

海伦兜兰的无菌播种与快速繁殖

胡琦敏^{1,2}, 李勇毅³, 黄云峰^{1,2,*}, 胡仁传¹, 吴坤林⁴

¹广西壮族自治区中医药研究院, 南宁530022; ²广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁530022; ³自然科学博物馆, 台湾台中404; ⁴中国科学院华南植物园华南农业植物分子分析与遗传改良重点实验室, 广州510650

摘要: 本文研究了海伦兜兰(*Paphiopedilum helenae*)的无菌播种与快速繁殖, 结果表明: 提高海伦兜兰种子萌发率较好的预处理方法是用0.1 mol·L⁻¹ KOH处理10min; 最适合海伦兜兰种子萌发的培养基为1/4MS+0.1% (m/V)活性炭+60 g·L⁻¹香蕉(*Musa nana*), 种子萌发率达69.4%; 最适合丛生芽诱导的培养基为1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+2.0 mg·L⁻¹萘乙酸(NAA)+0.1%活性炭+60 g·L⁻¹香蕉; 最适合生根壮苗的培养基为MS+60 g·L⁻¹马铃薯(*Solanum tuberosum*)或MS+30 g·L⁻¹香蕉。

关键词: 海伦兜兰; 种子; 无菌播种

海伦兜兰(*Paphiopedilum helenae*)为兰科(Orchidaceae)兜兰属植物, 株型矮小, 花金黄色, 极具观赏价值, 是杂交的好亲本, 也是园艺栽培中不可多得的种质资源。海伦兜兰分布于越南北部高平省及中国的中越边境一带, 最先由Averyanov (1996)发表, 发表当年即遭大规模商业采集, Averyanov等(1996)估计在该新种发表后的几星期内就有15 000~20 000苗野生植株被采集并通过非法渠道输送到国际市场出售, 野生种群遭受破坏非常严重(黄云峰和薛跃规2007)。海伦兜兰结实率极低, 其种子在自然环境下极难萌发, 主要通过分蘖繁殖, 因此, 其种质资源较少。利用无菌播种可以快速繁殖出大量兜兰种苗, 以满足市场需求, 从而缓解野生资源面临的压力。有关兜兰的无菌播种已有一些报道(Zeng等2016), 周艳等(2013)和丁长春等(2011)利用硬叶兜兰(*P. micranthum*)种子进行无菌播种获得大量试管苗。王莲辉等(2008)和刘其府等(2012)对同色兜兰(*P. concolor*)种子进行了非共生萌发实验。田凡等(2014)以白花兜兰(*P. emersonii*)种子为外植体, 研究了种子胚萌发、继代增殖和生根技术, 组培苗移栽成活率可达96%。曾宋君等(2006)对带叶兜兰(*P. hirsutissimum*)进行了无菌播种并获得大量组培苗, 移栽后的组培苗成活率达75%以上。Zeng等(2012)对彩云兜兰(*P. wardii*)的无菌播种、组织培养和自然回归进行了系统的研究。我国目前对海伦兜兰的无菌播种和组织培养快速繁殖的研究较少, 仅有一例无菌播种的报道(Lee 2007)。本研究以海伦兜兰种子为外植体进行无菌播种, 进而对丛生芽的诱导和生根进行研究, 为其应用繁殖和保护提供技术支持。

材料与方法

1 实验材料

所用实验材料海伦兜兰(*Paphiopedilum helenae* Aver.)蒴果采自广西那坡县。

2 实验方法

2.1 外植体消毒

将成熟未开裂的海伦兜兰蒴果采回后, 用自来水冲洗表面尘土20 min, 再用洗洁精清洗蒴果表面后, 置于超净工作台上, 用75% (V/V)酒精浸泡30 s, 0.1%的升汞(HgCl₂)加两滴吐温20浸泡20 min, 无菌水冲洗4~5次, 备用。

2.2 培养基制备

根据实验目的不同使用不同的培养基: 添加不同浓度的6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)和萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA), 附加不同浓度的香蕉(*Musa nana*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、30 g·L⁻¹食用蔗糖和7 g·L⁻¹琼脂, 灭菌前调pH至6.5, 配制分装后, 于121°C灭菌20 min。

2.3 种子预处理

在超净工作台上, 将消毒过的蒴果置于培养皿中, 切开果荚取出种子。将种子分成两组, 一组用0.1 mol·L⁻¹ NaOH浸泡, 另一组用0.1 mol·L⁻¹ KOH浸泡, 每组再分为8小组, 分别浸泡5、10、15、20、25、30、45和60 min, 无菌水清洗3次, 接种于1/2MS培养基中[添加0.1% (m/V)活性炭和60

收稿 2016-06-20 修定 2016-08-05

资助 国家重点研发计划项目(2016YFC0503104)、广西自然科学基金(2012GXNSFBA053079)和南宁市青秀区科学研究与技术开发计划课题(2013S13)。

* 通讯作者(E-mail: huangyunfeng2000@126.com)。

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉], 每个处理小组接种5瓶。观察种子的萌发情况, 萌发以胚突破种皮形成白色原球茎为准, 萌发率的统计方法为: 在显微镜下取不同视野统计100粒种子中的萌发粒。

2.4 种子萌发

将用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH浸泡10 min的处理组接种于MS、1/2MS和1/4MS培养基中(添加0.1%活性炭和 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉), 每个处理小组接种5瓶, 统计萌发率。

2.5 丛生芽的诱导

将萌发的原球茎转接到丛生芽的诱导培养基中, 以1/2MS为基本培养基, 添加 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的香蕉和0.1%活性炭, 比较不同浓度的6-BA (0.5、1.0和 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和NAA(0.2、0.5、1.0和 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对海伦兜兰原球茎诱导丛生芽的影响, 每个处理组接种30个原球茎, 重复2次, 在超净工作台中统计诱导的芽苗数。

2.6 生根壮苗

当小苗长出2~3片叶子、叶长1~1.5cm时便可转接到生根壮苗培养基中, 以MS为基本培养基, 比较不添加添加物(空白组)和添加不同浓度的马铃薯(30 和 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和香蕉(30 和 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)对海伦兜兰生根壮苗的影响, 每个处理组接种10株小苗, 统计生根壮苗后小苗的叶片数量、叶片长度、根数及根长。

2.7 培养条件

MS培养基添加3% (m/V)蔗糖和 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂; 1/2MS培养基添加2%蔗糖和 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, 培养室温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 无菌播种后先暗培养7 d, 然后转到光照培养, 种子萌发和芽分化培养每天光照12 h, 生根壮苗培养每天光照14 h。

2.8 数据处理分析

实验数据采用SPSS 13.0和Excel 2007软件进行统计分析。

实验结果

1 不同预处理对海伦兜兰种子萌发的影响

将种子撒播在培养基表面, 隔5 d观察一次, 播种后60 d统计萌发率。从表1可以看出, NaOH处理组中, 海伦兜兰种子萌发率随着处理时间的增加先增高再降低, 当种子处理45 min时, 种子萌发率

表1 不同预处理条件对海伦兜兰种子萌发率的影响

Table 1 Effect of various pretreatment conditions on the germination percentage of *P. helenae* mature seeds

处理时间/min	用不同材料处理的种子萌发率/%	
	$0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH	$0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH
5	0.8 ^f	4.2 ^e
10	2.6 ^f	44.0 ^b
15	6.2 ^e	24.2 ^b
20	11.8 ^d	2.4 ^e
25	21.2 ^c	0 ^d
30	25.4 ^b	0 ^d
45	37.0 ^a	0 ^d
60	25.6 ^b	0 ^d

同列数据后不同小写字母标识表示差异显著($P<0.05$), 下同。

与其他处理组的萌发率差异显著, 最高达37%; 在KOH处理组中, 海伦兜兰种子萌发率也是随着处理时间的增加先增高再降低, 当处理10 min时种子萌发率与其他处理组的萌发率差异显著, 达44.0%, KOH处理25 min以上时, 种子萌发率为0。由此可见, 海伦兜兰种子较好的预处理方法是用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH处理10 min。

2 不同培养基对海伦兜兰种子萌发的影响

将经过预处理的种子散播在添加0.1%活性炭和 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉的MS、1/2MS和1/4MS培养基中, 40 d后种子萌发成原球茎(图1-A), 60 d后统计种子萌发率及原球茎生长情况。由表2可见, 各培养基中的种子萌发率差异显著, 其中1/4MS培养基中的种子萌发率最高、原球茎较大且原球茎颜色由白色转为绿色, 因此, 最适合海伦兜兰种子萌发的培养基为1/4MS+0.1%活性炭+ $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉。

3 不同植物生长调节剂水平对海伦兜兰丛生芽诱导的影响

将原球茎接种于丛生芽诱导培养基中, 原球茎分化成丛生芽(图1-B), 60 d后统计诱导的芽数。由表3可知, 在不同植物生长调节剂水平配比的情况下, 海伦兜兰诱导的丛生芽数量差异显著。当NAA浓度相同时, 低浓度的6-BA有利于芽的诱导; NAA浓度越大, 诱导的丛生芽数越多, 说明较高浓度的NAA有利于丛生芽的诱导。10和11号培养基诱导的芽数差异不显著, 但考虑到成本问题, 我们选择10号培养基作为丛生芽诱导的最适合培养基。因此, 海伦兜兰丛生芽诱导的最适合培养基

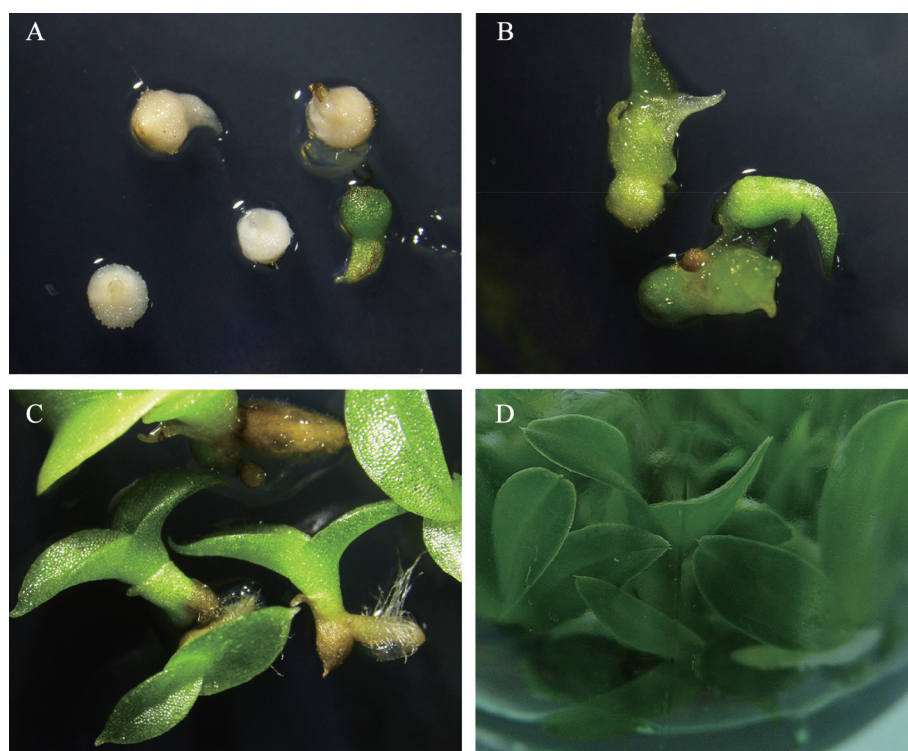


图1 海伦兜兰的无菌播种与快速繁殖

Fig.1 Aseptic seeding and rapid propagation of *P. helenae*

A: 无菌播种2个月后种子萌发成原球茎; B: 原球茎诱导丛生芽; C: 叶片的生长及根的分化; D: 生根壮苗培养后可以出瓶的小苗。

表2 不同培养基对海伦兜兰种子萌发的影响

Table 2 Effects of basal media on seed germination and protocorm formation of *P. helenae*

培养基	种子萌发率/%	原球茎生长情况
MS	22.8 ^c	大、白色
1/2MS	46.8 ^b	大、绿色
1/4MS	69.4 ^a	大、绿色

为1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+2.0 mg·L⁻¹ NAA+0.1% 活性炭+60 g·L⁻¹香蕉。

4 不同添加物对海伦兜兰生根壮苗的影响

将芽接种于生根壮苗培养基上,小苗分化出根(图1-C),接种50 d后统计叶片数量、叶片长度、生根数量及根长(图1-D)。从表4可以看到,海伦兜兰在添加马铃薯和香蕉的培养基中在叶片数量和生根条数上没有显著性差异,而在叶片长度和根长上有显著性差异。在添加60 g·L⁻¹马铃薯和30 g·L⁻¹香蕉的培养基中,海伦兜兰生长较好,叶片长度和根长较长且差异不显著,但与其他组差异显著,我们在海伦兜兰的生根壮苗阶段中可根据实

际情况添加马铃薯或者香蕉。因此,海伦兜兰生根壮苗的最适合培养基为MS+60 g·L⁻¹马铃薯或MS+30 g·L⁻¹香蕉。

讨 论

兰科种子非常细小,无胚乳,自身所含的营养物质极少,在自然环境中需要与真菌共生才能萌发。兜兰在进行无菌播种时,由于兰科成熟的种子形成了一层不可渗透种皮,阻碍了水分和营养物质的吸收,同时,在种子中可能存在抑制种子萌发的物质,或缺少促进种子萌发的激素。因此,在进行无菌播种前,对兜兰种子进行预处理有利于种子的萌发。一般对种子进行预处理的溶液有NaClO、NaOH、KOH等,这些溶液能破坏种皮,增加种皮的通透性或者减少种皮中抑制物质的含量(Lee 2007)。刘其府等(2012)利用含0.5%有效氯的NaClO溶液处理同色兜兰成熟种子50 min,萌发率可达69%。丁长春等(2011)用10%的84消毒液处理硬叶兜兰的种子11 min,种子萌发率高达40%。Lee (2007)采用1%次氯酸钠溶液处理巨瓣兜兰(*P.*

表3 不同植物生长调节剂水平对海伦兜兰丛生芽诱导的影响

Table 3 Effect of different hormone combinations on induction of multiple shoots of *P. helenae*

培养基编号	不同植物生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹		接种原球茎数量/个	分化的芽数量/个
	6-BA	NAA		
1	0.5	0.2	30	31.0 ^{def}
2	1.0	0.2	30	30.5 ^{def}
3	2.0	0.2	30	27.0 ^f
4	0.5	0.5	30	32.5 ^{de}
5	1.0	0.5	30	29.0 ^{ef}
6	2.0	0.5	30	30.5 ^{def}
7	0.5	1.0	30	37.5 ^{bc}
8	1.0	1.0	30	32.5 ^{de}
9	2.0	1.0	30	32.5 ^{de}
10	0.5	2.0	30	44.5 ^a
11	1.0	2.0	30	41.5 ^{ab}
12	2.0	2.0	30	34.5 ^{cd}

表4 不同添加物对海伦兜兰生根壮苗的影响

Table 4 Effect of organic supplements on seedling growth *in vitro* of *P. helenae*

添加物	叶片数量/片	叶片长度/cm	根数量/条	根长/cm
空白对照	3.6 ^a	2.7 ^c	3.1 ^a	3.2 ^c
30 g·L ⁻¹ 马铃薯	4.2 ^a	3.6 ^b	3.3 ^a	4.1 ^b
60 g·L ⁻¹ 马铃薯	4.5 ^a	4.2 ^a	3.8 ^a	5.2 ^a
30 g·L ⁻¹ 香蕉	4.4 ^a	4.6 ^a	4.2 ^a	5.5 ^a
60 g·L ⁻¹ 香蕉	4.1 ^a	4.4 ^a	3.8 ^a	4.7 ^{ab}

bellatulum)、*P. godefroyae*、*P. niveum*、海伦兜兰、亨利兜兰(*P. henryanum*)和*P. spicerianum*种子60~75 min, 种子萌发率均得到提高。本实验利用NaOH和KOH溶液对海伦兜兰种子进行预处理, 其中KOH溶液对海伦兜兰种子处理的时间相对较短, 处理10 min后种子萌发率可达44%, 因此, 我们选用KOH溶液处理10 min作为海伦兜兰种子预处理的最好方法; 但由于KOH腐蚀性较强, 处理25 min种子萌发率为0, 因此, 我们在用KOH处理种子时必须严格控制好时间。

在兜兰的组织培养中, 培养基的盐分组成和盐浓度是影响种子发育及原球茎生长的重要因素。本研究发现较低盐浓度的培养基(1/4MS)较适合海伦兜兰种子的萌发, 种子萌发率可达69.4%, 原球茎大且易转绿。丁长春等(2004)研究发现, 杏黄兜兰(*P. armeniacum*)的种子适宜在较低盐浓度下萌发, 在MS、RE、1/5MS和改良花宝1号培养基的对比实验中, 以1/5MS中的种子萌发率最高, 可

达到42.5%。陈之林等(2004)也发现低盐浓度的培养基较适宜杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子萌发。刘其府等(2012)将同色兜兰种子播种于MS、1/2MS、1/4MS、1/8MS、KC、VW、RE、GD、H26和H16培养基中, 结果发现其在1/4MS培养基上的萌发率最高, 而在之后的原球茎培养中发现, VW和1/8MS上的原球茎生长状况较差。由此可见, 虽然低盐浓度的培养基较适合兜兰种子萌发, 但过低的盐浓度会造成营养成分不够全面而影响原球茎的生长。

在海伦兜兰原球茎诱导丛生芽培养阶段, 本实验进行了不同浓度的6-BA和NAA配比实验, 结果发现较低浓度的6-BA和较高浓度的NAA配合使用有利于丛生芽的诱导, 这与杨燕萍等(2011)对亨利兜兰的培养相似, 即在培养基中添加0.2 mg·L⁻¹ 6-BA和2.0 mg·L⁻¹ NAA时丛生芽增殖倍数最高。但周艳等(2013)对硬叶兜兰的培养发现, 在培养基中添加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA和0.5 mg·L⁻¹ NAA, 原球茎

分化增殖倍数最高, 芽生长健壮。曾宋君等(2006)在带叶兜兰的原球茎增殖分化成苗阶段的培养基中添加较高浓度的6-BA和较低浓度的NAA, 分化生长的苗较粗壮。同是兜兰属的植物, 但对植物植物生长调节剂的需求不同, 可能是由于不同植物之间所含的内源激素不同所致。

椰乳、香蕉、马铃薯等添加物在兰科组织培养中运用的比较常见, 根据不同的植物添加不同浓度的添加物, 均对培养结果有较大的影响。在本实验的生根壮苗阶段, 海伦兜兰小苗在添加香蕉和马铃薯的培养基中比不添加香蕉和马铃薯的培养基中生长更为健壮。

参考文献

- Averyanov LV (1996). *Paphiopedilum helenae* (Orchidaceae), a new slipper orchid from the North Vietnam. *Ботанический журнал*, 81 (9): 105–110
- Averyanov LV, Nguyen TH, Phan KL, Dzuong DH (1996). Endangered Vietnamese paphiopedilums: 1. *Paphiopedilum helenae*. *Orchids*, 65 (10): 1062–1068
- Chen Z, Ye X, Liang C, Duan J (2004). Seed germination in vitro of *Paphiopedilum armeniacum* and *P. micranthum*. *Acta Horticult Sin*, 31 (4): 540–542 (in Chinese with English abstract) [陈之林, 叶秀芬, 梁承邺, 段俊(2004). 杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子试管培养. *园艺学报*, 31 (4): 540–542]
- Ding CC, Li L, Xia NH (2011). Aseptic sowing and *in vitro* seeding culture of *Paphiopedilum micranthum* T. Tang & F.T. Wang. *Northern Hortic*, (5): 115–117 (in Chinese with English abstract) [丁长春, 李蕾, 夏念和 (2011). 硬叶兜兰的无菌播种和试管成苗. *北方园艺*, (5): 115–117]
- Ding CC, Yu H, Liu FY (2004). Factors affecting the germination of *Paphiopedilum armeniacum*. *Acta Bot Yunnan*, 26 (6): 673–677 (in Chinese with English abstract) [丁长春, 虞泓, 刘方媛 (2004). 影响杏黄兜兰种子萌发的因素. *云南植物研究*, 26 (6): 673–677]
- Huang YF, Xue YG (2007). Conservation status of *Paphiopedilum helenae* Aver., a newly recorded orchid in China. *Acta Phytotaxon Sin*, 45 (3): 333–336 (in Chinese with English abstract) [黄云峰, 薛跃规(2007). 中国新分布种海伦兜兰的濒危状况. *植物分类学报*, 45 (3): 333–336]
- Lee YI (2007). The asymbiotic seed germination of six *Paphiopedilum* species in relation to the time of seed collection and seed pretreatment. *Acta Horticult*, 755: 381–385
- Liu QF, Fu YY, Zeng SJ, Wu KL, Zhang JX, Duan J (2012). Test on asymbiotic seed germination of *Paphiopedilum concolor* (Bateman) Pfitz. *Guangdong Agric Sci*, (12): 47–49 (in Chinese with English abstract) [刘其府, 傅燕艳, 曾宋君, 吴坤林, 张建霞, 段俊(2012). 同色兜兰种子非共生萌发实验. *广东农业科学*, (12): 47–49]
- Tian F, Jiang YL, Luo ZQ, Wang LH (2014). Asymbiotic germination and *in vitro* seeding cultivation of *Paphiopedilum emersonii*. *Guizhou For Sci Technol*, 42 (3): 34–38 (in Chinese with English abstract) [田凡, 姜运力, 罗在柒, 王莲辉(2014). 白花兜兰种子无菌萌发及试管成苗技术研究. *贵州林业科技*, 42 (3): 34–38]
- Wang LH, Jiang YL, Yu JY, Luo ZQ, Chen JY (2008). Tissue culture and rapid propagation of *Paphiopedilum concolor* (Bateman) Pfitz. *Plant Physiol Commun*, 44 (6): 1171–1172 (in Chinese) [王莲辉, 姜运力, 余金勇, 罗在柒, 陈景艳(2008). 同色兜兰的组织培养与快速繁殖. *植物生理学通讯*, 44 (6): 1171–1172]
- Yang Y, Xu X, Yao L, Lin X, Zhang Q, Zhang X, Huang J (2011). Meristem-tip induction and *in vitro* rapid proliferation experiments of *Paphiopedilum henryanum*. *Bull Agric Sci Technol*, (4): 53–55 (in Chinese) [杨燕萍, 徐晓薇, 姚丽娟, 林霞, 张庆良, 张旭乐, 黄建(2011). 亨利兜兰茎尖诱导与离体快繁试验. *农业科技通讯*, (4): 53–55]
- Zeng S, Huang W, Wu K, Zhang J, da Silva JAT, Duan J (2016). *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Crit Rev Biotechnol*, 36 (3): 521–534
- Zeng S, Wu K, da Silva JAT, Zhang J, Chen Z, Xia N, Duan J. (2012) Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Sci Horticult*, 138: 198–209
- Zeng SJ, Chen ZL, Duan J (2006). Asepsis sowing and *in vitro* propagation of *Paphiopedilum hirsutissimum* Pfitz. *Plant Physiol Commun*, 42 (2): 247 (in Chinese) [曾宋君, 陈之林, 段俊(2006). 带叶兜兰的无菌播种和离体快速繁殖. *植物生理学通讯*, 42 (2): 247]
- Zhou Y, Zhou HY, Zhu L, Zhou Q (2013). Aseptic germination and rapid propagation of *Paphiopedilum micranthum* Tang. *Guizhou Sci*, 31 (5): 79–82 (in Chinese with English abstract) [周艳, 周洪英, 朱立, 周庆(2013). 硬叶兜兰的无菌播种和离体快速繁殖. *贵州科学*, 31 (5): 79–82]

Aseptic seeding and rapid propagation of *Paphiopedilum helenae*

HU Qi-Min^{1,2}, LI Yong-Yi³, HUANG Yun-Feng^{1,2,*}, HU Ren-Chuan¹, WU Kun-Lin⁴

¹Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China; ²Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China; ³Museum of Natural Science, Taizhong, Taiwan 404, China;

⁴Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Gene Improvement, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

Abstract: In this study, we investigated aseptic seeding and rapid propagation of *Paphiopedilum helenae*. The results show that the best method for pretreatment of *P. helenae* seeds was to soak them into 0.1 mol·L⁻¹ KOH for 10 min; the best medium for seeds germination was 1/4MS+0.1% (m/V) activated carbon (AC)+ 60 g·L⁻¹ banana (*Musa nana*), and the germinating rate was up to 69.4%; the best medium for multiple shoots induction was 1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-benzylaminopurine (6-BA)+2.0 mg·L⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid (NAA)+0.1% AC+60 g·L⁻¹ banana; the best medium for rooting and growth of plantlet was MS+60g·L⁻¹ potato (*Solanum tuberosum*) or MS+30 g·L⁻¹ banana.

Key words: *Paphiopedilum helenae*; seed; aseptic seeding

Received 2016-06-20 Accepted 2016-08-05

This work was supported by the National Key Research Project of China (Grant No. 2016YFC0503104), the Natural Science Fund Project of Guangxi (Grant No. 2012GXNSFBA053079), and Nanning Scientific Research and Technology Development Project (Grant No. 2013S13).

*Corresponding author (E-mail: huangyunfeng2000@126.com).