

# 金线兰种子萌发及其原球茎的增殖培养

邱 玥<sup>1,2</sup>, 龚 宁<sup>1,2\*</sup>, 张奎—<sup>1,2</sup>

( 1. 贵州师范大学 生命科学学院, 贵阳 550001; 2. 贵州省山地环境信息系统与生态环境重点实验室, 贵阳 550001 )

**摘要:** 研究了影响金线兰种子非共生萌发的因素, 并应用正交试验研究基本培养基、6-BA、ZT、NAA 四种因素对原球茎增殖的作用。结果表明: 授粉类型对金线兰种子非共生萌发影响较大, 异株异花、同株异花以及同株同花授粉所得的种子的萌发率分别为 78.53%、69.62%、39.87%; 蒴果成熟度以生长 150 d 为宜, 采收后萌发率可达 78.59%; 冷藏影响种子的活力, 种子的萌发率随冷藏时间的延长而降低; 使用次氯酸钠浸泡后的种子与对照相比, 其萌发率无明显差异; NAA 对原球茎增殖作用显著, 适宜于原球茎增殖的培养基为 1/2MS + ZT0.5mg/L + NAA1.0mg/L。

**关键词:** 金线兰; 种子萌发; 原球茎; 增殖

**中图分类号:** Q945.5    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-3142(2010)04-0555-05

## Seed germination and the protocorm multiplication of *Anoectochilus roxburghii*

QIU Yue<sup>1,2</sup>, GONG Ning<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Kui-Yi<sup>1,2</sup>

( 1. College of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;

2. Guizhou Provincial Key Laboratory for Mountain Environment, Guiyang 550001, China )

**Abstract:** Seed germination of *Anoectochilus roxburghii* in asymbiotic culture and the effects of four factors (culture medium, 6-BA, ZT and NAA) on protocorm multiplication through orthogonal design were studied. The results showed that pollination type was an important factor on *A. roxburghii* seeds' non-symbiotic germination, germination ratio of the xenogamy seeds reached 78.53%, and the germination ratio of the geitonogamy seeds reached 69.62%, while the germination ratio of self-pollination was only 39.87%. The most suitable maturity of capsule appeared when it grew for 150 days, the germination rate of such seeds could reach 78.59%. The vitality of the seeds were affected by refrigerated storage; the germination rate of the seeds was decreased with the increase of seed cool storage time. There were no significant changes of seed germination rate between seed treatment by 10% NaClO solution and the control. NAA had a significant effect on the proliferation of protocorm, the optimum culture medium for protocorm proliferation was 1/2MS + ZT0.5mg/L + NAA1.0mg/L.

**Key words:** *Anoectochilus roxburghii*; seed germination; protocorm; multiplication

金线兰 (*Anoectochilus roxburghii*) 为兰科开唇兰属植物, 全草入药, 味甘、性平, 具有清热凉血、除湿解毒的功效。在民间常用于治疗肺病、肝炎、肾炎、风湿性关节炎、糖尿病、高血压及神经衰弱, 外用可治肿伤、创伤及毒蛇咬伤, 素有药王之称 (孔祥海,

2001)。除药用外, 由于株型矮小, 叶型优美, 叶脉金黄色, 成网状排列, 还是观赏价值极高的室内观叶珍品 (范子南等, 1997)。由于该植物自然生态条件独特, 繁殖率低, 生长缓慢, 加上鸟类嗜食, 特别是近年来对其需求量猛增, 产区人们过度采挖, 使得金线兰

收稿日期: 2008-10-13    修回日期: 2009-04-23

基金项目: 贵州省科学技术基金 (黔科合 J 字 (2008) 2097 号) [Supported by Science and Technology Foundation of Guizhou Province (2008) 2097]

作者简介: 邱玥 (1984-), 女, 贵州赤水市人, 硕士研究生, 主要从事药用植物研究, (E-mail) xianbenying@126.com.

\* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: gn2033@126.com)

野生资源日渐枯竭(于雪梅等,2000)。种子离体培养是保护兰花野生资源的重要手段之一(伍成厚等,2005)。金线兰种子发育不完全,在自然条件下极难萌发,需由某种真菌侵入,将种子胚细胞中的淀粉转化为糖,才能促进萌芽(陈裕等,1994),但在人工培养下,可通过非共生萌发形成原球茎,原球茎是快速繁殖提高繁殖系数的核心,一旦形成原球茎,就可以在无菌条件下取出切成小块,转到新鲜的培养基中继代增殖,这样可以通过原球茎途径得到大量植株。关于金线兰种子非共生萌发的研究,报道较少,黄慧莲等(2002)研究了基本培养基对种子萌发的影响;周伟香等(2007a)也曾报道了植物生长物质、蔗糖浓度和培养方式等因素对种子非共生萌发的影响。至于蒴果的成熟度、冷藏时间、种子预处理等对其萌发的影响,至今未见报道。关于金线兰原球茎的培养,有少量文献报道(周伟香等,2007b;杨柏云等,2008),但原球茎在培养过程中边增殖边分化,同步性差,极大地限制了原球茎的应用范围。本文研究几种因素对金线兰种子萌发的影响和原球茎增殖培养方案,以期建立原球茎培养体系提供具有实用价值的资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

野生金线兰植株(由贵州师范大学王承录副教授鉴定)采自贵州省荔波县,经人工授粉获得蒴果。

### 1.2 方法

(1)接种及培养:采摘尚未开裂的蒴果,用75%酒精棉擦拭果皮,置10% NaClO 溶液中浸泡12 min,后用无菌水冲洗5~6次。在超净工作台上,用无菌解剖针将消毒后的蒴果纵向剖成两半,用无菌镊子夹取少量种子,洒入培养基中,摇匀。种子萌发培养基均为1/4MS+NAA0.3mg/mL+蔗糖30g/L,pH为5.8,每处理三个重复。培养条件为光照12 h/d,光照强度20~30  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,温度为(22±2)°C,液体悬浮振荡转速为70 r/min。观察种子萌发过程,记录开始萌发日期并在70 d后于解剖镜下统计萌发率。以胚膨大形成白色原球茎为萌发标准。(2)种子授粉类型试验:将同株同花授粉的种子、同株异花授粉的种子和异株异花授粉的种子在相同的条件下萌发。(3)种子成熟度及冷藏试验:将生长60、90、120、150 d的金线兰种子分别在4 °C

下贮藏0、30、60、90、120 d后在相同的条件下萌发。(4)种子预处理试验:用镊子将成熟蒴果纵向剖开,取出种子,滤纸包好放入10% NaClO 溶液浸泡10 min后,用无菌水冲洗5~6次。接种方法同上。(5)原球茎增殖试验:试验选用L16(4<sup>5</sup>)表进行正交设计,选取基本培养基、6-BA、ZT、NAA四因素,浓度各设四水平(表1),共有16个试验组合,每组组合接种5瓶,每瓶10个原球茎。液体悬浮震荡培养,30 d后统计原球茎增殖数,计算增殖率。原球茎增殖率=(增殖后原球茎数-接种原球茎数)/接种原球茎数。培养基均加蔗糖30 g/L,pH5.8。

表1 原球茎增殖试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of test for the protocorm multiplication

水平 Level	因素 Factor (mg/L)			
	培养基 Medium	6-BA	ZT	NAA
1	MS	0	0	0
2	1/2MS	1	0.5	0.5
3	1/4MS	2	1.0	1.0
4	1/6MS	3	1.5	1.5

## 2 结果

### 2.1 不同授粉类型对金线兰种子萌发的影响

金线兰的种子极为细小(图版I:A),由一个简单的胚和数层种皮细胞组成,萌发时位于中间的胚开始膨大(图版I:B),突破种皮,45 d后形成肉眼可见白色原球茎。在金线兰开花后进行人工授粉,结果表明,三种不同授粉方式均能结实,说明金线兰无自交不亲和性。但所形成的种子的萌发率和萌发形成的原球茎长势却有很大差异,从表2看出,异株异花授粉的种子由于亲缘关系远其萌发率最高,为78.53%,同时萌发形成的原球茎长势较好(图版I:C),生长迅速。同株同花授粉的种子萌发率最低,为39.87%,萌发形成的原球茎细小、部分原球茎萌发后停止生长。

### 2.2 不同成熟度及冷藏时间对种子萌发的影响

生长时间越短的蒴果,萌发率较低且萌发慢,随着蒴果生长时间的延长,萌发率逐渐提高(表3),生长期为150 d的金线兰蒴果其种子萌发率最高,开始萌发时间早,形成的原球茎粗大、整齐。说明金线兰的种子萌发率与蒴果的成熟度呈正相关。金线兰种子采摘后直接萌发时,萌发率最高,且原球茎生长

良好。从生长 60 d 一直到生长 150 d 的种子都表现出相同的趋势,即萌发率随着冷藏时间的延长而降低。经过冷藏后,部分种子也能萌发,但种子萌发时间延长,萌发率下降,原球茎弱小,部分原球茎停止生

长,褐化死去,这说明冷藏会影响种子的活力(表 3)。

### 2.3 种子预处理对种子萌发的影响

金线兰种子经过 NaClO 溶液浸泡后,萌发率为 72.84%,对照为 71.06%。对试验结果进行 *t*-检验,



图版 I A. 金线兰种子( $\times 100$ ); B. 萌发 25 天的种子( $\times 100$ ); C. 种子萌发形成的原球茎; D. 原球茎增殖。

Plate I A. Seed of *Anoectochilus roxburghii*; B. Seed cultured for 25 days; C. Protocorms formed from seed germination; D. Protocorm multiplication.

表 2 不同授粉类型对金线兰种子萌发的影响

Table 2 Effect of different types of pollination on seed germination

授粉类型 Pollination type	接种数 No. of inoculation	萌发数 No. of germination	萌发率(%) Germination rate	萌发特征 Germination trait
同株同花授粉 Self-pollination	459	183	39.87	原球茎细长、易分化
同株异花授粉 Cross-pollination in one plant	576	401	69.62	原球茎大小不一
异株异花授粉 Coss-pollinate	475	373	78.53	原球茎整齐、粗壮、生长较快

表 3 蒴果成熟度及冷藏时间对种子萌发的影响

Table 3 Effect of capsule maturity and cold storage on seed germination

果实成熟度 Capsule maturity (Days after pollination)	冷藏时间 Cold storage time (d)									
	萌发率 Germination rate (%)					开始萌发时间 Germination time (d)				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
60	49.51	19.24	7.16	2.21	1.26	30	35	38	40	45
90	47.32	21.43	15.89	10.41	5.49	30	35	38	40	45
120	70.81	32.23	20.44	8.98	2.42	25	30	35	40	45
150	78.59	30.59	21.26	10.87	3.65	25	30	32	35	40

得到  $P > 0.05$ , 没有显著差异,说明次氯酸钠浸泡对种子萌发率没有显著影响,但使萌发时间提前 10 d (表 4)。

### 2.4 原球茎增殖正交试验结果

从表 5 可以看出,不同处理组合对原球茎增殖影响很大,由极差分析可知 NAA 对原球茎增殖影响最大,4 种因素作用强弱依次是: NAA > 培养基 > 6-BA > ZT。为进一步反映各因子之间的差异以便寻求最佳水平,进行了方差分析,结果显示 NAA 作用显著,基本培养基、6-BA、ZT 对金线兰原球茎增殖作用不显著。综合以上分析在本试验设计范围里得到金线兰原球茎增殖最佳组合为  $A_2B_1C_2D_3$ , 即  $1/2MS + ZT 0.5mg/L + NAA 1.0mg/L$ 。

把原球茎接种到以  $A_2B_1C_2D_3$  组合配制的培养基上,30 d 后统计原球茎的平均增殖率达 2.18 倍(版图 I :D),比正交设计中的任何一个组合都高,证实了正交试验筛选的结果。

表 4 NaClO 预处理对种子萌发的影响

Table 4 Effect of bleaching on seed germination

预处理 Treatment	萌发率(%) Germination rate	开始萌发时间 Germination time	萌发特征 Germination trait
10% NaClO 溶液浸泡 Bleached in 10% NaClO	71.06	25	原球茎整齐
对照 Control	72.84	15	萌发快,原球茎整齐

表 5 原球茎增殖正交试验结果  
Table 5 Determination of orthogonal test on protocorm multiplication

组合号 No.	因素 Factor (mg/L)				接种数 No. of inoculation	增殖后原球茎数 No. of protocorms after multiplication	增殖率 Multiplication rate
	(A)	(B)	(C)	(D)			
1	MS	0	0	0	56	81	0.45
2	MS	1	0.5	0.5	50	93	0.86
3	MS	2	1.0	1.0	50	103	1.06
4	MS	3	1.5	1.5	50	77	0.54
5	1/2MS	0	0.5	1.0	50	138	1.76
6	1/2MS	1	0	1.5	50	59	0.18
7	1/2MS	2	1.5	0	50	78	0.56
8	1/2MS	3	1.0	0.5	42	80	0.90
9	1/4MS	0	1.0	1.5	41	66	0.61
10	1/4MS	1	1.5	1.0	44	88	0.50
11	1/4MS	2	0	0.5	48	86	0.79
12	1/4MS	3	0.5	0	50	68	0.35
13	1/6MS	0	1.5	0.5	50	90	0.41
14	1/6MS	1	1.0	0	50	75	0.25
15	1/6MS	2	0.5	1.5	50	66	0.32
16	1/6MS	3	0	1.0	57	106	0.86
K1	0.728	0.807	0.570	0.402			
K2	0.850	0.448	0.823	0.740			
K3	0.563	0.682	0.705	1.045			
K4	0.460	0.662	0.503	0.413			
R	0.390	0.359	0.320	0.643			

### 3 讨论

种子成熟度是影响种子萌发的重要因素,徐晓薇等(2004)研究表明蝴蝶兰种子授粉 3~4 个月后采摘的蒴果其种子萌发率高达 95%,此后种子萌发率随着果龄的增加而急剧下降。丁长春等(2004)对杏黄兜兰种子萌发的研究结果显示,授粉后 120 d 的蒴果萌发率最高,在 120 d 之后,种子萌发率则随着蒴果成熟度的增加而降低,这都说明没有完全成熟的种子,更有利于萌发。本试验得到了相反的结果:完全成熟的金线兰蒴果(即生长了 150 d 的蒴果)其种子萌发率最高。

兰科植物的种子在暗冷场所保存 1~10 年,其发芽率几乎不会降低(汪建亚等,2007)。有研究发现兰花种子低温保存处理对其萌发有明显的促进作用,Bowles 等(2002)发现一些采集后直接播种几乎不能萌发的种子,在一定时间的低温处理后萌发率达到 30%~50%,且在 4 个月内,萌发率随处理时间的延长而提高。但在本试验中,金线兰的蒴果采摘后直接萌发,其萌发率最高,在 4℃下保存 1 个月,萌发率明显降低,并随着储存时间的延长萌发率

逐渐下降,保存 4 个月后,几乎不能萌发。说明金线兰种子不耐储藏。这可能也是野生金线兰萌发率很低的一个原因。野生金线兰蒴果在 11 月下旬以后陆续成熟,成熟后蒴果裂开,种子随风漂散到枯枝落叶层下、草丛中、沟谷旁、山涧石壁等处。这时已进入冬天,温度较低,不利于种子的萌发。等到第二年气温回升后又错过了最佳萌发时间,因此导致了萌发率极低。

种皮是阻碍种子萌发的主要因素之一,通过机械和化学处理方法破损种皮可以明显提高种子的萌发率。黄磊等(2003)用 0.5% NaClO 溶液浸泡春兰种子 4~6 min 后,萌发率得到很大的提高。黄家林等(2001)研究发现,用 0.5% NaClO 溶液处理黄花杓兰种子 10 min 后,萌发率比对照提高 15%。而本试验的结果却表明,经 NaClO 溶液浸泡 10 min 后,仅萌发时间提前 10d,萌发率没有明显的改变,萌发形成的原球茎的长势没有明显差异。至于不同浸泡时间对其萌发率是否有影响,还有待进一步研究。

原球茎在无激素的条件下,其顶端不断延伸,形成根状茎,根状茎进一步分化长成植株。因此需要在激素的调节下使得原球茎不断增殖。本试验室曾报道(周伟香等,2007b)生长调节物质对原球茎增

殖的影响,结果显示改良 KC+6-BA2.0mg/L+NAA1.5mg/L+KT0.2mg/L 增殖效果最好,增殖倍率最高,但原球茎在这种培养基上容易分化,经过继代3次,就会分化长出小叶。张菊野等(1993)认为6-BA能促进春兰原球茎的发生与分化,NAA有利于原球茎增殖与根的形成。林丛发等(2007)在对铁皮石斛类原球茎增殖和分化的研究中,也认为6-BA不利于类原球茎的增殖,而NAA则有利于类原球茎的增殖。正交设计是多因素分析的有利工具,可以用较少的试验次数得到较多的信息,从而选出主要因素及其最优水平(徐晓峰等,2002)。本试验通过正交设计确定了基本培养基、6-BA、ZT和NAA四种因素对原球茎增殖的影响作用大小,NAA的作用达到显著,最佳组合为:1/2MS+ZT0.5mg/L+NAA1.0mg/L。在该培养基上培养了半年的原球茎,增殖效果良好,只有少数原球茎分化成根状茎。

**致谢** 本试验得到了贵州师范大学生命科学学院乙引教授和陈庆富教授在试验场地方面给予的帮助,在此表示感谢。

## 参考文献:

- 汪建亚,王冬云,蔡桁,等. 2007. 蝴蝶兰的杂交和无菌播种技术[J]. 湖北林业科技,4:69-70
- 张菊野,俞玲凤,连宏坤. 1993. 几种影响春兰原球茎生长与分化的因素[J]. 植物生理学通讯,29(3):175-178
- Bowles ML, Jacobs KA, Zettler LW. 2002. Crossing effects on seed viability and experimental germination of the federal threatened *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae)[J]. *Rhodora*, 104(917):14-30
- Chen Y(陈裕), Lin KR(林坤瑞), Guan QK(管其宽), et al. 1994. Biological characteristics and habitat characters of *Anoectochilus roxburghii*(金线莲生物学特性及生境特点的研究)[J]. *Subtrop Plant Res Commun*(亚热带植物通讯), 23(1):19
- Ding CC(丁长春), Yu H(虞泓), Liu FY(刘方媛). 2004. Factors affecting the germination of *Paphiopedilum armeniacum*(影响杏黄兜兰种子萌发的因素)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 26(6):673-677
- Fan ZN(范子南), Xiao HS(肖华山), Fan XH(范晓红), et al. 1997. Study on tissue culture of *Anoectochilus roxburghii*(金线莲的组织培养研究)[J]. *J Fujian Teach Univ*(福建师范大学学报), 13(2):82-87
- Huang HL(黄慧莲), Liu XW(刘贤旺), Wu XS(吴祥松), et al. 2002. Study on seedling inducement from seed of *Anoectochilus roxburghii*(金线莲种子诱导成苗的研究)[J]. *The Chinese Traditional Drug*(中药材), 25(1):3-5
- Huang L(黄磊), He XR(贺筱蓉), Zheng LM(郑立明), et al. 2003. Seed germination of *Cymbidium goeringii* in asymbiotic culture(春兰种子非共生萌发的研究)[J]. *Seed*(种子), 132(6):40-41.
- Huang JL(黄家林), Hu H(胡虹). 2001. Seed germination requirements of *Cypripedium flavum* in axenic culture(黄花杓兰种子无菌萌发的培养条件研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 23(1):105-108
- Kong XH(孔祥海). 2001. Preliminary study on natural resources of *Anoectochilus roxburghii*(“药王”金线莲的自然资源初步研究)[J]. *Chin Trad Herb Drug*(中草药), 32(2):155-157
- Lin CF(林丛发), Zhong AQ(钟爱清), Lin YB(林云斌), et al. 2007. Study on proliferation and redifferentiation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum*(铁皮石斛类原球茎增殖和分化的研究)[J]. *Acta Agric Jiangxi*(江西农业学报), 19(1):84-86
- Wu CH(伍成厚), Ye XL(叶秀萍), Liang CY(梁承邺). 2005. *In vitro* seed germination in *Doritis pulcherrima*(五唇兰种子离体培养的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 25(2):149-151
- Xu XW(徐晓薇), Lin SS(林绍生), Yao LJ(姚丽娟), et al. 2004. Study on the factors affecting seed embryo germinating of butterfly orchid(*Phalaenopsis*)(蝴蝶兰种胚萌发影响因素的研究)[J]. *Acta Agric Zhejiang*(浙江农业学报), 16(4):202-205
- Xu XF(徐晓峰), Huang XL(黄学林). 2002. Establishment of broccoli plant regeneration system with orthogonal design(应用正交设计建立青花菜植株的再生体系)[J]. *Guihaia*(广西植物), 22(6):513-516
- Yu XM(于雪梅), Guo SX(郭顺星). 2000. Establishment of symbiotic system for *Anoectochilus roxburghii* and endophytic fungi(金线莲与内生真菌共生培养体系的建立)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 25(2):81-83
- Yang BY(杨柏云), Gao YY(高荫榆), Li CH(李春华), et al. 2008. Induction and rapid propagation of *Anoectochilus roxburghii* protocorm(金线莲原球茎的诱导与快速繁殖)[J]. *J Anhui Agri Sci*(安徽农业科学)36(10):3999-4001
- Zhou WX(周伟香), Gong N(龚宁), Li G(李光), et al. 2007a. Seed germination of *Anoectochilus roxburghii* in asymbiotic culture(花叶开唇兰种子非共生萌发的研究)[J]. *Chin Trad Herb Drug*(中草药), 38(4):610-613
- Zhou WX(周伟香), Gong N(龚宁), Li G(李光), et al. 2007b. Influence of plant growth regulator on multiplication and differentiation of *Anoectochilus roxburghii* protocorm(植物生长调节剂对花叶开唇兰原球茎增殖和分化的影响)[J]. *Subtrop Plant Sci*(亚热带植物科学), 36(1):17-19