

珍稀林药植物齿瓣石斛 芽增殖和快繁研究

崔秋华¹ 孙永玉¹ 李昆^{1*} 周志美² 闫红¹ 黄传响³

(1. 中国林业科学研究院 资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224; 2. 云南省保山市森林资源管理总站, 云南 保山 678000; 3. 四川省攀枝花市林业局, 四川 攀枝花 617000)

摘要:以齿瓣石斛(*Dendrobium devonianum* Paxt) 组培苗为外植体, 对适合齿瓣石斛丛生芽增殖和生根的培养基进行筛选, 并建立齿瓣石斛无性繁殖体系。研究表明, 丛生芽增殖的最适培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 25 g/L 蔗糖, 在此培养基上, 增殖系数高, 幼苗生长状况好; 继代苗在 MS + 0.3 mg/L NAA + 20 g/L 蔗糖的培养基上生根效果最好, 根系长而粗壮; 适于组培苗炼苗的最佳基质为甘蔗渣, 两个月后, 成活率达 90% 以上。其研究结果对野生石斛资源的保护和合理开发具有重要的意义, 并为齿瓣石斛的规模化生产提供科学依据。

关键词:齿瓣石斛; 丛生芽增殖; 生根; 快繁研究

中图分类号: Q943.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)06-1139-05

A Study on Bud Proliferation and Rapid Propagation of Rare Forest Medicine Plant of *Dendrobium devonianum* Paxt

CUI Qiu-hua¹, SUN Yong-yu¹, LI Kun^{1*},
ZHOU Zhi-mei², YAN Hong¹, HUANG Chuan-xiang³

(1. Research Institute of Resource Insects, CAF, Kunming 650224, China; 2. Forestry Resources Station of Baoshan Forestry Bureau, Baoshan 678000, China; 3. Panzhihua Forestry Bureau, Sichuan Province, Panzhihua 617000, China)

Abstract: By using the tissue culture seedlings of *Dendrobium devonianum* Paxt as explant to filter the best medium for bud proliferation and rooting, the vegetative propagation system of *Dendrobium devonianum* Paxt was established. The results showed that: the optimal medium for proliferation of multiple buds was MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + Sucrose 25 g/L. On this medium, the multiplication coefficient was high, and seedling grew well; subculture seedlings rooted well on the medium of MS + NAA 0.3 mg/L + sucrose 20 g/L, the roots were long and thick; the best hardened matrix for seedlings was sugar cane residue. Two months later, the survival rate was over 90%. The study has great significance in protection and rational exploitation of wild *Dendrobium* resources, and provides a scientific basis for large-scale production of *Dendrobium devonianum* Paxt.

Key words: *Dendrobium devonianum* Paxt; buds proliferation; root; propagation

收稿日期: 2011-09-06 修回日期: 2011-10-17

基金项目: 科技部农业成果转化基金项目(2008GB24320419)

作者简介: 崔秋华(1984—), 女, 硕士生, 主要从事种苗培育研究, E-mail: qiuhacu2012@126.com; * 通讯作者: 李昆, 研究员, E-mail: caflkun@163.com。

石斛为兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)植物,具有较高的药用价值,我国在原来74种2变种的基础上,增加了10个新种,即86种^[1],其中有51种具有药用价值^[2]。齿瓣石斛(*Dendrobium devonianum* Paxt.)是近年来开发应用的药用石斛,又名紫皮石斛、大黄草,主要分布于我国的云南、广西、贵州等省,缅甸、越南、老挝、泰国也较多,有报道认为其质量不亚于铁皮石斛(*D. officinale* Kimura)^[2]。

随着对药用石斛资源的深入研究,对石斛原材料的需求日趋增长,齿瓣石斛作为药用石斛的佳品^[3],资源更为稀缺。由于齿瓣石斛生长条件有其特殊性,野生齿瓣石斛被过度采挖利用,加之种子小,无胚乳,自然繁殖率低和苗木生长缓慢等特点,人工栽培技术还不成熟,种苗数量严重不足,制约了齿瓣石斛苗规模化发展。采用组织培养技术建立快繁体系,可在短期内获得大量优质的组培苗,对其规模化生产有一定的参考价值,有关齿瓣石斛的组织培养研究有少量报道,主要集中于齿瓣石斛的种子无菌萌发研究^[3-6],但对齿瓣石斛芽增殖的研究未有详细报道。本实验以组培苗为材料,进行丛生芽增殖和快繁研究,筛选最适的增殖和生根培养基以及炼苗基质,以此获得大量的组培苗,以达到快速繁殖的目的。

1 植物材料

供试材料为齿瓣石斛(*Dendrobium devonianum* Paxt.)组培苗。

2 培养基成分与培养条件

实验所用的增殖培养基6.8 g/L的琼脂,生根培养基含7 g/L的琼脂粉,增殖和生根的两种培养基的pH值均为5.8,并在121℃高压灭菌20 min。培养温度为(25±1)℃,光照强度为2 000 Lx,光照时间为16 h。

2.1 丛生芽增殖

以MS为基本培养基,组培苗为外植体进行增殖培养,采用正交设计,6-BA、NAA和蔗糖的不同浓度组合见表1,每种培养基接种20瓶,每瓶接种3丛(每丛5株苗),3次重复。接种30 d后观察芽的生长状况,并调查幼苗的苗高生长量、增殖系数等,筛选出适合丛生芽增殖的最适激素配比和蔗糖质量浓度。

2.2 生根培养

以1/2MS为基本培养基,NAA的质量浓度设置

为:0.1 0.3 0.5 1.0 1.5 mg/L,当生长健壮的丛生芽长到3 cm以上时,将其分割成每丛3株苗,然后分别转入含有不同浓度的NAA的生根培养基中,培养40 d后调查幼苗的生根情况和生根数量。

2.3 炼苗和移栽

当齿瓣石斛组培苗根长到1.5 cm以上且根数达到3条以上时可进行炼苗和移栽。先将组培苗移入具有散射光的地方在闭瓶炼苗6 d,接着松开瓶口1 d,然后逐渐将瓶口全部打开,这个过程需要2~3 d,最后敞开口炼苗1 d,以使幼苗逐渐适应外界环境。组培苗经过瓶内炼苗后,用温水洗净根系附着的培养基,移栽到经过高锰酸钾灭菌的4种基质(苔藓、甘蔗渣、椰丝、腐殖土)中,移到温室中进行培育,先用遮阳网遮光1个月,可揭开遮阳网,每天喷雾3次。移栽后7 d,叶面喷施1/5MS营养液,以后每隔7 d喷施1次,并进行病虫害防治。分别30 d和60 d后观察幼苗生长状况,统计成活率。

表1 不同浓度的激素和蔗糖正交设计组合

Tab.1 The combination of orthogonal design in different concentrations of hormones and sucrose

组合 Combination	ρ (细胞分裂素) / (mg · L ⁻¹) 6-BA	ρ (生长素) / (mg · L ⁻¹) NAA	ρ (蔗糖) / (g · L ⁻¹) Sucrose
1	1	0.3	20
2	1	0.5	25
3	1	1.0	30
4	1.5	0.3	25
5	1.5	0.5	30
6	1.5	1.0	20
7	2	0.3	30
8	2	0.5	20
9	2	1.0	25

3 结果与分析

3.1 增殖培养

植物细胞或组织在离体培养条件下往往缺乏合成生长素和细胞分裂素的能力,因此植物组织培养中为了达到促进细胞生长、分裂的效果,在多数情况下需要同时使用生长素和细胞分裂素2种生长调节剂^[7]。糖作为碳源,为细胞提供合成新化合物的碳骨架,为细胞的呼吸代谢提供底物与能源,而且糖

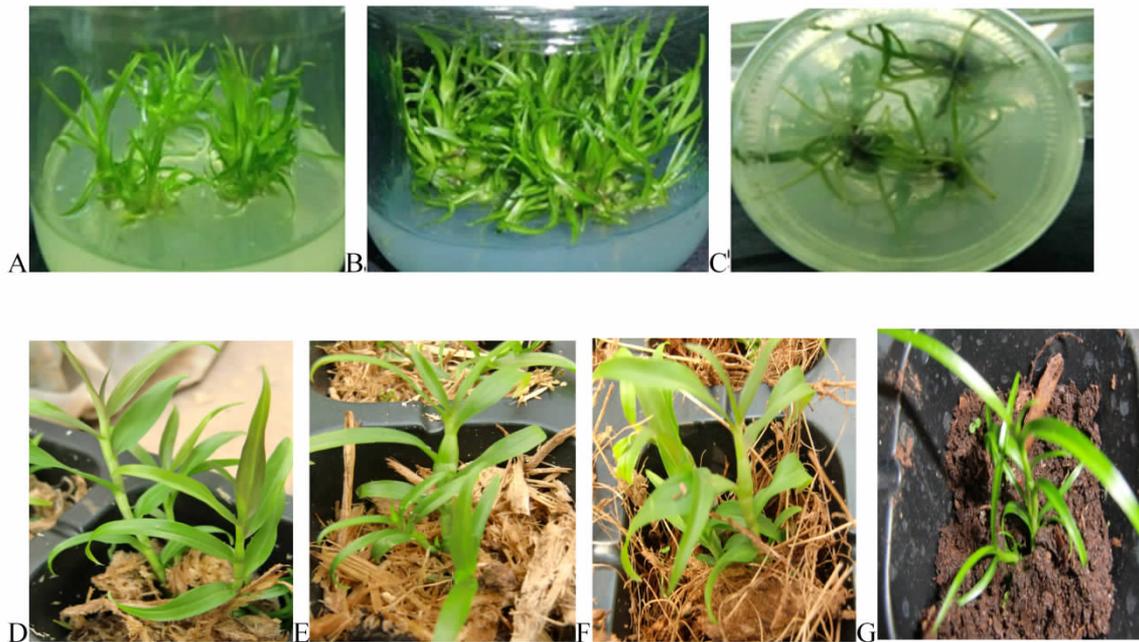
表2 不同激素组合和蔗糖质量浓度对丛生芽增殖的影响

Tab.2 Effects of different hormone combinations and sucrose mass concentration on proliferation of *Dendrobium devonianum* Paxt.

组合 Combination	ρ (细胞分裂素) / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 6-BA	ρ (生长素) / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) NAA	ρ (蔗糖) / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Sucrose	增殖系数 Proliferation coefficient	植株长势 Plant growth
1	1.0	0.3	20	2.9 ± 0.07	++
2	1.0	0.5	25	3.3 ± 0.09	+++
3	1.0	1.0	30	1.2 ± 0.08	+
4	1.5	0.3	25	2.1 ± 0.07	+
5	1.5	0.5	30	2.4 ± 0.06	++
6	1.5	1.0	20	2 ± 0.04	+
7	2.0	0.3	30	2.4 ± 0.09	
8	2.0	0.5	20	2.2 ± 0.05	++
9	2.0	1.0	25	2.5 ± 0.09	++

表中增殖系数代表平均值 \pm 标准偏差。+ : 长势一般; ++ : 长势良好; +++ : 长势优,无+ : 长势。

Date in the table represent average value \pm SD. + Represents the general growing; ++ Represents well growing; +++ Represents excellent growing; No + Represents poor growing.



A 芽增殖; B 丛生芽; C 生根培养; D ~ G 炼苗移栽, 炼苗基质依次为为苔藓、甘蔗渣、椰丝、腐殖土。

A Bud proliferation; B Multiple shoots; C Root culture; D ~ G The transplanted plantlet, Hardened matrix followed by the moss, bagasse, coconut, humus.

图1 齿瓣石斛组织培养与快速繁殖

Fig.1 Tissue culture and rapid propagation of *Dendrobium devonianum* Paxt.

还用以维持一定的渗透势,是培养物渗透环境的主要调节者^[8]。植物组织培养一般采用蔗糖、果糖、葡萄糖作为碳源,而蔗糖是生长效果最好的^[9]。将外植体接种到含有不同激素组合和蔗糖浓度的MS培养基上(图1A)接种30 d后进行观察,统计结果显示(表2)通过正交分析,得出培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+25 g/L蔗糖时,生长效果最好(图1B)丛生芽苗数量多,幼苗翠绿,生长旺盛,平均增殖系数达到3.3,处理3增殖系数最低,幼苗长势一般。实验中发现,激素6-BA和NAA的比率过高时,容易脱分化,形成较多黄绿色的原球茎,增殖形成幼苗数量减少,激素比例为1时,增殖系数低。因此,本实验得出的适宜于齿瓣石斛丛生芽增殖的最佳培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+25 g/L蔗糖,可为石斛的规模化生产提供科学的参考依据。这与王兰新等^[4]和李军萍等^[5]对齿瓣石斛组织培养的研究结论有差别。

3.2 生根培养

从表3可以看出,继代苗在不同浓度的NAA培养基上生根效果有差别。当NAA浓度为0.3 mg/L时,生根效果最好,平均生根率达92%,根数多,根系长而粗壮(图1C);当NAA浓度>0.3 mg/L时,随着浓度的增加,生根率降低,并且生根速度慢,根数少,根短,部分根尖端有瘤状突起。实验中观察到,生根培养10 d后,幼苗基部愈伤组织膨大,有呈浅黄绿色的根开始长出。由此得出,齿瓣石斛生根壮苗培养时,添加NAA的最适浓度为0.3 mg/L,能达到良好的生根效果,这与姚丽娟等^[10]对大花蕙兰生根壮苗研究时得出的结论类似。

表3 不同浓度NAA生根培养结果
Tab.3 The results of rooting culture on different concentrations of NAA

$\rho(\text{萘乙酸}) / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ NAA	生根率/% Rooting	根数 Root number	根长/cm Root length	生根特征 Root characteristics
0.10	84 ± 1.20	3 ± 1.10	1.6 ± 0.50	根系粗壮
0.30	92 ± 0.85	4 ± 1.00	2.0 ± 0.30	根系长而粗壮
0.50	73 ± 1.50	2 ± 0.90	1.2 ± 0.60	根系粗壮
1.00	15 ± 2.30	2 ± 0.95	0.7 ± 0.9	根系短且部分根尖端有瘤状突起
1.50	8 ± 2.10	2 ± 1.2	0.4 ± 1.2	根系短且部分根尖端有瘤状突起

表中数据代表平均值 ± 标准偏差。

Date in the table represent average value ± SD.

3.3 炼苗移栽

由表4可以看出,不同移栽基质对齿瓣石斛的炼苗成活率和幼苗生长状况有影响(图1D~G)。齿瓣石斛组培苗移栽后一个月,在pH为6.4的甘蔗渣基质上移栽成活率最高,达98%,幼苗翠绿,生长状况优;其次是pH为5.2的苔藓和pH为5.2的椰丝,腐殖质土上,成活率最低,为76%,有部分叶片变黄。移栽后两个月时,炼苗基质甘蔗渣上的成活率为96%,腐殖土上的成活率最低,为72%。可能原因是甘蔗渣基质粗糙,并含有少量的糖分,不仅疏松透气,具有保水性,还可以为幼苗提供一定的营养;椰丝空隙大,与根的接触面积小,影响水分和养分的吸收;腐殖土颗粒小,保水强,不利于根部透气,根系易腐烂,因此得出,甘蔗渣和苔藓是齿瓣石斛最佳炼苗基质。

表4 不同基质移栽对齿瓣石斛成活率的影响

Tab.4 Effects of Different matrixes on Survival rate of *Dendrobium devonianum* Paxt

基质类型 Matrix type	pH 值	成活率/% Survival rate		植株长势 Plant growth
		1个月 One month	2个月 Two month	
苔藓	5.4 ± 0.20	92 ± 0.80	90 ± 0.60	++
甘蔗渣	6.4 ± 0.10	98 ± 0.50	96 ± 0.50	+++
椰丝	6.2 ± 0.10	85 ± 1.20	82 ± 0.90	++
腐殖土	5.6 ± 0.20	76 ± 1.80	72 ± 1.20	+

表中数据为平均值 ± 标准偏差。+ : 长势一般; ++ : 长势良好; +++ : 长势优; 无 + : 长势。

Date in the table represent average value ± SD. + Represents the general growing; ++ Represents well growing; +++ Represents excellent growing; No + Represents poor growing.

4 结论与讨论

通过对齿瓣石斛丛生芽增殖的研究,得出丛生芽增殖的最适培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 25 g/L 蔗糖,表现为具有较高的增殖系数,幼苗翠绿,生长状况较好。

齿瓣石斛生根培养时,培养基中添加不同浓度的 NAA,影响齿瓣石斛的生根率,当 NAA 的浓度为 0.3 mg/L 时,有利于丛生芽生根,浓度过高,生根效果较差,可以看出 NAA 可促进丛生芽生根,生根的效果受到 NAA 浓度水平的影响,这与 Lal^[11] 和 Dannis James^[12] 的报道类似。

齿瓣石斛组培苗炼苗时,不同的移栽基质影响成活率。甘蔗渣疏松透气,是齿瓣石斛炼苗的最佳基质,炼苗 2 个月,成活率达 90% 以上,腐殖土颗粒较细,具有较强的保水性,不利于根部透气,易导致根系腐烂,影响炼苗成活率,不适宜齿瓣石斛的炼苗。

参考文献:

- [1]李振坚,王国平,缪昆.中国濒危石斛属植物资源多样性及分布[R/OL].中国乡村经济网,2009-09-21.
- [2]包雪声,顺庆生,陈立钻.中国药用石斛彩色图谱[M].上海:上海医科大学出版社,复旦大学出版社,2001:1-108.
- [3]丁长春.齿瓣石斛的胚培养技术及其快速繁殖研究[J].热带农业科技,2004,27(3):10-11.
- [4]王兰新,曾彩云.齿瓣石斛的培养[J].林业调查规划,2006,31(5):128-130.
- [5]李军萍,杨燧民.齿瓣石斛种子培养及扩繁技术研究[J].河北农业科学,2008,12(7):52-53.
- [6]孙永玉,李恒安,闫红,等.齿瓣石斛的无菌播种和组织培养[J].植物生理学通讯,2009,45(10):1017-1018.
- [7]崔凯荣,刑更生,周攻克,等.植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节[J].遗传,2000,22:349-354.
- [8]刘冬云,史宝胜,李银华,等.不同碳源及 PP₃₃₃, CA₃ 对山丹组培苗续茎增大的影响[J].河北农业大学学报,2005,28(2):32-35.
- [9]侯学文,郭勇.接种量及蔗糖浓度对悬浮培养玫瑰茄细胞生长的影响[J].华南农业大学学报,2000,21(4):51-54.
- [10]姚丽娟,陈义增,徐晓薇,等.大花蕙兰生根壮苗及落地移栽试验[J].浙江农业科学,2006,2:133-135.
- [11]Lal N. Assessment of IAA, IBA and NAA for in vitro rooting and plantlet growth in sugarcane[J]. Sugar, 1992, 42: 205-208.
- [12]Dannis P S, James F H. Growth of rooted 'Galla' apple micro cutting in vitro as influenced by initial adventitious shoot count [J]. Hort Sci, 1993, 18: 664-666.

声 明

因在我刊《江西农业大学学报》2005年第27卷第2期发表的《均匀设计法优化益生菌菌种比例的研究》一文已在它刊发表,应第一作者要求,经我社同意,决定作出撤稿处理,并请求中国知网等相关数据库卸载该文。

特此声明!

江西农业大学期刊社

2011年12月1日