



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113951144 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202111471692.4

(22) 申请日 2021.12.03

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113951144 A

(43) 申请公布日 2022.01.21

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所  
地址 650201 云南省昆明市盘龙区蓝黑路  
132号

(72) 发明人 杨颖婕 姚林伶 张石宝 黄家林

(74) 专利代理机构 昆明祥和知识产权代理有限公司 53114

专利代理师 马晓青

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105165629 A, 2015.12.23

CN 101720672 A, 2010.06.09

黄家林等. 黄花杓兰种子无菌萌发的培养条件研究.《云南植物研究》.2001, (第01期), 全文.

卢松茂等. 柑橘黑斑病菌生物学特性研究.《植物保护》.2012, (第05期), 全文.

朱泉等. 兰科植物种子的非共生萌发研究进展.《江苏农业科学》.2009, (第04期), 全文.

审查员 张婷

权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法

(57) 摘要

提供一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法。该方法包括果荚采集与消毒、种子萌发、原球茎分化及生根等步骤。本发明通过优化培养基,在不同的发育阶段设计不同的培养基,建立了虎斑兜兰组培快繁体系,虎斑兜兰的种子萌发率可达80%,成苗率可达94%,移栽半年后成活率可达90.5%。采用该方法,能实现虎斑兜兰的大规模繁殖,对虎斑兜兰种质资源的保护及利用具有重要的意义。



1. 一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1) 果荚采集与消毒:选取虎斑兜兰成熟未开裂的果荚,冲洗后,用0.1%升汞溶液浸泡10~15 min,75%乙醇表面灭菌30 s,酒精灯略微灼烧果荚后,置于无菌纸上备用;

(2) 种子无菌萌发:在无菌纸上,将上述消过毒的果荚切开,均匀的撒于种子萌发培养基表面,种子在13~19天开始萌发,3~6周为种子萌发的高峰期,第7周完成萌发后,暗培养2~3个月,得到原球茎,所述的种子萌发培养基为:cHa+1 mg/L KT+0.1 g/L活性炭+ 100 mL/L椰乳+20 g/L蔗糖+6 g/L琼脂;

(3) 原球茎分化:将步骤(2)所得原球茎转入原球茎分化培养基中,转光培下,原球茎逐渐转绿,培养3~4个月,得到带1~2片叶的小苗,所述的原球茎分化培养基为:1/4 MS+2mg/L KT+0.3 g/L活性炭+50~100 mL/L椰乳+20 g/L蔗糖+6 g/L琼脂;

(4) 幼苗继代:将步骤(3)所得带1~2片叶的小苗转入小苗继代培养基中,培养3~4个月,得到带有2~3片叶的小苗,所述的小苗继代培养基为:1/2 MS+0.5~1.5 g/L活性炭+100 mL/L椰乳+20 g/L蔗糖+6 g/L琼脂;

(5) 生根壮苗:将步骤(4)所得带2~3片叶的小苗转入生根壮苗培养基中,培养4~6个月,得到带4~5片叶、5~7条根、高4~6cm的幼苗;所述的生根壮苗培养基为:1/2 MS + 15 g/L土豆 + 30 g/L香蕉 + 1.0 g/L活性炭 + 0.5 g/L白云石粉+20 g/L蔗糖+6 g/L琼脂;

(6) 幼苗的移栽:将步骤(5)所得幼苗至于温室条件下炼苗2周,然后将植株从瓶中取出,洗净幼苗根部附着的培养基,将其移入碎树皮基质中培养。

2. 根据权利要求1所述的一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其特征在于,步骤(1)中虎斑兜兰果荚冲洗采用肥皂水刷洗、自来水冲洗。

3. 根据权利要求1所述的一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其特征在于,步骤(2)中所述的种子萌发在完全黑暗条件下培养。

4. 根据权利要求1所述的一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其特征在于,步骤(3)、(4)、(5)均在温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照12h/d,光照1600~2000Lx条件下培养,步骤(6)环境温度18~24 $^{\circ}\text{C}$ ,空气相对湿度50~70%,遮光75~80%。

5. 根据权利要求1所述的一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其特征在于,步骤(2)、(3)、(4)、(5)所述种子萌发培养基、原球茎分化培养基、幼苗继代培养基、生根壮苗培养基PH均在5.6~5.8之间。

6. 一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

(1) 果荚采集与消毒:选取虎斑兜兰成熟未开裂的果荚,果荚经肥皂水刷洗、自来水冲洗后,于超净工作台上用0.1%升汞溶液浸泡10~15 min,75%乙醇表面灭菌30 s,酒精灯略微灼烧果荚后,置于无菌纸上备用;

(2) 种子无菌萌发阶段:在无菌纸上,用手术刀将上述消过毒的果荚切开,均匀的撒于种子萌发培养基表面,种子在13~19天启动萌发,3~6周为种子萌发的高峰期,第7周完成萌发;种子萌发在完全黑暗条件下培养,暗培养2~3个月后,得到白色、健康的原球茎,有效萌发率达82%;所述的种子萌发培养基为:cHa+1 mg/L KT+0.1 g/L活性炭+ 100 mL/L椰乳+20 g/L蔗糖+6 g/L琼脂,PH在5.6~5.8之间;

(3) 原球茎分化阶段:将上述原球茎转入原球茎分化培养基中,转光培后下,原球茎逐渐转绿,培养3~4个月,得到带1~2片叶的小苗,分化率达94%;所述原球茎分化培养基为:1/4

MS+2mg/L KT+0.3 g/L活性炭+50~100 mL/L椰乳+20 g/L蔗糖+6 g/L琼脂;在温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照12h/d,光照1600~2000Lx条件下培养,PH在5.6~5.8之间;

(4) 幼苗继代阶段:将上述带1~2片叶的小苗转入小苗继代培养基中,培养3~4个月,得到带有2~3片叶的小苗,所述小苗继代培养基为:1/2 MS+0.5~1.5 g/L活性炭+100 mL/L椰乳+20 g/L蔗糖+6 g/L琼脂;在温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照12h/d,光照1600~2000Lx条件下培养,PH在5.6~5.8之间;

(5) 生根壮苗阶段:将上述带2~3片叶的小苗转入生根壮苗培养基中,培养4~6个月,得到带4~5片叶、5~7条根、高约4 cm的幼苗,所述生根壮苗培养基为:1/2 MS + 15 g/L土豆 + 30 g/L香蕉 + 1.0 g/L活性炭 + 0.5 g/L白云石粉+20 g/L蔗糖+6 g/L琼脂;在温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照12h/d,光照1600~2000Lx条件下培养,PH在5.6~5.8之间;

(6) 幼苗的移栽:将上述幼苗置于温室条件下炼苗2周,环境温度 $18\sim 24^{\circ}\text{C}$ ,空气相对湿度50~70%,遮光75~80%,然后将植株从瓶中取出,洗净幼苗根部附着的培养基,将其移入碎树皮基质中培养,移栽半年后成活率达90.5%。

## 一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物生物技术领域,具体地,涉及兜兰快繁,更具体地,涉及一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法。

### 背景技术

[0002] 兜兰属(*Paphiopedilum*)植物是世界著名的观赏兰花,因其花的唇瓣特化为兜状又被称为拖鞋兰。目前,过度采集和生境丧失使得兜兰属的野生种群数量急剧减少,该属的全部物种均被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约(CITES)》附录I,受到最高等级的保护。种苗繁育技术的解决对种质资源的保护利用具有重要意义。由于缺少胚乳,兰科植物的种子在自然条件下萌发十分困难,通常需要共生真菌为其提供种子萌发所需的营养,自然萌发率不足5%。种子无菌萌发技术和无性克隆技术是兰花主要的种苗人工繁育方式,但兜兰属植物的无性克隆非常困难,目前虽在技术上取得了一些进展,但仍不能投入商业应用。种子无菌萌发技术已经在多种兜兰上取得成功,但是该技术的成苗率在种间的差异极大,有些物种的种子无菌萌发非常困难,如虎斑兜兰(*P. tigrinum*)。曾宋君等(2011)对多种兜兰进行无菌播种,除虎斑兜兰、秀丽兜兰(*P. venustum*)外均获得了试管苗,可见虎斑兜兰的种苗繁育之困难。虎斑兜兰是一个商业价值很高的稀有物种,种苗繁育技术的欠缺极大地限制了其规模化的生产栽培及向原生地的回归。攻克虎斑兜兰的种子无菌萌发和成苗技术,将对特色珍稀种质资源的保护及利用具有重要的意义。

### 发明内容

[0003] 本发明研发虎斑兜兰从种子无菌萌发、原球茎分化、幼苗继代、壮苗生根等各个阶段最佳的培养基配方,以提高虎斑兜兰的种子萌发率及成苗率,为虎斑兜兰的保护回归和大规模繁殖提供理论支持和技术支撑。

[0004] 针对现有技术中虎斑兜兰萌发率较低,成苗和生根困难的问题,本发明的目的在于提供一种虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗快繁的方法,大大提高了种子萌发率及成苗率。

[0005] 本发明的上述目的是通过以下技术方案加于实现的:

[0006] 一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,该方法包括以下步骤:

[0007] (1) 果荚采集与消毒:选取虎斑兜兰成熟未开裂的果荚,冲洗后,用0.1%升汞溶液浸泡10~15min,75%乙醇表面灭菌30s,酒精灯略微灼烧果荚后,置于无菌纸上备用;

[0008] (2) 种子无菌萌发:在无菌纸上,将上述消过毒的果荚切开,均匀的撒于种子萌发培养基表面,种子在13~19天启动萌发,3~6周为种子萌发的高峰期,第7周完成萌发,暗培养2~3个月后,得到白色、健康的原球茎;

[0009] (3) 原球茎分化:将步骤(2)所得原球茎转入原球茎分化培养基中,转光培后下,原球茎逐渐转绿,培养3~4个月,得到带1~2片叶的小苗;

[0010] (4) 幼苗继代:将步骤(3)所得带1~2片叶的小苗转入小苗继代培养基中,培养3~4个月,得到带有2~3片叶的小苗;

[0011] (5) 生根壮苗:将步骤(4)所得带2~3片叶的小苗转入生根壮苗培养基中,培养4~6个月,可得到带4~5片叶、5~7条根、高约4cm的幼苗;

[0012] (6) 幼苗的移栽:将步骤(5)所得幼苗至于温室条件下炼苗2周,然后将植株从瓶中取出,洗净幼苗根部附着的培养基,将其移入碎树皮基质中培养。

[0013] 根据一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其中步骤(1)中虎斑兜兰果荚冲洗采用肥皂水刷洗、自来水冲洗。

[0014] 根据一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其中步骤(2)中所述的种子萌发培养基为:改良Harvais+1mg/L KT+0.1g/L活性炭+100mL/L椰乳+20g/L蔗糖+6g/L琼脂。

[0015] 根据一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其中步骤(2)中所述的种子萌发在完全黑暗条件下培养。

[0016] 根据一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其中步骤(3)中所述的原球茎分化培养基为:1/4MS+2mg/L KT+0.3g/L活性炭+50~100mL/L椰乳+20g/L蔗糖+6g/L琼脂。

[0017] 根据一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其中步骤(4)中所述的小苗继代培养基为:1/2MS+0.5~1.5g/L活性炭+100mL/L椰乳+20g/L蔗糖+6g/L琼脂。

[0018] 根据一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其中步骤(5)中所述的生根壮苗培养基为:1/2MS+15g/L土豆+30g/L香蕉+1.0g/L活性炭+0.5g/L白云石粉+20g/L蔗糖+6g/L琼脂。

[0019] 根据一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其中步骤(3)、(4)、(5)均在温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光照12h/d,光照1600~2000Lx条件下培养,步骤(6)环境温度 $18\sim 24^{\circ}\text{C}$ ,空气相对湿度50~70%,遮光75~80%下进行。

[0020] 根据一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,其中步骤(2)、(3)、(4)、(5)所述种子萌发培养基、原球茎分化培养基、幼苗继代培养基、生根壮苗培养基PH均在5.6~5.8之间。

[0021] 一种促进虎斑兜兰种子无菌萌发及成苗的方法,该方法包括以下具体操作步骤:

[0022] (1) 果荚采集与消毒:选取虎斑兜兰成熟未开裂的果荚,果荚经肥皂水刷洗、自来水冲洗后,于超净工作台上用0.1%升汞溶液浸泡10~15min,75%乙醇表面灭菌30s,酒精灯略微灼烧果荚后,置于无菌纸上备用。

[0023] (2) 种子无菌萌发阶段:在无菌纸上,用手术刀将上述消过毒的果荚切开,均匀的撒于种子萌发培养基表面。种子在13~19天启动萌发,3~6周为种子萌发的高峰期,第7周左右完成萌发。暗培养2~3个月后,得到白色、健康的原球茎(图1),有效萌发率可达82%。所述的种子萌发培养基为:改良Harvais+1mg/LKT+0.1g/L活性炭+100mL/L椰乳+20g/L蔗糖+6g/L琼脂。

[0024] (3) 原球茎分化阶段:将上述原球茎转入原球茎分化培养基中,转光培后下,原球茎逐渐转绿,培养3~4个月,得到带1~2片叶的小苗(图2),分化率高达94%。所述原球茎分化培养基为:1/4MS+2mg/L KT+0.3g/L活性炭+50~100mL/L椰乳+20g/L蔗糖+6g/L琼脂。

[0025] (4) 幼苗继代阶段:将上述带1~2片叶的小苗转入小苗继代培养基中,培养3~4个月,得到带有2~3片叶的小苗(图3)。所述小苗继代培养基为:1/2MS+0.5~1.5g/L活性炭+

100mL/L椰乳+20g/L蔗糖+6g/L琼脂。

[0026] (5) 生根壮苗阶段:将上述带2~3片叶的小苗转入生根壮苗培养基中,培养4~6个月,可得到带4~5片叶、5~7条根、高约4cm的幼苗。所述生根壮苗培养基为:1/2MS+15g/L土豆+30g/L香蕉+1.0g/L活性炭+0.5g/L白云石粉+20g/L蔗糖+6g/L琼脂。

[0027] (6) 幼苗的移栽:将上述幼苗至于温室条件(环境温度18~24℃,空气相对湿度50~70%,遮光75~80%)下炼苗2周,然后将植株从瓶中取出,洗净幼苗根部附着的培养基,将其移入碎树皮基质中培养。移栽半年后成活率可达90.5%。

[0028] 步骤(2)所述种子萌发在完全黑暗条件下培养,步骤(3)、(4)、(5)均在温度 $25 \pm 2$ ℃,光照12h/d,光照1600~2000Lx条件下培养,步骤(6)要求环境温度18~24℃,空气相对湿度50~70%,遮光75~80%。所述种子萌发培养基、原球茎分化培养基、幼苗继代培养基、生根壮苗培养基PH均在5.6~5.8之间。

[0029] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0030] 本发明在不同的发育阶段设计不同的培养基,建立了虎斑兜兰组培快繁体系,虎斑兜兰的种子萌发率可达80%,成苗率可达94%,移栽半年后成活率可达90.5%。采用该方法,可实现虎斑兜兰的大规模繁殖,对虎斑兜兰种质资源的保护及利用具有重要的意义。

## 附图说明

[0031] 图1为本发明的种子萌发培养情况示意图;

[0032] 图2为本发明的原球茎分化情况示意图;

[0033] 图3为本发明的幼苗继代培养示意图;

[0034] 图4为本发明壮苗生根培养示意图;

[0035] 图5为本发明的移栽成活情况示意图。

## 具体实施方式

[0036] 下面结合附图,通过本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此来限定本发明。

[0037] 实施例1

[0038] 1. 果荚表面灭菌:用肥皂水刷洗虎斑兜兰(*P. tigrinum*)果荚三遍,自来水冲洗干净后,在超净工作台上用0.1%升汞溶液浸泡10~15min,75%乙醇表面灭菌30s,酒精灯略微灼烧果荚后,放于无菌纸上备用。

[0039] 2. 种子萌发:用手术刀将上述步骤(1)消过毒的果荚切开,将种子播种于已经预先灭菌的50mL三角瓶内,每瓶含20~30mL培养基(在高压蒸汽灭菌锅内121℃灭菌15min)。培养基成分为:以cHa为基本培养基,添加1.0mg/L KT、100mL/L椰汁。设置活性炭浓度分别为0.1、0.5、1.0、2.0g/L,以不添加活性炭的处理为对照。

[0040] 每个处理接种3~5瓶,每瓶约100粒种子。在黑暗培养下培育。在播种后90d统计每种培养基中的种子萌发率,同时统计萌发完成时的褐变率。本研究将胚膨大视为种子萌发,萌发后、叶/根形成前的个体称为原球茎。

[0041] 总萌发率(%) = 所有萌发的种子数/每瓶中播种的种子数

[0042] 褐变率(%) = 玻璃化及褐变的原球茎数/萌发形成的原球茎数

[0043] 有效萌发率(%) = 健康的原球茎数/每瓶中播种的种子数

[0044] 结果显示(表1),随着活性炭浓度的增加,虎斑兜兰的总萌发率呈现先升高后降低的趋势,褐变率则逐步增加。添加0.1g/L活性炭的培养基上有效萌发率最高,达88.10±2.38%,原球茎生长也较健康。

[0045] 表1活性炭对虎斑兜兰种子萌发的影响

	活性炭浓度 (g/L)	启动萌发时 间(d)	总萌发率(%)	褐变率(%)	有效萌发率(%)
	0	16	82.51 ± 3.94ab	0d	82.51 ± 3.93ab
[0046]	0.1	16	88.89 ± 3.18ab	0.86 ± 0.86d	88.10 ± 2.38a
	0.5	19	94.03 ± 0.03a	24.68 ± 7.56c	69.14 ± 7.14b
	1.0	19	83.90 ± 0.17ab	55.07 ± 3.33b	37.64 ± 2.02c
	2.0	19	80.07 ± 3.73b	82.02 ± 2.02a	14.32 ± 0.94d

[0047] 注:基本培养基为cHa+1.0mg/L KT+100mL/L椰汁。数据均为平均值±标准误(n=3~5)。同列的不同字母表示差异显著(P<0.05)。

[0048] 3. 原球茎分化:将上述步骤(2)获得的原球茎暗培养90d后转到以下培养基中:以1/4MS为基本培养基,添加不同浓度的KT(0.5、1.0、2.0、4.0mg/L)和TDZ(0.1、0.5、1.0、2.0、4.0mg/L),培养基中均添加50mL/L椰汁+0.3g/L活性炭。90d后统计分化率。所有培养基中均添加20g/L蔗糖和6g/L琼脂,pH均调为5.8。培养温度均为25±2℃。除特殊光照要求外,光照时间均为12h/d,光照强度1600~2000Lx。使用50mL三角瓶。在Excel中进行数据的整理,在SPSS 20中进行差异显著性分析。结果显示(表2),在1/4MS+2.0mg/L KT+50mL/L椰汁+0.3g/L活性炭的培养基中,虎斑兜兰的分化率最高,达94%,生根率达66%,平均每株苗可分化出2片叶,幼苗的生长发育也十分健康。

[0049] 表2TDZ和KT对虎斑兜兰原球茎分化的影响

	TDZ (mg/L)	KT (mg/L)	分化率(%)	生根率(%)	平均叶片数
			91.67 ± 3.19a	60.00 ± 2.36ab	2.05 ± 0.06a
	0.1		75.56 ± 4.84b	41.11 ± 4.84cde	1.92 ± 0.16a
	0.5		75.83 ± 7.38b	43.33 ± 6.38cd	2.02 ± 0.06a
	1.0		87.78 ± 5.88ab	35.56 ± 1.11de	1.42 ± 0.11b
[0050]	2.0		88.33 ± 4.41ab	29.17 ± 4.17e	1.50 ± 0.13b
	4.0		91.67 ± 2.89a	12.50 ± 25f	1.30 ± 0.06b
		0.5	85.56 ± 1.11ab	12.22 ± 4.84f	1.85 ± 0.13a
		1.0	92.50 ± 0.83a	40.83 ± 4.38cde	2.15 ± 0.08a
		2.0	94.17 ± 2.50a	66.67 ± 4.91a	2.16 ± 0.06a
		4.0	92.50 ± 2.50a	51.67 ± 3.19bc	2.05 ± 0.06a

[0051] 注:培养基成分为1/4MS+0.3g/L活性炭+50mL/L椰汁。每个处理4瓶,每瓶30个原球茎。数据均为平均值±标准误(n=4)。同列的不同字母表示差异显著(P<0.05)。

[0052] 4. 幼苗继代:将上述步骤(3)获得的带有1~2片叶的虎斑兜兰幼苗转入以下培养

基中:以1/2MS为基本培养基,设置活性炭浓度为0、0.5、1.0、1.5g/L的四个梯度,以上培养基均添加1.0mg/L KT、100mL/L椰汁。

[0053] 每个处理10瓶,每瓶10株虎斑兜兰幼苗。120d后统计存活率、生根率及平均叶片数。

[0054] 存活率(%) = 每瓶存活的幼苗数/每瓶接入的幼苗总数

[0055] 生根率(%) = 每瓶生根的株数/每瓶接入的幼苗总数

[0056] 平均叶片数 = 每瓶的叶片数/每瓶存活的幼苗数。

[0057] 结果显示(表3),添加活性炭的培养基中,幼苗存活率、生根率、平均叶片数均明显提高。综合来看,添加0.5g/L活性炭的培养基效果最优,存活率达75%,生根率达66.25%,平均叶片数最多,幼苗生长表现也较好。

[0058] 表3活性炭在虎斑兜兰幼苗继代中的影响

	活性炭浓度(g/L)	存活率(%)	生根率(%)	平均叶片数(片)
	0	53.75 ± 8.85b	15.00 ± 2.67b	2.01 ± 0.14b
[0059]	0.5	75.00 ± 3.78a	66.25 ± 4.60a	2.72 ± 0.11a
	1.0	72.22 ± 4.34a	66.67 ± 4.41a	2.52 ± 0.12a
	1.5	77.50 ± 4.53a	61.25 ± 1.25a	2.58 ± 0.09a

[0060] 5. 生根壮苗:将上述步骤(4)获得的带有2~3片叶的虎斑兜兰幼苗转入生根培养基中。以1/2MS为基本培养基,添加不同浓度的激素和白云石粉,以上培养基均添加1.0g/L活性炭、15g/L土豆,30g/L香蕉。每个处理40株幼苗,120d后统计存活的幼苗数及每株幼苗的叶片数、最长叶长、根数、最长根长、最长根宽和株高。

[0061] 结果显示(表4),添加白云石粉的处理地上部分长势明显较好,叶片数、叶片长度和株高都显著高于不添加白云石粉的处理。综合来看,在添加0.5g/L白云石粉的培养基中,虎斑兜兰幼苗有最多的叶片数 $5.20 \pm 0.29$ ,最长叶长 $2.77 \pm 0.08$ ,平均根数( $6.15 \pm 0.42$ )和最长根长( $1.87 \pm 0.12$ )、株高( $3.91 \pm 0.10$ )等指标也处于上等水平。

[0062] 6. 幼苗移栽:将上述步骤(5)获得的生根幼苗至于温室条件(环境温度18~24℃,空气相对湿度50~70%,遮光75~80%)下炼苗2周,然后将植株从瓶中取出,洗净幼苗根部附着的培养基,将其移入碎树皮基质中培养。共计移栽幼苗200株,移栽半年后统计得成活幼苗181株,成活率达90.5%。

[0063] 本发明通过对培养基配方的优化,总结出了一套适合虎斑兜兰种子萌发、原球茎分化、幼苗继代及生根的技术方案,使虎斑兜兰的种子萌发率和幼苗成苗率得到显著提高,种子萌发率可达80%(自然萌发率仅5%),成苗率可达94%,移栽半年后成活率可达90.5%。本发明有助于实现虎斑兜兰的规模化繁殖,对虎斑兜兰种质资源的保护及利用具有重要的意义。



[0064]

表 4 激素和白云石粉对虎斑兜兰幼苗生长的影响

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	白云石 粉(g/L)	接种株 数(株)	存活数	存活率(%)	平均叶片数 (片)	最长叶长(cm)	平均根数(条)	最长根长 (cm)	最长根宽 (cm)	株高(cm)
			40	40	100.00	4.13 ± 0.23bc	2.15 ± 0.07b	7.48 ± 0.38a	1.74 ± 0.10a	0.12 ± 0.01b	3.15 ± 0.11bc
1.0	0.1		40	35	87.50	4.12 ± 0.27bc	1.42 ± 0.09d	6.97 ± 0.37a	1.23 ± 0.09bc	0.21 ± 0.01a	2.39 ± 0.12d
2.0	0.2		30	22	73.33	5.18 ± 0.41a	1.79 ± 0.14c	6.59 ± 0.52ab	1.07 ± 0.10cd	0.20 ± 0.03a	2.70 ± 0.16cd
3.0	0.3		30	8	26.67	3.22 ± 0.52c	1.22 ± 0.19d	4.00 ± 0.82d	0.70 ± 0.17d	0.21 ± 0.03a	1.80 ± 0.27e
4.0	0.4		40	0	0	-	-	-	-	-	-
		0.5	40	40	100.00	5.20 ± 0.29a	2.77 ± 0.08a	6.15 ± 0.42abc	1.87 ± 0.12a	0.10 ± 0.00b	3.91 ± 0.10a
		1.0	40	40	100.00	5.03 ± .26ab	2.76 ± 0.13a	5.28 ± 0.44bcd	1.99 ± 0.19a	0.10 ± 0.00b	3.94 ± 0.19a
		2.0	40	40	100.00	4.73 ± 0.26ab	2.44 ± 0.09ab	4.73 ± 0.33cd	1.65 ± 0.14ab	0.10 ± 0.00b	3.61 ± 0.13ab

注：培养基成分为 1/2 MS + 1.0 g/L 活性炭 + 15 g/L 土豆 + 30 g/L 香蕉。每处理 4 瓶，每瓶 10 株苗。数据均为平均值 ± 标准误(n = 8-40)。同列的

不同字母表示差异显著(P<0.05)。

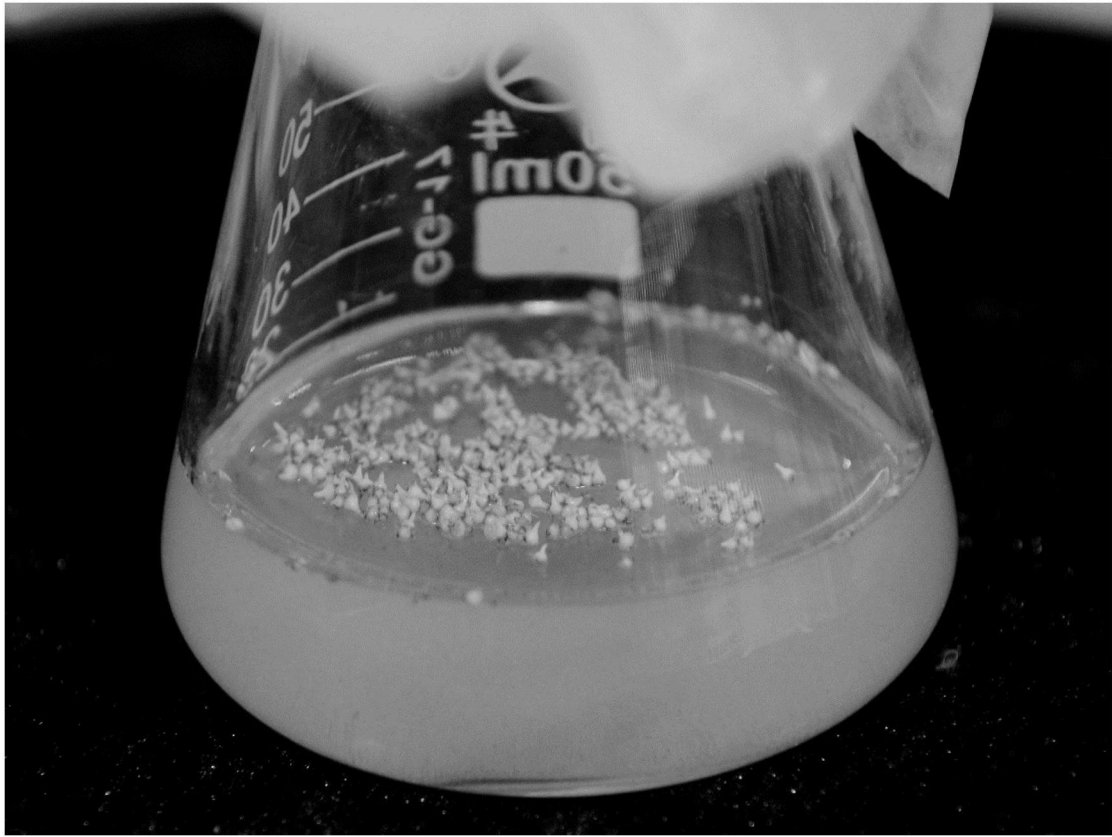


图1



图2



图3

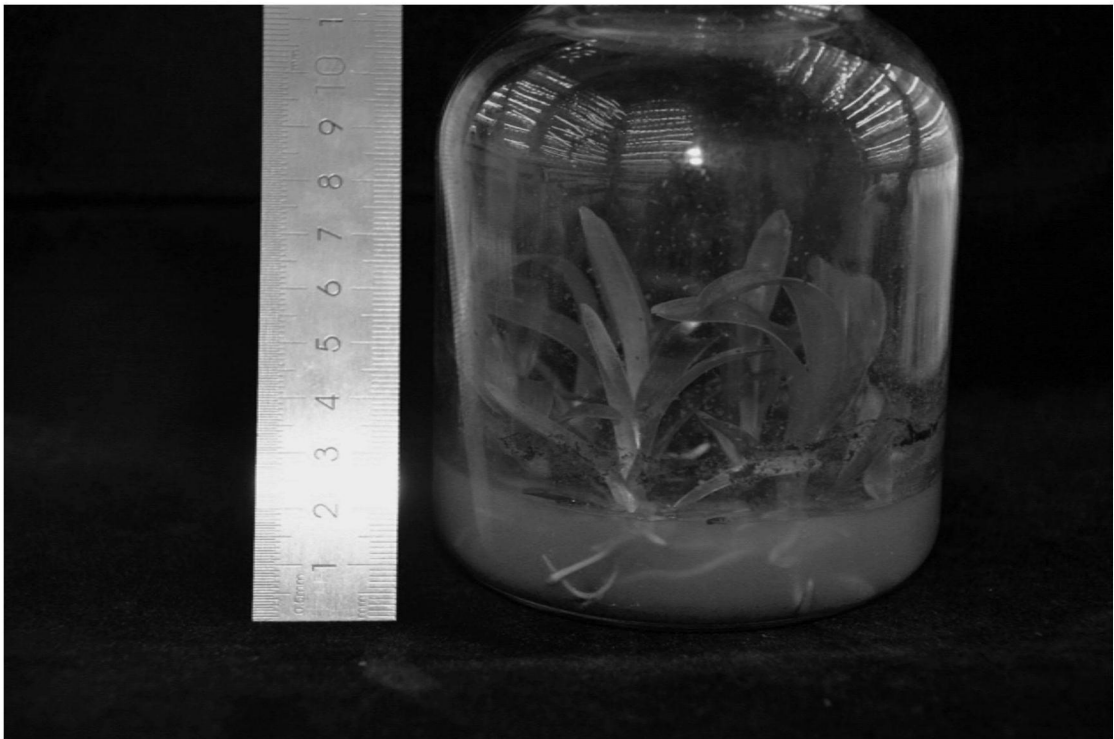


图4



图5