

DOI:10.11937/bfyy.201619031

杜鹃兰原球茎增殖培养条件

吴彦秋, 吕 享, 李小兰, 高晓峰, 刘剑东, 张明生

(贵州大学 生命科学学院, 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘 要:以杜鹃兰种子萌发的原球茎为试材, 研究不同培养基、不同植物生长调节物质(6-BA、NAA 和 IBA)、活性炭、温度及光照强度对杜鹃兰原球茎增殖的影响。结果表明:1/2MS 培养基为适于原球茎增殖的基本培养基;添加一定浓度的 6-BA、NAA 和 IBA 均有利于原球茎的增殖, IBA 的浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 原球茎增殖率较高, 40 d 可达 170.07%;适量添加活性炭对原球茎增殖有促进作用;温度及光照强度的控制对原球茎增殖是必需的。杜鹃兰原球茎增殖的适宜培养条件为 1/2 MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭, 温度为 15°C , 光照强度为 2 000 lx。

关键词:杜鹃兰;原球茎;增殖培养

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)19-0124-05

杜鹃兰(*Cremastra appendiculata* (D. Don.) Maki-no)属兰科(Orchidaceae)杜鹃兰属(*Cremastra*)多年生珍稀药用植物,内用具有抗肝癌、乳腺癌、子宫癌等功效,外用可治疮毒、蛇虫咬伤、皮肤烫伤或烧伤等^[1]。由于

第一作者简介:吴彦秋(1992-),女,硕士,研究方向为植物生物技术与次生物质代谢。E-mail:737080538@qq.com。

责任作者:张明生(1963-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事植物生理生化与生物技术等研究工作。E-mail:mszhang@guz.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360613);贵州省高层次人才创新创业人才培养计划资助项目(黔科合人才[2015]4031号);贵州大学研究生创新基金资助项目(研农 2016004)。

收稿日期:2016-07-21

人们长期过度采挖,导致野生资源严重枯竭^[2]。杜鹃兰种子在自然条件下几乎不能萌发,假鳞茎是其主要的繁殖器官,但因其繁殖系数低而无法实现规模化生产。利用组培快繁技术,有望解决杜鹃兰繁殖系数极低的问题,而原球茎增殖是该技术成功的关键环节。目前,虽有少数学者在杜鹃兰组织培养方面做了一些工作^[3-8],但仍未解决原球茎增殖周期长、增殖速率低等问题。现以人工授粉获得的杜鹃兰种子萌发的原球茎为试材,系统研究原球茎增殖的适宜培养基及培养条件,以期对杜鹃兰人工种植所需种苗的规模化繁育奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的杜鹃兰采自贵州省黔东南州境内,盆栽后

Establishment of Plant Regeneration System for Four *Chrysanthemum morifolium*

LI Jintong¹, WU Yan¹, DING Bing¹, QI Xuejun², ZHANG Yang¹, XIE Linan¹

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Liaoning Institute of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: This experiment was conducted to construct a high efficient and stable regeneration system by adding different concentration of 6-BA and NAA to the basic MS medium with the leaf explant of four kinds of *Chrysanthemum morifolium*, including 'Donglinruixue', 'Duomumanao', 'Huangjinzhan' and 'Jinbuhuan'. The results showed that the optimum concentration combination of NAA and 6-BA for 'Donlinruixue' was MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA; for 'Duomumanao' was MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; 'Huangjinzhan' was MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; 'Jinbuhuan' was MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; and the rooting medium of all the four kinds of *Chrysanthemum morifolium* was 1/2 MS medium.

Keywords: *Chrysanthemum morifolium*; regeneration system; 6-BA; NAA

通过人工授粉获得种子,将种子经培养基无菌萌发得到原球茎,为供试材料。

1.2 试验方法

1.2.1 原球茎增殖培养基筛选 选择 MS、1/2 MS、VW、KC 4 种培养基^[9-10],均附加 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和活性炭 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,以筛选适于原球茎增殖的基本培养基;以 1/2 MS+活性炭 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为基本培养基,以不同浓度的 6-BA($0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、NAA($0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、IBA($0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)设置单因素试验;以 1/2 MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 为基本培养基,以不同浓度的活性炭($0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)设置单因素试验,最终获得原球茎增殖的适宜培养基。上述培养基中均添加蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和琼脂 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 5.8~6.0,培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度 2000 lx ,光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。将原球茎接种于以上培养基中,每个处理接种 3 瓶,每瓶接种 5 个原球茎,重复 3 次,每隔 10 d 观察记录 1 次原球茎的生长情况,接种 40 d 后统计其增殖结果。增殖率(%)=(培养后原球茎数目-接种原球茎数目)/接种原球茎数目 $\times 100$ 。

1.2.2 培养条件的筛选 温度和光照强度对杜鹃兰的生长发育影响较大^[11-13]。以 1/2 MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭+ $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂为试验培养基,pH 5.8~6.0,光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。设置不同温度梯度($15, 25, 30^\circ\text{C}$)和光照强度($500, 1000, 2000, 3000, 4000 \text{ lx}$),每处理接种

3 瓶,每瓶接种 5 个原球茎,重复 3 次,每隔 10 d 观察记录 1 次原球茎的生长情况,培养 40 d 后统计其增殖结果。

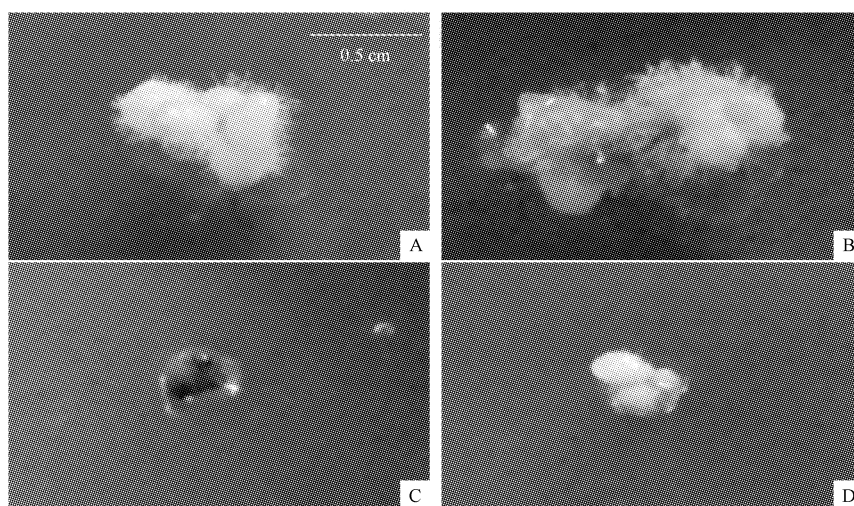
1.3 数据分析

运用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 软件对试验结果进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 培养基组分对原球茎增殖的影响

不同类型基本培养基对杜鹃兰原球茎增殖及生长情况有显著影响。由图 1、2 可知,接种于 1/2 MS 培养基的原球茎增殖速度快,长势较好,原球茎呈绿色(图 1 B),增殖率达 120.00%;接种于 MS 培养基的原球茎增殖速度及长势稍次于 1/2 MS,原球茎呈淡绿色(图 1 A),少数出现褐化现象,增殖率达 95.45%;接种于 VW 和 KC 培养基的材料部分呈白色,出现水渍状或褐化,少数死亡(图 1 C、D)。杜鹃兰原球茎接种 10 d 后,1/2 MS 培养基中的原球茎颜色由白色转为浅绿色,接种 20 d 后,原球茎明显增大,30 d 后有少数原球茎开始增殖,颜色呈黄绿色,40 d 时培养基中的原球茎多数已形成丛生型原球茎,颜色转为绿色。上述结果可能是由于 MS 培养基成分种类丰富,无机盐浓度高^[14];VW 和 KC 培养基只含有大量矿质元素,缺少有机元素和微量元素,无法满足原球茎正常生长的需要;1/2 MS 较 MS 培养基无机盐浓度低。由此可知,杜鹃兰原球茎生长增殖需要适量的无机盐、种类丰富的微量元素和有机元素,故接种于 1/2 MS 培养基中的原球茎增殖率及长势显著高于其它处理。



注:A. MS;B. 1/2 MS;C. VW;D. KC。

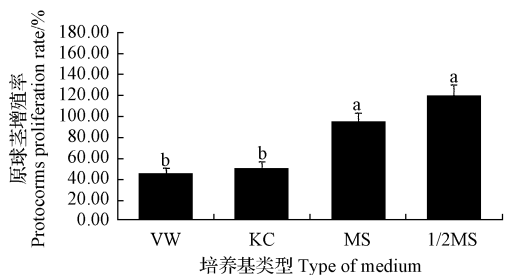
图 1 培养基组分对原球茎长势的影响

Fig. 1 Effect of media on protocorms growth situation

2.2 植物生长调节物质对原球茎增殖的影响

不同种类及浓度的植物生长调节物质对杜鹃兰原

球茎增殖均有不同程度的促进作用。由表 1 中 6-BA 的作用效果可知,当 6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,形成的



注:图中不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图2 培养基组分对原球茎增殖的影响

Fig. 2 Effect of media on protocorms proliferation

表1

6-BA 对原球茎增殖的影响

Table 1

Effect of 6-BA on protocorms proliferation

处理 Treatment	6-BA /(mg·L ⁻¹)	增殖率 Proliferation rate/%	原球茎生长情况 Protocorms growth situation
1	0	81.09±20.01ab	+, 白色
2	0.5	101.94±25.12ab	++, 浅绿
3	1.0	142.22±35.05a	+++, 绿色
4	1.5	71.88±17.71b	++, 浅绿
5	2.0	43.13±16.63b	+, 褐色

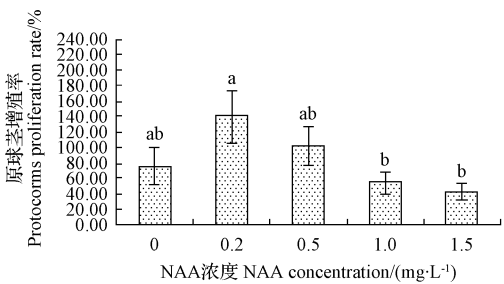
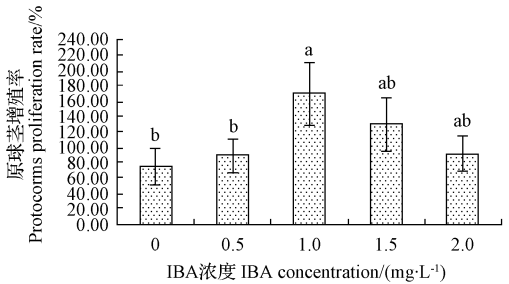


图3 NAA 和 IBA 对原球茎增殖的影响

Fig. 3 Effect of NAA and IBA on protocorms proliferation

2.3 活性炭对原球茎增殖的影响

适量的活性炭对杜鹃兰原球茎增殖有益(表2)。活性炭浓度为 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,原球茎的增殖效果相对较好,呈绿色,在原球茎表面长有许多白色毛状物,适合继代增殖培养,增殖率达 151.17% ,与其它处理组相比差异显著;活性炭浓度为 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,原球茎增殖相对较快,但不及 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性炭;活性炭浓度增加到 $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,原球茎增殖生长较差,大部分原球茎呈白

色;在不添加活性炭的处理中,增殖缓慢,原球茎褐化率高,易分化。活性炭作为培养基中的吸附剂,既可以吸附原球茎生长过程中释放的酚类化合物,抑制褐变的发生,有利于原球茎的生长,也可吸附培养基中的生长调节物质,阻滞原球茎不能摄入过多的生长素类物质而使其缓慢、健壮生长。因此,适宜浓度的活性炭既能提高原球茎的增殖,也能大大降低原球茎的褐化死亡率。

表2

活性炭对原球茎增殖的影响

Table 2

Effect of active carbon on protocorms proliferation

处理 Treatment	活性炭 AC/(g·L ⁻¹)	增殖率 Proliferation rate/%	原球茎生长情况 Protocorms growth situation
1	0	85.53±16.79b	+, 浅绿
2	0.2	102.67±20.50ab	++, 黄绿
3	0.5	151.17±30.04a	+++, 绿色
4	1.0	95.49±18.37ab	+, 白色
5	1.5	69.42±13.79b	+, 白色

2.4 光照强度和温度对原球茎增殖的影响

一定的光照强度对杜鹃兰原球茎的增殖有促进作用(表3)。当光照强度为3 000 lx时,原球茎的增殖率明显高于其它处理组,为162.54%,原球茎呈绿色且表面长有许多白色毛状物,但部分原球茎开始分化;光照强度为2 000 lx时,增殖率仅次于3 000 lx处理,原球茎呈

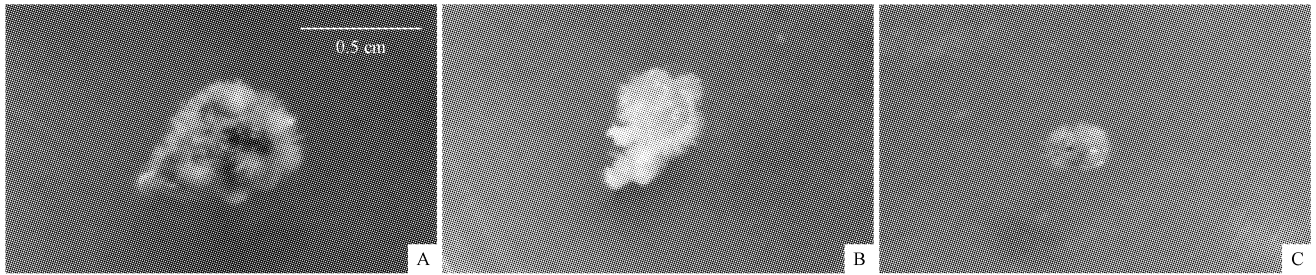
黄绿色且未分化;光照强度为1 000 lx时,原球茎增殖率也相对较高,但不如2 000、3 000 lx处理;光照强度为4 000 lx和500 lx时,原球茎增殖率显著下降,部分原球茎褐化,说明过强或过弱的光照均不利于原球茎增殖^[13]。

表3 光照强度对原球茎增殖的影响
Table 3 Effect of light intensity on protocorms proliferation

处理 Treatment	光照强度 Light intensity/lx	增殖率 Proliferation rate/%	原球茎生长情况 Protocorms growth situation
1	500	61.09±12.75 b	+, 褐白
2	1 000	109.84±23.01 ab	+, 浅绿
3	2 000	141.18±29.89 ab	++, 黄绿
4	3 000	162.54±33.81 a	+++, 绿色
5	4 000	82.67±17.52 b	++, 褐色

温度对原球茎增殖也有显著影响(图4、5)。15℃下,原球茎长势旺,呈绿色,无褐化现象(图4A),增殖率显著高于其它处理组,可达177.11%。随着温度的升

高,原球茎增殖率显著下降,温度达30℃时,原球茎褐化现象严重,长势差,甚至出现死亡,这正好体现了杜鹃兰适于低温生境的生物学特性。



注:A. 15℃;B. 25℃;C. 30℃。

图4 温度对原球茎长势的影响

Fig. 4 Effect of temperature on protocorms growth situation

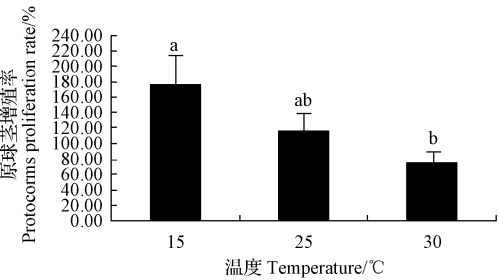


图5 温度对原球茎增殖的影响

Fig. 5 Effect of temperature on protocorms proliferation

3 讨论

杜鹃兰自然繁殖系数低,采用组培快繁技术是获得大量优良种苗的途径之一^[15-17]。目前关于杜鹃兰组培快繁的研究表明,原球茎增殖是杜鹃兰快速增殖的关键^[3-4],而影响杜鹃兰原球茎增殖的因素有很多,其中植物生长调节物质的种类、浓度及其比例是最关键的因素之一^[18]。廖婷婷等^[19]发现NAA对山慈菇组织芽块的增殖优于IAA,NAA 0.075 mg·L⁻¹时,45 d原球茎的

增殖率为48.93%。该试验发现,IBA对杜鹃兰原球茎的增殖效果明显好于NAA,在IBA 1.0 mg·L⁻¹时,40 d原球茎增殖率可达170.07%,与廖婷婷等^[19]的研究结果不同,可能与选择的试验方法不同有关。由于不同植物生长调节物质并不是孤立的发挥作用,它们之间存在着交互作用,因此,有关植物生长调节物质对杜鹃兰原球茎增殖的交互作用还需进一步做多因素组合试验研究。

温度和光照强度也是影响植物生长的一个重要因素。该研究表明,杜鹃兰原球茎增殖的适宜温度为15℃,这一研究结果与张丽霞^[12]发现杜鹃兰主要分布区自然条件下年平均气温为15.3℃相似,说明组培条件与植物的野外生存环境有着密切的关系;光照强度2 000 lx比光强3 000 lx的原球茎增殖率低,但原球茎分化程度较小,综合考虑光强2 000 lx适宜原球茎的增殖。但该研究主要是从宏观方面去观察温度及光照强度对原球茎增殖的影响,至于不同温度及光照强度对杜鹃兰的生理代谢的影响,需要继续研究。

此外,在原球茎的增殖过程中出现了不同程度的芽分化现象,这对后期的种苗工厂化生产不利。该研究通过添加适宜浓度的活性炭在一定程度上起到抑制芽分化的作用,这与谢利等^[20]的研究结果一致。通过调整适宜植物生长调节物质比例对抑制芽分化有一定的效果^[20],该研究结果发现,适宜比例的植物生长调节物质可有效抑制芽分化,与上述研究结果一致。至于能否通过缩短生长周期、切割材料等手段进行增殖过程中芽分化的控制,从而达到工厂化生产种苗标准,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] ZHANG M S, WU S J, JIE X J, et al. Effect of endophyte extract on micro propagation of *Cremastra appendiculata* (D. Don.) Makino (Orchidaceae) [J]. Propagation of Ornamental Plants, 2006, 6(2): 83-89.
- [2] 田昌海, 王世清. 山慈菇的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(7): 1009-1010.
- [3] 毛堂芬, 丁映. 杜鹃兰的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(6): 716-716.
- [4] 毛堂芬, 刘涛, 刘作易, 等. 杜鹃兰离体快繁技术研究[J]. 中药材, 2007, 30(9): 1057-1059.
- [5] 张明生, 戚金亮, 刘志, 等. 药用兰科植物杜鹃兰的组织培养与快速繁殖[J]. 种子, 2005, 24(8): 82.
- [6] 张明生, 彭斯文, 杨小蕊, 等. 杜鹃兰人工种子技术研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15): 1894-1897.
- [7] MUKHOPADHYAY M J, MUKHOPADHYAY S, SEN S. *In vitro* propagation of *Iphigenia indica*, an alternative source of colchicine[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2002, 69: 101-104.
- [8] JIANG W M, ZHAO M S, FU C X. Studies on *in vitro* regeneration competence of pseudobulb cultures in *Changnienia amoena* Chien[J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56: 2580-2585.
- [9] 廖婷婷. 山慈菇(杜鹃兰)快速繁殖技术体系的建立[D]. 成都: 西南交通大学, 2012.
- [10] 冯沛春. 山慈菇(杜鹃兰)快速繁殖技术优化及铁皮石斛叶文库的构建[D]. 成都: 西南交通大学, 2014.
- [11] 吴根良, 何勇, 王永传, 等. 不同光照强度下卡特兰和蝴蝶兰光合作用和叶绿素荧光参数日变化[J]. 浙江林学院学报, 2008, 25(6): 733-738.
- [12] 张丽霞. 杜鹃兰重要生理特性和生态适应性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008.
- [13] 徐步青, 崔永一, 郭岑, 等. 不同光照强度和培养时间下铁皮石斛类原球茎生物量、多糖和生物碱量的动态变化[J]. 中草药, 2012, 43(2): 355-359.
- [14] 吴华芬, 刘南祥, 诸葛华, 等. 百合组织培养快速繁殖技术[J]. 中国科技信息, 2008(19): 73-75.
- [15] 李洪林, 付志惠, 杨波. 独蒜兰的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 632.
- [16] 汪杰, 刘小青, 钱森和. 不同激素水平对石斛兰组织培养的影响[J]. 湖南农业科学, 2009(12): 21-23.
- [17] 陈丽静, 齐欣, 王玉坤. 北五味子快繁体系的建立[J]. 中草药, 2011, 42(3): 575-578.
- [18] 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]. 中草药, 2011, 34(8): 1172-1177.
- [19] 廖婷婷, 邹嘉欣, 王万军. 山慈菇快速繁殖体系的建立[J]. 北方园艺, 2012(9): 121-125.
- [20] 谢利, 马晓娟, 郭和蓉, 等. 杂交兰类原球茎增殖中芽分化的控制和快速繁殖[J]. 植物生理学报, 2014, 50(2): 209-213.

Culture Conditions of Protocorms Proliferation of *Cremastra appendiculata*

WU Yanqiu, LYU Xiang, LI Xiaolan, GAO Xiaofeng, LIU Jiandong, ZHANG Mingsheng

(School of Life Sciences, Guizhou University/Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guiyang, Guizhou 550025)

Abstract: The protocorms from the germination of *Cremastra appendiculata* seed were used as test materials to investigate the effects of the media, growth regulators (6-BA, NAA and IBA), active carbon (AC), temperature and light intensity on protocorms proliferation of *C. appendiculata*. The results showed that 1/2 MS medium was the appropriate basic medium for protocorms proliferation. Adding 6-BA, NAA and IBA into 1/2 MS medium was beneficial to protocorms proliferation. The proliferation rate reached to 170.07% after 40 days while adding 1.0 mg · L⁻¹ IBA, and adding certain amount of AC could promote the proliferation. In addition, the temperature and light intensity were also necessary to the proliferation. In conclusion, the suitable culture condition for protocorms proliferation of *C. appendiculata* was 1/2 MS adding 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA, 1.0 mg · L⁻¹ IBA and 0.5 g · L⁻¹ AC with 15 °C and 2 000 lx light intensity.

Keywords: *Cremastra appendiculata* (D. Don.) Makino; protocorms; proliferation culture