

# 天然添加物对铁皮石斛类原球茎增殖、分化及生根的影响

方中明<sup>1,2</sup>, 白根祥<sup>1</sup>, 曾祺森<sup>1</sup>, 邹敏<sup>1</sup>, 曾宋君<sup>3</sup>

(1. 武汉生物工程学院 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430415; 2. 华中农业大学 生命科学技术学院, 湖北 武汉 430070; 3. 中国科学院 华南植物园, 广东 广州 510650)

**摘要:**以云南软脚铁皮石斛为试材,研究了不同天然添加物对其类原球茎增殖、分化及小苗生根的影响。结果表明:高浓度的香蕉汁抑制类原球茎的增殖,而高浓度的马铃薯汁促进类原球茎的增殖,铁皮石斛类原球茎增殖最适培养基为 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 8 g/L+活性炭 2 g/L+马铃薯汁 200 g/L,接种 60 d 后类原球茎增殖倍数为 6.8,继续培养 30 d 分化率达 97%。培养基中添加香蕉汁、马铃薯汁均有利于铁皮石斛小苗生根,最适生根的天然添加物为马铃薯汁 100 g/L。

**关键词:**铁皮石斛;组培;天然添加物

**中图分类号:**S 682.310.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0107-04

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)属兰科(Ochidaceae)石斛属(*Dendrobium*)多年生附生草本植物。其种子极小、无胚乳,在自然条件下,需与某些共生菌共生才能萌发,故很难生产足够的实生苗用于栽培;而传统的分株、扦插等方式的繁殖率极低,加上人为的过度采挖和生境破坏,其资源已濒临灭绝,被国家列为重点保护的药用植物之一<sup>[1]</sup>。从 20 世纪 80 年代开始,国内开始对铁皮石斛进行无性快速繁殖技术的开发,对影响其种子萌发、类原球茎生长及壮苗因素等进行了研究<sup>[2]</sup>。目前,铁皮石斛的养生功效越来越受到消费者的认可,市场需求日益增大<sup>[3]</sup>,铁皮石斛的组织培养虽已是一项较为成熟的繁殖技术,但组织培养中还存在类原球茎或小苗褐化、分化率低,周期长、栽培成活率低等限制大规模培养的问题<sup>[4-5]</sup>。因此,选取铁皮石斛优质品种,降低组培苗生产成本、提高组培苗生产效率是急需解决的关键问题。

类原球茎是兰花种子萌发过程中缩短的、呈颗粒状的、有胚性细胞组成且类似嫩茎的器官。铁皮石斛组织培养的外植体多用类原球茎,也可以使用组培幼苗、茎尖、根尖等材料<sup>[6-7]</sup>。采用类原球茎作材料,可有效的缩

短育苗周期。类原球茎所用的培养基因铁皮石斛阶段品种不同差异较大。1/2MS 和 MS 等基本培养基较适合类原球茎增殖<sup>[8-9]</sup>。NAA 和 BA 配合使用有利于铁皮石斛类原球茎增殖<sup>[10-11]</sup>。香蕉泥、苹果汁、马铃薯汁等天然添加物对铁皮石斛类原球茎增殖有重要影响,有研究表明天然添加物中含有氨基酸、植物生长调节物质、酶等有机复杂成分,对细胞的增殖有明显促进作用<sup>[12-14]</sup>。

云南软脚铁皮石斛茎大且柔软、味甘、富含多糖,比硬脚铁皮石斛价值高,适宜加工成枫斗。现以云南软脚铁皮石斛为试验材料,系统研究了不同的天然添加物对类原球茎增殖及生根的影响,通过探究铁皮石斛增殖与生根的关键因素,优化和完善云南软脚铁皮石斛快繁体系,以期为其高效快速繁殖和大规模生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

云南软脚铁皮石斛来源于武汉生物工程学院细胞工程实验室。选取生长状况良好、无分化、色泽鲜绿的类原球茎为试材。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配制 类原球茎增殖、分化的基本培养基为 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 8 g/L+活性炭 2 g/L(pH 5.8),各培养基在此基础上添加成分为 CK1(基本培养基,未加活性炭)、CK2(基本培养基,加活性炭)、香蕉汁、马铃薯汁、苹果汁,浓度梯度依次为 0、50、100、200 g/L。小苗生根的基本培养基为 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖

**第一作者简介:**方中明(1984-),男,博士,讲师,研究方向为植物生物技术。E-mail:zmfang@mail.hzau.edu.cn.

**责任作者:**曾宋君(1965-),男,博士,研究员,研究方向为植物生物技术。E-mail:zengsongjun@scib.ac.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31301250);湖北省教育厅科学技术研究资助项目(B2015394)。

**收稿日期:**2015-07-23

30 g/L+琼脂 8 g/L+活性炭 2 g/L,各培养基在此基础上添加成分为 CK(基本培养基)、香蕉汁、马铃薯汁、苹果汁,浓度梯度依次为 0、50、100、200 g/L。

1.2.2 样品处置 每种培养基接 30 瓶,每瓶接种 5 株类原球茎或小苗,重复 3 次。类原球茎增殖培养 60 d 后测定增殖倍数、鲜重,继续培养 30 d 后,统计分化率、生长状况。小苗生根培养 60 d 后测定根数和根长。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 软件进行变量分析(ANOVA),采用Duncan's在 0.05 水平上进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同天然添加物对类原球茎增殖的影响

由表 1 可以看出,添加香蕉汁 50 g/L,类原球茎有一定增殖,增殖紧密,颜色为黄绿色。香蕉汁 100 g/L 对类原球茎增殖效果最好,平均鲜重 0.510 g,增殖倍数为 5.3,同时增殖致密紧凑,颜色为黄绿色。当添加 200 g/L 香蕉汁时,会对铁皮石斛类原球茎增殖起抑制的作用,增殖效果不如 CK2。添加马铃薯汁 50 g/L 与 100 g/L,类原球茎增殖效果较好,增殖紧密,颜色为黄绿色。添加马铃薯汁 200 g/L 有利于类原球茎增殖,与其它培养基有显著差异,平均鲜重 0.659 g,增殖倍数 6.8,增殖致密却比较松散,颜色为绿色。添加苹果汁对铁皮石斛类原球茎的增殖效果较差,只有较低的增殖效果。不同的天然添加物对铁皮石斛类原球茎生长的影响有明显的差异,添加马铃薯汁 200 g/L,类原球茎增殖效果最好,添加香蕉汁 200 g/L 时,会对铁皮石斛类原球茎增殖起到抑制的作用。

表 1 天然添加物对铁皮石斛类原球茎增殖的影响

培养基/(g·L <sup>-1</sup> )	鲜重/g	增殖倍数
CK1	0.186±0.044e	1.100±0.675g
CK2	0.237±0.046d	3.000±0.667ef
香蕉汁 50	0.358±0.129c	3.500±1.581def
香蕉汁 100	0.510±0.182b	5.300±1.947b
香蕉汁 200	0.294±0.096cd	2.300±0.823fg
马铃薯汁 50	0.514±0.167b	5.400±1.956bc
马铃薯汁 100	0.571±0.151b	5.500±1.509bc
马铃薯汁 200	0.659±0.078a	6.800±1.229a
苹果汁 50	0.328±0.088cd	3.900±1.287de
苹果汁 100	0.359±0.059c	4.600±0.966cd
苹果汁 200	0.334±0.093cd	3.600±1.506def

注:±表示标准差,不同小写字母表示差异显著,下同。

### 2.2 不同天然添加物对类原球茎分化的影响

由表 2 可知,添加香蕉汁对铁皮石斛类原球茎的分化有促进作用,添加香蕉汁 50 g/L 分化的芽黄色面积较多。香蕉汁 100 g/L 对类原球茎的分化效果较好,达到 92%。香蕉汁 200 g/L 分化出的芽最鲜绿。添加一定量的马铃薯汁对铁皮石斛类原球茎分化起到促进作用,马铃薯汁 50 g/L 下,类原球茎分化程度较低,马铃薯汁 100 g/L 下,类原球茎分化程度一般,颜色为绿色,添加马铃薯汁 200 g/L 的培养基中类原球茎分化程度最高,

达到 97%,但出现少量黄色的芽。添加高浓度的苹果汁会对类原球茎的分化起到促进效果,苹果汁 50 g/L 下,类原球茎基本没出现分化,苹果汁 100 g/L 下,类原球茎分化程度低,颜色多为黄色,苹果汁 200 g/L 下,类原球茎分化程度较高,达到 83%,出现了少量黄色的芽。

在适宜的激素配比培养基中,添加香蕉汁、高浓度的马铃薯汁和苹果汁的类原球茎分化程度均高于不加天然添加物的培养基,而添加苹果汁 50 g/L 和 100 g/L、马铃薯汁 50 g/L 的培养基,其分化程度均低于不加任何天然添加物的培养基,可见香蕉汁、高浓度的马铃薯汁和苹果汁能有效促进铁皮石斛类原球茎分化,但低浓度的马铃薯汁和苹果汁对类原球茎的分化无明显作用。

表 2 天然添加物对铁皮石斛类原球茎分化的影响

培养基/(g·L <sup>-1</sup> )	分化率/%	生长状况
CK1	73	松散,黄白色
CK2	23	松散,黄白色
香蕉汁 50	90	紧密,黄绿色
香蕉汁 100	92	紧密,绿色
香蕉汁 200	86	松散,绿色
马铃薯汁 50	62	紧密,绿色
马铃薯汁 100	83	紧密,绿色
马铃薯汁 200	97	松散,绿色
苹果汁 50	8	紧密,黄绿色
苹果汁 100	59	紧密,黄绿色
苹果汁 200	83	紧密,黄绿色

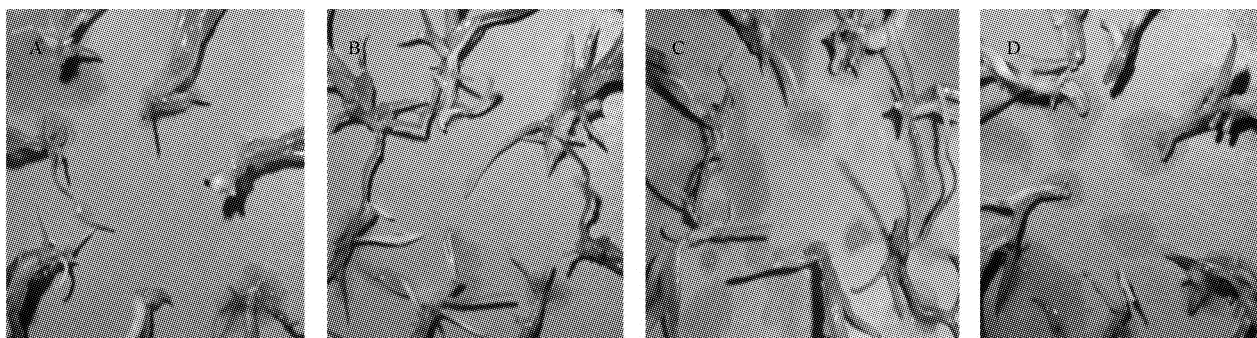
### 2.3 不同天然添加物对铁皮石斛丛生芽生根的影响

由表 3、图 1 可知,添加 200 g/L 香蕉汁、100 g/L 马铃薯汁的培养基对铁皮石斛生根有明显的促进作用,根数与对照相比达到了显著水平,而苹果汁对铁皮石斛生根促进作用较小。添加马铃薯汁的培养基对铁皮石斛最长根的长度有显著提高。每苗根数和最长根长随香蕉汁浓度的增加而增加,香蕉汁 200 g/L 较为有效的促进了生根。当马铃薯汁浓度为 100 g/L 时,有助于铁皮石斛的生根,平均每苗根数为 3.57 条,最长根长度达 1.09 cm,均与对照相比达到了显著水平。而当马铃薯汁浓度为 50、200 g/L 时,对根数和根长生长均无较大作用。单独添加苹果汁不利于云南软脚铁皮石斛的生根,与对照相比均无显著性差异。云南软脚铁皮石斛最佳生根效果的天然添加物为马铃薯汁 100 g/L。

表 3 不同天然添加物对铁皮石斛丛生芽生根的影响

培养基浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	平均每苗根数	每苗最长根长度/cm
CK	2.24±1.30b	0.62±0.48b
香蕉汁 50	2.35±1.2b	0.66±0.44b
香蕉汁 100	2.68±0.73b	0.72±0.38b
香蕉汁 200	3.45±1.79a	0.94±0.63a
马铃薯汁 50	2.30±1.06b	0.77±0.62ab
马铃薯汁 100	3.57±2.04a	1.09±0.71a
马铃薯汁 200	2.44±1.65b	0.76±0.53ab
苹果汁 50	2.25±1.92b	0.42±0.36c
苹果汁 100	2.65±1.32b	0.62±0.27b
苹果汁 200	2.91±1.11b	0.77±0.25ab





注:A. CK;B. 香蕉汁 100 g/L(生根状况良好);C. 马铃薯汁 100 g/L(生根状况良好);D. 苹果汁 100 g/L(生根状况较差)。

图1 不同有机添加物对丛生芽生根的影响

### 3 讨论与结论

椰子汁、香蕉和马铃薯等是一类含有氨基酸、激素和酶等有机物且成分较为复杂的天然复合物,促进或抑制植物生长<sup>[15]</sup>。该研究以云南软脚铁皮石斛种子诱发的类原球茎作为试验材料,通过添加不同浓度与种类天然添加物,对铁皮石斛类原球茎的增殖、分化,小苗生根展开研究。结果表明,添加 200 g/L 马铃薯汁对铁皮石斛类原球茎的增殖起到明显的促进作用,致密却比较松散,颜色为深绿。谢启鑫等<sup>[16]</sup>研究用浓度 20% 马铃薯提取液能够得到形态好、变异少的铁皮石斛类原球茎,同样马铃薯汁有利于云南软脚铁皮石斛类原球茎的增殖。刘炜嫒等<sup>[14]</sup>研究表明,5%~10% 的香蕉添加物可以使类原球茎大而健壮,颜色浓绿,分化程度较低,且紧密程度较好,适宜类原球茎增殖,而该研究中添加 100 g/L 的香蕉汁对类原球茎增殖效果较好,同时增殖致密紧凑,颜色为黄绿色。添加不同浓度的苹果汁对铁皮石斛类原球茎的增殖效果差异并不大,这与杨柳平等<sup>[17]</sup>添加苹果汁 200 g/L 对铁皮石斛类原球茎的增殖有较好效果的结论不同,可能与铁皮石斛品种不同有关。

加入天然添加物可以对铁皮石斛类原球茎分化起到促进作用,如添加香蕉汁能有效的促进铁皮石斛类原球茎的分化,这与杨柳平等<sup>[17]</sup>研究表明添加香蕉汁会起到的抑制作用不同,可能是与香蕉的种类或成熟度不同有关。而该研究中添加 200 g/L 马铃薯汁培养基中铁皮石斛类原球茎分化程度最高,这与杨柳平等<sup>[17]</sup>的试验结论一致。另外,有试验表明马铃薯汁对番木瓜芽分化及健壮生长有较大作用<sup>[18]</sup>。

铁皮石斛存在移栽成活率低等问题。其中,生根壮苗是组培苗移栽成活的关键因素,因此在组织培养过程中提高组培苗生根率尤为重要。添加香蕉汁 10% 有利于兰科植物的生根<sup>[19]</sup>,何俊平等<sup>[20]</sup>也表明添加香蕉汁有利于铁皮石斛的生根。课题组通过研究影响云南软脚石斛苗生根的天然添加物香蕉汁、马铃薯汁、苹果汁发现,香蕉汁和马铃薯汁均有利于铁皮石斛生根,但对于云南软脚铁皮石斛生根效果最好的为马铃薯汁浓度 100 g/L,培养 60 d 平均每苗根数为 3.57 条。

### 参考文献

- [1] 张启香,方炎明. 铁皮石斛组织培养及试管苗营养器官和原球茎的结果观察[J]. 西北植物学报,2005,25(9):1761-1765.
- [2] 段俊,段毅平. 铁皮石斛高效栽培技术[M]. 福州:福建科学技术出版社,2013.
- [3] 徐红,王峰涛,丁家宜,等. 药用石斛生物技术研究概况[J]. 中国野生植物资源,2000(1):1-4.
- [4] 邵华,张玲琪,李俊梅,等. 铁皮石斛研究进展[J]. 云南植物研究,1982,4(2):211-212.
- [5] 张玲,张志国. 铁皮石斛种子试管苗适宜培养基研究[J]. 浙江医学,1997,29(3):4-6.
- [6] 刘青林,马祎,郑玉梅. 观赏花卉组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [7] 熊丽,吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [8] 罗吉凤,程治英,龙春林. 铁皮石斛快速繁殖和离体种质保存研究[J]. 广西植物,2006,26(1):69-73.
- [9] 陈兆贵,谭俊. 不同激素配比对铁皮石斛组织培养的影响研究[J]. 惠州学院学报(自然科学版),2006,26(3):11-14.
- [10] 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(自然科学版),2005,26(3):66-69.
- [11] 莫昭展,贝学军. 铁皮石斛原球茎增殖条件的研究[J]. 福建林业科技,2007,34(4):55-58.
- [12] 刘骅,张治国. 铁皮石斛试管苗壮苗培养基的研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(11):654-655.
- [13] 刘晓燕,向青云,刘玲玲,等. 基本培养基及附加物对蝴蝶兰原球茎增殖效果的影响[J]. 种子,2005,24(6):18-26.
- [14] 刘炜嫒,赖钟雄. 香蕉泥对铁皮石斛组织培养和快速增殖的影响[M]. 北京:中国科学技术出版社,2011.
- [15] 何松林,孔德政,杨秋生. 碳源和有机添加物对文心兰原球茎增殖的影响[J]. 河南农业大学学报,2003,37(2):154-157.
- [16] 谢启鑫,宋小明,黄东华,等. 铁皮石斛的种子培养[J]. 北方园艺,2010(8):90-91.
- [17] 杨柳平,刘畅庆,赵仁发,等. 铁皮石斛种子诱导原球茎组培快繁体系的研究[J]. 广东农业科学,2012(7):54.
- [18] 黄东梅,李艳霞,林妃,等. 天然复合物的添加对番木瓜芽分化的影响[J]. 基因组学与应用生物学,2014,33(6):1336-1340.
- [19] FANG Z M, HUANG W T, ZENG S J, et al. *In vitro* propagation of *Cymbidium nanutum* Y. S. Wu et S. C. Chen[J]. Propagation of Ornamental Plants, 2011, 11(3):149-155.
- [20] 何俊平,涂小云. 不同培养基配方对铁皮石斛生根培养的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):57-59.

DOI:10.11937/bfyy.201521029

# 百合病毒检测芯片的杂交条件优化

贾 慧<sup>1</sup>, 郑 洁<sup>1</sup>, 曹志艳<sup>1</sup>, 王进忠<sup>2</sup>, 董金皋<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071000; 2. 北京农学院, 北京 102206)

**摘 要:**分别以感染百合无症病毒、黄瓜花叶病毒和百合斑驳病毒的百合及感染烟草花叶病毒和马铃薯病毒 Y 的烟草为试材, 根据 5 种植物病毒外壳蛋白基因保守序列设计引物和寡核苷酸探针, 并制备基因芯片。用 Trizol 试剂盒提取感染病毒的植物总 RNA, 荧光 RT-PCR 产物与芯片杂交, 研究 PCR 产物是否进行变性处理、杂交时间、杂交温度、杂交液组分 SSC 和 SDS 浓度及 PCR 体系中非荧光引物和荧光引物比例对芯片杂交的影响。结果表明: 杂交适宜条件为  $6\times$  SSC、0.2% SDS 的杂交液、42℃ 杂交 60 min, PCR 体系中非荧光与荧光引物比例为 1:10, PCR 产物要进行变性处理。经过整体条件优化后的基因芯片在杂交检测上具有较高的特异性, 适于检测百合病毒病。

**关键词:**百合病毒; 基因芯片; 杂交条件; 优化

**中图分类号:**S 436.8<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0110-06

近年来, 百合作为切花和盆栽花卉跃升为国际进出口贸易中前 10 位, 有大约 294 个属 4 500 多种。同时, 病毒病是危害百合生产的最主要的问题。据报道, 我国

**第一作者简介:**贾慧(1977-), 女, 河北沽源人, 硕士, 讲师, 现主要从事植物分子病理学等研究工作。E-mail: hui\_jiahui@126.com.

**责任作者:**董金皋(1963-), 男, 河北平乡人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事植物真菌毒素研究及植物分子病理学等研究工作。

**基金项目:**北京市自然科学基金资助项目(5043026)。

**收稿日期:**2015-05-19

百合种植业受到至少 10 种以上的病毒病危害<sup>[1-2]</sup>, 其中最为严重的为百合无症病毒(Lily symptomless virus, LSV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)和百合斑驳病毒(Lily mottle virus, LMoV)<sup>[3-5]</sup>。生产上, 百合病毒病的防控除了科学、合理的肥水等栽培管理和种植脱毒种球外, 简单、灵敏、快速的病毒检测体系往往成为防御发生、流行的先决条件<sup>[6-7]</sup>, 目前, 分子检测技术将病毒检测灵敏度由血清学的 ng 水平提高到了 pg 级<sup>[8]</sup>。基因芯片技术, 作为一个综合性的高新技术平台, 以其高通量、高灵敏度的优势, 为植物病毒病的诊断、病原鉴

## Effect of Natural Additives on Protocorm Proliferation, Differentiation and Rooting of *Dendrobium officinale*

FANG Zhongming<sup>1,2</sup>, BAI Genxiang<sup>1</sup>, ZENG Qisen<sup>1</sup>, ZOU Min<sup>1</sup>, ZENG Songjun<sup>3</sup>

(1. School of Life Science and Technology, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415; 2. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650)

**Abstract:** Taking Yunnan Ruanjiao *D. officinale* as materials, the effect of natural additives on protocorms proliferation, differentiation and rooting were studied. The results showed that high concentrations of banana juice could inhibit the proliferation of protocorm of *D. officinale* but banana juice was favorable to proliferation. The best protocorm proliferation medium of *D. officinale* was MS+6-BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L+sucrose 20 g/L+agar 8 g/L+activated carbon 2 g/L+potato juice 200 g/L, with multiplication rate 6.8 after 60 days, and differentiation rate reached to 97% after 30 days. When adding banana, or potato juice in MS, it had an obvious effect on rooting. The optimal natural additives for rooting was potato juice 100 g/L.

**Keywords:** *Dendrobium officinale*; tissue culture; natural additives