维普资讯 http://www.cqvip.com

滇越金线莲快速繁殖技术研究

张 铁[1]，田雪琪[1]，李 彬[2]

（1. 文山师范高等专科学校 生物资源开发研究中心，云南 文山 663000；
2. 文山民族职业技术学校，云南 文山 663000）

［摘要］ 通过滇越金线莲种子无菌诱导和茎诱导芽以及丛生芽增殖、生根等试验，得出结论：滇越金线莲种子在不含激素的Hyponex 1培养基上有较好萌发率，并且在添加10%椰乳后原球茎能分化出健壮的苗。外植茎在Hyponex 1+6-BA 1 mg/L+NAA 0.01/L培养基上诱导产生芽的几率最高；最佳增殖培养基是Hyponex 1+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L；生根培养基是Hyponex 1+6-BA 0.05 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

［关键词］ 滇越金线莲；兰科；开唇兰属；花叶开唇兰；组织培养；组培快繁

［中图分类号］ Q943 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1671-3303(2006)03-0110-05

滇越金线莲（*Anoectochilus chapaensis*）为兰科开唇兰属多年生草本植物，是一种名贵珍稀的中药材，主要分布于云南文山与越南交界的边境线一带[1](P26-28)。由于其生物学特征及药效与同属植物花叶开唇兰相近[2]，被当地药农无度采挖，加之生态环境的破坏，这一野生资源日趋枯竭。从文献资料看，对于滇越金线莲研究甚少，组培快繁研究还未见报导，作者以滇越金线莲种子和茎为材料，利用植物组织培养技术，建立了人工快繁技术体系，为保护、开发和利用这一资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

材料于2003年9月采自麻栗坡火烧梁子林区，植株带有成熟蒴果。

1.2 实验方法

1.2.1 摘取尚未开裂蒴果及去除根叶的茎段，经表面清洗后，放入75%酒精中灭菌30秒，再以0.1%升汞灭菌7~10分钟，用无菌水冲洗4~5次。在无菌条件下将蒴果切开，将种子均匀撒播在培养基上，60天后统计萌芽率。在无菌条件下，将茎切成1cm左右长带1~2腋芽的节段，接种到诱导培养基上。

1.2.2 选择MS、改良VW（Vacin和Went，1949，添加MS的微量元素）、Knudson C、花宝一号（Hyponex 1，7-6-19）3 g/L[3](P267)等4种基本培养基，考察其对种子萌发的影响。

1.2.3 在不同培养阶段，添加不同激素浓度配比6-BA、NAA，考察其对外植体诱导、增殖及壮苗生根情况。

1.2.4 在种子诱导培养基中添加10%的椰乳（CM），考察其对种子萌芽的影响；在壮苗培养基中分别添加10%香蕉提取物、10%马铃薯提取物，筛选最佳添加物壮苗培养基配方。

1.2.5 除种子萌发期在暗处培养外，其余每天连续光照12 h，光照强度1 500~3 000 lx，培养温度25±1 ℃。

2 结果与分析

2.1 诱导种子萌发

通过种子无菌诱导试验，40天后可观察到种子开展萌动，出现肉眼可见的淡黄色的原球茎，与金线莲种子无菌萌发时间相近[4](P3-5)。观察1/2MS、VW、KC、Hyponex 1等4种培养基对滇越金线莲种子萌发的影响，结果见表1，其优劣顺序为：Hyponex 1>1/2MS>KC>VW。在Hyponex 1培养基上种子萌发快，萌发率最高，达到70%，原球茎生长状况最好；VW培养基上种子萌发最慢，并且萌发率低，原球茎后期出现褐化、部分死亡。从添加椰乳（CM）对种子萌发的影响试验来看，添加椰乳不仅可提高于种子萌芽率，而且后期原球茎分化的苗健壮（图1）。

［收稿日期］ 2006-05-12

［基金项目］ 文山师范高等专科学校学术科研基金项目（2003201）

［作者简介］ 张铁（1969-），男，文山师专实验师，主要从事生物技术研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 不同基本培养基对滇越金线莲种子萌发的影响

基本培养基	萌芽率%	萌发特征
1/2MS	50	萌发快，原球茎生长整齐，后期苗弱
1/2MS + 10% CM	55	萌发快，原球茎生长整齐，后期苗健壮
VW	20	萌发慢，原球茎后期褐化、部分死亡
VW + 10% CM	25	萌发慢，原球茎后期褐化、部分死亡
Hyponex 1	70	萌发快，原球茎生长整齐，后期苗健壮
Hyponex 1 + 10% CM	70	萌发快，原球茎生长整齐，后期苗健壮
KC	45	萌发较快，原球茎生长整齐，后期苗弱
KC + 10% CM	50	萌发较快，原球茎生长整齐，后期苗健壮

注：播种60天后解剖镜下统计的萌发率

2.2 芽的诱导、增殖

将茎段接在以 Hyponex 1 为基本培养基的诱导基质上，培养12～14 d后，茎段叶腋处及茎段基部开始分化出可观察到的乳白色的不定芽（图2、3）。30天后可见明显的丛生芽（见图4、5）。试验结果表明不同浓度的激素对滇越金线莲茎芽诱导有不同效果，丛生芽增殖率也有明显的不同（见表2）。

表2 不同激素浓度配比对滇越金线莲茎诱导及增殖的影响

激素浓度（mg/L）		诱导率	增殖率
BA	NAA	（%）	（%）
0	0	0	0
1.0	0.05	74.2	180
1.0	0.1	60.8	360
1.0	0.2	46.3	240
2.0	0.05	69.5	340
2.0	0.1	60.5	430
2.0	0.2	45.5	270
3.0	0.05	30.5	270
3.0	0.1	24.6	320
3.0	0.2	21.4	250

表2表明，在未加激素时，从茎段不能诱导出芽。从试验结果中得出，当6－BA浓度在1～3 mg/L、NAA浓度在0.05～0.2 mg/L时，均能诱导出芽，最适宜的诱导培养基是 Hyponex 1 + 6－BA 1 mg/L + NAA 0.05 mg/L。将诱导的芽接种到相同培养基上扩增，其产生的丛生芽的增殖率如表2所示，在不添加激素时，芽只是继续生长，不产生新的丛生芽。在添加一定配比浓度的6－BA和NAA后，能产生丛生苗，其中在 Hyponex 1 + 6－BA 2 mg/L + NAA 0.1mg/L 培养基上丛生芽增殖率最高，可获得大量丛生芽。

2.3 生根成苗

取茎段粗壮，长势好的苗接种以下各培养基中诱导生根成苗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3 不同生根培养基的培养结果

激素浓度（mg/L）		株叶片数（片/株）	株根数（条/株）	叶片畸形率（%）
BA	NAA			
0	0	1.1	1.2	0
0	0.01	1.5	1.4	0
0	0.1	1.9	2.0	0
0	0.5	1.7	1.8	21
0.05	0.01	3.0	1.7	0
0.05	0.1	2.3	2.3	0
0.05	0.5	2.2	2.1	23
0.1	0.01	2.5	1.5	0
0.1	0.1	2.0	2.1	0
0.1	0.5	1.8	1.8	23
0.5	0.01	2.1	1.6	32
0.5	0.1	2.3	1.9	35
0.5	0.5	1.9	1.7	56

在没有激素的培养基上，虽然可以得到株形正常的小苗，但生长速度慢，不适于作快速繁殖。在BA浓度达到0.5 mg/L、NAA浓度达到0.5 mg/L时，苗虽然生长快，但叶片出现叶脉缺失等畸形现象，不能大量发育出正常的苗。因此，既能尽量保证苗的正常发育，又能保证苗生长速度快的培养基是：Hyponex l +6－BA 0.05 mg/L＋NAA 0.1 mg/L（见表3）。

2.4 壮苗、移栽

将已生1～2条根，株高4 cm左右的正常小苗移入Hyponex l基本培养基、或分别添加10%香蕉提取物、10%马铃薯提取物的Hyponex l基本培养基中壮苗。

4周后，从三组试管苗生长对比试验得出，添加10%香蕉取物或10%马铃薯提取物的Hyponex l基本培养基中的苗长势较好，试管苗健壮、根系发达（图6、7）。

经过4周的壮苗培养，幼苗一般长到5～6 cm、具有3～4片叶片、2～3条的根时，将瓶子移到室外打开瓶盖炼苗3～5天，然后洗去小苗基部的残留培养基，移入无菌珍珠岩中，每天进行一次叶片喷雾，每周用1/5Hyponex l液体培养基施入珍珠岩中，保持环境相对湿度在80%～90%，经过四周的过渡栽培再移入荫棚中，成活率可达98%以上。

3 小 结

3.1 滇越金线莲种子在不含激素的Hyponex l培养基上种子萌发快，萌发率最高，原球茎生长状况最好。

3.2 添加适量的椰乳后，种子萌发率显著增加，表明椰乳内具有某种活性物质可促进种子的萌发，我们在对兰科文山红柱兰的研究中也得到类似的结果[5](P225－226)。

3.3 滇越金线莲茎在Hyponex l＋6－BA 1 mg/L＋NAA 0.05 mg/L培养基上诱导产生芽的几率最高；最佳增殖培养基是Hyponex l＋6－BA 2 mg/L＋NAA 0.1 mg/L；生根培养基是Hyponex l＋6－BA 0.05 mg/L＋NAA 0.1 mg/L；壮苗培养基是Hyponex l＋10%的香蕉及10%的马铃薯提取物。

3.4 从生苗产生有两种途径：一种是节间腋芽萌发伸长，逐渐形成不定芽（图4），继代时把不定芽切割成带一个腋芽的茎段，增殖率250%～430%，若停止继代转入生根培养基，每个小芽可形成植株；另一种是接触培养基的节膨大，节周围长满重重叠叠的突起，随着突起的生长，节的形态消失，形成不规则的团状肉质原球茎和丛生芽（图3），原球茎可进行增殖，若割成3～4块，每块又可形成若干新的原球茎，它增殖率比较高，可达320%～460%；若停止切割，每个原球茎就能长成一个完整的植株。但后一种途径产生丛生苗的增殖率高，形成的苗较弱、畸形苗几率高。

3.5 在生根培养过程中，培养基中附加10%的香蕉及10%的马铃薯提取物对试管苗壮苗及生根有明显促进作用。

3.6 根系发育良好的植株，对霉菌有较好抵抗力。

维普资讯 http://www.cqvip.com

附图：

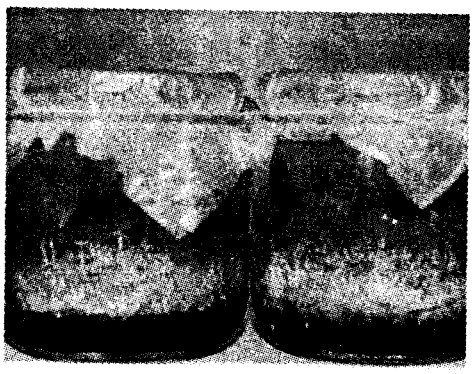

图1 种子诱导形成的苗60天后

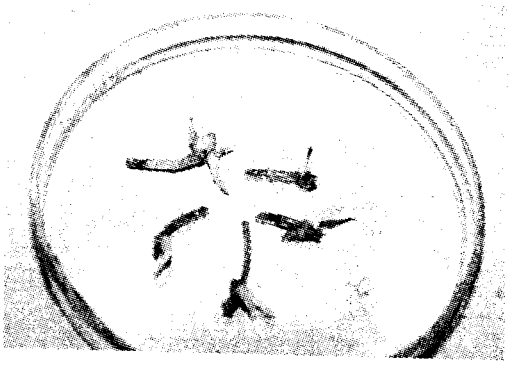

图2 茎节诱导形成的不定芽

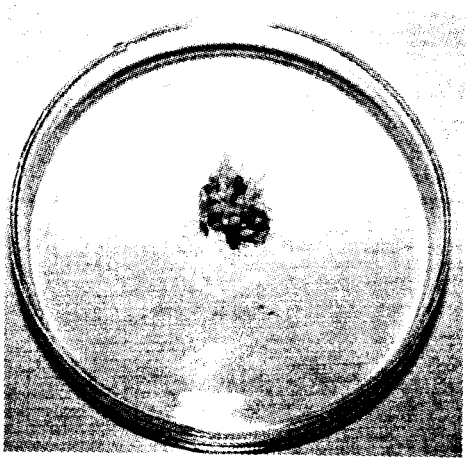

图3 茎基部诱导生成的团状肉质原球

图4 茎节间腋芽萌发增殖

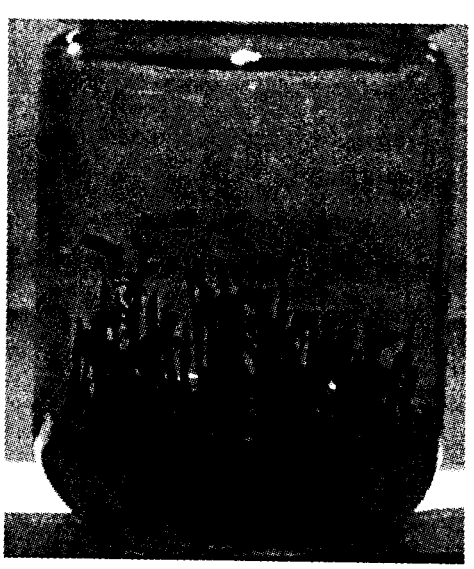

图5 滇越金线莲丛生苗继代增殖

图6 滇越金线莲无菌生根苗

维普资讯 http://www.cqvip.com

图7 经过壮苗处理的滇越金线莲苗

[参 考 文 献]

[1] 张铁等．文山金线莲种质资源初步调查[J]．文山师范高等专科学校学报2005,(1).

[2] 中国科学院植物研究所．中国高等植物[M].(第十三卷)青岛:青岛出版社,2002.

[3] 谭文澄．观赏植物组织培养[M]．中国林业出版社,1988.

[4] 黄慧莲等．金线莲种子诱导成苗的研究[J]．中药材2002,(1).

[5] 丁长春等．文山红柱兰快速繁殖技术的研究[J]．文山师范高等专科学校学报,2005,(3).

A Study on Embryo Germination and Proliferation in Vitro of *Anoectochilus Chapaesis*

ZhANG Tie[1], TIAN Xue - qi[1], LI Bin[2]

(1. Research and Development Center of Biological Resources, Wenshan Teachers' College, Wenshan, Yunnan 663000, China; 2. Wenshan Vocational and Technical College for Nationalities, Wenshan, Yunnan 663000, China)

Abstract: This paper presented the optimal culture conditions for the in vitro embryo germination and proliferation in vitro of *Anoectochilus chapaesis* . The results were as follows: the seeds germinated well in Kyoto medium without growth regulators, and new shoots were differentiated from protocorm when 10% CM were added. In a second experiment, the stems were then used as explants and produced new shoots best in the medium of Hyponex 1 +6 - BA 1 mg/L + NAA 0.01/L; the best proliferation medium was Hyponex 1 + BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L; and the best rooting medium was Hyponex 1 +6 - BA 0.05mg/L + NAA0.1 mg/L.

Key words: *Anoectochilus chapaesis*; Orchidaceae; Anoectochilus Blume; Anoectochilus roxburghii; tissue culture; micropropogation