

# 培养基种类、BA 浓度和蔗糖浓度对春石斛组培苗增殖的影响

修景润<sup>1</sup>, 朴炫春<sup>2</sup>, 姚睿<sup>2</sup>, 高日<sup>2</sup>, 廉美兰<sup>2</sup>

(1. 延边朝鲜族自治州农业科学院, 吉林 龙井 133400; 2. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

**摘要:**以春石斛(*Dendrobium casciflake*)的组培苗为试材, 研究培养基的种类、BA 浓度、蔗糖浓度等因素对不定芽增殖生长的影响, 为春石斛种苗的规模化生产提供理论依据。结果表明: 在 MS 培养基中不定芽分化及生长能力明显好于 White、VW、SH、B<sub>5</sub> 及 KC 培养基, 培养 30 d 后每个外植体平均分化出 3.7 个健壮的苗; 在 MS 培养基中加入 BA 3.0 mg/L 以及蔗糖 30 g/L 时, 春石斛不定芽增殖数多, 且生长良好。

**关键词:**春石斛; 增殖生长; 培养基种类; BA 浓度; 蔗糖浓度

**中图分类号:**S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0143-03

石斛(*Dendrobium casciflake*)为兰科石斛兰属多年生草本植物, 在我国主要分布于西南和华南地区<sup>[1]</sup>。春石斛兰属, 有优美的花姿、芳香的气味, 具有很高的观赏价值, 受到全球消费者喜爱<sup>[2]</sup>。春石斛主要采用分株及组织培养的方式进行繁殖, 但其分株繁殖的繁殖系数低<sup>[3-5]</sup>, 不能满足生产需要, 且其对生长条件的要求较为苛刻, 所以早在 20 世纪 60 年代初国外有人开始进行石斛组织培养<sup>[6-8]</sup>的研究, 但是春石斛在生产实践过程中还存在很多问题急需被研究和解决。有人采用组织培

养的技术方法进行墨兰根状茎的快速繁殖, 克服了种子繁殖与分株繁殖技术上的缺点<sup>[9]</sup>。利用组织培养技术快速繁殖春石斛, 能够克服普通繁殖技术上的缺点, 缩短了人工栽培春石斛周期, 在短期内取得经济效益, 具有较大的实用价值。因此, 该试验用春石斛无菌试管苗作为试验材料, 对影响春石斛增殖的几个外部因素分别进行了探讨, 以缩短人工栽培周期为种苗的规模化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

取春石斛的侧芽, 去掉根和老叶, 使用流水冲洗 30 min 以上, 再用浓度为 70% 的酒精浸泡 30 s, 然后使用无菌水冲洗 1 次后用浓度为 0.1% 的升汞溶液浸泡, 浸泡时间为 8 min, 最后用无菌水冲洗 6 次, 得到无菌外植体。

**第一作者简介:**修景润 (1981-), 男, 硕士, 现主要从事长白山经济植物栽培育种研究工作。E-mail: huijuanli2006@163.com。

**责任作者:**廉美兰 (1963-), 女, 博士, 教授, 现主要从事植物组织培养和生物反应器的研究工作。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31160179)。

**收稿日期:**2012-03-26

## Establishment of Inter Simple Sequence Repeat PCR Reaction System in Asparagus Bean

YIN Guang-jing<sup>1,2</sup>, SONG Ting-yu<sup>2</sup>, WU Chun-yan<sup>2</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, SONG Shu-yao<sup>2</sup>

(1. Songyuan Technical College, Songyuan, Jilin 138005; 2. Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** Genomic DNA of asparagus bean was extracted by the method of DNA secure Plant kit. Five factors such as concentration of  $Mg^{2+}$ , dNTPs, *Taq* DNA, primer, and template DNA which were primary factor for the orthogonal design was selected, while the best cycles of PCR reaction was also screened from three different treatments. The results showed that the optimization for ISSR-PCR reaction system on asparagus bean was as follows: 25  $\mu$ L reaction system containing 1.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.2  $\mu$ mol/L dNTP, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, 0.3  $\mu$ mol/L primer and 45 ng DNA template, the whole PCR reaction ran for 40 cycles.

**Key words:** asparagus bean; ISSR; reaction system

## 1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 将无菌外植体接入增殖培养基中进行培养,培养条件为温度(25±2)℃,相对湿度 70%,将形成的不定芽,切成单株高约为 1 cm、带 2 片叶的外植体作为试验材料。用 110 mL 柱状瓶(30 mL 培养基),每瓶接种 4 个长约 2 cm、带 1~2 个节茎段的外植体,每个处理接种 5 瓶。采用人工光照封闭式培养,光照强度为 1 600 lx,光照时间 16 h/d,温度(25±2)℃,相对湿度 70%,培养 30 d 后进行观察。

1.2.2 基本培养基对春石斛组培增殖的影响 以 White(White)、VW(Vacin& Went)、MS(Murashige and Skoog)、SH(Shenk and Hildebrandt)、B<sub>5</sub>(Gambor et al)、KC(Knudson C)6 种培养基作为基本培养基,每种培养基中分别加入 BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L,pH 调节为 5.8,进行培养。30 d 后对不定芽个数、鲜物重和干物重进行统计分析 & 方差分析,筛选出最佳基本培养基。

1.2.3 BA 对春石斛组培增殖的影响 用 BA 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/L 与 NAA 0.1 mg/L 配成 6 个不同激素浓度组合进行培养,其中以未加 BA 的 0 mg/L 处理为对照,30 d 后对不定芽个数、株高、鲜物重和干物重进行统计分析 & 方差分析,筛选出最合适的 BA 浓度水平。

1.2.4 蔗糖对春石斛组培增殖的影响 将蔗糖 10、20、30、40、50、60 g/L 与 MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+琼脂 7.0 g/L 配成 6 个不同蔗糖浓度的培养基进行培养,30 d 后对不定芽个数、株高、鲜物重和干物重进行统计分析 & 方差分析,筛选出最适合的蔗糖浓度水平。

1.2.5 培养条件及数据分析 统计方法数据分析利用 SAS (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) 程序,采用邓肯氏新复极差法比较显著水平。

## 2 结果与分析

## 2.1 基本培养基对春石斛组培增殖的影响

由表 1 可知,不同培养基种类对铁皮石斛增殖的影响不同,其中 MS 培养基中不定芽数分化的最多,达 3.7 个,在 White 培养基中不定芽分化数量最少,不定芽个数只有 1.5 个。MS 培养基中不定芽的数量明显比其它种类的培养基中不定芽的数量高,B<sub>5</sub> 和 KC 这 2 种培养

表 1 基本培养基种类对春石斛增殖的影响

| 培养基种类          | 不定芽数/个 | 株高/cm | 鲜物重/mg    | 干物重/mg |
|----------------|--------|-------|-----------|--------|
| MS             | 3.7 a  | 3.5 a | 1 378.6 a | 82.8 a |
| B <sub>5</sub> | 2.7 b  | 3.0 b | 808.0 b   | 67.4 b |
| VW             | 2.3 c  | 2.5 c | 787.1 c   | 59.4 c |
| KC             | 2.2 c  | 2.9 b | 692.2 d   | 43.5 d |
| SH             | 1.9 d  | 2.4 c | 640.4 e   | 42.4 e |
| White          | 1.5 e  | 2.1 d | 417.7 f   | 29.5 f |

注:小写字母为 0.05 显著水平的多重比较结果。下同。

基中不定芽的分化数量没有显著差异,但是都比 VW 和 SH 培养基中的不定芽分化数量多,培养基 VW 和 SH 中的不定芽分化数量没有显著差异。因此,在春石斛组培增殖中,MS 是最适宜的培养基。

## 2.2 BA 对春石斛组培增殖生长的影响

由表 2 可知,随着 BA 浓度的增加,春石斛不定芽数量、鲜物重和干物重呈上升趋势,以 3.0 mg/L 为最佳,外植体分化的不定芽数、鲜物重和干物重均出现了最高值,显著高于其它处理;当 BA 超过 3.0 mg/L 时,不定芽数量、鲜物重和干物重开始呈现下降趋势。从综合指标考虑,BA 的适合浓度为 3.0 mg/L,该试验结果和傅玉兰的研究结果相似<sup>[10]</sup>。

表 2 BA 对春石斛增殖生长的影响

| BA 浓度/mg · L <sup>-1</sup> | 不定芽数/个 | 株高/cm | 鲜物重/mg    | 干物重/mg  |
|----------------------------|--------|-------|-----------|---------|
| 0                          | 1.4 d  | 1.8 e | 466.3 e   | 34.3 f  |
| 1.0                        | 2.0 c  | 2.3 c | 682.5 d   | 40.2 d  |
| 2.0                        | 3.2 b  | 2.4 c | 974.5 b   | 70.3 b  |
| 3.0                        | 4.5 a  | 2.5 c | 1 326.7 a | 78.2 a  |
| 4.0                        | 2.5 bc | 3.7 a | 937.2 c   | 67.0 c  |
| 5.0                        | 2.7 bc | 2.9 b | 681.0 d   | 39.5 de |
| 6.0                        | 2.3 bc | 2.0 d | 679.5 d   | 39.2 e  |

## 2.3 蔗糖对春石斛组培增殖生长的影响

由表 3 可知,随着蔗糖浓度的升高,不定芽数量、株高、鲜物重和干物重呈上升趋势,在蔗糖浓度为 30 g/L 时,外植体分化的不定芽数、株高、鲜物重和干物重均达到了最高值,显著高于其它处理。当蔗糖浓度为 40 g/L 及以上时,对春石斛不定芽的增殖生长起到了抑制的作用。导致这样结果的原因有可能是蔗糖浓度过低而影响了培养基的渗透压,提供不了植株生长所必需的碳源,而蔗糖浓度过高则会导致瓶内空气湿度变小,从而不利于植株的生长,从综合指标考虑,蔗糖的适宜浓度为 30 g/L。

表 3 蔗糖浓度对春石斛增殖生长的影响

| 蔗糖浓度/g · L <sup>-1</sup> | 不定芽数/个 | 株高/cm | 鲜物重/mg    | 干物重/mg |
|--------------------------|--------|-------|-----------|--------|
| 10                       | 2.1 d  | 2.8 d | 521.4 e   | 37.3 e |
| 20                       | 2.8 b  | 3.4 b | 721.8 c   | 49.8 c |
| 30                       | 4.8 a  | 3.8 a | 1 398.3 a | 90.2 a |
| 40                       | 2.9 b  | 3.3 b | 802.9 b   | 66.2 b |
| 50                       | 2.4 c  | 3.2 b | 704.9 c   | 48.1 d |
| 60                       | 2.3 c  | 3.0 c | 541.6 d   | 38.3 e |

## 3 结论与讨论

试验结果表明,MS 培养基较为适合春石斛增殖生长,有利于不定芽的分化,可能是由于 MS 培养基无机盐浓度高,与其它培养基的含氮量相比较,其中硝态氮的含量是铵态氮含量的 2 倍,能够起到使植物加速生长的作用,能提供植物组织生长所需要的矿物质营养。一般在蝴蝶兰的组培快繁培养基也以 MS 居多,效果很好<sup>[11-13]</sup>。在该试验的春石斛增殖培养中,进行了 BA 的浓度筛选,使用 NAA 0.1 mg/L 与 BA 配成了 6 个不同

激素浓度组合进行培养,结果发现 BA 浓度为 3.0 mg/L 时的增殖率最好,不定芽数量高于其它浓度的处理,这个结果与洋兰进行组织培养时所使用的激素浓度相似,洋兰在诱导、增殖及分化的过程中一般要用较高浓度的细胞分裂素配合较低浓度的生长素,这样有利于植株的生长<sup>[14]</sup>。选择合适浓度的生长调节物质,能对大规模的快速繁殖起到重要的作用。蔗糖在植物组织培养中起到碳源的作用,能够为植物细胞提供合成新化合物的碳骨架,能够供外植体生长所需要的能量。蔗糖浓度过高或者过低都会导致外植体失水,对植物细胞产生不良的影响,从而影响植株的生长。当蔗糖浓度为 2% 时,对于兰科植物原球茎的生长有利<sup>[15]</sup>,而蔗糖浓度达到 2%~3% 时,对芽的形成有促进作用,当浓度达到 5% 时,根开始进行分化和生长<sup>[16]</sup>;蔗糖浓度为 1.0%~1.5% 时,有利于墨兰原球茎的快速生长,如果进行长期培养可适当加大蔗糖的浓度<sup>[17]</sup>。该研究结果表明,蔗糖浓度为 30 g/L 时,对于不定芽的形成是较为理想的。因此,MS 培养基中加入 BA 3.0 mg/L 以及蔗糖 30 g/L 对春石斛不定芽的增殖、鲜物重和干物重都有较好的影响,适合春石斛的增殖生长。

#### 参考文献

- [1] 刘金,潘光华. 兰花[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [2] 叶香娟,赖联森. 春石斛兰组培苗的炼苗与移栽[J]. 林业科技开发, 2006, 20(2): 80-81.
- [3] 乔佳伟. 春石斛栽培要点[J]. 中国花卉园艺, 2005(8): 18-19.
- [4] 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, 30(5): 580-583.
- [5] 王玉英,李枝林,余朝秀. 春石斛试管增殖研究初报[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 208-209.
- [6] Morel G M. Producing virus-free cymbidiums [J]. Am Orchid Soc Bull, 1960, 29: 495-497.
- [7] Sagawa Y, Shoji T. Clonal propagation of *Dendrobium* through shoot meristem culture [J]. Am Orchid Soc Bull, 1967, 36: 856-859.
- [8] Kim K K, Kunisaki J T, Sagawa Y. Shoot-tip culture of *Dendrobium* [J]. Am Orchid Soc Bull, 1970, 39: 1077-1080.
- [9] 郑艳艳,朴炫春,李嫵,等. 几种因素对墨兰根状茎增殖生长的影响[J]. 延边大学农学报, 2010, 32(5): 254-256.
- [10] 傅玉兰,张志华,姚萍. 春石斛组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(3): 464-465.
- [11] 刘福林,李淑萍. 蝴蝶兰花梗的组织培养和植株再生[J]. 商丘师范学院学报, 2001, 17(6): 98-99.
- [12] 彭立新,王殊,孟广云. 蝴蝶兰组织培养快繁研究[J]. 天津农业科学, 1999, 5(2): 27-29.
- [13] 杨美纯,周歧伟,许鸿源. 蝴蝶兰的种子培养[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(4): 258-260.
- [14] 杨玉珍,雷呈,胡如善,等. 文心兰的组织培养和快速繁殖技术[J]. 江苏农业科学, 2003(6): 77-79.
- [15] Kusumoto M. Interform variation of the proliferation, organogenesis and effects of growth regulating substances on *Cymbidium* protocorms cultured *in vitro* [J]. Jpn Soc Hort Sci, 1980b, 48(4): 510-518.
- [16] Paek K Y, Chun C K. Physiological characteristics of *Cymbidium* protocorm cultured *in vitro*. II Effects of several substances on organogenesis and subsequent growth of protocorm [J]. Kor Plant Cult, 1983, 10(1): 27-35.
- [17] 谷祝平,颜延进. 大花蕙兰茎尖组织培养及形态建成的研究[J]. 实验生物学报, 1999(2): 149-151.

## Effect of Several External Factors on Proliferation and Growth of *Dendrobium casiflake*

XIU Jing-run<sup>1</sup>, PIAO Xuan-chun<sup>2</sup>, YAO Rui<sup>2</sup>, GAO Ri<sup>2</sup>, LIAN Mei-lan<sup>2</sup>

(1. Yanbian Academy of Agricultural Sciences, Longjing, Jilin 133400; 2. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

**Abstract:** With adventitious shoots proliferated through tissue culture of *D. casiflake* as experimental material, the effect of several factors such as the medium types, the concentrations of BA, the concentrations of sucrose etc on the proliferation and growth of *D. casiflake* were studied. To provide the theoretical basis for scale production of *D. casiflake* seedling. The results showed that the effect of MS medium on the proliferation and growth of *D. casiflake* was better than other kinds of medium, and should help improve the differentiation of adventitious shoots. It had obvious promoting effect on the differentiation of adventitious shoots, fresh weight and dry weight when BA at 3.0 mg/L and sucrose at 30 g/L were added into MS medium which were perfect for the proliferation and growth of *D. casiflake*.

**Key words:** *Dendrobium casiflake*; proliferation and growth; medium types; BA concentration; sucrose concentration