

# 黑节草再生植株壮苗培养条件的优化

石彩娟, 范高韬, 朱梦丽, 王万军

(西南交通大学 生物工程学院, 四川 成都 610031)

**摘要:**以黑节草种子为外植体, 研究比较了基本培养基、蔗糖、激素及激素组合对黑节草试管苗生长的影响。结果表明:以 1/2MS 大量元素、MS 全量微量元素及有机物为基本培养基, 附加 2% 蔗糖、1.0 mg/L NAA 和 1.0 mg/L IAA, 组成壮苗培养基, 能有效地诱导再生植株的新根萌发并能促进茎和根的发育。

**关键词:**黑节草; 再生植株; 壮苗培养

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0090-04

黑节草(*Dendrobium candidum* Wall ex Lindl.) 属兰科石斛属多年生草本附生植物<sup>[1]</sup>, 又名铁皮石斛, 是我国传统的名贵中药材。由于过度采挖, 已导致资源枯竭而成为濒危植物。因此, 自 20 世纪 70 年代以来我国各地相继开展了黑节草快速繁殖技术研究以解决资源短缺问题<sup>[2]</sup>, 研究热点主要集中在丛生芽的诱导和原球茎的增殖与分化方面<sup>[3]</sup>, 但对黑节草试管苗的壮苗培养研究鲜有报道。该试验以黑节草再生植株为材料, 比较了各种壮苗培养基的培养效果, 以期寻找为入土移栽提供整齐、高大、健壮以及根系发达的试管苗的培养条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以黑节草种子在 MS 基础培养基上萌发形成的幼苗为外植体诱导再生植株, 以这些再生植株为材料, 筛选最佳壮苗培养基。

### 1.2 试验方法

黑节草壮苗培养基由基本成分、蔗糖、激素及 0.55% 琼脂组成, 基本成分包括 MS 基础培养基中的大量元素、微量元素、铁盐和有机元素, 各壮苗培养基中的基本成分、蔗糖及激素组成如表 1~4 所示, 其中 1/2MSm 培养基指基本成分仅含 MS 基础培养基中大量元素的 1/2 和铁盐, 而不含任何其它微量元素和有机元素; 1/5MS、1/2MS 和 MS 指基本成分中的大量元素是 MS 基础培

养基中大量元素的 1/5、1/2 和全量, 而基本成分中的微量元素、铁盐和有机元素与 MS 基础培养基中的一致。配制时, 首先将琼脂加热溶化至沸腾, 稍凉后分别加入如表 1~4 所示各成分, 然后用 1.0 mol/L HCl 或 1.0 mol/L NaOH 调 pH 至 5.8~6.2, 再分别分装到 150 mL 的三角瓶中, 每瓶 40 mL。最后, 在 105 kPa、121℃ 条件下湿热灭菌 20 min。将具 2~3 片小叶(最大叶面积约为 2 mm×5 mm)、1~2 条短根(最长根约 1 cm)、苗高约为 0.5 cm 的黑节草再生植株转接于不同的壮苗培养基中, 每种培养基接 4 瓶, 每瓶接 4~5 株, 培养温度为 (25±1)℃, 每日光照 12 h, 光照强度 2 000~3 000 lx, 2 次重复。

### 1.3 数据分析

培养 60 d 后统计根的条数和叶片数, 测量根和茎的长度与径度。根长和茎高用普通直尺进行测量, 根和茎的径度分别在根的基部与茎的膨大部用游标卡尺(A 型, 150 mm)测量, 将所测数据进行算术平均, 统计分析采用 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 基本培养基成分对黑节草再生植株的影响

在黑节草壮苗培养过程中, 比较了培养基中的 4 种基本成分对黑节草再生植株生长的影响, 结果如表 1 中 1、2、3、4 号所示, 其中 1 号是对照。经差异显著性检验, 1 号与 4 号培养基相比对根径的影响达到显著水平 ( $P<0.05$ ), 3 号与 4 号培养基相比对根数的影响达到显著水平 ( $P<0.05$ ), 2 号与 4 号培养基相比对根长的影响都达到极显著水平 ( $P<0.01$ ), 1、2、3 号与 4 号培养基相比对叶数的影响均达显著水平 ( $P<0.05$ )。各基本培养基对根、茎的生长均有显著作用。当培养基中 MS 大量元素小于 1/2 时, 根的伸长生长受到抑制, 全量元素时根的伸长生长和根的径向生长都受到明显促进, 但全量

**第一作者简介:**石彩娟(1987-), 女, 河北邯郸人, 硕士, 现主要从事药用植物资源与分子生物学的研究工作。E-mail: caijuanshi@163.com.

**责任作者:**王万军(1962-), 男, 四川南充人, 博士, 教授, 研究方向为植物生物技术。E-mail: wanjunwang@home.swjtu.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31271302)。

**收稿日期:**2012-11-07

元素又能明显抑制新根的萌发。同时,培养基中加入微量元素和有机物有利于根的径向生长。综合考虑,3号是比较适宜的基本培养基,对再生植株根、茎的生长以及新根的萌发有促进作用。

表 1 培养基基本成分对黑节草再生植株生长的影响

Table 1 Influence of basic components in media on plantlets growth

培养基 编号	基本成分	蔗糖 /%	再生植株的生长					
			根数	根径/mm	根长/cm	叶数	茎高/cm	茎径/mm
1(CK)	1/2MSm	2	3 a	0.47 a	1.92 A	4 a	1.48 a	2.11 a
2	1/5MS	2	3 a	0.57 b	1.78 B	4 a	1.53 a	2.44 b
3	1/2MS	2	4 b	0.63 b	1.90 A	4 a	1.74 a	2.41 b
4	MS	2	3 a	0.66 b	2.00 A	5 b	1.66 a	2.11 a

注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。下同。

Note: Different small letters mean significant difference at 0.05 level, and different capital letters mean very significant difference at 0.01 level. Same as below.

## 2.2 蔗糖对黑节草再生植株生长的影响

在基本培养基中附加不同浓度的蔗糖,以5号培养基为对照,结果见表2中3、5、6、7号培养基所示。经差异显著性检验,蔗糖对茎高、茎径、根长、叶数的影响不显著,但对根径和根数有显著作用,3、7号培养基与5号培养基相比对根径的影响达到极显著水平( $P<0.01$ ),6、3、7号培养基与5号相比对根数的影响达到显著水平( $P<0.05$ )。以上结果表明,蔗糖对再生植株在培养过程中能显著促进其新根的萌发及根的径向生长,其中以3号(在培养基中添加2%的蔗糖)最适合黑节草再生植株的生长。

表 2 蔗糖对黑节草再生植株生长的影响

Table 2 Influence of sucrose concentration in media on plantlets growth

培养基 编号	基本成分	蔗糖 /%	再生植株的生长					
			根数	根径/mm	根长/cm	叶数	茎高/cm	茎径/mm
5(CK)	1/2MS	0	3 a	0.37 A	1.78 a	4 a	1.62 a	2.05 a
6	1/2MS	1	4 b	0.45 A	1.67 a	4 a	1.69 a	2.02 a
3	1/2MS	2	4 b	0.63 B	1.90 a	4 a	1.74 a	2.41 a
7	1/2MS	3	4 b	0.55 B	1.66 a	5 b	1.92 a	2.31 a

## 2.3 NAA对黑节草再生植株生长的影响

以3号培养基为对照,附加不同浓度的NAA,培养效果见表3中3号及8~12号培养基所示。结果经差异显著性检验,9号培养基与3号相比对根长的影响达显著水平( $P<0.05$ ),11、12号培养基与3号相比对茎高、茎径、根径的影响达显著水平( $P<0.05$ ),10、11、12号培养基与3号相比对根数的影响达到极显著水平( $P<0.01$ )。结果显示,NAA对再生植株萌发新叶无显著作用,但在低浓度下,对根和茎的伸长生长有促进作用;0.5 mg/L NAA对根的伸长生长最佳,1.0 mg/L NAA对茎的伸长生长较好,超过此浓度,NAA又可抑制根和茎的伸长生长;相对于伸长生长,NAA对根和茎的径向生长也表现出同样的作用,1.5 mg/L NAA可使

根径和茎径达到最大值;当NAA浓度超过0.5 mg/L时,可抑制再生植株萌发新根,这种作用还随NAA浓度增加而增强。这些结果表明,在基本培养基中添加一定浓度的NAA对黑节草再生植株的生长有促进作用,但超过一定浓度后又阻碍再生植株的发育。综合考虑,在培养基中附加0.5~1.0 mg/L的NAA较为合适,在其中生长的黑节草再生植株的状态较好,同时对黑节草苗的丛生也有一定的促进作用。由此可以看出,NAA在黑节草壮苗过程中是一个重要的调控因子,其适宜浓度有利于再生植株的发育。

表 3 NAA对黑节草再生植株生长的影响

Table 3 Influence of NAA in media on plantlets growth

培养基 编号	基本成分	蔗糖 /%	NAA /mg·L <sup>-1</sup>	再生植株的生长					
				根数	根径/mm	根长/cm	叶数	茎高/cm	茎径/mm
3(CK)	1/2MS	2	0	4 A	0.63 a	1.90 a	4 a	1.74 a	2.41 a
8	1/2MS	2	0.2	4 A	0.67 a	2.07 a	5 b	1.85 a	2.24 a
9	1/2MS	2	0.5	4 A	0.69 a	2.46 b	4 a	1.78 a	2.56 a
10	1/2MS	2	1.0	3 B	0.78 a	1.66 a	5 b	1.88 a	2.34 a
11	1/2MS	2	1.5	3 B	1.03 b	1.55 a	4 a	1.69 b	2.88 b
12	1/2MS	2	2.0	2 B	0.51 b	1.81 a	5 b	1.55 b	2.80 b

## 2.4 激素组合对黑节草再生植株生长的影响

在上述试验基础之上,以9、10号培养基为对照,进一步考察了NAA与IAA和IBA的激素组合对黑节草再生植株的壮苗效果,结果见表4所示。经差异显著性检验,16、17号培养基与其它各培养基相比都对茎高的作用达显著水平( $P<0.05$ ),使茎的伸长生长达到最大;18、19、20号培养基与其它各培养基相比对茎径的影响都达到极显著水平( $P<0.01$ ),表明在NAA和IBA的组合中,只要其中之一为较高浓度时就抑制茎的径向生长;13~20号培养基与9号培养基相比对叶数的影响均达显著水平( $P<0.05$ ),而与10号培养基相比无显著差异,表明激素组合比低浓度NAA更能促进新叶的产生;16、17、20号培养基与9号以及10号培养基相比对根长的影响都达到显著水平( $P<0.05$ ),其中以16号培养基促进最大,以20号培养基抑制最强,表明较高浓度的IAA与NAA组合能促进根的伸长,而较高浓度的IBA与NAA组合则抑制根的伸长;14、18、20号培养基与9号以及10号培养基相比对根径的影响达到显著水平( $P<0.05$ ),表明IAA抑制根的径向生长,当NAA为1.0 mg/L时又能部分降低这种抑制作用,IBA在0.5 mg/L时能促进根的径向生长,但这种促进作用不显著,而当IBA为1.0 mg/L时却能显著抑制根的径向生长;13、14、18、20号培养基与9号培养基相比以及16号培养基与10号培养基相比对根数的影响达显著水平( $P<0.05$ ),表明当NAA对新根萌发有最佳促进作用时,与IAA、IBA组合则抑制这种作用,而当NAA的浓度抑制新根萌发时,若IAA为1.0 mg/L或IBA为0.5 mg/L时,又可显著促进

表 4 不同激素组合对黑节草再生植株生长的影响

Table 4 Influence of plant growth regulator's combination in media on plantlets growth

培养基 编号	基本成分	蔗糖/%	激素组成/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			再生植株的生长					
			NAA	IAA	IBA	根数	根径/mm	根长/cm	叶数	茎高/cm	茎径/mm
9(CK)	1/2MS	2	0.5	0	0	4 a	0.69 a	2.46 a	4 a	1.78 a	2.56 A
10(CK)	1/2MS	2	1.0	0	0	3	0.78	1.66	5	1.88	2.34
13	1/2MS	2	0.5	0.5	0	3 b	0.62 a	1.88 a	5 b	1.77 a	2.48 A
14	1/2MS	2	0.5	1.0	0	3 b	0.50 b*	2.02 a	5 b	1.72 a	2.40 A
15	1/2MS	2	1.0	0.5	0	3 b	0.75 a	1.75 a	5 b	1.99 a	2.46 A
16	1/2MS	2	1.0	1.0	0	4 a*	0.72 a	2.78 b* *	5 b	2.41 b*	2.59 A
17	1/2MS	2	0.5	0	0.5	4 a*	0.79 a	2.49 a*	5 b	2.43 b*	2.45 A
18	1/2MS	2	0.5	0	1.0	3 b	0.53 b*	2.02 a	5 b	1.81 a	2.19 B* *
19	1/2MS	2	1.0	0	0.5	4 a*	0.87 a	1.77 a	4 a*	2.15 a	2.13B* *
20	1/2MS	2	1.0	0	1.0	3 b	0.43 b*	1.55 b*	5 b	1.74 a	2.10 B* *

注:同一列中与对照 9 号相比,不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ );同一列中与对照 10 号相比,\* \* 表示差异极显著( $P < 0.01$ ),\* 表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different small letters and \* mean significant difference at 0.05 level compared with Medium 9 and 10 respectively; different capital letters and \* \* mean very significant difference at 0.01 level compared with Medium 9 and 10 respectively.

新根的萌发,使其达到最佳状态。因而,综合考虑,16 号培养基是一种比较适宜的壮苗培养基,在该培养基上壮苗的再生植株的培养效果较理想。

### 3 讨论与结论

在铁皮石斛的组织培养研究中,一定浓度的 NAA 对铁皮石斛不定芽的分化和壮苗有一定的促进作用<sup>[6]</sup>,该试验的结果同样也证明了这一点。但在黑节草再生植株的壮苗培养过程中,外源激素对培养效果的影响还与再生植株的起始状态有关,如果再生植株比较幼小(刚由原球茎分化而成,茎高小于 0.5 cm),低浓度的 NAA 则并没有起到促进作用,在含 NAA 的培养基中生长的黑节草幼小再生植株苗逐渐变黄,生长状态不理想。只有当再生植株具一定高度时(茎高为 0.5 cm 左右),低浓度的 NAA 才对再生植株的生长起到很好的促进作用,植株的生长状态比较理想。另外,在培养基中附加 NAA 和 6-BA,与在 9 号培养基中生长的黑节草再生植株相比较,茎和根系的生长都没有明显的优势,但苗的丛生率比较高,9 号培养基的黑节草植株萌发新根和新叶的现象则不是很明显,可达到极显著差异水平,这对黑节草幼苗的扩繁有比较好的效果。在黑节草再生植株的壮苗培养过程中,还探讨了 0.2%、0.5%、1.0% 不同浓度的活性炭对再生植株壮苗效果的影响。与在 3 号培养基中的培养效果相比较,在添加活性炭的培养基中生长的再生植株的状态较好,茎干粗壮、根系发达、叶色浓绿,在附加 3 种不同浓度活性炭的培养基中生长的再生植株的生长状态以含 0.5% 的活性炭的培养基的培养效果较为理想,含 0.2% 的活性炭的培养基次之,含 1% 的活性炭的培养基效果较差。表明活性炭也是黑节草再生植株壮苗培养过程中的一个重要调控

因子,其作用机理尚有待进一步研究。

该研究以具一定大小的黑节草再生植株为对象,系统考察了基本培养基、碳源、激素及活性炭在壮苗培养过程中对再生植株根、茎的生长以及新根与新叶萌发的影响,结果表明以 1/2MS 大量元素、全量 MS 微量元素和有机元素为基本培养基,并附加 1.0 mg/L NAA、1.0 mg/L IAA、0.5% 活性炭(W/V)和 2%(W/V)蔗糖组成壮苗培养基,较适合黑节草再生植株的壮苗培养,能显著促进根、茎的伸长生长和径向生长,同时还能促进再生植株萌发新根和新叶,从而使在其中生长的再生植株具较发达的根系和较粗壮的茎干。

### 参考文献

- [1] 丁小余,徐璐珊,王峰涛,等.铁皮石斛群落差异的研究[J].中草药,2001,32(9):828-831.
- [2] 邵华,张玲琪,李俊梅,等.铁皮石斛研究进展[J].中草药,2004,35(1):109-112.
- [3] Nayak N R, Rath S P, Patnaik S. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation[J]. Scientia Horticulturae, 1997, 71:243-250.
- [4] Nayak N R, Sahoo S, Patnaik S, et al. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) [J]. Scientia Horticulturae, 2002, 94:107-116.
- [5] 王进红,张雪梅,付开聪.黑节草茎段直接诱导丛生芽[J].时珍国医国药,2000,11(11):1052.
- [6] 张泉峰,毛碧增.铁皮石斛培养的产业化研究[J].中草药,2004,35(4):438-440.
- [7] 刘用生,李友勇.植物组织培养中活性炭的使用[J].植物生理学通讯,1994,30(3):214-217.

# 石蒜愈伤组织的诱导及其植株再生研究

刘合霞, 周 坚

(南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

**摘 要:**以石蒜为试材,研究了不同激素组合和外植体选择对石蒜愈伤组织诱导及植株再生的影响。结果表明:外植体选择是石蒜愈伤组织诱导的关键因素,3种外植体中,种子胚诱导愈伤组织的效果最好;在MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L培养基中,诱导愈伤率最高可达82.4%。并能较好地诱导愈伤组织发生不定芽,MS+NAA 0.1 mg/L能较好地诱导愈伤组织发生根。石蒜再生植株进行移栽的最佳基质应为腐殖质和珍珠岩以1:1的比例组成,其成活率为70%。

**关键词:**石蒜;愈伤组织;植株再生

**中图分类号:**S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0093-04

石蒜(*Lycoris radiata* Herb.)属单子叶植物纲石蒜科(Amaryllidaceae)多年生草本植物<sup>[1]</sup>,别名老鸦蒜、蒜头草,有些地方因多数种类花被裂片强烈反卷而称其为龙爪花,还有些地方因其鳞茎有毒性,可作土农药杀灭害虫,又称之为蟑螂花<sup>[2]</sup>。石蒜属植物不仅外形美观,还具有较高的药用及营养保健价值,有广阔的开发应用前景<sup>[3]</sup>。近年来市场上对石蒜属植物的需求量日益增加,但石蒜有性杂交结实率很低,大部分是花而不实<sup>[4]</sup>;

其自然分球繁殖系数低、速度慢,因而它的快速繁殖成为迫切需要解决的问题<sup>[5]</sup>。目前对石蒜组织培养的研究较多,主要以鳞茎等为外植体,通过器官发生途径获得再生植株,而通过诱导愈伤组织,再诱导细胞分化获得完整植株的研究则较少;在大部分的研究中,愈伤组织都是由诱导鳞茎等外植体获得,以种子胚为外植体诱导愈伤组织获得完整植株的研究尚鲜见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2010年9月,待石蒜果实成熟后,于南京林业大学南大山苗圃采集石蒜种子;石蒜组培苗,培养于南京林业大学森林资源与环境学院组培室。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 石蒜种子处理:挑选健康饱满、大小一致的石蒜种子,用洗涤剂洗净后,流水冲洗2~4 h。在超净工作台上,将种子置于已灭菌的玻璃瓶中,用

**第一作者简介:**刘合霞(1984-),女,山东滕州人,在读博士,研究方向为发育植物学。E-mail:liuhexia2010@163.com.

**责任作者:**周坚(1961-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为发育植物学。

**基金项目:**江苏省教育厅资助项目(JH07-012);镇江市科技局资助项目(NY2008034);江苏省研究生培养创新工程资助项目(CXZZ12\_0519)。

**收稿日期:**2012-12-10

## Culture of Strong Regenerated Seedling of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl.

SHI Cai-juan, FAN Gao-tao, ZHU Meng-li, WANG Wan-jun

(College of Bioengineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610031)

**Abstract:** Taking the seeds of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. as material, the effect of media with sucrose, hormones and hormone combinations of NAA (Naphthaleneacetic acid), IAA (3-indoleacetic acid) and IBA (3-indolebutyric acid) on growth of plantlets were studied. The results showed that the new roots of regenerated plantlets could be efficiently induced, and the development of stems and roots could be promoted on the basal medium with half of macronutrients and all the other micronutrients and organic nutrients of MS (Murashige and Skoog) medium, supplemented with 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L IAA and 2% sucrose.

**Key words:** *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl.; regenerated plantlets; tissue culture