

祁永琼,王丽莉,罗瑞芳,等.金线莲不同外植体组织培养成苗技术探讨[J].江苏农业科学,2014,42(8):57-59.

金线莲不同外植体组织培养成苗技术探讨

祁永琼¹,王丽莉¹,罗瑞芳¹,李开云²

(1. 云南农业职业技术学院,云南昆明 650031; 2. 昆明市西山林场,云南昆明 650100)

摘要:以金线莲的顶芽、中部茎段和基部茎段为外植体,研究金线莲组织培养快繁成苗技术。结果表明,初代培养阶段在 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基中,以顶芽为外植体,诱导率、增殖倍数最高;芽苗增殖阶段,在 MS+6-BA 1.5~2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基中,3 种外植体的芽苗增殖倍数都较高,其中顶芽增殖倍数达到 7.5 倍;细弱芽苗在 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+10% 马铃薯+2% 蛋白胨培养基中可长势健壮;最佳生根培养基为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+2% 活性炭+10% 香蕉泥。

关键词:金线莲;外植体;组织培养

中图分类号:S682.310.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0057-03

金线莲,又名金线兰、金丝草、树草莲、金线虎头蕉、金线入骨消等,为兰科(Orchidaceae)开唇兰属(*Anoectochilus*)植物,是多年生珍稀中草药,在我国云南、四川、广西、福建、台湾等地均有分布,但十分稀少,一般生长于密林下或溪边潮湿的草丛中。金线莲富含氨基酸和多种微量元素,有较高的药用价值,素有“药王”“金草”“神药”“乌人参”等美称,《全国中草药汇编》谓其可治疗肺结核、糖尿病、肾炎、膀胱炎、风湿性及类风湿性关节炎等症;在治疗肝病、排毒去火、降压凉血等方面有独特效果。民间常用其清水煎服或炖汤,治疗小儿惊风、妇女白带以及毒蛇咬伤等。随着金线莲的药用价值日益被人们所认同,在云南的西双版纳、保山、文山、德宏等地,农民无节制、掠夺式采收野生金线莲的现象比较普遍^[1],且金线莲生长迟缓、开花结果不易,导致资源匮乏。因此,利用植物组织培养技术繁殖成为培育金线莲种苗的重要途径^[2-6]。本试验利用金线莲进行组织培养,以期探索适宜的外植体和高效的成苗技术,培育健壮试管苗。

1 材料与方法

1.1 材料

材料于 2010 年 4 月采自云南保山林区,引种于云南农业职业技术学院园艺实验训练基地。

1.2 方法

1.2.1 不同外植体进行初代培养 取生长正常、叶色浓绿、株高 5~6 cm 的植株茎段,除去根叶,流水冲洗 1 h,洗洁精溶液浸泡约 10 min,用软毛刷刷洗茎节处绒毛,用自来水清洗干净。转移至超净工作台上,用 75% 乙醇灭菌 30~60 s,转入 0.1% 氯化汞中灭菌 8~10 min,边浸泡边搅拌以彻底灭菌,然后用无菌水冲洗 5 次。用解剖刀切取,分为顶芽、带 1 个节中部茎段和带 1 个节的基部茎段作为接种的外植体。诱导培养

基为 M₁、M₂、M₃、M₄,分别添加 6-BA 为 0、1.0、2.0、3.0 mg/L, NAA 浓度为 0.5 mg/L,培养条件为:光照度 1 500~3 000 lx,光照时间 8~10 h/d,温度(25±2)℃,MS 为基本培养基,pH 值为 5.8,蔗糖浓度为 30 g/L。每处理 4 瓶,每瓶 5 个外植体。培养 10 d 后统计污染率,培养 50 d 后统计诱导率、增殖倍数。

1.2.2 不同激素组合对芽苗增殖途径的影响 用解剖刀切取无菌苗茎段,分为顶芽、带 1 个节中部茎段和带 1 个节的基部茎段,接种于增殖培养基 I₁、I₂、I₃、I₄。增殖培养基 I₁~I₄ 分别为添加 6-BA 1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L,添加 NAA 0.5 mg/L,培养条件同初代培养。培养 50 d 后,调查成苗情况,统计增殖倍数、黄化苗率。

1.2.3 壮苗培养 切取增殖培养中产生的芽苗,进一步进行壮苗培养,接种于壮苗培养基 H₁(MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+10% 马铃薯)、H₂(MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+10% 马铃薯+2% 蛋白胨)。每处理 4 瓶。培养 50 d 后,调查芽苗生长情况。培养条件同初代培养。

1.2.4 生根培养 切取约 2 cm、生长健壮的茎段,进一步进行生根培养,采用 1/2MS+NAA 0.5 mg/L,添加 0~2% 活性炭、0~10% 香蕉泥为生根培养基,将小苗放在生根培养基中进行壮苗生根培养,长成完整植株。30 d 后统计结果。培养条件同初代培养。

2 结果与分析

2.1 适宜的初代培养外植体

外植体的选择和适宜的培养基是组织培养的关键,决定着能否建立高效的繁殖体系。结果表明,在初代培养过程中,以顶芽为外植体,在添加 2.0 mg/L 6-BA、0.5 mg/L NAA 的 M₃ 培养基中,污染率最低,诱导率、增殖倍数最高;中部茎段次之;基部茎段污染率高,诱导率较低(表 1),因此认为顶芽适宜作金线莲初代诱导培养时的外植体。

2.2 不同激素组合对芽苗增殖的影响

在芽苗增殖阶段,适宜浓度的 6-BA 和 NAA 对顶芽、中部茎段和基部茎段芽苗的增殖有促进作用。NAA 浓度为 0.5 mg/L 时,6-BA 浓度为 1.5~2.0 mg/L,3 种外植体芽苗的增殖倍数都较高,但是随着 6-BA 浓度的增大,增殖倍数

收稿日期:2013-10-30

基金项目:云南农业职业技术学院科研基金(编号:ynavc201128)

作者简介:祁永琼(1978—),女,云南宜良人,硕士,讲师,主要从事植物遗传育种和组织培养教学。Tel:(0871)66322997;E-mail:lengzhu_1978@163.com。

表 1 不同外植体初代培养污染率、诱导率、增殖倍数

外植体	污染率 (%)	诱导率(%)				增殖倍数			
		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
顶芽	10	0	66.7	77.8	47.1	0	1.67	82.72	1.41
中部茎段	25	0	56.2	41.2	26.7	0	0.81	1.03	0.53
基部茎段	55	0	25.0	22.2	10.0	0	0.22	0.51	0.10

下降,且黄化苗率升高(表 2)。

在不同激素组合的 I₁ 至 I₄ 培养基中,3 种外植体增殖芽苗的途径存在一定差异,苗生长情况存在较大差异。顶芽和

中部茎段接种于 I₂ 培养基 15 d 后,顶芽伸长,茎节处产生突起,逐渐伸长形成不定芽,在 I₃、I₄ 培养基中则产生丛生芽;基部茎段接种于增殖培养基中不易伸长增殖,在茎节处形成不定芽(表 3)。

顶芽在 I₂ 培养基中增殖产生的芽苗较健壮(图 1),并且没有黄化苗产生;基部茎段在 I₃ 培养基中增殖产生的芽苗较为细弱,黄化苗率达 34.5%;中部茎段增殖产生的芽苗的生长情况则介于前两者之间(图 2)。综合比较,顶芽在 I₂ 培养基中增殖产生的芽苗较健壮,没有黄化苗,不需经过壮苗可直接进行生根培养;基部茎段增殖产生的芽苗黄化苗率高,较为细弱(图 3),需经过壮苗培养后再进行生根培养。

表 2 不同激素组合对芽苗增殖率、黄化苗率的影响

培养基	增殖倍数			黄化苗率(%)		
	顶芽	中部茎段	基部茎段	顶芽	中部茎段	基部茎段
I ₁	2.3	1.5	1.3	0	0	0
I ₂	7.5	5.3	2.5	0	10.0	20.0
I ₃	5.3	3.3	7.3	13.3	15.4	34.5
I ₄	4.5	3.8	4.5	33.9	26.7	45.6

表 3 不同激素组合对芽苗增殖途径、芽苗生长情况的影响

培养基	增殖途径			苗生长情况		
	顶芽	中部茎段	基部茎段	顶芽	中部茎段	基部茎段
I ₁	茎段伸长	茎段伸长	茎段伸长	芽苗短粗	芽苗健壮	芽苗短
I ₂	茎段伸长,长出不定芽	茎段伸长,长出不定芽	长出不定芽	芽苗健壮,芽苗伸长	芽苗细长,少量不定芽	少量不定芽
I ₃	丛生芽	长出不定芽	长出不定芽	较多丛生芽	芽伸长,少量不定芽	芽苗细弱,大量不定芽,部分叶黄化
I ₄	丛生芽	长出不定芽丛	长出不定芽	丛生芽多、短,出现黄化苗	芽短粗,较多不定芽	芽苗细弱,部分叶黄化



a. 茎段伸长



b. 茎段伸长, 长出少量不定芽



c. 丛生芽



d. 丛生芽

图1 顶芽接种后增殖



a. 茎段伸长, 长出不定芽



b. 长出不定芽



c. 长出不定芽丛

图2 中部茎段接种后增殖



a. 长出不定芽

b. 长出大量不定芽

c. 长出不定芽

图3 基部茎段接种后增殖

2.3 附加物对细弱芽苗生长的影响

培养基中添加适宜的有机物质,使金线莲植株不断增殖^[7]。结果表明,在添加了 10% 马铃薯 + 2% 蛋白胨的 H₂ 培养基中,芽苗长势健壮,且叶色绿,叶片网纹明显(表 4、图 4)。

表 4 附加物对细弱芽苗壮苗的影响

培养基	苗生长情况
H ₁	芽苗伸长,茎秆粗壮
H ₂	芽苗伸长,长势健壮,叶片大,叶色绿,网纹明显



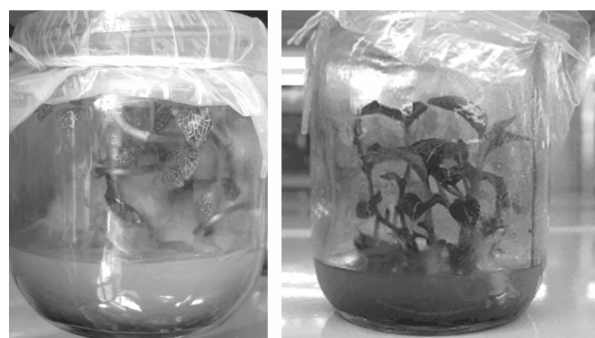
a. 增壮的芽苗

b. 健壮、叶色绿的芽苗

图4 细弱芽苗进行壮苗培养

2.4 不同附加物对芽苗生根的影响

试验结果表明,培养基中加入 2% 活性炭和 10% 香蕉泥有利于根的分化和生长,平均根数达到 3.6 条,平均根长 3.32 cm,根粗壮(图 5)。



a. 试管苗

b. 健壮生根苗

图5 生根苗

3 讨论

金线莲组织培养快繁可选用种子、茎段、顶芽或叶片为外植体,再生成苗主要有原球茎、不定芽、丛生芽等 3 条途径,张

铁等用种子诱导原球茎^[8],刘芳等用中部茎段诱导丛生芽^[9],阚世超等用茎尖诱导丛生芽^[5],吴坤林等用中段茎段诱导不定芽^[10],杨柏云等用茎段诱导原球茎^[11]。本试验采用顶芽、中部茎段和基部茎段增殖培养,发现顶芽的诱导率和增殖倍数高,芽苗健壮;中部茎段诱导易产生不定芽,诱导率和增殖倍数次之;基部茎段诱导产生的不定芽苗较为细弱。究其原因,一方面不同部位外植体的茎段组织发育程度不同;另一方面,不同部位外植体的内源激素含量和比例也不同,活性生长素在植株顶部芽中含量较高^[12]。因此,顶芽生长旺盛,组织培养产生的芽苗健壮,较适宜作为初代培养外植体。

在金线莲的组织培养过程中,芽苗增殖是十分关键的环节,只有提高增殖系数,才能达到快速繁殖的目的。组织培养产生的细弱芽苗在添加 10% 马铃薯 + 2% 蛋白胨的壮苗培养基上可长势健壮。因此,顶芽增殖的健壮芽苗、中部茎段增殖的芽苗、增壮后的基部茎段芽苗等均可作为增殖材料继续用于增殖和生根,提高金线莲的组织培养繁殖系数。

参考文献:

- [1] 余东莉,张培松,范 萍,等. 西双版纳金线莲分布及利用现状[J]. 林业调查规划,2006,31(5):97-99.
- [2] 郝丽丽,乙 引,申 刚,等. 金线莲腋芽增殖培养条件的优化[J]. 贵州农业科学,2010,38(7):18-19.
- [3] 黄 勇. 金线莲组织培养新体系建立及优化[J]. 北方园艺,2010(13):178-179.
- [4] 伍成厚,冯毅敏,贺漫媚,等. 金线莲种子培养的研究[J]. 中国野生植物资源,2008,27(1):47-50.
- [5] 阚世超,张明生,李 花. 金线莲丛生芽诱导研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(3):981-982.
- [6] 宋丽莎,邓 伟,文治瑞,等. 金线莲外植体的筛选及不定芽诱导的研究[J]. 种子,2009,28(9):19-22.
- [7] 刘 伟,王牛柱. 金线莲组织培养增殖培养基的筛选[J]. 安徽农业科学,2009,37(4):1475-1476.
- [8] 张 铁,田雪琪,李 彬. 滇越金线莲快速繁殖技术研究[J]. 文山师范高等专科学校学报,2006,19(3):110-114.
- [9] 刘 芳,韦鹏霄,岑秀芬,等. 外植体和基本培养基对台湾金线莲丛生芽诱导的影响[J]. 北方园艺,2009(4):103-104.
- [10] 吴坤林. 金线莲快繁及工厂化生产中间试验[J]. 中药材,1997,20(12):595-597.
- [11] 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.
- [12] 郝建军,康宗利. 植物生理学[M]. 北京:化学工业出版社,2005:161.