

邹娜,喻苏琴,王春玲,等. 铁皮石斛组织培养及试管开花研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):42-44.

铁皮石斛组织培养及试管开花研究

邹娜¹,喻苏琴¹,王春玲²,张露¹

(1. 江西农业大学园林与艺术学院,江西南昌 330045; 2. 江西农业大学农学院,江西南昌 330045)

摘要:以铁皮石斛茎段为外植体,进行腋芽的诱导及增殖,并使获得的无菌苗在试管中开花。结果显示:外植体灭菌 8 min 或 6 min 污染率相当,污染率可控制在 50% 以下;茎段外植体接种于 MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 培养基上,腋芽诱导率可达 95% 以上,接种于不同的开花诱导培养基上,铁皮石斛无菌苗均可在试管内开花,开花率在 17.18% ~ 35.37%。

关键词:铁皮石斛;组织培养;试管开花

中图分类号: S567.230.4⁺3;Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0042-03

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)为兰科石斛属多年生附生草本植物,花期 3—6 月,花型奇特。铁皮石斛在我国主要分布于江西、广西、广东、贵州、云南、安徽、浙江、湖南、陕西、河南和福建等地^[1]。铁皮石斛不仅可作为兰科观赏花卉,也是一种珍贵的中药材,民间有救命仙草、中华仙草的美称,以新鲜或干燥茎入药,具有滋阴清热、生津益胃、止咳润肺、免疫

调节、延缓衰老等功效^[2]。由于市场供应紧缺,铁皮石斛国际市场干品价目前已达 1 000 美元/kg 以上^[3]。

铁皮石斛种子极小、无胚乳,且生长条件十分苛刻,自然产量极低,再加上民间长期过度采挖,野生资源濒临绝种,探索行之有效的铁皮石斛快速繁殖技术并通过仿生栽培,可以实现对其野生资源的有效保护^[4],解决由于资源短缺而制约国内外市场发展和临床医学的需求。

由于试管内开花不受季节限制,对缩短育种周期、降低栽培设施的投入和生产管理费用都具有十分重要的意义,同时,生产铁皮石斛试管花也为人们日益增长的鲜花需求开辟了广阔的市场前景。因此,应用植物组织培养技术,对铁皮石斛进行离体快繁和种质保存,并通过试管开花调控种质繁育、研究其开花机理,具有重要的现实意义和应用价值^[5]。目前关于铁皮石斛的组培快繁及栽培技术已有较多研究,而对于其开

收稿日期:2013-06-01

基金项目:江西省教育厅青年基金(编号:GJJ13253);江西农业大学青年科学基金(编号:QN201103)。

作者简介:邹娜(1982—),女,河南南阳人,博士,讲师,研究方向为园林植物生物技术、园林植物栽培及营养生理。Tel: (0791) 83813243;E-mail: nzouy@126.com。

通信作者:张露,教授,博导,研究方向为观赏植物繁育。Tel: (0791) 83813123;E-mail: zhlu@163.com。

体生长出来的能量代谢是有氧生长还是无氧生长。无氧状态生长出来的大肠杆菌是做不出效率高的感受态细胞。建议装量不要超过容器的 1/5 体积。

(3)培养基 pH 值要控制好。一般来说,接种前 pH 值为 6.8 ~ 7.2;摇菌结束后,pH 值为 6.5 以上,使细菌实现有氧生长。

(4)D 控制在 0.3 ~ 0.6。一般来说,制备感受态最适的 D 值为 0.3 ~ 0.6。D 值大时,菌体总量往往大,感受态细胞绝对数量要大一些,但是,D 值太高,细菌死亡数量增多,制备感受态效率下降。

(5)CaCl₂ 尽量不要高温高压灭菌,最好采用过滤灭菌。

(6)最好选用新鲜的平板挑取单克隆摇菌。

(7)使用不同的菌株制备感受态细胞时,最好使用另外一套器具,否则,制备的感受态细胞效率很低,或者制备不出感受态细胞。

(8)整个制备过程都需要在冰上进行,一定要保持 0℃。

参考文献:

- [1] Mandel M, Higa A. Calcium - dependent bacteriophage DNA infection[J]. Journal Molecular Biology, 1970, 53(1): 159 - 162.
- [2] 朱森康,黄磊,李燕飞,等. 制备高效大肠杆菌电转化感受态细

胞和电转化条件的研究[J]. 生物技术通报,2011(10):206 - 209.

[3] Li W, Xie H, Xie Z, et al. Exploring the mechanism of competence development in *Escherichia coli* using quantum dots as fluorescent probes[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004, 58(1): 59 - 66.

[4] Theodorou M C, Tiligada E, Kyriakidis D A. Extracellular Ca²⁺ transients affect poly - (R) - 3 - hydroxybutyrate regulation by the AtoS - AtoC system in *Escherichia coli* [J]. Biochemical Journal, 2009, 417(3): 667 - 672.

[5] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.

[6] 梅运军,陈向东,谢志雄,等. Ca²⁺ 对诱导大肠杆菌摄取外源 DNA 的影响[J]. 武汉大学学报:理学版,2012(4):354 - 358.

[7] 王友如. CaCl₂ 浓度对感受态细胞转化效率的影响[J]. 湖北师范学院学报:自然科学版,2006,26(3):30 - 32.

[8] 张岚岚,徐春燕,徐昌杰. 大肠杆菌感受态细胞转化能力的影响因素[J]. 细胞生物学杂志,2004,26(4):429 - 432.

[9] 谢翎,陈红梅,尹翀,等. 大肠杆菌 DH5α 菌株感受态制备即转化率变化研究[J]. 生物学杂志,2011,28(4):4 - 6.

[10] 唐颜苹,王小媚,何薇,等. 大肠杆菌感受态细胞保存条件的研究[J]. 华中农业大学学报,2008,27(6):745 - 748.

花调控的研究报道相对较少^[5-7]。本研究在铁皮石斛组织培养的基础上,进行无菌苗的试管开花诱导研究,以期为铁皮石斛的大规模人工种植和开发利用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

铁皮石斛取自于江西农业大学花卉盆景教学研究基地,选取长势良好的铁皮石斛茎段作为外植体材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒灭菌 选择生长旺盛的铁皮石斛健康植株,将采回的茎段室内剪去多余的叶片,蘸洗洁精仔细刷洗枝条表面,水流下冲洗 20 min。将上述材料转入超净工作台,用 70% 的乙醇浸泡 10 ~ 30 s,取出材料后用含吐温 - 20 的 0.1% HgCl₂ 溶液分别剧烈震荡消毒 6 min 和 8 min,无菌水冲洗 5 遍,滤纸吸干表面水分,待用。

1.2.2 腋芽诱导 将消毒后的植株茎段接种到各诱导培养基上,研究不同浓度的 6 - BA 对铁皮石斛腋芽诱导的影响,各处理培养基均以 MS 为基本培养基,添加 0.5 mg/L NAA、琼脂 6.5 g/L、蔗糖 20 g/L,pH 值调至 5.8。培养 4 周后统计各处理中茎段腋芽诱导率。

1.2.3 开花诱导 将获得的无菌苗接种到各开花诱导培养基中,研究不同基本培养基对开花诱导的影响。培养 60 d,观察其开花情况。各培养基成分见表 1。开花率 = 开花外植体数/接种外植体总数 × 100%。

表 1 开花诱导培养基

培养基编号	基本培养基
K ₁	MS
K ₂	改良 MS
K ₃	1/4MS
K ₄	1/2 改良 MS
K ₅	1/2MS

注:其他成分为 6 - BA 2.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L + 蔗糖 20 g/L + 亚精胺 7 mg/L + 琼脂 6.5 g/L,pH 值 5.8。

1.3 生长条件

培养室温度为 25 ± 1 ℃,光照时间为 12 h/d,光照强度为 2 000 lx。铁皮石斛茎段外植体先接种于 MS 预培养基中暗培养 1 周,之后转入各腋芽诱导培养基中,并放在正常光照条件下培养。开花处理为每种培养基中添加 7 mg/L 亚精胺,如无特殊说明,各培养基均添加琼脂 6.5 g/L、蔗糖 20 g/L,用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 5.8,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 13.0 统计分析程序进行试验数据分析处理。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对铁皮石斛外植体灭菌效果的影响

由表 2 可知,不同灭菌时间对铁皮石斛外植体灭菌效果无显著的影响。HgCl₂ 消毒灭菌 6 min 和 8 min,外植体污染率无明显差异。因此,以铁皮石斛茎段为外植体,消毒灭菌时间可控制在 6 ~ 8 min,平均污染率可控制在 50% 以下。

表 2 不同灭菌时间对铁皮石斛外植体灭菌效果的影响

灭菌时间 (min)	重复	接种数 (块)	污染数 (块)	污染率 (%)	平均污染率 (%)
6	I	30	10	33.33	45.56a
	II	30	15	50.00	
	III	30	16	53.33	
8	I	30	10	33.33	36.67a
	II	30	10	33.33	
	III	30	13	43.33	

注:表中同列数据后不同小写英文字母表示处理间差异显著(P < 0.05)。下同。

2.2 不同 6 - BA 浓度对腋芽诱导的影响

不同 6 - BA 浓度对铁皮石斛腋芽诱导具有显著影响,表现为腋芽诱导率随着 6 - BA 浓度的增加先升高后显著降低(表 3)。当培养基中 6 - BA 浓度为 2.0 mg/L 时,腋芽诱导率最好,分别比 1.0、5.0 mg/L 6 - BA 时诱导率提高 7.41%、163.62%。方差分析结果表明,2.0 mg/L 6 - BA 浓度对腋芽诱导效果与 1.0 mg/L 6 - BA 相比无显著性影响,而两者与 5.0 mg/L 6 - BA 相比,诱导率的差异达到显著水平。因此,铁皮石斛茎段腋芽诱导较适宜培养基配方为 MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 琼脂 6.5 g/L + 蔗糖 20 g/L(图 1 - A),并且该培养基可用于腋芽的继代增殖(图 1 - B)。

表 3 不同 6 - BA 浓度对腋芽诱导的影响

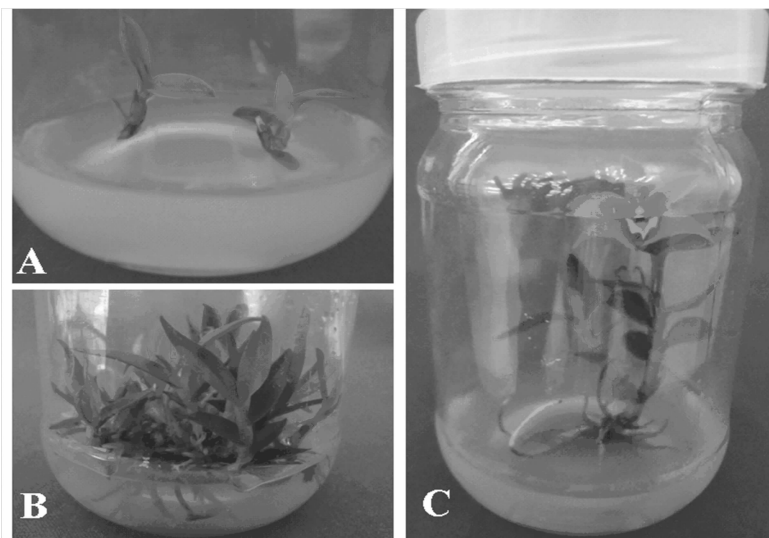
序号	6 - BA 浓度 (mg/L)	重复	接种数 (块)	诱导数 (块)	诱导率 (%)	平均诱导率 (%)
1	1.0	I	15	13	86.67	90.00a
		II	15	14	93.33	
2	2.0	I	15	14	93.33	96.67a
		II	15	15	100.0	
3	5.0	I	15	5	33.33	36.67b
		II	15	6	40.00	

2.3 铁皮石斛开花诱导

由表 4 可知,不同培养基对铁皮石斛开花诱导效果无显著性差异,在培养基中其他成分相同情况下,以 MS、改良 MS、1/4MS、1/2 改良 MS、1/2MS 为基本培养基均可诱导铁皮石斛在试管中开花,开花率在 17.18% ~ 35.37%,其中以 K₂ 培养基中的开花率最高。而且,无菌苗在开花诱导过程中,95% 以上的无菌苗基部都形成了根系(图 1 - C)。

表 4 不同开花培养基对铁皮石斛开花诱导的影响

培养基	重复	接种数 (块)	开花数 (块)	开花率 (%)	平均开花率 (%)
K ₁	I	59	18	30.51	26.19a
	II	32	7	21.88	
K ₂	I	49	16	32.65	35.37a
	II	21	8	38.1	
K ₃	I	55	13	23.64	17.18a
	II	28	3	10.71	
K ₄	I	39	17	43.59	32.21a
	II	24	5	20.83	
K ₅	I	52	20	38.46	25.9a
	II	15	2	13.33	



A—铁皮石斛腋芽诱导; B—腋芽增殖; C—无菌苗试管开花

图1 铁皮石斛组织培养及试管开花诱导

3 结论与讨论

前人在对铁皮石斛的组织培养过程中,培养基中都不同程度地添加了马铃薯泥、香蕉泥和椰子汁等辅助成分^[1],而本试验仅采用常规激素组合对其进行诱导,效果同样显著(表3)。此外,腋芽诱导与增殖培养可采用同一培养基,操作简单易行便于推广。另外,腋芽增殖植株具有遗传上比较稳定、自发变异频率低和再生植株粗壮等优点,与丛生芽相比,通过腋芽诱导可保持母本优良性状。所以在大量生产中,可以从缩短育苗周期、节约繁殖成本及便于操作的角度考虑,使用简单培养基成分诱导腋芽途径进行铁皮石斛的组织培养及种质保存。但是,同大多数兰科植物一样,培养基中生长素与细胞分裂素的浓度及对比对铁皮石斛组织培养中芽的诱导与分化起着决定性的作用。

本试验中,铁皮石斛外植体茎段腋芽的诱导在 $MS + 6-BA\ 1.0 \sim 2.0\ mg/L + NAA\ 0.5\ mg/L$ 中较好,诱导率可达90%以上。但随着 BA 浓度进一步增加,腋芽诱导率显著下降,其原因可能是加入不同浓度的 BA 后,显著改变了培养基中 $6-BA/NAA$ 配比有关。在铁皮石斛茎段组培过程中,在增加 $6-BA$ 浓度的同时配合 NAA 并使其达到合适的比例时,才能使芽萌发时间、数量、生长速度均达到较理想的水平^[8-9]。另外,铁皮石斛的组织培养通常通过加入活性炭以解决其褐化问题^[8]。然而,活性炭除了可以吸附培养基中有毒副作用的物质外,还会降低盐离子浓度或吸附植物生长调节剂等。在本研究过程中,外植体接种初期暗处理1周,同样可以有很好的防止褐化作用。

铁皮石斛无菌苗在不同培养基上均可以在试管内开花,

开花率在 $17.18\% \sim 35.37\%$,且不同处理之间开花率没有显著性差异,说明基本培养基成分可能不是影响铁皮石斛试管开花最主要的因素。推测铁皮石斛开花诱导可能与培养基中其他成分如 NAA 、 BA 和亚精胺等有关^[5-7]。虽然在本试验过程中成功诱导出铁皮石斛试管花,但其开花率仍很低,关于铁皮石斛试管开花影响因素及调控机制尚需深入研究。

参考文献:

- [1] 魏凤娟. 铁皮石斛组织培养与栽培技术研究进展[J]. 广东农业科学, 2010, 37(4): 81-85.
- [2] 李娟, 李顺祥, 黄丹, 等. 铁皮石斛资源、化学成分及药理作用研究进展[J]. 科技导报, 2011, 29(18): 74-79.
- [3] 蒋向辉, 余朝文, 王善粉, 等. 不同激素浓度对铁皮石斛高效快繁体系的影响[J]. 江苏农业科学, 2010(1): 76-78.
- [4] 刘键, 沈岚, 王芳, 等. 铁皮石斛组培苗移栽与植株仿野生栽培技术[J]. 宁波农业科技, 2012(2): 31-33.
- [5] 王光远, 许智宏, 蔡德发, 等. 铁皮石斛的离体开花[J]. 中国科学, 1997, 27(3): 229-234.
- [6] 岑秀芬, 黄春红, 韦鹏霄. 激素因子对铁皮石斛离体培养开花诱导的效应[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(16): 8308-8311.
- [7] 赵银河. 铁皮石斛试管开花研究[J]. 种子, 2013, 32(2): 16-18, 23.
- [8] 张红兵, 武芸, 刘金龙, 等. 铁皮石斛茎段组培快繁体系的改良研究[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2011, 29(3): 282-284.
- [9] 姜殿强, 潘梅, 黄赛, 等. 铁皮石斛茎段丛生芽的增殖培养研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(5): 1905-1906, 1940.