



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102630464 B

(45) 授权公告日 2013.04.24

(21) 申请号 201210118941.6

(22) 申请日 2012.04.23

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650204 云南省昆明市蓝黑路 132 号

(72) 发明人 严宁 张娟娟 胡虹

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108
代理人 马晓青

(51) Int. Cl.
A01G 1/00(2006.01)

(56) 对比文件
CN 101536629 A, 2009.09.23, 全文.
CN 1593107 A, 2005.03.16, 全文.
丁长春等. 影响杏黄兜兰种子萌发的因
素. 《云南植物研究》. 2004, 第 26 卷(第 6 期),
第 673-677 页.

陈之林等. 杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子试管
培养. 《园艺学报》. 2008, 第 31 卷(第 4 期), 第
540-542 页.

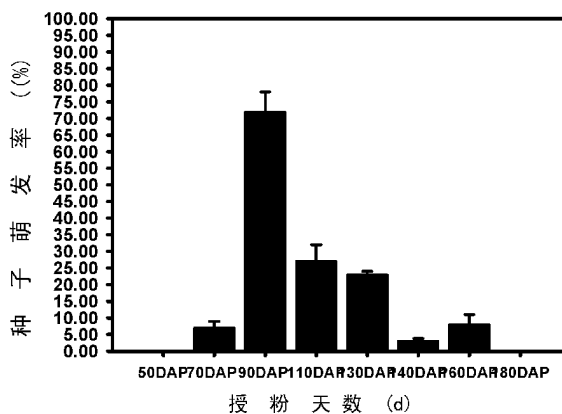
审查员 王晓光

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称
杏黄兜兰的繁殖方法

(57) 摘要

杏黄兜兰的繁殖方法, 先将杏黄兜兰成年植株定植, 在杏黄兜兰开花时进行人工授粉, 授粉时标记时间, 取授粉 90 天-110 天的杏黄兜兰蒴果种子进行播种. 近年, 杏黄兜兰的野外种群被过度采集, 受到严重破坏, 濒临灭绝, 需要通过人工繁育方法解决其保护及商业化开发的问题. 杏黄兜兰种子成熟后萌发较困难, 本发明利用种子形态特征观察及无菌萌发方法, 确定杏黄兜兰种子在授粉 90 天后, 种子胚细胞形态特征表现为椭圆形胚形成, 胚柄呈现出由 2-3 个直线排列的细胞组成的性状时, 其种子萌发率最高, 此方法可以确定杏黄兜兰种子最佳萌发时间, 为杏黄兜兰高效人工繁殖技术体系的建立奠定了技术基础.



1. 杏黄兜兰的繁殖方法,包括定植、授粉、确定种子最佳萌发时间并播种,所述定植是将杏黄兜兰成年植株定植,所述授粉是在杏黄兜兰开花时将其唇瓣去除,将位于雄蕊上的花粉粒取下,涂抹到雌蕊柱头上进行人工授粉,所述确定种子最佳萌发时间并播种是在杏黄兜兰授粉时标记时间,将授粉 50 天后的杏黄兜兰种子在显微镜下观察,确定出杏黄兜兰种子处于最佳萌发时间时进行播种,所述的杏黄兜兰种子的最佳萌发时间是当种子胚发育的形态学特征表现为原胚体积增大,几乎充满整个胚囊,形成椭球形胚,胚柄由呈直线型排列的 2-3 个细胞组成时也就是授粉后 90-110 天。

2. 如权利要求 1 所述的杏黄兜兰的繁殖方法,其特征在于所述定植是将杏黄兜兰成年植株定植于实验温室中,其栽培条件为日温 25℃,夜温 18℃,光照强度 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光照时间 12h,相对湿度为 60%,每 10 天浇一次水,同时每 30 天施以自配的含有氮、磷、钾 1:1:1 的营养液一次。

3. 如权利要求 1 所述的杏黄兜兰的繁殖方法,其特征在于所述确定杏黄兜兰种子最佳萌发时间是将授粉 50 天后的杏黄兜兰种子固定在改良的 FAA 固定液中,所述的改良 FAA 固定液其配方是 38% 的甲醛即福尔马林 5ml,冰醋酸 5ml,50% 的酒精 90ml,利用 GMA 混合液包埋聚合,通过切片,在显微镜下观察,当种子胚发育的形态学特征表现为原胚体积增大,几乎充满整个胚囊,形成椭球形胚,胚柄由呈直线型排列的 2-3 个细胞组成时为杏黄兜兰最佳萌发时间。

4. 如权利要求 1 所述的杏黄兜兰的繁殖方法,其特征在于所述定植是将杏黄兜兰成年植株定植于实验温室中,其栽培条件为日温 25℃,夜温 18℃,光照强度 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光照时间 12h,相对湿度为 60%,每 10 天浇一次水,同时每 30 天施以自配的含有氮、磷、钾 1:1:1 的营养液一次;所述确定杏黄兜兰种子最佳萌发时间并播种是将授粉 50 天后的杏黄兜兰种子固定在配方为 38% 的甲醛即福尔马林 5ml,冰醋酸 5ml,50% 的酒精 90ml 的改良的 FAA 固定液中,利用 GMA 混合液包埋聚合,通过切片,在显微镜下观察,当种子胚发育的形态学特征表现为原胚体积增大,几乎充满整个胚囊,形成椭球形胚,胚柄由呈直线型排列的 2-3 个细胞组成时也就是授粉后 90-110 天为杏黄兜兰最佳萌发时间时播种。

杏黄兜兰的繁殖方法

技术领域：

[0001] 本发明属于生物技术领域，具体地，涉及一种兜兰属 (*Paphiopedilum*) 杏黄兜兰 (*P. armeniacum* S. C. Chen et F. Y. Liu) 种子繁殖方法。

技术背景：

[0002] 兜兰属 (*Paphiopedilum*) 隶属于兰科杓兰亚科 (*Cypripedioideae*)，目前总共有 79 个野生种类记录在案，其中约 1/3 产自中国。就种类而言，中国是世界上兜兰属植物最为丰富的国家，总种类达到 27 种 (刘仲健等, 2009)。兜兰属的显著特征之一即为唇瓣特化成兜状或拖鞋状，故又称“拖鞋兰”或“仙履兰” (罗毅波等, 2005)。兰科兜兰属植物 (*Paphiopedilum*) 以花形奇特，花色艳丽而享誉世界，丰富的花色和盛长的花期而广受兰花爱好者及园艺学家的关注与喜爱，具有巨大的观赏价值和市场价值。

[0003] 杏黄兜兰 (*P. armeniacum* S. C. Chen et F. Y. Liu) 是产于我国的兜兰原生种之一，主要生长于云南西部，如碧江、泸水、保山等地海拔 1400-2100 米的石灰岩壁积土处或多石而排水良好的北坡上。是兜兰属中罕见的黄花种类，其花色纯黄，叶子具斑纹而被誉为“金兜”，是兜兰中最引人注目的种类之一，与硬叶兜兰 (*P. micranthum*) 并称为“金童玉女”，一直受到人们的广泛关注。80 年代杏黄兜兰在国际市场上的售价达到上百美元一株，到 1992 年为止，其已在美国兰展会上 70 多次夺得大奖，是兜兰中著名观赏种。鉴于此种情况，杏黄兜兰的野外种群被过度采集，受到严重破坏，再加上近年来生境破坏，其濒危程度加剧，因此利用人工繁育方法提高杏黄兜兰种苗繁殖率是解决杏黄兜兰保护及商业化开发的重要技术。

[0004] 目前对于杏黄兜兰常用的繁育方法是利用种子进行无菌萌发，从而获得实生苗。然而，杏黄兜兰的种子在成熟后萌发通常十分困难 (Arditti, 1982; Rasmussen, 1995)。现有技术未解决杏黄兜兰种子萌发最佳时期的技术问题，未提供一种杏黄兜兰高效人工繁殖的方法和技术体系。

发明内容：

[0005] 本发明旨在克服现有技术的上述问题，提供了一种杏黄兜兰种子繁殖的方法，利用形态解剖方法并结合种子无菌萌发技术，对杏黄兜兰种子发育过程进行观察，分析萌发率较高时的种子形态特征，依赖确定杏黄兜兰种子萌发率最高时的最佳时间，选择此期间的种子进行播种，从而克服种子萌发困难的技术难题，为建立杏黄兜兰高效人工繁殖技术体系提供了技术基础。

[0006] 本发明的上述目的是通过下述的技术方案加以实现的：

[0007] 杏黄兜兰的繁殖方法，包括定植、授粉、确定种子最佳萌发时间并播种，所述定植是将杏黄兜兰成年植株定植，所述授粉是在杏黄兜兰开花时将其唇瓣去除，将位于雄蕊上的花粉粒取下，涂抹到雌蕊柱头上进行人工授粉，所述确定种子最佳萌发时间并播种是在杏黄兜兰授粉时标记时间，将授粉 50 天后的杏黄兜兰种子在显微镜下观察，确定出杏黄兜

兰种子的最佳萌发时间时进行播种。

[0008] 上述的杏黄兜兰的繁殖方法,所述定植是将杏黄兜兰成年植株定植于实验温室中,其栽培条件为日温 25℃,夜温 18℃,光照强度 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光照时间 12h,相对湿度为 60%,每 10 天浇一次水,同时每 30 天施以自配的含有氮、磷、钾 1 : 1 : 1 的营养液一次。

[0009] 上述的杏黄兜兰的繁殖方法,所述确定杏黄兜兰种子最佳萌发时间是将授粉 50 天后的杏黄兜兰种子固定在改良的 FAA 固定液中,利用 GMA 混合液包埋聚合,通过切片,在显微镜下观察,当种子胚发育的形态学特征表现为原胚体积增大,几乎充满整个胚囊,形成椭球形胚,胚柄由呈直线型排列的 2-3 个细胞组成时为杏黄兜兰最佳萌发时间。

[0010] 上述的杏黄兜兰的繁殖方法,所述改良 FAA 固定液其配方是 38% 的甲醛即福尔马林 5ml,冰醋酸 5ml,50% 的酒精 90ml。

[0011] 具体地,杏黄兜兰的繁殖方法中,定植是将杏黄兜兰成年植株定植于实验温室中,其栽培条件为日温 25℃,夜温 18℃,光照强度 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光照时间 12h,相对湿度为 60%,每 10 天浇一次水,同时每 30 天施以自配的含有氮、磷、钾 1 : 1 : 1 的营养液一次;所述确定杏黄兜兰种子最佳萌发时间并播种是将授粉 50 天后的杏黄兜兰种子固定在配方为 38% 的甲醛即福尔马林 5ml,冰醋酸 5ml,50% 的酒精 90ml 的改良的 FAA 固定液中,利用 GMA 混合液包埋聚合,通过切片,在显微镜下观察,当种子胚发育的形态学特征表现为原胚体积增大,几乎充满整个胚囊,形成椭球形胚,胚柄由呈直线型排列的 2-3 个细胞组成时也就是授粉后 90-110 天为杏黄兜兰最佳萌发时间时播种。

附图说明:

[0012] 图 1 杏黄兜兰种子胚发育过程,图中 a :50DAP, b :70DAP, c :90DAP, d :110DAP, e :130DAP, f :140DAP, g :160DAP, h :180DAP ;em :胚细胞, fs :胚柄;

[0013] 图 2 杏黄兜兰授粉后天数与萌发率的关系。

具体实施方式:

[0014] 下面结合本发明的附图,通过本发明的具体实施例子进一步来说明本发明的实质性内容,但并不以此来限定本发明。

[0015] 实施例 1 :

[0016] 确定杏黄兜兰种子的最佳萌发时间的方法,杏黄兜兰的繁殖方法:

[0017] 1. 材料和方法

[0018] 1.1 研究材料

[0019] 杏黄兜兰 (*P. armeniacum* S. C. Chen et F. Y. Liu) :分布在云南西部,生于海拔 1400-2100 米的石灰岩壁积土处或多石而排水良好的草坡上。具细长而横走的地下根状茎,直径 2-3mm,5-7 枚叶,花纯黄色,花葶 15-28cm,唇瓣深囊状,近椭圆状球形或宽椭圆形,花期 2 ~ 4 月,果实成熟期为 8-9 月。其种植于中国科学院昆明植物所兰花温室内。温室内栽培条件为日温 25℃,夜温 18℃,光照强度 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光照时间 12h,相对湿度为 60%。每 10 天浇一次水,同时每 30 天施以自配的含有氮、磷、钾 (1 : 1 : 1) 的营养液一次。

[0020] 1.2 果荚采集

[0021] 2011年3月-5月期间,对开花的杏黄兜兰进行授粉,先将其唇瓣去除,用尖头镊子将位于雄蕊上的花粉粒取下,涂抹到雌蕊柱头上,分别于授粉后50天、70天、90天、110天、130天、140天、160天、180天,随机摘取果荚(每种2-3个)作为实验材料,且分别记为50DAP(授粉后的天数)、70DAP、90DAP、110DAP、130DAP、140DAP、160DAP、180DAP。

[0022] 1.3 胚发育过程的形态观察

[0023] 从杏黄兜兰授粉后各个时期的果荚中取部分种子,浸泡于改良的FAA固定液,其配方是38%的甲醛(福尔马林)5ml,冰醋酸5ml,50%的酒精90ml中24h以上,将种子按以下浓度顺序置于50%、70%、80%、90%酒精溶液中各浸泡30min,在100%的无水乙醇溶液中浸泡1h,之后再换一次无水乙醇,继续浸泡1h;之后在GMA(乙二醇甲基丙烯酸酯)混合液中浸透并包埋,该混合液含GMA90毫升,过氧化苯甲酰0.18克,PEG-400(聚乙二醇-400),置于60℃温箱中聚合10h。用LEICARM2126RT转轮式切片机切片,切片厚度为5μm。

[0024] 1.4 无菌播种

[0025] 用肥皂水刷洗果荚,其后用75%酒精溶液浸泡1分钟,无菌水冲洗3次,用0.1%升汞溶液处理8分钟后,无菌水冲洗5次,用灭菌手术刀将果荚小心地划开,将种子播种于基本培养基为改良的Harvais培养基(见表一)(黄家林等,2000),再加入2%的葡萄糖,5%的土豆提取物,0.8%的琼脂粉及1mg/L的激动素(KT)组成的播种培养基上,于25℃暗中培养。每个时期的果荚播种5瓶。播种80天后,从培养基上随机取出2个1cm×1cm的琼脂块,统计萌发率,用SPSS16.0软件(SPSS Inc., Chicago, USA)进行统计分析,并用sigmaplot10.0(Systat Software Inc., city, USA)软件作图。

[0026] 表一 改良 Harvais 培养基组成

[0027]

培养基组成成分	用量
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	400mg/L
KH_2PO_4	200mg/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200mg/L
KNO_3	200mg/L
KCl	100mg/L
柠檬酸铁铵	25mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.03mg/L
H_3BO_3	0.5mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5mg/L

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02mg/L
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025mg/L
KI	0.1mg/L
甘氨酸	2.0mg/L
谷氨酰胺	100mg/L
酪蛋白水解物	500mg/L
烟酸	10mg/L
泛酸钙	5mg/L
维生素 B1	5mg/L

[0028] 2. 结果与分析

[0029] 2.1 杏黄兜兰授粉天数与种子萌发率的关系（图 2）

[0030] 杏黄兜兰的种子在授粉 50 天后，不能萌发；在授粉 70 天后有少量种子（7%）萌发，到授粉 90 天时萌发率达到最高（72%）；授粉 110 天到 130 天时，种子萌发率下降到 27.0 ~ 23.0；此后萌发率一直下降，在 180DAP 时已经没有种子萌发。

[0031] 2.2 杏黄兜兰授粉天数与种子胚发育的关系：

[0032] 杏黄兜兰的绝大多数胚囊都在授粉后 50 天（50DAP）完成了受精作用，受精形成的合子呈狭长型，有明显的极性分化，细胞核位于合子的合点端（图 1:a）。在授粉 70 天（70DAP）后，合子通过多次分裂形成由较小的顶细胞和较大的基细胞共同组成的原胚，位于珠孔段的基细胞经过几次横分裂开始衍生出胚柄（图 1:b）；在授粉 90 天后（90DAP），随着细胞向各个方向的持续分裂，原胚体积不断增大，几乎充满整个胚囊，形成椭球形胚，此时胚柄由呈直线型排列的 2-3 个细胞（图 1:c）；授粉 110 天后（110DAP）椭球形胚已充满整个胚囊，胚柄成为由 5-6 个细胞组成的不规则排列（图 1:d）；授粉 130 天（130DAP）后，椭球形胚依旧充满整个胚囊，胚柄开始退化（图 1:e）；授粉 140 天后（140DAP）椭球形胚没有变化，但胚柄已退化成由 1 个细胞组成的小突起（图 1:f）。授粉 160 天后（160DAP）胚柄已经退化为残留痕迹（图 1:g）。授粉 180 天后（180DAP），胚柄已经完全消失，椭球形的胚已经有了简单的组织分化（图 1:h）。

[0033] 综上所述，杏黄兜兰种子萌发率最高的时间是授粉 90 天后，在授粉 90 天后，胚细胞的形态特征是原胚体积增大，几乎充满整个胚囊，形成椭球形胚，胚柄由呈直线型排列的 2-3 个细胞，可在显微镜下观察杏黄兜兰的胚发育情况，从而确定出杏黄兜兰种子萌发的最佳时间。

[0034] 3. 确定杏黄兜兰种子萌发的最佳时间，以及繁殖方法：

[0035] 将杏黄兜兰成年植株定植于实验温室中，其栽培条件为日温 25℃，夜温 18℃，光

照强度 $300 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 光照时间 12h, 相对湿度为 60%。每 10 天浇一次水, 同时每 30 天施以自配的含有氮、磷、钾 (1 : 1 : 1) 的营养液一次。在杏黄兜兰开花时进行人工授粉, 先将其唇瓣去除, 用尖头镊子将位于雄蕊上的花粉粒取下, 涂抹到雌蕊柱头上, 授粉时标记时间, 待授粉 90 天, 将杏黄兜兰蒴果取下, 取少量种子固定于改良的 FAA 固定液中, 其配方是 38% 的甲醛 (福尔马林) 5ml, 冰醋酸 5ml, 50% 的酒精 90ml, 利用 GMA 混合液包埋聚合, 通过轮转切片机切片, 在显微镜下观察, 其种子胚发育的形态学特征表现为原胚体积增大, 几乎充满整个胚囊, 形成椭球形胚, 胚柄由呈直线型排列的 2-3 个细胞组成时, 是杏黄兜兰种子无菌萌发的最适宜时机, 利用此时的种子进行播种, 获得较高的萌发率。

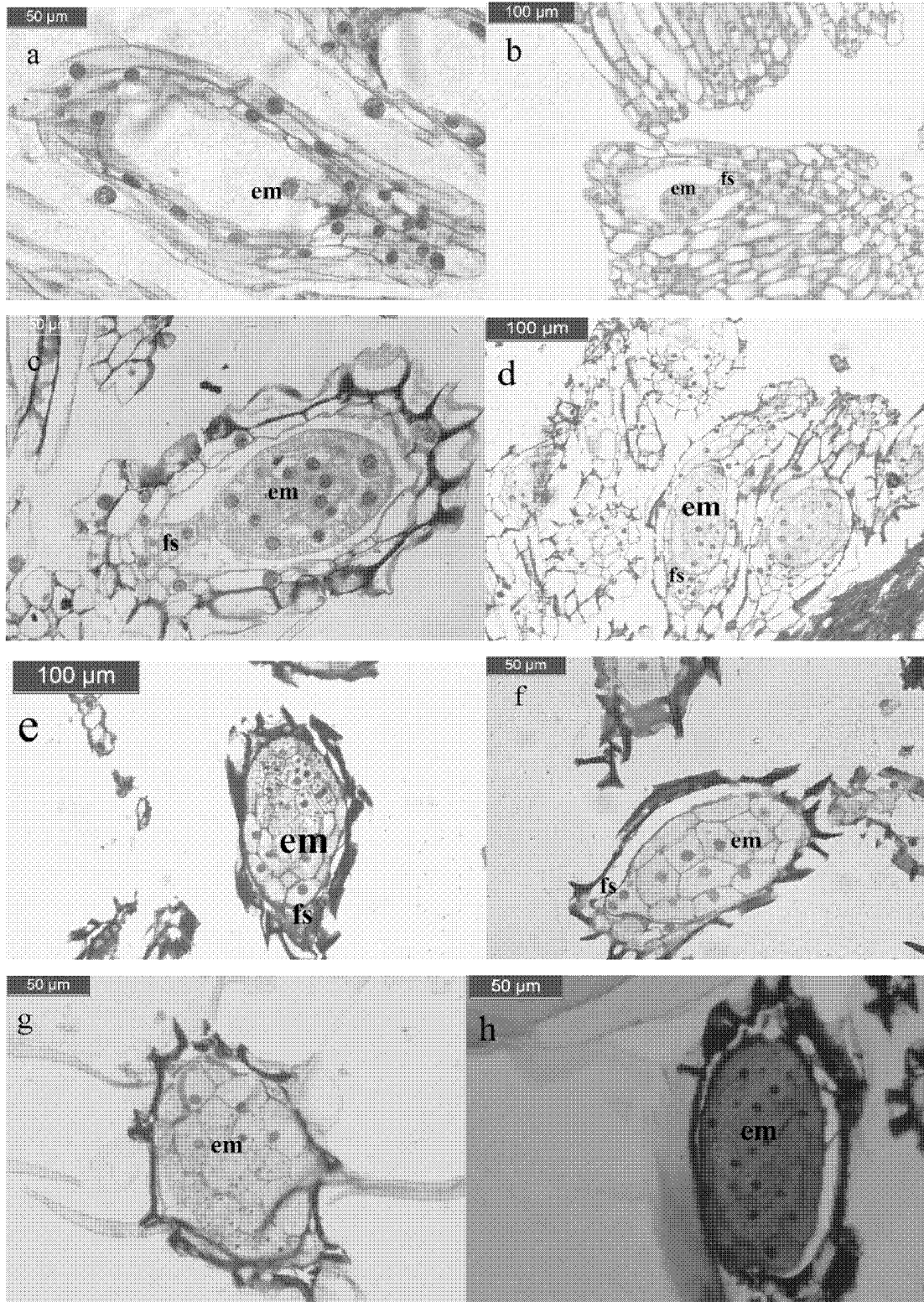


图 1

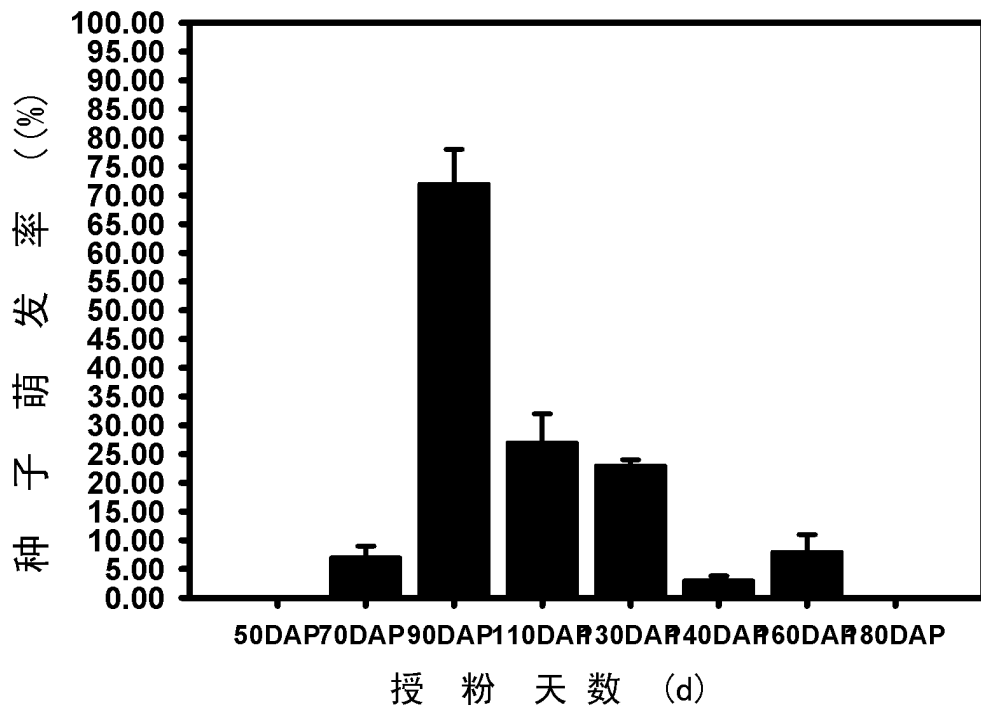


图 2