

李 光,龚 宁,余 霜. 金线兰根状茎试管苗丛生芽高效增殖体系[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):52-53.

金线兰根状茎试管苗丛生芽高效增殖体系

李 光^{1,2}, 龚 宁¹, 余 霜²

(1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550001; 2. 安顺学院化学与生物农学系, 贵州安顺 561000)

摘要:以金线兰试管苗茎段为材料,用正交设计法研究不同激素处理对金线兰试管苗丛生芽的诱导及分化过程的影响,建立了金线兰试管苗丛生芽高效增殖体系。结果表明,植物生长调节物质 KT 是诱导丛生芽增殖的关键因素。金线兰根状茎培养腋芽增殖的最佳培养条件为:MS+6-BA 3.0 mg/L+KT 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L,增殖倍率高达 4.800。

关键词:金线兰;根状茎;丛生芽;增殖

中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0052-01

金线兰 [*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl], 为兰科开唇兰属植物,全草入药,是民间珍稀名贵的中草药,具有广阔的开发利用前景^[1]。兰科种子发芽率普遍较低,金线兰种子自然发芽率甚至不到 0.1%,依靠自然繁殖已无法满足人们的需求,组织培养是保护濒危植物的有效技术手段,可在极短的时间里繁殖出大量新生植株,对解决金线兰自然资源保护和合理利用具有现实意义。金线兰根状茎试管苗繁殖主要通过丛生芽增殖和原球茎增殖 2 种方式进行,虽然原球茎增殖倍率较高,但易出现褐化、玻璃化等问题^[2],采用金线兰根状茎初代培养基诱导的丛生芽增殖倍率又相对较低,急需开展金线兰丛生芽增殖方面的研究。本研究探讨了 3 种生长调节剂物质对金线兰试管苗增殖中的作用效果,为金线兰工厂化种苗生产探索成苗快、操作方便的试管芽苗增殖方法。

1 材料与方法

1.1 材料

金线兰根状茎试管苗由贵州师范大学生命科学学院组培室提供。金线兰初代培养条件为:MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L+蔗糖 30 g/L。

1.2 方法

在超净工作台上,用解剖刀将无菌腋芽切下,接种采取茎段直立插入培养基的方式。采用 $L_9(3^4)$ 进行正交试验^[3],考察 3 种植物生长物质(6-BA、KT、NAA)及其浓度(表 1)对金线兰根状茎试管苗茎段培养的影响,各试验均采用 MS 基本培养基,光照 12 h,光强 2 000 lx,蔗糖 30 g/L。

2 结果与分析

2.1 根状茎茎段增殖培养最佳培养条件的筛选

接种 30 d 后,统计结果,计算诱导率(表 2),并对试验结

果进行极差分析和方差分析(表 3)。

由表 2 和表 3 可知:植物生长调节物质 KT 对根状茎腋芽的增殖作用达到 $\alpha=0.10$ 的显著水平,6-BA 和 NAA 对根状茎腋芽的诱导作用没有达到显著水平,3 种植物生长物质作用强弱依次为:NAA>6-BA>KT,它们的最佳浓度组合为 $A_3B_3C_3$,金线兰根状茎培养腋芽增殖的最佳培养条件为 MS+6-BA 3.0 mg/L+KT 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L。

表 1 金线兰根状茎增殖培养因素与水平

浓度	因素 (mg/L)		
	A:6-BA	B:KT	C:NAA
1	1	1	0.1
2	2	2	0.3
3	3	3	0.5

表 2 根状茎增殖培养 $L_9(3^3)$ 试验结果

代号	因素 (mg/L)			增殖倍率
	A:6-BA	B:KT	C:NAA	
1	1	1	0.1	2.333
2	1	2	0.3	3.857
3	1	3	0.5	4.266
4	2	1	0.3	2.714
5	2	2	0.5	3.639
6	2	3	0.1	3.687
7	3	1	0.5	3.643
8	3	2	0.3	3.900
9	3	3	0.1	3.500
k_1	3.485	2.897	3.307	
k_2	3.347	3.799	3.357	
k_3	3.681	3.818	3.849	
R	0.334	0.921	0.542	

表 3 根状茎增殖培养方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F	$F_{0.10}$ 临界值	显著性
A	0.169	2	0.400	3.460	
B	1.662	2	3.938	3.460	*
C	0.539	2	1.277	3.460	
误差	1.27	6			

注: * 表示在 $\alpha=0.10$ 水平具显著性。

2.2 根状茎茎段增殖培养最佳培养条件验证

取生长一致的金线兰试管苗茎段 30 个,接入上述最佳培

收稿日期:2013-03-29

基金项目:贵州省中药材现代产业技术体系建设专项(编号:GZCYTX-02)。

作者简介:李 光(1980—),男,副教授,主要从事植物学、作物遗传育种研究。E-mail:lg20029@126.com。

通信作者:龚 宁,教授,硕士生导师。E-mail:gongning2007@126.com。

唐 功,任朝琴,戴先芝,等. 辣根过氧化物酶生物印迹与交联[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):53-54.

辣根过氧化物酶生物印迹与交联

唐 功,任朝琴,戴先芝,鲜雪梅

(阿坝师范高等专科学校化学化工与生命科学系,四川汶川 623002)

摘要:对辣根过氧化物酶进行生物印迹,最佳模板选择根据检测印迹后酶活力大小来定,并对印迹的辣根过氧化物酶进行了乙酰化和交联,用三硝基苯磺酸法检测乙酰化和交联的程度。结果表明,以对苯二胺为模板最佳,印迹酶活性比游离酶增加约 10 倍。

关键词:辣根;过氧化物酶;生物印迹;交联

中图分类号: Q554⁺.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0053-02

Russell 等发现有机溶剂中酶有一个非常奇特的现象,通过配体与酶之间的相互诱导、相互作用可以改变酶的构象,即生物印迹^[1]。通过生物印迹提高酶在有机溶剂中的催化活性,增加其作为催化剂的应用,如印迹脂肪酶在手性药物中间体的拆分、食品分析、有机合成等过程中,都表现出了较好的催化活性^[1]。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)是一种糖蛋白,以铁卟啉为辅基,在过氧化氢存在时能催化苯酚、苯胺及其取代物聚合,由于在辣根中含量很高而得名。试

验以 HRP 为印迹对象,以底物及底物类似物为模板,分别对 HRP 进行生物印迹,通过检测印迹后酶活力大小来确定最佳模板,后对印迹的辣根过氧化物酶进行乙酰化和交联,用三硝基苯磺酸法检测乙酰化和交联的程度。印迹酶具有抗恶劣环境、高稳定、长寿命、可设计性和催化效率高等特点,为酶的人工模拟开拓了新的途径。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:HRP:Ec1.11.1.7,250 U/mg,上海生工;马来酸酐,江阴市顺飞精细化工厂;乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA),上海生工;对苯二胺 C. P,上海生工;偶氮二异丁腈(AIBN) A. R,上海市四赫维化工有限公司;二甲苯 A. R,天津市巴斯夫化工有限公司;对甲苯磺酸 A. R,天津市科密欧化学试剂有

收稿日期:2013-03-05

基金项目:四川省教育厅 2011 年自然科学重点项目(编号:11ZA179)。

作者简介:唐 功(1970—),男,硕士,讲师,主要从事生物化学-酶工程研究。E-mail:sdezgt@163.com。

养条件中,30 d 后统计试验结果,结果增殖倍率高达 4.800,优于正交试验中的各组,故金线兰根状茎茎段增殖培养最佳培养条件为:MS+6-BA 3.0 mg/L+KT 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L。

3 讨论

根状茎外形与根相似,蔓生于土层下,具有明显的节和节间,叶退化成非绿色的鳞片叶,叶腋中的腋芽或根状茎的顶芽可形成背地性之力的地上枝,同时节上产生不定根。根状茎贮有丰富的营养物质,可存活 1 年以上,若因耕犁等外力切断时,茎段上的腋芽仍可再生为新株^[4]。根状茎比地上茎有更强的生活力,以根状茎为材料诱导的试管苗可能比以地状茎为材料诱导的试管苗具有更强适应力。相关报道中,以根状茎为材料诱导的试管苗研究较少,笔者报道了金线兰根状茎初代培养研究^[5],王建勤等报道了金线兰根状茎增殖培养研究,他以 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA3.0 mg/L 的培养条件获得了 5.4 倍的增殖倍率^[6],比本试验的增殖倍率高 0.6,原因可能是:(1)王建勤等使用的外植体产自福建省,而本试验所用外植体产自贵州省,不同外植体对植物生长调节物质的响应程度不同;(2)王建勤等的试验周期为 45 d,本试验的周期为 30 d,较长的培养时间有利于更多芽的产生。

在金线兰组织培养研究结论中,植物生长调节物质

6-BA 对组织培养结果的影响强于 KT,本研究发现植物生长调节物质 KT 对根状茎腋芽的增殖作用达到 $\alpha=0.10$ 的显著影响,而植物生长调节物质 6-BA 和 NAA 对根状茎腋芽的诱导作用没有达到显著水平,3 种植物生长物质作用强弱依次是:NAA>6-BA>KT。原因可能为:目前大多数金线兰组织培养选用的材料为地上茎和原球茎,而本研究采用的试验材料为金线兰地下茎,不同材料部位可能对不同的植物生长调节物质的响应程度不同。

参考文献:

- [1]中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志:第 17 卷[M]. 北京:科学出版社,2000:220.
- [2]顾德峰,刘 喆,宋彦君,等. 蝴蝶兰类原球茎玻璃化产生的原因及恢复效果研究[J]. 北方园艺,2007(8):183-185.
- [3]黄云华,陈庆富. 普通养麦植株茎段快速繁殖技术的研究[J]. 武汉植物学研究,2009(4):417-422.
- [4]叶创兴,朱念德,廖文波,等. 植物学[M]. 北京:高等教育出版社,2007:29.
- [5]李 光,龚 宁,周伟香,等. 应用正交设计优选花叶开唇兰初代培养基[J]. 种子,2006(11):69-71.
- [6]王建勤,林兰英,陈 钢. 药用金线莲根状茎组培育苗研究[J]. 时珍国药研究,1995(1):36-37.