

# 金线莲不同繁殖途径比较

郑枫<sup>1</sup>, 黎倩芸<sup>2</sup>, 叶志聪<sup>2</sup>, 曾宋君<sup>1</sup>, 吴坤林<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650; 2. 广州甘润堂生物科技有限公司, 广东广州 510900)

**摘要** [目的] 筛选出高效的金线莲种苗工厂化繁殖技术体系。[方法] 分别以野生金线莲种子进行非共生萌发和以茎段为外植体进行无性克隆 2 种途径繁育种苗。[结果] 2 种繁殖途径在诱导初始条件、增殖方式、增殖系数、继代周期、根的诱导分化及移栽等方面均存在差异。[结论] 金线莲以无性克隆繁殖途径为宜, 建立的繁育体系具有经济、高效、稳定等优点, 该研究可为规模化育苗提供理论和技术参考。

**关键词** 金线莲; 繁殖途径; 组织培养

**中图分类号** S567.23      **文献标识码** A      **文章编号** 0517-6611(2018)26-0094-04

**Comparison on Different Rapid Propagation Pathways of *Anoectochilus roxburghii***  
**ZHENG Feng<sup>1</sup>, LI Qian-yun<sup>2</sup>, YE Zhi-cong<sup>2</sup> et al** (1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650; 2. Guangzhou Ganruntang Biological Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510900)

**Abstract** [Objective] The industrial production technology system of *Anoectochilus roxburghii* seedling was screened out. [Method] By comparing the different propagation methods of *A. roxburghii*, we screened out the efficient seedling breeding methods. In this study, non-symbiotic germination of wild *A. roxburghii* seeds and asexual cloning with stem segments as explants were carried out. [Result] There were differences between the two pathways, such as induced initial conditions, proliferation ways, propagation coefficient, subculture cycle, root induction and seedling transplanting. [Conclusion] According to the comparative test, it's more suitable for constructing the tissue culture system with asexual cloning, which is more economical, more efficient and steady, and it will provide material and technical reference for large-scale seedling production.

**Key words** *Anoectochilus roxburghii*; Propagation pathway; Tissue culture

金线莲 [*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl] 即金线兰, 别名金线入骨消、鸟人参等, 是兰科开唇兰属的一种多年生珍稀药用草本植物, 有清热凉血、滋阴降火、消炎止痛之功效, 民间多用于小儿高烧不退、惊风, 现也被应用于糖尿病、癌症等疑难病症的治疗。金线莲对生长环境要求较苛刻<sup>[1]</sup>, 且种子发育不完全, 自然状态下极难萌发, 通过分根法或扦插繁殖系数极低, 加上近年来生态环境日益恶化和药农过度采挖, 金线莲的野生蕴藏量日益稀少。

植物组织培养技术是种苗繁育的有效手段。从 20 世纪 90 年代起, 关于金线莲的组织培养技术就已有报道, 主要是对单一繁殖途径的外植体选择<sup>[2-3]</sup>、培养基类型<sup>[4]</sup>、生长调节剂浓度<sup>[5]</sup>、工厂化育苗技术<sup>[6]</sup>以及移栽<sup>[7-9]</sup>等方面进行研究, 针对不同繁殖途径的比较研究还鲜见报道。笔者对金线莲组织培养中种子的非共生萌发和以茎段为外植体建立的无性克隆方法这 2 种繁殖途径进行比较分析, 筛选出稳定、高效的组培繁育体系, 以期专业化、规模化种苗繁育提供技术指导。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 以野生金线莲的茎段和对其人工授粉获得的成熟蒴果为外植体。野生金线莲于 2015 年 8 月采自广东省广州市从化区天湖。

## 1.2 方法

### 1.2.1 外植体的消毒。

**基金项目** 广东省产学研项目 (2013B091500045); 广东省星火计划项目 (2013B020405007); 广东省林业科技创新项目 (2018KJCX031)。

**作者简介** 郑枫 (1979—), 男, 江苏泰州人, 助理研究员, 硕士, 从事植物生物技术研究。\* 通讯作者, 副研究员, 博士, 从事遗传育种研究。

**收稿日期** 2018-05-03

**1.2.1.1** 以野生金线莲的茎段为外植体。取生长健壮、无病虫害的野生金线莲全株, 用软毛刷在流水下将苗株表面小心洗净, 去掉根、叶片和叶鞘, 顶部未展开叶片可保留约 1 cm。用洗衣粉水浸泡, 同时轻轻摇动约 10 min, 清水洗净后拿至超净工作台。将金线莲茎条切成 2 cm 左右带节茎段, 先用 75% 乙醇浸泡 30 s, 在 0.1% HgCl<sub>2</sub> 中分别浸泡并摇动 5、8、10、13、16 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 无菌纸吸干茎段表面水分, 切去两端各 1~2 mm, 接种到诱导培养基上。每个处理接种 15 瓶, 每瓶接种 1 个茎段。培养 40 d 时观察生长情况, 统计其污染率、成功率和诱导率。

**1.2.1.2** 以野生金线莲的成熟蒴果为外植体。取野生金线莲的成熟蒴果, 流水下洗净后, 浸泡在洗衣粉水中并轻轻摇动约 10 min, 清水洗净后拿至超净工作台。75% 乙醇浸泡 30 s, 再在 0.1% HgCl<sub>2</sub> 中浸泡并摇动 15 min, 无菌水冲洗 3~5 次后, 用无菌纸吸干蒴果表面水分, 切开后将内部种子均匀撒在播种培养基表面。30 d 时统计存活情况。

**1.2.2** 无菌繁殖系的建立。将无菌存活的茎段外植体接种到以 MS 为基本培养基的不定芽诱导培养基 1~4 中; 将无菌存活的种子接种到以 1/2MS 为基本培养基的播种培养基 5~9 中。

**1.2.3** 增殖培养。将茎段外植体诱导出的簇生不定芽进行分切, 转接到增殖培养基 10~13 中, 增殖培养基以 MS 为基本培养基, 添加生长调节剂 6-BA 和 NAA 不同浓度的组合。

**1.2.4** 生根培养。将增殖苗瓶中高度 3 cm 以上、叶片张开 2 片以上、茎粗壮的金线莲苗转接到生根培养基 14 中。种子苗生长到 2~3 cm 高时转接到壮苗培养基 15 中。

**1.2.5** 培养条件。培养温度 (23±2)℃, 光照强度 1 000~1 500 lx, 光照时间 12 h/d。

**1.2.6 培养基配制。**不定芽诱导培养基 1~4: MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0~5.0 mg/L;播种培养基 5~9:以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA(0、0.5 mg/L)和 NAA (0、0.3、0.4、0.5、1.0 mg/L);增殖培养基 10~13: MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0~5.0 mg/L+蛋白胨 3.0 g/L;生根培养基 14: MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 5.0 mg/L+蛋白胨 3.0 g/L+活性炭 3.0 g/L;壮苗培养基 15: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+蛋白胨 3.0 g/L+活性炭 2.0 g/L。每种培养基中均添加白糖 30 g/L、卡拉胶 7.2 g/L,调节 pH 为 5.4。

**1.2.7 炼苗移栽。**金线莲生根苗生长到高度 7~8 cm、叶 3 片以上、根 2 条以上时,将其摆放在种植大棚内炼苗 7~10 d,以适应外界环境。将生根苗从培养瓶中取出,用清水洗净,并用多菌灵、百菌清等杀菌药浸泡 10 min。基质选用泥炭土:珍珠岩=3:1;分别以 1、2、3 株苗为一丛进行种植,苗丛间隔 3 cm。将 2 种繁殖途径获得的生根苗分别进行移栽,每种密度种植 3 个托盘,每个托盘种植 54 穴,放置到大棚相同位置进行养护。

2 结果与分析

**2.1 外植体消毒效果比较** 由表 1 可知,随着 0.1%HgCl<sub>2</sub> 消毒时间的加长,茎段外植体的污染率下降,而死亡率上升。同时也观察到金线莲越下端的茎段,污染率越高,尤其是长有根的茎段,消毒成功率极低;近顶芽的茎节污染率较低,但是随 HgCl<sub>2</sub> 消毒时间延长,茎节处缢缩死亡明显增多。金线

莲茎段外植体最佳消毒方法为预处理→75%乙醇 30 s→0.1%HgCl<sub>2</sub> 10 min →无菌水冲洗 3~5 次,消毒成功率可以达到 66.7%。金线莲蒴果消毒后播种 120 瓶,成功 105 瓶,成功率为 87.5%。从消毒效果来看,蒴果的消毒比茎段更方便、高效。

表 1 HgCl<sub>2</sub> 消毒时间对金线莲茎段外植体消毒成功率的影响  
Table 1 Effect of HgCl<sub>2</sub> disinfection time on disinfection success rate of explants of *A. roxburghii*

| 消毒时间<br>Disinfection time<br>min | 污染率<br>Contamination<br>rate// % | 死亡率<br>Mortality<br>rate// % | 成功率<br>Success<br>rate// % |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 5                                | 100.0                            | 0                            | 0                          |
| 8                                | 73.3                             | 0                            | 26.7                       |
| 10                               | 26.7                             | 6.7                          | 66.7                       |
| 13                               | 26.7                             | 33.3                         | 40.0                       |
| 16                               | 20.0                             | 73.3                         | 6.7                        |

**2.2 无菌繁殖系建立比较** 金线莲茎段外植体在诱导培养基中培养 10 d,茎节处腋芽萌动,出现乳白色凸起(图 1A);培养 40 d 时,凸起处生长为新芽(图 1B);培养 70 d 时大部分茎段能诱导出健壮的簇状丛生芽(图 1C)。由表 2 可知,培养基 4 中不定芽发生效率最高,40 d 时诱导率达 90%;茎尖伸长生长明显,其下端茎节处易发生膨大,并生长出数个不定芽;中间茎段较易发生簇状不定芽。



注: A.茎段外植体诱导培养 10 d,茎节处发生乳白色凸起; B.茎段外植体茎节诱导培养 40 d,凸起处生长的新芽; C.茎段外植体诱导出的簇状丛生芽; D.丛生芽稳定增殖; E.无性克隆繁殖途径生根苗  
Note: A. A white outgrowth started to develop from stem nodules after being induced from stem explants for 10 days; B. New buds growing at the outgrowths after being induced from stem explants for 40 days; C. Shoot clusters were induced from stem explants; D. Shoot clusters propagated efficiently; E. Plantlets were generated from plant cloning system

图 1 金线莲无性克隆繁殖途径  
Fig.1 Asexual cloning propagation pathway of *A. roxburghii*

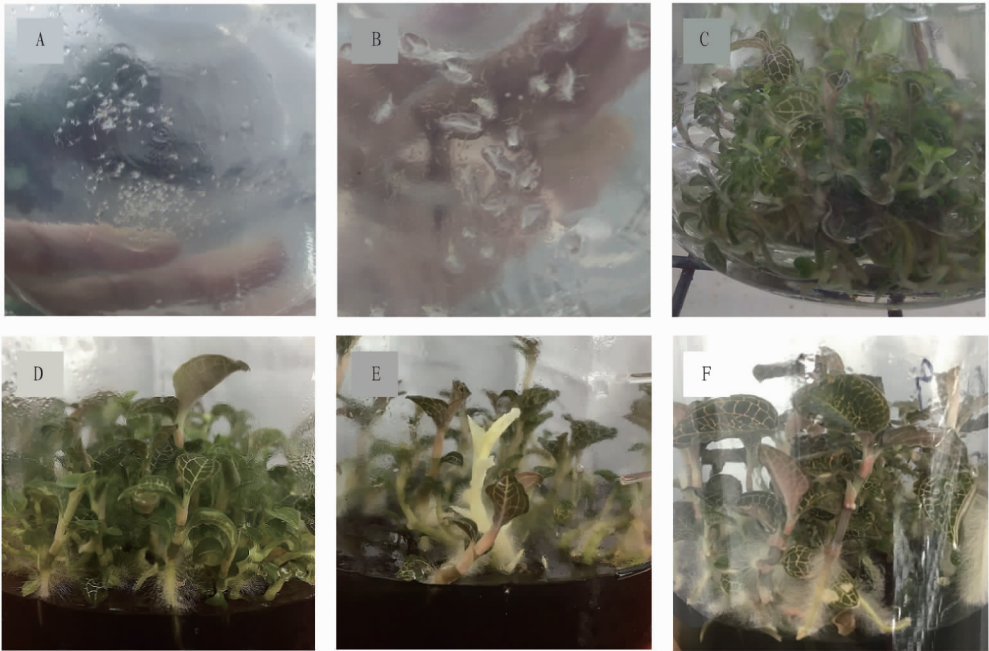
表 2 不同 6-BA 浓度对茎段外植体诱导丛生芽的影响  
Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA on induction of clustered shoots from stem segments

| 培养基<br>编号<br>Medium<br>No. | 6-BA 浓度<br>Concentration<br>of 6-BA<br>mg/L | 生长情况<br>Growth situation               | 诱导率<br>Induction<br>rate // % |
|----------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|
| 1                          | 2.0                                         | 小部分在茎节处长出白色芽点,多数无明显动静                  | 30.0                          |
| 2                          | 3.0                                         | 部分在茎节处长出单芽,约 2 mm,其余茎段略有膨大             | 50.0                          |
| 3                          | 4.0                                         | 大部分长出单芽,茎节处明显膨大并有白色凸起                  | 80.0                          |
| 4                          | 5.0                                         | 大部分长出 1 个侧芽,高 3~13 mm,茎节处明显膨大并有多多个白色凸起 | 90.0                          |

金线莲种子在 1/2MS 培养基中培养 30~40 d 时均能萌

发形成淡黄色原球茎;后逐渐长出丝状白色表皮毛(图 2A),并分化出茎尖;培养 70 d 时,可形成基部具表皮、毛顶部为茎尖的根状茎(图 2B);培养 150 d 时才形成根茎叶俱全的小植株(图 2C)。培养基中添加少量的 NAA、6-BA 可提高种子萌发率(表 3)。

从发生方式、发生时间和生长情况上比较,2 种繁殖途径建立无菌繁殖系的方式存在明显差异。茎段外植体能更快完成诱导,不定芽主要发生在茎节上,最早 10 d 左右便能观察到萌动,且芽体健壮;大部分金线莲种子培养 30 d 时在各播种培养基中均能萌发,但需培养 150 d 才能形成根茎叶俱全的繁殖系。总体看来,茎段外植体的诱导效率高,且丛生芽芽体健壮,所建立的无菌繁殖系明显优于种子无菌播种形成的繁殖系。



注:A.种子萌发生长出表皮毛;B.播种 70 d 时苗况;C.播种 150 d 时苗况;D.播种 240 d 时苗况;E.种子萌发生长出的白化苗;F.种子非共生萌发繁殖途径生根苗

Note: A. Formation of ectopic trichome during seed germination; B. Seedlings after sowing for 70 days; C. Seedlings after sowing for 150 days; D. Seedlings after sowing for 240 days; E. Formation of albino seedling during seed germination; F. Seedlings were generated from non-aseptic germination

图 2 金线莲种子非共生萌发繁殖途径

Fig.2 Non-symbiotic germination propagation pathway of *A. roxburghii* seeds

表 3 不同 6-BA 和 NAA 浓度对金线莲种子萌发的影响  
Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on seed germination of *A. roxburghii*

| 培养基编号<br>Medium<br>No. | 6-BA 浓度<br>Concentration of<br>6-BA // mg/L | NAA 浓度<br>Concentration<br>of NAA // mg/L | 萌发率<br>Germination<br>rate // % |
|------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|
| 5                      | 0                                           | 0                                         | 85.3 a                          |
| 6                      | 0                                           | 0.3                                       | 85.2 b                          |
| 7                      | 0                                           | 0.4                                       | 95.8 b                          |
| 8                      | 0                                           | 0.5                                       | 94.1 b                          |
| 9                      | 0.5                                         | 1.0                                       | 93.5 b                          |

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )  
Note: Different small letters within the same column mean significant differences ( $P < 0.05$ )

2.3 增殖及壮苗培养比较 在培养基 4 中诱导出的丛生芽,继续培养则发生的新芽数多且小、节间变短、叶片变小,而在培养基 2 中,新芽健壮,且能够稳定增殖(图 1D),更加适宜丛生芽的增殖培养。

培养 150 d 时,种子苗茎部在壮苗培养基表面匍匐生长 2~4 个茎节,长出 1~4 条根,绿色叶片逐渐长大、出现叶纹(图 2C);培养 240 d 时,小苗的茎变得更粗壮,叶片及茎逐渐由绿色或浅黄色变成红棕色,且金线清晰,苗平均高度 4 cm,茎直径约 1 mm(图 2D);出现白化苗现象(图 2E)。

以茎段为外植体进行无性克隆的繁育途径为茎段→诱导不定芽→不定芽增殖→诱导不定根→完整植株,不定芽增殖率约为 4.5,继代培养周期 45 d,1 年 1 个外植体可生产出

16 万株组培苗, 苗株高且健壮、叶片大, 生根后即可出苗; 以种子进行非共生萌发的繁殖途径为种子→原球茎→根状茎→长根长叶→完整植株, 原球茎分化形成的苗株完整但矮小纤细、生长较慢, 必须经过 2~3 次壮苗培养后方可成长为大苗, 总培养时间长达 270~300 d, 1 个蒴果可以生产出数万株种子苗。

**2.4 生根培养比较** 以茎段为外植体进行无性克隆的繁殖途径中, 增殖阶段符合要求的苗株生根培养 60~90 d 后, 苗株高 8~10 cm, 节间较长, 茎粗壮; 展开叶片 4 片以上, 叶片大、金线清晰; 根 2~4 条, 长 3 cm 以上, 根毛丰富(图 1E), 无需经过专门的壮苗培养。

以种子进行非共生萌发的繁殖途径中, 原球茎直接分化成形态完全的苗株, 小苗生长时有数量不等的细根, 除极少数苗在生长过程中发生侧芽, 大多数苗都是单株生长。2~3 次壮苗培养后, 苗高 6~8 cm, 茎直径约 2 mm, 节间较短, 根细长且根毛丰富, 有 4 片以上展开叶片(图 2F), 无需专门的生根培养即可出苗。

金线莲在组织培养过程中, 生根较为容易<sup>[7]</sup>。无性克隆繁殖途径中, 在增殖阶段即有部分大苗长出根, 生根培养时, 苗株茎节处由下至上依次长出根, 生根后苗生长较快; 种子非共生萌发后得到的苗下部在培养基表面匍匐生长, 每个茎节上均生有根, 数量较多, 但苗株生长相对较慢。相比之下, 种子苗不需要专门的生根培养, 但是也要经过数次壮苗培养才能达到出苗标准, 2 种方式各有优势。

**2.5 炼苗移栽** 大棚种植情况表明, 2 种繁殖途径的生根苗存活率均为 95% 以上, 种植 30 d 后可以观察到苗株生长明显, 90 d 内生长情况无明显差别, 仿野生种植的生长对比则有待进一步研究。罗安雄等<sup>[3]</sup>认为, 无性繁殖虽能保持母本的优良特性, 但适应外界环境的能力差, 与该试验结果有差别, 有待进一步比较。

不同种植密度的苗丛在试验中, 单株和 2 株苗生长 90 d

后差别不明显, 3 株一丛相比之下茎节间较长, 叶稍小。综合考虑苗生长质量和空间、材料利用率, 可以采取 2 株一丛、丛距 5 cm 的种植方式。

3 结论

2 种不同繁殖途径的对比表明金线莲以茎段外植体进行无性克隆繁殖具有更多优势: 诱导时间短、发生过程简单、生长速度快、芽苗健壮高大, 诱导形成的无菌繁殖系可以根据生产需要进行长期培养, 繁殖出大量的能保持母本的优良性状的组培种苗。蒴果的消毒简单, 种子萌发成原球茎后, 分化成单株苗, 整个生长过程相对缓慢, 苗株相对矮小, 且存在变异的情况, 在后续培养中难以保证种苗一致性。

随着金线莲药用和保健价值被逐渐发掘, 其规模化、产业化生产体系也在各地逐渐建立。在组培生产中, 要建立快速、高效的快繁体系, 同时必须保证所繁育的种苗具有亲本的优良特性, 否则会给后期生产和种植造成巨大的损失。在选择具有优良性状亲本的同时, 需要选择能保持亲本特性, 且稳定、高效、经济的繁殖途径。

参考文献

[1] 许文江, 陈裕, 林坤瑞. 药用野生金线莲植物资源的研究[J]. 福建热作科技, 2000, 25(4): 9-10.  
[2] 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.  
[3] 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.  
[4] 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.  
[5] 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, 2(2): 170-174.  
[6] 吴坤林. 金线莲快繁及工厂化生产中间试验[J]. 中药材, 1997, 20(12): 595-597.  
[7] 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.  
[8] 吴艺东. 金线莲组织培养及栽培技术研究[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(15): 46, 211.  
[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.

(上接第 84 页)

等全省经济发展较为落后的第 2、第 3 阶梯区, 大力发展经济, 不同类型用水变化幅度较大。

(3) 2007—2016 年各州市的水资源利用效率随时间变化呈多样化, 分为增长型、下降型、变化幅度不明显型 3 种类型。全省过半的区域仍处于水资源利用效率较低效型及以下水平, 亟需提升。

青海省水资源与经济发展、人口分布存在严重不匹配, 在当前转型发展的关键时期, 水资源需求逐渐增大, 水资源利用效率依然有待提升。因此, 了解全省水资源及其利用的空间分布状况, 在水资源“三条红线”控制指标约束下, 优化水资源配置, 调整产业结构, 加强节约用水建设, 提升水资源利用效率, 在促进经济社会可持续发展的同时不挤占生态用水, 坚决筑牢国家生态安全屏障。

参考文献

[1] 刘昌明, 陈志恺. 中国水资源现状评价和供需发展趋势分析[M]. 北京:

中国水利水电出版社, 2001.

[2] 刘毅, 贾若祥, 侯晓丽. 中国区域水资源可持续利用评价及类型划分[J]. 环境科学, 2005, 26(1): 42-46.  
[3] 祝卓. 人口地理学[M]. 北京: 中国人民大学出版社, 1991.  
[4] 陶格套. 中国人口、经济重心迁移定量分析[J]. 经济研究导刊, 2017(35): 1-4.  
[5] 徐建华, 岳文泽. 近 20 年来中国人口重心与经济重心的演变及其对比分析[J]. 地理科学, 2001, 21(5): 385-389.  
[6] 曹芳东, 黄震方, 余凤龙, 等. 国家级风景名胜区旅游效率空间格局动态演化及其驱动机制[J]. 地理研究, 2014, 33(6): 1151-1166.  
[7] 尹上岗, 马志飞, 黄萍, 等. 中国水资源利用的时空分布格局探究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2017(6): 841-848.  
[8] 王介勇, 刘彦随. 1990 年至 2005 年中国粮食产量重心演进格局及其驱动机制[J]. 资源科学, 2009, 31(7): 1188-1194.  
[9] 马海良, 王若梅, 曾永成. 中国省级水资源利用的公平性研究[J]. 中国人口·资源与环境, 2015, 25(12): 70-77.  
[10] 梁虹, 张为为, 农华. 青海省气温空间变化特征分析[J]. 气象研究与应用, 2017, 38(z1): 52-53, 62.  
[11] 童旭光, 鄢一龙, 胡鞍钢. 青海地区发展不平衡性实证分析[J]. 青海社会科学, 2010(2): 1-4.  
[12] 张爱儒. 青海省区域经济发展研究[J]. 统计与决策, 2008(16): 130-132.