

兴仁金线兰种子非共生萌发特性与快繁育苗

周丽^{1*}, 隆林², 王苑¹, 王兴益¹, 刘森银³

¹兴义民族师范学院, 民族药用生物资源研究与开发重点实验室, 贵州兴义562400; ²黔西南州药品检验所, 贵州兴义562400; ³黔西南州绿缘动植物科技开发有限公司, 贵州兴义562400

摘要: 本文研究了兴仁金线兰种子非共生萌发特性和芽增殖条件, 结果表明, 授粉后55 d种子达到生理成熟状态, 种子萌发率最高达97.28%; 授粉后75 d种子趋于形态成熟, 萌发率可达94.44%; 授粉后115 d的种子过度成熟, 萌发率反而仅为23.34%。芽增殖的最佳培养基为ER+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.03 g·L⁻¹ 活性炭, 增殖系数为8.25。把试管苗移栽到直径6~9 mm的细树皮中, 成活率在96.83%以上。本研究为兴仁金线兰的产业化生产奠定了基础。

关键词: 兴仁金线兰; 非共生萌发; 快繁育苗

Asymbiotic Seed Germination and Rapid Seedling Regeneration of *Anoectochilus xingrenensis*

ZHOU Li^{1*}, LONG Lin², WANG Yuan¹, WANG Xing-Yi¹, LIU Sen-Yin³

¹Key Laboratory of National Medicinal and Biological Resources, Xingyi Normal University for Nationalities, Xingyi, Guizhou 562400, China; ²Qianxinan Prefecture Institute for Drug Control, Xingyi, Guizhou 562400, China; ³Southwest Guizhou Lvyuan Animal and Plant Technologies Company Limited, Xingyi, Guizhou 562400, China

Abstract: This paper introduces a high quality plantlets propagation technology of *Anoectochilus xingrenensis* developed by researching its characteristics of the asymbiotic seed germination and suitable condition of bud multiplication. Results showed that the seeds of 55 days after pollination (DAP) reached physiological maturity, with a seed germination rate up to 97.28%; the seeds of 75 DAP could be morphologically mature, with a seed germination rate up to 94.44%; while the seeds of 115 DAP were over-mature, with a seed germination rate dropping to 23.34%. Eriksson medium with 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.5 mg·L⁻¹ NAA and 0.03 g·L⁻¹ active charcoal (AC) was optimal for bud multiplication, with an effective multiplication coefficient of 8.25. The survival rate could be up to 96.83% when the plantlets were transplanted to 6–9 mm diameter pine bark. Therefore, this research provides a basis for the industrial production of *A. xingrenensis*.

Key words: *Anoectochilus xingrenensis*; asymbiotic germination; rapid seedling regeneration

金线莲为兰科开唇兰属植物的干品, 金线莲的基原植物有金线兰(*Anoectochilus roxburghii*)、兴仁金线兰(*A. xingrenensis*)和台湾金线莲(*A. formosanus*)等, 均为多年生草本植物, 全草入药, 具有保肝、降血糖、降血压、利尿、抗肿瘤等作用(蔡鑫艳2006; 王常青2008), 在民间有“药王”、“药虎”之称。杨秀伟等(2007)的研究表明, 金线兰含有多糖、微量元素、强心苷类、氨基酸、有机酸、甾体化合物、黄酮类化合物、生物碱等多种成分, 是我国传统的珍贵药材。兴仁金线兰是金效华等(2002)在贵州省西南地区进行植物考察时发现, 并于2002年公开发表的新种。兴仁金线兰分布在黔西南州的兴仁、兴义、安龙等地, 具有叶面积大、叶片厚、茎段粗、单株重、产量高(王苑等

2014)、药用历史悠久等特点, 更具开发价值。随着生境的破坏和人类需求量的不断增加, 兴仁金线兰的野生资源严重枯竭。采用组织培养的方法繁育大量优质试管苗, 进行产业化栽培, 不仅可以满足市场需求, 而且还能有效保护野生资源。

目前, 对金线莲组织培养的研究大多集中在金线兰和台湾金线莲的丛生芽诱导、经愈伤组织诱导后成苗(江建铭等2009; 李光等2013; 杨红丽等

收稿 2015-09-15 修定 2015-10-14

资助 贵州省教育厅产学研结合示范基地(黔教合KY字[2012]035号)、贵州省教育厅2011年教育质量提升项目(黔教高发[2011]278号)、贵州省教育厅创新团队(黔教合人才团队字[2013]30号)。

* 通讯作者(E-mail: zhouli@xynun.edu.cn)。

2013; 杨玉红和林梅2011)及瓶播常规育苗技术(罗安雄等2012), 关于兴仁金线兰组织培养的研究很少, 仅见到利用茎节诱导丛生芽增殖(罗晓青等2012)和种子萌发后丛生芽增殖的报道(罗晓青等2014)。本文研究了兴仁金线兰种子非共生萌发特性并优化工厂化育苗技术, 以期为其产业化栽培奠定基础。

材料与方 法

1 实验材料

兴仁金线兰植株于2013年5月采自贵州省兴义市则绒乡, 同年7月开花, 由中国科学院昆明植物研究所标本馆彭华研究员鉴定为兰科金线兰属植物兴仁金线兰(*Anoectochilus xingrenensis* Z. H. Tsi & X. H. Jin), 剩余植株用原产地腐叶土栽培在大棚内, 以便实验观察和取材使用。

2 人工授粉

栽培于大棚内的野生兴仁金线兰花期7~8月, 在开花后6 d进行人工授粉, 选取花序基部健壮的3~6朵花进行异株授粉, 授粉后剪去花序顶端未开放的花朵。

3 播种

播种时剪取不同胚龄的果实, 用75%酒精轻轻擦拭果实表面后, 用0.1%的 HgCl_2 处理10 min, 无菌水冲洗3次后, 取出种子, 播种在萌发培养基上。

4 种子萌发

种子萌发培养基为: $1/2\text{MS}+0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}+20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{蔗糖}+7.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{琼脂粉}$, pH为5.8。光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 光照强度 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 培养温度 $(25\pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$ 。

在培养瓶内4个对角位置, 挑取一定量种子放在载玻片上, 于显微镜下观察种子萌发情况, 胚膨大突破种皮者视为萌发, 统计100粒种子, 萌发率=(萌发种子数/观察种子总数) $\times 100\%$ 。将萌发的种子在形态学上端分化出小芽并转为绿色者视为分化, 分化率=(分化种子数/萌发种子数) $\times 100\%$ 。

5 增殖培养

芽增殖培养基为: 基本培养基Eriksson (ER)(王蒂和陈劲枫2013)+ $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{蔗糖}+7.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{琼脂粉}+0.03\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{活性炭}$, pH为5.8, 添加不同的植物生长调节剂。将壮苗培养40 d的中苗以茎节为单位切割后进行增殖培养, 每种培养基接种6瓶, 每瓶8个节

位, 重复3次, 培养70 d后统计分析芽的增殖效率。增殖率=(总芽数/接种芽数) $\times 100\%$ 。

6 生根培养

壮苗生根培养基为: $\text{ER}+60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{香蕉泥}+100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{土豆水}$ (土豆去皮后切片煮沸15 min的水液)+ $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{蔗糖}+7.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{琼脂粉}$, pH为5.8。

7 出瓶与栽培

出瓶前将培养瓶盖打开, 放置于遮荫大棚内炼苗, 5 d后取出试管苗, 洗净根部培养基, 栽培45 d后统计成活率, 观察生长状况。成活率=(成活苗数/栽培苗数) $\times 100\%$ 。

8 数据分析

所得数据用SAS V8软件进行方差分析。

实验结果

1 兴仁金线兰的人工授粉与果实灭菌

对兴仁金线兰进行人工授粉时, 由于其蕊柱前面有两枚片状附属物, 用镊子很难将花粉块粘合到柱头上, 结实率仅为12.78%。第二年, 改用毛笔授粉, 将花粉块取下置于灭菌后的小称量瓶中, 用干净的毛笔将花粉压散后粘取一定量的花粉从蕊柱前的片状附属物处刷到柱头上, 结实率高达73.81%(资料未列出)。

由于金线兰的果实小, 果皮很薄, 播种时如果采用兰科蒴果常用的酒精灼烧法灭菌(周丽等2014), 高温使种子的萌发率大大降低。本文采用 HgCl_2 灭菌对蒴果内种子影响极小, 对萌发率无影响。

2 兴仁金线兰的种子生物学特性

兴仁金线兰果实生长发育很快, 35 DAP (days after pollination)时, 种子形态结构发育较完整, 种子在75 DAP时发育基本成熟, 种子长约0.36 mm, 球胚长为0.028~0.038 mm, 宽0.011~0.016 mm, 球胚长度仅为种子长的1/10左右, 种子属于翅很长的类型。

种子发育程度对萌发的影响较大, 35 DAP时, 种子紧密着生在胎座上, 种皮细胞透明, 球形胚很小, 居于种子中央, 种子内球形胚还处于发育阶段, 种子未成熟, 播种到培养基上种胚易变褐死亡, 种子不能萌发; 55 DAP时种子较紧着生在胎座上, 种皮白色较透明, 球形胚充满种皮中部膨大部位(图

1-A), 接种后18 d便开始萌发, 并且萌发率比起播种相同天数的其他发育程度种子来说处于较高的水平, 培养到75 d时萌发率高达97.28%, 种子达到生理成熟; 75 DAP的种子较易从胎座上分离, 种皮略带浅黄色, 启动萌发较早, 接种后21 d开始萌发, 萌发速度较快, 培养45 d时大多数球胚一端分化多条管状突起物(图1-C), 培养到75 d时萌发率可达

94.44%, 种子趋于形态成熟; 75 DAP后, 种子和球胚的大小没有太大变化, 只是种皮的颜色变深, 种皮细胞壁上的萌发抑制物质积累量增加, 95 DAP种子成熟, 种皮为黄褐色, 易从胎座上脱落, 播种25 d启动萌发, 萌发速度较慢, 培养到75 d时萌发率为67.95%; 115 DAP果实容易于开裂, 种皮呈黑褐色油亮状(图1-B), 种子过度成熟, 种皮细胞壁增厚,

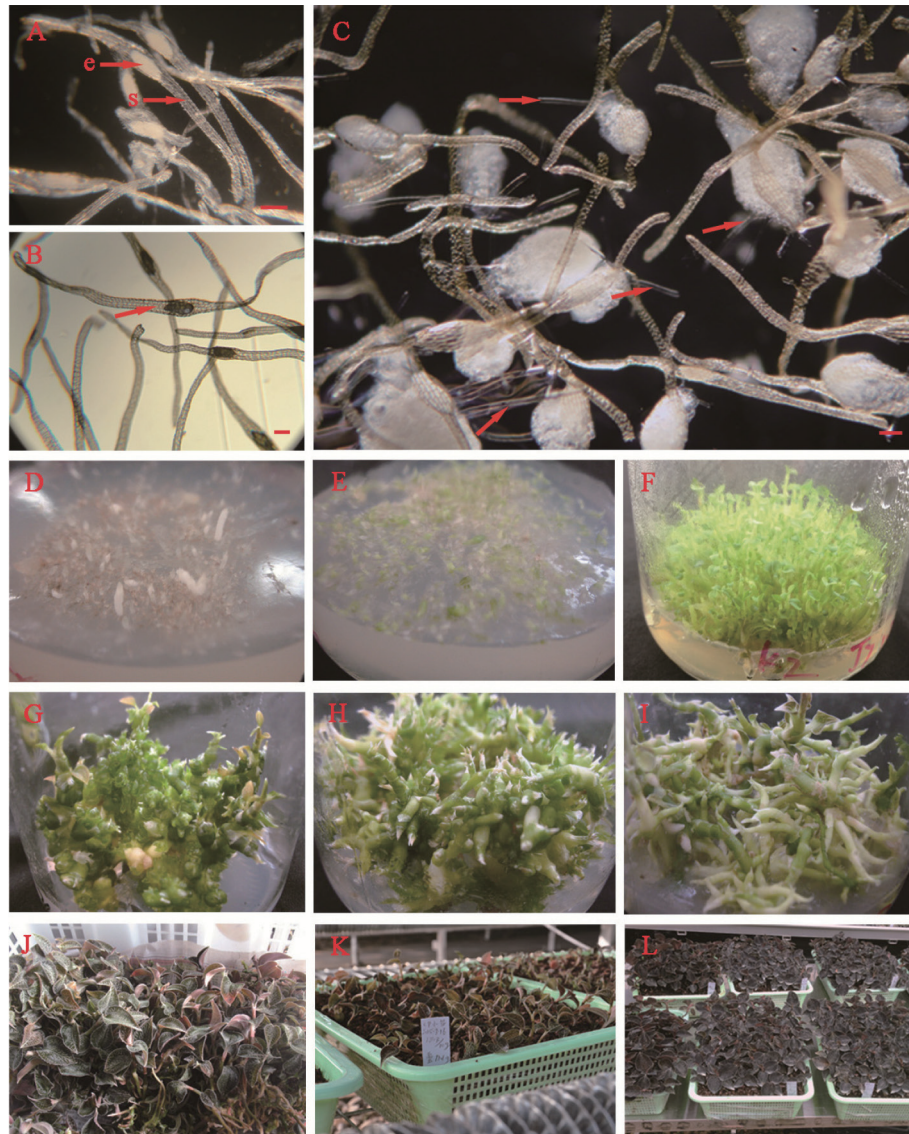


图1 兴仁金线兰的快速繁殖

Fig.1 Rapid propagation of *A. xingrenensis*

A: 55 DAP的种子, 种皮白色较透明(s), 胚饱满(e); B: 115 DAP的种子, 种皮黑褐色油亮(箭头所示); C: 播种45 d, 管状突起物(箭头所示); D: 黑暗条件下萌发的种子, 白化小芽; E: 光照条件下萌发的种子, 已分化小芽; F: 播种后160 d直接分化的小苗; G: 增殖培养基ER+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA上不正常的圆球状芽; H: 增殖培养基ER+0.6 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA上不正常的粗壮芽; I: 增殖培养基ER+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA上的有效芽; J: 用于出瓶的试管苗; K: 刚栽培的试管苗; L: 栽培150 d的植株。A和B中标尺=20 μm; C中标尺=200 μm。

并积累萌发抑制物质, 种子启动萌发时间推迟到30 d以后, 萌发速度缓慢, 萌发率仅能达到23.34% (表1)。

3 光照对非共生萌发的影响

将75 DAP的种子播种后分别置于25 °C 黑暗和光照两种条件下, 培养相同天数后分别统计萌发率和分化率。结果显示, 光照条件下培养35、50、70 d的萌发率均比黑暗下的高得多(表2), 说明

光照有利于提高种子萌率。培养35 d时黑暗和光照条件下的分化率差异不大, 其主要原因是由于培养时间较短, 光照对分化的影响还未显现出来; 随着培养时间增长, 光照条件下的分化率远远超过黑暗下的, 在黑暗条件萌发较早产生的类原球茎, 分化出较弱的白化小芽(图1-D), 培养75 d时光照条件下的分化率高达63.28%, 而黑暗下的仅为3.09% (表2), 表明黑暗可以有效限制类原球茎的分化。

表1 种子发育程度对萌发率的影响

Table 1 Effects of development degree of seeds on seed germination rate

种子发育程度/DAP	培养时间/d					%
	18	30	45	60	75	
35	0 ^B	0 ^D	0 ^D	0 ^E	0 ^E	
55	28.67 ^A	54.36 ^B	79.61 ^A	96.73 ^A	97.28 ^A	
75	0 ^B	67.28 ^A	77.68 ^A	88.79 ^B	94.44 ^B	
95	0 ^B	35.96 ^C	46.49 ^B	54.17 ^C	67.95 ^C	
115	0 ^B	0 ^D	12.27 ^C	18.96 ^D	23.34 ^D	

不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

表2 光照对种子萌发的影响

Table 2 Effects of light on seed germination

光照条件	培养35 d		培养50 d		培养75 d	
	萌发率/%	分化率/%	萌发率/%	分化率/%	萌发率/%	分化率/%
光照	71.93 ^A	0.03 ^A	85.19 ^A	1.36 ^A	94.44 ^A	63.28 ^A
黑暗	45.32 ^B	0.01 ^A	50.82 ^B	0.05 ^B	60.19 ^B	3.09 ^B

不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

4 类原球茎的分化与芽增殖

种子在萌发培养基上萌发后, 类原球茎可自行分化, 培养160 d, 长成具有2~3个节和2~3片小叶的小苗(图1-F), 将其转入壮苗培养基, 培养40 d后切取茎段进行增殖培养。当6-BA浓度水平在1.0 mg·L⁻¹时, 虽然芽的增殖系数高达13以上, 但是芽呈现圆球状, 部分玻璃化, 转接后壮苗生根效果不好(图1-G); 当6-BA浓度为0.6 mg·L⁻¹时, 芽增殖系数大于10, 茎很粗壮, 叶分化效果不佳(图1-H); 6-BA浓度为0.3 mg·L⁻¹时, 芽增殖系数较低, 茎粗度适合, 后期壮苗生根速度快(图1-I)。NAA在生根方面有重要作用, 与细胞分裂素配合使用对器官的形成和植物株再生起调控作用。由表3可见, 培养基中6-BA与NAA浓度比值为10.0时, 增殖率最

高为14.62, 但是得到的芽为无效芽; 比值为1.0时, 芽增殖数少, 不分化, 节数少, 因此增殖系数最低, 仅为6.37; 比值为0.6时, 增殖率虽然也较低(8.25), 但是芽在增殖后生长、分化较快, 转接后成苗快。在6-BA为0.3 mg·L⁻¹时, 随着NAA浓度的增加, 所得到增殖芽的质量提高, 所以从生长调节剂用量和芽增殖的质量考虑, 添加0.3 mg·L⁻¹ 6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA最适合增殖生长。

5 工厂化育苗技术改进

兴仁金线兰一个果实内有几十万粒种子, 种子萌发率高达97.28%, 种子萌发后非常容易分化成苗, 将萌发培养基上培养160 d后分化的小苗转入壮苗培养基上50 d, 每株小苗有3~4个节位时, 将其切成3~4节接种于壮苗生根培养基上培养, 每瓶

表3 植物生长调节剂对兴仁金线兰芽增殖的影响

Table 3 Effects of plant growth regulators on bud multiplication of *A. xingrenensis*

生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹		6-BA/NAA浓度比值	芽增殖系数/个	增殖效果
6-BA	NAA			
0.3	0.1	3.0	8.69 ^D	芽白绿色, 粗壮, 密集, 未分化
0.3	0.3	1.0	6.37 ^E	芽白绿色, 粗壮, 未分化
0.3	0.5	0.6	8.25 ^D	芽白绿色, 节伸长, 顶部分化小叶片
0.6	0.1	6.0	13.54 ^{AB}	芽绿色, 节较短, 茎粗壮
0.6	0.3	2.0	10.28 ^C	芽绿色, 节短, 茎粗壮
0.6	0.5	1.2	11.07 ^B	芽绿色, 茎粗壮
1.0	0.1	10.0	14.62 ^A	节极度短缩, 芽圆球状, 基部有芽呈绿色玻璃化状
1.0	0.3	3.3	13.51 ^{AB}	芽粗壮, 节短缩, 芽深绿色
1.0	0.5	2.0	14.48 ^A	芽粗壮, 节较短, 芽深绿色

不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

定苗20株, 培养90~120 d便可出瓶移栽(图1-J), 培养到180 d时, 苗长满瓶内空间不易出瓶。

6 出苗与移栽

将炼苗后洗净的试管苗用6~9 mm发酵细树皮栽植于25 cm×40 cm塑料筐内(图1-K), 底部放入10 g肥力为180 d的缓效肥, 放置于遮荫大棚内, 加强水分管理, 成活率可达96.83% (图1-L), 栽培180~200 d可采收。

讨 论

兴仁金线兰为单轴分枝类植物, 在顶芽存在的情况下不能分蘖产生更多的小苗, 由于种子结构分化不完全又缺少胚乳的原因, 常规播种无法萌发, 只能采用植物组织培养的方法培育小苗。大多数工厂化育苗采用增殖培养后再切芽育苗的方法, 需要多次继代增殖并切割定苗, 减慢了接种速度等于增加了试管苗成本中的人工工资, 而且随着继代培养次数的增加, 材料白化和玻璃化的程度增加, 种苗质量下降。为了克服以上问题, 结合兴仁金线兰种子的非共生萌发特性进行育苗技术改进, 减少增殖继代次数, 减少切割次数, 以提高育苗效率。

兴仁金线兰种子的翅很长, 55 DAP时就可达到生理成熟, 这时种皮细胞为发育早期的薄壁细胞, 透水性好, 易吸胀萌发, 球形胚膨大和生长速度快, 胚依靠体积的快速增加来撑破种皮; 75 DAP时种皮也较薄, 较易吸水, 除了球胚自身膨大的张力外, 大多数球胚还会分化出多条管状突起物协

助球胚突破种皮生长, 这时根状突起物起到刺破种皮加速萌发和分化的作用, 管状突起物也被称为指状突起物(王卜琼等2006)或‘表皮毛’(罗安雄等2012), 是兰科植物种子萌发初期球胚一端的部分表皮细胞外部产生的细管状突起, 在球胚没有产生管状突起的一端往往都分化出芽, 在管状突起物多的一端往往分化出根, 所以管状突起物的发生与兰科植物根的发生有关; 75 DAP以后, 随着时间的增加种皮细胞壁增厚, 并积累萌发抑制物质, 种子启动萌发时间推迟, 球胚吸水膨大的张力降低, 根状突起物刺破种皮成为主要萌发动力, 而根状突起物的产生又需要球胚的吸水及胚膨大, 所以种子萌发率逐渐下降。

芽增殖培养的结果表明, 兴仁金线兰对植物生长调节剂的需要量不大, 6-BA浓度高于0.3 mg·L⁻¹时不利于有效芽的产生; 但是常规的切芽增殖培养扩繁幼苗法, 由于继代次数过多, 导致生长调节剂在芽丛中的累积, 容易出现芽分化困难和玻璃化苗的现象(本实验室于2008年播种, 到2014年增殖继代15代的苗大量玻璃化), 进而导致优质试管苗数量大大下降。结合兴仁金线兰种子数量多、萌发率高、黑暗条件减慢种子萌发速度并能抑制萌发后的分化等萌发特性和工厂化育苗时控制继代次数的要求, 可在黑暗和低温条件下保存播种后刚萌发的类原球茎, 在适合的时间使其恢复生长, 达到一年中随时有由类原球茎分化来的小苗, 缓解大批种苗分化后的转接压力, 将育苗步骤简化为: 播种萌发—低温保存—恢复常温培养

转接一切割定苗, 除去播种的步骤, 只需要两次继代(其中只有一次切割)便可出苗, 除去萌发和低温保存时间, 120 d可出瓶移栽。关于用低温与黑暗延长萌发期的组合条件和最佳培养基优化还有待进一步研究。

参考文献

- 蔡鑫艳(2006). 金线莲降血糖活性成分及作用机制的研究[硕士论文]. 武汉: 华中科技大学
- 江建铭, 俞旭平, 沈晓霞, 沈宇峰(2009). 金线莲组培快繁技术研究. 时珍国医国药, 20 (2): 408~410
- 金效华, 吉占和, 覃海宁(2002). 贵州兰科植物增补. 植物分类学报, 40 (1): 82~86
- 李光, 龚宁, 余霜(2013). 金线兰根状茎试管苗丛生芽高效增殖体系. 江苏农业科学, 41 (10): 52~53
- 罗安雄, 孟志霞, 陈晓梅, 郭顺星(2012). 福建金线莲种子萌发及幼苗培养研究. 中国药学杂志, 47 (15): 1199~1203
- 罗晓青, 蒙秋伊, 查松兰, 张志勇, 卢加举(2012). 兴仁金线莲丛生芽诱导增殖研究. 安徽农业科学, 40 (22): 11231~11232, 11260
- 罗晓青, 申刚, 蒙秋伊, 张显波, 查松(2014). 兴仁金线兰组织培养与快繁殖试验. 西南农业学报, 27 (1): 331~336
- 王卜琼, 李枝林, 刘国民, 钱慧生, 余朝秀(2006). 几种兰花种子无菌萌发及胚胎发育过程的几种途径. 云南植物研究, 28 (4): 399~402
- 王常青, 严成其, 王勇, 蓝杰, 孙兵法, 钱凯先(2008). 台湾金线莲多糖的分离纯化及其体外抑瘤活性研究. 中国生化药物杂志, 29 (2): 93~96
- 王蒂, 陈劲枫(2013). 植物组织培养. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 347
- 王苑, 桂娟娟, 谭成敏, 周丽(2014). 三种金线莲叶面积回归方程的建立. 兴义民族师范学院学报, (5): 120~124
- 杨红丽, 胡靖锋, 徐学忠, 和江明, 宋爽(2013). 金线莲的组织培养与快速繁殖研究. 西南农业学报, 26 (6): 2485~2488
- 杨秀伟, 韩美华, 靳彦平(2007). 金线莲化学成分的研究. 中药材, 30 (7): 797~780
- 杨玉红, 林海(2011). 金线兰愈伤组织诱导条件的优化. 贵州农业科学, 39 (3): 28~30
- 周丽, 徐正海, 谭成敏(2014). 短距槽舌兰的驯化栽培与快速繁殖. 植物生理学报, 50 (6): 792~796