

潘 梅,吕德任,姜殿强,等.铁皮石斛袋式组培快繁技术研究[J].江苏农业科学,2013,41(10):37-40.

铁皮石斛袋式组培快繁技术研究

潘 梅,吕德任,姜殿强,黄 赛,王景飞,戚华莎

(海南省农业科学院园林花卉研究所,海南海口 571100)

摘要:利用聚丙烯透明薄膜袋作为培养容器,铁皮石斛丛生芽作为外植体,研究铁皮石斛袋式组培快繁的适宜培养基。结果表明:适宜原球茎(PBL)增殖的培养基为 MS + 活性炭 0.5 g/L;适宜原球茎分化的培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 活性炭 0.5 g/L;培养基 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 香蕉泥 100 g/L + 活性炭 0.5 g/L,对丛生芽的生长及增殖效果好;适合组培苗生根的培养基为 MS + NAA 2.0 mg/L + 香蕉泥 100 g/L + 活性炭 2.0 g/L。

关键词:铁皮石斛;袋式组织培养;快速繁殖

中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0037-03

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.)是我国名贵中药,被称为“药界大熊猫”,具有免疫调节、延缓衰老等功效。不仅是大家熟悉的“脉络宁注射液”的必需原料,还是数十种中成药及保健品的必要原料。长期以来,人们用此药都是依靠采挖收集野生资源,不仅难以满足市场的需求,而且由于野生铁皮石斛自然繁殖率极低,致使铁皮石斛濒危灭绝。从 20 世纪 70 年代起,国内外有关机构便开始了铁皮石斛的研究工作,并取得了较大的进展。近年来,在浙江、云南、广西等地均有人工栽培铁皮石斛,由于种植密度大,种苗需求量极大,因此快速高效地繁育优质种苗尤为重要。目前有关铁皮石斛组织培养与快速繁殖的研究报道很多,但有关袋式培养的报道极少^[1-2]。我们以聚丙烯透明薄膜袋作为培养容器,研究铁皮石斛的组培快繁技术,为高效规模化培育铁皮石斛种苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

外植体为云南铁皮石斛瓶式培养的丛生芽。

1.2 培养容器

采用不透水耐高温高压的聚丙烯透明薄膜袋代替玻璃瓶进行组织培养,培养袋壁厚 0.05 mm,规格为 120 mm × 140 mm,培养基按常规技术配制后灌入培养袋中,然后装入用牛皮纸制成的外包装袋,于温度 121 ℃、压力 0.14 MPa 的高压锅灭菌 20 min,在超净工作台上取出按常规方法接种,用封口机进行密封后放入培养室培养。

1.3 培养基

以 MS 为基本培养基(生根培养基中设计了大量元素减

量的 1/2 MS 和 1/4 MS 培养基),根据试验目的添加不同浓度的 6-BA(6-苄基腺嘌呤)、NAA(萘乙酸)和 IBA(吲哚丁酸),有机添加物,附加蔗糖 30 g/L,卡拉胶 6 g/L,pH 值 5.8。

1.4 培养条件

材料接种后,在光照度 1 500 lx 光照下培养,光照时间 9 h/d,温度(25 ± 2) ℃。

1.5 培养方法

本研究将丛生芽切断接种在 MS + BA 2.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L 的培养基上诱导原球茎。原球茎增殖与分化试验每袋接种 5 团;丛生芽增殖试验以 2 个小芽为单位切分后接入培养基,每袋接种 6 块(密度试验除外);生根培养小苗高约 2 cm,单株接入各种培养基,每袋 10 株。所有处理均接种 10 袋,重复 3 次,定期观察记录,60 d 后统计结果。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛原球茎的增殖与分化

以 MS 为基本培养基,附加 6-BA 和 NAA 组成 7 种培养基。原球茎培养 30 d 后有明显的生长,60 d 的生长情况见表 1。从表 1 可以看出,在无激素培养基和只添加 NAA 0.2 mg/L 的培养基中,原球茎增殖快,分化少,其中以无激素培养基为最优(图 1)。原球茎在培养过程中均出现不同程度的分化,分化整齐度与激素的作用有关。单独使用 6-BA,原球茎分化少;6-BA 和 NAA 二者配合使用,能明显促进原球茎的分化,其中以低浓度 NAA 与高浓度 6-BA 配用效果好。在 NAA 0.2 mg/L 时,随着 6-BA 浓度的加大,原球茎的分化率也随之升高,6-BA 为 2.0 mg/L 时效果最好,分化率高,具有 2~4 片叶的分化苗占 90% 以上,而且分化整齐(图 2),因此,选择 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 作为原球茎的分化培养基。

2.2 丛生芽增殖

2.2.1 植物生长调节剂 6-BA 和 NAA 组合对丛生芽增殖的影响 以 MS 为基本培养基,设置 6-BA 0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L 和 NAA 0、0.2、0.5、0.8 mg/L 各 4 个浓度水平的配比,共 16 种处理,培养基中附加活性炭 0.5 g/L。小苗接入培养基中培养 15 d 后开始长出新芽,30 d 后芽增长明显,培养

收稿日期:2013-03-09

基金项目:2011 年海南省科学事业费项目(编号:琼财预[2011]207);2011 年海南省引进集成项目(编号:YJJC2011003)。

作者简介:潘 梅(1962—),女,广西隆安人,高级园艺师,研究方向为植物组织培养研究与开发。Tel:(0898)65380711;E-mail:panmei200@sina.com。

通信作者:姜殿强,硕士。Tel:(0898)65393907;E-mail:dqjiang2004@163.com。

表 1 不同培养基对铁皮石斛原球茎生长的影响

培养基	增殖倍数	原球茎生长情况
MS	9.65b	原球茎黄绿色,生长良好,分化少
MS + NAA 0.2 mg/L	8.35c	原球茎黄绿色,生长良好,分化较少,芽长 0.5 cm 左右
MS + 6 - BA 0.5 mg/L	7.45d	原球茎绿色,颗粒状,分化少,芽长 0.2 ~ 1.0 cm
MS + 6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L	5.40f	原球茎黄绿色,分化较多、不整齐,芽长 0.2 ~ 1.0 cm,2 ~ 4 片小叶
MS + 6 - BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L	6.85e	原球茎黄绿色,多数分化,分化整齐,芽长 0.5 cm 左右,2 片小叶
MS + 6 - BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L	7.05de	原球茎绿色,分化多,不整齐,芽长 0.2 ~ 1.0 cm
MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L	10.60a	基本上全部分化,整齐,芽长 1.0 cm 左右,2 ~ 4 片小叶

注:表中数据均为 3 次重复的平均值,不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

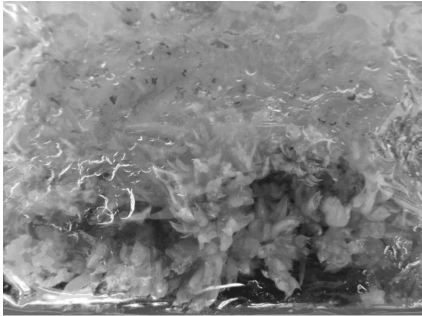


图1 铁皮石斛原球茎在MS培养基上的增殖

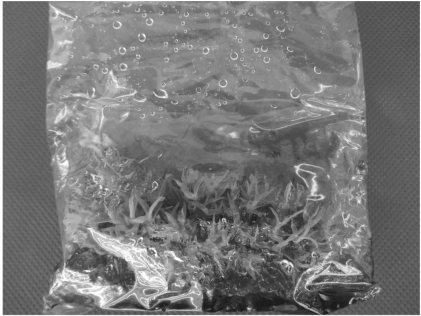


图2 铁皮石斛原球茎在 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上的分化

60 d 的生长情况见表 2。由表 2 可见,不同的 6 - BA 和 NAA 配比对铁皮石斛丛生芽增殖和生长的影响不相同,其中以 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 的组合增殖效果最好,增殖率最高(5.83),芽苗生长势好,叶色绿而健壮。方差分析结果表明,该组合的丛生芽增殖倍数与其他的 6 - BA 和 NAA 的配比组合差异显著,因此,适合铁皮石斛丛生芽增殖的植物生长调节剂的配比为 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L。

2.2.2 天然有机添加物对丛生芽增殖的影响 以 MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 活性炭 0.5 g/L 培养基作为对照,分别添加香蕉泥、椰子汁、马铃薯泥 100 g/L。表 3 结果表明,3 种有机添加物对铁皮石斛丛生芽的增殖有促进作用,培养 60 d 的增殖倍数均显著大于对照,其中椰子汁的增殖倍数最大,香蕉泥次之,马铃薯第三,添加 3 种有机物培养的铁皮石斛丛生芽均健壮,叶色浓绿(图 3)。方差分析结果表明,椰子汁和香蕉泥对丛生芽的增殖效果相近,由于香蕉价格较椰子低而且容易获得,因此,在工厂化生产铁皮石斛种苗时宜以香蕉泥作为有机添加物。

2.2.3 植入密度对丛生芽增殖的影响 以 MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 活性炭 0.5 g/L + 香蕉 100 g/L

表 2 不同植物生长调节剂组合对铁皮石斛丛生芽增殖的影响

植物生长调节剂组合		增殖 倍数	丛生芽生长情况
6 - BA (mg/L)	NAA (mg/L)		
0.5	0	3.90f	长势较好,芽整齐
0.5	0.2	4.46d	长势较好,芽整齐
0.5	0.5	4.40de	长势较好,芽较整齐
0.5	0.8	3.81f	长势一般,芽较整齐,根较多
1.0	0	3.78f	长势较好,根少
1.0	0.2	3.89f	长势好,芽绿、较壮,根较多
1.0	0.5	4.45d	长势差,芽细弱,根较多
1.0	0.8	4.58cd	芽矮小,叶短小,根多
2.0	0	4.39de	长势较差,根较少
2.0	0.2	5.83a	长势好,芽绿、较健壮
2.0	0.5	5.01b	长势好,芽绿、较健壮,根少
2.0	0.8	4.85bc	长势差,芽细弱
3.0	0	4.53d	长势差,芽细弱
3.0	0.2	4.21e	长势较好,根少
3.0	0.5	4.55d	长势一般,芽矮小,根较多
3.0	0.8	4.39de	长势较好,芽整齐,根多

表 3 不同天然有机添加物对铁皮石斛丛生芽增殖的影响

添加物	增殖倍数	丛生芽生长状况
香蕉泥	7.10a	芽整齐健壮
椰子汁	7.22a	芽整齐健壮
马铃薯泥	6.63b	芽健壮
对照	5.63c	芽整齐



图3 铁皮石斛丛生芽在添加有机物培养基上的增殖 为培养基,设计 3、6、9 丛/袋共 3 种接种密度,由表 4 可见,接种密度为 3 丛/袋时,丛生芽增殖倍数较低;当密度为 6 丛/袋时,丛生芽长势好,粗壮,增殖倍数最大,达到 7.01;当接种密度达到 9 丛/袋时,丛生芽细弱,一些幼苗出现畸形。这可能是铁皮石斛生长具有一定的群集效应,以及与营养物质竞争

表 4 不同植入密度对铁皮石斛丛生芽增殖的影响

密度 (丛/袋)	增殖倍数	丛生芽生长状况
3	6.76b	长势好,苗健壮,绿色
6	7.01a	长势好,整齐健壮,绿色
9	4.87c	长势较差,苗细弱,出现畸形,叶微黄

有一定的关系。因此,铁皮石斛丛生芽的接种密度不宜过疏或过密。

2.3 再生芽生根

2.3.1 再生芽生根基本培养基的选择 将丛生芽接入含 NAA 2.0 mg/L、活性炭 2.0 g/L 的 3 种不同基本培养基(分别

为 MS、1/2MS、1/4MS)中,15 d 后均开始生根。培养 20 d 后,1/2MS 和 1/4MS 培养基中的植株老叶开始出现黄化;培养 30 d 后,1/4MS 培养基中约有 30% 植株叶片黄化,而 1/2MS 培养基的植株黄叶数量增加很少;培养 60 d 时,1/4MS 培养基中出现死苗,1/4MS、1/2MS 2 种培养基中植株出现黄枯叶现象,可能是由于无机盐浓度降低、氮素不足的缘故。从培养 60 d 的生长情况看(表 5),MS 培养基中植株生根效果最好,植株长势好,叶色绿,生根数多,根系粗壮。方差分析结果表明,MS 培养基中植株在根长和生根率上与其他 2 种培养基差异不显著,但茎粗和株高上差异达到显著水平,生根数与 1/2MS 差异不显著,而与 1/4MS 差异显著。因此,铁皮石斛小苗的生根培养基宜选择 MS。

表 5 不同基本培养基对铁皮石斛组培苗的影响

基本培养基	生根数 (条)	根长 (cm)	生根率 (%)	茎粗 (cm)	株高 (cm)	生长状况
MS	4.58a	1.10a	100a	0.23a	3.67a	叶绿,根较粗
1/2MS	4.34a	1.09a	100a	0.20b	2.98b	少数叶变黄,根较粗
1/4MS	3.59b	1.10a	100a	0.19b	2.77b	苗弱、叶枯黄,出现死株,根细

2.3.2 植物生长调节剂种类和浓度对再生芽生根的影响 以 MS + 活性炭 2.0 g/L 培养基作为对照,附加 NAA 或 IBA 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 或添加香蕉泥 100、200 g/L,共 9 种处理。表 6 显示,2 种生长素对铁皮石斛的生根都有促进作用,高浓度生长素的促根效果更佳,随着生长素浓度的加大,生根条数、根长和株高都随之增加;2 种生长素的生根效果以 NAA 较优。培养基中添加香蕉泥 100 g/L 能明显促进生根,并且

根的质量好,组培苗生长健壮(图 4);培养基中添加高浓度的香蕉泥不利于组培苗的生长,苗长势差,枯黄叶多,根少而短。从方差分析结果看,NAA2.0 mg/L + 香蕉泥 100 g/L 处理与其他处理相比,在茎粗和生根率上差异不显著,但诱导根的数量,根的长度以及株高都显著增加,因此,铁皮石斛适宜的生根培养基为 MS + NAA2.0 mg/L + 香蕉泥 100 g/L + 活性炭 2.0 g/L。

表 6 不同浓度 NAA、IBA 及香蕉对铁皮石斛根系分化的影响

处理			生根数 (条)	根长 (cm)	生根率 (%)	茎粗 (cm)	株高 (cm)	组培苗生长状况
NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	香蕉 (g/L)						
0	0	0	2.88c	1.76f	96.7a	0.21a	2.97bcd	苗弱,根细
0.5	0	0	4.04b	1.98cde	100.0a	0.25a	3.46bc	长势一般,部分叶片枯黄,根细
1.0	0	0	4.37b	2.05bcd	100.0a	0.25a	3.50bc	长势较好,黄叶少,根较粗
2.0	0	0	4.54b	2.17b	100.0a	0.25a	3.72b	长势好,叶绿,根较粗
0	0.5	0	3.72b	1.85def	100.0a	0.20a	3.14cd	长势较好,黄叶较少,根细
0	1.0	0	3.87b	1.96cdef	100.0a	0.21a	3.50bc	长势较好,黄叶少,根较细
0	2.0	0	4.12b	2.14bc	100.0a	0.22a	3.65b	长势好,黄叶少,根较粗
2.0	0	100	6.20a	2.36a	100.0a	0.26a	5.36a	苗健壮,茎节明显,叶绿,根粗
2.0	0	200	2.29c	1.83ef	98.0a	0.22a	3.26bcd	长势差,枯黄叶多,根较粗

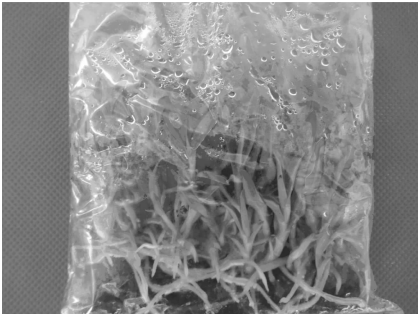


图4 铁皮石斛袋式生根苗

3 结论

植物生长调节剂对铁皮石斛的组织培养起着重要的作用,其中植物生长调节剂配比是影响芽诱导和增殖生长的主要因素,本试验中以 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 为最佳配比,原球茎分化和丛生芽继代增殖的效果最好,与郑宽瑜等^[3-8]在瓶式培养中的研究结果一致。仲磊等在铁皮石斛的袋式培养中生长素采用 IAA,认为 6 - BA 0.3 mg/L + IAA 0.1 mg/L 配比对芽的培养效果最好^[1]。在铁皮石斛的生根培养中,生长素对根的分化促进作用明显,不同学者在瓶式生根培养中所用生长素的种类和浓度不尽相同^[5-8]。仲磊等认

许建兰,周 懋,马瑞娟,等. 帚形山桃离体快繁技术研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):40-41.

帚形山桃离体快繁技术研究

许建兰,周 懋,马瑞娟,俞明亮,沈志军

(江苏省农业科学院园艺研究所,江苏南京 210014)

摘要:以帚形山桃春季嫩梢为材料,研究不同消毒方法对帚形山桃外植体污染率、死亡率、成活率的影响,探讨不同激素种类及浓度对芽增殖生长的影响。结果表明,先用 75% 乙醇处理茎段和茎尖 1 min,然后用 0.1% HgCl_2 消毒茎尖 12 min,用 0.1% HgCl_2 消毒茎段 18 min,茎尖和茎段成活率最高。最佳增殖培养基为 $\text{MS} + 1.0 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg/L IBA} + 20 \text{ g/L 蔗糖} + 5 \text{ g/L 琼脂粉}$,增殖系数可达 3.2,植株生长健壮,无玻璃化现象发生。

关键词:帚形山桃;离体快繁

中图分类号: S662.104⁺.3;Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0040-02

帚形山桃是山桃的变异类型,树干笔直、树皮光滑,观赏价值较高,同时也可作为观赏桃的优良砧木。由于帚形山桃开花早,加之近年春季气温不稳定,时常出现倒春寒,在长江流域及其以南地区很难收到帚形山桃的种子。目前已有关于桃及砧木组织培养研究^[1-4],但尚未见关于帚形山桃的报道。本研究以帚形山桃嫩梢为材料,探讨不同消毒方法及激素配比对帚形山桃试管苗生长的影响,并建立帚形山桃离体快繁体系,旨在为开发利用帚形山桃提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为帚形山桃,保存于江苏省农业科学院园艺研究所国家果树种质南京桃资源圃。

1.2 方法

1.2.1 外植体取材与消毒 帚形山桃春季芽萌发后生长一段时间,取其茎段和茎尖,先用实验室流水冲洗 2 h,然后用 75% 乙醇处理 1 min,无菌水清洗 5 次,采用 3 种不同消毒方法进行消毒。方法 1:用 0.1% HgCl_2 消毒 12 min;方法 2:用

0.1% HgCl_2 消毒 15 min;方法 3:用 0.1% HgCl_2 消毒 18 min。最后无菌水冲洗 6 次,分别将茎段和茎尖接种于初代培养基^[4]。每处理接种 30 个试管,2 周后调查茎段和茎尖的污染率、死亡率、成活率。

1.2.2 基本培养基的筛选 分别以 MS、WPM、F14 为基础培养基,添加相同浓度和配比的 $1.0 \text{ mg/L } 6\text{-BA}$ 和 0.5 mg/L IBA 。每处理接种 10 个试管,重复 3 次,30 d 后观察统计外植体生长情况。

1.2.3 生长素的筛选 以 MS 为基础培养基,添加 $1.0 \text{ mg/L } 6\text{-BA}$,添加不同种类生长素 IBA 和 NAA,浓度均设为 0.5 mg/L ,筛选适宜生长素。

1.2.4 诱导与增殖培养条件的筛选 以 MS 为基础培养基,添加不同种类、浓度的外源激素 6-BA (0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.5 mg/L)、IBA (0.5 、 1.0 mg/L),比较试管苗增殖情况。

以上所有培养基均加入 20 g/L 蔗糖 及 5 g/L 琼脂粉 ,灭菌前调节 pH 值为 5.8 , 121°C 下高压灭菌 20 min。温度为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$,光周期为 12 h/d,光照强度约为 $2\,500 \text{ lx}$ 。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒方法比较

从表 1 可见,相同消毒时间下,茎段的污染率明显高于茎尖,死亡率低于茎尖。随着 HgCl_2 消毒时间的延长,2 种外植体污染率均不断降低,死亡率不断提高。茎尖采用方法 1 消

收稿日期:2013-05-07

基金项目:农业部种质保护项目(编号:NB2013-2130135-07)。

作者简介:许建兰(1976—),女,江苏兴化人,硕士,助理研究员,主要从事桃新品种选育和种质资源研究。Tel: (025) 84390225; E-mail: jlxujsa1976@yahoo.com.cn。

为 $6\text{-BA } 0.3 \text{ mg/L} + \text{IAA } 0.1 \text{ mg/L}$ 最适合铁皮石斛袋式生根培养^[1];蒋慧萍等以 $1/2\text{MS}$ 为基本培养基, NAA 浓度为 2.0 mg/L 时袋式生根效果最好^[2],本试验结果表明以 MS 为基本培养基, NAA 浓度为 2.0 mg/L ,香蕉泥 100 g/L 时铁皮石斛袋式生根效果最好。

参考文献:

- [1] 仲 磊,徐宏强,刘海一. 铁皮石斛兰的袋式组织培养[J]. 林业科技开发,2006,20(4):72-73.
- [2] 蒋慧萍,庾韦花,张向军,等. 袋式培养在铁皮石斛组培苗生根中应用研究和效率评价[J]. 西南农业学报,2009,22(5):1420-1423.

- [3] 郑安瑜,邓君浪,赵 辉. 铁皮石斛快繁技术体系研究[J]. 云南农业科技,2009(增刊):57-59.
- [4] 蒋波杨,存 亮,黄 捷,等. 原球茎生长分化及生根壮苗研究[J]. 玉林师范学院学报:自然版,2005,26(3):66-69.
- [5] 李 莹,谭鹏鹏,彭方仁,等. 铁皮石斛组培快繁技术[J]. 林业科技开发,2012,26(1):96-99.
- [6] 杨立昌,乙 引,张宇斌,等. 铁皮石斛快速繁殖体系研究[J]. 北方园艺,2010,2(22):136-138.
- [7] 洪香娇,瑜晚之,熊正葵. 铁皮石斛的组织培养与快速繁殖洪香娇瑜晚之熊正葵[J]. 现代园艺,2008(7):9-10.
- [8] 戴小英,张淑霞,周莉荫,等. 铁皮石斛不同外植体组培快繁技术比较研究[J]. 中国农学通报,2011,27(10):122-126.