

苏 江,岑忠用,吴月圆,等. 铁皮石斛丛生芽增殖和生长影响因素的研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):36-39.

铁皮石斛丛生芽增殖和生长影响因素的研究

苏 江,岑忠用,吴月圆,覃勇荣
(河池学院化学与生物工程学院,广西宜州 546300)

摘要:以铁皮石斛丛生芽为材料,通过研究不同基本培养基、碳源及天然有机复合物等若干因子对铁皮石斛丛生芽增殖分化及壮苗生根的影响,筛选出适宜铁皮石斛组培苗快速繁殖的最佳配方,试图建立铁皮石斛组培苗的无菌繁殖系。研究表明,铁皮石斛丛生芽增殖分化的最适培养基为 N_6 培养基,植株生长健壮;最适碳源为蔗糖;壮苗生根的最适配方为 $MS+6-BA\ 1.0\ mg/L+NAA\ 0.5\ mg/L+25\%$ 香蕉汁+3% 白糖,生根率较高。

关键词:铁皮石斛;丛生芽;增殖;生长

中图分类号: S567.23+9.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0036-03

石斛属是兰科植物中一个较大的属,全世界约 110 种,广泛分布于亚洲、欧洲和大洋洲等地。我国有 74 种 2 变种,分布于秦岭以南诸地区,尤其以云南南部为多。《中国药典》2005 年版记载,能够入药的石斛有 5 种,其中以铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)最为名贵。铁皮石斛为兰科石斛属多年生草本植物,俗称铁皮枫斗,又名黑节草,因其表皮呈铁绿色而得名^[1]。铁皮石斛主要生长在高山峻岭悬崖峭壁和岩石缝隙中,是一种分布在岩溶地区的珍贵中药材植物,民间有“救命仙草”“中华仙草”的美称^[2]。铁皮石斛是一种生长缓慢、自身繁殖能力很低的兰科附生植物,对生长环境要求十分严格。铁皮石斛从开花授粉至果实成熟约需 6 个月,一般借助昆虫或外力异花传粉,因而授粉不良,结果甚少。在自然条件下,种子萌发因缺乏营养物质,需与真菌共生,以获得养分的供给才能完成萌发,发芽率极低。铁皮石斛种子极小,不含胚乳,自然繁殖十分困难,加上人为的过度采挖和破坏生境,其资源已濒临灭绝^[3-6]。目前,为满足国内外市场对石斛药源的需要,须通过人工培育的方法快速繁殖铁皮石斛。

1 材料与方法

1.1 试验材料

由河池学院植物组织培养实验室提供的铁皮石斛无菌芽。

1.2 试验方法

1.2.1 不同基本培养基对铁皮石斛丛生芽增殖和生长的影响 设 3 个处理,即以 MS 、 $1/2MS$ 、 N_6 为基本培养基,添加激素 $6-BA\ 1.0\ mg/L$ 、 $NAA\ 0.5\ mg/L$ 、白糖 3%,琼脂 $7.0\ g/L$, pH 值 $5.8\sim6.0$,每个处理 $0.5\ L$ 。

1.2.2 不同碳源对铁皮石斛增殖丛生芽和生长的影响 设 3 个处理,即以白糖 3%、蔗糖 3%、葡萄糖 3% 为碳源,添加至

$MS+6-BA\ 1.0\ mg/L+NAA\ 0.5\ mg/L$ 培养基上,琼脂 $7.0\ g/L$, pH 值 $5.8\sim6.0$,每个处理 $0.5\ L$ 。

1.2.3 不同附加物及浓度对铁皮石斛丛生芽增殖和壮苗生根的影响 设 6 个处理,即以香蕉汁、马铃薯汁各 15%、20%、25% 为附加物,添加至 $MS+6-BA\ 1.0\ mg/L+NAA\ 0.5\ mg/L$ 培养基上,琼脂 $7.0\ g/L$, pH 值 $5.8\sim6.0$,每个处理 $0.5\ L$ 。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 石斛芽的增殖率 增殖系数 = 培养 45 d 后获得不定芽数/接种外植体数。

1.3.2 株高 随机抽取 3 瓶材料,在无菌超净台上用加热器高温灭菌的镊子将石斛苗从培养瓶中取出,每瓶约取出 10 株,置于培养皿中待用。用尺子测量 30 株石斛苗的株高,记录数据。

1.3.4 根数及根长 随机抽取 3 瓶材料,在无菌超净台上从培养瓶中取出约 30 株石斛苗,放至培养皿中待用。用镊子辅助数出肉眼可见的根数,并用尺子测量其根长,记录数据。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对丛生芽增殖和生长的影响

试验结果表明,在添加激素 $6-BA\ 1.0\ mg/L$ 、 $NAA\ 0.5\ mg/L$ 、白糖 3%, pH 值 5.8 等同等条件下,铁皮石斛丛生芽增殖率从高到低排列为 $N_6>1/2MS>MS$,即以 N_6 为基本培养基时最适合铁皮石斛丛生芽的增殖,增殖率最高,增殖系数达 2.0,且芽叶片颜色浓绿,长势均匀整齐。 $1/2MS$ 的增殖效果也很明显,增殖系数为 1.9,但是石斛芽较矮小,颜色略带黄色。 MS 的效果最差,增殖率最低,但是 MS 培养基的石斛芽最健壮,茎的生长最明显(表 1、图 1、图 2、图 3)。

表 1 不同基本培养基对组培苗生长的影响

培养基	接种芽数 (个)	增殖后芽数 (个)	增殖系数	颜色	芽长势
MS	105	168	1.6	淡绿	不太整齐,健壮
1/2MS	110	209	1.9	较绿	均匀整齐,较弱
N_6	100	200	2.0	浓绿	均匀整齐,健壮

2.2 不同碳源对铁皮石斛丛生芽增殖和生长的影响

试验结果表明:不同的碳源对铁皮石斛的增殖和丛生芽

收稿日期:2013-10-28

基金项目:广西教育厅项目(编号:2013YB207);河池学院重点项目(编号:2012YBZ-N002);广西高校重点实验室桂西北特色资源研究与开发实验室资助项目(编号:桂教科研[2010]6号)。

作者简介:苏 江(1980—),女,广西北明人,硕士,讲师,从事植物组织培养及相关生物技术研究。E-mail:suppersuijiang@sina.com。

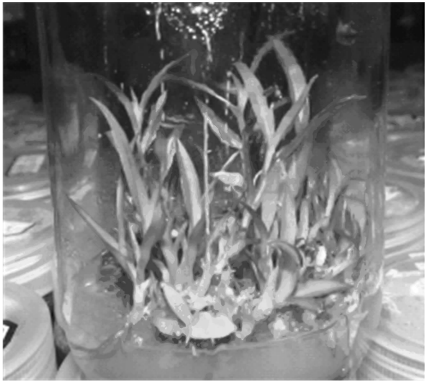


图1 MS培养基上的丛生芽



图2 1/2MS培养基上的丛生芽

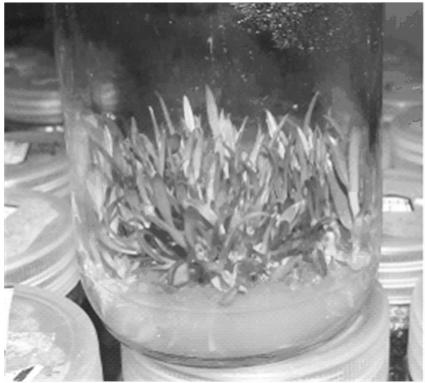


图3 N₆培养基上的丛生芽

生长有不同的效果(表2),其中蔗糖的增殖效果最好,葡萄糖次之,白糖的增殖效果最差。另外,从丛生芽生长的情况看,以蔗糖为碳源的丛生芽长势均匀、整齐健壮且颜色浓绿,平均株高达到2.42 cm;以白糖为碳源的丛生芽长势与以蔗糖为碳源的丛生芽长势相似,但平均株高仅为1.83 cm;以葡萄糖为碳源的丛生芽长势最差,其茎较细,颜色浅绿。

表2 不同碳源对铁皮石斛组培苗生长的影响

碳源种类及浓度	接种芽数(个)	增殖后芽数(个)	增殖系数	平均株高(cm)	颜色	芽长势
白糖 3%	121	208	1.72	1.83	较绿	均匀整齐健壮
蔗糖 3%	126	268	2.13	2.42	浓绿	均匀整齐健壮
葡萄糖 3%	118	226	1.92	1.77	浅绿	均匀整齐,弱

2.3 不同附加物对铁皮石斛丛生芽增殖和壮苗生根的影响

不同的附加物对铁皮石斛丛生芽增殖和壮苗生根具有不

同程度的影响。由表3可知,马铃薯汁更有利于促进丛生芽的增殖,增殖系数均达2.1以上,这有利于短期快速获得大量的试管苗,但褐化现象较严重(图4、图5、图6),对诱导生根也具有抑制作用。其中以马铃薯汁25%最有利于铁皮石斛的增殖,但芽长势较弱。不同浓度香蕉汁增殖效果均比马铃薯汁的差,且不同浓度的增殖效果差异不明显。

表3 不同附加物对铁皮石斛组培苗生长的影响

附加物及浓度	接种芽数(个)	增殖后芽数(个)	增殖系数	颜色	芽长势
香蕉汁 15%	112	216	1.93	较绿	均匀整齐,健壮
香蕉汁 20%	108	198	1.83	较绿	均匀整齐,健壮
香蕉汁 25%	114	221	1.94	浓绿	均匀整齐,健壮
马铃薯汁 15%	116	247	2.13	深绿	不太整齐,弱
马铃薯汁 20%	109	238	2.18	深绿	不太整齐,弱
马铃薯汁 25%	106	256	2.42	深绿	均匀整齐,弱



图4 马铃薯15%处理培养的丛生芽



图5 马铃薯汁20%处理培养的丛生芽



图6 马铃薯汁25%处理培养的丛生芽

从株高、生根率、根数、根长等指标综合来看,添加香蕉汁都明显优于马铃薯汁,表现在根粗壮、芽均匀整齐健壮、叶色浓绿。这表明,香蕉汁有利于诱导铁皮石斛生根并且在一定程度上起到壮苗作用。

由表 4 和图可 7、图 8 图 9 可知,在添加香蕉汁的 3 个处理浓度(15%、20%、25%)中,生根效果都较好,3 个处理的平均根长都在 0.65 cm 以上且较粗壮,其中以添加香蕉汁 25% 的效果最好,其根长达 0.84 cm;另外 3 个香蕉汁处理均无明显褐化现象。在添加马铃薯汁的 3 个处理浓度(15%、20%、25%)中均无根生成,说明马铃薯汁不利于铁皮石斛的生根。

表 4 不同附加物及浓度对铁皮石斛生根的影响

附加物及浓度	接种芽数 (个)	生根芽数 (个)	平均根数 (条)	生根率 (%)	根长 cm)
香蕉汁 15%	98	31	1.69	31.63	0.71
香蕉汁 20%	87	27	1.54	31.03	0.68
香蕉汁 25%	94	34	2.29	36.17	0.84
马铃薯汁 15%	98	—	—	—	—
马铃薯汁 20%	96	—	—	—	—
马铃薯汁 25%	101	—	—	—	—

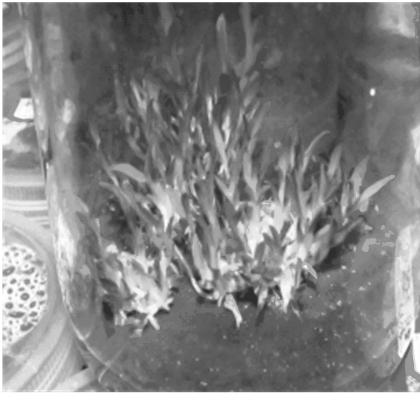


图7 香蕉汁15%处理培养的丛生芽



图8 香蕉汁20%处理培养的丛生芽

此外,由图 10 可知,2 种不同附加物对铁皮石斛株高都有促进作用,但差异不明显,在培养 65 d 时平均株高达到 1.86 cm 以上,其中香蕉汁 25% 处理的株高最大,为 2.1 cm。

3 讨论

3.1 铁皮石斛丛生芽增殖和生长的最适基本培养基

本研究结果显示,N₀ 为基本培养基时铁皮石斛丛生芽增殖效果较好,这与曾宋君等对 5 种石斛进行离体培养得出石



图9 香蕉汁25%处理培养的丛生芽

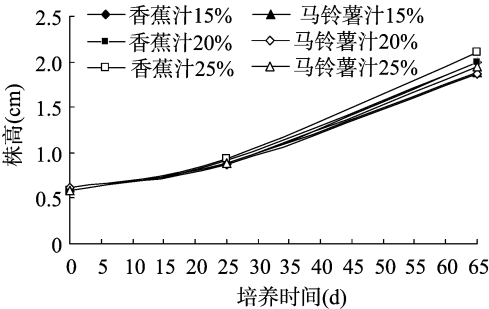


图10 不同附加物及浓度对铁皮石斛株高的影响

斛的通用最适培养基是改良 N₀。培养基的结果^[7]一致。MS 为基本培养基时丛生芽增殖效果最差,但 MS 培养基对石斛茎生长有较好的促进作用,这与郭洪波的研究结果^[8]相同。在比较 MS、1/2MS、N₀ 不同培养基对铁皮石斛生长的影响时发现,增殖明显的石斛芽茎生长不明显,反之,茎生长较好的增殖率不高。所以研究不同问题时,要根据需要选择适合的培养基,本研究认为 N₀ 培养基最适合铁皮石斛的增殖,而 MS 培养基较有利于茎的生长。

3.2 铁皮石斛组培苗生长的最适碳源

在比较不同碳源对铁皮石斛生长的影响中,试验结果表明,蔗糖对石斛芽的增殖效果最好,长势整齐健壮,对株高的影响优于白糖和葡萄糖,这与魏梅娟等的研究结果^[9]一致。从铁皮石斛的生长情况看,本研究还发现以白糖为碳源的丛生芽长势与以蔗糖为碳源的丛生芽长势相似,以葡萄糖为碳源的丛生芽长势最差,其茎较细,颜色浅绿。因此,本研究认为大规模工业化生产铁皮石斛组培苗时,在尽量保证苗质量的前提下,为了降低生产成本,以白糖作为碳源较合适。

3.3 铁皮石斛壮苗生根的最适附加物及浓度

天然有机物是植物组织培养中常用的附加物^[10],在长期的组织培养实践中,人们发现在培养基内加入某些适当的天然有机附加物,能够增强培养物的生长、分化效应,促进培养物更好地存活、发育。植物组织培养中常用的天然有机附加物包括椰乳、香蕉汁、苹果汁、番茄汁、胡萝卜汁、马铃薯汁等^[11]。本研究以香蕉汁和马铃薯汁为附加物,结果表明,香蕉汁和马铃薯汁对铁皮石斛丛生芽增殖和壮苗生根培养具有不同的影响。从增殖效果来看,马铃薯汁处理更有利于丛生芽的增殖,并以 25% 马铃薯汁的增殖效果最佳,这将有利于短期快速获得大量的试管苗;但马铃薯汁处理褐化现象较重。增殖效果较差的是 15% 香蕉汁和 20% 香蕉汁。从根的

潘晓寒. 模式植物基因功能突变数据库资源报告[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 39–42.

模式植物基因功能突变数据库资源报告

潘晓寒

(南京大学生命科学学院, 江苏南京 210093)

摘要:拟南芥与水稻是植物基因组中的模式生物,植物的基因功能及基因结构间的相关联系一直是研究的重点,通过对这 2 种模式生物进行基因敲除来确定基因功能是目前对植物基因研究最为普遍的做法。目前,关于基因功能突变体的数据资源的介绍并不充分,针对这种情况,本文介绍了基因功能研究的大规模随机敲除突变的常见载体标签及其方法,并给出了与其相应的相关数据库的介绍。

关键词:基因敲除;数据库;模式生物;标签

中图分类号: Q754 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)02–0039–04

目前,基因研究已逐渐由结构基因组学向功能基因组学领域展开。拟南芥和水稻作为模式生物,在植物中率先展开基因功能的研究^[1]。目前,对基因功能的研究方法有许多种,而建立敲除突变体库是最常见的方法^[2]。基因敲除是指用方法使植物基因失活,然后通过观察表型来确定基因结构和功能的关系。最初, γ 射线、化学诱变剂 EMS 等物理化学诱变方法被用来制作突变体^[3],之后同源重组^[4]、基因沉默、RNA 干扰^[5]等方法也被用来制作突变体,但这些方法都不足以在多细胞生物体中构建能够包含所有基因的突变体库。自农杆菌在单子叶植物中的转化技术获得成功后,利用外源序列对植物基因组的大规模插入来构建突变体库成为最常用也是最可靠的办法^[6–7]。根据插入元件的不同,大规模外源基因的插入建立的突变体库可以大致分为 3 种:T–DNA 插入构建的突变体库^[8–9]、转座子插入构建的突变体库^[10–11]以及

反转座子插入构建的突变体库^[12–13]。目前在全世界范围内已建立了大量的上述 3 种元件作为突变工具的水稻和拟南芥的突变数据^[14–15]。

随着研究深入,更多的突变体库在全世界范围内建立起来^[16],在拟南芥中更是实现了几乎全部基因都有敲除突变的高覆盖率^[2]。在其他植物(如玉米、马铃薯、小麦、苜蓿等)中也都有插入突变数据库的存在^[17–19],不过数据尚不够充分。本文介绍了一些重要的拟南芥和水稻突变体库目前的规模和制造突变株的方法,为需要突变株种子以及数据的学者提供方便。

1 大规模外源基因插入构建突变体库的几种常用方法

1.1 T–DNA 插入构建突变体库

T–DNA 突变体库的建立首先需要制作载体 Ti 质粒。抗性基因被整合入载体,然后导入农杆菌中。取植物的愈伤组织进行诱导和继代培养,将继代培养的植物愈伤组织放入农杆菌培养液之中,使其感染农杆菌,最后转入选择培养基培养。在进行完 2 次选择培养后,将长出的抗性愈伤组织通过组织分化形成植株,对植株进行转基因检测来确保基因敲除

收稿日期:2013–07–18

作者简介:潘晓寒(1988—),女,江苏宜兴人,硕士研究生,研究方向为生物进化。E-mail:huajianji00@163.com。

生长情况来看,香蕉汁处理的生根率、根数、根长都优于马铃薯汁处理,在培养 65 d 时,3 个香蕉汁处理的平均根长都在 0.65 cm 以上,其中以添加 25% 香蕉汁处理的效果最好,其根长达 0.84 cm。从丛生芽的生长情况来看,香蕉汁和马铃薯汁对铁皮石斛丛生芽的生长都有促进作用,在培养 65 d 时各处理的平均株高达到 1.86~2.1 cm,且香蕉汁处理的平均株高均稍大于马铃薯汁处理,其中 25% 香蕉汁处理的株高最大,为 2.1 cm。综合试验结果,本研究认为,香蕉汁比马铃薯汁更有利于铁皮石斛壮苗生根培养,且以 25% 香蕉汁处理效果最佳,这可能是香蕉汁和马铃薯汁所含的成分不同所致,有关这方面还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 王宪楷,赵同芳. 石斛属植物的化学成分与中药石斛[J]. 中国药学杂志,1986,21(11):666–669.
- [2] 杨一令,来平凡,蒋士鹏. 铁皮石斛的研究进展[J]. 山东中医药大学学报,2008,32(1):82–85.

- [3] 淳泽. 药用石斛的资源危机与保护对策[J]. 资源开发与市场,2005,21(2):139–140.
- [4] 刘瑞驹,蒙爱东,邓锡青,等. 铁皮石斛试管苗快速繁殖的研究[J]. 药学报,1988,23(8):636–640.
- [5] 张治国,刘烨,王黎,等. 铁皮石斛原球茎增殖的培养条件研究[J]. 中草药,1992,23(8):431–433.
- [6] 廖俊杰,许继勇,李进进,等. 铁皮石斛试管种苗产业化生产的技术因素分析[J]. 中药材,2006,29(6):533–535.
- [7] 曾宋君,程式君,张京丽,等. 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究[J]. 园艺学报,1998,25(1):76–81.
- [8] 郭洪波. 铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)组培快繁及其抗癌作用的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2008:3–10.
- [9] 魏梅娟,李雪,叶清梅,等. 铁皮石斛组培苗生长的影响因素研究[J]. 北方园艺,2011(2):146–148.
- [10] 曹改义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,2002:85–126.
- [11] 刘晓燕,向青云,刘玲玲,等. 基本培养基及附加物对蝴蝶兰原球茎增殖效果的影响[J]. 种子,2005,24(6):18–20,26.