

不同激素对春石斛的组织培养影响研究初报

韩磊¹, 张洪平², 艾应伟¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 四川省成都市科瑞园艺有限公司, 610066)

摘要:用春石斛(*Dendrobium nobile*) 1~3 mm 的茎尖为外植体, 以 1/2MS 为基本培养基, 调节不同激素水平诱导芽体萌发, 进行繁殖培养。研究表明: 萌芽诱导阶段: 1/2MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+椰子汁 200 mL/L+蔗糖 30 g/L+活性炭 3 g/L+琼脂 5 g/L 中萌芽早, 生长快; 继代和增殖培养阶段: 以 1/2MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L+椰子汁 200 mL/L+蔗糖 15 g/L+活性炭 3 g/L+琼脂 5 g/L 效果最好; 生根阶段培养基: 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 15 g/L+活性炭 3 g/L+琼脂 5 g/L 每茎段可生根 4 条肉质健壮, 在培养过程中达到了较好的效果。

关键词:春石斛; 激素水平; 组织培养

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)03-0177-02

春石斛(*Dendrobium nobile*)属于兰科石斛属多年生草本, 几乎与卡特兰、蝴蝶兰齐名, 是四大观赏热带兰之一, 园艺学上根据石斛的开花时期将其分为春石斛和秋石斛, 春石斛属落叶温带种, 其花艳丽, 做盆栽栽培受到广泛的青睐^[1,2,4]。春石斛用种子繁殖常得不到与亲代一致的植株, 用分株繁殖的无性繁殖方式太慢且一年只能得到 2~3 倍的增殖速度, 不能满足生产的需要, 而且我国的春石斛品种基本上是从日本进口, 使我国春石斛的发展受到极大的限制^[1,2,5]。该试验旨在通过组织培养进行春石斛的快速繁殖技术研究, 为实现春石斛的后期开发利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

所用材料为成都科瑞园艺有限公司提供的春石斛品种(又称节生花型石斛)。在萌芽诱导阶段用春石斛 5 cm 的幼嫩带侧芽原基或顶芽的茎段为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体选取及消毒方法 先将植株拿进消毒后的培养室, 每天用紫外灯进行照射 2h, 采取每 5 d 对其进行叶面茎段进行化学药物多菌灵 800 倍液喷洒灭菌。通过 20 d 的循环处理, 在 1/2MS 培养基中对植株建立无菌系。剥去老叶, 取带芽的和带幼叶的茎段, 用自来

水冲洗 5~6 次, 然后用 70% 的酒精消毒 10~20s, 再用 0.1% 的 HgCl 浸泡 15 min。在无菌水下冲洗 7~8 次, 然后切成 5 cm 的带侧芽原基的茎段接种到 1/2 MS 培养基(共接种 400 瓶每瓶一个茎段), 对其进行无菌系建立。转入培养基 20 d 左右。外植体有 80 瓶染菌, 其余均成功建立无菌系, 达到 80% 的较好的效果。

1.2.2 培养条件 培养基的 pH 为 5.4~5.6、温度 25 ± 1℃、光照 14~16 h。

2 结果与分析

2.1 萌芽诱导阶段

在选用的基本培养基建立无菌系中, MS 培养基中褐化比较严重, 1/2MS 培养基虽也有褐化现象存在但比在 MS 中减轻很多。在对茎段的培养过程中, 植物种类、外植体的老化程度、光照过强、温度过高、培养时间过长等是出现褐化现象的影响因素。在进行暗培养的外植体没有褐化现象, 有效的措施是将光照降低和添加活性炭。在不定芽诱导阶段采取降低无机盐浓度和加入活性炭。

表 1 不同激素组合的培养基对不定芽诱导培养结果

组号	培养基	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	接种茎 段数(个)	长芽数 (个)	芽增殖 倍数(%)	植株 长势
1	1/2MS	0.2	0.2	31	46	200	++
2	1/2MS	0.2	0.5	20	22	100	++
3	1/2MS	0.5	0.2	28	36	130	+++
4	1/2MS	0.5	0.5	35	177	500	++
5	1/2MS	0.5	1.0	32	44	140	++
6	1/2MS	1.0	1.0	30	39	100	+
7	1/2MS	1.0	2.0	22	35	160	++

注: 培养基的其他附加物为蔗糖 15 g/L, 琼脂条 5 g/L, 椰子汁 200 mL/L 活性炭 3 g/L, 其中在 1~4 号培养基中进行对比试验(有 4 瓶加活性炭而每个号的另外 4 瓶未加活性炭)。+ 代表长势一般, ++ 代表长势良好, +++ 代表长势优。

第一作者简介:韩磊, 男, 1980 年生, 在读硕士, 研究方向为园林植物与观赏园艺的组织培养。

通讯作者:艾应伟。

基金项目:四川省科技攻关计划项目, 编号: 2006Z10-006, 成都市科瑞园艺有限公司科研基金共同资助。

收稿日期:2006-11-10

取春石斛无菌苗 1~3 mm 茎尖接种在以 1/2MS 为基本培养基 7 种不同激素水平培养基中, 所得不定芽的诱导培养结果见表 1。通过 30 d 的观察, 不定芽诱导以 1/2MS+BA0.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+椰子汁 200 mL/L+蔗糖 15 g/L+活性炭 3 g/L+琼脂条 5 g/L 效果最好, 萌芽快外植体生长正常。在 1、4 号培养基中的茎段, 在接种 15 d 左右其不定芽开始萌发, 有不同程度的伸长, 接种 30 d 左右, 不定芽的叶原基形成。

2.2 继代增殖阶段

不同激素组合的培养基对春石斛芽继代增殖培养结果见表 2。把诱导阶段产生的不定芽接种在增殖培养基中, 发现在 1/2MS+BA0.5 mg/L+NAA2.0 mg/L+椰子汁 200 mL/L+蔗糖 15 g/L+活性炭 3 g/L+琼脂条 5 g/L, 每个外植体 30 d 后可得到高为 10 cm 左右、4 个节、且有 3 个不定芽、生根 3~5 条的植株, 为继代增殖的理想培养基。通过 1/2MS+BA0.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+椰子汁 200 mL/L+蔗糖 30 g/L+活性炭 3 g/L+琼脂条 5 g/L 对茎尖和茎段外植体培养 20 d, 每瓶便可得到 5 个不定芽和侧芽, 然后将每个不定芽分开, 分别放入 1/2MS+BA0.5 mg/L+NAA2.0 mg/L+椰子汁 200 mL/L+蔗糖 15 g/L+活性炭 3 g/L+琼脂条 5 g/L 培养基中, 反复在以上两种培养基中培养, 当繁殖到一定数量的时候就可对瓶苗中的带有 3 个节的外植体在增殖培养基中进行微扦插, 可达到快速繁殖的目的。

在增殖阶段的 6 号培养基中各有一苗其茎段基部形成类原球茎, 其它没有形成。这可能与激素水平有关, 该试验加椰子汁的培养基在诱导、增殖阶段取得了良好的效果, 而未加椰子汁的培养基中的苗情长势和形成芽的过程要比加椰子汁的慢一周。

表 2 不同激素组合的培养基对芽继代增殖培养结果

组号	培养基	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	节增殖 倍数(个)	接种茎 段数(个)	长芽 数(个)	芽增殖 倍数(%)	植株 长势
1	1/2MS	0.2	1.0	1	24	31	130	+
2	1/2MS	0.2	1.5	1	30	46	150	+
3	1/2MS	0.2	2.0	2	31	61	200	++
4	1/2MS	0.5	1.0	2	28	36	130	++
5	1/2MS	0.5	2.0	1	28	84	300	+++
6	1/2MS	1.0	2.0	4	30	45	150	+

注: 培养基的其他附加物为蔗糖 15 g/L, 琼脂条 5 g/L, 椰子汁 200 mL/L 活性炭 3 g/L。+代表长势一般, ++代表长势良好, +++代表长势优。

2.3 生根壮苗

NAA 不同水平对春石斛生根壮苗影响见表 3。在继代增殖阶段 1/2MS+BA0.5 mg/L+NAA2.0 mg/L+椰子汁 200 mL/L+蔗糖 15 g/L+活性炭 3 g/L+琼脂条 5 g/L 培养基中也能生根 2~5 条。但对于植物出瓶移栽来说确是不利的, 在 1/2MS+

BA0.5 mg/L+NAA2.0 mg/L+椰子汁 200 mL/L+蔗糖 15 g/L+活性炭 3 g/L+琼脂条 5 g/L 培养基长出的带根的幼苗, 经过田间试验全部死亡。说明在培养基中的生根幼苗没有达到壮苗要求, 不能出苗。通过壮苗生根试验结果, 筛选出培养基 1/2MS+NAA0.1 mg/L+活性炭 2 g/L+琼脂条 6 g/L+蔗糖 15 g/L 在壮苗生根阶段的效果最好, 生根数 4 条且幼苗生长健壮。在以上生根培养基配方试验中, 每瓶培养基中的苗都完全生根, 但生根的数量和质量却完全不同。

表 3 NAA 不同水平对生根壮苗的影响

组号	NAA(mg/L)	生根结果
1	0.1	生根数 4 条、肉质粗壮
2	0.5	生根数 5 条、细长
3	1.0	生根数 5 条、细长
4	2.0	生根数 2 条、细长

注: 每种培养基均用 1/2MS 加活性炭 2 g/L, 琼脂条 6 g/L, 蔗糖 30 g/L。

3 讨论

在选用春石斛的基本培养基时该试验结果和王玉英等人的试验结果相同, 降低无机盐浓度有利于试管苗的诱导和增殖^[2]。在春石斛继代增殖培养中出现类原球茎, 可能与幼嫩程度、激素比例有关, 但其是否能分化出正常增殖苗还有待于以后的研究。在芽诱导及继代增殖中如果 6-BA 的含量过高也会出现芽变粗不能形成正常的增殖芽, 建议在芽增殖阶段 6-BA 的含量不宜超过 1.0 mg/L, 这与毛碧增等人试验结果相同^[1]。继代增殖阶段 NAA 的含量起到比较关键的作用, 能够促进细胞伸长促进节间的生长, NAA 与 6-BA 的比例是外植体在增殖阶段不产生变态茎的保证, 但如果 NAA 含量过高使芽分化出的苗细长不适合以后的壮苗和练苗。在继代阶段虽然也达到了较好的生根效果, 但在以后的出瓶移栽阶段生长缓慢、死苗多, 可能与激素的含量高有关。整个试验中在加入椰子汁起到了促进增殖的作用, 在没有加椰子汁的培养基中, 芽增殖不正常且出现老化现象, 且生长周期要比加入椰子汁慢一周左右, 不利于进一步的增殖和壮苗。这与其它的石斛属植物组织培养研究报道是不一样的^[1,2,3]。

参考文献:

- [1] 毛碧增, 李凤玉, 王春, 等. 春石斛组织培养技术研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2003, 30(5): 580-583.
- [2] 王玉英, 李枝林, 余朝秀. 春石斛试管增殖研究初报[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 208-209.
- [3] 李杰, 黄敏仁, 王明麻, 等. 植物外源激素对大花蕙兰体胚发生影响的研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(4): 65-68.
- [4] Huan, L. V. T., T. Takanura, and M. Tanaka. Callus formation and plant generation from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium orchid*[J]. *Plant Sci*, 2004, 166, 1143-1149.
- [5] JAINA, HUSSA INS, KOTHARISL. Micropropagation of *Dianthus caryophyllus* L control of vit rification [J]. *J Plant Biochem Biotechnol*, 1997, 6(1): 35-37.