

石斛兰茎段组织培养再生体系的初步建立

张彦妮¹, 钱 灿¹, 陈立新²

(1. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省农科院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘 要: 以石斛兰无菌苗茎段为外植体, 通过在 MS 基本培养基中加入不同浓度的 6-BA 和 NAA, 筛选最佳培养基配方, 从而初步建立石斛兰茎节的组织培养再生体系。结果表明: 诱导茎节分化的最佳培养基是 MS+ 6-BA 0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L, 分化率为 89.5%; 最佳增殖培养基是 MS+ 6-BA 2 mg/L+ NAA 0.2 mg/L, 增殖倍数为 5.16; 最佳生根培养基是 1/2 MS+ 6-BA 0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L, 生根率为 100%; 移栽后成活率为 97%。

关键词: 石斛兰; 茎节; 组织培养

中图分类号: S 682.310.4⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0129-03

石斛属(*Dendrobium*) 是兰科植物中最大的属之一, 有 1 500~ 1 600 个原生种, 主要分布于东亚、东南亚及澳大利亚等地区。我国大约有 60 种石斛兰, 北自秦岭、淮河以南, 南至海南岛南部的崖县都有分布, 大多数种类集中在北纬 15°30'~ 25°21' 之间, 主要分布在云南、广西、贵州和台湾等省(区), 大多为热带附生兰, 在自然界多附生于树干和岩石上。

石斛兰(*Demdrobium nobile*) 花姿优美, 色彩鲜艳, 盆栽摆放阳台、窗台或吊盆悬挂客厅、书房, 凌空泼洒, 别具一格。在欧美常用石斛花朵制作胸花, 配上丝石竹和天冬草, 有欢迎光临之意。至今, 其广泛用于大型宴会、开幕式剪彩典礼, 在许多国家把石斛兰作为每年 6 月 19 日的父亲节之花。近年来, 国内花卉市场上石斛兰鲜切花供不应求, 主要缘于其自然繁殖力很低, 常规繁殖速度太慢, 许多优良品种无法大量繁殖以满足日益增长的市场需求。曾宋君^[1]、叶秀萍^[2] 曾开展胚培养及其细胞学的研究。探讨石斛兰茎尖的组培快繁技术, 可完善石斛兰组织培养的方法和创造一定经济价值。陈永勤^[3] 对石斛兰原球茎快速增殖的技术进行了研究。刘会清^[4] 等对春石斛兰的茎段繁殖进行了研究。罗岚^[5] 以秋石斛兰小苗的茎尖为材料进行离体快繁, 结果表明, 原球茎诱导以 NX+ 6-BA 1.5 mg/L+ NAA 0.15 mg/L 最好, 原球茎在 MS+ 6-BA 3 mg/L 培养基上出芽最多, 生根培养为 1/2 MS+ IBA 0.4 mg/L 最好, 生根率为

98.7%。现以秋石斛组培苗的茎节为外植体, 比较其在不同培养基上的诱导分化和再生情况, 从而初步建立茎节的离体再生培养体系, 为石斛兰的快速繁殖和遗传转化育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为石斛兰的无菌苗。

1.2 试验方法

1.2.1 诱导和分化培养 将石斛兰无菌苗的叶片、根段、茎节切割成 0.5~ 1 cm 大小, 根尖取 0.1~ 0.2 cm, 接种到诱导和分化培养基上, 比较不同外植体间的萌发、生长和分化状况。诱导和分化培养基分别为: A: 1/2 MS+ 6-BA 0.5~ 6 mg/L+ NAA 0~ 1 mg/L; B: MS+ 6-BA 1 mg/L+ NAA 0.05~ 0.5 mg/L; C: MS+ KT 1.0 mg/L+ 6-BA 4 mg/L; D: 1/2 MS+ TDZ 0.001~ 0.1 mg/L+ NAA 0.2 mg/L。以上所有培养基均附加 10% 椰子汁、0.1% 活性炭、20 g/L 白砂糖和 8 g/L 琼脂, 然后用 1% NaOH 调节 pH(5.4~ 5.6)。在 121℃ 条件下高压灭菌 13 min。外植体接种后, 均放入培养室内进行培养, 培养室温度为(25±2)℃, 光/暗周期为 14 h/10 h, 光照强度 2 500~ 3 500 lx。

1.2.2 试管苗的生根诱导 当获得的试管苗长到 2~ 4 cm 时, 将其转入生根培养基 1/2 MS+ 6-BA 0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 上进行生根诱导试验, 30 d 后统计生根率、根的长度以及生根状况等。

1.2.3 试管苗的驯化和移栽 将生根良好的试管苗在移栽前先松开三角瓶的帮扎或拧松瓶盖, 在组织培养室放置 3~ 5 d, 然后放于温室中, 去掉封口膜, 1 d 后, 取出试管苗即可进行移植。移植前, 洗净试管苗基部的培养基, 然后用经过灭菌的水苔包裹试管苗的根部, 将其移

第一作者简介: 张彦妮(1974), 女, 博士, 副教授, 现主要从事园林花卉的教学及研究工作, 研究方向为园林花卉的繁殖栽培及育种。E-mail: zhangyanni808@126.com。

基金项目: 黑龙江省博士 后科研启动金资助项目(LBH-Q08156)。

收稿日期: 2009-12-15

植到营养钵中,前期要保持高湿环境,每隔1周浇1次经稀释100倍后的1/2 MS液体培养基,株高长到6 cm左右时再换到大一号的营养钵中即可。

1.2.4 不同指标的计算方法 每隔一段时间观察1次,30或60 d后统计生根率、分化率及产生不定芽数。计算公式如下:生根率= [生根外植体的总数/(接种外植体总数- 污染外植体总数)] × 100%;不定芽分化率= [产生不定芽的外植体总数/(接种外植体总数- 污染外植体总数)] × 100%。

2 结果与分析

2.1 6-BA 与 NAA 配合对石斛兰外植体诱导的影响

将石斛兰叶片、根段、茎节、根尖放在附加NAA和6-BA的1/2 MS培养基上培养,试图诱导其产生愈伤组织或不定芽,60 d后发现,叶片全部变为褐黄色,尤其在与培养基接触处,褐化明显。根段变为黄绿色,大部分均肿大;根尖绿色肿大。但接种的所有外植体均未产生愈伤组织或不定芽。

将石斛兰的茎节接种到附加NAA和6-BA的MS

表 1 在不同激素水平下石斛兰组培苗茎节的诱导及生长状况

NAA 浓度/ mg · L ⁻¹	6-BA 浓度/ mg · L ⁻¹	接种数/ 个	生根率/ %	分化率/ %	平均出芽数/ 个	生长状况(60 d后统计)
0.5	0.5	10	60.0	80.0	1.20	根少,无毛;叶细,长势一般
0.1	0.5	19	31.5	89.5	1.47	生根较粗,有须根毛,量较少。长高明显
0.01	0.5	21	9.5	47.6	2.19	叶较宽,高生长明显。基部变褐
1	1	28	57.1	50.0	1.36	叶片较窄,茎细
0.5	1	43	47	34.9	1.63	顶芽长高明显,叶宽
0.1	1	41	24.4	41.5	1.22	叶绿,茎粗叶宽,长势较好,3个顶芽产生花蕾,其中1棵茎扁化
0.05	1	54	16.7	75.6	1.04	长高明显,大于2.5 cm,叶黄绿色,有些叶子黄化,可能是光照不足

从表2看出,在NAA浓度为0.2 mg/L时,随着6-BA浓度的增加,茎节分化率均低于6-BA浓度为2

培养基上培养(表1和表2),结果发现,接种30 d后,在茎节基部或节间有不定芽产生,随着时间的延长,不定芽逐渐长大,等长到1 cm左右时可以将其切下再次作为外植体进行不定芽的诱导增殖,可以扩大繁殖系数,获得大量的石斛兰组培苗。

在6-BA浓度不变1 mg/L的情况下,随着NAA浓度的升高,茎节分化率逐渐降低,但在NAA浓度为1 mg/L时又升高,达到50%。但平均产生的不定芽数随着NAA浓度的升高而增加,在NAA浓度为1 mg/L时有所降低。并且在此浓度下,石斛兰茎节的生根率最高,为57.1%。这充分证实了NAA是一种生长素,主要促进根的发生,6-BA是一种细胞分裂素,主要促进不定芽的发生。

在6-BA浓度为0.5 mg/L的情况下,随着NAA浓度的增加,生根率增加,在NAA浓度为0.5 mg/L时达到最大,为60.0%。分化率在NAA浓度为0.5 mg/L时达到最大,为89.5%。而平均芽数在培养基MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L时最大,为2.19。

mg/L时的分化率,并且在这一浓度下,平均分化芽数也最高,为5.16(图1),生根率也最高,为56.0%。

表 2 在不同 MS 培养基上石斛兰组培苗茎节的诱导及生长状况

NAA 浓度/ mg · L ⁻¹	6-BA 浓度/ mg · L ⁻¹	接种数/ 个	生根率/ %	分化率/ %	平均出芽数/ 个	生长状况(60 d后统计)
0.2	2	25	56.0	84.0	5.16	1个褐化死亡,差,根多于10条,生长较好,植株高
0.2	3	32	50.0	56.3	2.47	1个褐化,大部分生长较好
0.2	4	11	18.2	36.4	2.55	根少
0.2	6	8	25.0	37.5	1.88	根良好,长势良好

2.2 TDZ 与 NAA 配合对石斛兰茎节诱导的影响

从表3看出,在NAA浓度为0.2 mg/L,随着TDZ浓度的增加,茎节分化率降低,但各个浓度下分化率

相差不大。生根率和生根数增加明显。平均芽数也有所增加。

表 3 在不同 1/2 MS 培养基上石斛兰组培苗茎节的诱导及生长状况

NAA 浓度/ mg · L ⁻¹	TDZ 浓度/ mg · L ⁻¹	接种数/ 个	芽增殖倍数	分化率/ %	生根率/ %	生长状况(60 d后统计)
0.2	0.001	14	1.29	57.1	28.6	较好,叶片大
0.2	0.01	14	1.64	50.0	35.7	较好,叶大
0.2	0.1	10	2.1	50.0	50.0	生根多



图1 茎节产生的不定芽

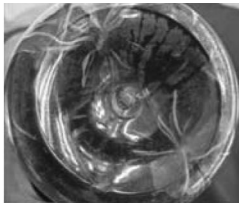


图2 诱导生根的石斛兰无菌苗



图3 驯化移栽后的石斛兰无菌苗

2.3 石斛兰无菌苗的生根诱导

当石斛兰试管苗长到2~ 4 cm 时,将其转入到附加0.5 mg/L 6-BA 和0.1 mg/L NAA 的1/2MS 培养基上进行生根诱导试验。50 d 后进行记录统计,结果表明,生根率达到100%(见图2),且根的数量较多。

2.4 石斛兰试管苗的驯化和移栽

移栽后的石斛兰无菌苗生长良好(图3),成活率为97.0%。但有些植株叶片出现叶尖干枯现象,可能是有时空气中的湿度过低的原因造成的。

3 结论与讨论

尽管理论上植物的任何一部分均可以再生成完整植株,但以石斛兰的叶片、根段、根尖、茎段为外植体,未获得再生植株。而茎节在所用的培养基上均有一定的分化率,且相对较高,分化率在34%以上。茎节在每种培养基上也产生了不定根。但在所选用的激素种类和组合中,6-BA 对石斛兰茎节不定芽的诱导作用最大,茎节在培养基MS+ 6-BA 2 mg/L+ NAA 0.2 mg/L 上产生的平均不定芽最多,为5.16个;在培养基MS+ 6-BA

0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 上分化率最高,为89.5%。不定芽的生根培养基是1/2MS+ 6-BA 0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L,生根率为100%。石斛兰组培苗经过驯化移栽后成活率为97.0%。为了保证出瓶后的苗生长良好,刚开始要保持较高的空气湿度和温度,以后随着出瓶时间的延长,试管苗对外部环境的逐渐适应,逐渐降低空气湿度,这样利于苗木的生长。否则叶尖会出现干枯现象,影响其观赏价值。

参考文献

[1] 曾宋君,程式君,张京丽,等. 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究[J]. 园艺学报,1998,25(1): 75-80.
[2] 叶秀舜. 石斛兰组织培养和细胞学观察[J]. 园艺学报,1995,22(1): 83-87.
[3] 陈永勤. 石斛兰快速无性繁殖的研究[J]. 贵州农业科学,1994(2): 1-4.
[4] 刘会清,张爱香,常美花,等. 春石斛兰的茎段繁殖研究[J]. 北方园艺,2008(1): 181-183.
[5] 罗岚,关仕港,刘建昌,等. 秋石斛兰离体快速繁殖研究[J]. 佛山科学技术学院学报,2004,22(2): 69-71.

Primary Development of Tissue Culture Systems for Stem of *Dendrobium nobile*

ZHANG Yan-mi¹, QIAN Can¹, CHEN Li-xin²

(1. Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang 150040; 2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Horticultural Branch, Harbin, Heilongjiang 150069)

Abstract: This paper took stems with nodes of tissue culture seedling as explants and screened out the best culture medium. Then regeneration system of *Dendrobium nobile* stem was established primarily. The results showed that the best culture medium for stems with nodes was MS supplemented with 0.5 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA, which the ratio of differentiation was 89.5%. The best medium for proliferation was MS basal medium supplemented with 2 mg/L 6-BA and 0.2 mg/L NAA. Proliferation multiple was 5.16. The best rooting medium was 1/2MS medium with 0.5 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA. The rooting ratio was 100%. The survive ratio was 97% after transplanting.

Key words: *Dendrobium nobile*; stems with nodus; tissue culture