

铁皮石斛组培苗耐盐性研究

李国树^{1,2}, 徐成东^{1,2}, 李天星¹, 杜富祥¹, 邱璐^{1,2}, 李雪玲^{1,2}

(1. 楚雄师范学院 化学与生命科学系 云南 楚雄 675000 2. 滇中高原生物资源与利用研究所 云南 楚雄 675000)

摘要:以铁皮石斛为外植体诱导出愈伤组织后,分别接种到不同盐浓度的愈伤增殖、茎叶分化和生根3种培养基中进行耐盐性筛选,30 d 后进行脯氨酸含量测定。结果表明:在培养基中,NaCl 浓度在 0.2%~1.0%范围内,对铁皮石斛的愈伤增殖、茎叶分化和生根均产生抑制作用,并且盐浓度越高,脯氨酸含量也随之升高,抑制作用越大。盐浓度达 0.6%时,愈伤诱导受害明显,脯氨酸含量是对照组的 3.60 倍;盐浓度高于 0.5% 时,盐胁迫对不定根和茎叶分化诱导更显著。

关键词:铁皮石斛;组培苗;耐盐性;临界盐浓度

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)01-0153-04

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为兰科多年生附生草本植物,是一种珍稀的药用植物和园艺植物,其含有石斛碱、石斛次碱和石斛宁等多种生物碱,具有滋阴清热、生津益胃、抗肿瘤、抗衰老和扩张血管的作用^[1-3]。但因野生铁皮石斛多生长在高山岩石阴面或森林树干上,开花结果少,繁殖能力低,自然条件下发芽率不足 5%^[4-6],最终导致野生铁皮石斛濒临绝迹。目前,生产上多用组培苗大棚栽培提供铁皮石斛产品,因大棚环境相对密闭,室内温度高、土壤水分蒸发量大,浇水追肥频繁,导致肥料中的盐分容易随水分上升到土壤耕层产生盐害,影响铁皮石斛的栽培效益,但对铁皮石斛苗及耐盐性的相关研究尚未见报道。因此,该试验从培养基盐分含量梯度入手,筛选铁皮石斛组织培养过程的盐分浓度,比较铁皮石斛愈伤组织、茎叶分化苗和生根苗的耐盐相关性,通过游离脯氨酸含量测定来反映其耐盐性,为快速繁殖铁皮石斛苗及幼苗栽培环境提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)外植体取自云南文山广南。

1.2 试验方法

1.2.1 铁皮石斛无菌苗的建立 以铁皮石斛为外植体,

第一作者简介:李国树(1969-),男,彝族,云南永仁人,高级实验师,现从事植物学实验及植物资源开发与利用研究工作。E-mail:hsxlgs@cxte.edu.cn.

基金项目:楚雄师范学院学术后备人才资助项目(08YJRC22);云南省应用基础研究计划资助项目(2008CD218)。

收稿日期:2010-10-29

用 MS+2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+3%蔗糖+10%琼脂为铁皮石斛愈伤诱导培养基;MS+3 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA+3%蔗糖+10%琼脂为茎叶分化培养基;MS+2 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA+3%蔗糖+10%琼脂为生根苗培养基。在以上培养基中得到铁皮石斛的愈伤组织、茎叶分化苗和生根苗,然后在以上3种培养基中分别添加 0.0%(CK,下同)、0.2%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%、1.0%NaCl 浓度进行耐盐性筛选试验,每种培养基 20 瓶。

1.2.2 脯氨酸标准曲线的制作 按照脯氨酸含量的测定方法^[7-8],以脯氨酸浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线(图 1)。其线性回归方程为 $y=0.05934x+0.01147(R=0.99771)$ 。

表 1 脯氨酸标准溶液的浓度与吸光度

编号	1	2	3	4	5	6
浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.073	0.137	0.180	0.240	0.316	0.364

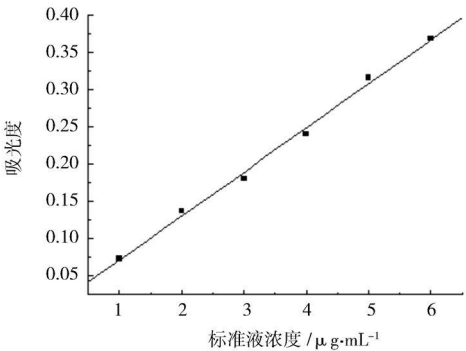


图 1 脯氨酸标准曲线

1.2.3 不同盐浓度对石斛愈伤诱导的影响 所用 NaCl 浓度为 0.0%、0.2%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%、1.0%。取 50 d 的继代愈伤,长、宽、高约为 0.5 cm 的材料接种于含不同浓度 NaCl 的 MS+2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+3%蔗糖+10%琼脂的培养基中培养,共 70 瓶,每瓶接种 2 个愈伤。接种后,定期观察、记录其增殖、受害情况,愈伤大小等外观形态生长情况。盐胁迫 30 d 后统计愈伤大小(长×宽×高)、颜色变化等伤害程度。

1.2.4 不同盐浓度对石斛茎叶分化的影响 所用 NaCl 浓度为 0.0%、0.2%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%、1.0%。取 50 d 的继代愈伤,长、宽、高约为 0.5 cm 的材料接种于含不同浓度 NaCl 的 MS+3 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA+3%蔗糖+10%琼脂的培养基中培养,共 70 瓶,每瓶接种 2 个愈伤。接种后 30 d 后统计统计茎叶大小(个数及高度)、颜色变化等伤害程度。

1.2.5 不同盐浓度对石斛生根影响 所用 NaCl 浓度为 0.0%、0.2%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%、1.0%。取

50 d 的继代愈伤,长、宽、高约为 0.5 cm,置于含不同浓度 NaCl 的 MS+2 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA+3%蔗糖+10%琼脂的培养基上,共 70 瓶,每瓶接种 2 个愈伤。接种后,定期从外观形态(增殖、受害情况,愈伤大小)上观察记录,盐胁迫 30 d,统计根长度及根数、颜色变化等伤害程度。

2 结果与分析

2.1 不同盐浓度对石斛愈伤诱导的影响

由表 2 可看出,随 NaCl 浓度升高,供试材料的愈伤生长均被抑制。盐胁迫 30 d,在 0.2%~1.0%范围内,随 NaCl 浓度升高,石斛愈伤受害程度上升。在 NaCl 浓度为 0.6%时,受害明显。当盐浓度高于 0.6%时,石斛愈伤的生长严重受抑制,盐浓度越高,抑制作用越大,以致盐浓度到 1.0%全部失水萎蔫死亡。由此,铁皮石斛愈伤增殖培养基中 NaCl 临界浓度为 0.6%。

表 2 不同盐浓度下愈伤组织的生长量

NaCl 浓度/%	0.0	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0
愈伤体积平均值 (长×宽×高)/cm	2.5×2.2×1.25	1.4×1.31×0.99	1.1×0.84×0.62	0.74×0.58×0.59	0.34×0.33×0.37	0.25×0.21×0.23	全部死亡

2.2 不同盐浓度对石斛茎叶分化的影响

组培盐胁迫 30 d 后,随 NaCl 浓度升高,茎叶分化均受到抑制。对照组 15 d 开始形成茎叶分化,但含盐胁迫 20 d 才少量出现茎叶分化,30 d 后对结果进行统计(表 3)。由表 3 可知,试验组的茎叶分化程度明显低于对照

组,当盐浓度在 0.4%~0.5%时,茎叶分化受害明显,盐浓度在 0.6%~0.8%时,愈伤不增长,而到了 1.0%时,全部受盐害,失水萎蔫。因此,确定对于铁皮石斛茎叶分化耐盐筛选的临界浓度为 0.5%。

表 3 不同盐浓度下铁皮石斛苗茎叶分化情况

NaCl 浓度/%	试验序号										平均值
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0.0(苗数、高)/cm	9.0.5	7.0.5	8.0.4	8.0.4	9.0.3	7.0.5	10.0.4	11.0.3	9.0.4	8.0.4	8.6.0.41
0.2(苗数、高)/cm	5.0.3	3.0.3	5.0.4	6.0.3	4.0.4	7.0.3	5.0.2	3.0.4	4.0.3	4.0.4	4.6.0.36
0.4(苗数、高)/cm	3.0.1	4.0.1	3.0.2	3.0.1	2.0.1	4.0.2	3.0.1	3.0.1	5.0.2	2.0.2	3.2.0.14
0.5(苗数、高)/cm	无茎叶分化,但愈伤变大										
0.6(苗数、高)/cm	无增长,幼苗黄化,干枯,盐害明显										
0.8(苗数、高)/cm											
1.0(苗数、高)/cm	全部受盐害,失水萎蔫										

2.3 不同盐浓度对石斛生根的影响

对照组 15 d 开始形成圆形灰白色幼根,但受含盐胁迫 20 d 才逐渐出现少量幼根,随 NaCl 浓度升高,铁皮石斛苗生根过程和生根数量及根系长度均受到明显抑制,30 d 后进行结果统计(表 4)。由表 4 可知,盐浓度对铁皮石斛苗生根过程和生根数量及根系长度均有明显抑制作用,当盐浓度在 0.4%~0.5%时,生根数量仅为对照组的 1/2~1/3,幼根生长长度明显低于对照组;当盐浓度在

0.8% 时,无根生长;而到了 1.0%时,全部受盐害,黄化萎蔫。因此,确定对于铁皮石斛幼根生长耐盐筛选的临界浓度为 0.5%。

表 4 不同盐浓度铁皮石斛苗根系生长情况

NaCl 浓度/%	0.0	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0
根系条数/条	6	6	4	2	2	无生根	
根系长度/cm	7.3	4.1	2.7	1.1	0.4	全部死亡	

2.4 不同盐浓度对游离脯氨酸含量的影响

2.4.1 不同盐浓度对铁皮石斛愈伤诱导游离脯氨酸的影响 取 30 d 不同盐浓度胁迫下材料各 0.5 g, 分别置于大试管中(3 次重复), 加入 5 mL 3% 磺基水杨酸溶液, 管口加盖玻璃球塞, 于沸水浴中浸提 10 min。取出试管, 待冷却至室温后, 吸取上清液 2 mL, 加 2 mL 冰乙酸和 2 mL 酸性茚三酮液, 于沸水浴中加热 30 min。取出冷却后向各管加入 4 mL 甲苯充分振荡, 以萃取红色物质。静置待分层后吸取甲苯层, 以甲苯液为对照, 在波长 520 nm 下比色测定。从标准曲线中查出测定液中脯氨酸浓度, 按公式计算样品中脯氨酸含量: 脯氨酸 ($\mu\text{g/g}$ FW 或 DW) = $(C \times V/a) / W^{[8]}$; 式中: C 为提取液中脯氨酸含量 (μg), 由标准曲线求得; V 为提取液总体积 (mL); a 为测定时所吸取提取液的体积 (mL); W 为样品重 (g)。由表 5 可以看出, 在 MS+2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+3% 蔗糖+10% 琼脂培养基上接种的愈伤, 35 d 后随着盐浓度的增加, 其脯氨酸含量也随之升高。NaCl 浓度达 0.6% 时, 脯氨酸含量是对照组的 3.60 倍。在 1.0% 的盐浓度胁迫下, 愈伤失水萎蔫死亡, 无法测其脯氨酸含量。

表 5 诱导愈伤中的脯氨酸含量

NaCl 浓度/%	0.0	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8
诱导愈伤中 Pro 含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	7.52	13.93	20.33	23.01	27.07	36.85

2.4.2 不同盐浓度对铁皮石斛茎叶分化游离脯氨酸的影响 用 2.4.1 测脯氨酸含量的方法测得茎叶分化材料中不同盐浓度胁迫下脯氨酸的含量见表 6。由表 6 可知, 在诱导茎叶分化的最适培养基上接种的愈伤, 30 d 后, 随着盐浓度的增加, 其脯氨酸的含量也随之升高, 当 NaCl 浓度达 0.5% 时, 脯氨酸含量是对照组的 2.02 倍。在 1.0% 的盐浓度胁迫下, 愈伤失水萎蔫死亡, 无法测其脯氨酸含量。

表 6 茎叶分化苗中的脯氨酸含量

NaCl 浓度/%	0.0	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8
茎叶分化苗中 Pro 含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	12.24	16.29	17.97	29.76	31.12	50.55

3 结论与讨论

3.1 NaCl 浓度对石斛愈伤诱导效果影响

自从植物细胞的全能性获得证实以后, 利用组织培养技术、采用诱变剂、通过胁迫筛选等方法可以在一定范围内选择出植物生长的临界值^[9]。该研究从外观形态(增殖、受害情况、叶片大小)、生长动态和脯氨酸含量几方面入手, 确定了对植物危害较大的 NaCl 在继代苗耐盐筛选中的临界浓度。失水萎蔫是盐渍下多种植物最迅速最严重的盐害症状, 它直接导致植株死亡。叶片枯焦和

黄化是植物在较低盐胁迫下主要盐害症状^[10]。在试验中, 石斛愈伤受害程度随 NaCl 浓度的升高其伤害程度加深, 到 1.0% 时均达到试验的最大值, 组培苗致死率超过 100%。当 NaCl 浓度在 0.2% 时, 与对照组相比, 其伤害程度显著, 由此表明铁皮石斛的愈伤生长对盐十分敏感。在 NaCl 浓度为 0.6% 时, 受害差异显著。当盐浓度高于 0.6% 时, 石斛愈伤的生长严重受抑制。以铁皮石斛愈伤在 30 d 盐胁迫下生长表现为标准, NaCl 进行耐盐筛选的适宜临界浓度为 0.6%。

3.2 盐浓度对石斛茎叶分化的影响

在茎叶分化的诱导中, 随 NaCl 浓度的升高, 铁皮石斛茎叶分化受到不同程度的抑制, 同样在 NaCl 浓度为 0.2% 时, 与对照组相比, 其伤害程度显著, 当盐浓度在 0.5% 时, 茎叶分化受害明显, 盐浓度在 0.6%~0.8% 时, 愈伤不增长, 而到了 1.0% 时, 全部受盐害, 失水萎蔫。因此, 铁皮石斛茎叶分化耐盐筛选的临界浓度为 0.5%。

3.3 脯氨酸含量可作为铁皮石斛组织培养中耐盐性的一个生理指标

试验在铁皮石斛苗培养基中分别添加了不同浓度的 NaCl, 在盐胁迫 30 d 的情况下, 从外观形态(增殖、受害情况, 愈伤大小)上观察记录分析及脯氨酸含量的测定数据表明, 铁皮石斛组培苗耐 NaCl 的临界浓度为 0.5%~0.6% 之间, 且脯氨酸含量在一定程度上与 NaCl 浓度成正比, 可以将脯氨酸含量测定作为铁皮石斛苗耐盐性的一个生理指标。

参考文献

- [1] 莫昭展, 贝学军, 韦江萍, 等. 不同培养条件对铁皮石斛原球茎增殖的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(22): 6835-6836, 7011.
- [2] 马国祥, 徐国钧, 徐珞珊. 鼓缝石斛及化学成分抗肿瘤活性研究[J]. 中国药科大学学报, 1994(3): 188-189.
- [3] 蒋波, 杨存亮, 黄捷, 等. 铁皮石斛原球茎生长分化及生根壮苗研究[J]. 玉林师范学院学报, 2005, 26(3): 66-69.
- [4] 张明, 夏鸿西. 石斛组织培养研究进展[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(6): 323-326.
- [5] 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, 35(3): 656-657, 670.
- [6] 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, 32(3): 522-523.
- [7] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 278-279.
- [8] 李合生. 植物生理生化试验原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [9] 王海英, 孙建设, 王旭静. 果树耐盐性研究进展[J]. 河北农业大学学报, 2004, 23(2): 54-57.
- [10] 马凯, 汪良驹, 汪业遵, 等. 十八种果树盐害症状与耐盐性研究[J]. 果树科学, 1997, 14(1): 1-5.

植物生长调节剂对黄精愈伤组织诱导的影响

杨玉红

(鹤壁职业技术学院, 河南 鹤壁 458030)

摘 要:应用正交设计法研究了不同培养基和4种植物生长调节剂对黄精愈伤组织诱导的影响。结果表明:6-BA对诱导黄精愈伤组织生长效果显著,2,4-D、NAA和KT效果不显著;黄精愈伤组织诱导的最佳培养基为MS+2,4-D 3.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 0.25 mg/L。

关键词:黄精; 诱导; 愈伤组织

中图分类号 S 567.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0156-03

黄精是百合科黄精属多年生宿根性草本药用植物,其根茎是传统中药,始载于《名医别录》,被列为上品。药典中规定入药的还有同属的多花黄精、滇黄精。以干燥根茎入药,味甘性平,归脾、肺、肾经,具有健脾、补肾、润肺、生津等功效。由于黄精需求的大幅增长,造成黄精野生资源匮乏。李世^[1]等人对黄精的野生变家种栽培进行了研究,而且有些地方也开始人工种植黄精^[2-3],但由于生产上多采用分根繁殖,其繁殖系数低,种根茎用量大,既不经济,又限制了黄精的产量潜力,不便栽植管理与推广,而且长期的分根无性繁殖很容易引起黄精品种退化^[4],且黄精的种子发育较慢,从播种到长出地上部分大概需要1 a时间,且其新生根茎较小,因此种苗问题成了人工大面积种植黄精的瓶颈,尤其是黄精GAP基地建设中所面临的主要问题。

随着组织培养技术在药用植物上的广泛应用,为濒

临灭绝的野生药用资源保护和生产替代品提供了新途径。目前已建立了众多经济植物的商品化大规模栽培基地,均依靠组织培养实现了快速繁殖。利用组织培养这一技术可以迅速提高黄精的繁殖率,同时也可以提高黄精种质的品质,防止退化。徐红梅^[5]等报道了植物生长调节剂对多花黄精芽体外发生过程中性状的影响,认为激素组合TDZ 1.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L对黄精根茎芽增殖最有利,而徐忠传^[6]通过研究则认为激素组合6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L不仅能使芽快速增殖,且不定芽增殖的综合质量好,无畸形叶片产生。徐忠传^[6]曾报道用多花黄精带芽的根茎成功繁殖出实生苗,但黄精愈伤组织诱导的研究报道很少。现采用正交实验设计,研究不同培养基和4种植物生长调节剂对诱导愈伤组织生长的影响,以期对黄精愈伤组织诱导和细胞培养奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采自河南省信阳鸡公山野生黄精植株,人工授粉得到成熟浆果。种子无菌接种在培养基上萌发获得幼苗

作者简介:杨玉红(1966),女,河南鹤壁人,硕士,教授,研究方向为食品生物技术。

收稿日期:2010-10-18

Research of the Salt Resistance in Seedling Cultivation of *Dendrobium officinale*

LI Guo-shu^{1,2}, XU Cheng-dong^{1,2}, LI Tian-xing¹, DU Fu-xiang¹, QIU Lu^{1,2}, LI Xue-ling^{1,2}

(1. Department of Chemistry and Life Science, Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan 675000; 2. Institute for Bio-resources Research and Development of Central Yunnan Plateau, Chuxiong, Yunnan 675000)

Abstract: Took propagated tissue culture of *Dendrobium officinale* callus as the material. It was inoculated into three different concentration of medium salt tolerance screening. The results showed that 30 days under salt stress, different salt concentration on callus induction of *Dendrobium* obviously higher than the 0.6% in the salt concentration, tissue culture, significantly affected, proline was the 3.60 times of content; different salt concentration on differentiation of stem and root induction and growth were influential, in the salt concentration higher than the 0.5% level significantly affected, and salt stress on adventitious root induction was more pronounced.

Key words: *Dendrobium officinale*; seedling cultivation; salt resistance; critical concentration