

金线莲种子培养的研究

伍成厚^{1,2}, 冯毅敏¹, 贺漫媚¹, 陈妙贤¹, 朱纯¹, 叶振华¹

(1. 广州市园林科学研究所, 广东 广州 510405; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要 金线莲种子在培养基 1/2MS + 6 - BA1.0 mg/L + NAA1.0 mg/L 上萌发后形成原球茎, 原球茎可以直接发育成幼苗, 也可以由原球茎产生愈伤组织, 再由愈伤组织发育成类原球茎而分化成幼苗。通过类原球茎可以实现大量增殖, 在 MS + 6 - BA1.0 mg/L + NAA0.1 mg/L 上培养 60 d 的增殖倍数达到 6.7 倍。在培养基 MS + IBA0.3 mg/L 上, 金线莲的生根率可达到 96.0%。

关键词 金线莲; 种子; 原球茎; 类原球茎; 组织培养

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 9690(2008)01 - 0047 - 04

Seeds Culture of *Anoectochilus roxburghii*

Wu Chenghou^{1,2}, Feng Yimin¹, He Manmei¹, Chen Miaoxian¹, Zhu Chun¹, Ye Zhenhua¹

(1. Guangzhou Institute of Landscape and Garden, Guangzhou 510405, China;

2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Seeds of *Anoectochilus roxburghii* would germinate and develop to protocorms on the medium of 1/2MS + 6 - BA1.0 mg/L + NAA1.0 mg/L. The protocorms may develop to seedlings immediately or induce callous and then induce protocorm - liked - bodies which would develop to seedlings also. *Anoectochilus roxburghii* be rapidly propagated by the later method and 6.7 folds of propagation would get on the medium of MS + 6 - BA1.0 mg/L + NAA0.1 mg/L after subcultured 60 days. Seedling's rooting rate was 96.0% on the medium of MS + IBA0.3 mg/L.

Keywords: *Anoectochilus roxburghii*; seed; protocorm; protocorm - liked - body; tissue culture

金线莲 [*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.] 为兰科开唇兰属植物, 主要分布于中国、日本、斯里兰卡、印度和尼泊尔等国, 生长在深山密林下或溪涧旁潮湿的草丛中或竹林下, 特别是阔叶林下的潮湿地带, 一般呈稀疏、零星分布, 很少成片密生^[1]。金线莲是我国传统的珍贵药材, 因其叶脉呈金黄色的美丽线纹, 观赏价值极高, 也具有开发为室内观叶小盆栽的广阔前景。由于金线莲种子细小, 胚发育不全在野生状态下难以大量繁殖, 加上人为肆意采挖, 野生资源日渐濒危。利用植物组织培养

可以进行金线莲的快速繁殖^[1-7], 在种子培养方面, 前人报道利用金线莲的种子离体培养可以获得原球茎^[4-5], 并由原球茎离体发育成幼苗^[5]。本文着重报道金线莲种子培养过程中类原球茎的诱导及其分化的试验结果。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为广东省乳源瑶族自治县南岭山区野生的金线莲, 植株采集后种植在广州市园林科学研究所的温室内。开花期间进行人工授粉, 每株授粉 2 朵花, 授粉后将花萼其余部分剪除, 从正常发育的果实中采取种子进行离体培养。

1.2 种子萌发及原球茎的诱导

采集接近成熟的果实, 用自来水冲洗干净, 先在

收稿日期: 2007 - 05 - 20

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B60302006), 广州市科技计划项目(2004Z3 - E0361); 广州市建委项目[(2003)06]

作者简介: 伍成厚(1968 -), 男, 湖南省绥宁县人, 博士, 主要从事园林植物组织培养的研究与应用。

70%酒精浸20 s,再用0.1%升汞消毒10 min,并以无菌水冲洗5~6遍。剖开果实取出种子,在培养基1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L上种子萌发形成原球茎。

1.3 类原球茎诱导、分化

将原球茎接种到诱导培养基上进行类原球茎的诱导,每种培养基接种10瓶,每瓶8团块,培养6周后统计愈伤组织诱导率及类原球茎产生率,愈伤组织诱导率=产生愈伤组织块数/总块数,类原球茎产生率=产生类原球茎块数/总愈伤组织块数。

将形成的类原球茎接种到分化培养基,每种培养基接种3瓶,每瓶10团块,60 d后统计类原球茎的分化情况。小苗增殖倍数=小苗数/接种的类原球茎块数。新的类原球茎分化数量根据目测进行分级,以分化数量最多的为“++++”,依次类推,分化最少的为“+”。

1.4 生根诱导及移栽

将颜色变绿的无根苗转入生根培养基,每种培养基接种5瓶,每瓶接种10株,45 d后统计生根率。将已生根的苗炼苗7 d,洗去小苗基部的培养基后移入泥炭土中,遮阴保湿,30 d后统计移栽成活率。

1.5 培养基及培养条件

以MS、1/2MS(大量元素减半)为基本培养基,添加不同浓度的6-BA、NAA、IBA,培养基均含精

制白砂糖3%、卡拉胶0.51%,pH 5.8。培养温度为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$,光强为1500~2000 lx,光照时间10 h/d。

2 结果与分析

2.1 生长调节物质对类原球茎诱导的影响

金线莲的种子细小,呈灰尘状,一枚蒴果含有成千上万粒种子,种子由球形胚与单层细胞构成的种皮组成,在自然条件下种子需与真菌共生才能萌芽生长。本文试验中,金线莲种子在1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L培养基上光照培养,胚的体积逐渐增大。培养1个月左右胚的体积明显胀大,突破种皮开始萌发,培养45 d左右可以发育成原球茎(Protocorm)。

将原球茎转入诱导培养基,其顶部会分化出叶片,而基部则长出大量白色假根,这些假根部分能伸入培养基,可能起吸收营养的作用。假根保持相当一段时期,在根分化后才逐渐解体。在部分原球茎表面会形成愈伤组织,通常为白色、颗粒状,质地致密的可以直接分化为类原球茎(Protocorm-liked-body, PLB)。从表1可以看出,培养基中添加生长调节物质6-BA和NAA可以促进愈伤组织的形成,在6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L条件下,愈伤组织的诱导率可达52.5%。

表1 植物生长调节物质对金线莲类原球茎诱导的影响

编号	培养基浓度/mg·L ⁻¹	原球茎 块数	愈伤组织			PLB	
			块数	分化率/%	生长状况	块数	分化率/%
1	MS	80	2	2.5	白色、软	0	0
2	MS+6-BA 1.0+NAA 0.1	80	10	12.5	白色、硬	10	100
3	MS+6-BA 1.0+NAA 0.5	80	23	28.8	白色、硬	20	87.0
4	MS+6-BA 0.3+NAA 0.1	80	19	23.8	白色、硬	19	100
5	MS+6-BA 0.2+NAA 0.5	80	42	52.5	白色、硬	30	71.4

在相同培养基上,愈伤组织可以逐渐分化出类原球茎,较低浓度的生长素(NAA 0.1 mg/L)有利于类原球茎的分化。

2.2 生长调节物质对类原球茎发育的影响

金线莲原球茎在上述培养基上可以发育成苗,而类原球茎通过培养也可以发育成绿色小苗,由原球茎和类原球茎发育的2种小苗,在形态的差异并不明显。在培养过程中,类原球茎的基部又可以分化出愈

伤组织和新的类原球茎,这些类原球茎也可发育成小苗,从而形成小苗、类原球茎和愈伤组织混生的团块。在原培养基上,类原球茎不经切割也可增殖,并有部分类原球茎逐渐分化形成芽,而部分则处于分生状态,但通过继代培养它们最终都能形成植株。从表2可以看出,细胞分裂素浓度增高,有利于类原球茎的分化,而不利于根的形成。在MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基上,小苗的增殖倍数最高可

达6.7倍,而类原球茎的分化则以MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基最多。

表2 植物生长调节物质对金线莲类原球茎发育的影响

编号	培养基浓度/mg·L ⁻¹	PLB块数	形成小苗数	增殖倍数	小苗状况	新PLB形成数量
1	MS	30	65	2.2	根1~2条	+
2	MS+6-BA1.0+NAA 0.1	30	203	6.7	丛生,分化假根	++++
3	MS+6-BA1.0+NAA 0.5	30	162	5.4	丛生,分化假根	++++
4	MS+6-BA0.3+NAA 0.1	30	185	6.2	丛生,有根分化	++++
5	MS+6-BA1.0+NAA 0.01	30	190	6.3	丛生,分化假根	++
6	MS+6-BA0.5+NAA 0.01	30	173	5.8	丛生,有分化根	+++

2.3 试管苗生根诱导与移栽

由于金线莲小苗、类原球茎和愈伤组织成团块混合生长,为方便幼苗移栽需将小苗分开进行生根诱导。表3可以看出,金线莲在不含激素的MS培养基上生根率也可达到90%,在培养基中添加有机物胰蛋白胍可促进生根。试验表明,浓度低浓度的生长素有利于金线莲根的生根,而IBA诱导生根的效果优于NAA。在培养基MS+IBA0.3 mg/L培养基上,金线莲的生根率可达到96.0%。金线莲生根虽然生根容易,但单株小苗生根的数量不多,均为1~3条根。

表3 不同生根培养基对金线莲生根的影响

编号	培养基浓度/mg·L ⁻¹	芽数/个	生根芽数/个	生根率/%	平均根数/条
1	MS	50	45	90.0	1.8±0.4
2	MS+NAA 0.1	50	46	92.0	1.1±0.3
3	MS+NAA 0.5	50	38	76.0	1.1±0.3
4	MS+IBA 0.1	50	46	92.0	1.7±0.7
5	MS+IBA 0.3	50	48	96.0	1.4±0.6
6	MS+IBA 1.0	50	44	88.0	1.3±0.5
7	MS+蛋白胍 2000	50	47	94.0	1.3±0.6

炼苗7 d,将试管苗从培养瓶中取出,自来水冲洗干净后,将幼苗移栽到泥炭土中,保湿遮阴,90%以上的移栽植株能够成活。

3 结论与讨论

兰科植物的种子在人工配制的培养基上萌发,可以从球形胚发育成原球茎,而营养器官通过愈伤组织也可以诱导出类似原球茎的结构,通常称之为类原球茎(Protocorm-liked-body, PLB),类原球茎也可以发育成苗。通过类原球茎实现高频率增殖是

兰科植物繁殖的特色途径,已普遍应用于兰花的工厂化生产中。金线莲为兰科植物,其繁殖也可采取此类途径。前人关于金线莲的组织培养主要是采用茎段腋芽萌发新植株再诱导丛生芽的繁殖方法^[1-2],也有利用茎节诱导(类)原球茎的报道^[3],而采用种子繁殖的资料较少^[4-5]。1995年王建勤等用组培方法从种子诱导出原球茎,但未解决成苗问题^[4],2002年黄慧莲等利用种子培养获得了试管苗,认为种子萌发成原球茎较适宜的培养基为Knudson C,原球茎分化成小苗的适宜培养基为Knudson C+6-BA0.5 mg/L+马铃薯提取物20%,成苗率可达51%^[5]。本文试验中利用1/2MS培养基离体培养未成熟的金线莲种子可以萌发成原球茎,原球茎可以进一步发育成幼苗。原球茎在培养阶段也可以产生愈伤组织,并由愈伤组织形成类原球茎,再进一步发育成幼苗。金线莲种子离体培养能产生大量愈伤组织,并由类原球茎发育成苗的现象,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,在不破坏生态环境的条件下,可能取得相当可观的经济效益,具有良好的应用前景。

前人报道,在培养基中添加高浓度的生长素^[6]或生根粉^[7],可以促进金线莲试管苗的生根。本文试验培养基MS不加生长调节物质金线莲试管苗的生根率90%,平均根数最高;添加低浓度的NAA和IBA仅能提高生根率,而较高的浓度(0.5 mg/L以上)则抑制生根。本试验中金线莲根的数量虽少,但根比较粗壮,只要移栽后注意遮阴保湿,也可取得90%以上的成活率,这在金线莲工厂化生产中有助于降低试管苗的生产成本。

参考文献:

- [1] 范子南,肖华山,范晓红,等. 金线莲的组织培养研究[J]. 福建师范大学学报:自然科学版, 1997, 13(2): 82-87.
- [2] 毛碧增,娄沂春,蔡素琴,等. 金线莲的快速繁殖[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 1999, 25(5): 527-528.
- [3] 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): 54-55.
- [4] 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.
- [5] 黄慧莲,刘贤旺,吴祥松,等. 金线莲种子诱导成苗的研究[J]. 中草药, 2002, 25(1): 3-5.
- [6] 黄慧莲,刘贤旺,吴祥松,等. 金线莲无根苗的壮苗促根试验研究[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(6): 74-75.
- [7] 王雅英,林荣耀,杨忠耿,等. 金线莲快速繁殖及促根壮苗试验[J]. 亚热带植物科学, 2005, 34(3): 40-42.

(上接第42页)

为4.5 mg,总酶活为1 975.4 U。由表1 换算比活力与原提取液比活力之比求得纯化倍率为12 倍,总酶活之比即回收率为28%。蛋白量显著减少,其原因在于大量杂蛋白及该酶的酸碱性同工酶随纯化流程而被清除。总酶活的大量减少可能在于不稳定的低活性的酸性同工酶及高活性的碱性同工酶被去除。纯化后的结果与国内同行对 HRP 纯化的结果接近。

3.4 酶的稳定性

酶学性质的研究结果显示酶最适温度为55 ℃,在70 ℃以下时稳定,40 ℃和50 ℃有轻微激活作用,70 ℃后酶活力迅速降低,在到达最适温度前其活力随着温度的升高而增高,故酶的热稳定性较高,与所属酶的属性相最适 pH 为6.8。在 pH 值为6~9,于4 ℃下处理24 h,其酶活力仍在80%以上,故该酶的 pH 值稳定范围较广,而在 pH2.0 以下几乎没有活性, Burnette 认为, POD 在低 pH 时失活是由于在低 pH 条件下 POD 失去了亚铁原卟啉(Heme group) 组份,该组份是构成 POD 结构及活性中心的必需成分^[9-10]。

综上所述,竹笋脚料中含有丰富的过氧化物酶,经过三步纯化可以得到 R_z 值高达2.5 的纯酶,同时在进行阳离子交换层析的时候,得到中性同工酶。

由此可见过氧化物酶在植物体内易于分离,是单一存在的,不与其他蛋白结合在一起的。此酶对温度有较高的稳定性和耐受性,对 pH 的适用范围很广泛,这一点使其在应用时允许有较大的 pH 值及温度变化范围。与辣根过氧化物酶相比,竹笋脚料过氧化物酶既有大量的非常廉价的原料来源,又有非常优越的酶学特性,应用前景乐观。

参考文献

- [1] 田国忠,李怀芳,裘维番. 植物过氧化物酶研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(4): 332-344.
- [2] 黄燕华,贾 楠,严 岩,等. 双水相萃取法应用于白萝卜中快速提取过氧化物酶[J]. 广东化工, 2006, 1(33): 31-41.
- [3] 罗 曼,邹国林,邹开朗. 笋壳过氧化物酶提纯及综合利用研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(4): 28-32.
- [4] 何忠效. 生物化学实验技术[M]. 化学工业出版社, 2004: 368-371.
- [5] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2001: 123-124.
- [6] 蒋立科. 现代生物化学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2003: 19-118.
- [7] 徐芝勇,严 群,强 毅,等. 大豆过氧化物酶纯化及酶学特性研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(2): 82-85.
- [8] 范 军,李 纯,等. 辣根过氧化物酶的分离制备和纯化[J]. 安徽农业大学学报, 1998, 25(3): 313-316.
- [9] Burnette F. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality; A review[J]. J Food Sci, 1977, 42: 1-6.