

紫皮石斛组培技术的优化研究

祁永琼¹, 陈志远¹, 李开云², 李长科¹

(1. 云南农业职业技术学院, 云南 昆明 650031; 2. 昆明市西山林场, 云南 昆明 650100)

摘要:以紫皮石斛种子和茎段作为外植体, 研究芽苗增殖培养、生根培养及组培苗优化条件。结果表明: 种子最适宜作为快繁的外植体, 种子通过无菌小芽苗、芽苗增殖、壮苗生根的途径再生成完整植株; 并探索出适宜的培养基配方: 初代诱导培养基为 1/2MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA, 种子直接萌发长成大量绿色、长势整齐的无菌小芽苗; 增殖培养基为 MS+2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+5% 马铃薯汁+5% 香蕉泥, 芽苗增殖倍数高, 达到 4.6 倍, 且长势好、芽苗粗壮; 生根壮苗培养基为 1/2MS+0.5 mg/L NAA+10% 香蕉泥+0.1% 活性炭, 生根苗平均根数和根长达到了最佳状态, 根系发达, 苗高、健壮, 叶色浓绿。培养基中适宜的琼脂浓度为 6 g/L, 增殖倍数较高, 植株直立, 叶片也不弯曲。

关键词:紫皮石斛; 快繁; 种子; 琼脂

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)05-0139-04

紫皮石斛是兰科植物以齿瓣石斛为代表的一类兰科石斛属植物(*Dendrobium devoninum* Paxt), 因其茎呈紫色, 故称之为紫皮石斛、紫皮兰。据《中国药典》(2005 版)记载: 石斛为常用贵重药材, 以铁皮石斛的药用价值最高, 紫皮石斛次之。铁皮石斛生长环境苛刻、栽培周期长、植株矮小且价格昂贵, 相比之下紫皮石斛更易生长, 植株长度超过 40 cm, 原料获取方便, 多糖含量较高, 为铁皮石斛的 60%, 价格实惠, 被称为平民“铁皮”。目前紫皮石斛加工而成的紫皮枫斗因其较好的药用价值和较高的性价比被市场广为接受, 进行林下栽培已成为云南省保山、德宏、临沧、思茅等广大山区农民致富之路^[1]。

经过多年的采集, 现野生紫皮石斛几乎灭绝, 而市场需求逐年增加, 种苗供不应求, 价格年年看涨。从 20 世纪 70 年代中期开始, 我国对于石斛组培快繁的报道已经很多, 但是对于紫皮石斛组织培养的报道很少^[2]。因此, 利用组织培养方法实现紫皮石斛快速繁殖种苗, 是满足生产需要的最佳途径。该试验旨在为规模化生产紫皮石斛种苗建立一种高效、快速的途径提供一定的指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为引种于云南农业职业技术学院中草药

园的紫皮石斛成熟种子及 1 a 生茎段。

1.2 试验方法

1.2.1 不同外植体进行初代培养 以成熟种子作为外植体, 于 5~6 月取紫皮石斛成熟未开裂的蒴果, 用 75% 酒精棉球仔细擦洗果实表面, 尤其是果壳表面沟纹, 用无菌水冲洗 3 次, 在超净工作台上用 0.1% HgCl₂ 消毒 10~15 min 后, 用无菌水冲洗 5 次, 在无菌滤纸上将已灭菌的果实切开小口, 轻轻抖动果荚, 将种子均匀散播于初代培养基(M1、M2、M3、M4)上。暗培养 3 d 后转入光照条件下培养, 大约 20 d 后种胚开始膨大、转绿, 40 d 后逐渐长成无菌芽苗, 用于进一步进行试验。选择生长健壮、茎节粗壮的紫皮石斛 1 a 生幼嫩枝条, 流水冲洗 0.5 h, 摘去叶片和叶鞘, 用洗洁剂溶液浸泡 30 min, 再用软毛刷轻轻刷洗表面, 清水冲洗干净。在超净工作台上用 75% 酒精消毒 30 s, 0.1% HgCl₂ 灭菌 8~10 min 后, 用无菌水冲洗 5 次, 用无菌滤纸吸去多余水分。然后将紫皮石斛嫩茎切成长度约为 2 cm 的茎段, 接种于初代培养基上, 每瓶接种 1~2 个外植体。40 d 后观察记录。

1.2.2 无菌芽苗增殖培养 不同激素组合对芽苗增殖的影响: 将无菌小苗转入增殖培养基中进行增殖培养。增殖培养基以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的生长调节剂 BA、NAA 及土豆汁和香蕉汁等附加物(M5、M6、M7、M8、M9、M10), 30 d 后观察统计芽苗生长、增殖的情况。琼脂浓度对芽苗增殖的影响: 琼脂浓度会影响芽苗的增殖。以 M9 为配方, 以 1 L 培养基中添加不同的琼脂。将无菌苗接种于附加不同琼脂浓度的培养基中, 30 d 后观察统计芽苗生长的情况。

第一作者简介:祁永琼(1978-), 女, 云南宜良人, 硕士, 讲师, 现主要从事植物遗传育种和组织培养教学工作。E-mail: lenglengzhu_1978@163.com。

收稿日期:2011-12-16

1.2.3 生根培养 将增殖培养产生的 2 cm 以上的小苗放在生根培养基(R1、R2、R3、R4、R5)中进行壮苗生根培养长成完整植株,30 d 后统计结果。

1.2.4 培养条件 初代培养基:M1 为 1/2MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA; M2 为 MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA; M3 为 MS+2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA; M4 为 MS+3 mg/L BA+0.5 mg/L NAA。增殖培养基:M5 为 M1+20%马铃薯汁; M6 为 M2+10%马铃薯汁; M7 为 M3+10%马铃薯汁; M8 为 M4+10%马铃薯汁; M9 为 M3+10%香蕉泥; M10 为 M3+5%马铃薯汁+5%香蕉泥;以 M9 为配方,琼脂浓度分别设定为 4、5、6、7 g/L 4 个处理。生根培养基:R1 为 1/2MS; R2 为 1/2MS+0.2 mg/L NAA; R3 为 1/2MS+0.5 mg/L NAA; R4 为 1/2MS+1.0 mg/L NAA; R5 为 1/2MS+0.5 mg/L NAA+10%香蕉泥+0.1%活性炭。光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 8~10 h/d,温度 (25±2)℃,培养基 pH 5.6,白糖浓度为 20~30 g/L。

2 结果与分析

2.1 种子和茎段作为外植体的比较分析

由表 1 可知,2 种外植体的再生途径不同,以种子(图 1)为外植体,在不同的培养基中种子直接萌发长成大量绿色、长势整齐的无菌小芽苗(图 2);而茎段作为外植体,是在茎节处产生不定芽或者较少的原球茎,增殖系数低。激素对不同外植体诱导成苗的影响也不同。以种子为外植体,NAA 浓度不变,随着 BA 浓度的增加,诱导率降低,尤其是接种于 M4 培养基中,原球茎诱导率仅 10%,长势细弱,因此认为高浓度 BA 会抑制紫皮石斛种子的萌发;NAA、BA 浓度相同,基本培养基为 1/2MS 和 MS 时,种子在 1/2MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 诱导率最高达 90%。以茎段为外植体,经过诱导可长出 不定芽,但 BA 浓度增加可诱导出细弱的原球茎,颜色发黄,不适宜再进行增殖。

综合分析,认为种子最适宜作为紫皮石斛快繁的外植体,采用 1/2MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 培养基进行初代培养,可获得萌发率高、长势整齐的大量无菌小芽苗作为良好的增殖材料,为建立高效快繁体系奠定基础。

表 1 不同外植体初代培养结果

培养基	诱导率/%		生长情况	
	种子	茎段	种子	茎段
M1	90	0	大量绿色芽苗,长势整齐	生长缓慢
M2	80	35	大量芽苗,长势不齐	生长快、伸长
M3	40	75	发芽率低,长势不齐	节处长出 2~3 个不定芽
M4	10	85	发芽缓慢,细弱	节处长出 4~5 个原球茎,细弱、发黄

2.2 不同激素对芽苗增殖的影响

由表 2 可知,当 NAA 为 0.5 mg/L、BA 浓度为 2 mg/L,芽苗的增殖倍数最高,达到 4.2 倍;但 BA 浓度

为 3 mg/L,芽苗的增殖倍数降低,且发黄、长势细弱,即过高浓度的 BA 则抑制紫皮石斛芽苗的增殖,并影响芽苗的质量。芽苗在 M5 培养基中,生长较慢,因此认为 1/2MS 培养基不适合进行紫皮石斛增殖培养。在增殖培养基中添加适量的马铃薯汁、香蕉泥对外植体的生长、分化增殖有明显的促进作用。试验结果表明,在附加了马铃薯汁和香蕉泥的培养基上,芽苗不但增殖倍数高,达到 4.6 倍,而且长势好、芽苗粗壮(图 3),马铃薯汁、香蕉泥的适宜用量为 5%。因此认为紫皮石斛芽苗增殖培养时,适宜的培养基配方为 MS+2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+5%马铃薯汁+5%香蕉泥。

表 2 不同激素和有机附加物对芽苗增殖的影响

培养基	增殖倍数/倍	生长情况
M5	1.4	生长缓慢
M6	2.1	生长慢
M7	4.2	生长快、长势好
M8	3.2	生长快、长势好
M9	3.5	生长快,发黄,芽苗细弱
M10	4.6	生长快、长势好、芽苗粗壮

2.3 琼脂浓度对芽苗增殖的影响

由表 3 可知,从芽苗增殖倍数来看,当琼脂浓度为 5~6 g/L 时,芽苗增殖倍数高,达到 3.3 倍以上;琼脂浓度过低或过高,芽苗增殖倍数下降。从植株的着生状态来看,在琼脂浓度为 6 g/L 时,紫皮石斛植株生长状态较好,直立不歪斜,叶片也不弯曲;过高或过低的琼脂浓度,芽苗易畸形或黄化。究其原因,琼脂浓度过低,培养基较软,芽苗沉入培养基内,影响其对光照和氧气的需要而导致芽苗颜色慢慢退化;琼脂浓度过高,培养基较硬,芽苗不易吸收营养而引起生长不良,植株黄化、矮小。

表 3 不同琼脂浓度对芽苗增殖的影响

琼脂浓度/g·L ⁻¹	增殖倍数	生长情况
4	2.4	芽苗颜色浅黄或呈无色透明状
5	3.6	芽苗绿色、健壮
6	3.3	芽苗绿色、健壮,植株生长直立
7	1.6	芽苗黄化、矮小

2.4 不同激素和附加物对生根壮苗的影响

由表 4 可知,5 个处理紫皮石斛接种苗的生根率都达到了 100%。但随其 NAA 浓度的增加,接种苗的生根数先呈现上升趋势,而后又出现下降,说明在紫皮石斛组培苗的生根培养期,适宜浓度的 NAA 有利于生根、壮苗;所添加 NAA 的浓度并不是越高越好,过高浓度的 NAA 对其接种苗的生根会产生抑制的作用。1/2MS 培养基未添加 NAA 时,紫皮石斛接种苗的生根率也达到了 100%,但生根数少,为 2~3 条,根细长,苗细弱,且颜色黄绿,这说明紫皮石斛以种子为外植体再生的芽苗较易生根。在未添加 NAA 的 1/2MS 培养基中,紫皮石斛因根数过少,不利于后期苗体的驯化栽培;当 1/2MS 培

培养基所添加的 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时,紫皮石斛接种苗生根效果最好,其平均根数达到了 4.1 条,且在附加 10%香蕉泥、0.1%活性炭的培养基中,平均根数和根长也达到了最佳状态,分别为 4.4 条和 4.06 cm,生根苗生长状况良好,根系发达,苗高、健壮,叶色浓绿(图 4)。

表 4 不同激素和有机附加物对芽苗生根的影响

培养基	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm	生根苗长势
R1	100	2.5	4.45	根细长,苗细弱,叶色黄绿
R2	100	3.6	2.54	根短粗,苗细高,叶色绿
R3	100	4.1	3.82	根粗、长,苗壮,叶色绿
R4	100	3.0	3.45	根短粗,苗矮,叶色淡绿
R5	100	4.4	4.06	根粗、长,苗高、健壮,叶色浓绿



图 1 紫皮石斛种子



图 2 无菌小芽苗



图 3 增殖苗

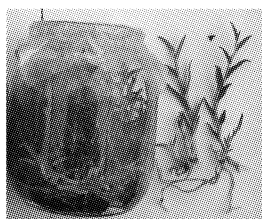


图 4 生根壮苗

3 结论与讨论

紫皮石斛自然繁殖率低,生长缓慢,传统的分株、扦插繁殖率不高^[3-4],使得大规模基地栽培中存在种苗数量不足的问题,极大地限制了产量。所以利用组培进行紫皮石斛种苗快速繁育,将可以有效地解决这一问题。为探索适宜快繁的途径,该试验分别以紫皮石斛种子和茎段作为外植体进行比较,试验结果表明,茎段作为外植体,增殖率较低;种子最适宜作为快繁的外植体,可获得萌发率高、长势整齐的大量无菌小芽苗作为良好的增殖材料。该试验并探索了适宜的培养基配方:初代诱导培养基为 1/2MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA;增殖培养基为 MS+2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+5%马铃薯汁+5%香蕉泥;生根壮苗培养基为 1/2MS+0.5 mg/L NAA+10%香蕉泥+0.1%活性炭。

适当的琼脂浓度可使培养基具有适当的软硬度、适当的透气性、适当的含水量^[5],有利于紫皮石斛种子的萌发,无菌苗的增殖、生长和生根。而琼脂浓度过低,一方面使培养基硬度不够,外植体组织不能和培养基紧密

接触,激素和营养物质不能被充分地吸收;另一方面培养基较软,芽苗沉入培养基内,影响其对光照和氧气的需要而导致芽苗颜色慢慢退化;琼脂浓度过高,培养基较硬,透气性降低,水分含量减少,激素和营养物质也不容易扩散,则芽苗不易吸收营养而引起生长不良,植株黄化、矮小。对于紫皮石斛无菌芽苗,琼脂浓度为 6 g/L 时较为适宜,增殖倍数较高,达 3.3 倍,植株生长状态较好,直立不歪斜,叶片也不弯曲。此外,减少琼脂使用量,可降低规模化生产的企业生产成本。

据报道,目前在石斛属植物中,霍山石斛、金钗石斛、铁皮石斛、鼓槌石斛等 9 种以根尖、茎尖或茎段、叶尖和种子等为外植体,经过愈伤组织、原球茎、胚状体和丛生芽等途径^[5-9],已成功诱导出无性繁殖系和离体种子苗。但是关于紫皮石斛组织培养技术的报道却很少。刘会清等^[2]报道,采用紫皮石斛的离体种子无菌苗,对其原球茎进行增殖,通过分化后接入生长培养基,获得完整的紫皮石斛植株,并认为在紫皮石斛组织培养的过程中,原球茎的增殖和分化最为关键。在该试验中,紫皮石斛种子经过诱导,直接萌发成无菌苗,并通过增殖培养扩大其群体,继而生根壮苗,并没有经过原球茎就获得完整植株。陈文等^[10]报道的鼓槌石斛种子离体培养时,主要是通过种胚发育膨大→突破种皮形成裸露的种胚→萌发成小苗^[10],与该试验紫皮石斛种子培养获得无菌小芽苗的成苗途径相一致。而以茎段为外植体诱导不定芽或原球茎的成苗途径,是否能较好地保持遗传稳定性且快速得到增殖体系,则有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 冉懋熊,刘家保. 云南龙陵紫皮石斛产业发展的思考与建议[J]. 中国现代中药, 2010, 12(2): 11-13.
- [2] 刘会清,张爱香,常美花,等. 紫皮石斛组织培养体系的建立[J]. 北方园艺, 2007(10): 192-193.
- [3] 包雪声,顺庆生,陈立钻. 中国药用石斛彩色图谱[M]. 上海:上海医科大学出版社,复旦大学出版社, 2001.
- [4] 傅玉兰,谷凤,胡传,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.
- [5] 高培元,陈健妙,甘铨. 金钗石斛的茎段组织培养与植株再生[J]. 中草药, 2002, 33(11): 1031-1033.
- [6] 孙丹,朴炫春,郑艳艳,等. 铁皮石斛圆球茎增殖影响因素的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(32): 18150-18151.
- [7] 蓝玉甜,刘世勇,罗玉婷,等. 鼓槌石斛种子萌发培养与小苗组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(9): 5380-5382.
- [8] 卢文芸,唐金刚,乙引,等. 五种药用石斛快速繁殖的研究[J]. 种子, 2005, 24(5): 23-26.
- [9] 詹忠根. 铁皮石斛根尖诱导丛生芽研究[J]. 中草药, 2006, 37(6): 929-931.
- [10] 陈文,王延春,刘国民,等. 鼓槌石斛未成熟种子无菌萌发与小苗组培快繁的研究[J]. 贵州科学, 2008, 26(1): 45-51.

天人菊菌核病病原鉴定及其拮抗木霉菌株的筛选

刘 威, 叶 云 峰, 李 林 轩, 蒋 妮, 刘 丽 辉

(广西壮族自治区药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023)

摘 要:通过致病性测定、病害症状、病原菌培养性状及形态特征等对天人菊菌核病病原菌进行鉴定;通过室内拮抗作用测定和盆栽防治效果测定筛选生防木霉菌株。结果表明:将天人菊菌核病的病原菌鉴定为核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary);筛选到对天人菊菌核病菌拮抗作用最强,盆栽防治效果最好的菌株是哈茨木霉 H5,其拮抗指数为I级,防治效果为 93.2%。在测试的 5 个木霉菌株中,哈茨木霉 H5 对天人菊菌核病的防治效果最好。

关键词:天人菊;菌核病;病原鉴定;拮抗木霉;筛选

中图分类号:S 482.2⁺92 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)05-0142-04

天人菊(*Gaillardia pulchella* Foug.)为菊科 1 a 生草本植物,别名虎皮菊、六月菊。原产北美,喜阳光,耐半阴,是干旱地区良好的防风固沙植物。由于其花期较长,色彩绚丽,深得人们喜爱,是花坛、庭园美化的理想花卉,也是城市园林绿化中的重要观赏植物之一。此外,该植物全株含天人菊内脂(gaillardin),有抗肿瘤(人体鼻咽癌)和治疗阿米巴痢疾、阴道滴虫等药用功效^[1]。

第一作者简介:刘威(1982-),女,广西北流人,本科,助理工程师,现主要从事药用植物病虫害研究工作。E-mail: liuweiy98@126.com。

基金项目:广西药用植物园青年基金资助项目(桂药基 200807)。

收稿日期:2012-01-04

2011 年以来,随着政府刺激内需政策效应的逐渐显现以及国际经济形势的好转,天人菊内酯市场需求膨胀,面临巨大的市场投资机遇。目前,该植物在我国的台湾、四川、广西、贵州、云南等中、南部省区有大量栽培。随着天人菊种植年限的增加和种植面积的扩大,其生育期间的病害问题也日渐突显,尤其是近 2 a 在广西的多个栽培区出现了菌核病,病害严重时发病率达 40%~50%,常造成大片植株枯死,严重影响了天人菊的品质和产量。目前,对天人菊的研究主要集中在快速繁殖方面^[2-3],关于其病虫害方面的研究尚未见报道。

为了有效控制天人菊菌核病的发生和蔓延,现对该病的病原种类进行了鉴定,并通过室内拮抗作用测定和

Optimizing Study on Tissue Technology of the Purple Skin *Dendrobe*

QI Yong-qiong¹, CHEN Zhi-yuan¹, LI Kai-yun², LI Chang-ke¹

(1. Yunnan Vocational and Technical College of Agriculture, Kunming, Yunnan 650031; 2. West Mountain Forest Station of Kunming, Kunming, Yunnan 650100)

Abstract: With the purple skin *Dendrobe* seed and stem section as explants, the bud seedling proliferation, rooting, and optimized conditions of plantlets were studied. The results showed that the seed was most appropriate as rapid propagation explant, seeds through the small bud seedling, the proliferation and seedling rooting of the way into complete plant regeneration; And a suitable culture medium formula was explored; beginning the generation of inductive medium for 1/2MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA, seed germination directly grow, growth of large green and sterile small bud seedling; Proliferation medium for MS+2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+5% potatoes juice+5% mashed bananas, bud seedling multiple of 4.6 times as high proliferation and growth better, the bud seedling stout; Rooting medium 1/2MS+0.5 mg/L NAA+10% mashed bananas+0.1% activated carbon, take root seedlings root number and root for average to best, root system developed, seedling height, robust, and the leaves deep green. Medium suitable for the AGAR concentration of 6 g/L, therefore, higher multiples, erect plant, leaf also didn't bend.

Key words: purple skin *Dendrobe*; rapid propagation; seed; agar