidium goeringii* × *Cymbidium* ‘Han Xiang Mei’[J]. Subtropical Plant Science, 2021, 50(4): 245-250. (in Chinese)