

铁皮石斛原球茎高效增殖体系的构建

黄作喜¹, 张 杨¹, 颜小玉¹, 肖小君¹, 李 强², 王自丙²

(1. 内江师范学院, 特色农业资源研究与利用省高校重点实验室, 四川 内江 641112; 2 四川先拓生物科技有限公司, 四川 内江 641110)

摘 要:以铁皮石斛 T4 种群原球茎为试材, 研究了原球茎团块直径、接种密度、不同激素配合及继代周期对原球茎的增殖和长势的影响, 以期构建铁皮石斛原球茎的高效增殖体系。结果表明: 在铁皮石斛原球茎的增殖过程中具有明显的群体效应, 适当增大原球茎团块直径和接种密度有利于提高增殖率; 不同浓度的激动素(KT)、6-苄基腺嘌呤(6-BA)与萘乙酸(NAA)配合试验中, NAA 0.02 mg/L+KT 0.5 mg/L 能更有效地促进原球茎的增殖和生长; 铁皮石斛原球茎增殖培养的适宜继代周期是 50 d。

关键词:铁皮石斛; 原球茎; 增殖体系

中图分类号:R 931.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0107-04

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 属兰科石斛属珍稀濒危植物, 与冬虫夏草等同被列为“中华九大仙草”, 因其滋阴补虚效果显著而位居“中华九大仙草”之首^[1]。目前铁皮石斛野生资源已趋枯竭, 而组培快繁技术已取得了突破并应用于规模化生产, 其中原球茎增殖与丛芽、愈伤组织增殖等途径相比具有更高的扩繁效率, 也可用于低温保存种质资源及倍性扩增等遗传学研究^[2]。但目前铁皮石斛组培生产上则反映原球茎培养过程中的增殖效率、品质往往偏低, 老化、甚至畸形等症状时有发生, 严重制约了组培体系的质量^[3]。徐雪荣等^[4]在铁皮石斛高效再生体系研究中发现, 原球茎增殖过程中具有较强的丛生效应, 较大的接种密度能促进原球茎增殖系数的提高, 蒙爱东等^[5]在铁皮石斛原球茎常温保存的研究中发现, 苗的分化率随着保存过程中继代周期的延长而下降。而关于不同浓度的 6-苄基腺嘌呤(6-BA)与萘乙酸(NAA)配合影响铁皮石斛原球茎增殖的研究, 也有若干报道^[6-7]。但尚缺乏针对铁皮石斛原球茎的接种方式、继代周期、外施激素种类与配比等的进一步研究。该试验以生产上流行的铁皮石斛 T4 种群的原球茎为试材, 采用增大接种团块直径和密度、选用与 6-BA 同为细胞分裂素类的激动素(KT)与 NAA 配合、控制继代周期等措施, 使原球茎的增殖效率及品质明显提高, 构建了铁皮石斛原球茎的高效增殖体系, 以期为其规模化生产提供急需的参考

数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以铁皮石斛 T4 种群(其野生种群采自于云南广南)组培瓶苗中发生的原球茎群为试材。

1.2 试验方法

1.2.1 原球茎团块大小试验 于超净工作台上, 将铁皮石斛 T4 种群的原球茎群切分成单个原球茎和直径分别为 0.3、0.6、0.9、1.2 cm 的团块, 单个原球茎为一般组培所采用, 然后分别接种于添加 NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基上, 每瓶 10 块(单个原球茎接种 10 个)(图 1), 比较不同的原球茎团块大小对其增殖的影响。

1.2.2 原球茎团块密度试验 将直径为 1.2 cm 的铁皮石斛 T4 种群原球茎团块接种于添加 NAA 0.1 mg/L+

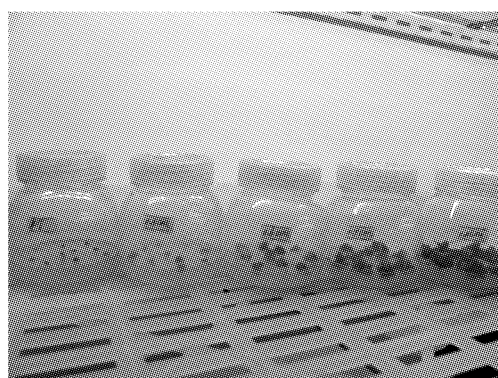


图 1 原球茎团块大小试验(接种后 0 d)

注: 从左至右依次接种单个原球茎及直径为 0.3、0.6、0.9、1.2 cm 的团块。

第一作者简介:黄作喜(1966-), 男, 四川安岳人, 硕士, 教授, 现主要从事植物资源教学与科研工作。E-mail: huangzx118@126.com.

基金项目:四川省教育厅重点资助项目(13ZA0007)。

收稿日期:2014-03-13

6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基上,每瓶分别接种 5、8、11、14 块(图 2),比较不同的原球茎团块密度对其增殖的影响。

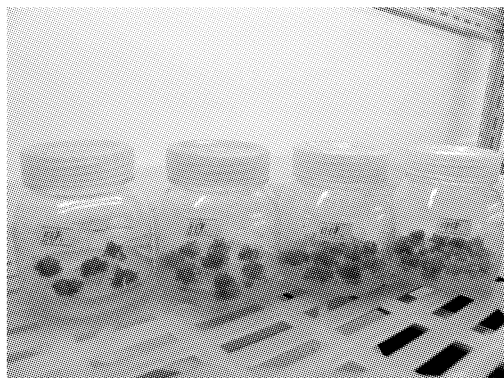


图 2 原球茎团块密度试验(接种后 0 d)

注:从左至右依次接种直径 1.2 cm 的团块 5、8、11、14 块。

1.2.3 KT、6-BA 与 NAA 配合处理 以添加 KT 1.0 mg/L 与 NAA 0.01、0.02、0.05、1.0 mg/L 分别配合, NAA 0.02 mg/L 与 KT 0.1、0.5、2.0 mg/L 分别配合,及 6-BA 1.0 mg/L 与 NAA 0.05、0.10、0.20 mg/L 分别配合, NAA 0.10 mg/L 与 6-BA 0.1、0.5、2.0 mg/L 分别配合的 MS 培养基进行原球茎增殖培养。每瓶接种直径为 1.2 cm 的原球茎 14 块,比较不同激素组合对铁皮石斛原球茎增殖的效果,筛选较合适的激素组合。

1.2.4 继代周期试验 继代周期是指继代接种时前一代培养物的培养时间。以继代周期为 30、50、70 d 时的铁皮石斛原球茎为试材,以添加 NAA 0.02 mg/L+KT 0.5 mg/L 的 MS 培养基为继代培养基,每瓶接种直径为 1.2 cm 的原球茎 14 块,比较继代周期对铁皮石斛原球茎增殖的影响。各试验的培养基 pH 值为 5.8、琼脂 0.7%、蔗糖 3%,以 260 mL 的广口塑料培养瓶为容器,每瓶盛装 50 mL 固体培养基,在白天 22~25℃、晚间 16~20℃和每天光照时间 13.5 h、光照强度 2 000 lx 条件下培养。各试验均于接种后 50 d 时统计,统计内容包括原球茎的终重(g)、增殖倍数、长势,增殖倍数为原球茎终重(收获鲜重)与初重(接种鲜重 g)的比值,长势为观察所得(以“+”表示),主要指原球茎的饱满和嫩绿程度。各试验均接种 12 瓶、重复 3 次,结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛原球茎团块大小对增殖的影响

从表 1 可以看出,接种的原球茎团块数相同(10 块/瓶)时,原球茎直径越大,增殖培养后的终重、增殖倍数越高,长势也越旺盛,原球茎直径为 1.2 cm 时的增殖倍数达 10.5、长势较其它直径的更好,而单个原球茎接种后的增殖倍数仅为 2.7 且长势较差(图 3)。

表 1 铁皮石斛原球茎团块大小对增殖的影响

原球茎团块直径/cm	初重/g	终重/g	增殖倍数	原球茎长势/+
单个	0.12	0.32	2.7	+
0.3	0.15	0.61	4.1	+
0.6	0.65	4.81	7.4	++
0.9	2.31	22.18	9.6	++
1.2	3.20	33.60	10.5	+++



图 3 原球茎团块大小对其增殖的影响(接种后 50 d)

注:从左至右的次序同图 1。

2.2 铁皮石斛原球茎团块接种密度对增殖的影响

由表 2 可知,当接种的原球茎直径均为 1.2 cm 时,接种密度越大,增殖培养后的终重越高、增殖倍数越大,长势越旺盛,每瓶接种 14 块原球茎时的增殖倍数达 10.8 且长势也较好(图 4)。

表 2 铁皮石斛原球茎团块接种密度对增殖的影响

原球茎团块接种密度/块	初重/g	终重/g	增殖倍数	原球茎长势/+
5	1.62	12.15	7.5	+
8	2.56	22.02	8.6	++
11	3.71	35.25	9.5	+++
14	4.50	48.60	10.8	+++



图 4 原球茎团块密度对其增殖的影响(接种后 50 d)

注:从左至右的次序同图 2。

2.3 KT、6-BA 与 NAA 配合处理对铁皮石斛原球茎增殖的影响

表 3 表明,6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时, NAA 浓度在 0.05~0.20 mg/L 范围内越高,其原球茎的增殖倍数越

高, NAA 浓度为 0.10 mg/L 时, 6-BA 浓度在 0.1~2.0 mg/L 范围内越高, 其原球茎的增殖倍数也越高, 但 NAA 达 0.20 mg/L、6-BA 达 2.0 mg/L 时的原球茎长势均变弱, 6-BA 1.0 mg/L 与 NAA 0.10 mg/L 配合时, 培养的原球茎增殖倍数较高且长势也较旺, 较多原球茎分化出叶原基(图 5)。KT 与 NAA 配合的各试验的原球茎增殖倍数, 均高于各浓度的 6-BA 与 NAA 配合的培养基, 其中 KT 0.5 mg/L 与 NAA 0.02 mg/L 配合时的原球茎增殖倍数、长势均优于其它处理(图 6)。

表 3 KT、6-BA 与 NAA 配合处理对铁皮石斛原球茎增殖的影响

激素组合/mg·L ⁻¹	初重/g	终重/g	增殖倍数	原球茎长势/+
KT 1.0+NAA 0.01	4.56	54.26	11.9	+++++
KT 1.0+NAA 0.02	4.60	64.10	13.9	+++++
KT 1.0+NAA 0.05	4.51	65.23	14.5	+++++
KT 1.0+NAA 0.10	4.41	65.82	14.9	++++
KT 0.1+NAA 0.02	4.68	46.86	10.0	+++++
KT 0.5+NAA 0.02	4.53	72.62	16.0	+++++
KT 2.0+NAA 0.02	4.43	65.14	14.7	++++
6-BA 1.0+NAA 0.05	4.55	28.67	6.3	+++
6-BA 1.0+NAA 0.10	4.64	46.02	9.9	++++
6-BA 1.0+NAA 0.20	4.63	48.15	10.4	++
6-BA 0.1+NAA 0.10	4.57	30.16	6.6	+++
6-BA 0.5+NAA 0.10	4.43	33.23	7.5	+++
6-BA 2.0+NAA 0.10	4.52	51.98	11.5	++



图 5 NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 配合培养的原球茎(接种后 50 d)

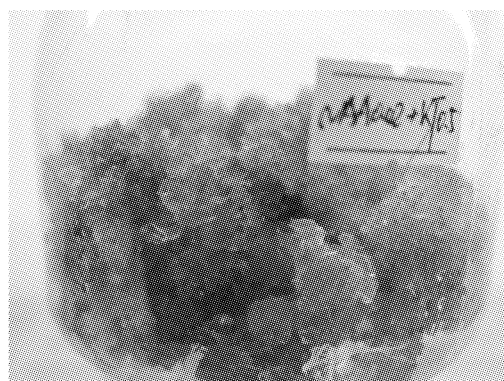


图 6 NAA 0.02 mg/L+KT 0.5 mg/L 配合培养的原球茎(接种后 50 d)

2.4 继代周期对铁皮石斛原球茎增殖的影响

表 4 表明, 继代周期为 70 d 时的原球茎, 经继代培养后的长势和增殖效率均明显低于 30、50 d 时的原球茎。观察还发现, 前者继代后的原球茎普遍分化出了叶原基、衰老现象明显(图 7~9)。

表 4 继代周期对铁皮石斛原球茎增殖的影响

继代周期/d	初重/g	终重/g	增殖倍数	原球茎长势/+
30	4.39	76.38	17.4	+++++
50	4.48	70.79	15.8	+++++
70	4.61	39.36	8.54	++

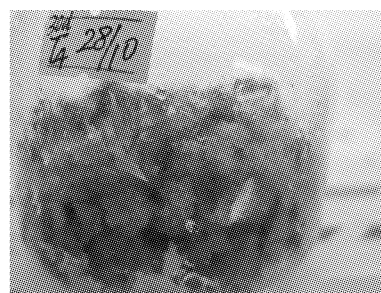


图 7 继代周期为 30 d 时培养的原球茎(接种后 50 d)

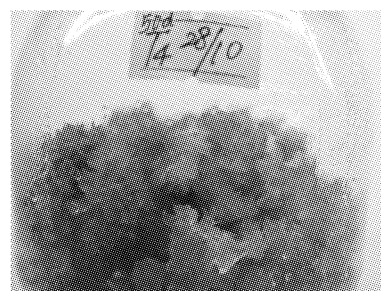


图 8 继代周期为 50 d 时培养的原球茎(接种后 50 d)



图 9 继代周期为 70 d 时培养的原球茎(接种后 50 d)

3 讨论

原球茎增殖是铁皮石斛组培扩繁的重要途径, 具有效率高、周期短的特点, 应用芽诱导培养基对其培养可获得大量整齐一致的丛芽。但在原球茎继代增殖阶段, 如何获得较高的增殖效率, 并使原球茎维持饱满嫩绿、具有持续的增殖能力, 尚需研究。

铁皮石斛是一种丛生植物, 在栽培上多株种植比单株种植长势更好, 也更易成活, 一般以 3~5 株为一丛种植^[8]。莫昭展等^[9]在铁皮石斛丛生芽增殖的研究中也

发现,接种单株时对丛生芽的发生不利,而接种 2 株以上时,丛生芽发生率达 100%,发生时间提早。该试验表明接种原球茎团块的直径越大、密度越高,则原球茎的增殖效果越好、长势越旺盛,表明在铁皮石斛原球茎的增殖过程中也具有明显的群体效应,适当增大接种团块直径和接种密度有利于提高其增殖效果,维持较高的增殖潜力。

该试验中,NAA 与 KT 配合时,铁皮石斛原球茎的增殖效果优于 NAA 与 6-BA 的配合,说明在铁皮石斛原球茎增殖培养中,细胞分裂素 KT 与 6-BA 相比可能具有更强的促进作用。但 NAA 和 KT 浓度分别提高至 0.10、2.0 mg/L 时,原球茎的长势开始变弱,说明二者的较低浓度组合有利于原球茎扩繁和保持其持续增殖的能力,经筛选认为 NAA 0.02 mg/L+KT 0.5 mg/L 为铁皮石斛 T4 原球茎增殖的较好激素组合。观察还发现,NAA 与 6-BA 配合培养 50 d 时,较多的原球茎分化出了叶原基,老化进程较快,而 NAA 与 KT 配合经相同时间培养后的原球茎饱满、嫩绿,品质更高。

由该试验可知,用于接种的原球茎的继代周期较短(30 d)时,经培养后的增殖效果好,但其前一代的生长时间较短,可用于继代接种的原球茎重量较低。继代周期

较长(70 d)时,可能由于营养和激素供应不足等原因,继代接种的原球茎本身已衰老,增殖效果因而很差。因此,控制适当的继代周期是保持铁皮石斛原球茎持续高效增殖的重要环节,该试验发现 T4 种群原球茎增殖培养的适宜继代周期是 50 d。

参考文献

- [1] 吴韵琴,斯金平.铁皮石斛产业现状及可持续发展的探讨[J].中国中药杂志,2010,35(15):2033-2037.
- [2] 张桂芳,关杰敏,黄松,等.铁皮石斛原球茎的诱导与增殖影响因素研究[J].中药材,2011,34(8):1172-1177.
- [3] 张铭,朱峰,魏小勇,等.铁皮石斛种胚萌发和原球茎质量控制[J].浙江大学学报(理学版),2000,27(1):92-94.
- [4] 徐雪荣,姚全胜,雷新涛,等.铁皮石斛高效再生体系研究与应用[J].热带农业科学,2009,29(10):40-44.
- [5] 蒙爱东,余丽莹,董青松,等.铁皮石斛原球茎常温保存研究[J].广西植物,2009,29(6):808-811.
- [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] 罗冠勇,代正福,宋希强,等.铁皮石斛的快速繁殖[J].热带农业工程,2010,34(3):9-11.
- [8] 黄作喜,林忠全,陶广松,等.影响铁皮石斛组培苗驯化的关键因素探析[J].中药材,2011,34(12):1829-1833.
- [9] 莫昭展,贝学军,覃贵毕,等.铁皮石斛丛生芽增殖研究[J].西北林学院学报,2008,23(6):104-106.

Establishment for a Highly Efficient Proliferation System of Protocorm of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

HUANG Zuo-xi¹, ZHANG Yang¹, YAN Xiao-yu¹, XIAO Xiao-jun¹, LI Qiang², WANG Zi-bing²

(1. Key Laboratory of Colleges and Universities for Research and Utilization of Distinctive Agricultural Undertakings, Neijiang Normal University, Neijiang, Sichuan 641112; 2. Sichuan Xiantuo Bio-technology Co. Ltd., Neijiang, Sichuan 641110)

Abstract: Taking the protocorm of T4 population as trial material, the effect of mass diameter, inoculation density of protocorm, hormone combinations, subculture cycle on proliferation and growth of protocorm were researched for establishing a highly efficient proliferation system of protocorm of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. The results showed that the high community effect could be observed during protocorm proliferation culture, so the appropriate increase of mass diameter and inoculation density of protocorm was of benefit to protocorm proliferation. Experiment was done with different concentration combinations of KT added with NAA or 6-BA added with NAA, which showed that NAA 0.02 mg/L+KT 0.5 mg/L was the best hormone combinations for the proliferation and growth of protocorm. 50 d was the suitable subculture cycle for protocorm proliferation culture of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; protocorm; proliferation system