

花多多对金线莲组培苗和移栽成活率的影响

牛欢¹, 谢卓宓¹, 古力¹, 梁莹², 韦坤华², 缪剑华², 李明杰^{1,3}, 张重义^{1,3*}

(1. 福建农林大学 作物科学学院 福建 福州 350002; 2. 广西壮族自治区 药用植物园 广西 南宁 530023;

3. 福建农林大学 作物遗传育种与综合利用省部共建教育部重点实验室 福建 福州 350002)

摘要:以金线莲品种“泰宁一号”为试验材料,用 MS 与 B5 作为基础培养基,添加不同种类不同用量的花多多肥料,筛选出有利于金线莲组培苗培育壮苗和提高移栽成活率的最优培养基。结果表明:不同组合培养基对金线莲根茎和叶生长影响存在着明显差异,MS+添加物更有利于根、茎生长;而 B5+添加物更有利于叶片生长;同时,与空白 MS 和 B5 培养基相比,适当增添不同量花多多可以显著地改善金线莲组培苗的长势、增加内含物和提高移栽成活率。其中,尤以 MS+2 g 花多多 1 号的处理更利于培育壮苗、提高移栽成活率。

关键词:金线莲;花多多;组织培养;生长状况;移栽成活率

中图分类号:S567 文献标志码:A 文章编号:1001-8581(2018)10-0036-05

Effects of Adding “Huaduoduo” Fertilizer into Culture Medium on Growth Potential and Transplanted Survival Rate of *Anoectochilus roxburghii* Plantlets

NIU Huan¹, XIE Zhuo-mi¹, GU Li¹, LIANG Ying², WEI Kun-hua²,
MIAO Jian-hua², LI Ming-jie^{1,3}, ZHANG Zhong-yi^{1,3*}

(1. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Medical Plant Garden of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530023, China; 3. Key Laboratory of Crop Genetics, Breeding and Comprehensive Utilization Constructed by Fujian Province and Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The *Anoectochilus roxburghii* cultivar “Taining No. 1” was used as experimental material, and the optimum medium for cultivating the strong plantlets and enhancing the transplanted survival rate of plantlets was screened out by adding different kinds and levels of “Huaduoduo” fertilizer into MS and B5 basic medium. The results showed that the effects of different combinations of media on the growth of root, stem and leaf of *A. roxburghii* plantlets were significantly different, and MS+ additives was more conducive to the growth of root and stem, while B5+ additives was more conducive to leaf growth. In comparison with the blank MS and blank B5 without additives, the MS or B5 basic culture medium with appropriate quantity of “Huaduoduo” fertilizer could significantly improve the growth vigor of *A. roxburghii* plantlets, increase their inclusions, and improve their survival rate after transplantation. Among all treatments, the treatment MS+2 g “Huaduoduo No. 1” was more beneficial to the cultivation of strong plantlets and the improvement of their transplanted survival rate.

Key words: *Anoectochilus roxburghii*; “Huaduoduo”; Tissue culture; Growth status; Transplanted survival rate

金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)又名金线兰、金蚕、乌人参、金线入骨消等,是一种多年生兰科草本植物^[1]。主产于中国、印度等几个亚洲国家,国内金线莲主要在福建、云南等地种植。金线莲含多糖、黄酮类化合物、生物碱等多种成分,具有抗衰老、提高机体免疫等功效^[2]。但由于金线莲对生长环境要求严格,种子缺乏胚乳、自然条件下发芽率极低,导致种质资源匮乏。目前,生产上金线莲多采用组织培养

的方法进行繁育^[3]。虽然金线莲的组培技术也相对较为成熟,但从组培苗移栽到大田环境下,组培苗的质量和炼苗环节仍然是影响最终成活率的关键因素。这使得具有优良基础的金线莲组培苗成了决定其成活率以及炼苗有效性的前提条件。为了获取金线莲林下移栽所需要的最佳长势组培苗,本研究立足前期金线莲繁育和栽培体系基础,外源添加兰科通用肥料花多多 1 号、11 号,研究不同外源添加物水平对金线

收稿日期:2018-05-14

基金项目:国家中医药管理局 2015 年行业科研专项(201507002);国家中药材产业技术体系建设项目(CARS-21-09)。

作者简介:牛欢(1993—),女,硕士,研究方向:中药资源研究。* 通讯作者:张重义。

莲组培苗生长状况、多糖含量、可溶性蛋白含量与移栽成活率的影响。本研究不仅为金线莲进行炼苗和后期移栽提供优良的材料,也为提高金线莲的安全生产和有效性奠定重要组培技术支持。

1 材料与处理

1.1 试验材料

以福建省广泛种植的金线莲品种“泰宁一号”为试验材料,在福建农林大学中药材 GAP 研究所内,将 MS、B5 培养基作为基础,详细研究不同外源添加肥料对金线莲组培苗的影响,以获取能够在林下或大棚成活率高且有效的组培苗。

1.2 试验处理

基于课题组前期已经构建的金线莲繁殖体系^[4]的研究基础,以 MS/B5+琼脂 7 g/L+蔗糖 25 g/L+NAA 0.2 mg/L+活性炭 1.5 g/L 作为基础培养体系。分别添加 0、1、2、3 g 等不同水平的兰科专用肥(花多多 11 号)和通用肥(花多多 1 号)。选择长势一致的金线莲增殖苗,以茎段接种方式接种到相应培养基上^[5],每瓶接种 15 丛,每个处理接种 10 瓶,每个处理 3 组重复。培养条件设置为温度 25 ℃ 左右,光照强度 750~1500 lx,光照时长 10~12 h/d^[6]。接种 150 d 后移出培养基,对其生理生化指标进行测定,并在每个处理中选取长势相对一致的种苗进行林下移栽,移栽 30 d 后统计各处理成活率,最终获取林下移栽所需的最佳处理。

2 试验方法

2.1 生物量测定

在接种后 150 d 进行取样,统计金线莲植株茎高与茎粗、叶片长宽、根长与根粗、鲜重与干重,并计算其折干率。

2.2 多糖含量测定

接种后 150 d 对移出的组培苗进行多糖含量的测定,并根据蒽酮-硫酸比色法测定多糖含量^[7]。取金线莲全株,在 40 ℃ 的真空干燥箱内烘干 1 h,将植株取出后研磨成细粉状,经 380 μm 孔径筛进行过滤;60 ℃ 水浴,超声振荡提取 40 min;在 4200 r/min 转速下离心 15 min 后取上清液。将所获取的沉淀加水,重复离心 2 次,合并 3 次上清液,将其低温旋转蒸发至 10 mL。移取 3 mL 提取液加入蒽酮试剂反应,进行沸水浴加热后迅速移入冷水浴冷却,在 625 nm 下测定 A(吸收度)值。根据试验中建立的葡萄糖标准曲线回归方程: $y = 0.0495x - 0.0059$ ($R^2 = 0.9911$) 计算多糖含量。

2.3 可溶性蛋白测定

采用考马斯亮蓝法^[8]测定总蛋白含量,称取各处理鲜样 0.5 g,将研钵置于冰浴中研磨,添加 4 次 0.05 mol/L pH=7.8 磷酸缓冲液,第一次添加 1.5 mL,其余 3 次添加 1 mL,研磨成浆后移入离心管,于 4 ℃、14000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液为待测蛋白。采用考马斯亮蓝 G-250 比色法测定,以牛血清蛋白作为标准蛋白。使用分光光度计在 595 nm 下比色测定可溶性蛋白含量。按照以下公式计算出可溶性蛋白含量^[9]。

$$\text{可溶性蛋白含量} / (\text{mg/g}) = \frac{C \times V \times D}{M \times V_i \times 1000}$$

其中, C 为按照标准曲线得出的蛋白含量, V 为提取蛋白的提取液体积, D 为溶液稀释倍数, M 为研磨用的鲜样品质量, V_i 为测定时取用的待测液的体积。

2.4 数据处理

用 Excel 对不同处理的数据进行初步整理,用 DPS 软件对不同处理的数据进行统计分析^[10]。

3 结果与分析

3.1 培养基内外源添加肥料对金线莲生长状况的影响

以普通 MS 和 B5 培养基作为基础培养基,分别添加不同水平的花多多 1 号与花多多 11 号,研究其对金线莲组培苗生长的影响。从 2 种培养基总体上来看,B5+添加物的培养基能够显著促进金线莲组培苗根数量增加。在 2 种培养基中分别加入不同水平的花多多均能够促进根数增加,但对根长的影响相对较小。同时,B5+花多多 1 号的效应显著优于 B5+花多多 11 号。值得注意的是,B5 加 2~3 g 花多多 11 号的处理之间效果无显著差异。因此,在生长过程中如果想获取根系较多的组培苗,可以用 B5 培养基加入适量花多多 1 号诱发苗体产生更多根系。根据表 1 可以发现,B5+3 g 花多多 1 号培养基内金线莲根数量的增长情况更加明显;但对于平均根长的影响,MS 培养基优于 B5 培养基,MS+2 g 花多多 1 号培养基内平均根长增加更为明显,并且其生根数与 B5+3 g 花多多 1 号处理相比,在 0.01 水平上无显著差异性。综合根长与根数来看,MS+2 g 花多多 1 号培养基内金线莲根系生长状况最好,最适合移栽。

根据表 2 所示,金线莲茎长与茎粗的增加以 MS+2 g 花多多 1 号培养基内效果更为显著。MS+3 g 花多多 1 号培养基与 B5+2 g 花多多 11 号培养基内金线莲叶片宽度与其他处理有明显差异,其叶片宽度明显大于其他处理下的叶片宽度。对于叶片长度,B5+2 g 花多多 11 号培养基内金线莲叶片长度明显大于

其他处理。综合叶宽与叶长,以 B5 培养基为基础时添加 2 g 花多多 11 号对金线莲叶片生长最有利。总体而言,以 MS 为基础培养基添加花多多 1 号的培养基中,金线莲组培苗在茎长、茎粗等生长指标明显优于其它处理;在以 B5 为基础培养基的条件下添加花多多 11 号金线莲的叶片生长状况较好。

培养基中添加外源添加物对组培苗茎、叶的影响与对根系生长的影响相反。从 2 种培养基的本底来看,MS 培养基更有利于根、茎的生长,B5 培养基更有利于叶片的生长。从不同添加物来看,花多多 1 号更

有利于茎叶的生长。此外,从培养基和外源添加物的组合来看,MS+花多多 1 号相比其它处理能够显著促进根的生长和茎部的伸长和加粗。综合不同处理对金线莲组培苗根、茎、叶生长的影响可以看出,不同处理组合对根和茎、叶的生长影响存在着差异,这种差异更多是由于培养基本身性质所决定。因此,在金线莲的生产实践中,应该考虑不同培养基及添加物对苗体的影响,依据具体需求进行合理搭配以获取理想的移栽壮苗。

表 1 添加肥料对于金线莲根系生长状况的影响

培养基及添加物	添加水平/(g/L)	生根率/%	生根数/条	平均根长/cm
MS	0	100	3.703±0.2 bcAB	3.35±1 abAB
MS+花多多 1 号	1	100	3.496±0.5 bcB	3.20±0.9 abA
	2	100	3.741±0.2 bcAB	3.49±0.6 aA
	3	100	3.808±0.4 abcAB	2.75±0.5 abcdABC
MS+花多多 11 号	1	100	3.357±0.5 bcB	2.01±0.4 defCD
	2	100	3.424±0.1 bcB	2.11±0.5 cdefCD
	3	100	3.583±0.1 bcAB	2.39±0.7 cdefCD
B5	0	100	3.808±0.2 abcAB	3.33±0.9 abA
B5+花多多 1 号	1	100	3.202±0.3 abcAB	2.69±0.1 bcdeABC
	2	100	4.381±0.5 abAB	2.81±0.7 abcABC
	3	100	4.659±0.4 aA	1.69±0.3 fD
B5+花多多 11 号	1	100	3.960±0.1 abcAB	2.65±0.6 bcdeBCD
	2	100	4.234±0.3 abcAB	2.33±0.5 cdefCD
	3	100	3.156±0.1 cB	1.98±0.5 efCD

注:表中小写字母表示不同处理在 $P<0.05$ 水平上的差异显著性,大写字母表示不同处理在 $P<0.01$ 水平上差异显著性。下表同。

表 2 添加肥料对于金线莲茎叶生长状况的影响

培养基及添加物	添加水平/(g/L)	平均茎长/cm	平均茎粗/cm	平均叶宽/cm	平均叶长/cm
MS	0	4.955±0.2 abcABC	0.22±0.01 cdABC	1.3507±0.3 cdAB	1.7453±0.3 bAB
MS+花多多 1 号	1	4.264±0.1 bcdBCD	0.19±0.03 deCD	1.4587±0.2 abcdAB	1.8293±0.2 abAB
	2	6.358±0.1 aA	0.25±0.03 aA	1.67±0.2 abcAB	1.9207±0.3 abAB
	3	5.185±0.1 abABC	0.19±0.03 deCD	1.7253±0.2 aA	2.012±0.2 abAB
MS+花多多 11 号	1	3.887±0.1 bcdeBCDE	0.19±0.03 deCD	1.7113±0.2 abA	2.0413±0.2 abAB
	2	3.525±0.1 cdefCDE	0.17±0.01 eD	1.7087±0.3 abA	1.7753±0.3 abAB
	3	5.069±0.1 abABC	0.22±0.02 bcABC	1.5653±0.2 abcdAB	1.8233±0.3 abAB
B5	0	2.516±0.05 efE	0.19±0.03 deCD	1.4453±0.3 abcdAB	1.768±0.2 abAB
B5+花多多 1 号	1	2.586±0.05 efE	0.16±0.02 abcdAB	1.5967±0.2 abcdAB	1.918±0.2 abAB
	2	2.31±0.05 fE	0.21±0.01 cdBC	1.57±0.1 abcdAB	1.8773±0.3 abAB
	3	3.098±0.1 defDE	0.25±0.04 abA	1.7033±0.2 abA	1.914±0.3 abAB
B5+花多多 11 号	1	6.392±0.1 aA	0.20±0.02 cdCD	1.284±0.1 dB	1.6633±0.2 bB
	2	4.377±0.05 bedABC	0.21±0.01 cdBC	1.7287±0.3 aA	2.202±0.3 aA
	3	5.22±0.05 abAB	0.20±0.03 cdCD	1.3733±0.3 bedAB	1.6133±0.3 bB

3.2 外源添加物对金线莲组培苗的生物量及移栽成活率的影响

各处理中以 MS+2 g 花多多 11 号处理的金线莲组培苗平均折干率最高,达到 26.53%,与其他处理呈现出明显差异,表明以 MS 为基础培养基添加 2 g 花多多 11 号能明显增加金线莲组培植株的干物质积

累。在金线莲生产上,大棚或林下环境中组培苗的移栽成活率对于金线莲后期产量收获具有重要意义。一般情况下影响金线莲移栽成活率主要包括 2 个方面因素:一个是健壮金线莲组培苗壮苗培育;另外一个则是移栽驯化环节。本研究选择阔叶林栽培不同处理培养基的组培苗,并对其移栽成活率进行观察和记

录。结果发现在栽培 30 d 后,MS+2 g 花多多 1 号培养基内的金线莲组培苗成活率最高,达到 83.12%,MS+0 g 花多多成活率最低,只有 70.77%。这表明适当的添加肥料可显著提高金线莲组培苗移栽成活率。

表 3 不同培养基植株生物量积累及移栽成活率

培养基及添加物	添加水平/(g/L)	平均鲜重/g	平均干重/g	平均折干率/%	成活率/%
MS	0	0.5075±0.1 abcdABC	0.0796±0.001 eF	16.07±3 bedABC	70.77±0.3 fG
MS+花多多 1 号	1	0.5104±0.1 abcdABC	0.0645±0.003 fG	19.70±5 abcABC	82.63±0.1 aAB
	2	0.6542±0.1 abAB	0.1029±0.003 bB	21.10±5 abcABC	83.12±0.5 aA
	3	0.5036±0.1 abcdABC	0.0478±0.001 hI	11.83±2 cdBC	82.65±0.4 aAB
MS+花多多 11 号	1	0.4607±0.1 bedABC	0.0954±0.001 cC	26.42±4 aA	76.54±0.4 cdCDEF
	2	0.4557±0.1 bedABC	0.1127±0.007 aA	26.53±5 aA	76.79±0.4 cdCDE
	3	0.5567±0.1 abcdABC	0.0879±0.003 dD	23.48±3 abAB	78.43±0.2 bcBCD
B5	0	0.3837±0.1 dC	0.0573±0.004 hH	19.46±2 abcABC	73.73±0.3 defDEFG
B5+花多多 1 号	1	0.5451±0.1 abcdABC	0.0872±0.001 dDE	18.41±3 abcABC	72.79±0.7 efEFG
	2	0.4412±0.1 cdBC	0.067±0.001 fG	22.20±4 abAB	72.17±0.2 efFG
	3	0.6871±0.2 aA	0.0808±0.001 eEF	9.65±2 dC	74.37±0.1 deDEFG
B5+花多多 11 号	1	0.593±0.1 abcdABC	0.0674±0.001 fG	16.15±3 bedABC	81.56±0.5 abABC
	2	0.557±0.1 abcdABC	0.0461±0.002 hI	9.49±2 dC	81.74±0.5 abABC
	3	0.6164±0.3 abcABC	0.0833±0.002 deDEF	25.12±5 abA	79.61±0.6 abcABC

3.3 不同外源添加物对金线莲多糖及可溶性蛋白含量的影响

为了进一步了解不同外源添加物对组培苗的药用活性成分影响。对不同培养基生长条件下金线莲组培苗多糖及可溶性蛋白的含量进行测定。从测定结果可以看出,以 B5+3 g 花多多 1 号培养基上生长的金线莲植株内可溶性蛋白含量最高,达到 8.19 mg/

g; 以 MS+2 g 花多多 11 号培养基内的金线莲多糖含量最高,达到 23.51 mg/g。综合以上结果得出,在 MS 和 B5 培养基内添加外源添加物能够显著提升金线莲组培苗内多糖和蛋白含量。多糖和游离蛋白含量水平在一定程度上能够反映出苗体的代谢水平和长势。因此,本研究的结果说明金线莲组培培养基内适当增添外源添加物能显著提高组培苗的代谢水平。

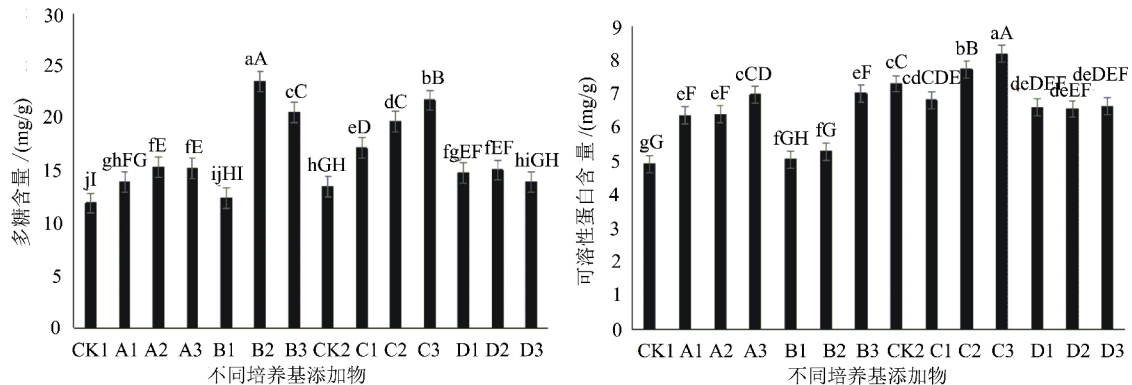


图 a 为多糖含量、图 b 为可溶性蛋白含量; CK1、CK2 代表两个空白, A、B、C、D 分别表示 MS 花多多 1 号、MS 花多多 11 号、B5 花多多 1 号、B5 花多多 11 号, 1、2、3 代表添加花多多的质量 1、2、3 g

图 1 不同培养基添加物内金线莲药用活性成分含量

4 讨论

将组培苗移栽到设施栽培和林下栽培环境中,组培苗的成活率是影响后期产量和品质的决定性因素之一。目前,在金线莲组织培养的过程中,多采用在培养基中添加不同种类与用量的生长素^[11]、碳源物质^[12]等方法,以研究其对组培苗生长强弱和相应的壮苗效果的影响。前期的研究表明在金线莲培养基中适当添加香蕉等外源添加物能显著改善组培苗的

长势和长相^[13]。花多多是重要的兰科植物肥料,其中,花多多 1 号的基本配方为氮:磷:钾=1:1:1^[15],加上世界专利的 M-77 微量元素组合使作物吸收养分更均衡,可以作为所有植物的通用肥料;花多多 11 号高钾含量(N:K=1:5.2)极大地满足如兰花这类具肉质根或假球茎植物对钾肥的需求。研究发现花多多肥料能够显著促进植物的生长和发育^[14],添加于不同的培养基中能够显著改善组培苗的生长状况。目前,在金线莲培养基中添加肥料对金线莲组培苗影

响的研究相对较少。本研究通过添加不同水平 2 种肥料,详细研究了适量花多多肥料对金线莲组培苗品质的影响。结果发现:添加不同种类和不同量的肥料对金线莲组培苗的长势及营养成分均有不同程度的影响,并且发现金线莲组培苗的长势与营养成分含量无关,例如 MS+2 g 花多多 1 号处理下金线莲组培苗长势最好、移栽成活率最高,但其多糖成分仅有 15.33 mg/g,可溶性蛋白含量为 6.39 mg/g,均未达到最大含量;MS+2 g 花多多 11 号处理下,虽然金线莲生长状况不佳,但其折干率与多糖含量最高。综合来看,MS+2 g 花多多 1 号处理下更利于培育壮苗、提高移栽成活率,同时,也可以看出花多多 1 号对于金线莲的生长更有利。虽然本文具体研究了不同花多多添加水平对金线莲组培苗的生长和长势的影响,没有系统结合金线莲组培苗、后期设施和林下栽培技术体系进行系统研究,因此,后续还需进一步结合大田栽培进行深入研究。

致谢:感谢作物生态与分子生理学福建省高校重点实验室(福建农林大学)对本研究的支持。

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):102-104.
- [2] 唐健,邓元荣,卓仪荣.金线莲的药理活性研究进展[J].海峡药学,2008,20(12):77-79.
- [3] 汪佳秀,武艳艳,钟田坤.金线莲组织培养快繁技术试验[J].南方农业,2016,10(6):50-52.
- [4] 刘润东,郭文杰,林忠宁,等.金线莲组织培养及营养成分的分析研究[J].广西农业科学,2006,37(5):506-509.
- [5] 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.
- [6] 陈兆贵.金线莲组织培养和移栽技术研究[J].惠州学院学报,2007,27(6):14-17.
- [7] 靳淑敏,齐鹏成,周娜,等.蒽酮-硫酸比色法测定三黄糖敏汤中多糖的含量[J].中国药房,2015(6):811-812.
- [8] 李娟,张耀庭.应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J].中国生物制品学杂志,2000,13(2):118-120.
- [9] 刘萍.植物生理学实验技术[M].北京:科学出版社,2007.
- [10] 唐启义,冯明光.实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M].北京:科学出版社,2002.
- [11] 唐军荣,金德博,余秋尚.不同培养基组分对金线莲组培苗生长及生根的影响[J].现代农业科技,2015(24):89-90.
- [12] 林秀莲,杨自轩,严旭超,等.金线莲组培快繁及移栽技术研究[J].园艺与种苗,2016(5):6-9.
- [13] 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.
- [14] 王再花,朱根发,操君喜,等.不同施肥处理对春石斛生长特性和矿物质含量的影响[J].广东农业科学,2011,38(5):83-86.
- [15] 张之鹏,易彬,罗火林,等.不同营养液对铁皮石斛生长及多糖含量的影响[J].南昌大学学报:理科版,2016,40(1):88-92.

(责任编辑:周军)