

细茎石斛组织培养研究

田雪琪, 张 铁

(文山师范高等专科学校 生化系, 云南 文山 663000)

[摘要] 以细茎石斛 (*Dendrobium moniliforme* (L.) sw.) 的种子进行离体培养, 获得无菌苗。截取无菌苗的茎段作为外植体, 进行组织培养。结果表明: 最适宜诱导细茎石斛原球茎生成的培养基为 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 2 mg/L NAA + 10% CM; 最适宜细茎石斛原球茎增殖及幼苗分化的培养基为 MS + 4 mg/L 6-BA + 1 mg/L KT + 1 mg/L NAA + 10% 马铃薯浸汁; 最适宜细茎石斛壮苗生根的培养基为 MS + 2 mg/L NAA + 10% 香蕉汁; 最适宜细茎石斛瓶苗移栽的基质为纯苔藓。

[关键词] 细茎石斛; 组织培养; 茎段; 原球茎

[中图分类号] Q944.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-3303(2007)03-0114-04

细茎石斛又名铜皮石斛, 是兰科石斛属多年生草本植物, 在我国分布广泛, 是一种优质的药用石斛品种。其主要的有效成分生物碱的含量测定与铁皮石斛中的生物碱含量近似, 而且含有较高的多糖、微量元素等活性物质^[1], 经研究表明细茎石斛多糖有降血糖的活性作用^[2]。在传统药材市场上常以细茎石斛作为霍山石斛和铁皮石斛的替代品。

石斛属植物的种子缺乏胚乳组织, 需与真菌共生才能萌发, 自然条件下发芽率一般不及5%^[3], 通常以分株繁殖, 繁殖系数极低, 远远不能满足商品化生产的要求。本试验以采自文山西畴的细茎石斛为实验材料, 对其快速繁殖技术进行一系列的研究, 为其快速及大规模工厂化生产提供依据。

1 材料与方 法

将还没开裂, 但种胚已成熟 (种龄约为4个月) 的细茎石斛蒴果用自来水冲洗干净后, 放置于超净工

作台上, 先用75%的乙醇浸泡1 min, 再用0.1%升汞溶液灭菌20 min, 无菌水冲洗3次, 无菌吸水纸吸干。切开果皮, 把粉末状的种子撒在已灭菌的培养基上, 经培养获得无菌苗。截取无菌苗的茎段作为外植体, 进行诱导培养, 以MS为基本培养基。在培养的不同阶段, 加入不同的激素(6-BA、NAA、KT)和添加物(香蕉泥、马铃薯浸汁、椰乳汁(CM)), 蔗糖30 g/L, 琼脂7 g/L, PH5.6, 培养温度(25±2)℃, 光照强度1800 Lx, 光照时间为10~12 h/d。

2 结果与分析

2.1 原球茎的诱导

截取通过种子无菌培养获得的无菌苗的茎段, 接种于诱导培养基中诱导原球茎的生成。为寻找最适宜诱导原球茎生成的培养基, 设计以下处理(表1)。每个处理接种茎段20个, 培养基为MS+10%CM, 接种40 d后统计结果。

表1 6-BA、NAA对细茎石斛原球茎诱导的影响

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种数	诱导生成原球茎 的外植体数	诱导率 (%)
1	0.1	1	20	5	25
2	0.1	1.5	20	8	40
3	0.1	2	20	10	50
4	0.5	1	20	11	55
5	0.5	1.5	20	13	65
6	0.5	2	20	16	80

[收稿日期] 2007-03-26

[作者简介] 田雪琪(1979-), 女, 云南宣威人, 助教, 主要从事植物细胞工程研究; 张 铁(1969-), 男, 彝族, 云南建水人, 高级实验师, 主要从事生物技术研究。

从表1可看出, 6-BA和NAA均对原球茎的诱导有影响, 合理组配能促进外植体形成原球茎. 6-BA的浓度0.5 mg/L效果优于0.1 mg/L, NAA浓度达到2 mg/L效果最佳. 处理6所诱导的原球茎最多, 诱导率最高. 因此, 最适宜诱导细茎石斛原球茎生成的培养基应为MS+0.5 mg/L 6-BA +2 mg/L NAA +10% CM.

2.2 原球茎的增殖及幼苗的分化

原球茎的增殖及幼苗的分化关系到细茎石斛繁殖速度的快慢、繁殖系数的高低. 为寻找最适宜细茎石斛原球茎增殖及幼苗分化的最适培养基, 设计以下不同处理(表2). 以MS为基本培养基, 附加KT1 mg/L. 每种处理接种30个原球茎, 培养40 d后统计结果.

表2 6-BA、KT、NAA对细茎石斛原球茎增殖及幼苗分化的影响

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	原球茎分化 个数(个)	分化率 (%)	原球茎的增殖 倍数
1	1	0.5	13	43	2
2	2	0.5	15	50	3
3	3	0.5	18	60	4
4	4	0.5	20	67	7
5	5	0.5	21	70	5.5
6	1	1	19	63	6
7	2	1	23	77	8
8	3	1	25	83	9
9	4	1	26	87	12
10	5	1	22	73	10

从表2可看出, 随着6-BA浓度的升高, 原球茎的分化率也随之增大, 但超过4 mg/L之后反而有所降低. 而NAA的浓度为1 mg/L的效果高于0.5 mg/L. 处理8、9、10中, 原球茎的增殖倍数及幼苗的分化率均较高, 其中以处理9效果最好.

试验还发现, 在附加3种不同的10%植物提取液的培养基中, 原球茎分化率顺序为马铃薯浸汁>香蕉汁>对照>椰乳汁. 在10%马铃薯浸汁培养基上, 分化的苗较健壮整齐, 叶色浓绿. 因此, 最适宜细茎石

斛原球茎增殖及幼苗分化的培养基应为MS+4 mg/L 6-BA+1 mg/L KT+1 mg/L NAA+10% 马铃薯浸汁.

2.3 壮苗生根

为了寻找细茎石斛无根苗生根壮苗的最适培养基, 设置以下不同处理(表2), 以MS为基本培养基, 附加NAA 2 mg/L. 将生长健壮, 高2~3 cm的无根苗, 接种于4种不同处理生根培养基上, 每种培养基接种30株, 培养40 d后统计结果:

表3 不同植物提取液对细茎石斛壮苗生根的影响

处理	NAA (mg/L)	植物提取液 (10%)	生根植株数 (株)	生根率 (%)	平均根数 (根)
1	2	香蕉汁	28	93	4.5
2	2	马铃薯浸汁	22	70	3.5
3	2	CM	14	47	2.5
4	2	对照	11	37	2.0

从表3可看出, 在壮苗生根培养基中添加NAA 2 mg/L(处理4)可使37%的无根苗长出根, 但是添加了香蕉汁(处理1)之后, 效果明显, 生根率达93%, 且每株苗平均有4.5条根, 根系粗壮, 组培苗健壮. 因此, 最适宜细茎石斛壮苗生根的培养基应为MS+2 mg/L NAA+10%香蕉汁.

2.4 移栽

当瓶苗长至3~5 cm高, 有3片以上叶和3~5条根时, 即可出瓶移栽. 为使瓶苗移栽后适应自然环

境, 出瓶前将瓶苗移至自然漫射光的室内炼苗7 d(最后1~2 d可把瓶盖全部打开或打开一半). 出瓶取苗时要小心操作, 不能折断根部, 从瓶中取出的苗须洗净附着在其根部的琼脂, 以免琼脂发霉引起烂根, 然后3~5株一丛种植到几种基质中(表4). 小苗移栽后应浇透水定根, 放入温室大棚内, 进行70%遮光处理, 一周后便可正常管理, 保持湿度70%~80%, 温度15~25℃.

表4 不同栽培基质对瓶苗移栽成活率的影响

处理	栽培基质	移栽苗数(株)	成活苗数(株)	成活率(%)
1	细纱	50	10	20
2	珍珠岩	50	21	42
3	纯苔藓	50	40	80

纯苔藓透气性、保水性均较好, 是较好的栽培基质。从表4看出, 移栽在纯苔藓上的瓶苗成活率较其他两重基质高, 可达80%。因此, 最适宜细茎石斛瓶苗移栽的基质为纯苔藓。

3 小结

① 在无菌播种的MS培养基中, 不附加激素和植物提取液, 种子也能萌发形成原球茎, 而用外植体诱导原球茎时, 激素的配比很关键。6-BA和NAA均对原球茎的诱导有直接影响, 6-BA的浓度0.5 mg/L效果优于0.1 mg/L, NAA浓度达到2 mg/L效果最佳。实验结果表明: MS+0.5 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+10% CM是诱导细茎石斛原球茎生成的最适宜培养基。

② 原球茎的增殖及幼苗的分化是细茎石斛繁殖速度的快慢、繁殖系数的关键。随着细胞分裂素6-BA浓度的升高, 增殖倍数也在增加, 但超过4 mg/L之后反而有所降低; 当6-BA的浓度达4 mg/L时, 增殖达12倍, 同时苗分化率也达87%。而生长素NAA的浓度为1 mg/L的效果高于0.5 mg/L。在附加3种不同的10%植物提取液的培养基中, 原球茎分化率顺序为马铃薯浸汁>香蕉汁>椰乳汁。在10%马铃薯浸汁

培养基上, 分化的苗较健壮整齐, 叶色浓绿。最适宜细茎石斛原球茎分化的培养基为MS+4 mg/L 6-BA+1 mg/L KT+1 mg/L NAA+10% 马铃薯浸汁。

③ 生长素NAA和植物提取液(香蕉汁)对细茎石斛的壮苗生根起重要作用, 两者合理组配既能壮苗又能促根, 达到苗健壮、根粗壮。最适宜细茎石斛壮苗生根的培养基应为: MS+2 mg/L NAA+10% 香蕉汁。

④ 瓶苗移栽的关键是选取较适宜其生长的栽培基质。细茎石斛喜较高的空气湿度, 但基质又不能过于潮湿或干燥, 否则根部易腐烂或干枯。纯苔藓既疏松透气又保水, 是一种较理想的移栽基质。

[参考文献]

- [1] 陈云龙, 张铭等. 细茎石斛不同部位有效成分及分布规律研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26, (10): 709-710.
- [2] 陈云龙, 何国庆等. 细茎石斛多糖的降血糖作用[J]. 浙江大学学报, 2003, 30, (6): 693-696.
- [3] 张明, 夏鸿西等. 石斛组织培养研究进展[J]. 中国中药杂志, 2000, 25, (6): 323-326.

Tissue Culture of *Dendrobium Moniliforme*

TIAN Xue-qi, ZHANG Tie

(Department of Biochemistry, Wenshan Teachers' College, Wenshan Yunnan 663000, China)

Abstract: The research got the aseptic seedling by isolated culture of the seeds of *Dendrobium moniliforme*, and then conducted tissue culture on the stalk cut from the aseptic and used as explants. The result indicated that, the culture medium most suitable for the production of PLB (Protocorm-liked body) on *Dendrobium moniliforme* was MS+0.5 mg/L 6-BA+2 mg/LNAA+10% CM; the culture medium most appropriate for the seedling differentiation and the breeding of PLB was MS+4 mg/L6-BA+1 mg/LKT+1 mg/LNAA+10% tomato-soaking liquid; the culture medium most suitable for the rooting of sturdy seedling was: MS+2 mg/LNAA+10% banana juice; the medium favorable for the transplanting of *Dendrobium moniliforme* seedling was pure moss.

Key words: *Dendrobium moniliforme*; tissue culture; stalk; PLB (Protocorm-liked body)