文章编号:1671-9964(2008)06-0584-04

流苏石斛的离体快速繁殖

黄卫昌[1],殷丽青[2],胡永红[1],王新其[2],赵晓峰[1],李秀芬[2]
(1. 上海植物园,上海 200231;2. 上海市农业科学院 林木果树研究所,上海 201106)

摘 要:以流苏石斛茎段为外植体进行离体快速繁殖研究。结果显示:茎段诱导芽的适宜培养基为 MS + BA 2.0 mg·L^{-1} + NAA 0.5 mg·L^{-1} + CH 0.5 g·L^{-1},芽的诱导率达58.3%;培养基 MS + BA 4.0 mg·L^{-1} + NAA 0.5 mg·L^{-1} + CH 0.5 g·L^{-1} 可促进丛芽的形成,而丛芽增殖的适宜培养基为 MS + BA 2.0 mg·L^{-1} + NAA 0.2 mg·L^{-1} + CH 0.5 g·L^{-1},增殖系数达6.23;试管苗生根的最佳培养基为 1/2 MS + IBA 0.5 mg·L^{-1} + NAA 0.5 mg·L^{-1},50 d 后试管苗生根率可达100%。研究还发现,壮苗的适宜培养基为 1/2 MS + BA 0.5 mg·L^{-1} + NAA 0.1 mg·L^{-1} + CH 0.2 g·L^{-1},丛芽在该培养基上培养75 d后,可同时完成增殖与生根程序。

关键词:流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum*);组织培养;快速繁殖
中图分类号:Q943.1 **文献标识码**:A

In Vitro Rapid Propagation of *Dendrobium fimbriatum*

HUANG Wei-chang[1], *YIN Li-qing*[2], *HU Yong-hong*[1], *WANG Xin-qi*[2], *ZHAO Xiao-feng*[1], *LI Xiu-fen*[2]
(1. Shanghai Botanical Garden, Shanghai 200231, China; 2. Forestry and Pomology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China)

Abstract: Studies were carried out on rapid propagation of *Dendrobium fimbriatum in vitro*, using stem as explants. The results were showed the optimal medium for inducing buds was MS + BA 2.0 mg·L^{-1} + NAA 0.5 mg·L^{-1} + CH 0.5 g·L^{-1}, the inducing rate of buds was 58.3%; the medium MS + BA 4.0 mg·L^{-1} + NAA 0.5 mg·L^{-1} + CH 0.5 g·L^{-1} would advanced production of clumpy buds; the MS medium supplement with BA 2.0 mg·L^{-1} + NAA 0.2 mg·L^{-1} + CH 0.5 g·L^{-1} was indicated good for propagation of clumpy buds and the propagation coefficient was 6.23; the optimal medium for root formation was 1/2 MS + IBA 0.5 mg·L^{-1} + NAA 0.5 mg·L^{-1}, the rooting frequency was up to 100%. It was also found the optimal medium for healthy plantlet was 1/2 MS + BA 0.5 mg·L^{-1} + NAA 0.1 mg·L^{-1} + CH 0.2 g·L^{-1}, which would accomplish propagation of shoots and rooting after 75 days.

Key words: *Dendrobium fimbriatum*; tissue culture; rapid propagation

流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum*)又名马鞭石斛、大黄草等,为兰科石斛属附生类植物,具有较高观赏价值,又是我国重要的中药材,有很高药用价值,是中国药典收载的品种[1]。近年来,随着市场需求量的不断增加,野生资源被过度采挖及其自身的生长、繁殖特性和对生长环境的特殊要求,流苏石斛野生资源临近枯竭,目前已被列为国家重点保护的珍稀濒危药用植物[2]。有关流苏石斛组织培养的研究有过报道。2006年付志惠等首次报道了有关流苏石斛组织培养获得成功的报道[3],随后莫昭展等进行了流苏石斛茎段组织培养的初步研究,但未获得流苏石斛试管苗壮苗、生根等结果[4]。目前,未见流苏石斛规模化离体快速繁殖的报道。为确保珍稀濒危植物——流苏石斛种质资源的保持和可持续利用,满足市场需要,本研究拟以流苏石斛茎段为外植体,建立其离体快速繁殖的技术体系,以期获得大量优质种苗。同时,笔者在低倍增殖与生根同时进行的繁殖体系方面进行了探索,以其简化培养程序,降低繁殖成本,为流苏石斛的规模化生产提供理论依据和实用技术。

收稿日期:2008-07-02
基金项目:上海市绿化管理局资助项目
作者简介:黄卫昌(1971-),男,硕士,高级工程师.研究方向:热带植物引种驯化和保育研究及温室技术;殷丽青为本文通讯作者.

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料流苏石斛 (*Dendrobium fimbriatum*)来自上海植物园温室,以健壮母株的幼嫩茎节段作外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体的选择与灭菌　选取生长健壮的流苏石斛嫩枝,剪去叶片,用洗洁精摇晃清洗后,用流动自来水冲洗 30 min,剪取其茎节段,先用 75%酒精灭菌 30 s,再用 0.1% $HgCl_2$ 灭菌 8 min,然后用饱和漂白粉液灭菌 8 min,最后用无菌水冲洗 4~5 次。接种前用无菌吸水纸吸干外植体表面的水分,在无菌条件下,剪去外植体两段的坏死组织,将 0.5~1.0 cm 的带节茎段接种于无菌芽诱导培养基。

1.2.2 培养基与培养条件　以 MS 或 1/2 MS 为基本培养基,不同阶段添加不同种类和浓度的植物生长调节剂,诱导和增殖培养基添加蔗糖 30 $g\cdot L^{-1}$,水解酪蛋白 0.5 $g\cdot L^{-1}$, 壮苗、生根培养基中添加蔗糖 20 $g\cdot L^{-1}$,所有培养基均添加香蕉泥 60 $g\cdot L^{-1}$、琼脂粉 6.0 $g\cdot L^{-1}$,pH 为 5.4~5.6。培养温度为 25 ℃左右,光照时间为 12 $h\cdot d^{-1}$,光照强度 2 000 lx 左右。

1.2.3 试管苗的出瓶与移栽　试管苗在生根培养基上生长 50 d 后,带瓶盖移至常温,在自然散射光下炼苗 5~7 d,然后打开瓶盖,继续炼苗 1~2 d 后出瓶,洗净其基部培养基,栽入小颗粒碳化树皮或珍珠岩中,保持空气湿度在 70%以上,环境温度 20~25 ℃。

1.2.4 结果计算方法　芽的诱导结果于培养 35 d 考察统计,芽的诱导率为产生芽的外植体数占接种的外植体总数之百分比;丛芽诱导、增殖结果于培养 45 d 后考察统计,增殖系数为增殖培养后的有效芽数与接种芽数之比;试管苗生根结果于培养 50 d 后考察统计,根的直径采用专业版根系分析系统 WinRHIZO Pro 测量。生根率为生根苗数占接种苗数的百分比。

2 结果与分析

2.1 无菌系的建立

经灭菌处理后,外植体两段组织发白、坏死,切除坏死组织,取 0.5~1.0 cm 的带节茎段接种于含不同浓度植物生长调节剂的 MS 诱导培养基上。结果显示, 当培养基中 BA 浓度为 1.0~4.0 $mg\cdot L^{-1}$、NAA 为 0.2~0.5 $mg\cdot L^{-1}$ 时, 外植体均可不同程度诱导无菌芽 (见表 1)。流苏石斛诱导芽的适宜培养基是: MS + BA 2.0 $mg\cdot L^{-1}$ + NAA 0.5 $mg\cdot L^{-1}$。在该培养基上,外植体培养 10 d 后,茎节处开始局部膨大,随后有白色突起,20 d 后有嫩绿色腋芽萌发 (图 1),30~35 d 后无菌芽长至 1.5~2 cm 左右, 并有 2 片叶初展,即可切离外植体进一步培养。

傅玉兰等在春石斛组织培养研究中认为,BA 0.5 $mg\cdot L^{-1}$ + NAA 0.1 $mg\cdot L^{-1}$ 的激素组合最有利于芽的诱导[5],而在本研究中,我们将流苏石斛外植体培养于 MS + BA 0.5 $mg\cdot L^{-1}$ + NAA 0.1 $mg\cdot L^{-1}$ 的培养基上却长期没有反应,最后未能获得无菌系,这可能与植物基因型不同有关。由表 1 结果可知,在流苏石斛的初始培养中,太低浓度的激素组合对其芽的诱导没有效果,但培养基中激素浓度过高,对芽的诱导也有一定的抑制作用。

表 1　植物生长调节剂对流苏石斛外植体诱导无菌芽的影响
Table 1　Effect of plant growth regulator on the inducing from the explant

生长调节剂 Plant growth regulator/($mg\cdot L^{-1}$)	外植体数 No. of explants	产生无菌芽的外植体数 No. of explants to induct plantlets	芽的诱导率 Germination rate /%
BA 0.5 + NAA 0.1	12	0	0
BA 1.0 + NAA 0.2	12	6	50.0
BA 2.0 + NAA 0.5	12	7	58.3
BA 4.0 + NAA 0.5	12	2	16.7

2.2 丛芽的诱导与增殖

剪去流苏石斛无菌芽上部 1/3, 取其中下部组织接种于 MS + BA 4.0 $mg\cdot L^{-1}$ + NAA 0.5 $mg\cdot L^{-1}$ 进行丛芽诱导培养。观察发现,外植体培养 30 d 后,其基部开始形成突起,继续培养逐渐有小芽形成,45 d 后形成绿色丛生芽。将丛芽切成含 1~3 个小芽的组织块接种于含不同浓度植物生长调节剂的培养基上。结果显示(表 2),流苏石斛丛芽增殖的适宜培养基为 MS + BA 2.0 $mg\cdot L^{-1}$ + NAA 0.2 $mg\cdot L^{-1}$, 在该培养基上,流苏石斛增殖系数达 6.23。在相同营养成分的培养基上,当 BA 浓度较低时,流苏石斛无性系增殖较慢,茎叶伸展较快,随着培养基中 BA 浓度的升高,无性系增殖加快,但当培养基中 BA 浓度升高到 4 $mg\cdot L^{-1}$ 时, 畸形芽较多, 丛芽生长瘦弱、黄化,而有效芽减少,在 BA 4 $mg\cdot L^{-1}$ + NAA 0.5 $mg\cdot L^{-1}$ 的培养基上,培养物基部形成较多黄绿色的组织块,结构疏松,可利用的有效芽很少。

由此可见,丛芽的形成需要较高浓度的激素进行启动,但形成丛芽后,进行继代增殖应适当降低激素浓度。如果继续使用较高浓度的激素,则苗分化过多、生长慢,还会形成愈伤组织,并出现芽丛密集、

黄化、节间缩短和产生畸形苗等现象。我们在流苏石斛增殖培养中还发现,从芽在 MS + BA 2.0 mg·L^{-1} + NAA 0.2 mg·L^{-1} 连续多次继代增殖后,有时也会出现苗分化过多、芽丛密集等现象,这可能与培养物经过长期积累,内源激素过高有关,应及时降低培养基的激素浓度,或将材料转接于无激素的培养基。

2.3 壮苗培养与根的形成

2.3.1 壮苗培养 当流苏石斛增殖材料达到一定数量后,可将其转入较低植物生长调节剂的培养基上进行壮苗培养。结果显示,在 1/2 MS + BA 0.5 mg·L^{-1}+ NAA 0.1 mg·L^{-1} + CH 0.2 g·L^{-1} 的培养基上,丛芽茎叶伸展快且生长健壮,同时能成倍增长(见图 1-3),45 d 后即可切取单芽进行生根诱导。

试验中还发现,如果延长壮苗培养时间,芽丛不再继续增殖,而开始形成根系。当培养物在该培养基上培养 55 d 后,芽丛基部开始产生白色根系,随着培养时间的推移,根系逐渐发育良好,当芽丛在壮苗培养基上培养 75 d 后,大多数芽丛基部形成良好的根系(见图 1-4)。轻轻掰开芽丛,每个单芽具 3~5 根生长发育良好的根系,即可进行移栽。

表 2 植物生长调节剂对流苏石斛丛芽增殖的影响
Table 2 Effect of plant growth regulator on shoot multiplication

生长调节剂 Plant growth regulator/mg·L^{-1}	增殖系数 Multiplication rate	生长情况 Growth of shoots
BA 1 + NAA 0.2	2.91	茎叶伸展,生长好
BA 2 + NAA 0.2	6.23	生长旺,芽多、芽壮
BA 2 + NAA 0.5	5.64	芽多,稍细弱,基部形成少量组织块
BA 4 + NAA 0.2	4.22	瘦弱、黄化,畸形芽较多,有效芽少
BA 4 + NAA 0.5	-	基部形成较多黄绿色的组织块,结构疏松

2.3.2 诱导生根 经低浓度植物生长调节剂的培养基继代培养后,将长到 2.0 cm 左右的丛生芽切割成单芽分别接种于不同配方的生根培养基作培养试验,观察生根情况,50 d 后统计生根结果并移栽。结果显示:流苏石斛试管苗比较容易生根,部分材料在无生长调节剂的 1/2 MS 培养基上也能形成根系,但根系细弱、生长缓慢。适当加入生长素就能促进其生根,不同生长素联合使用诱导流苏石斛试管苗生根效果最好(见表 3)。试管苗生根的最佳培养基为 1/2 MS + IBA 0.5 mg·L^{-1}+ NAA 0.5 mg·L^{-1},50 d 后试管苗生根率可达 100%,其次分别为 1/2 MS + IBA1.0 mg·L^{-1} 和 1/2 MS + NAA 0.5 mg·L^{-1}。在适宜培养基上,试管苗 25 d 后开始形成根系,50 d 后生长良好的幼苗均能分化出良好的根系(见图 1-5、1-6)。

试验中还发现,来源于低浓度激素或无激素培养基的无根苗更容易生根、诱导生根所需时间也较短。因此,在试管苗诱导生根前,应先将其培养于低浓度激素培养基上进行壮苗培养,否则要延长诱导生根时间。

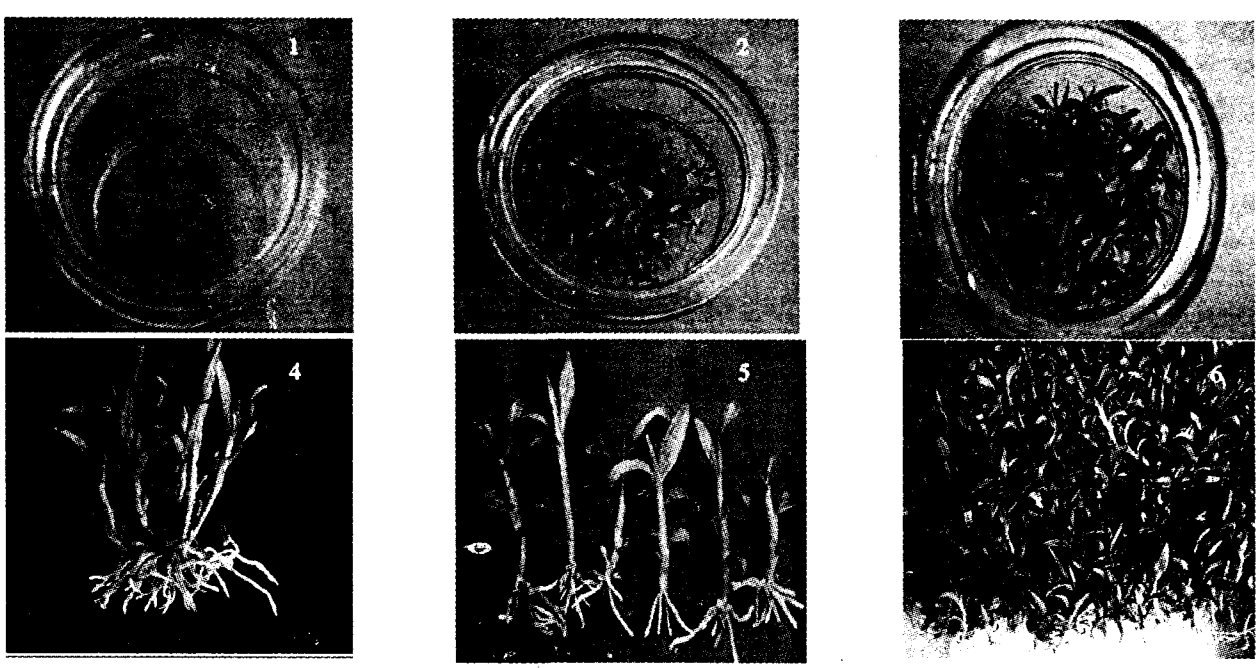

图 1 流苏石斛的离体快速繁殖

Fig. 1 *In Vitro* rapid propagation of *Dendrobium fimbriatum*

1.无菌芽的诱导 Inducing buds 2.丛生芽的增殖培养 Propagation of clumpy buds 3. 壮苗培养 Culture of healthy plantlet 4.增殖又生根的幼苗 The plants of rooting and propagation. 5、6.生根的幼苗 Regeneration plants

表 3　植物生长调节剂对流苏石斛试管苗生根的影响

Table 3　Effects of plant growth regulator on rooting of plantlets *Dendrobium fimbriatum*

生长素 Hormone /(mg·L⁻¹)	总苗数 Total plantlets	生根苗数 Rooted explants	生根率 Rooting rate /%	根系生长情况 State of root growth		
				Diameter /mm	Length /cm	Number of roots
CK	90	53	58.9	0.75	2.1	2~5
IBA 0.3	112	85	75.9	0.86	2.6	4~10
IBA 0.5	107	98	91.6	0.93	3.3	4~10
IBA 1.0	128	126	98.4	0.96	2.9	6~10
NAA 0.5	132	129	97.7	0.96	2.7	4~8
IBA 0.5	105	105	100.0	0.97	2.9	5~11
NAA 0.5						

3　结论与讨论

笔者通过研究认为:在流苏石斛组织培养中,芽诱导、增殖的基本培养基以 MS 为宜,香蕉泥和水解酪蛋白对芽的诱导与生长比较有利,可不再添加其它有机成分。在流苏石斛的组织培养中未发现褐化现象,因此,无需添加 AC。本研究建立和完善了流苏石斛的快速繁殖技术体系,经组织培养获得成千上万的流苏石斛试管苗,并进行了部分种苗的移栽。

付志惠等在流苏石斛组织培养中[3],所有培养过程均以 1/2 MS 为基本培养基, 其中侧芽诱导培养基中附加 BA 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹,并以 1/2 MS + BA 5.0 mg·L⁻¹+ NAA 0.5 mg·L⁻¹+椰汁 100 g·L⁻¹ + AC 0.5 g·L⁻¹ 的培养基进行丛芽诱导与增殖;莫昭展[4]等认为诱导流苏石斛茎段腋芽萌发以 MS + 6-BA 4.0 mg·L⁻¹ + NAA 1.0 mg·L⁻¹ 效果最好, 芽增殖阶段以 MS + BA 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.1 mg·L⁻¹ 增殖效果好。本研究结果显示: 茎段诱导芽的适宜培养基为 MS + BA 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹ + CH 0.5 g·L⁻¹,培养基 MS + 4.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹+ CH 0.5 g·L⁻¹ 可促进丛芽的形成, 而丛芽增殖的适宜培养基为 MS + BA 2.0 mg·L⁻¹+ NAA 0.2 mg·L⁻¹+ CH 0.5 g·L⁻¹, 试管苗生根的最佳培养基为 1/2 MS + IBA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹。研究结果与前人有所不同,可能与研究材料的生长环境、生理状况及内源激素水平等因素有关。

流苏石斛的增殖培养周期一般以 45 d 左右为宜,具体可根据培养基厚度及培养物增殖情况确定。在试验中发现,培养周期小于 40 d,培养物生长势较好,但繁殖系数不是很高,且人力、材料等培养成本增加;若培养时间超过 50 d,不能及时进行继代增殖或壮苗、生根培养,则久不转移的苗子会发黄、部分材料基部开始长根,还会出现过分拥挤、营养不良等现象,产生无效苗增多。

此外,我们发现,在流苏石斛壮苗培养过程中,如果延长培养时间,部分培养物就能长出根来。为简化培养程序,可适当增加壮苗培养基厚度,将无菌芽接种于 1/2 MS + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.1 mg·L⁻¹ + CH 0.2 g·L⁻¹ 的培养基,延长壮苗培养时间(达 75 d), 则 85%以上的培养物在低倍增殖的同时可形成完整的根系。采用低倍增殖与诱导生根同时进行,可减少人力、物力支出、对降低培养成本具有积极意义。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一)[M]. 北京:化学工业出版,2000. 70.

[2] 刘　强,殷寿华,黄　文,等.流苏石斛濒危原因及资源保护[J]. 亚热带植物科学,2007,36(4):45-47.

[3] 付志惠,李洪林,杨　波.流苏石斛的组织培养[J].植物生理学通讯,2006,42 (4): 690.

[4] 莫昭展,蒋　波,何小燕,等.流苏石斛茎段组织培养的初步研究[J].安徽农业科学, 2007,35(33) :10704-10706.

[5] 傅玉兰,张志平,姚　萍.春石斛组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(3):464-465.