

何荆洲,卜朝阳,黄昌艳,等. 金线莲的结实特性和无菌播种培养[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):214-217.

金线莲的结实特性和无菌播种培养

何荆洲, 卜朝阳, 黄昌艳, 闫海霞

(广西农业科学院花卉研究所, 广西南宁 530007)

摘要:观察金线莲的结实性情况,比较其蒴果采收期4种基本培养基、NAA与6-BA激素组合及水果添加物对金线莲无菌播种膨大率及萌发率的影响。结果表明:(1)不同杂交组合的结实率存在明显差异,结实率变化范围为0~100%;(2)蒴果在授粉后45d采收最好,种子的膨大率、萌发率均较高;(3)不同基本培养基对金线莲种子的膨大萌发效果不同,种子在WPM培养基上的膨大萌发率最高,膨大率最高达73%,萌发率最高为79%;(4)不同生长激素组合对金线莲种子的膨大萌发影响差异显著,以1/2MS+0.5mg/L NAA的效果最好;(5)不同水果有机添加物都对金线莲种子的膨大萌发有促进作用。

关键词:金线莲;蒴果;无菌播种;膨大率;萌发率

中图分类号:S567.23⁺9.04 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)09-0214-04

金线莲 [*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.] 为兰科开唇兰属多年生草本植物,是我国传统的珍稀名贵药材,全草可入药,性甘、味平,具有清热凉血、祛风除湿、解毒等功效,有“金草”“药虎”“乌人参”等美称,特别是在我国台湾地区,金线莲被称为“药中之王”^[1-2]。此外,金线莲叶型优美,叶脉金黄色,呈网状排列,具有极高的观赏价值。由于对生态环境条件要求较严,因此金线莲植株矮小、分布零散、根系不发达、生长缓慢、适应性差^[3];金线莲的种子极为细小,由未成熟的胚及数层种皮细胞构成,在自然环境中需要与真菌共生才能萌发,且萌发率极低^[4],但通过无菌播种及人工培育可在短期内获得大量幼小植株。

目前国内对金线莲的组织培养研究主要集中在原球茎培养^[5-6]和丛生芽培养^[7-8]方面,在种子培养方面,伍成厚等报道了金线莲种子培养过程中类原球茎的诱导及其分化^[9],罗安雄等则探讨了不同培养基对金线莲种子萌发以及幼苗生长的影响^[10]。本研究对2个金线莲品种进行了自交及正反交,并观察了结实情况、蒴果采收时间和培养基成分等因素对金线莲非共生萌发的影响,以期建立金线莲无菌播种繁殖技术,为金线莲育种提供技术参考。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

2个金线莲品种材料均取自广西农业科学院花卉研究所观赏植物研发中心的育苗温室,其编号和品种的主要性状、形态分别见表1、图1。

1.2 试验地概况

广西南宁位于北回归线以南,平均海拔74m,年均降水量1304.2mm,平均湿度79%,年平均气温21.6℃,极端最高气温40.4℃,极端最低气温-2.1℃,全年无霜期高达365d,属亚热带季风气候。

园艺学报,2002,29(2):176-178.

[5] 朱 徽. 植物染色体及染色体技术[M]. 北京:科学出版社,1982:42-83.

[6] 季道藩. 遗传学[M]. 2版,北京:中国农业出版社,1984.

[7] 张仲鸣,苏都莫日根,李正理. 银杏小孢子中的微核形成及其在进化过程中的意义[J]. 植物学报,1997,39(2):97-101.

[8] Ramsey J, Schemske D W. Neopolyploidy in flowering plants[J]. Annu Rev Ecol Syst,2002,33:589-639.

[9] 蓝泽蓬,梁学礼. 遗传学实验原理和方法[M]. 成都:四川大学出版社,1990:183-184.

[10] 庄东红. 石田雅士. 柿树减数分裂和小孢子形成过程的观察[J]. 武汉植物学研究,2000,18(5):356-358.

[11] 艾建国,高山林. 丹参同源四倍体的诱导、鉴定及有效成分的含量测定[J]. 药物生物技术,2003,10(6):372-376.

收稿日期:2013-11-04

基金项目:农业部专项(编号:13RZZY-25);广西农业科学院项目(编号:桂农科2013YM30、桂农科2012GW03)。

作者简介:何荆洲(1981—),女,广西南宁人,硕士,助理研究员,主要从事生物技术、植物组培等方面的研究。Tel:(0771)3246429; E-mail:he5141@sina.com。

通信作者:卜朝阳,女,研究员,主要从事生物技术、植物组培等方面的研究。Tel:(0771)3276924;E-mail:yangnv@126.com。

远来看,多倍体使作物遗传储备资源增加,其另外增加的染色体组就像基因重复一样,具备了转变成新基因的潜在优势。对于金银花这种药用植物来说,四倍体金银花的选育成功对于提高产量和品质、满足市场需求、增加农民收入和扩大金银花的种质资源等都有重大意义。

参考文献:

[1] 国 信.“九丰一号”金银花通过鉴定[J]. 西南园艺,2005(6):18.

[2] 路易斯 W H. 多倍体在植物和动物中的地位[M]. 鲍文奎,译. 贵阳:贵州人民出版社,1984.

[3] 陈素萍,王 莉,宋清秀. 党参多倍体育种的研究[J]. 中草药,1991,22(5):224-227.

[4] 王 俐,郑思乡,顾志建. 同源四倍体库拉索芦荟的离体培养[J].

表1 金线莲亲本及其品种性状

品种	平均叶长 (cm)	平均叶宽 (cm)	叶色	平均花梗长 (cm)	平均花长 (cm)	平均花宽 (cm)	花色
294	3.64	2.64	叶背暗红,绿色网状脉	15.51	1.7	1.4	淡黄绿色
295	3.44	2.99	叶背暗红,紫红色网状脉	11.66	1.7	1.4	白色



图1 金线莲花形态

1.3 试验方法

1.3.1 授粉 在亲本花中选取开放3~7 d内的花朵,用牙签取其蕊柱上呈浅黄色、具有黏性的花粉块,并置于亲本花的柱头蕊腔内。

1.3.2 蒴果发育情况的测量以及结实率的统计 蒴果采收后用分析天平称质量并用游标卡尺测量果荚最终长、宽;计算结实率(采收的蒴果占授粉花朵数的百分数)。

1.3.3 种子预处理与播种 将果荚置于流水下,用软毛刷小心刷洗表皮后用洗衣粉水浸泡10 min(期间不停晃动),再用流水冲洗30 min;在超净工作台上用75%乙醇擦拭表面后用无菌水冲洗1次,接着用1%氯化汞浸泡蒴果8 min,再用无菌水冲洗4次;吸干表面水分,用解剖刀纵向切开蒴果,将种子均匀播撒在培养基上;暗培养7 d后转入光照培养条件,光照时间为10 h/d,光照强度1 000~1 500 lx,培养温度保持在26~30 ℃。

1.4 种子萌发试验

1.4.1 蒴果成熟度对比试验 采用单因素试验法,进行不同成熟度蒴果的对比试验,即授粉后31、45、52 d的种子在配方为1/2 MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+20 g/L蔗糖、pH值5.6的培养基中进行培养。

1.4.2 基本培养基对比试验 采用单因素比较法,进行种子诱导萌动的培养基对比试验,即MS(高盐)培养基、1/2MS(中盐)培养基、WPM(中盐、高钙、高钾)培养基及KC(低盐)培养基4个处理,并附加20 g/L蔗糖、6.5 g/L琼脂,调节pH值为5.6。

1.4.3 生长激素组合的对比试验 以295自交种子为材料,选用0.05、1.0、1.5 mg/L 6-BA与0.02、0.5 mg/L NAA两者的组合共8个处理,加上清水对照共9个处理,均附加20 g/L蔗糖、6.5 g/L琼脂,最后调节pH值为5.6,具体见表2。

表2 不同生长激素的组合

编号	6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)
1	0	0
2	1.0	0
3	0	0.5
4	0.5	0.2
5	0.5	0.5
6	1.0	0.2
7	1.0	0.5
8	1.5	0.2
9	1.5	0.5

1.4.4 水果添加物对比试验 以295自交种子为材料,选用20%香蕉汁、10%椰汁、20%苹果汁和20%马铃薯汁共4个处理,同时分别添加1 mg/L 6-BA和0.5 mg/L NAA,并附加20 g/L蔗糖+6.5 g/L琼脂,调节pH值为5.6,观察种子萌发情况。

1.5 数据统计

定期观察并记录种子的萌发情况,记录培养10周末的种子膨大率与培养16周末的萌发率。膨大标准为种子膨大形成原球茎,萌发标准为原球茎变绿。每处理随机抽取5瓶,每瓶选取3个视野进行统计,最后计算平均数。

所有数据均用Microsoft Excel和SPSS 17.0软件进行方差分析与多重比较。

2 结果与分析

2.1 蒴果结实特性及基本特征

由表3、图2可知,无论是在形状还是颜色方面,2种金线莲的蒴果及种子都无明显差别;但自交结实率差异明显,295的自交结实率比较高,为92.77%,而294仅为63.75%,两者之间相差29.02个百分点;294与295之间的正反交结实率分别为100.00%、0,表明在正交成功的情况下,反交可能不会杂交成功,因此金线莲在杂交育种时,同时进行正反交有助于提高成功率。

表3 蒴果的基本性状

杂交组合 (♀×♂)	授粉数 (个)	结实数 (个)	结实率 (%)	平均果荚质量 (g)	平均果荚长 (cm)	平均果荚宽 (cm)	果荚颜色	种子
294×294	80	51	63.75	0.03	1.70	0.6	黄褐色	黄褐色,针状
295×295	83	77	92.77	0.04	1.74	0.6	黄褐色	黄褐色,针状
294×295	10	10	100.00	0.03	1.71	0.6	黄褐色	黄褐色,针状
295×294	10	0	0					



图2 金线莲果荚

2.2 种子萌发

2.2.1 蒴果采收期对种子萌发的影响 将授粉后分别发育

表4 蒴果采收期对种子萌发的影响

授粉后蒴果采收时间 (d)	杂交组合 (♀ × ♂)	果荚状态	种子颜色	原球茎膨大率 (%)	萌发率 (%)
31(六成熟)	294 × 294	不饱满	乳白色	0a	0a
	295 × 295	不饱满	乳白色	28.0 ± 27.0ab	35.0 ± 49.0ab
45(八成熟)	294 × 294	饱满	黄褐色	36.0 ± 6.0ab	29.0 ± 11.0ab
	295 × 295	饱满	黄褐色	99.0 ± 2.0c	91.0 ± 2.0c
52(完全成熟)	294 × 294	饱满,有轻微皱缩	黄褐色	0.3 ± 0.5a	7.8 ± 9.2a
	295 × 295	饱满,有轻微皱缩	黄褐色	63.0 ± 30.0bc	73.0 ± 28.0bc

注:同列数据后标有不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。表5~表7同。294 × 294组合至统计结束时仍未膨大、萌发。

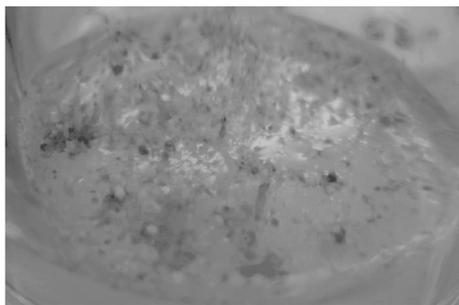


图3 种子膨大萌发情况

2.2.2 基本培养基对种子萌发的影响 金线莲种子在4种基本培养基上膨大萌发的原球茎外形无明显差异。但在MS和KC培养基上的种子膨大时间比在1/2MS和WPM培养基上的晚,原球茎也没有那么粗壮。不论是在种子膨大成原球茎还是在原球茎分化成幼苗方面,WPM组都比较粗壮,优于其他3组。综合试验结果,在发育形态方面金线莲基本培养基的优劣顺序为:WPM > 1/2MS > MS > KC。

4种基本培养基对金线莲种子膨大率与萌发率的影响见表5,可以看出,在培养10周末,WPM组295 × 295的种子膨大率分别比MS、1/2MS、KC组高24%、12%、40%;在16周末,WPM组295 × 295的种子萌发率分别比MS、1/2MS和KC组高20%、14%、41%;而294 × 294在KC组培养基上至统计结束仍未见膨大萌发。在种子萌发方面,金线莲基本培养基的优劣顺序为:WPM > 1/2MS > MS > KC。可见在同一基本培养基上的294 × 294品种,不论是在膨大率还是萌发率方面

了31、45、52d的种子播种于1/2MS培养基中,分别培养10、16周,统计种子的膨大率、萌发率。由表4可见,授粉后31d,294 × 294未见种子的膨大与萌发,295 × 295种子的膨大率仅为28.0%,萌发率为35.0%;授粉后45d,2个品种的膨大率和萌发率都显著提高,其中295种子的膨大率达到99.0%,萌发率达到91.0%;授粉后52d,种子的膨大率和萌发率都比45d的种子有所下降,其中295 × 295种子的膨大率相差达36个百分点,萌发率相差达18个百分点;同一采收期的294 × 294种子,不论是膨大率还是萌发率都显著低于295 × 295(除授粉后31d)。结果表明,当蒴果采收期为45d时,最有利于膨大形成原球茎(图3),且后续发育形成原球茎的速度也较快;而当蒴果采收期只有31d时,不能或很难膨大形成原球茎;当蒴果采收期达52d时,果荚饱满并有轻微皱缩,但尚未开裂,说明种子已经完全成熟,但其膨大率和萌发率反而有所下降。总体结果可以看出,不同金线莲品种之间的膨大、萌发效果相差较大。

都显著低于295 × 295品种,表明不同金线莲品种之间的膨大萌发效果差异较大。

表5 不同培养基对种子萌发的影响

基本培养基	杂交组合 (♀ × ♂)	原球茎膨大率(%) (10周末)	萌发率(%) (16周末)
MS	294 × 294	9 ± 16ab	15 ± 26ab
	295 × 295	59 ± 30c	66 ± 17cd
1/2MS	294 × 294	7 ± 13ab	11 ± 14a
	295 × 295	65 ± 37c	69 ± 32cd
WPM	294 × 294	10 ± 15ab	33 ± 32abc
	295 × 295	73 ± 35c	79 ± 12d
KC	294 × 294	0a	0a
	295 × 295	52 ± 35bc	56 ± 40bcd

2.2.3 生长激素组合对种子萌发的影响 由表6可知,单独使用NAA对金线莲种子膨大萌发最为有利,高于NAA与6-BA不同浓度的组合配比;而单独添加6-BA的膨大率低于空白对照组,萌发率与空白对照组无显著性差异;随着6-BA浓度的升高,膨大率、萌发率出现一定的升高趋势,但差异不显著。推测可能是低浓度的6-BA对金线莲种子萌发有一定的抑制作用。

2.2.4 水果添加物对种子萌发的影响 由表7可见,与对照组相比,添加不同的水果有机物对金线莲种子膨大有一定的促进作用,且不同处理间存在显著差异。其膨大率大小为:香蕉汁 > 马铃薯汁 > 苹果汁 > 椰子汁;萌发率大小为:马铃薯汁、苹果汁 > 椰子汁 > 香蕉汁。可以看出,加入香蕉汁的培养

表6 不同激素组合对种子萌发的影响

编号	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	原球茎膨大率(%) (10周末)	萌发率(%) (16周末)
1	0	0	65 ± 37ab	69 ± 32ab
2	1.0	0	38 ± 28a	59 ± 39ab
3	0	0.5	82 ± 10b	86 ± 18b
4	0.5	0.2	44 ± 34a	69 ± 33ab
5	0.5	0.5	33 ± 38a	36 ± 44a
6	1.0	0.2	48 ± 37a	61 ± 37ab
7	1.0	0.5	51 ± 33a	65 ± 30ab
8	1.5	0.2	54 ± 30ab	73 ± 29b
9	1.5	0.5	51 ± 34a	64 ± 35ab

基对种子膨大的促进效果比添加椰子汁、苹果汁和马铃薯汁的更显著,但添加香蕉汁的培养基在种子萌发成幼苗时的萌发率比其他3组显著下降,这说明香蕉有促进种子吸水膨大的良好效果,但同时在种子萌发成苗的过程中起一定的抑制作用。综合试验结果可知,添加马铃薯汁对金线莲种子的膨大、萌发最有利。

表7 不同水果添加物对种子萌发的影响

编号	水果附加物	原球茎膨大率(%) (10周末)	萌发率(%) (16周末)
1	无	51 ± 33a	65 ± 30b
2	20%香蕉汁	95 ± 11c	20 ± 12a
3	10%椰子汁	60 ± 41a	78 ± 19bc
4	20%苹果汁	70 ± 16ab	91 ± 11c
5	20%马铃薯汁	82 ± 27bc	91 ± 20c

3 结论

通过种子无菌播种,可缩短杂交育种周期,提高育种效率,加快种苗规模化生产进程,是金线莲种质资源保存利用的关键技术环节。目前国内在金线莲无菌播种技术应用研究方面做得比较少,且金线莲不同品种对基本培养基、激素组合配比和水果添加物的选择等有一定的差别。因此,本试验以2个金线莲品种的杂交蒴果为材料,探讨了蒴果采收时间、培养基成分、激素组合配比等因素对种子膨大萌发的影响,结果表明:(1)授粉后45 d的种子无菌播种后膨大率、萌发率都显著高于52 d的,这与张娟娟等研究的某些兰科植物的种子成熟前比成熟后在无菌萌发过程中具有较高的萌发率相一致^[11],推测可能是由于种皮开始皱缩,木质素类物质积累,种皮透水性下降导致萌发率下降,因此金线莲在野生环境下需要相应的共生真菌侵染后才能萌发;(2)4种培养基中MS无机盐含量最高,属于高盐培养基,1/2MS为中盐培养基,WPM也是中盐培养基,但相对而言钙、钾含量高,这说明低磷浓度有利于金线莲种子的萌发,而高浓度的无机盐含量不利于其膨大萌发,KC属于低盐培养基,且营养成分比较简单,可能不足以支持种子的萌发,同时说明金线莲种子萌发需要有充足的营养;(3)本试验中单独使用NAA对金线莲种子萌发最为有

利,显著高于NAA与6-BA不同浓度组合配比,推测可能是细胞分裂素信号的转导是通过磷酸基团在主要组分之间连续传递而实现的^[12],而低磷浓度有利于金线莲种子的萌发,因此6-BA对金线莲种子萌发起不到促进作用,NAA与6-BA同时配合使用时,6-BA通过促进细胞的分化,在一定程度上对抗着NAA的作用,因此NAA与6-BA不同浓度组合与空白对照组无明显差异,也可能是激素浓度范围过小或激素种类过少造成的结果,在以后的试验中可以适当扩大激素范围浓度和种类;(4)天然水果添加物的成分比较复杂,大多含有氨基酸、激素、酶等一些复杂的化合物,它们对细胞和组织的增殖、分化有明显的促进作用,培养基中添加香蕉汁,可有效促进金线莲种子的膨大,却又抑制了其萌发,这可能是成熟的香蕉中含有较多的植物生长激素,有利于膨大,同时又含有较高的可溶性糖,提高了培养基的碳/氮比,从而抑制了种子的萌发;(5)金线莲品种之间的膨大萌发效果相差显著。

种子萌发是一个复杂的植物生理过程,在自然环境中,金线莲种子只有经过适宜的真菌侵染才能萌发,且萌发率低,因而其野生资源十分匮乏。金线莲每个果荚中都含有成千上万粒种子,通过无菌播种手段可以使之萌发成苗,应用于生产上可以加速金线莲的繁殖,为中药材和花卉市场提供大量的商品苗,具有良好的应用前景。此外,通过无菌播种手段也可以促进金线莲资源的再生,对野生资源的保护也会起到积极的作用。

参考文献:

- [1]钟岑生. 金线莲的药用价值与开发[J]. 广西农业科学,1997(2):51-53.
- [2]李介元. 台湾金线莲[J]. 台湾农业探索,2001(2):42.
- [3]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[J]. 亚热带植物通讯,1994,23(1):18-24.
- [4]蔡文燕,肖华山,范秀珍. 金线莲研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学,2003,32(3):68-72.
- [5]王建勤,林兰英,陈钢. 金线莲原球茎的诱导与植株再生[J]. 植物学通报,1996,13(1):55-56.
- [6]韩晓红,罗明英,欧阳志成,等. 金线莲原球茎增殖研究[J]. 北方园艺,2012(24):144-146.
- [7]孟志霞,郭顺星,于雪梅,等. 植物生长调节剂对福建金线莲丛生芽增殖的影响[J]. 中国药学杂志,2008,43(23):1777-1780.
- [8]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.
- [9]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.
- [10]罗安雄,孟志霞,陈晓梅,等. 福建金线莲种子萌发及幼苗培养研究[J]. 中国药学杂志,2012,47(15):1199-1203.
- [11]张娟娟,严宁,胡虹. 三种兜兰属植物种子发育过程及其与无菌萌发的关系[J]. 植物分类与资源学报,2013,35(1):33-40.
- [12]许智宏,薛红卫. 植物激素作用的分子机理[M]. 上海:上海科学技术出版社,2012.