

钩唇石斛离体快速繁殖技术体系的建立

周音¹, 殷丽青¹, 汤桂钧², 黄卫昌³, 胡永红³, 李秀芬¹, 蒋建平²,
刘 熠³, 胡海锋²

(1. 上海市农业科学院 林木果树研究所, 上海 201403; 2. 上海市闵行区农业科学研究所, 上海 201109;
3. 上海辰山植物园, 上海 201602)

摘要: 为了加快石斛类珍稀植物的育种进程、挽救珍稀濒危种类, 为石斛类珍稀植物离体快速繁殖提供依据, 本文以钩唇石斛(*Dendrobium aduncum* Lindl.) 未成熟的种子为外植体进行离体快速繁殖研究。结果表明: 未成熟种子接种于 0.5~1.0 mg/L MS+BA+0.2 mg/L NAA 培养基可以直接诱导原球茎; 适宜原球茎增殖的培养基为 2.0 mg/L MS+BA+0.5 mg/L KT+0.5 mg/L NAA, 增殖系数为 12.4; 原球茎分化的适宜培养基为 0.5 mg/L MS+BA+0.5 mg/L KT+0.2 mg/L NAA, 分化率为 97.5%; 芽苗生根的适宜培养基为 1/2 MS 培养基中添加 0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA, 平均根数为 8.57 条, 生根率达 100%, 移栽后再生植株生长健壮, 长势良好。

关键词: 钩唇石斛; 组织培养; 快速繁殖; 未成熟种子

中图分类号: S682.31

文献标识码: A

Establishment of Technological System for *In Vitro* Propagation of *Dendrobium aduncum*

ZHOU Yin¹, YIN Li-qing¹, TANG Gui-jun³, HUANG Wei-chang³, HU Yong-hong³,
Li Xiu-fen¹, JIANG Jian-ping², LIU Zhao³, HU Hai-feng²

(1. Forestry and Pomology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China;
2. Agricultural Research Institute of Minghang District, Shanghai 201109, China;
3. Shanghai Chen Shan Botanical Garden, Shanghai 201602, China)

Abstract: In order to accelerate the breeding process, rescue rare and endangered variety and provide the premise for *in vitro* propagation of rare plant *Dendrobium*, in this study, the immature seeds used as explants were applied to conduct rapid *in vitro* breeding of *Dendrobium aduncum*. The results showed that the protocorm was induced directly on MS medium containing 0.5~1.0 mg/L of BA and 0.2 mg/L of NAA. The optimal medium for protocorm multiplication was 2.0 mg/L MS+BA+0.5 mg/L KT+0.5 mg/L NAA with the propagation coefficient up to 12.4. The MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA, 0.5 mg/L KT and 0.2 mg/L NAA was suitable for the differentiation of the adventitious buds with the differentiation percentage of 97.5%. The optimal medium for root formation was MS 1/2+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA. The number of root per plantlet was 8.57 and the rooting rate up to 100%. The

收稿日期: 2012-05-05

基金项目: 上海市科委资助项目(10dz1913100); 上海市绿化管理局资助项目“兜兰和石斛等兰科植物种质资源收集、栽培和繁殖技术研究”

作者简介: 周音(1962-), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 观赏植物组织培养技术, E-mail: zhouyin20032000@yahoo.com.cn;

殷丽青(1965-)为本文通讯作者, 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 观赏植物组织培养技术; E-mail: ylq_saa@tom.com

plantlets grew well after transplanted.

Key words: *Dendrobium aduncum*; tissue culture; *in vitro* propagation; immatured seed

钩唇石斛别名钩状石斛,兰科石斛属多年生附生草本,总状花序;小花淡粉色,唇瓣白色,先端钩状,芳香,花期春季至秋季,为中国乃至世界著名的珍稀观赏类石斛兰;也是传统的名贵中药材,具益胃生津、滋阴清热、润肺止咳之功效,早在《神农本草经》中即被列为上品。和其他石斛一样,钩唇石斛种子细小,种胚的发育又缺乏胚乳组织,自然条件下需与真菌共生才能萌发,萌发率较低,成苗困难。传统分株繁殖周期长,效率低,难以形成规模化生产,加之长期的无性繁殖造成感染病毒植株日益增多,使得花朵品质下降,影响观赏性^[1]。

石斛属植物的组织培养已有一些报道^[2-10],目前国外主要以观赏石斛为主,组织培养着重于培养条件的优化,如外植体、培养基成分和生长调节剂的选择试验;而国内则以满足药用生产的需求,主要进行了霍山石斛(*Den. huoshanense* C. Z. Tang. et S. J. Cheng)、曲轴石斛(*Den. gibsonii* Lindl.)、金钗石斛(*Den. noble* Lindl.)、铁皮石斛(*Den. officinale* Kimura et Migo.)和细叶石斛(*Den. hancockii* Rolfe)等药用石斛快繁体系的建立。

刘瑞驹^[7]、何宏贤^[8]研究建立了铁皮石斛、美花石斛(*Den. loddigesii* Rolfe)、细茎石斛[*Den. moniliforme* (Linn.) Sw.]、重唇石斛(*Den. hercoglossum* Rchb. f.)的组织培养快繁技术体系。叶秀舜^[9]用嫩叶和不同种龄的种子诱导愈伤组织后,光培养条件下形成(类)原球茎(protocorm),然后再生成苗,曾宋君等^[10]用5种石斛植物的种子进行原球茎的诱导。但钩唇石斛种子的离体培养与扩繁技术尚未见报道。

本实验以钩唇石斛未成熟种子为外植体,研究建立钩唇石斛高频率的离体快速繁殖体系,以期获得大量优质种苗,为其规模化生产提供技术指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

上海植物园提供的钩唇石斛蒴果。

1.2 方法

1.2.1 材料的准备与消毒

将钩唇石斛人工授粉后进行套袋,8~9分成熟

时(蒴果黄绿色,2.5 cm×4.5 cm)摘取其蒴果。在超净工作台上,先用酒精棉进行果面消毒,然后用解剖刀破开蒴果,取出种子,用无菌硫酸纸包裹;再用75%酒精消毒30 s,10%次氯酸钠溶液浸泡10 min,无菌水冲洗3~4次。

1.2.2 种子培养与原球茎的诱导

将钩唇石斛种子制成无菌水悬浮液,用移液枪吸取悬浮液,接种于原球茎诱导培养基的表面,直接诱导原球茎。原球茎诱导培养基成分如下:

(1) 0.5 mg/L MS+6-BA+0.2 mg/L NAA

(2) 1.0 mg/L MS+6-BA+0.2 mg/L NAA

(3) 2.0 mg/L MS+6-BA+0.2 mg/L NAA

培养基(1)~(3)添加3.0%蔗糖,0.6%琼脂,水解酪蛋白0.5 g/L和香蕉泥60 g/L,调节pH至5.4~5.6。培养温度为24~26℃,黑暗培养,25 d后改为光照培养,光照时间为12 h/d,光照强度为2000 lx左右。

1.2.3 原球茎的增殖与分化

选取直径约为1.5 mm左右的原球茎,接种至5个不同浓度配比的原球茎增殖与分化培养基上:

(4) 0.5 mg/L MS+6-BA+0.5 mg/L KT+0.2 mg/L NAA

(5) 1.0 mg/L MS+6-BA+0.5 mg/L KT+0.2 mg/L NAA

(6) 2.0 mg/L MS+6-BA+0.5 mg/L KT+0.2 mg/L NAA

(7) 2.0 mg/L MS+6-BA+0.5 mg/L KT+0.5 mg/L NAA

(8) 4.0 mg/L MS+6-BA+0.5 mg/L KT+0.5 mg/L NAA

培养基其他组分与光照培养条件与原球茎诱导相同。每瓶转接20个,每个处理6瓶,重复4次。培养45 d后统计原球茎的增殖系数和芽分化率。

1.2.4 壮苗与生根

将分化后高约1 cm、1对以上叶片的试管苗转接在壮苗培养基(1/2 MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L CH),培养30 d后(株高约2.0 cm左右)将试管苗切成单芽,转接于生根培养基上,培养15、30 d后统计试管苗生根结果。生根培养基含有2.0%蔗糖、0.7%琼脂:

(9) 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L NAA

(10) 1/2 MS+0.5 mg/L IBA

(11) 1/2 MS+1.0 mg/L IBA

(12) 1/2 MS+0.5 mg/L NAA

(13) 1/2 MS+1.0 mg/L NAA

1.2.5 试管苗的移栽

试管苗在生根培养基上生长 45 d 后,带瓶盖移至常温,自然散射光下炼苗 5~7 d,然后打开瓶盖,继续炼苗 2~3 d 后出瓶,去除基部培养基,移栽于以苔藓为基质的穴盘中,保持温度 25 ℃ 左右,空气湿度 80% 左右,1 个月后统计试管苗移栽成活率。

1.2.6 统计方法

增殖系数为增殖培养后的有效原球茎数与接种原球茎数之比;芽分化率为分化芽的原球茎数占接种原球茎数的百分比;生根率为生根苗数占接种苗数的百分比。

采用 Q-basic 系统用单因素随机区组设计的统计分析方法进行数据统计。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂对原球茎诱导及分化的影响

将含有钩唇石斛未成熟种子的水悬浮液接种至原球茎诱导培养基 35 d 后,培养基(1)~(3)上的种

子开始萌动、变绿,70~80 d 后逐渐形成圆锥状的原球茎(图 1-A),其中种子在(1)、(2)号培养基上萌发均匀,形成的原球茎淡绿色,生长旺盛,少量原球茎顶端逐渐开始形成叶原基,进而分化成苗,且分化苗粗壮、整齐;而(3)号培养基上的原球茎深绿色,细小、紧密,未见分化,表明 0.5~1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 为原球茎诱导适宜的激素浓度配比,过高浓度 6-BA 则不利于原球茎的分化与生长。

2.2 不同植物生长调节剂对原球茎增殖的影响

将诱导获得的原球茎接种在不同植物生长调节剂及其配比的(4)~(8)培养基上,培养 45 d 后统计分析 20 个外植体诱导的原球茎数、增殖系数及原球茎分化芽的百分比。结果表明(表 1):较低浓度的 BA(0.5 mg/L)即对原球茎的增殖有促进作用。当 NAA 为 0.2 mg/L、BA 在 0.5~2.0 mg/L 浓度范围内,钩唇石斛原球茎的增殖系数随 BA 浓度提高而增大;当 BA 浓度达 2.0 mg/L 时,继续提高 BA 浓度,原球茎增殖系数不再提高。适宜原球茎增殖的最佳激素配比是:2 mg/L MS+6-BA+0.5 mg/L KT+0.5 mg/L NAA,与其他处理相比差异达极显著水平,在该激素配比的培养基上,原球茎增殖系数达 12.4,且原先形成的原球茎不断分化成苗,培养的组培苗比较粗壮(见图 1-B)。BA 浓度在 0.5~2 mg/L 之间原球茎分化率均在 90% 以上,4 号处理最好,分化率达 97.5%。

表 1 不同植物生长调节剂对钩唇石斛原球茎增殖与分化的影响

Tab. 1 Effects of the different plant growth regulator (PGR) treatments on multiplication and differentiation of proctocorm of *Dendrobium aduncum*

处理编号 No. of treatment	诱导原球茎平均数 Mean proctocorm	增殖系数 Multiplication coefficient	分化芽的原球茎数 No. of mean proctocorm of differentiation	分化率/% Differentiation percentage	平均原球茎数差异显著性 Significance of difference between means
7	247.8	12.4	18.3	91.5	a A
6	207.6	10.4	18.8	94.0	b B
8	194.3	9.7	17.2	86.0	c B
5	187.7	9.4	19.2	96.0	c B
4	121.0	6.1	19.5	97.5	d C

注:LSD_{0.05}=10.08,LSD_{0.01}=14.15。大、小写字母分别表示 1% 和 5% 水平的显著,下同。

Notes: Capital and small letters represent the significant at 1% and 5% probability levels, respectively. The same meaning was shown as in the tables below.

2.3 试管苗的生根与移栽

当钩唇石斛原球茎增殖达到一定数量后,将其转入含有较低浓度植物生长调节剂的培养基上进行壮苗培养,分化的芽生长快且健壮,同时还能低倍增殖。生根结果表明(表 2):培养 30 d 后,各培养基上

试管苗的生根率均达 100%,其中(9)处理号每株生根数高达 8.57 根(见图 1-C),明显高于其他处理,且差异达极显著水平,在该培养基上,试管苗 15 d 生根率达 85%,高于其他处理,表明 IBA 和 NAA 配合较单独使用效果更好,有利于促进不定根的形

成。本研究利用该方法,繁育了大量钩唇石斛试管苗(图 1-D),经炼苗后移栽,在以苔藓为基质的容器上生长良好,1 个月后几乎全部成活(图 1-E)。

表 2 不同植物生长调节剂对钩唇石斛试管苗生根的影响

Tab. 2 Effects of plant growth regulators on rooting of plantlets of *Dendrobium aduncum*

处理号 No. of media	平均根数/株 Mean root number per flask	生根率/% Percentage of rooting		平均根数差异显著性 Significance of difference between means of root number	
		15 d	30 d		
9	8.57	85	100	a	A
10	6.43	64	100	b	B
12	6.25	60	100	b	B
11	5.70	52	100	b	B
13	5.25	51	100	b	B

$LSD_{0.05}=0.67, LSD_{0.01}=0.94$

3 结论与讨论

3.1 钩唇石斛花色艳丽(图 1-F)、气味芳香。本研究采用未成熟的钩唇石斛种子作外植体,进行无菌培养获得较好的效果,种子消毒方法简单,用 75% 酒精消毒 30 s 后,再用 10% 次氯酸钠处理 10 min 就可达到良好的灭菌效果,基本无污染,且未见外植体发生死亡现象。该方法避免使用毒性及残留较高的升汞,也适用于其他石斛属植物种子的消毒。

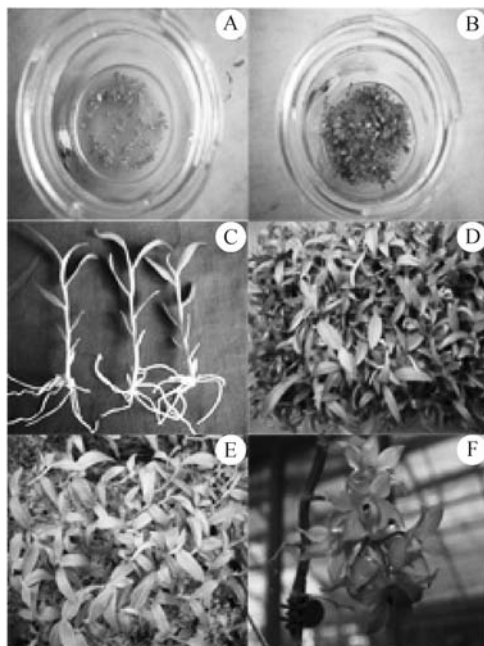


图 1 钩唇石斛的离体快速繁殖

A:原球茎的诱导;B:原球茎增殖分化;C:生根的再生植株
D:繁殖的大量组培苗;E:再生苗移栽;F:开花的钩唇石斛

Fig. 1 *In vitro* rapid propagation of *Dendrobium aduncum*

A: The protocorm like-bodys were induced; B: The protocorm like-bodys were multiplied& differentiated; C: Rooting regeneration plants;

D: A large number of regeneration plants; E: Regeneration plants

were transplanted; F: *Dendrobium aduncum* blossom

3.2 本研究采用钩唇石斛未成熟种子在添加香蕉泥和水解酪蛋白的 MS 培养基中可直接诱导原球茎,且不易褐化,简化了培养步骤,适合钩唇石斛的规模化离体快速繁殖。研究结果为钩唇石斛的生理、遗传育种方面的研究奠定基础,对该种种质资源保护和有效利用及提供种苗具有一定的应用价值。

3.3 王伟^[3]等报道了大苞鞘石斛的离体培养与快速繁殖,将增殖后的原球茎分割后培养于 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L 培养基上,30 d 分化率为 43%,但未报道原球茎的增殖结果;本研究结果显示,将钩唇石斛原球茎培养于 2.0 mg/L MS+6-BA+0.5 mg/L KT+0.5 mg/L NAA,增殖系数达 12.4,分化率达 91.5%,是前者的 2 倍多,可能与基因型及培养条件有关。本研究还发现,当繁殖的钩唇石斛试管苗达到一定数量后,降低植物生长调节剂浓度(1/2 MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA+0.2 g/L CH),可达到壮苗与低倍增殖的效果。

3.4 李军萍^[2]等进行了齿瓣石斛种子培养及扩繁技术研究,结果发现在 1/2 MS+0.3 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA+香蕉汁 10%+活性炭 0.1%+蔗糖 20 g/L 上,再生植株生根率为 90%,每株生根 4~5 条;本研究结果显示,植株生根的最佳激素配比为 0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA,生根率达 100%,每株生根数 8~9 根,根系发达,植株生长健壮,移栽全部存活。

参考文献:

- [1] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1991:268-278.
- [2] 李军萍,杨遂民. 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.

(下转第 71 页)