

国内金线莲组织培养研究进展

周雨青, 谢学强*, 季磊, 郑巧萍, 潘石琼

(四川民族学院环境与生命科学系 四川康定 626001)

摘要 综述了国内外对金线莲原球茎、器官、愈伤组织的诱导与增殖培养等方面的研究进展,分析了金线莲组培苗的外界影响因素,指出了目前存在的问题并展望未来。

关键词 金线莲 组织培养 研究进展

金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)又称金石蚕、金线兰、金线虎头蕉、金线入骨消等,中文名花叶开唇兰,为兰科开唇兰属多年生草本植物。金线莲全草均可入药,其味甘、性平,有清热凉血、除湿解毒、消炎止痛的功效,主治咯血、支气管炎、肾炎、膀胱炎、风湿性关节炎、高血压、糖尿病及肿瘤等疑难病症,素有“药王”、“金草”、“神药”、“乌人参”等美称。分布于海拔300~1200m的温凉潮湿处,我国主要分布于福建、广东、广西、浙江、江西、海南、云南、四川、贵州及西藏南部等省区,其中以闽、浙、赣为主产地。日本、斯里兰卡、印度、尼泊尔也有^[1]。

1 金线莲原球茎诱导与增殖研究

金线莲组培中可选用种子、茎尖、茎段或茎片(将茎段切成2~3mm厚、1~2cm长)为外植体诱导原球茎。王建勤等^[2]指出,影响诱导原球茎的关键因素包括外植体部位、产地及培养基配方。其中不同部位外植体诱导效果差异显著,以种子诱导效果最佳,诱导率达90%,带节茎段诱导率达65%。不同产地外植体诱导效果差异较显著,广西野生金线莲诱导率为42.9%,福建野生金线莲的诱导率为31.4%,台湾金线莲不能诱导出原球茎。诱导原球茎较适宜的培养基配方为MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 0.2mg/L+ZT 0.5mg/L+KT 1.0mg/L。封应丽等^[3]以带节茎段为外植体,最适培养基是1/2MS+NAA 0.2mg/L+ZT 0.8mg/L+琼脂粉0.6%+蔗糖3%,诱导率达73%。韩晓红等^[4]将茎段切成2~3mm厚、1~2cm长的茎片作为外植体,最适培养基为MS+6-BA 2.0mg/L+2,4-D 0.2mg/L+ZT 0.2mg/L+蔗糖30g/L+琼脂7g/L,诱导率达81%。何碧珠等^[5]以茎段为外植体,通过诱导潜伏副芽的萌发来产生芽体,再利用芽体的茎尖来诱导原球茎,得出诱导原球茎的最适培养基为MS+BA 2.0mg/L+NAA 0.3mg/L+Hyponcex I 3.0g/L,诱导率达90%,原球茎增殖的最适培养基为1/2MS+BA 2.0mg/L+NAA 0.3mg/L+AC 0.2%+香蕉汁100g/L。韩晓红等^[6]研究了4种基本培养基(B₅、MS、N₆、1/2MS)、3种

基金项目:四川民族学院四川省省级大学生创新创业训练项目(201511661014)
通讯作者:谢学强(1964-)男,四川省大竹县人,硕士,教授,研究方向:植物资源、园艺及观赏园艺。

添加物(香蕉汁、苹果汁、椰汁)以及3种培养方式(液体悬浮培养、液体静置培养、固体培养)对原球茎增殖的影响,得到B₅基本培养基最适合原球茎增殖,B₅、MS基本培养基的增殖效果比N₆、1/2MS好,3种添加物对原球茎增殖均有明显促进作用,椰汁促进作用最明显;3种培养方式的增殖率均为100%,其中液体悬浮培养增殖效果最好。

2 金线莲器官诱导与增殖研究

2.1 不定芽及丛生芽的诱导与增殖

冯亦平等^[7]以1~2cm的茎段为外植体,得到诱导不定芽的培养基是1/2MS+IBA 1.5mg/L+NAA 0.5mg/L+0.5%AC+0.7%琼脂+3%蔗糖,此培养基条件下每个外植体可形成3~4个不定芽,苗高5.1~6.0cm,平均苗高5.4cm,且不定芽的长势达到最佳。罗国庆等^[8]以茎段为外植体,发现诱导不定芽较适宜培养基为MS+6-BA 1.0mg/L+KT 1.0mg/L,芽色绿、粗壮;继代增殖较适宜的培养基MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.5mg/L,增殖倍数为2.00,苗的叶色绿、叶脉明显、茎粗。

金线莲组培中可选用茎段、顶芽为外植体,研究影响丛生芽诱导与增殖的因素,其主要包括基本培养基的类型、植物激素、添加物的类型和质量浓度。何云芳等^[9]用茎段作外植体,腋芽能快速萌发出不定芽体,在基本培养基方面试验得出B₅和MS是诱导丛生芽的适宜培养基,B₅中腋芽个数由1个增加到11.4个,芽径为1.8mm,而MS中腋芽个数增加到10.2个,芽径为2.2mm,细胞分裂素方面得出6-BA对不定芽的增殖效果优于KT和ZT,增殖的芽数达到最多为10.8个,且适宜诱导不定芽的质量浓度为4.0mg/L,生长素方面得到NAA 0.3mg/L和GA₃ 0.3mg/L对诱导丛生芽有较强的促进作用,植物添加剂方面得出在培养基中加入2.0mg/L绿宝诱导丛生芽最佳,增殖的芽数达到15.5个。江建铭等^[10]以茎节段为外植体,同样得出B₅和MS适合作为金线莲茎段诱导丛生芽的基本培养基,B₅和MS的芽平均增殖率分为5.2倍和5.4倍,6-BA比KT更适合金线莲茎节诱导不定芽,且6-BA添加的适宜量为4.0mg/L,生长素NAA对金线莲不定芽的诱导与生长具有明显促进作用,芽体色浓绿、粗壮,且NAA适

宜添加的量为0.5~1.0mg/L。此外还研究发现:外植体以不含顶芽和长根的中部茎段为好,平均芽增殖率达到4.05倍,且芽数较多,发育良好。孔琼等^[11]以带腋芽茎段为外植体,诱导丛生芽的适宜培养基为MS+KT 1.0mg/L+NAA 0.2mg/L+6-BA 2.0mg/L+2,4-D 0.4mg/L。研究证明6-BA和2,4-D均有利于丛生芽的诱导,单独加入质量浓度为1.0~4.0mg/L 6-BA的培养基能使丛生芽增值倍数由2.3增加到4.5,同时加入6-BA和2,4-D,增值倍数进一步加大,且在培养基中加入2.0mg/L 6-BA和0.4mg/L 2,4-D时,增值倍数达到最大,为8.1。魏翠华等^[12]以顶芽为外植体,应用L9(34)正交试验设计研究得出对不定芽增殖的影响力:6-BA>蔗糖>NAA>基本培养基。何碧珠等^[6]还研究得到愈伤组织诱导丛生芽的适宜培养基为1/2MS+BA 2.0mg/L+NAA 0.2mg/L+香蕉汁100g/L,出芽数达到最高为14个,丛生芽增殖适宜培养基为1/2MS+BA 3.0mg/L+NAA 0.5mg/L+KT 1.0mg/L+香蕉汁100g/L+AC 0.2%,增值倍数为4.33。

2.2 无根苗生根诱导与根量增殖

诱导生根的研究内容主要是最佳培养基配方,包括MS培养基的优化、添加激素和添加物的类型和浓度。激素多为6-BA、GA₃、NAA和IAB,添加物多为香蕉汁、活性炭、蔗糖和琼脂。赵玥和郭顺星^[13]研究发现金线莲无根苗生根能力随MS培养基大量元素含量降低而升高,因而要减少MS培养基用量诱导生根。封应丽等^[9]试验得到生根适宜生长物质及浓度是IBA 0.5mg/L。罗庆国等^[8]在培养基中加入20g/L香蕉泥发现根生长粗壮。岑秀芬等^[14]发现:4.0mg/L NAA和0.5mg/L MET配合使用诱导生根效果最好,能有效提高根的质量,促进根的伸长和加粗,使平均根数达到10.40条、平均根长为2.88cm。魏翠华等研究得出:对生根培养的影响为:蔗糖>6-BA>基本培养基>NAA。黄敏等^[15]研究得到:对生根系数影响程度大小为:基本培养基>6-BA>活性炭>IAB。

3 金线莲愈伤组织诱导与增殖研究

冯亦平^[7]等研究得出诱导愈伤组织的最佳外植体是从茎段切成厚约2mm的小片(简称茎片),适合的培养基是MS(大量元素减半,微量元素加倍)+6-BA 4.0mg/L+ZT 0.2mg/L+NAA 0.5mg/L+0.7%琼脂+3%蔗糖,且诱导率为70%。王雅英等^[16]研究得出:以茎段、茎片和不定芽为外植体,均能成功诱导愈伤组织,且最佳外植体为不定芽,最佳培养基是MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 0.5mg/L+ZT 0.2mg/L,诱导率达95%。

4 影响金线莲组培苗的外因研究

4.1 消毒杀菌处理

4.1.1 培养室灭菌。张望舒等^[17]试验得出:除了甲醛高锰

酸钾熏蒸法、过氧化氢熏蒸法可用于金线莲组培室空气灭菌,艾叶与苍术联合熏蒸法也可降低金线莲组培苗的污染率,甲醛高锰酸钾熏蒸法灭菌效果最好。

4.1.2 外植体消毒。金线莲组培中外植体不同,消毒方法也不同。阚世超等^[18]以茎段为外植体试验得到:最佳消毒方式为用75%酒精浸泡30s,0.15%升汞消毒4min。杨红丽等^[19]以金线莲茎尖、茎段为外植体研究得出:相同消毒条件下茎段的污染率高于茎尖,茎尖耐受次氯酸钠浓度的能力比茎段弱,同时适合2种外植体的消毒方式为70%酒精处理30s+0.1%次氯酸钠处理20min。

4.1.3 组培苗培养过程抑菌。金线莲组培苗受微生物污染十分严重,在实验室中污染率可达50%,影响金线莲正常生长,许婉芳等^[20]将50%多菌灵加入培养基中,发现其抑制细菌和真菌生长效果明显,抑菌率达100%,且能促进金线莲生长。

4.2 培养基及添加物

培养基能在金线莲组培苗生长过程中提供所需要的营养物质,因此培养基配方是组培苗生长的基础条件。王丽芳^[21]研究证明:最利于金线莲生长量积累的培养基是MS+3%蔗糖,且在相同培养基中添加香蕉泥比添加马铃薯泥更有效。杨红丽等^[22]得到:蔗糖是金线莲离体培养最佳碳源,其培养的叶片颜色深绿,长势旺盛,在培养基中添加有机物可显著促进金线莲生长,椰汁和香蕉能显著加快金线莲生长速度,且添加2.0g/L的活性炭有利于培育壮苗。黄肇宇等^[23]在培养基中添加不同浓度稀土硝酸镧,其低浓度时对金线莲增殖、生长、生根具有促进作用,高浓度时具有一定抑制作用。

4.3 光照强度

金线莲属喜阴植物,在光照强度为2000~3000Lux时生长较快,过低光照强度不利于金线莲正常生长。陆祖正等^[24]研究得到:维持金线莲正常生长最低光照强度为400Lux。高于400Lux时光照强度越大,金线莲生长越健壮,低于400Lux时,金线莲中有机物积累大幅减少。

4.4 温度

金线莲组培苗生长过程中需要适宜的外界环境,主要包括光照和温度,因此在一定的光照条件下,温度的控制也尤为重要。牛蓓等^[25]研究得出:金线莲生长最适温度为25℃,最不适温度为35℃。杨红丽等人同样发现金线莲最适宜生长温度范围为20~25℃,当培养温度为25℃时,金线莲的生长速度最快,长势最旺盛,高于35℃时,金线莲会因热害而死亡。

4.5 光质

周锦业等^[26]研究发现:红光有利于植株茎的伸长生长,但在一定程度上造成植株徒长,绿光对植株生长

没有促进作用,蓝光有一定的壮苗效果,但植株纵向生长速度减慢。单纯的某种光质处理不利于金线莲组培苗健康生长,因此单色光照不适合作为金线莲组培苗的人工光源,但可考虑通过红蓝混合光源或者周期性交替使用单色光照处理来弥补上述缺点。

5 金线莲组织培养研究的问题与展望

5.1 问题

目前,我国在金线莲组织培养上的研究已取得较好的成果。目前主要针对原球茎、不定芽和丛生芽、无根苗根、愈伤组织诱导及增殖,研究其最佳外植体、最优配方、影响因素,以进行栽培。未见直接以愈伤组织作药源的研究,以及相关的增殖研究。另外,共生菌对金线莲种子萌发的影响、萌发条件研究和组培研究较少。

不同产地金线莲的研究较局限,不同产地野生金线莲生存环境不同,需要的培养条件也可能不同。国内学者主要研究福建和台湾金线莲,对其他产地野生金线莲研究较少。

有关影响金线莲组培苗生长的因素研究也已较完善,主要针对消毒杀菌处理、培养基及添加物、光照强度、温度和光质几方面进行,但关于培养室和外植体新杀菌方法和新杀菌材料研究较少;多用固体培养基,对液体及其他培养基研究较少;培养基添加物多采用椰汁、香蕉泥、马铃薯泥、活性炭,未见使用原生土壤提取液和一般土壤提取液;培养中用单色光如红光研究表明金线莲不适宜单色光照射培养,未见使用混合光以及周期性单色光。

5.2 展望

金线莲种子微小,自然萌发率和繁殖率低,目前市场上货源主要来自于野生采挖,产品一直处于供不应求的状况。近年来,随着对金线莲药用价值的认识进一步提高,其市场货源紧缺的状况更为严峻,野生资源也不断遭到破坏性采挖,以致处于濒临灭绝之地。利用组织培养技术解决金线莲种苗来源、快速繁殖种苗、加快人工栽培,对金线莲的开发利用、野生资源保护、稳定市场供应具有现实意义。目前,开唇兰属金线莲组培育苗已获成功,但还是存在地域限制,在四川尤其西部干旱河谷地区涉及极少。在种子组织培养、不同产地金线莲组培研究、培养基添加物(土壤浸提液)、混合光和周期性单色光方面进行研究,以提供充足的药源,保护

金线莲。

(收稿 2017-03-14)

参考文献:

- [1]蔡文燕,肖华山,范秀珍.金线莲研究进(综述)[J].亚热带植物科学,2003,32(3):68-72.
- [2]王建勤,陈钢,林兰英.金线莲原球茎的组培诱导[J].中药材,1995,18(1):3-5.
- [3]封应丽,余元涛,杨春桃,等.植物生长物质对金线莲离体再生的影响[J].北方园艺,2010(7):136-138.
- [4]韩晓红,王春龙,段春红.不同激素水平对金线莲组织培养的影响[J].广东农业科学,2012(18):94-97.
- [5]何碧珠,何官榕,黄铭星,等.福建野生金线莲快速繁育技术[J].农业工程,2013,3(2):94-97.
- [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]冯亦平,张利平,王岩花,等.金线莲外植体的筛选及不定芽诱导的研究[J].种子,2009,28(10):19-22.
- [8]罗庆国,叶炜,江金兰,等.金线莲组培快繁技术研究[J].南方农业,2011,5(10):43-44.
- [9]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.
- [10]江建铭,俞旭平,沈晓霞,等.金线莲组培快繁技术研究[J].时珍国医国药,2009,20(2):408-410.
- [11]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].安徽农业科技,2008,36(6):2272,2278.
- [12]魏翠华,秦建彬,谢宇,等.应用正交设计法优选台湾金线莲快繁培养基[J].中国农学通报,2013,29(04):114-117.
- [13]赵玥,郭顺星.两种金线莲组培苗的促根试验研究[J].辽宁农业科学,2011(3):40-42.
- [14]岑秀芬,韦鹏霄,刘芳.植物生长调节剂对台湾金线莲试管苗增殖和生根的影响[J].广西农学报,2009,24(2):19-21.
- [15]黄敏,梁春辉,李秀平,等.应用正交设计优化金线莲继代增殖和生根培养的研究[J].北方园艺,2015(01):96-98.
- [16]王雅英,林小华,洪璇.金线莲外植体筛选及愈伤组织诱导研究[J].亚热带植物科学,2011,40(3):41-43.
- [17]张望舒,吴梦依,黄瑜秋,等.艾叶和苍术熏蒸对金线莲组培室的空气灭菌效果[J].浙江农业科学,2015,56(12):1999-2001.
- [18]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,2009,27(3):981-982.
- [19]杨红丽,胡靖锋,徐学忠,等.金线莲的组织培养与快速繁殖研究[J].西南农业学报,2013,26(6):2485-2488.
- [20]许婉芳,龚福生,萧华山.杀菌剂对金线莲组织培养中微生物污染的抑制作用[J].福建果树,1999(110):6-7.
- [21]王丽芳.不同培养基及添加物对金线莲生长量的影响[J].北方园艺,2011(05):75-176.
- [22]杨红丽,胡靖锋,徐学忠,等.金线莲分化芽离体培养条件的优化[J].湖南农业科学,2014:52-54.
- [23]黄肇宇,叶晓霞,黎建玲,等.不同浓度硝酸镧对金线莲试管苗生长的影响[J].玉林师范学院学报(自然科学),2016,37(2):75-81.
- [24]陆祖正,唐君海,唐利球,等.低光照对金线莲组培苗生长的影响[J].中国热带农业,2013(51):56-58.
- [25]牛蓓,傅华龙,卿人韦,等.温度对组培金线莲生理生化影响的研究[J].四川大学学报(自然科学版),2004,41(4):842-844.
- [26]周锦业,丁国昌,何荆洲,等.不同光质对金线莲组培苗叶绿素含量及叶绿素荧光参数的影响[J].农学学报,2015,5(5):67-72.

Study Progress of *Anoectochilus roxburghii* in China

ZHOU Yu-qing, XIE Xue-qiang, JI Lei, ZHENG Qiao-ping, PAN Shi-qiong

(Department of Environment and Life Science, Sichuan Minzu College, Kangding, 626001, China)

Abstract: These aspects of *Anoectochilus roxburghii* were studied widely in China such as the induction and multiplication culture of the protocorm, the adventitious buds, the cluster buds, the rootage and the callus, and the influences to the tissue culture seedlings of the disinfection treatment, the culture medium and additives, the light intensity and wave, the temperature, and etc. These researches had made many achievements, but need many further studies as well.

Key words: *Anoectochilus roxburghii*; Tissue culture; Study Progress