

# 曲茎石斛的组培繁殖研究

张明月<sup>1</sup>, 黄作喜<sup>1\*</sup>, 李 强<sup>2</sup>

(1. 内江师范学院 生命科学学院, 四川 内江 641199;  
2. 四川千草生物技术股份有限公司, 四川 内江 641000)

**摘 要:**以曲茎石斛组培苗为实验材料,探讨了不同培养基、激素配比、继代周期和活性炭浓度,对于其不定芽增殖和生根的影响.结果表明,培养基 B<sub>5</sub>+0.3 mg/L 6-BA(6-苄基腺嘌呤)+0.03 mg/L NAA(萘乙酸)+6 g/L 琼脂粉+30 g/L 蔗糖促进组培苗增殖的效果较好.在 30d、50d、70d 继代周期的培养试验中,50 d 的增殖效果较好;添加 0.30 mg/L NAA、0.8 g/L 活性炭的培养基对组培苗生根的促进作用较好.试验结果为曲茎石斛组培苗的大规模快繁提供了数据支持.

**关键词:**曲茎石斛;组培技术;增殖;生根

**DOI:**10.13603/j.cnki.51-1621/z.2018.10.015

**中图分类号:**S688 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-1785(2018)10-0076-04

## 0 引言

曲茎石斛 (*Dendrobium flexicaule* Z. H. Tsi, S. C. Sun et L. G. Xu), 为兰科石斛属草本植物,是中药西枫斗的原植物之一,具有一定的观赏价值和极高的药用价值<sup>[1-2]</sup>. 由于其生境特殊、分布范围狭小、生长缓慢,加之长期的人为过度采集,导致其自然资源日益枯竭.如何利用人工繁殖和栽培手段解决药材短缺、资源与环境保护的问题,已成为目前研究的重点之一<sup>[3-4]</sup>. 余晓丽等<sup>[5]</sup>针对野生曲茎石斛的离体快繁进行了初步研究,国内部分企业也开展了组培扩繁研究,但有关不定芽增殖和生根的再生体系尚不完善,难以满足大规模生产的需求.本研究探讨了不同培养基及不同激素配比、继代周期和活性炭浓度对曲茎石斛组培苗不定芽增殖和生根的影响,以期为进一步完善曲茎石斛的组培快繁体系提供技术数据.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

曲茎石斛组培苗由“四川千草生物技术股份有

限公司”组培车间提供,其大小、健壮度和整齐度基本一致.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 不同培养基及激素比对曲茎石斛组培苗增殖的影响

以 MS 或 B<sub>5</sub>+0.3 mg/L 6-BA+6 g/L 琼脂粉+蔗糖 30 g/L 为基本培养基,分别添加 0.01 mg/L NAA、0.03 mg/L NAA、0.10 mg/L NAA、0.01 mg/L IAA(吲哚乙酸)、0.03 mg/L IAA、0.10 mg/L IAA、0.01 mg/L 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、0.05 mg/L 2,4-D、0.10 mg/L 2,4-D 的植物生长调节剂,培养曲茎石斛组培苗,每种培养基接 6 瓶,每瓶接种 8 株组培苗,且以两株一丛的形式接种.50d 后观察其增殖情况并统计结果.

#### 1.2.2 不同继代周期对曲茎石斛组培苗增殖的影响

将曲茎石斛组培苗接种于 B<sub>5</sub>+0.3 mg/L 6-BA+0.03 mg/L NAA+6 g/L 琼脂粉+30 g/L 蔗糖培养基中,分别培养 30d、50d、70d 后转接继代,观察继代周期对组培苗增殖的影响.每种培养基接 6 瓶,

收稿日期:2018-05-25

作者简介:张明月(1995—),女,四川都江堰人,内江师范学院学生

\*通信作者:黄作喜(1966—),男,四川安岳人,内江师范学院教授,硕士.研究方向:植物资源与利用

每瓶接种 8 株组培苗,且以两株一丛的形式接种. 三种继代周期试验均培养 50d 后观察其增殖情况并统计结果.

### 1.2.3 不同浓度的 NAA、IBA、IAA 对曲茎石斛组培苗生根的影响

选取整齐一致、生长状况良好的曲茎石斛组培苗,接种到以 MS+6 g/L 琼脂粉+30 g/L 蔗糖为基本培养基,分别添加 0.10 mg/L NAA、0.30 mg/L NAA、0.40 mg/L NAA、0.10 mg/L IBA、0.30 mg/L IBA、0.40 mg/L IBA、0.10 mg/L IAA、0.30 mg/L IAA、0.40 mg/L IAA 的培养基中,每种培养基接 6 瓶,每瓶接种 8 株组培苗,且以两株一丛的形式接种. 50d 后观察其生根情况,统计结果.

### 1.2.4 添加活性炭对曲茎石斛组培苗生根的影响

选取整齐一致、生长状况良好的曲茎石斛组培苗,接种到 MS+0.30 mg/L NAA+6 g/L 琼脂粉+30 g/L 蔗糖为基本培养基,分别添加 0.2、0.5、0.8、1.1 g/L 活性炭的培养基中,每种培养基接 6 瓶,每瓶接种 8 株组培苗,且以两株一丛的形式接种. 50d 后观察其生根情况并统计结果.

### 1.2.5 培养条件

培养基 pH 值为 5.8,在白天温度(22±1)℃,夜间温度(18±1)℃,光照 1800 Lx 及光照时间 14 h/d,通风良好的环境下培养.

### 1.2.6 统计结果

增殖系数(个/株)=每实验组增殖的芽数/总的株数;生根率(%)=生根的株数/总株数×100%;单株平均根数(条/株)=每实验组的根数/总的株数;株高或根长(cm)为每试验组组培苗的株高或根长之和/总的株数,株高和根长用直尺测量;生长情况(+)均为肉眼观察所得,主要指茎的粗细、植株的颜色、生长旺盛程度等. 以上试验均设三个平行,结果取平均值.

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基及激素比对曲茎石斛组培苗增殖的影响

由表 1 可知,以 MS 或 B<sub>5</sub>+0.3 mg/L 6-BA+6 g/L 琼脂粉+蔗糖 30g/L 为基本培养基,在添加相同激素配比的条件下,B<sub>5</sub>培养基中组培苗的增殖效果总是优于 MS 培养基. 在添加不同浓度的 NAA、IAA 和 2,4-D 的激素实验中,IAA 和 2,4-D 处理的组培苗增殖系数、平均株高、生长情况等指标差异不大,

添加 NAA 培养的组培苗的增殖系数、平均株高、生长情况的指标优于前两种激素,其中 0.03 mg/L 浓度下培养的增殖效果较好. 上述实验表明:促进曲茎石斛组培苗增殖的较好培养基是 B<sub>5</sub>+0.3 mg/L 6-BA+0.03 mg/L NAA+6 g/L 琼脂粉+30 g/L 蔗糖.

表 1 不同培养基及激素比对曲茎石斛组培苗增殖的影响

培养基	增殖系数 /个/株	平均株高 /cm	生长情况 /+
MS+0.3mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA	1.68	1.92	++
MS+0.3 mg/L 6-BA+0.03mg/L NAA	2.22	2.17	++++
MS+0.3mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA	1.95	2.05	+++
MS+0.3mg/L 6-BA+0.01 mg/L IAA	1.72	1.96	+
MS+0.3mg/L 6-BA+0.03 mg/L IAA	2.13	2.01	+++
MS+0.3mg/L 6-BA+0.10 mg/L IAA	1.88	2.00	++
MS+0.3mg/L 6-BA+0.01 mg/L 2,4-D	1.82	1.89	+
MS+0.3mg/L 6-BA+0.05 mg/L 2,4-D	2.13	1.96	+++
MS+0.3mg/L 6-BA+0.10 mg/L 2,4-D	2.03	1.93	++
B <sub>5</sub> +0.3 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA	2.30	1.82	+++
B <sub>5</sub> +0.3 mg/L 6-BA+0.03 mg/L NAA	2.51	2.19	++++
B <sub>5</sub> +0.3 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA	2.42	2.07	+++
B <sub>5</sub> +0.3 mg/L 6-BA+0.01 mg/L IAA	1.97	1.94	++
B <sub>5</sub> +0.3 mg/L 6-BA+0.03 mg/L IAA	2.25	2.11	+++
B <sub>5</sub> +0.3 mg/L 6-BA+0.10 mg/L IAA	2.07	2.05	++
B <sub>5</sub> +0.3 mg/L 6-BA+0.01 mg/L 2,4-D	1.93	1.91	+
B <sub>5</sub> +0.3 mg/L 6-BA+0.05 mg/L 2,4-D	2.26	2.18	++
B <sub>5</sub> +0.3 mg/L 6-BA+0.10 mg/L 2,4-D	2.09	2.04	++

### 2.2 不同继代周期对曲茎石斛组培苗增殖的影响

表 2 继代周期对曲茎石斛组培苗增殖的影响

继代周期/d	个/株	株高/cm	生长情况/+
30	2.18	1.96	++
50	2.53	2.17	+++
70	2.41	2.05	+++

由表 2 可知,继代周期 50 d 时,曲茎石斛组培苗的增殖系数、株高比 30 d 时分别高 0.35 个/株、0.21 cm,生长情况更佳,比 70 d 时分别高 0.12 个/株、0.12 cm. 可见,曲茎石斛组培苗增殖培养的继代周期以 50 d 为宜.

### 2.3 不同浓度的 NAA、IBA、IAA 对曲茎石斛组培苗生根的影响

由表 3 可知,用 0.10、0.30、0.40 mg/L 的 NAA 处理诱导曲茎石斛组培苗生根的试验中,0.30 mg/L

NAA 处理的生根率、平均根数、根长高于 0.10、0.40 mg/L 处理,根生长情况较好.0.30 mg/L 的 NAA、IAA 处理的生根率、平均根数、根长分别高于 0.10、0.40 mg/L 处理,根生长情况较好.各试验中,0.3 mg/L NAA 处理促进曲茎石斛生根的效果较明显,其生根率、平均根数、根长分别达 87.51%、4.21 条/株、0.77 cm,根生长良好.所以,较好的曲茎石斛生根培养基是 MS+0.30 mg/L NAA+6 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖.

表 3 不同浓度的 NAA、IBA、IAA 对曲茎石斛组培苗生根的影响

培养基	生根率/%	平均根数/条/株	根长/cm	根生长情况/+
MS+0.10mg/L NAA	78.14	3.89	0.67	+++
MS+0.30mg/L NAA	87.51	4.21	0.77	++++
MS+0.40mg/L NAA	81.33	4.18	0.74	+++
MS+0.10mg/L IBA	77.67	2.68	0.49	+
MS+0.30mg/L IBA	83.35	2.90	0.54	+++
MS+0.40mg/L IBA	79.18	2.77	0.52	++
MS+0.10mg/L IAA	75.01	2.40	0.41	+
MS+0.30mg/L IAA	79.46	3.09	0.55	++
MS+0.40mg/L IAA	77.57	2.92	0.45	+

2.4 添加活性炭对曲茎石斛组培苗生根的影响

表 4 添加活性炭对曲茎石斛组培苗生根的影响

活性炭/g/L	生根率/%	平均根数/条/株	根长/cm	根生长情况/+
0.2	83.25	3.86	0.58	+++
0.5	86.76	3.97	0.67	+++
0.8	92.25	4.54	0.82	++++
1.1	88.30	4.36	0.74	+++

由表 3-4 可知,添加适当浓度的活性炭对曲茎石斛组培苗的生根有明显的促进作用.活性炭浓度为 0.2、0.5、0.8 g/L 时,随着浓度的升高,组培苗的生根率、单株平均根数、根长也逐渐升高,添加活性炭浓度过高,生根受到抑制.当活性炭浓度为 0.8 g/L 时,曲茎石斛的生根率达 92.25%,平均根数、根长分别达 4.54 条/株、0.82 cm.

3 讨论

有关石斛组织培养快繁技术的研究已有不少报道,MS 和 B<sub>5</sub> 常被用作基本培养基.本研究显示,接种于 B<sub>5</sub> 培养基中的曲茎石斛组培苗优于 MS 培养基,其组培苗增殖的芽数多、植株高、叶绿且健壮,可能是由于 B<sub>5</sub> 培养基含有较低的铵盐,有利于曲茎石斛等的组培生长和芽增殖,这与方香香<sup>[6]</sup>、王国梅<sup>[7]</sup>、刘骅<sup>[8]</sup>等在金叉石斛、铁皮石斛组培研究中的结果类似<sup>[6-8]</sup>.NAA、IAA、IBA、2,4-D 同属于生长

素类物质,以适当浓度添加到培养基中,对于植物组培苗的增殖和生根均具有不同程度的促进作用<sup>[9]</sup>.已有的组培研究表明,2,4-D 一般促进组培物愈伤组织的作用明显<sup>[10]</sup>,IAA 被吸收后在运输过程中易于分解<sup>[11]</sup>,本试验也发现,添加 NAA 培养的曲茎石斛组培苗的增殖效果超过 IAA 和 2,4-D 处理.添加 NAA、IAA、IBA 促进曲茎石斛组培苗生根的试验中,发现 NAA 处理的组培苗的生根率等高于 IAA、IBA 处理,可能是因为曲茎石斛组培苗对不同的生长素的敏感性不同,影响根原基的发端和不定根的形成,从而导致生根率等各项指标的差异.

人们对石斛组培的研究主要集中在外植体的选择、处理及培养基的筛选等方面<sup>[12-13]</sup>,本试验研究了不同继代周期对曲茎石斛组培苗增殖的影响.研究表明,继代周期 50d 时组培苗的增殖系数较高、植株健壮、生长状况良好.可能因为 30d 继代周期下培养的组培苗生长时间短、生长量不足,进而影响增殖系数;70d 继代周期下培养的组培苗经过长时间的培养,培养基中营养物质被大量消耗,加之长时间生长产生了各种代谢物,不利于植株的生长,植株老化、不利于进一步继代增殖,试验后期发现植株叶片发黄、根系老化.合适的继代周期的筛选,能保证石斛试管苗处于最佳的生长状态,又能经济充分地利用培养基<sup>[14]</sup>.

生根壮苗是影响组培苗移栽成活率的关键,发达的根系是曲茎石斛成功移栽的保障.因此在组织培养过程中提高组培苗的生根率尤为重要<sup>[14]</sup>.本试验发现,添加适当浓度的活性炭对曲茎石斛组培苗的生根有明显的促进作用.活性炭为根系提供了黑暗环境,促使不定根的发生.活性炭表面积大、内有复杂的孔隙结构,因此有较强的吸附性,可以吸附植物生长过程中代谢的醌类等生长抑制性物质<sup>[15]</sup>,避免植株被生长抑制性物质毒害而产生褐变.但当活性炭浓度过高时,活性炭不仅吸附生长抑制性物质,还可能吸附培养基中生长调节剂或营养物质,因此添加高浓度活性炭会抑制曲茎石斛组培苗的生长.

4 结论

曲茎石斛组培繁殖过程中,培养基 B<sub>5</sub>+0.3 mg/L 6-BA+0.03 mg/L NAA+6 g/L 琼脂粉+30 g/L 蔗糖的增殖效果较好,继代周期以 50d 为宜,添加 0.3 mg/L NAA、0.8 g/L 活性炭的培养基对组培苗生根的促进作用较好.

## 参考文献:

- [1] 冉懋雄. 石斛 [M]. 北京:科学技术文献出版社,2002.
- [2] 《中国中药资源丛书》编委会. 中国常用中药材 [M]. 北京:科学出版社,1995:18-19.
- [3] 李旻,刘友平,张玲,等. 石斛属药用植物研究进展 [J]. 现代中药研究与实践,2009,23(5):73-76.
- [4] 张明,夏鸿西,朱利泉,等. 石斛组织培养研究进展 [J]. 中国中药杂志,2000,25(6):323-326.
- [5] 余晓丽,王世茹,曾万勇,等. 野生曲茎石斛的离体培养及再生体系研究 [J]. 武汉轻工大学学报,2010,29(1):21-24.
- [6] 方香香,谢欢,伍奥林,等. 霍山石斛快速繁殖技术研究 [J]. 中国现代中药,2015,17(6):529-532.
- [7] 王国梅,韦鹏霄,岑秀芬. 基本培养基和激素组合对金钗石斛原球茎增殖的影响 [J]. 南方农业学报,2006,37(1):10-12.
- [8] 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):654-656.
- [9] 唐雪梅,陈红. 激素对曲茎石斛试管苗生长的影响 [J]. 中药材,1993(8):12-13.
- [10] 钱春艳,曹有龙,段安安,等. 枸杞花药培养体系优化 [J]. 安徽农业科学,2010,38(2):1079-1081.
- [11] 文清岚,秦丽凤,李祎旻,等. IAA 和 NAA 对杉木组培苗生根效果的影响 [J]. 湖北农业科学,2016,55(14):3720-3722.
- [12] 袁颖丹,李志,胡冬南,等. 铁皮石斛组织培养研究进展 [J]. 湖北农业科学,2016,55(1):9-12.
- [13] 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,2013,4(2):57-59.
- [14] 贾书华,王娣,高楦,等. 继代周期对霍山石斛试管苗生长及培养基成分的影响 [J]. 中草药,2007,38(8):1239-1242.
- [15] 孙占育,孙志强,曹斌. 活性炭在促进组培苗植物生根中的作用 [J]. 湖南农业科学,2010(7):3-5.

## On the Tissue Culture and Propagation of *Dendrobium flexicaule*

Z. H. Tsi, S. C. Sun et L. G. Xu

ZHANG Mingyue<sup>1</sup>, HUANG Zuoxi<sup>1</sup>, LI Qiang<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Neijiang Normal University, Neijiang, Sichuan 641199, China;

2. Sichuan Qiancao Bio-technology Co., Ltd. Neijiang, Sichuan 641000, China)

**Abstract:** The effects of different culture medium, growth hormone proportion, subculture cycle and concentration of active carbon on multiplication of adventitious buds, rooting of *Dendrobium flexicaule* Z. H. Tsi, S. C. Sun et L. G. Xu were researched in this experiment, in which the tissue culture seedlings were used as material for experiment. The results showed that the multiplication of adventitious buds was relatively satisfactory when the tissue culture seedlings were cultured in medium of B<sub>5</sub> + 0.3mg/L 6-BA + 0.03mg/L NAA + 6g/L Agar + 30g/L Sugar. In the subculture cycle experiment of 30d, 50d and 70d, subculture cycle of 50d was best in favor of multiplication of adventitious buds. When the medium was added with 0.30mg/L NAA and 0.8g/L activated carbon, it drastically promoted the rooting of tissue culture seedlings in *Dendrobium flexicaule* Z. H. Tsi, S. C. Sun et L. G. Xu. The above experimental results statistically provided a technical basis for large-scale production of *Dendrobium flexicaule* Z. H. Tsi, S. C. Sun et L. G. Xu.

**Keywords:** *Dendrobium flexicaule* Z. H. Tsi, S. C. Sun et L. G. Xu; tissue culture technology; multiplication; rooting

(责任编辑:谢玉华)