杨　澜,王爱华,石乐娟,等. 植株成熟度与生长调节剂对黑喉石斛花芽诱导的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(12):190 - 192.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2019.12.042

植株成熟度与生长调节剂对黑喉石斛花芽诱导的影响

杨　澜, 王爱华, 石乐娟, 陈之林
(贵州省农业科学院园艺研究所,贵州贵阳 550006)

摘要:黑喉石斛在自然条件下从播种到开花需要 3 年左右的时间。为了研究黑喉石斛的开花过程,缩短开花年限,采用组织培养方法研究不同因素对黑喉石斛试管内花芽诱导的影响。结果表明,(1)植株的成熟度与花芽诱导率相关性明显;(2)植物生长调节剂 TDZ + PP_{333}组合可诱导黑喉石斛花芽形成,以 0.2 mg/L TDZ + 0.3 mg/L PP_{333}组合诱导 90 d 苗龄的黑喉石斛幼苗试管开花率最高,为 40.00%;(3)TDZ + PP_{333} + NAA 组合有利于丛生芽的增殖和试管内壮苗培养,以比例 1∶5∶2 和 1∶8∶4 的处理效果最佳。由此推测黑喉石斛试管内开花不仅跟植物生长调节剂的种类和浓度有关,还与植株的生理状态相关。

关键词:黑喉石斛;植物生长调节剂;组织培养;花芽诱导
中图分类号: S682.310.4　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 - 1302(2019)12 - 0190 - 03

黑喉石斛(*Dendrobium ochreatum*)是兰科(Orchidaceae)石斛属多年生附生草本植物,也是珍贵的药用石斛[1]。花期 4 ~ 5 月,花大且颜色艳丽,具有良好的观赏价值。石斛幼年期较长,从营养生长到开花需要 3 年,受基因型及生长环境条件影响而有所差异。黑喉石斛的开花特性有别于其他同属石斛,在成熟植株当年新生长出来的嫩茎上就能开花,无需等到第 2 年再开花,是研究石斛提早开花机制的理想材料。成花诱导是高等植物开花的基础,决定着植物的开花时间。通过组织培养的方法可以实现植物在试管内完成成花诱导、花发育过程。该方法重复性强且不受季节和地域的限制,为研究植物开花的生理及分子生物学机制提供了一个理想的试验系统。兰花试管开花诱导条件具有很强的品种差异性[2]。植物开花是多种因素综合作用的结果,众多研究表明,植物生长调节剂[3-4]、氮磷镁离子浓度和培养温度[5]、植物材料成熟程度[6]等是影响石斛试管内开花的主要因素。植物材料成熟程度和植物激素对植物试管开花起着重要作用[6-7]。刘义存等研究指出,不同浓度的生长调节剂组合对试管中花芽形成的诱导效果有明显的差别,其中细胞分裂素的作用最突出,而生长素次之[8]。目前利用组织培养技术已成功获得了霍山石斛[9]、春石斛[10]、铁皮石斛[11]试管开花苗。

通过组织培养的方式获得黑喉石斛的试管开花材料是研究其开花生理及分子机制的有效方法,本试验以单叶幼苗期(HH1)、原球茎晚期(HH2)、原球茎早期(HH3)黑喉石斛为研究材料,研究植物成熟度及植物生长调节剂[噻苯隆(thidiazuron,简称 TDZ)、多效唑(paclobutraeol,简称 PP_{333})]对其试管内花芽诱导的影响,以期探索出适宜的诱导时期和诱导培养基,为进一步建立试管苗诱导开花体系,研究其开花机制提供一定的基础。

收稿日期:2018 - 02 - 22
基金项目:贵州省科技创新人才团队建设项目(编号:黔科合平台人才[2016]5628 号);中央补助地方科技基础条件专项资金(编号:黔科合条中补地[2015]4002);贵州省农业科学院项目(编号:黔农科院青年基金[2017]08 号)。
作者简介:杨　澜(1990—),女,贵州贵阳人,硕士,助理研究员,研究方向为分子植物育种。E - mail:281806994@qq.com。
通信作者:陈之林,博士,副研究员,研究方向为花卉遗传育种等。E - mail:chenzhilin@126.com。

1　材料与方法

1.1　不同成熟度无菌材料的培养

试验时间为 2016 年 5 月,试验在贵州省园艺研究所兰花组培室进行。试验材料采自于贵州省园艺研究所兰花种质资源温室,将采回的 1 个成熟未开裂的黑喉石斛蒴果用蘸有 75% 乙醇的棉球擦拭表面,再用 0.1% 氯化汞溶液浸泡 30 min,最后用无菌水浸泡冲洗 5 次,将蒴果表面的氯化汞溶液清洗干净。之后在无菌器皿中将果荚从中间切开,将果荚内的种子播种于添加萘乙酸(NAA)的 1/2MS(不含琼脂和蔗糖)培养基中,果荚内剩余的种子放入无菌 eppendroff 管中保存备用,每间隔 10 d 播种 1 次,共播种 3 次。分别经过 50、40、30 d 培养,获得 3 种成熟度的材料,分别为单叶幼苗期材料 HH1、原球茎晚期材料 HH2、原球茎早期材料 HH3。

1.2　黑喉石斛试管内花芽诱导

以 HH1、HH2、HH3 黑喉石斛为试验材料,采用不同浓度的 TDZ + PP_{333}组合进行黑喉石斛花芽诱导处理(表 1),培养 60 d 后转入 1/2MS 培养基中。所有培养基中附加香蕉 100 g/L、苹果 50 g/L、胡萝卜 50 g/L,将 pH 值调至 5.4,培养条件:温度为(23 ± 2) ℃,光照度为 1 000 ~ 1500 lx,光照时间为 11 h/d,且以不添加植物生长调节剂为对照(CK)培养基,培养 90 d 后观察并统计试管内花芽数量及组培苗的生长情况,计算花芽诱导率,花芽诱导率 = 分化花芽的植株数/所有植株 数 × 100%。

1.3　黑喉石斛继代培养 1 次后进行花芽诱导

将 HH1、HH2、HH3 的无菌苗转入 1/2MS 继代培养基中,培养 60 d 后再转入 B1 ~ B10 及无激素的对照(CK)培养基中(表 2)。所有培养基中附加香蕉 100 g/L、苹果 50 g/L、胡萝卜 50 g/L 以及活性炭,将 pH 值调至 5.4。培养条件:温度为

表 1　黑喉石斛花芽诱导培养基

试验号	调节剂浓度(mg/L)	
	TDZ	PP_{333}
A1	0.05	0.5
A2	0.10	0.5
A3	0.20	0.5
A4	0.05	1.0
A5	0.10	1.0
A6	0.20	1.0
CK	0	0

注:试验重复 3 次,每组合接种 5 瓶,每瓶 5 株。表 2 同。

表 2　黑喉石斛继代培养后花芽诱导培养基

试验号	调节剂浓度(mg/L)		
	TDZ	PP_{333}	NAA
B1	0.1	0.3	0
B2	0.1	0.5	0.2
B3	0.1	0.8	0.4
B4	0.2	0.8	0.2
B5	0.2	0.5	0.4
B6	0.2	0.3	0
B7	0.5	0.3	0.4
B8	0.5	0.5	0
B9	0.5	0.8	0.2
B10	0.2	0	0
CK	0	0	0

(23 ± 2) ℃,光照度为 1 000 ~ 1 500 lx,光照时间为 11 h/d。培养 90 d 后统计试管内花芽数量及组培苗的生长情况,计算花芽诱导率。

2　结果与分析

2.1　黑喉石斛的无菌播种

为获得不同生长时期的黑喉石斛无菌材料,本试验分 3 个阶段将黑喉石斛种子播种于 1/2 MS + NAA 萌发培养基上。通过观察发现,经过 30 d 左右的培养,种子可萌发形成原球茎,萌发率超过 99%;经过 50 d 的培养,可分化生长出茎和叶。

2.2　黑喉石斛试管内花芽诱导及生长情况

从表 3 可以看出,HH1、HH2、HH3 黑喉石斛经过 6 种组合的 TDZ + PP_{333} 诱导处理 60 d 后,处于单叶幼苗期的材料及经过 A1(TDZ 0.05 mg/L + PP_{333} 0.5 mg/L)、A2(TDZ 0.1 mg/L + PP_{333} 0.5 mg/L)处理后转入 1/2 MS 培养基生长 90 d 后出现花芽,花芽诱导率分别为 5%、7%,其他处理及对照培养基中均未发现花芽。HH1、HH2、HH3 经过处理后茎和叶营养器官的生长受到不同程度的抑制作用,表现为植株矮小,叶片小且数量少,茎长度缩短,生长迟缓。随着 TDZ 与 PP_{333} 浓度的不断升高,对植株的营养生长抑制作用增强。当 TDZ 浓度达到 0.2 mg/L 时,叶片的分化受抑制,植株无法正常生长。PP_{333} 使 HH1、HH2、HH3 茎长度缩短,植株矮小。A1 ~ A6 处理均在不同程度上影响黑喉石斛根、茎、叶的生长。无激素处理的对照植株相对于激素处理的植株生长速度更快,植株健壮。

表 3　黑喉石斛组培苗试管内的生长情况

试验号	调节剂浓度(mg/L)		试管苗生长情况
	TDZ	PP_{333}	
A1	0.05	0.5	HH1、HH2、HH3 茎长度≤2.5 cm,叶片数≤3 张;仅 HH1 有花芽;3 种材料均生长迟缓
A2	0.10	0.5	HH1、HH2、HH3 茎长度≤2.5 cm,叶片数≤3 张;仅 HH1 有花芽;3 种材料均生长迟缓
A3	0.20	0.5	HH1、HH2、HH3 茎长度≤2.5 cm,叶片数≤2 张;均无花芽且生长迟缓
A4	0.05	1.0	HH1、HH2、HH3 茎长度≤2.0 cm,叶片数≤2 张;均无花芽且生长较迟缓
A5	0.10	1.0	HH1、HH2、HH3 茎长度≤2.0 cm,叶片数≤2 张;均无花芽且生长较迟缓
A6	0.20	1.0	HH1、HH2、HH3 茎长度≤1.5 cm,叶片数≤1 张;均无花芽且生长严重迟缓
CK	0	0	HH1、HH2、HH3 茎长度≈3.5 cm,粗壮,叶片数≈4 张;均无花芽;生长健壮

2.3　继代培养对黑喉石斛花芽诱导的影响

从表 4 可以看出,在 B1 ~ B10 及对照培养基中,HH1、HH2、HH3 的继代苗在试管内生长情况不尽相同。低浓度的 TDZ(0.1 mg/L)与 PP_{333}(0.3 mg/L)组合 B1 不仅无法诱导 HH1、HH2、HH3 的继代苗花芽形成,而且丛生芽少,植株生长缓慢。B6(TDZ 0.2 mg/L + PP_{333} 0.3 mg/L)、B8(TDZ 0.5 mg/L + PP_{333} 0.5 mg/L)、B10(TDZ 0.2 mg/L)3 种处理均能诱导 HH1、HH2、HH3 的继代苗形成花芽。B6 处理 HH1 继代苗的花芽诱导率最高为 40%,而 B8、B10 处理的花芽诱导率均低于 10%(表 5),且 B8 处理下容易出现畸形植株。其他的诱导培养基均无法诱导花芽生成,但对试管内壮苗、丛生芽增殖有一定的促进作用。B2、B3 处理植株的丛生芽增殖率较高,可达到 3 ~ 5 倍;植株茎干增粗,叶片变宽,根部变粗且有根毛,生长健壮;适合 3 ~ 4 个月苗龄的黑喉石斛丛生芽诱导及壮苗培养。而 B7、B8、B9 处理中虽然也有丛生芽的增殖,但畸形苗较多,且部分叶片黄化,茎干基部出现不同程度的褐化。对照培养基中无花芽出现。

3　结论与讨论

试管内的石斛苗要完成营养生长向生殖生长的转变,除了要有适宜的培养基及培养条件之外,营养物质的有效积累也是决定其花芽分化是否成功的关键因素之一[12]。本试验中 3 种成熟度黑喉石斛材料,单叶幼苗期材料 HH1,经过 A1(TDZ 0.05 mg/L + PP_{333} 0.5 mg/L)、A2(TDZ 0.1 mg/L + PP_{333} 0.5 mg/L)处理后转入 1/2 MS 培养基生长 90 d 后出现花芽,花芽诱导率分别为 5%、7%,后期植株茎伸长及叶片生长受到明显抑制,可能是由于石斛材料成熟度较低的原因。原球茎材料 HH2、HH3 未诱导出花芽。经过 60 d 继代培养的 HH1、HH2、HH3 材料均被 B6 处理诱导出花芽,诱导率分别为40.00%、21.32%、13.32%。B8、B10 培养基诱导花芽率

表 4　黑喉石斛组培苗试管内的生长情况

试验号	调节剂浓度(mg/L)			试管苗生长情况
	TDZ	PP_{333}	NAA	
B1	0.1	0.3	0	苗弱,丛生芽少,生根慢
B2	0.1	0.5	0.2	苗茎秆粗壮,丛生芽多,生长良好
B3	0.1	0.8	0.4	苗茎秆粗壮,丛生芽多,生长良好
B4	0.2	0.8	0.2	苗茎秆粗壮,丛生芽多,但部分植株畸形
B5	0.2	0.5	0.4	丛生芽多,但部分叶片黄化,植株畸形
B6	0.2	0.3	0	苗细小,生长慢,有丛生芽,花芽
B7	0.5	0.3	0.4	丛生芽多,但部分叶片黄化,植株畸形
B8	0.5	0.5	0	苗细小,有丛生芽,少量花芽,植株畸形
B9	0.5	0.8	0.2	苗大,有丛生芽,叶片畸形
B10	0.2	0	0	苗小,有丛生芽,少量花芽,无畸形苗
CK	0	0	0	苗大小适中,无畸形,无花芽、丛生芽

表 5　黑喉石斛继代培养后的试管花芽诱导率

试验材料	试管苗(株)	花芽数量(个)			花芽诱导率(%)		
		B6	B8	B10	B6	B8	B10
HH1 继代苗	25	10.00	2.33	2.33	40.00	9.32	9.32
HH2 继代苗	25	5.33	2.00	2.00	21.32	8.00	8.00
HH3 继代苗	25	3.33	1.70	1.70	13.32	6.80	6.80

均低于 10%。由继代培养前后的黑喉石斛试管内花芽诱导率可知,黑喉石斛无菌苗的成熟度与花芽诱导率相关性明显,3 ~4 个月苗龄的黑喉石斛无菌苗更容易被诱导出花芽且植株营养生长正常。

植物生长调节剂的种类及浓度也是成功诱导石斛试管内开花的重要因素之一,尤其细胞分裂素的种类对于石斛花芽分化的作用极为显著[13]。6 - 苄氨基嘌呤(6 - BA)、2,4 - 二氯苯氧基乙酸(2,4 - D)、噻苯隆(TDZ)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)等生长调节剂被研究者们广泛应用于兰花试管开花研究中,但不同兰花适宜的生长调节剂种类跟用量存在较大差异。陈肖英发现,培养基中单独添加低浓度的 TDZ 能成功诱导出霍山石斛花芽[14]。本试验中单独添加低浓度的 TDZ(0.2 mg/L)可诱导 3 ~4 个月苗龄的黑喉石斛苗试管开花,但诱导率较低,试管内仅见少量花芽。TDZ 与 PP_{333} 能够影响石斛的形态建成,促进其试管苗从营养生长阶段转变为生殖生长,在诱导兰花植物春石斛、铁皮石斛以及细茎石斛试管开花的研究中被证实有着重要作用[12,15-16]。李杰等发现,TDZ 和 PP_{333} 组合能诱导霍山石斛开花[9]。本试验中低比例的 TDZ 和 PP_{333} 组合 A1(1∶10)、A2(1∶5)可诱导处理处于单叶幼苗期黑喉石斛试管开花。B6(TDZ∶PP_{333} = 2∶3)、B8(TDZ∶PP_{333} = 1∶1)培养基成功诱导 3 ~4 个月苗龄的黑喉石斛试管苗开花。随着植株成熟度的增加,开花率逐渐增加,表现为 HH1 继代苗(40.00%) > HH2 继代苗(21.32%) > HH3 继代苗(13.32%)。未添加植物生长调节剂的对照均不能诱导黑喉石斛形成花芽。TDZ + PP_{333} + NAA 组合虽未能诱导花芽出现,但对 3 ~4 个月苗龄的黑喉石斛试管苗丛生芽的增殖及壮苗培养有积极的促进作用,其中以比例 1∶5∶2 和 1∶8∶4 的处理效果最佳。

参考文献:

[1]李　涛,张　训,汪元娇. 不同品种石斛药材鉴别特征研究[J]. 亚太传统医药,2017(8):39 - 41.

[2]张新平,张芳芳,王　飞,等. 植株成熟度与细胞分裂素对三种兰科植物试管开花与组培增殖的影响[J]. 南方园艺,2017(4):5 - 10.

[3]冯　莹,赖钟雄. 外源激素和糖对石斛兰原球茎受体系统建立的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2009,38(5):495 - 499.

[4]赵大克,李春芳,程治英,等. 梳唇石斛试管开花诱导和离体保存[J]. 亚热带植物科学,2012,41(1):48 - 50.

[5]张新平,丁群英,李　皓,等. 氮磷镁离子浓度和培养温度对 3 种兰花试管开花的影响[J]. 陕西林业科技,2017(2):1 - 6.

[6]张新平. 春石斛兰组培增殖及兰花试管开花研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.

[7]陈达菊. 兰花试管花的诱导及其发生机理的研究[D]. 广州:华南农业大学,2006.

[8]刘义存,周俊辉,白志川. 试管开花的研究评述[J]. 西南园艺,2006,34(5):20 - 22.

[9]李　杰,章金辉,朱根发,等. 生长调节剂诱导霍山石斛试管开花研究[J]. 中国农学通报,2015,31(1):127 - 131.

[10]吴高杰,赖钟雄. 春石斛离体培养条件优化及其试管开花研究[J]. 热带作物学报,2013,41(3):451 - 458.

[11]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(12):42 - 44.

[12]董　璐,李　青. 春石斛试管花芽分化与开花的影响因素[J]. 东北林业大学学报,2015,43(1):61 - 66.

[13]吴高杰,李　璐,赖钟雄. 兰花试管开花研究进展[J]. 中国农学通报,2011,27(10):67 - 72.

[14]陈肖英. 霍山石斛试管开花研究[D]. 广州:华南师范大学,2003.

[15]岑秀芬,黄春虹,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.

[16]王再花,涂红艳,叶庆生. 细茎石斛的快速繁殖和试管开花诱导[J]. 植物生理学通讯,2006,42(6):1143 - 1144.