

金线莲丛生芽诱导研究

阚世超¹, 张明胜², 李花¹ (1. 贵州大学生命科学学院, 贵州贵阳550025; 2. 贵州大学生命科学实验教学中心, 贵州贵阳550025)

摘要 [目的] 为提高金线莲的繁殖系数。[方法] 以金线莲为材料, 以MS为基本培养基, 设置不同的激素组合, 进行分化增殖培养, 定期观察并记录结果。[结果] 升汞浓度和消毒时间是金线莲无菌体系建立的重要影响因素。不同消毒方式对金线莲启动培养的污染率极显著差异, 褐变率有显著差别。金线莲启动培养最佳消毒方式为: 75%酒精消毒30s + 0.15%升汞消毒4min。不同激素浓度及配比对丛生芽诱导的影响差异极显著。培养基中附加6-BA 1.0 ng/L + 2,4-D 0.10 ng/L较其他培养基对丛生芽诱导有极显著差异, 增殖1.1667倍。筛选出的丛生芽诱导最佳培养基为MS + 6-BA 1.0 ng/L + 2,4-D 0.1 ng/L + 3%蔗糖 + 7g/L琼脂。[结论] 得到了适宜的诱导金线莲丛生芽的培养基。

关键词 金线莲; 丛生芽; 诱导

中图分类号 S603.6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)03-00981-02

Induction of Adventitious Buds of *Anoectochilus roxburghii*

KAN Shi-chao et al. (College of Life Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025)

Abstract [Objective] The aim was to improve the propagation coefficient of *Anoectochilus roxburghii*. [Method] With *A. roxburghii* as material and MS medium as basic medium, different combinations of hormone were set up for differentiation and propagation culture. The regular observation was made and the result was recorded. [Result] The chloride hydrargyrum concn. and disinfection time were the main influencing factors for the establishment of aseptic system of *A. roxburghii*. The contamination rate of different disinfection methods for the initiation culture of *A. roxburghii* showed a very significant difference and its browning rate had a very significant difference. The optimal disinfection method for the initiation culture of *A. roxburghii* was disinfection with 75% ethanol for 30 s + 0.15% chloride hydrargyrum for 4 min. The effects of different hormone concn. and their combinations on the induction of adventitious buds showed a very significant difference. Medium supplemented with 6-BA 1.0 ng/L + 2,4-D 0.10 ng/L had a very significant difference with other mediums and the proliferation was 1.1667 times. The optimum medium screened out for adventitious buds was MS + 6-BA 1.0 ng/L + 2,4-D 0.1 ng/L + 3% saccharose + 7g/L agar. [Conclusion] The optimum medium for the induction of *A. roxburghii* adventitious buds was obtained.

Key words *Anoectochilus roxburghii*; Adventitious buds; Induction

金线莲 [*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lind] 为兰科, 开唇兰属花叶开唇兰^[1], 全草入药, 在民间素有“金草”、“神药”、“乌人参”等美称^[2], 是福建、台湾等省和东南亚地区的珍稀名贵药材。由于它具有解热、止血等功效, 近年来在治疗高血压、糖尿病等疑难病症方面日益受到医药界的广泛重视。但是, 金线莲种子微小, 胚发育不完全, 在自然条件下极难出芽^[3]; 若以分根或扦插繁殖, 则耗时长且繁殖系数低, 同时其野生资源逐年减少, 而利用组织培养进行繁殖可以保存种源及适应于商品化生产。鉴于此, 笔者探讨了合理的培养组合因子对金线莲生长分化的影响, 旨在提高其繁殖系数。

1 材料与方法

1.1 材料 金线莲, 购于云南。

1.2 方法

1.2.1 外植体处理。 取生长良好的金线莲植株, 用自来水洗净, 再流水冲洗2h后进行表面消毒, 消毒方法是用75%酒精浸泡30s后, 用无菌水冲洗1遍, 再用不同浓度的升汞(0.05%、0.10%、0.15%)处理不同的时间(4、8、12min), 最后用无菌水充分浸泡冲洗3遍。外植体消毒后用无菌滤纸吸干水分, 将植株切成长约1cm带节茎段, 接入培养基中。

1.2.2 试验设计。 在参考文献[4-6]和预试验的基础上, 以MS为基本培养基, 设置不同浓度的激素组合, 各组合均添加琼脂7g/L, 蔗糖3%, 灭菌前pH值调至5.8, 120~125℃灭菌20min。初代培养以诱导不定芽萌发为主要目的, 因此应选择高浓度的细胞分裂素, 配以较低浓度的生长素。该试验选择常用的细胞分裂素6-BA, 浓度为2.0 ng/L, 以及生长素NAA, 浓度为0.1 ng/L。用解剖刀切掉金线莲两端, 再

分割成长约0.5~0.8cm的带节茎段, 接种到培养基上, 每个处理6段, 重复4次。培养4d后统计污染率, 7d后统计褐变率。培养条件:(23±1)℃, 2000lx, 光照时间为12h/d。

1.2.3 金线莲丛生芽诱导。 以初代培养的金线莲苗为材料进行分化增殖培养, 培养目的是繁殖大量有效的芽和苗。为考察NAA、2,4-D对金线莲丛生芽诱导的影响, 在1.0、2.0、3.0 ng/L 6-BA的基础上, 分别添加0.05、0.10 ng/L的NAA、2,4-D, 共12种培养基。取金线莲无菌苗, 剪掉茎节部位的所有叶片, 只留带节茎段, 将茎分割成长0.5~0.8cm的带节段, 接种到12种培养基中, 每个处理接种6~9段, 重复3次, 定期观察并记录结果, 28d统计结果。

1.3 数据处理 采用DPS7.05统计软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方式对金线莲启动培养的影响 以金线莲茎段为外植体诱导不定芽的萌发, 建立金线莲组织培养的无菌体系。接种3d后开始出现污染及部分表面褐变现象, 污染率、褐变率见表1。由表1可知, 不同消毒方式下的金线莲启动培养外植体的污染率达到了0.01极显著水平, 褐变率达到了0.05显著水平。因此, 升汞浓度和消毒时间是金线莲无菌体系建立的重要影响因素。从污染率与褐变率综合考虑, 金线莲启动培养外植体的最佳消毒方式为: 75%酒精浸泡30s, 0.15%升汞消毒4min。

2.2 不同激素浓度及配比对金线莲丛生芽诱导的影响 由表2可知, 不同激素浓度及配比对丛生芽诱导的影响差异极显著(P<0.01)。培养基7与其他11种培养基在诱导丛生芽上差异达0.01极显著水平。培养基3、6、11之间0.01水平差异不显著, 培养基8、9、10之间0.01水平差异不显著, 0.05水平差异显著。培养基2、12之间0.01水平差异不显著, 0.05水平差异显著。由此筛选出金线莲丛生芽诱导的最佳

作者简介 阚世超(1972-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向: 植物生理学。

收稿日期 2008-10-15

培养基为:MS + 6-BA 1.0 ng/L + 2,4-D 0.1 ng/L + 蔗糖3% + 琼脂7 g/L。

表1 不同消毒方式对金线莲启动培养的影响

Table 1 Effects of different disinfection methods on initiation culture of *A. roxburghii*

升汞浓度 % Mercuric chloride concentration	消毒时间 min Disinfection time	接种数 个 Inoculation number	污染数 个 Pollution number	污染率 % Pollution rate	褐变数 个 Browning number	褐变率 % Browning rate
0.05	4	20	16	80.00 A	0	0 b
0.10	8	27	12	44.40 ABC	3	11.11 b
0.15	12	29	0	0 C	14	48.28 a
0.15	8	24	5	20.83 BC	6	25.00 b
0.05	12	26	12	46.15 ABC	1	3.85 b
0.10	4	28	19	67.86 AB	0	0 b
0.10	12	31	6	19.35 BC	1	3.23 b
0.15	4	28	2	7.14 C	0	0 b
0.05	8	27	9	33.33 ABC	0	0 b

注:同列不同大写字母表示差异极显著,不同小写字母表示差异显著。下同。

Note: Different capital letters in a row mean extremely significant differences, different lowercases mean significant differences. The same as follows.

表2 不同激素浓度及配比对金线莲丛生芽诱导的影响

Table 2 Effects of different hormone concentrations and proportions on adventitious bud induction of *A. roxburghii*

培养基 Culture medium	6-BA ng/L	NAA ng/L	2,4-D ng/L	接种数 个 Inoculation number	芽数 个 Bud number	增殖倍数 Multiplication multiple
1	1.0	0.05		24	15	0.625 0 ± 0.125 0 fD
2	1.0	0.10		24	19	0.750 0 ± 0.125 0 efCD
3	2.0	0.05		24	22	1.000 0 ± 0.125 0 abcABC
4	2.0	0.10		24	8	0.333 3 ± 0.072 2 gE
5	3.0	0.05		25	22	1.041 7 ± 0.072 2 abAB
6	3.0	0.10		24	22	0.958 3 ± 0.072 2 bcdABC
7	1.0		0.10	24	28	1.166 7 ± 0.072 2 aA
8	1.0		0.05	24	19	0.791 7 ± 0.072 2 defBCD
9	2.0		0.10	21	18	0.863 0 ± 0.143 4 bcdeBCD
10	2.0		0.05	23	19	0.827 3 ± 0.067 6 cdeBCD
11	3.0		0.10	22	22	1.006 0 ± 0.134 1 abcABC
12	3.0		0.05	26	20	0.773 3 ± 0.104 1 defCD

3 小结与讨论

有学者研究金线莲离体繁殖时,以MS作为基本培养基诱导器官的分化^[7-8]。也有学者以B₅或改良MS培养基作为诱导器官分化的基本培养基^[9]。毛碧增等在比较18种培养基诱导金线莲茎段产生丛生芽的能力后,发现以MS为基本培养基,添加BA 1.5 ng/L、NAA 0.15 ng/L的组合为诱导茎段的最佳组合^[8]。何云芳等试验证明,BA最适浓度为4.0 mg/L, NAA 0.3 mg/L和GA₃ 0.3 mg/L对丛生芽的生成和伸展有较好的效果^[10];高燕等研究发现,金线莲在继代增殖培养过程中加入一定量的KT可促进芽的分化和增殖,还发现

金线莲对6-BA不敏感,当培养基中的6-BA浓度达到4.0 mg/L时仍未出现畸形苗,但在培养过程中6-BA有积累效应,应根据苗的长势确定6-BA的用量^[9]。该研究采用MS + 6-BA 1.0 ng/L + 2,4-D 0.1 ng/L + 蔗糖3% + 琼脂7 g/L诱导金线莲丛生芽的发生,获得了满意的结果。

参考文献

- [1] 陈裕,林坤瑞,管其宽.野生花叶开唇兰、大斑叶资源调查研究初报[J].亚热带植物通讯,1990(2):61.
- [2] 郑纯,黄以钟.金线莲文献考证,原植物及商品调查[J].中草药,1996,27(3):269.
- [3] 陈裕,林坤瑞,管其宽,等.金线莲若干栽培技术研究[J].亚热带植物通讯,1994,23(11):46-51.
- [4] 吴坤林.金线莲快繁及工厂化生产中间试验[J].药用植物栽培,1997,20(12):595-597.
- [5] 曹天旭,廉美兰,朴炫春,等.外部因子对金线莲丛生芽增殖和发根的影响[J].延边大学农学学报,2004,26(2):109-112.
- [6] 李海鹰,王桂文,范嘉晔,等.影响花叶开唇兰原球茎与丛生芽形态建成、生根与移栽因素的试验研究[J].广西科学,1999,6(3):235-237.
- [7] 邱瑾,刘慧明,黄圣明.6-BA与IBA组合对金线莲器官诱导的影响[J].三明师专学报,1998(2):51-53.
- [8] 毛碧增,娄沂春,蔡素琴,等.金线莲的快速繁殖[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,1999,25(5):527-528.
- [9] 高燕,白燕冰,赵云翔.金线莲组织培养几种培养基的筛选[J].热带农业科技,2004,27(3):12-14.
- [10] 何云芳,杨霞,余有祥,等.金线莲组培快繁技术[J].浙江林学院学报,1999,16(2):170-174.
- [11] 吴荣哲,吴松权.金线莲驯化过程中光照强度(PPFD)对生长及光合速率的研究[J].安徽农业科学,2008,36(35):15505-15506,15515.
- [12] 孔琼,袁盛勇,张庭香,等.药用植物台湾金线莲快繁技术研究[J].安徽农业科学,2008,36(6):2272,2278.
- [13] 杨柏云,高荫榆,李春华,等.金线莲原球茎的诱导与快速繁殖[J].安徽农业科学,2008,36(10):3999-4001.