

通过拟原球茎发生途径建立春石斛兰的组织培养体系

张爱香¹, 常美花¹, 刘会清¹, 李素琴²

(1. 河北北方学院 农林科技学院 河北 张家口 075131; 2. 河北省万全县种子分公司 河北 万全 076250)

摘要:以春石斛兰无菌幼苗茎段为外植体, 分别研究了拟原球茎的诱导、增殖、分化、生根的培养基配方。结果表明: 拟原球茎诱导率最高的培养基为 KC+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.5 mg/L; 拟原球茎增殖培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 拟原球茎的分化培养基为 MS+NAA 1.0 mg/L+KT 1.5 mg/L; 不定芽生根培养基为 1/2MS 或 MS+NAA 0.5 mg/L。

关键词:春石斛兰; 组织培养; 拟原球茎; 诱导; 增殖; 分化; 生根

中图分类号:S 682.31; S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)07-0120-03

石斛兰(*Dendrobium nobile* Lindl)又名杜兰, 石斛, 石兰等, 是兰科植物中最大的属之一, 种类繁多。原产于中国、日本、东南亚及澳大利亚, 为多年生附生落叶或常绿草本植物。由于其花形各异, 姿态优美, 花色艳丽多彩, 花多而且花期长, 深受人们喜爱。石斛兰为四大观赏兰之一, 分为春石斛和秋石斛, 春石斛春季开花, 花开在茎节两侧, 秋石斛秋季开花, 花从茎顶开出。春石斛兰是继蝴蝶兰、大花蕙兰之后最有希望的兰花商业品种, 其需求量增长甚快, 目前我国主要依靠从日本、韩国进口, 利用组织培养技术进行规模化生产已迫在眉睫。

我国从 20 世纪 70 年代中期开始对石斛的组织培养进行深入研究, 进展很快。据报道, 目前已在霍山石斛、金钗石斛、铁皮石斛等 9 种石斛属植物成功诱导出不定繁殖系和离体种子苗, 并已进入规模生产阶段。作为观赏花卉的春、秋石斛的组培研究工作, 自 20 世纪 80 年代开展以来, 取得可喜的进展, 离体种子的发芽成活率在 90% 以上, 秋石斛分生苗已进入工厂化生产。春石斛品种间差异很大, 分生苗的诱导有一定难度, 目前仍处于探索阶段。

现应用春石斛兰离体种子无菌苗作为材料, 先进行切段繁殖, 从侧芽诱导拟原球茎, 并对其进行增殖, 最后分化出完整的春石斛兰植株, 现将结果总结如下。

1 材料与方法

1.1 材料

春石斛兰离体种子无菌苗由张家口市农业科学院

第一作者简介: 张爱香(1968-), 女, 河北怀安人, 硕士, 副教授, 现主要从事植物病理学和分子生物学教学与科研工作。

通讯作者: 刘会清(1965-), 男, 本科, 副教授, 现从事作物栽培学方向研究工作。

基金项目: 河北省科技厅资助项目(052201122)。

收稿日期: 2009-02-10

花卉研究所提供。

1.2 方法

将健康的春石斛兰无菌苗自两节中间剪开, 每段带 1 个叶片接种于固体培养基上, 诱导侧芽后, 将侧芽掰下, 接种于拟原球茎诱导培养基上, 45 d 后调查拟原球茎诱导率。将拟原球茎接种于增殖培养基上, 1 个月后调查增殖系数, 将拟原球茎接种于分化培养基上, 40 d 后调查分化率, 最后将拟原球茎分化出的不定芽接种于生根培养基上, 1 个月后调查生根率。培养基的 pH 值为 5.4, 添加 20~30 g/L 的蔗糖, 5 g/L 的活性碳, 以 7 g/L 的琼脂固化, 培养室温度为 24~26℃, 每天光照 13 h, 光照强度为 3 000 lx。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对拟原球茎诱导的影响

将春石斛兰的茎段接种于不含任何激素的 KC 培养基上, 1 周后茎段开始膨大, 15 d 后长出侧芽, 将侧芽掰下, 接种于拟原球茎诱导培养基上, 45 d 后调查拟原球茎诱导率, 结果见表 1。

从结果看出, 在 KC 培养基上, 在 NAA 浓度保持不变的情况下, 6-BA 的浓度在 0.2~0.8 的范围内, 随浓度的提高, 拟原球茎的诱导率呈上升趋势。

表 1 6-BA 的浓度变化对春石斛兰拟原球茎诱导率的影响

KC	不同的激素配比		春石斛兰拟原球茎诱导率
	6-BA/mg · L ⁻¹	NAA/mg · L ⁻¹	
1	0.2	0.5	15.07
2	0.4	0.5	28.86
3	0.6	0.5	40.81
4	0.8	0.5	57.57

2.2 春石斛兰增殖培养基的筛选

将诱导出的春石斛兰拟原球茎接种于增殖培养基上, 1 个月后调查结果见表 2 及图 1。从结果看出, 适宜春石斛兰拟原球茎增殖培养基为 MS+6-BA 2 mg/L+

NAA 0.1 mg/L。

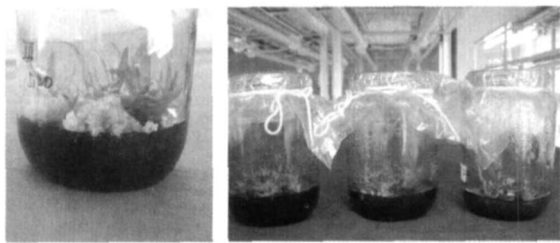


图 1 拟原球茎的增殖 图 2 春石斛拟原球茎分化成苗

表 2 在不同的培养基上原球茎的增殖情况

培养基	拟原球茎增殖情况
I:MS+NAA 0.5 mg/L+KT 1.5 mg/L	拟原球茎分化为幼苗, 部分褐化死亡
II:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	拟原球茎部分增殖, 增殖系数约 6 倍左右

2.3 春石斛拟原球茎分化培养基的选择

将增殖的春石斛拟原球茎接种于分化培养基上, 结果见表 3 和图 2。从结果看出, 在 MS 培养基中, KT 浓度保持不变的情况下, NAA 的浓度以 1 mg/L 的分化率最高。

表 3 NAA 的浓度对春石斛拟原球茎分化率的影响

MS 培养基	NAA/mg · L ⁻¹	KT/mg · L ⁻¹	分化率
1	0.5	1.5	71.2
2	1	1.5	85.3
3	1.5	1.5	60.8

2.4 春石斛不定芽生根培养基的选择

将拟原球茎分化出的不定芽接种于生根培养基上, 1 个月后调查生根率和平均根数, 结果见表 4。从结果看出, 2 种培养基均能很好的生根, MS+0.5 mg/L NAA 稍优于 1/2MS。

表 4 不同生根培养基对春石斛生根情况的影响

培养基	生根率/%	平均根数/个
MS+0.5(mg/L)NAA	100	6.13
1/2MS	100	5.78

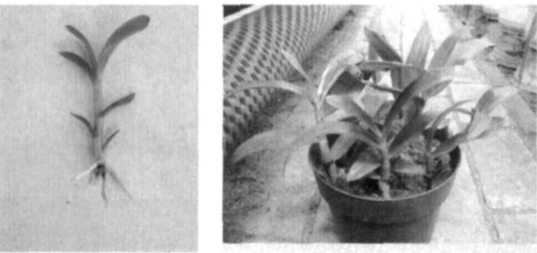


图 3 拟原球茎途径得到的 图 4 春石斛苗移栽成活完整的春石斛兰苗

2.5 移栽

将组培所得的春石斛兰苗移入温室, 练苗 3 d 后移栽。移栽前先洗净组培苗根部培养基, 用 50%的多菌灵

可湿性粉剂 1 000 倍液浸泡 15 min, 然后移入苔藓基质中, 其移栽成活率为 72%。春石斛兰移栽成活苗见图 4。

3 讨论

在春石斛兰的组织培养过程中, 会产生褐化。原因是由于植物离体组织或细胞中的多酚氧化酶被激活, 和酚类物质氧化产生棕黄色的醌类物质, 并抑制其他酶的活性, 这些酚类物质慢慢扩散到培养基中去, 毒害外植体, 严重影响离体培养植物组织的生长分化和再生, 造成生长不良甚至死亡。因此, 在春石斛兰的组织培养过程中, 要防止褐化现象的产生, 该试验通过在培养基中加入 0.5%的活性碳, 很好的解决了褐化问题, 且发现加活性碳的培养基幼苗生长显著, 根系发达, 叶色浓绿, 这与周华伟^[9]的结果相同。

春石斛兰组培苗移栽后, 成活率偏低, 主要原因可能是缺乏共生菌。潘超美等^[11]从野生建兰和墨兰根中分离, 纯化培养收获 4 种菌株, 发现其真菌对诱导石斛组织培养物(愈伤组织、拟原球茎以及不定芽)的生长均有不同程度的促进作用。郭顺星等^[12]从野生铁皮石斛和金钗石斛根中分离获得内生真菌 25 种, 其中 5 种真菌可促进石斛种子萌发; 7 种真菌可与石斛幼苗形成共生关系^[12]。因此, 分离和筛选促进春石斛生长发育的菌根真菌, 可能是提高试管苗移栽成活率, 解决北方春石斛生产的关键所在。

石斛为世界四大热带兰之一, 不同种或品种之间, 其观赏价值可能有很大区别。离体扩繁技术为石斛种质资源有效的保存和持续利用提供了可能。

参考文献

[1] 刘金. 兰花[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
[2] 钟士传. 植物激素对石斛兰组织培养效果的影响[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(4): 621, 629.
[3] 傅玉兰, 谷凤, 胡传明, 等. 霍山石斛组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2004(3): 522-523.
[4] 孙廷, 杨玉珍, 胡如善, 等. 金钗石斛的组织培养和快繁技术[J]. 西北农业学报, 2004(4): 13-16.
[5] 周俊辉, 钟雪峰, 蔡丁稳. 铁皮石斛的组织培养与快速繁殖研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005(1): 23-26.
[6] 赵天榜, 陈志秀, 陈占宽, 等. 石斛组织培养与栽培技术的研究[J]. 河南农业大学学报, 1994(2): 128-133.
[7] 张明, 夏鸿西, 朱利泉, 等. 石斛组织培养研究进展[J]. 中国中药杂志, 2000(6): 232-236.
[8] 张建勇, 刘涛, 袁佐清. 石斛属植物组织培养及遗传转化研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007(3): 656-670.
[9] 毛碧增, 李凤玉, 王春, 等. 春石斛组织培养技术研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2003(5): 580-583.
[10] 周华伟, 李世君. 组织培养中若干因素对石斛兰试管苗生长的影响[J]. 浙江农业大学学报, 1995 21(6): 622-624.
[11] 潘超美, 贺红, 林群英, 等. 真菌诱导子对铁皮石斛组培物生长的影响[J]. 中医药学报, 2004 22(1): 54-55.
[12] 郭顺星, 曹文岑, 高微微. 铁皮石斛及金钗石斛菌根真菌的分离及其生物活性测定[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(6): 338-341.

铁皮石斛试管苗培养技术的研究

陈 媛, 谢吉容

(重庆文理学院 生命科学与技术学院, 重庆 永川 402160)

摘 要: 研究了不同量激素浓度、天然添加物及植入密度对石斛试管苗生长的影响。结果表明: 使用 1/2MS 培养基并且在其他条件不变的情况下, 当 6-BA 的含量在 3.0 mg/L 时, 丛生芽数量多且有原球茎的发生; 香蕉汁具有明显的壮苗和诱导芽增殖的效果; 当铁皮石斛茎段植入密度为 10~12 个瓶/时, 对其分蘖和生长有利。

关键词: 铁皮石斛; 组织培养; 激素; 香蕉; 植入密度

中图分类号: S 567.21⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)07-0122-03

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl)又名黑节草, 俗称铁皮枫斗, 为兰科石斛属多年生常绿草本植物, 是一种名贵药材^[1], 早在 1 500 年前就被载入《神农本草经》而作药用, 具有生津益胃、清热养阴的功用。现代药理学研究发现, 石斛还具有抗衰老和扩张血管的作用, 可用于治疗具有阴虚证的急性及慢性咽喉炎、急性支气管炎、结核病、甲状腺机能亢进、糖尿病、慢性萎缩性胃炎等症^[2-3]。

铁皮石斛属于兰科石斛属, 石斛属是兰科的第二大属, 我国分布有 74 种和 2 变种, 主产我国安徽西南部、浙江东部、福建西部、广西西北部、四川、云南东南部地区, 生长在 1 600 m 的山地半阴湿的岩石上^[4], 在自然条件下的发芽率不到 5%, 且实生苗生长十分缓慢, 故其自然繁殖力极低。加之其作为一种重要的药用植物, 人为开采严重, 使野生环境下的石斛数量骤减, 至 1987 年, 铁皮石斛被列为国家重点保护野生植物, 在 1991 年出版的《中国植物红皮书》中被列为濒危种。

正是因为石斛的自然繁殖率低和市场的大量需求, 才使其对快繁技术的研究显得尤为必要。目前人们采用组织培养与快速繁殖技术, 对其试管苗进行人工栽培, 改善铁皮石斛繁殖系数低的现状, 提供石斛试管苗, 从而解决市场需求问题, 最终达到保护野生自然资源的目的。该研究旨在进一步探究铁皮石斛的快繁体系, 为进行其工厂化培育提供参考。

第一作者简介: 陈媛(1987-), 女, 本科在读, 现从事植物生理学方向研究。E-mail: chenyan_517@126.com。

通讯作者: 谢吉容(1966-), 女, 重庆永川人, 博士, 副教授, 现从事植物种质资源和品种选育研究工作。E-mail: xiejirong@tom.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC 2008BB1205); 重庆文理学院学生科技研究重点资助项目(XZ2008014)。

收稿日期: 2009-02-20

Constraction of Tissue Curture System of *Dendrobium Nobile* Lindl Through Protocorm-like Body

ZHANG Ai-xiang¹, CHANG Mei-hua¹, LIU Hui-qing¹, LI Su-qin²

(1. College of Science and Technology of Agriculture and Forestry, Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075131, China; 2. Hebei Wanquan Seed Co. LTD, Wanquan, Hebei 076250, China)

Abstract: PLB is successfully induced using the aseptic nodal segments of shoots, the best effect of PLB inducing was obtained by the use of KC+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.5 mg/L, the best effect of PLB proliferation was obtained by the use of MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; The highest efficiency of bud differentiation was obtained by the of MS+NAA 1.0 mg/L+KT 1.5 mg/L; the optimal medium to induce roots was 1/2MS or MS+NAA 0.5 mg/L.

Key words: *Dendrobium nobile* lindl; Tissue culture; Protocorm-like body; Induce; Proliferation; Differentiation; root