

金线莲原球茎增殖研究

韩晓红, 罗明英, 欧阳志成, 段春红

(武汉生物工程学院 生物工程系, 湖北 武汉 430415)

摘要:以金线莲原球茎为试材,研究了基本培养基、添加物以及不同培养方式对原球茎增殖的影响。结果表明:以 B5 为基本培养基最适合金线莲原球茎的增殖;天然添加物对金线莲原球茎增殖有明显的促进作用,椰汁对增殖的促进作用最大,培养 45 d 后原球茎重量平均增加 6.146 倍;液体悬浮培养的增殖效果最佳,培养 30 d 增殖倍数达 2.150,原球茎生长健壮。

关键词:金线莲;增殖;原球茎;培养方式;基本培养基;添加物

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0144-03

金线莲(*Anoectochilus roburghii* (Wall.) Lindl)为兰科开唇兰属植物,是一种传统的名贵药材,兼具赏叶和观花之功用。金线莲含有生物碱、氨基酸、多糖、皂甙、甾体等活性成分,主要用于治疗高血压、糖尿病、心脏病、肺炎、急慢性肝炎、肾炎等症^[1-2]。金线莲组织培养快速繁殖技术主要通过原球茎和丛生芽增殖 2 种途径,而原球茎增殖是兰科植物特有的增殖方式,该试验以金线莲的原球茎为试材,研究基本培养基、添加物以及培养方式对原球茎增殖的影响,旨在通过原球茎增殖途径快速繁殖金线莲,为解决其药源问题提供技术参考。

第一作者简介:韩晓红(1977-),女,博士,讲师,现主要从事植物组织培养及遗传转化的研究工作。E-mail:hongxiaohan@126.com。

基金项目:湖北省教育厅科学技术研究资助项目(B20114610);武汉市属高等科学研究资助项目(2010086)。

收稿日期:2012-08-22

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试金线莲原球茎由武汉生物工程学院植物细胞工程实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基选择试验 分别以 N6、B5、MS 以及 1/2MS 为基本培养基,每个培养基同时添加 TDZ 0.4 mg/L+ZT 0.2 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L,调 pH 至 5.8,研究不同基本培养基对原球茎增殖的影响。选取颜色较绿、形状比较规则、长势良好的原球茎作为接种材料,切割成大小约 1 cm×1 cm×1 cm 的块状,称重后接种到培养基上,每个处理 20 瓶,培养 45 d 后观察长势,称重。

1.2.2 添加物选择试验 以 B5+TDZ 0.4 mg/L+ZT 0.2 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L

Study on Cloning and Expression of *atp9* Gene in Carrot and Its Relationship to Cytoplasmic Male Sterility

ZHANG Zhi^{1,2}, LIANG Yi¹, DING Hai-feng¹, ZHANG Hong-wei¹

(1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops in North China, Beijing Jingyan Yinong Sci-Tech Development Center, Beijing 100097; 2. Shanxi Agriculture University, Taigu, Shanxi 030800)

Abstract: Specific primers were designed according to the *atp9* gene in carrot and other plants, carrot mitochondrion gene fragments associated with cytoplasmic male sterility were cloned either. The results showed that carrot *atp9* gene contains a many base pair's substitution and deletion in sterile line compared with maintainer line. The expression analysis using semi-quantitative RT-PCR and Real-time PCR demonstrates that expression of *atp9* gene in carrot sterile line was significantly lower than in maintainer line besides the big bud stage. These researches indicated that *atp9* gene mutation and its abnormal expression had a closely relationship with carrot cytoplasmic male sterility.

Key words: carrot; *atp9* gene; cytoplasmic male sterility; RT-PCR; real-time PCR

为基础培养基,分别添加 20% 的香蕉汁、苹果汁和椰汁,同时设置不加添加物为对照,调 pH 至 5.8,研究不同的添加物对金线莲原球茎增殖的影响。选取长势良好的原球茎作为接种材料,切割成大小约 1 cm×1 cm×1 cm 的块状,每个处理 20 瓶,培养 45 d 后统计结果。

1.2.3 培养方式选择试验 将金线莲原球茎在无菌条件下切成 1 cm×1 cm×1 cm 的小块,接种至 B5+TDZ 0.4 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+ZT 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L,pH 5.8 的培养基中,每个处理 20 瓶,每瓶 3~5 块原球茎。所设培养方式分别为液体悬浮、液体静置和固体培养,培养 30 d 后,分别统计其增殖结果。液体悬浮培养:培养基以每瓶 50 mL 的量分装 20 瓶于 250 mL 的三角瓶内,摇床转速为 100 r/min 的条件下培养,并且每 10 d 更换 1 次培养基。液体静置培养:每瓶分装 40 mL 培养基,同时加入棉花作为支撑,原球茎以 3~5 块/瓶的量接入培养基中进行静置培养。固体培养:在上述液体培养基中添加琼脂 7 g/L,以 3~5 块/瓶接入培养基中进行培养。

1.2.4 培养条件 培养温度为 (25±2)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对金线莲原球茎增殖的影响

将切割好的材料接到培养基中,接种约 12 d 后,原球茎均开始生长。接种材料颜色均匀呈鲜绿色的生长较快,生长 20 d 后,生长速度加快,与培养基接触的组织深入到培养基内部。由表 1 可以看出,B5、MS 整体的增殖效果比 N6、1/2MS 好。B5 的增殖效果最佳(图 1),经过 45 d 的培养增殖倍数最大,达到 3.156,所以 B5 作为基本培养基比较适合金线莲原球茎增殖。由 MS 和 1/2MS 结果对比可以看出,MS 的增殖效果明显好于 1/2MS,说明大量元素含量高有利于金线莲原球茎增殖。

表 1 基本培养基对金线莲原球茎增殖的影响(45 d)

基本培养基	平均接种量/g	45 d 平均重量/g	增殖倍数	生长势态
N6	1.121±0.333	3.021±0.803	2.748±0.497	+
B5	1.414±0.320	4.350±0.878	3.156±0.686	++
MS	1.292±0.223	3.842±0.893	2.974±0.460	++
1/2MS	1.407±0.312	3.314±0.757	2.361±0.222	+

注:增殖倍数=45 d 平均重量/平均接种量±标准差;“+”表示生长状况一般,速度慢,颜色淡;“++”表示生长状况良好,速度较快,颜色较绿。

表 3

金线莲不同培养方式下原球茎的增殖效果(30 d)

培养方式	平均接种量/g	平均增殖量/g	增殖倍数	生长情况
液体悬浮	2.714±0.551	3.057±0.653	2.150±0.243	浅黄绿色颗粒大,松散
液体静置	3.162±0.558	1.250±0.403	1.416±0.156	黑绿色颗粒小,密集
固体培养	2.535±0.672	1.178±0.296	1.521±0.262	绿色颗粒较大,密集

注:增殖倍数=(平均增殖量+平均接种量)/平均接种量±标准差。

2.2 不同添加物对金线莲原球茎增殖的影响

金线莲原球茎在含有添加物、苹果汁和椰汁的培养基上 10 d 后均开始生长,长出芝麻大小的浅绿色新组织,生长日益旺盛;未加添加物的对照要 12 d 后才有新的原球茎出现。由表 2 可以看出,添加物(香蕉汁、苹果汁和椰汁)对金线莲原球茎的增殖有明显的促进作用,增殖效果均好于未添加任何添加物的对照。椰汁促进作用最为明显(图 2),增殖倍数达 6.146,增殖效果好于香蕉汁、苹果汁。所以椰汁最适合作为添加物添加到金线莲增殖原球茎培养基中,促使原球茎快速增殖。

表 2 添加物对金线莲原球茎增殖的影响(45 d)

添加物	平均接种量/g	45 d 平均重量/g	增殖倍数	生长势态
香蕉汁	1.290±0.338	5.980±1.334	4.791±1.088	+++
苹果汁	1.090±0.251	3.880±0.996	3.620±0.824	++
椰汁	1.030±0.194	6.250±0.781	6.146±0.491	++++
—	1.292±0.223	3.842±0.893	2.974±0.460	++

注:增殖倍数=45 d 平均重量/平均接种量±标准差;“+”表示生长状况良好,速度较快,颜色较绿;“+++”表示生长速度很快,颜色较绿;“++++”表示生长速度极快,颜色较绿。

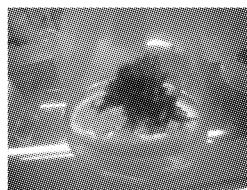


图 1 B5 为基本培养基的原球茎增殖

Fig. 1 PLBs proliferation in the basic medium B5

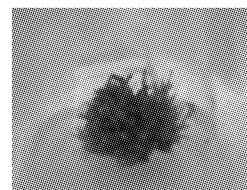


图 2 原球茎在添加椰汁的培养基上增殖

Fig. 2 PLBs proliferation in the medium supplemented with coconut juice

2.3 不同培养方式对金线莲原球茎增殖的影响

接种于液体悬浮培养的金线莲原球茎培养 15 d 时出现新原球茎,液体静置及固体培养均在 20 d 时开始增殖。将培养 30 d 的原球茎进行统计,3 种方式培养的增殖率均为 100%。由表 3 可看出,接种 30 d 后,以液体悬浮培养的原球茎增殖效果最好,平均增重 3.057 g,增殖倍数达 2.150,原球茎为浅黄绿色,颗粒大,松散(图 3);其次是固体培养,固体培养中原球茎为绿色,颗粒较大,密集(图 4);以液体静置方式增殖的最慢,液体静置中原球茎为墨绿色,颗粒小,密集(图 5)。原球茎通过液



图3 液体悬浮培养增殖后的原球茎

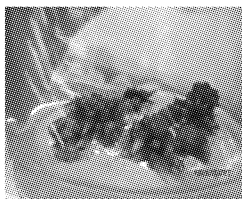


图4 固体培养增殖后的原球茎



图5 液体静置培养增殖后的原球茎

Fig.3 PLBs proliferation by liquid suspension Fig.4 PLBs proliferation by solid culture Fig.5 PLBs proliferation by liquid static culture

体悬浮培养相比较于固体和液体静止培养,通气好,营养供给充分,所以增殖效果最好。

3 结论与讨论

通过植物组织培养技术快速繁殖自身繁殖困难的濒危名贵中药材对于种质资源的保存及药源问题的解决都具有重要的意义。金线莲作为兰科植物通过原球茎繁殖是其主要的增殖途径之一。在原球茎的增殖试验中,不同的基本培养基对原球茎的增殖效果有显著差异,其中B5培养基的增殖效率最高,MS次之。在培养基中添加添加物对细胞组织的增殖和分化有明显的促进作用,王丽芳^[3]以金线莲为材料,研究在不同培养基中添加不同量的香蕉和马铃薯对金线莲生长量的影响,结果表明,在相同培养基中添加香蕉比添加马铃薯更有利于金线莲生长量的积累。刘伟等^[4]探究添加物对外植体生长的影响,认为添加马铃薯、香蕉、蛋白胨、花宝一号、活性炭等添加物能显著地促进金线莲外植体的分化与生长。该试验的结论同样证实了这一点,添加椰汁最有利于金线莲原球茎增殖,增殖倍数为6.146,其次为香蕉汁。因此金线莲原球茎增殖的最佳基本培养基为B5,最佳添加物为椰汁。添加物中含有丰富的物质,对金线莲原球茎增殖有明显的促进作用,但各个添加物具体适宜的添加量还有待于进一步试验确定。

在兰科植物的快速繁殖研究中,关于不同培养方式对原球茎增殖影响的报道较多,沐德俊等^[5]以固体培养、液体静止培养及液体振荡3种培养方式对霍山石斛

原球茎的生长情况进行研究,结果表明液体静置条件下培养最好。金青等^[6]在不同培养方式对霍山石斛原球茎增殖的研究中发现,液体摇瓶培养有利于原球茎快速增殖。该试验将金线莲原球茎通过液体悬浮培养、液体静置和固体培养3种培养方式进行增殖,接种后15~20d就可长出新原球茎,与陈钢等^[7]试验的结果一致,其中液体悬浮培养的原球茎增殖效果最好,其增殖倍数为2.150。在液体悬浮培养中,通过培养基的运动促进营养物质和气体的交换,外植体充分接触培养基;同时使细胞代谢物分散,防止其抑制原球茎的生长,因而原球茎能充分利用营养物质,与其它2种方式相比,原球茎增殖效果最好。

参考文献

- [1] 何春年,王春兰,郭顺星,等. 兰科开唇兰属植物的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国药理学杂志,2004,39(2):81-84.
- [2] 钟岑生. 金线莲的药用价值与开发[J]. 广西农业科学,1997,16(2):10-12.
- [3] 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,2011,16(5):175-176.
- [4] 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.
- [5] 沐德俊,高剑英. 霍山石斛原球茎在不同培养方式下生长状态的研究[J]. 上海农业科技,2011(3):19-21.
- [6] 金青,马绍璠,洪萨丽,等. 霍山石斛原球茎的诱导及培养方式对原球茎增殖的影响[J]. 安徽农业大学学报,2008,35(2):258-261.
- [7] 陈钢,林兰英,王建勤. 药用金线莲组织培养原球茎研究初报[J]. 福建中医药,1994,25(4):23-24.

Study on the Proliferation of Protocorm-like Bodies in *Anoectochilus roburghii*

HAN Xiao-hong, LUO Ming-ying, OUYANG Zhi-cheng, DUAN Chun-hong

(Department of Bioengineering, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415)

Abstract: Taking the protocorm-like bodies (PLBs) of *Anoectochilus roburghii* as test materials, the effects of different basic media, additives and culturing methods on PLBs proliferation of *Anoectochilus roburghii* were studied. The results showed that B5 was the most suitable basic medium for PLBs proliferation; when coconut juice, banana juice, apple juice were supplemented in the same medium for PLBs proliferation, the proliferation was best in the presence of coconut juice and the 6.146-fold increase in PLBs weight was achieved. The optimum culturing method was liquid suspension culture, by which proliferation rate reached 2.150-fold average after 30 days.

Key words: *Anoectochilus roburghii*; proliferation; protocorm-like bodies (PLBs); culturing method; basic culture medium; additives