

春石斛的组织培养和快速繁殖研究

陈燕

(福建省三明市农业局, 福建 三明 365000)

摘要: 试验结果表明: 春石斛不定芽诱导、增殖的最佳培养基为 1/2MS + 6-BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L + 香蕉泥 100 g/L; 原球茎诱导的培养基以 1/2MS + NAA 最佳; 不加任何生长调节剂的 1/2MS 培养基最适宜原球茎的增殖; 原球茎分化的最适基本培养基为 1/2MS; 最适宜的壮苗生根培养基为 1/2MS + NAA 2 mg/L + 香蕉泥 100 g/L。

关键词: 春石斛; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-8581(2007)10-0096-02

Study on Tissue Culture and Fast Propagation of *Dendrobium nobile*

CHEN Yan

(Agricultural Bureau of Sanming City, Sanming 365000, China)

Abstract: The experiment results indicated that: the best medium for inducement of adventitious bud and proliferation of *Dendrobium nobile* was 1/2MS + 6-BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L + mashed banana 100 g/L; the best medium for inducement of protocorm was 1/2MS + NAA; the best medium for proliferation of protocorm was 1/2MS without any growth regulator; the suitable basic medium for differentiation of protocorm was 1/2MS; the optimum medium for rooting was 1/2MS + NAA 2 mg/L + mashed banana 100 g/L.

Key words: *Dendrobium nobile*; Tissue culture; Fast propagation

石斛兰(*Dendrobium nobile*)是兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)多年生草本植物,春天开花的则称为春石斛,并与卡特兰、蝴蝶兰、万带兰并列为观赏价值最高的四大观赏兰类植物^[1]。其原种主要分布在亚洲热带地区和亚热带地区,如日本、韩国、中国、泰国、越南、菲律宾等,尤以泰国居多。目前全世界记载的野生石斛兰原生种约1500多种,分布于从低海拔的雨林地带到喜马拉雅山脉。我国原产的春石斛有70多种,主要分布在秦岭以南各省区,以云南省最多,在海拔500~1000 m之间生长,常附生于树木或岩石上。春石斛花朵繁多,花色鲜艳,豪华灿烂,常作为盆花栽种^[2]。最早,春石斛在日本、欧美等发达国家很受欢迎,近年来,在我国和其他东南亚国家非常流行。春石斛主要采取高位芽分株和扦插繁殖,其周期长,且增殖倍数小,不能满足工厂化生产需要。我们应用组培技术,采用正交实验方法对春石斛不定芽诱导、增殖培养基添加的6-BA含量、NAA含量、KT含量进行了筛选,并找到其较佳的增殖条件;同时进行春石斛原球茎诱导、增殖、分化、壮苗和生根试验,获得了较好的诱导和增殖效果,为工厂化育苗探索了另一条途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料为从深圳市农业科学研究所引进的春石斛瓶苗。

1.2 试验方法

1.2.1 不定芽诱导、增殖基本培养基的筛选 在无菌条

件下,从无菌瓶苗中选取长势健壮、高约3 cm的种苗,去除根系并剥除叶片和叶鞘,切成带节两段,接种于不同的诱导、增殖基本培养基上。设置1/2MS、MS、改良MS共3种基本培养基,观察不定芽诱导、增殖的效果。

1.2.2 不定芽诱导、增殖培养基激素配比的筛选 基本培养基由1/2MS、蔗糖20 g/L、香蕉泥80~100 g/L、琼脂粉5.5 g/L组成。再按3因素3水平 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,添加不同剂量的生长调节物质,并将培养基pH值调为5.6,分装于250 mL广口培养瓶中,每瓶约装40 mL,高压灭菌备用。不同生长调节物质的水平见表1。每瓶接种春石斛5株,每处理12瓶。接种后,接种瓶放置于培养室,培养温度约25℃,光照强度为1500~2000 lx,每天光照12 h。观察不同处理不定芽诱导、增殖的效果。

表1 供试的因素及其水平 mg/L

水平	6-BA	NAA	KT
1	0.50	0.10	0
2	1.00	0.50	0.25
3	1.50	1.00	0.50

1.2.3 原球茎诱导基本培养基的筛选 基本培养基由MS(或改良KC或1/2MS)添加蔗糖20 g/L、琼脂粉5.5 g/L、香蕉泥80~100 g/L组成。并添加各种不同质量浓度的生长调节物质和有机物,且将培养基pH值调为5.6,分装到250 mL的广口培养瓶中,每瓶约装40 mL,高压灭菌后备用。接种后培养瓶放置于培养室中,培养温

度约为 25℃,光照强度为 1500~2000 lx,每天光照 12 h。

1.2.4 原球茎的诱导 选取生长健壮的无菌苗或芽体饱满的腋芽,剥取其茎尖(约 0.5 cm)接种于 1/2MS + 6-BA 1 mg/L + NAA 0.8 mg/L 的培养基上。

1.2.5 6-BA、NAA 不同浓度配比对原球茎增殖的影响 基本培养基为 1/2MS。设置 5 种不同的 6-BA、NAA 浓度配比,接种培养 45 d 后观察对原球茎增殖的影响。

1.2.6 原球茎的分化 将原球茎分别转接到 MS、1/2MS 和改良 KC + 6-BA 0.5 mg/L 的培养基上,观察其分化效果。

1.2.7 试管苗的壮苗与生根 将不定芽增殖的或原球茎分化的无根苗接种于不同的壮苗生根培养基上,培养 45 d,记录小苗的生长状况。

2 结果与分析

2.1 不定芽诱导、增殖的最佳基本培养基 试验结果见表 2。从表 2 可看出,基本培养基的不定芽诱导、增殖效果依次是 1/2MS > 改良 MS > MS。因此 1/2MS 为其最佳基本培养基。

表 2 不定芽诱导、增殖基本培养基的效果

组别	接种数	基本培养基	激素(mg/L)			诱导率(%)	不定芽增殖倍数
			6-BA	NAA	KT		
1	60	1/2MS	1.00	1.00	0.25	100	8.70
2	60	MS	1.00	1.00	0.25	92	5.50
3	60	改良 MS	1.00	1.00	0.25	95	6.20

2.2 不定芽诱导、增殖的最佳激素配比 从表 3 正交试验结果可以看出,不定芽的增殖效果依次是 6 号 > 2 号、7 号、8 号 > 3 号 > 1 号 > 4 号、9 号 > 5 号,且当 6-BA 的添加量大于 1 mg/L 时,不定芽叶畸形;当添加香蕉泥时不定芽壮实。经统计分析,不定芽诱导、增殖的最佳培养基为 1/2MS + 6-BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L。

表 3 不同激素配比对不定芽增殖的影响

编号	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	KT (mg/L)	增殖倍数
1	0.50	0.10	0	7.50
2	0.50	0.50	0.25	7.80
3	0.50	1.00	0.50	7.70
4	1.00	0.10	0.25	6.40
5	1.00	0.50	0.50	4.50
6	1.00	1.00	0	9.50
7	1.50	0.10	0.50	7.80
8	1.50	0.50	0	7.80
9	1.50	1.00	0.25	6.40

2.3 原球茎诱导基本培养基的筛选结果 试验结果表明:1/2MS 基本培养基最适宜原球茎的诱导、增殖培养。

2.4 原球茎的诱导结果 经过 40 d 的培养,从腋芽剥取的茎尖多数形成丛生芽,极少数诱导出原球茎;而顶芽剥取的茎尖大多数诱导出原球茎。可见,顶芽的茎尖更容易诱导出原球茎。

进一步以茎尖为外植体在 1/2MS 基本培养基上培养,添加的生长调节剂 6-BA、NAA 的质量浓度均设置以下 4 个水平:0、0.5、1.0、2.0 mg/L,进行不同组合(共 16 组)的诱导试验。结果发现,单独用 NAA 或 6-BA 都能诱导出原球茎,诱导效果依次是 NAA > 6-BA > NAA + 6-BA > CK(对照,即不加任何激素)。

2.5 6-BA、NAA 不同浓度配比对原球茎增殖的影响 从表 4 可以看出,对照组(空白)的原球茎的增殖倍数最高,达 5.04,其次是只加 0.5 mg/L NAA 的处理,增殖倍数为 4.73,再次是 6-BA + NAA 的两个处理,只加 0.5 mg/L 6-BA 处理的增殖倍数最低,仅为 2.00。从而说明,生长调节剂对春石斛原球茎的增殖有明显的抑制作用,6-BA 细胞分裂素的抑制作用比 NAA 激素强。因此,不加任何生长调节剂的培养基(1/2MS)最适宜原球茎的增殖。

表 4 不同生长调节剂浓度配比对原球茎增殖的影响

生长调节剂 (mg/L)	接种数 (个)	增殖数 (个)	增殖倍数
6-BA 0 + NAA 0	30	151	5.04
6-BA 1 + NAA 0.5	30	96	3.20
6-BA 0.5 + NAA 0.1	30	77	2.57
6-BA 0.5	30	60	2.00
NAA 0.5	30	142	4.73

2.6 原球茎的分化结果 从表 5 中可见,在 3 种不同的基本培养基上培养原球茎 45 d 后,以改良 KC 中原球茎分化最多,其次是 1/2MS,而 MS 培养基中原球茎分化最少,且部分原球茎褐化,死亡。这说明无机盐浓度过高时会抑制原球茎的分化。从表 5 中还可可见,MS 和 1/2MS 中分化出的小苗质量好,整齐一致,而改良 KC 分化出的小苗质量较差。故原球茎分化的最适基本培养基为 1/2MS。

表 5 基本培养基对原球茎分化的影响

基本培养基	分化程度	分化小苗的特征
改良 KC	90	具 1~2 片叶,高约 2 mm,叶黄绿。
1/2MS	80	具 1~3 片叶,高约 3~4 mm,叶淡绿。
MS	60	具 2 片叶,高约 3 mm,叶淡绿。

2.7 试管苗的壮苗与生根结果 从表 6 中可以看出,处理 2 较处理 1 的苗壮,生根率高,处理 4 的苗壮且根粗,生根率达 100%,处理 3 的苗弱根细,生根率只有 85%。由此可见,香蕉泥对壮苗生根具有积极作用。春石斛适宜的壮苗生根培养基为 1/2MS + NAA 2 mg/L + 香蕉泥 100 g/L。

2.8 炼苗和移栽结果 待瓶苗长有 3 片以上叶子、2~3 条根时,将试管苗放置于智能温室大棚的苗床上炼苗,以增强幼苗对外界环境的适应能力。1 周后,将瓶塞打开,让瓶苗进一步适应外界的光、温条件,再经过 3 d,将组培

(下转第 101 页)

但储藏后期变化较为平稳甚至稍有降低,这与酸价、过氧化值的变化趋势差异较大。这种差别说明了硫代巴比妥酸值与另外两个指标并不相关。通过对这些指标的测定分析,可以大致得到以下推论:在储藏初中期,油质氧化的底物和中间代谢产物迅速积累,此时终产物虽然开始积累,但由于与其它物质的结合,并不易测定。配方2香肠不论是储藏期间的各个阶段还是最终值均较其余两个配方的香肠呈现较大的数值。这表明在6周的常温储藏期间内肥瘦比为1:3的香肠的脂肪氧化程度较其余两个肥瘦比的香肠高。希望本文的这个结论对香肠的生产和储藏能提供相关的理论指导。

参考文献:

[1] 郭月红. 腊肉中脂肪氧化变化及影响因素研究[D]. 重庆:西南大学,2006.
[2] 李彦军. 腌腊制品的酸败与预防措施[J]. 肉品卫生, 2005, (9): 27~28.
[3] 曹锦轩,徐幸莲,周光宏. 酸价标准在腊肠品质判定中的应用现状[J]. 江西农业学报,2006, 18(6):148~150.

[4] 冯有胜,丁晓雯,冯叙桥,等. 食品分析检测原理与技术[M]. 成都:成都科技大学,1994.
[5] M. W. Byun, J. W. Lee, C. Jo, et al. Quality properties of sausage made with gamma - irradiated natural pork and lamb casing [J]. Meat Science, 2001, 59:223~228.
[6] C. Jo, J. W. Lee, K. H. Lee, et al. Quality properties of pork sausage prepared with water - soluble chitosan oligomer [J]. Meat Science, 2001, 59:369~375.
[7] 张水华. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1991.
[8] 南庆贤. 肉类工业手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,2002.
[9] AOAC. Official methods of analysis of AOAC international [M]. 1997.
[10] M. C. Hughes, J. P. Kerry, E. K. Arendt, et al. Characterization of proteolysis during theripening of semi - dry fermented sausages [J]. Meat Science, 2002, 62:205~216.
[11] Dorte Juncher, Christian S. Vestergaard, Jakob Soltoft - Jensen, et al. Effects of chemical hurdles on microbiological and oxidative stability of a cooked cured emulsion type meat product [J]. Meat Science, 2000, 55:483~491.

(上接第97页)

苗小心倒入清水中,洗净根部附着的培养基,以免引起烂根。并用甲基托布津或多菌灵1000倍液浸泡小苗10 min,待根系表面水分自然晾干后,用水苔为基质定植于穴盘中。定植后,注意幼苗的保温保湿管理。1个月后,幼苗成活率可达90%以上。

表6 不同培养基的壮苗生根情况

处 理	培养基	无根苗数	生根苗数	瓶苗特征
1	1/2MS	100	10	苗纤细弱小,根细长
2	1/2MS+香蕉泥100g/L	100	50	苗健壮,根粗短
3	1/2MS+NAA 2mg/L	100	85	苗纤细弱小,根细长
4	1/2MS+NAA 2mg/L+香蕉泥100g/L	100	100	苗健壮,根粗,中等长

3 讨论

原球茎是一类圆锥状介于愈伤和短茎之间的兰科植物特有的幼嫩器官,在兰科植物中大多以此类器官进行增殖和分化。将春石斛的腋芽或茎尖接种在合适的诱导培养基上,约30 d时,茎尖形成淡黄色愈伤组织,继续培养10 d,淡黄色愈伤组织转化为珠状原球茎,此时将其接种于增殖培养基上,经过约20 d培养,大多数原球茎转变为黄绿色,有时表面被有白色茸毛,极少数分泌褐色物质。再经过10 d,出现多个黄绿色瘤状凸起物即新增

殖的原球茎。在分化培养基上,原球茎由黄绿色转变为绿色,成为具备绿色叶原基的假鳞茎原球茎,2个月后,长成有3片以上叶子、约5条粗根的健壮小苗。春石斛的这一快繁过程与其他兰科植物如蝴蝶兰、大花蕙兰和铁皮石斛等(尤其是铁皮石斛)的快繁过程相似。本试验以茎尖、腋芽为外植体成功地诱导出春石斛的原球茎,至于春石斛的叶子和根部作为外植体能否诱导出原球茎,有待于进一步研究。

据有关报道,有机添加物如土豆泥、香蕉泥和椰汁等能促进兰科植物的生长。本试验发现,香蕉泥对春石斛的不定芽诱导、增殖、壮苗和生根均具有显著促进作用。这可能是香蕉泥中含有春石斛生长所需元素,同时香蕉泥对酸碱有很强的缓冲能力,能较好地保持培养基pH值在5.6左右,避免了培养后期培养基过酸(pH值偏低),从而促进了春石斛的生长。土豆泥、椰汁能否促进春石斛的生长,有待于进一步试验、探讨。

参考文献:

[1] 卢思聪. 中国兰与洋兰[M]. 北京:金盾出版社,1994. 90.
[2] 毛碧增,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.