



# 五唇兰的无菌播种和回归野外的研究

■ <sup>1</sup>陈骋, <sup>1</sup>黄澧博, <sup>1</sup>范晨锐, <sup>1</sup>伍家豪, <sup>1</sup>甄翔翱, <sup>2</sup>张玉婷\*

(1. 深圳中学高中部 深圳 518001)  
(2. 全国兰科植物种质资源保护中心 深圳 518114)

**摘要:** 五唇兰(*Doritis pulcherrima*)尽管是一个广布种, 但已被列为濒危物种。在中国的分布仅限于海南省西南部。为尽量减少外源激素对该物种遗传稳定性的影响, 本实验通过不添加外源激素的方法成功实现五唇兰的种子无菌繁殖, 平均萌发率最高可达91%。本实验对种质资源日益受到破坏的五唇兰回归野外具有重要意义。

**关键词:** 五唇兰; 组织培养; 无菌繁殖; 快繁

## The technology of *Doritis pulcherrima* asepsis sowing and re-introduction

<sup>1</sup> Cheng Chen <sup>1</sup> Libo Huang <sup>1</sup> Chenrui Fan <sup>1</sup> Jiahao Wu  
<sup>1</sup> Xiang'ao Zhen <sup>2</sup> Yuting Zhang \*

(1. Senior Department of Shenzhen Middle School Shenzhen 518001, China)  
(2. The National Orchid Conservation Center Shenzhen 518114, China)

**Abstract:** Although *Doritis pulcherrima* is distributed widely, it has been listed as the endangered species. and native distributed in the northwest of Hainan, China. In order to reduce the influence on heredity stability of seed germination, the experiment without adding hormone was adopted. As a result, *Doritis pulcherrima* by asepsis sowing was reproduced successfully. The average germination rate may reach 91%. It is of great significance for the re-introduction of *Doritis pulcherrima*.

**Key words:** *Doritis pulcherrima*; in vitro culture; asepsis sowing; rapid propagation

全世界所有野生兰科植物均被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》的保护范围, 占该公约应保护植物的90%以上, 对中国兰科植物的研究和保育是世界兰科植物研究和保育工作的重要组成部分, 保护策略的核心就是如何就地保护和迁地保育, 采取措施增加种群数量, 回归野外<sup>[1]</sup>。为此, 通过组织培养技术是一个有效的途径。由于兰科植物种子中没有胚乳, 在野生条件下的萌发率非常低<sup>[1]</sup>。已经有越来越多的人通过组培方法培养以更好地保护兰科植物种质资源<sup>[2]</sup>。为了尽快得到大量的兰科植物植株, 通常的做法是在组培中添加外源激素<sup>[3]</sup>。外源激素的添加无疑有助于组培苗的生长<sup>[4]</sup>, 但可能违背了尽量保持物种的原始遗传特性的种质资源保护的根本。本实验选择可以作为占有较大市场份额的蝴蝶兰的母本五唇兰的种子作为原材料进行不添加外源激素的无菌播种繁殖试验, 以探讨该物种的种质资源保护。

### 1材料

采集越南北部和海南省乐东县的五唇兰成熟植株各60株移植于深圳市的全国兰科植物种质资源保护中心, 待其开花后, 随机抽选正在开放的10朵花进行人工自花授粉, 在180d后即于2007年3月12日采其未开裂蒴果的种子进行人工培养。

### 2方法

#### 2.1生物学特性观察和驯化试验

分别将越南和海南的植株盆栽后(每一植株栽一盆)分成3组, 每组20株, 分别置于露天、遮挡雨水和水墙调温的玻璃温室下进行生物学观察, 比较在三种条件下的五唇兰的生长状况。

#### 2.2无菌播种

##### 2.2.1培养基选择与制备

选择对于兰科植物种子萌发相对普遍有效的种子萌发培养基:(1)1/2MS;(2)B5;(3)MS。根据种子萌发状况选择原球茎增殖和分化成苗培养基:

(4) B5大量元素+MS有机物+MS微量元素+MS铁盐;(5) B5大量元素+MS有机物+MS微量元素+MS铁盐+5%椰子乳+2.5%香蕉汁;(6) 1/2MS+1g/L蛋白胨;(7) 1/2MS+2%蔗糖+5%香蕉汁;(8) B5大量元素+MS有机物+MS微量元素+MS铁盐+366mg/L硫酸铵;(9) MS+5%椰子乳+2.5%香蕉汁;(10) 1/2MS+5%椰子乳+2.5%香蕉汁;(11) B5+10%椰子乳+5%番茄汁;(12) B5+10%椰子乳+200mg/L蛋白胨,(13) B5大量元素+MS有机物+MS微量元素+MS铁盐+10%椰子乳+200mg/L蛋白胨。以上培养基除了(7)添加的蔗糖为2%以外, 其余培养基均附加3%蔗糖, 0.8%琼脂固化, pH5.6~5.8。

##### 2.2.2消毒

用洗洁剂刷洗蒴果表面后用自来水冲洗干净, 用75%酒精浸泡消毒30s, 再用0.1%升汞溶液消毒6min, 用无菌水冲洗5次, 吸干表面水分。切开蒴果, 夹着蒴果一端将种子轻轻敲落到培养基上。

##### 2.2.3接种

在无菌操作台上先把解剖刀和镊子烧红, 放在高温消毒的不锈钢盘上冷却, 将消毒后的蒴果用解剖刀在不锈钢盘上切开, 用镊子夹着蒴果一端将种子轻轻敲落到培养基上, 每瓶培养基的种子数量不可太少。

##### 2.2.4培养与管理

从种子萌发到最后成苗的培养温度均为(25±2)℃光照条件则有区别, 种子萌发时放在两种光照条件下培养, 一种是在1000lx条件下培养, 另一种是黑暗培养直至萌发后转入1000lx光照条件下, 光照时间均为8h/d; 原球体增殖和诱导分化成苗时的光照强度为2000lx, 光照时间为12~14h/d。

##### 2.2.5出苗

待苗长到至少2cm高并有3片叶或以上的时候, 将瓶盖松开放在大棚中炼苗1周, 取出苗, 用水温与当时气温相当的水冲洗干净培养基, 放入0.1%高锰酸钾溶液中浸泡15min后, 用水冲洗多次, 放在阴凉处晾干。种植基质为椰棕粒:树皮:石粒=2:2:6的体积比例配

\*通讯作者 E-mail: conservation@sinicaorchid.org



成。种植前先将椰棕粒和树皮用水浸泡透，石粒用水冲洗干净后再混合。种植后1周内不浇水，置于阴凉通风处，并保证空气相对湿度在70%左右，3周后待长出新根或新叶时，可移入大棚进行常规的栽培管理。

### 2.3 回归野外试验

在自然条件下，将人工播种长出新根的幼苗固定于人工疏林的树干上和林下石灰岩上，观察其生长状况。

## 3 结果与分析

### 3.1 五唇兰的生物学特性和驯化

五唇兰(*Doritis pulcherrima*)分布于印度东北部、缅甸、老挝、柬埔寨、越南、泰国、马来西亚、印度尼西亚、中国。在中国的分布仅限于海南省崖县、乐东等地，生长在阴凉湿润，有散射光的山沟边的树下，常见于覆有土层的岩石上<sup>[5]</sup>。

五唇兰(*Doritis Pulcherrima*)为附生兰，具短茎，成熟植株在茎的基部可分蘖进行无性繁殖。分蘖的幼苗全株叶片淡紫色，长大后叶面绿色，叶背淡紫红色。经过营养生长后，可进行有性繁殖。有性繁殖时，花葶从茎基部叶腋抽出，花茎直立，高30~40 cm。总状花序着生10~20朵花。花期持续40~50天。果实纺锤形。

来自于越南和海南的五唇兰在露天、遮挡雨水和温室的条件下的生长状况没有很大区别，均可进行正常的无性和有性繁殖。(图1:A. B. C.)

### 3.2 种子萌发

开始在黑暗条件下培养，23d左右种子萌发，萌发后移至10001x光照条件下培养一个星期后数其萌发率(见表1)：(1)的为91%，(2)的为81%，(3)的为54%。在10001x光照条件下培养，萌发时间比在黑暗条件下的迟2周，同样在萌发后一个星期数其萌发率(见表3)：(1)的为68%，(2)的为64%，(3)的为50%。此外，先在黑暗下培养23d后再移至10001x光照下培养，萌发率高且快2周，原球体的体积也较大。实验结果表明，在两种培养条件下，三种培养基中，(1)的萌发率最高，(3)的最低；先在黑暗条件下培养的种子萌发率均比光照条件下的高，说明种子萌发要求黑暗条件。

### 3.3 原球茎增殖、分化

将原球茎和小芽的混合体转移至(4)~(13)培养基上，其中，在(7)中的原球茎有玻璃化现象，(4)、(8)中原球茎的增殖数量最明显，其余配方培养基中也有少量增殖；原球茎在(5)、(6)、(9)~(13)培养基中经过30d大多直接分化成小芽，再经过60d左右长成小苗，其中培养基(13)的苗较粗壮。实验结果表明，五唇兰的原球体增殖需要无机盐浓度相对较高的培养基，其余添加有机物的培养基适合诱导原球体分化成苗。

将小苗转移到培养基(5)、(6)、(10)、(11)、(13)培养基中进行壮苗培养。培养基(13)中的植株生长速度较慢，但是苗较矮壮；(6)的生长速度较快，但苗较纤长；(5)与(10)中植株生长健壮，根的数量较多，根相对较粗短。实验结果表明，苗的生长过程中需要提供较多的有机物。若在实际生产中，建议使用相对简单易行的(10)培养基。

### 3.4 人工播种苗的栽培

人工播种苗移入大棚进行常规栽培，其植株生长良好。(图1:D.)

### 3.5 回归野外

附着于树干和石灰岩的石面的人工播种苗，在自

然条件下的生长状况与采集于野外迁地驯化栽培植株的生长状况相同(图1:E. F.)。

## 4 讨论

五唇兰现在已因各种渠道流失到世界许多地方，表明五唇兰这一物种可以进行异地人工栽培。从迁地驯化试验结果可以看到，该物种在不同条件下均能生长，完全可以进行迁地保护，而繁殖的植株重返野外对生境有很好的适应。因此，我们认为，五唇兰进行迁地保护和繁殖后重返自然应该没有技术障碍，并且方法简单易行，成本低廉。只有通过人工规模繁殖，通过将繁殖的植株重返原产地种植，可以恢复五唇兰野生居群。当然，这些工作必须兼顾五唇兰的居群遗传

表1 五唇兰的不同光照下的萌发率(%)

Table 1 Germination rates of *Doritis pulcherrima* under Different light intensities

取样次数	光照条件下			黑暗条件再转光照条件		
	(1)1/2MS	(2)B5	(3)MS	(1)1/2MS	(2)B5	(3)MS
1	74.58	63.11	54.17	93.62	80.77	56.41
2	75.68	71.43	46.30	91.92	85.45	53.85
3	50.79	72.64	52.14	91.76	74.19	47.06
4	70.69	61.76	42.11	93.33	82.98	52.56
5	73.63	61.90	43.94	91.67	84.62	56.30
6	63.16	69.64	53.91	88.31	79.17	63.16
7	78.33	52.59	51.39	92.22	84.51	58.75
8	72.97	67.33	54.12	90.16	85.25	51.92
9	49.09	62.50	47.54	92.45	80.00	49.09
10	71.67	56.60	47.92	90.91	86.15	53.75
11	65.12	65.43	51.26	80.26	83.54	55.45
12	69.23	64.23	40.20	89.36	81.43	56.31
13	74.51	54.17	61.46	92.55	82.69	55.83
14	63.27	65.38	44.58	90.00	84.21	49.09
15	71.67	67.74	58.02	92.59	72.55	58.00
16	64.94	62.50	48.91	89.83	82.28	52.34
17	70.83	71.03	55.71	91.67	80.85	52.80
18	56.06	68.87	51.48	94.12	75.86	53.85
平均数	67.57	64.38	50.29	90.93	81.47	54.25

性，以保持这一物种的种质资源多样性。

由于五唇兰具有其他兰科植物的共同特征之一，即其特殊的种子结构使其野生条件下的种子萌发率非常低，所以对其种质资源的保护非常迫切而有意义。种质保护的关键是要保证遗传的稳定性，但在多数物种的组培中均会或多或少地出现变异。许多研究者认为，培养基中的外源激素导致组培材料细胞分裂异常<sup>[6]</sup>，是诱导体细胞无性系变异的重要原因之一<sup>[7]</sup>。为了尽量减少发生变异的可能性，保护五唇兰原有特性和遗传特征，本实验通过不添加外源激素的方法，成功对其进行无菌繁殖。实验结果表明种子萌发需要黑暗的条件，而且实验中未发现有表现型与母株不同的幼苗。对五唇兰无菌繁殖的初步实验有助于对其种质资源的保护和有效利用。

## 【参考文献】

- [1] 刘仲健, 刘可为, 陈利君, 等. 濒危物种杏黄兜兰的保育生态学. 生态学报, 2006, 9: 2791~2800.
- [2] 陈喜蓉, 陈显臻, 钟剑峰, 等. 五唇兰的组织培养和快繁技术研究. 热带林业, 2006, 2: 34~35.
- [3] 伍成厚, 叶秀森, 梁承邺. 五唇兰种子离体培养的研究. 广西植物, 2005, 2: 149~151.
- [4] 张菊野, 俞玲凤, 李文安. 五唇兰生物学特性及试管繁殖的研究. 生物学杂志, 1995, 1: 20~22.
- [5] 吉占和(主编), 1999. 中国植物志19. 北京: 科学出版社.
- [6] 崔德才, 徐培文, 李红双, 等. 植物组织培养与工厂化育苗. 北京: 化学工业出版社. 2003
- [7] 王玉英, 高新一. 植物组织培养技术手册. 北京: 金盾出版社. 2006





图1 五唇兰*Doritis Pulcherrima*: A. 迁地驯化栽培植株; B. 自然条件下的生长植株; C. 驯化植株的果实; D. 人工播种苗的生长状况; E-F. 回归野外植株的生长状况