

花叶开唇兰的初级培养及再生途径*

Primary Culture and Regeneration Ways of *Anoectochilus roxburghii*

周 兴 李海鹰 王桂文 范嘉晔
Zhou Xin Li Haiying Wang Guiwen Fan Jaye

(广西科学院生物研究所 南宁市大岭路2号 530003)

(Institute of Biology, Guangxi Academy of Sciences, 2 Dalinglu, Nanning, Guangxi, 530003)

摘要 结果表明: 培养基的组成对初级培养成活率影响不大, 死亡率高、萌发率低是由于花叶开唇兰肉质茎脆弱, 抗消毒剂能力差。要提高初级培养成活率应尽量不破坏叶鞘, 控制好消毒强度, 采种时间以1月为宜。芽的再生途径: 一是节间腋芽萌发形成主芽, 增殖系数2~2.5; 二是原球茎或丛生芽, 增殖系数3~4。前一种再生途径形成的芽对外界气温适应能力较强, 后一种适应性较差, 28℃以上气温, 生长受抑制甚至出现大量死亡现象。试验材料为广西那坡野生花叶开唇兰, 植株6节高, 茎径大于0.6 cm。

关键词 花叶开唇兰 初级培养 再生途径

中图法分类号 Q 949.718.430.5

Abstract Experiments showed that the ingredients of medium had a little effect on the survival rate; the high mortality and low sprouting rate were due to the weak pulped stem and low resistant to sterilizing. For raising its survival rate, leaf sheath should be well kept on the stem and the sterilizing intensity should be in a good control, collecting seedlings in January. The plants are regenerated from both the axillary buds with a multiplication coefficient 2~2.5, and the protocorm with a multiplication coefficient 3~4. The buds from the former way had a good adaption to the outside temperature, while those from the latter way are poor in adaptation and may die at above 28℃. The trial materials were wild *Anoectochilus roxburghii* collected from Napo county of Guangxi, and plants were 6 nodes high with stem greater than 0.6 cm in diameter.

Key words *Anoectochilus roxburghii*, primary culture, ways of regeneration

花叶开唇兰 (*Anoectochilus roxburghii*) 俗称金线莲、金线草, 为多年生热带陆生兰。为满足市场的需要和保护野生植物资源, 笔者以广西中越边境的野生花叶开唇兰为材料, 开展组织培养快速繁殖的一系列研究, 本文就其初级培养中影响因素及其芽的再生途径进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

在广西那坡采挖野生花叶开唇兰, 选取具6个节以上, 茎直径大于0.6 cm的植株为培养材料, 参试基本培养基为MS, 添加BA NAA 椰乳、蔗糖、琼脂粉。pH值5.8。依试验需要改变特定的测试因素及其水平 (本文所用激素浓度单位均为 mg·L⁻¹)。

1.2 方法

1.2.1 采种时间对初级培养成活率试验

在菜园土上铺一层4 cm~5 cm厚的河沙作为苗床, 将采挖到的野生花叶开唇兰移植于试验苗圃中, 塑料薄膜覆盖, 遮阴培养, 按试验需要从苗圃中取样。按常规消毒后, 切割成带一个腋芽或顶芽1 cm~1.5 cm的茎段, 接入配方为MS+BA2.0+NAA0.5+椰乳10%+蔗糖3.5%+琼脂粉0.6%的培养基中, 观察其萌发状况, 两个月后统计其结果。

1.2.2 培养基成分对初级培养成活率试验

pH值5.8 琼脂粉0.5%不变, 变动MS BA NAA 蔗糖及椰乳的比例, 设计10个试验配方见表1。

2 结果与分析

2.1 材料处理对初级培养成活率的影响

从试验结果看, 花叶开唇兰的初级培养成活率比

表1 试验配方表

Table 1 Experiment design table

培养基号 Number of medium	MS	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	蔗糖 Sucrose (%)	椰乳 Coconut milk (%)
1	1/2	1.0	0.2	3.5	10
2	1	1.0	0.5	3.5	10
3	1	3.0	0.5	2.0	10
4	1/2	1.0	0.2	3.5	0
5	1	1.0	0.5	2.0	0
6	1/2	3.0	0.2	2.0	0
7	1	3.0	0.5	3.5	0
8	1/2	1.0	0.2	2.0	20
9	1	1.0	0.5	2.0	20
10	1/2	3.0	0.2	3.5	20

较低(表2),究其原因有两点:一是植株生长于阴湿的环境,试验材料长期裸露在外,表面附带大量微生物,外植体易于污染杂菌;二是外植体经表面处理后,如不污染,则常常表现为接入的外植体不萌发,不生长、易褪绿,随后变软死亡。进一步的试验观察分析表明(见表3)消毒外植体的处理方法略有不同,试验结果表现出显著的差异。实验I表面消毒处理时保留外植体的叶鞘,平均污染率达59.33%,平均死亡

表2 外植体去除叶鞘与保留叶鞘的试验结果

Table 2 Experimental results of explants with and without leaf sheaths

试验内容 Trial	接入外植体总数 Total explants inoculated	死亡的外植体 Dead explant		污染的外植体 Polluted explant		成活的外植体 Growing explant	
		数量 Total	比率 Percentage (%)	数量 Total	比率 Percentage (%)	数量 Total	比率 Percentage (%)
去除叶鞘的外植体 Explant without leaf sheath	133	124	93.23	9	6.77	0	0
保留叶鞘的外植体 Explant with leaf sheath	110	82	74.55	18	16.36	10	9.09

表3 培养基成分对花卉开唇兰初级培养成活率的影响

Table 3 The influence of ingredients of medium on the survival rate of *A. roxburghii* in its primary culture

培养基 Medium	外植体处理 数量 Ex plant in trial		污染数及其百分比 Polluted total and rate(%)		死亡数及其百分比 Death total and mortality(%)		成活数及其百分比 Survival total and rate(%)	
	I *	II **	I *	II **	I *	II **	I *	II **
1	39	32	21(53.83)	3(9.38)	8(20.51)	24(75.00)	10(25.64)	5(15.63)
2	32	31	18(56.25)	1(3.23)	6(18.75)	30(96.77)	8(25.00)	0(0)
3	41	37	27(65.85)	4(10.81)	9(21.95)	31(83.78)	5(12.20)	2(5.41)
4	32	34	25(78.13)	3(8.82)	3(9.38)	29(85.29)	4(12.50)	2(5.88)
5	36	34	18(50.00)	3(8.82)	8(22.22)	26(76.47)	10(27.78)	5(14.71)
6	36	34	18(50.00)	8(23.53)	8(22.22)	23(67.65)	10(27.78)	3(8.82)
7	39	31	24(61.54)	7(22.58)	6(15.38)	22(70.97)	9(23.08)	2(6.45)
8	40	31	28(70.00)	4(12.90)	3(7.50)	26(83.87)	9(22.50)	1(3.23)
9	37	32	26(70.27)	8(25.00)	6(16.22)	24(75.00)	5(13.51)	0(0)
10	54	32	24(44.44)	2(6.25)	17(31.48)	28(87.50)	13(24.07)	2(6.25)
合计 Total	386	328	229(59.33)	43(13.11)	74(19.17)	263(80.18)	83(21.50)	22(6.71)

* 此实验批次在外植体表面消毒处理时保留外植体的叶鞘 Explants with leaf sheath during sterilizing.

** 此实验批次在外植体表面消毒处理时去除外植体的叶鞘 Explants without leaf sheath during sterilizing.

括号内的数字为百分比 Data in brackets are percentage.

率则为19.17%,平均成活率为21.50%,而实验II在表面消毒处理时去除外植体的叶鞘,平均污染虽下降到13.11%,但成活率仅为6.71%,死亡率高达80.18%,重复试验显示了相同的趋势(见表4)。

将实验I的统计结果绘制成图1,可以看到随着外植体污染率的上升,成活率呈低-高-低的态势,其峰值(成活率27.78%)出现在50%污染的实验号

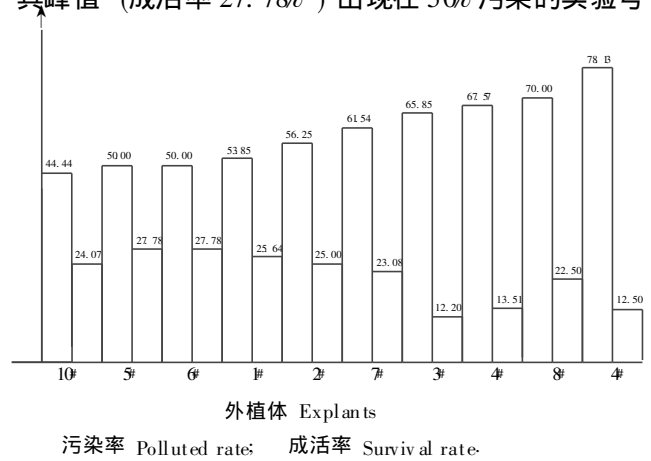


图1 外植体的污染率及成活率

Fig. 1 Polluted and survival rates of explants

表4 外植体采集时间对花叶开唇兰初级培养成活率的影响

Table 4 The influence of explant collecting time on the survival rate of *A. roxburghii* in its primary culture

试验批次 Trial	日期 Date	外植体处理数量 Explants in trial	污染数 Polluted total	污染率 Polluted rates (%)	死亡数 Death total	死亡率 Mortality (%)	成活数 Survival total	成活率 Survival rates (%)
I	1995-01-05	56	26	46.43	17	30.36	13	23.21
II	1995-03-11	35	12	34.29	17	48.57	6	17.14
III	1995-04-04	34	22	64.71	8	23.53	4	11.76
IV	1995-04-28	60	22	36.67	36	60.00	2	3.33
V	1995-05-11	29	20	68.97	7	24.14	2	6.89
VI	1995-05-30	61	41	67.21	13	21.31	7	11.48
VII	1995-06-19	30	23	76.67	5	16.67	2	6.66

中;外植体污染率高的实验号,虽死亡率下降了,但同时,成活率亦随之下降。这表明:外植体表面消毒处理的强度超过其承受能力,会导致外植体死亡率增加,成活率降低;而消毒处理的强度过弱,虽可使外植体死亡率下降,但由于污染率过高最终同样使成活率下降。

接入外植体易褪绿死亡的原因可能是该植物属草本单子叶植物,其肉质茎脆弱,抗消毒剂能力差。要提高其初级培养成活率应尽量不破坏其保护系统——叶鞘,以减少损伤程度并将外植体表面消毒控制在适当的强度。

2.2 培养基配方对初级培养成活率的影响

试验结果表明(见表3)培养基的组成对初级培养成活率影响不大,死亡率高萌发率低不是营养供给造成的,而可能是由试验材料自身遗传性状、生理结构引起的。

2.3 采种时间对初级培养成活率的影响

采种时间对成活率有一定的影响。1月份平均气温在广西南宁为全年最低的月份,此时初级培养成活率偏高(23.21%)且污染率偏低(46.43%);随着采种时间逐渐向高温月份推移,成活率逐渐下降,污染率逐渐上升,到6月份,初级培养成活率仅为6.67%。而污染率则高达76.67%(见表4),因此在月平均气温较低的月份采种是适宜的。资料表明花叶开唇兰属中山阴性植物,性喜温凉潮湿环境^[1],生长适

宜温度18℃~23℃,气温超过28℃生长受到抑制,而南宁1月份的气温条件与花叶开唇兰所处的发育阶段和生理状态较适宜其离体培养,同时温度偏低污染亦相对偏低,更有利于成活率的提高。

2.4 初级培养中芽的再生途径

花叶开唇兰植株矮小,呈根状茎伸长,全株6~8节,叶4~5片。根据笔者的经验,带顶芽者成活率最高,带叶鞘的节成活率次之,长出根的节成活率、萌芽率最低。所以试验中一般取4节,每一外植体带一节为宜,芽的再生有两种途径:一种是节间腋芽萌发伸长,逐渐形成主芽,继代时把主芽切割成带一个腋芽的茎段,继代系数2~2.5,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,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,它的继代系数比较高,可达3~4。若停止切割,每个原球茎就能长成一个完整的植株。但前一种再生途径形成的芽对外界气温的适应能力较强,后一种对气温适应性较差,遇28℃以上高温不但生长受抑制甚至出现大量死亡现象。

参考文献

- 1 陈裕,林坤瑞,管其宽等.金线莲生物学特性及生境特点的研究.亚热带植物通讯,1994,23(1):18-24.

(责任编辑:蒋汉明)