

流苏石斛茎段组织培养的初步研究

莫昭展¹, 蒋波¹, 何小燕¹, 符韵林² (1. 玉林师范学院, 广西玉林 537000; 2. 广西大学, 广西南宁 530001)

摘要 对流苏石斛茎段的添组织培养进行了初步研究。结果表明, 在诱导茎段腋芽萌发中, 以 MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 效果最好; 在芽增殖阶段, 以 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 增殖效果最佳; 在研究附加物对无菌苗增殖影响时, 添加 15% 的椰乳可有效提高芽的增殖率。

关键词 流苏石斛; 茎段; 组织培养

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)33-10704-03

Primary Study on Tissue Culture of Stem Segments of *D. fimbrialum* Hook

MO Zhao-zhan et al (Yulin Normal College, Yulin, Guangxi 537000)

Abstract The stem segments of *D. fimbrialum* Hook used as explants were studied. The results showed that: MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L was optimal for bud induction, MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L was the best for bud multiplication. While studying the influence of the complement on the seeding multiplication, it showed that adding 15% coconut juice can get the best effect of enhancing the coefficient of the multiplication.

Key words *D. fimbrialum* Hook.; Stem segments; Tissue Culture

流苏石斛(*D. fimbrialum* Hook.), 又名马鞭石斛、大黄草、流苏棒, 常附生于岩石上或树干上, 主要分布在广西、贵州、云南等地^[1]。流苏石斛具有较高的药用价值, 随着市场需求量的不断增加, 大量野生资源被采挖, 该物种已列为珍稀濒危种。目前对流苏石斛组织培养的很少^[2]。笔者在总结前人研究的基础上, 利用植物生长调节物质处理流苏石斛, 以期在短期内提供大量的试管苗, 通过人工栽培确保流苏石斛资源的保持和可持续利用。

1 材料与方法

利用流苏石斛茎段进行组织培养的步骤, 可归纳为: 材料的选取→外植体的消毒→接种→诱导芽的萌发→芽的分化与增殖→根的诱导。

1.1 材料 材料来源于广西十万大山的野生流苏石斛, 选取长势健壮, 叶片呈深绿色, 植株高 10~12 cm, 具有 10~13 片真叶, 无病变的流苏石斛植株。

1.2 方法 均以 MS 作为基本培养基, 添加蔗糖 2.50%, 琼脂 0.71%, 根据培养目的添加不同的植物生长调节物质, 培养基 pH 值为 5.6, 培养室温度 (25±2)℃, 光照强度 1 500~2 000 lx, 湿度为 60%~70%, 光照时间 12 h/d。

1.2.1 不同消毒方法对流苏石斛消毒效果影响的试验设计。 剪取长势大致相同的野生流苏石斛植株, 把植株上的叶梢剥取干净, 剪去靠近植株根部约 1/3 的茎^[3], 只留下中上部 2/3 的茎备用。用自来水把茎上的泥沙冲洗干净, 然后置于洗洁精溶液中浸泡 20 min, 刷洗干净, 于自来水下冲洗 3 min。把茎剪成 1.0~1.2 cm 的小茎段, 每节茎段包含一个节间。在超净工作台上对处理好的茎段按以下 3 种不同的方法进行消毒。每种方法试验 50 个茎段, 每瓶接种 1 个茎段, 15 d 后统计试验。

1.2.2 不同浓度激素对流苏石斛腋芽萌发影响的试验设计。 ①先用 0.1% 的升汞消毒 8 min, 取出用无菌水冲洗 5 次, 再用 75% 的酒精浸泡 30 s, 用无菌水冲洗 3 次; ②先用 75%

的酒精浸泡 30 s 后用无菌水冲洗 3 次, 再用 0.1% 的升汞消毒 8 min, 取出用无菌水冲洗 5 次; ③先用 75% 的酒精浸泡 30 s 后用无菌水冲洗 3 次, 再用 0.2% 的升汞消毒 8 min, 取出用无菌水冲洗 5 次。

把消毒好茎段两端的坏死组织切去, 使茎段长度维持在 0.8~1.0 cm, 然后分别接种于 14 种不同激素比例的培养基中培养(表 2), 每种培养基接种 10 瓶, 每瓶接种 1 个外植体, 30 d 后统计试验数据。

1.2.3 不同浓度激素对流苏石斛腋芽增殖及分化影响的试验设计。 从光照培养室中取出已萌发出腋芽的茎段, 分成长势相似的不同级别: 以苗高 0.8~1.0 cm, 具有 1~2 片真叶, 未完全舒展, 叶色淡绿色的植株为一级; 以未形成真叶, 还是幼芽或芽团的形态, 呈浅黄绿色者为另一级别。把它们分别接种于不同浓度的激素培养基中(表 3), 每种培养基接种有不同级别长势的无菌苗。在接种时, 已长成苗的可以把原老茎段切去, 芽太小的只需把老茎段变褐部分切去即可, 不宜把整个老茎段切掉, 处理好后直接接种于培养基中。每种培养基接种 8 瓶, 每瓶接种 1 株, 60 d 后观察记录试验数据。



图 1 流苏石斛第一代无菌苗

1.2.4 不同附加物对流苏石斛无菌苗增殖影响的试验设计。 从光照培养室中选取苗高 1.5~2.2 cm, 具有 5~7 片真叶、叶色浓绿的第一代无根无菌苗为试验材料(见图 1)。在相同激素配比的条件下, 分别接种于含有相同浓度的不同附加物提取液的培养基中(表 4)。附加物提取液的制备: 准确称量 150 g (按配制 1 L 培养基计), 洗净留皮,

用刀切成小块, 加入适量的蒸馏水, 煮沸 30 min, 用纱布过滤一次, 保留滤液, 滤渣继续加入蒸馏水, 煮沸 30 min 即可, 第二次过滤, 去渣取滤液, 二次滤液混合不超过所配制培养基体积的 4/5; 椰乳则按每升培养基量取 150 ml 即可^[4]。每种培养基接种 9 瓶, 每瓶接种 1 株小苗, 30 d 后对所得的结果进行统计记录。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法对流苏石斛消毒效果的分析 茎段接种

基金项目 广西教育厅科技项目; 玉林师范学院博士启动项目。

作者简介 莫昭展(1974-), 男, 广西玉林人, 博士, 副教授, 从事植物种质资源利用的教学与研究工作。

收稿日期 2007-06-11

培养 3 d 后,可观察到茎段与培养基表面接触处出现污染的现象,菌斑逐渐扩大;5 d 后,个别茎段开始由绿色逐渐变成淡黄色,进而变成桔黄色而出现死亡现象;15 d 后,对茎段的污染数及死亡数进行统计。

表 1 不同消毒方法对流苏石斛消毒效果的影响

消毒方法	污染数//瓶	死亡数//瓶	污染率//%	存活率//%
①	19	2	38	96
②	28	0	56	100
③	16	9	32	82

注:每处理 50 瓶。

结果表明(表 1):方法①,即先用 0.1% 的升汞消毒 8 min,后用 75% 的酒精浸泡 30 s 的消毒效果最好。方法①与方法②所使用的消毒剂种类与浓度一样,而对外植体的作用

顺序相反,方法①的消毒效果较好,可能是升汞先作用而改变植物细胞的通透性或细胞周围的 pH 值,使得后作用的酒精对微生物的作用力加强,致使茎段出现死亡现象,但消毒效果更彻底;方法③的污染率虽然更低,但由于升汞的浓度加大而外植体的死亡率也随之升高,可能是 Hg^{2+} 浓度加大,与菌体的作用加强,使菌体蛋白变性更快,而植物细胞与 Hg^{2+} 作用更强而死亡。

2.2 植物激素对流苏石斛腋芽萌发的影响 带节茎段接种 9 d 后,节间开始萌动冒出白色芽点;15 d 后长出 0.3~0.5 cm 的芽;20 d 后 0.1~0.2 cm 大小的芽团逐渐由黄绿色变成白色,最终不再长大而死亡;25 d 后长成 0.7~0.9 cm,长有 2 片小叶,叶长 0.2 cm 左右,30 d 后统计试验结果,计算萌芽率和芽死亡率。

表 2 生长调节物质对流苏石斛腋芽萌发的影响

编号	处理//mg/L			萌芽率 %	芽死亡率 %	萌动时间 d	生长情况
	6-BA	NAA	2,4-D				
①	-	-	-	10	0	21	节间萌动有 0.1cm 芽点,乳白色
②	-	1.0	-	30	33.3	15	芽平均 0.2,淡绿色
③	1.0	1.0	-	20	0	13	最高 0.3cm,平均 0.2cm,淡绿色
④	2.0	1.0	-	40	25	11	最高 0.5cm,平均 0.3cm,淡绿色
⑤	3.0	1.0	-	20	0	9	最高 1.0 cm,平均 0.7cm,绿色
⑥	4.0	1.0	-	50	0	10	最高 0.7cm,平均 0.4cm,淡绿色
⑦	2.0	0.75	-	20	0	11	最高 0.5cm,平均 0.3cm,黄绿色
⑧	2.0	0.4	-	30	0	12	最高 0.7cm,平均 0.3cm,淡绿色
⑨	2.0	0.3	-	10	0	12	平均芽高 0.2,黄绿色
⑩	2.0	0.25	-	20	0	14	平均芽高 0.2,黄绿色
⑪	2.0	-	-	10	0	16	节间萌动有芽点,乳白色
⑫	-	-	1.0	50	60	10	0.2cm 大小芽团,浅绿色,有变透明后死亡现象
⑬	-	-	2.5	40	50	11	0.2cm 大小芽团,黄绿色,有变黄死亡现象
⑭	-	-	2.0	30	66.7	10	0.1cm 大小芽团,米黄色,有变透明后死亡现象

注:基本培养基为 MS。

由表 2 可见,不添加任何激素茎段也可以萌芽,在单独添加 6-BA 或 NAA 时,加快腋芽的萌发时间,同时对腋芽的萌发率有所提高,这说明外源激素有加快腋芽萌发及提高萌发率的作用。当 NAA 浓度为 1.0 mg/L 时,随着 6-BA 浓度的增加,芽萌发的时间越短,同时萌发率呈上升趋势,芽平均高度也越高;当 6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时,芽萌发时间最短;当 6-BA 浓度达到 4.0 mg/L 时,芽萌发率最高,但萌发时间较长,且平均高度呈下降趋势,芽的健壮程度较好;当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,随着 NAA 浓度的增加芽萌发时间越短,萌发率也呈上升趋势,NAA 1.0 mg/L 时最高。试验中②与④配比中出现芽死亡现象;在单独使用 2,4-D 的试验中发现,其诱导腋芽萌发率较之更高,这说明 2,4-D 更利于诱导腋芽萌发。在节间形成的芽呈团块状,继续培养至 60 d 时,出现拟原球茎的状态,呈绿色,但诱导成芽团为 0.1~0.2 cm 大小时芽团颜色逐渐变黄至白而死亡,死亡率较高。综合分析表明,采用 MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 来获得第一代无菌苗最合适。

2.3 不同浓度激素对流苏石斛腋芽增殖及分化效果的影响

试验表明,在 MS 培养基中添加单激素时,NAA 浓度为 0.5 mg/L 增殖效果最好,而 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时增殖效果最好。为了找到最佳增殖配方,笔者进行了双激素的试验。

表 3 生长调节物质对流苏石斛芽增殖及分化的影响

编号	处理浓度//mg/L			芽平均增 殖系数	生长情况
	NAA	6-BA	IBA		
①	0.1	1.0	-	7.00	簇生,不易分开,淡绿色
②	0.5	1.0	-	9.30	未完全分化,绿色,出现坏死
③	1.0	1.0	-	7.90	较少分化,松散,颗粒较小
④	0.1	2.0	-	9.27	分化完全,翠绿色,健壮
⑤	0.5	2.0	-	8.20	分化成芽,翠绿色,较壮
⑥	1.0	2.0	-	7.58	分蘖处出芽,长势较高一些
⑦	0.1	3.0	-	8.27	簇生,翠绿色,出现坏死
⑧	0.5	3.0	-	8.00	簇生,绿色
⑨	1.0	3.0	-	7.50	不易分化成芽,较紧密,深绿色
⑩	0.1	2.0	0.5	3.80	增殖缓慢,绿色,长有少量长根
⑪	0.1	2.0	1.0	4.23	增殖较慢,绿色,有根
⑫	0.1	2.0	2.0	4.20	分蘖处长芽较多,较弱,绿色,有根

在试验中,诱导萌发的芽接到培养基 10 d 后,芽点处开始膨胀;30 d 后,可观察到直径为 0.3~0.8 cm 大小的团块,周围凹凸不平,呈分化成芽的趋势,深绿色(图 2);60 d 统计试验结果时已分化成 1.5~2.0 cm 高的小苗。由表 3 可见,在单激素最佳浓度进行组合时,芽平均增殖系数最大,即增殖效果最好,但随着芽增殖数量的增加,丛生芽出现腐烂坏死的现象(图 3)。在 6-BA 浓度大于 2.0 mg/L 时,芽增殖系数随着 NAA 浓度的升高而有所下降;在 NAA 浓度大于 0.5

mg/L时,随着 6-BA 浓度的升高芽平均增殖系数有所下降,这与黄肇宇等^[5]研究结果相似。而较高浓度的 6-BA 也似有致使丛生芽坏死的现象,由此可见,较低浓度的 NAA 与 6-BA 组合更有利于流苏石斛腋芽的增殖,即 MS + 6-BA 2.0 mg/L +

NAA 0.1 mg/L 时增殖效果最佳(图 4),在最佳双激素组合中加入 IBA 时,芽平均增殖系数大大下降,且出现生根的现象(图 5),说明 IBA 有促进芽生根的作用,这与潘瑞炽研究结果相符。

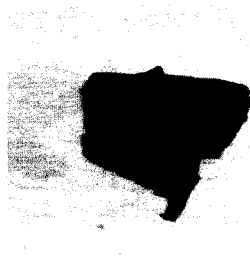


图 2 30 d 的芽生长情况

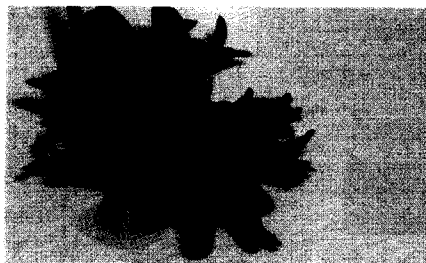


图 3 流苏石斛烂芽现象



图 4 60 d 的增殖情况



图 5 加入 IBA 生根的流苏石斛



图 6 从分蘖处长出的芽

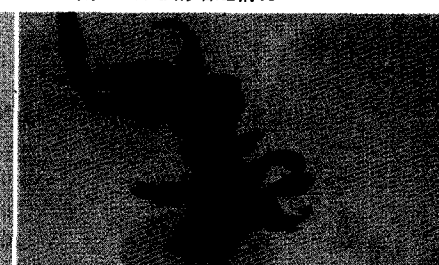


图 7 流苏石斛在香蕉中的增殖情况

试验发现,若接入这些组合培养基中的外植体为已长成有真叶的幼苗,则在增殖过程较易从分蘖处直接以长芽的方式增殖,而不再形成芽团继而分化成丛生芽(图 6),致使增殖效率大大降低。由此可见,以刚萌发成芽点时即转接入增殖培养基更利于增殖。

2.4 附加物对流苏石斛无菌苗增殖的影响 将仍带有老茎段的幼苗接种于添加有不同附加物的增殖培养基中,前 15d 基本无明显变化,25 d 后茎基部开始出现淡绿色芽,40 d 后某些茎基部出现白色根尖点,60 d 后统计结果。

表 4 不同附加物对无菌苗增殖的影响

编号	附加物	芽平均增殖系数	生长情况
①	香蕉汁	5.2	芽一般,叶尾枯死,微卷,长有短根
②	椰乳	4.9	芽健壮,长势较高,基部偶有类原球茎,绿色
③	马铃薯	4.1	芽较弱,绿色,有较长根

注:培养基均为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L。

由表 4 可见,香蕉提取液在增殖中效率最高,但在增殖过程中茎基部会变黄,有褐变现象,主苗的叶片尾部有枯死的情况(图 7),这可能与香蕉本身呈较碱性有关;在椰乳的苗样中,芽平均增殖系数稍低于香蕉,新生芽较为健壮,同时有类原球茎出现,这更利于增殖。说明椰乳更适合于流苏石斛无菌苗的增殖,而香蕉、马铃薯在生根中起到一定的作用。

3 结论与讨论

在植物体的生长过程中,激素是启动植物器官分化的一个非常重要的诱导因子,由于植物内源激素在体内的不均匀分布,造成其器官建成和分化方向也存在差异性。因此,通过添加不同种类和不同浓度的外源激素可以有效控制芽的萌发速率,达到增殖效率的目的。试验表明,稍高浓度的 6-BA 有利于缩短腋芽萌发的时间,而较低浓度的 6-BA、NAA 有利于芽的增殖;2,4-D 更易诱导形成原球茎,但易造成细胞老化及死亡;IBA 有利于生根。经试验筛选出:先用 0.1% 的升汞消毒 8 min,再用 75% 的酒精浸泡 30 s 是对外植体消毒的最好方法;培养基 MS + 6-BA 4.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L 在诱导腋芽萌发方面效果最好;以 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 增殖效果最佳;以加入椰乳的增殖效果最好。另外,因时间有限,未能得出外源激素对植株生根壮苗的影响及瓶苗移栽后的成活情况,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 姚建国. 石斛的来源和别名[J]. 中药天地, 2001, 10(10): 62.
- [2] 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.
- [3] 黄肇宇, 蒋波, 张存亮, 等. 金钗石斛老茎诱导无菌苗的初步研究[J]. 玉林师范学院学报, 2004, 25(5): 76-79.
- [4] 蒋波, 杨存亮, 黄捷, 等. 铁皮石斛原球茎生长分化及生根壮苗研究[J]. 玉林师范学院学报, 2005, 26(3): 66-69.
- [5] 黄肇宇, 蒋波, 詹源庆, 等. 生长调节物质对金钗石斛器官分化的影响[J]. 玉林师范学院学报, 2005, 26(3): 83-86.

本刊提示 文稿题名下写清作者及其工作单位名称、邮政编码;第一页地脚注明第一作者简介,格式如下:“作者简介:姓名(出生年-),性别,籍贯,学历,职称或职务,研究方向”。提供详细通讯地址、联系电话。