

几种外部因子对春石斛组培生根的影响

潘虹虹, 孙丹, 廉美兰, 朴炫春* (延边大学农学院园艺系, 吉林龙井 133400)

摘要 [目的]为春石斛种苗的规模化生产提供理论依据。[方法]以春石斛组培增殖的不定芽为外植体, 研究MS培养基浓度、IBA浓度、活性炭浓度及天然物质等外部因子对春石斛试管苗生根的影响。[结果]MS培养基浓度对试管苗生根影响较大, 试管苗在1/2 MS培养基中生根效果较好, 生根率达95%, 根多且长。在1/2 MS培养基中加入0.5 mg/L IBA和0.5 mg/L活性炭对试管苗生根及生长有明显促进作用。在培养基中添加天然物质对试管苗生根有促进作用, 其中添加100 g/L椰子汁时生根效果最佳, 生根率可达97%。[结论]当培养基配方为1/2 MS + 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L活性炭 + 100 g/L椰子汁时, 春石斛试管苗生根及生长效果较好。

关键词 春石斛; 培养基浓度; 活性炭; 天然物质

中图分类号 S682.31 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)29-12591-02

Effect of Several External Factors on Rooting of Tissue Culture Seedling of *Dendrobium nobile*

PAN Hong-hong et al (Horticulture Department, College of Agronomy Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

Abstract [Objective] The study was to provide the theoretical basis for scale production of *Dendrobium nobile* seedlings. [Method] With adventitious buds proliferated through tissue culture of *D. nobile* as explants, the effects of several external factors such as the concn. of MS medium, IBA, activated carbon and natural substance etc on rooting of tube seedlings of *D. nobile* were studied. [Result] The effect of MS medium concn. on rooting of tube seedling was bigger, and the rooting effect of tube seedling in 1/2 MS medium was better, the rooting rate reached 95%, and the roots were more and long. It had obvious promoting effect on rooting and growth of tube seedling when IBA at 0.5 mg/L and activated carbon at 0.5 mg/L were added into 1/2 MS medium. It had promoting effect on rooting of tube seedling when natural substance was added into the medium, and the rooting effect was best when 100 g/L coconut juice was added into the medium, with rooting rate up to 97%. [Conclusion] The effect of rooting and growth of tube seedling of *D. nobile* were better when the formula of medium was 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L activated carbon + 100 g/L coconut juice.

Key words *Dendrobium nobile*; Medium concn.; Activated carbon; Natural substances

春石斛(*Dendrobium nobile*)为兰科石斛属多年生草本植物, 属落叶温带种, 是继蝴蝶兰、大花蕙兰之后最有发展前景的兰花商业品种, 需求量增长极快, 目前我国依靠从日本、韩国进口^[1]。春石斛主要采用分株及组织培养的方式进行繁殖, 但其分株繁殖的繁殖系数低, 不能满足生产需要^[2-4]。关于石斛兰的离体繁殖有较多的报道, 但大多局限于外植体的试管建成、再生体系的建立、增殖及愈伤的诱导等方面。植物组织培养中, 组培苗生根状态对幼苗在田间的成活率及生长影响极大, 生根培养的成功与否直接影响到组培的成败。因此, 针对不同种类及不同品种探索组培生根条件具有重要意义。笔者以春石斛组培增殖的不定芽作为外植体, 研究几种外部因子对春石斛生根的影响, 为种苗的规模化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验处理 ①MS浓度试验。将无菌培养的春石斛不定芽切成1 cm大小后分别接入1/4 MS、1/2 MS、3/4 MS、MS、2 MS共5种培养基中, 培养基其他成分为IBA(吲哚乙酸)0.5 mg/L + 蔗糖30 g/L + 活性炭0.5 mg/L + 琼脂粉7 g/L, pH值为5.8; ②IBA浓度试验。在1/2 MS培养基中分别加入不同浓度的IBA, 其浓度分别为0.5、1.0、2.0 mg/L, 以不加IBA的为对照(0); ③活性炭浓度试验。在1/2 MS + IBA 0.5 mg/L的培养基中分别加入活性炭0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L, 以不加活性炭处理为对照; ④在1/2 MS + IBA 0.5 mg/L + 活性炭0.5 mg/L培养基中加入椰子、香蕉、马铃薯和苹果等天然物质(100 g/L), 以不加天然物质为对照。

1.2 培养方法及条件 试验采用100 ml柱形瓶, 培养基量

固定为50 ml, 在温度121℃, 压力1.2 kg/cm²的条件下高压灭菌15 min。培养基冷凝后, 每瓶接入4个外植体, 每处理接种5瓶作为重复。在培养温度(25±2)℃, 相对湿度70%, 光照强度1 600 lx, 光照16 h条件下培养。培养60 d后进行调查。

2 结果与分析

2.1 MS培养基浓度对春石斛试管苗生根的影响 由表1可知, 培养基浓度为1/2 MS时, 试管苗根及茎叶的生长显著优于其他处理, 生根率高达95%, 根数多且较长, 每株平均生根5.0条, 根长达3.5 cm; 培养基浓度过高或过低均不利于试管苗茎叶及根的生长, 在1/4 MS处理中, 根数少且短, 植株叶片发黄。2 MS处理中, 试管苗生长缓慢, 株高增长受到抑制, 植株矮小。植物组织培养生根阶段, 降低培养基中的大量元素和微量成分的浓度, 可提高大多数植物的生根能力^[5-6]。在试验中当MS培养基浓度降低至1/2时, 不论是根系生长还是茎叶生长均表现良好, 这与吴辉1/2 MS培养基适合金钗石斛试管苗生根的结果相似^[7]。因此, 春石斛组培生根培养基以1/2 MS培养基为佳。

2.2 IBA浓度对春石斛试管苗生根的影响 从表2可以看出, IBA对根的生长影响较大, 培养基中不添加IBA时, 春石斛几乎不生根, 但当培养基中加入IBA浓度为0.5 mg/L时生根率高达97%, 且试管苗的茎叶生长良好。当IBA浓度高于0.5 mg/L时, 生根率降低, 根及茎叶生长的各项指标随IBA浓度的增加呈下降趋势, 浓度达到2.0 mg/L时, 对根生长的抑制作用明显, 试管苗部分叶片变黄。黎建玲等对金钗石斛试管苗的生根进行研究时指出, 当IBA浓度为0.2 mg/L时, 试管苗生根率达100%, 根数多且粗壮^[8]; 试验中IBA浓度为0.5 mg/L时较其他浓度更有利于春石斛生根。结果表明, 石斛类组培生根培养基中应添加生长素, 但浓度不可过

基金项目 国家自然科学基金项目(30860176)。

作者简介 潘虹虹(1983-), 女, 吉林农安人, 硕士研究生, 研究方向: 植物组织培养。*通讯作者。

收稿日期 2008-07-07

高,具体浓度可根据不同种类或品种而定,春石斛以 IBA 0.5 mg/L 较为适宜。

2.3 活性炭(AC)浓度对春石斛试管苗生根的影响 由表 3 可知,培养基中添加 AC 时对试管苗的根及茎叶生长均有促进作用。当培养基中添加 0.5 mg/L 的 AC 时,春石斛根及茎叶生长显著优于其他处理,随着 AC 浓度的升高,试管苗的根及茎叶生长呈下降趋势,当培养基中 AC 浓度超过 1.0 mg/L 时,生根率反而降低,对根及茎叶的生长有抑制作用。从表 3 还可看出,培养基中不添加 AC 时,试管苗的生长明显不及加入 AC 的处理。赖家业和韩文璞在柠檬和甜樱桃的组织培养中发现活性炭可明显促进其芽及根的生长^[9-10]。试验也发现培养基中 0.5 mg/L 的 AC 对生根及根系生长有促进作用,而且也可缓解春石斛在组培继代中出现的褐化和枯死现象的发生。

表 1 MS 培养基浓度对春石斛试管苗生根的影响
Table 1 Effects of MS concentration on rooting of *D. nobile* in vitro

处理 Treatment	茎叶 Stem and leaf			根 Root				
	株高//cm	鲜重//mg	干重//mg	根长//cm	根数	鲜重//mg	干重//mg	生根率//%
	Plant height	Fresh weight	Dry weight	Root length	Number of root	Fresh weight	Dry weight	Rooting rate
1/4 MS	2.9 b	328.5 d	17.0 d	1.3 d	2.5 c	56.8 b	6.2 bc	85
1/2 MS	3.9 a	561.0 a	45.0 a	3.5 a	5.0 a	104.8 a	8.5 a	95
3/4 MS	3.1 b	429.5 c	25.3 c	2.4 c	3.0 c	57.8 b	6.3 b	80
MS	3.0 b	462.0 b	37.8 b	2.8 b	4.5 b	56.0 b	6.1 c	75
2 MS	2.2 c	312.0 e	17.5 d	2.7 b	3.0 c	26.8 c	2.7 d	70

注:同列不同小写字母表示在 0.05 水平上存在差异。下同。
Note:Different lowercases in a row mean differences at 0.05 level. The same as follows.

表 2 IBA 浓度对春石斛试管苗生根的影响
Table 2 Effects of IBA concentration on rooting of *D. nobile* in vitro

IBA 浓度//mg/L IBA concentration	茎叶 Stem and leaf			根 Root				
	株高//cm	鲜重//mg	干重//mg	根长//cm	根数	鲜重//mg	干重//mg	生根率//%
	Plant height	Fresh weight	Dry weight	Root length	Number of root	Fresh weight	Dry weight	Rooting rate
0	2.7 d	213.1 d	16.5 d	0	0	0	0	0
0.5	4.2 a	603.5 a	55.2 a	3.3 a	5.6 a	136.8 a	9.3 a	97
1.0	3.7 b	401.8 b	38.3 b	2.7 b	4.1 b	79.8 b	7.2 b	80
2.0	3.6 bc	304.8 c	29.4 c	2.6 b	3.0 c	56.1 c	6.4 c	79

表 3 活性炭浓度对春石斛试管苗生根的影响
Table 3 Effects of AC concentration on rooting of *D. nobile* in vitro

活性炭浓度//mg/L AC concentration	茎叶 Stem and leaf			根 Root				
	株高//cm	鲜重//mg	干重//mg	根长//cm	根数	鲜重//mg	干重//mg	生根率//%
	Plant height	Fresh weight	Dry weight	Root length	Number of root	Fresh weight	Dry weight	Rooting rate
0	3.4 c	438.3 d	32.6 d	1.5 d	1.6 c	30.5 e	4.6 e	48
0.5	4.5 a	699.1 a	60.5 a	3.7 a	5.8 a	179.5 a	10.5 a	97
1.0	3.8 b	583.5 b	49.8 b	2.9 b	3.8 b	87.8 b	8.2 b	80
1.5	2.8 d	503.2 c	37.3 c	2.8 b	3.7 b	58.5 c	7.3 c	74
2.0	2.3 e	522.5 c	39.7 c	2.3 c	1.7 c	41.8 d	6.8 d	72

2.4 不同天然物质对春石斛试管苗生根的影响 由表 4 可知,当培养基中添加椰子、香蕉和马铃薯等天然物质后试管苗根及茎叶生长显著优于对照(未加天然物质),但加入苹果后反而对试管苗生长不利。在添加椰子、香蕉和马铃薯的培养基中,生根效果以添加椰子汁的处理为最佳。在添加椰汁的处理中试管苗分化的根数多,根较长且粗,茎叶生长也良好,说明椰子汁具有生根壮苗的作用。马铃薯的效果仅次于椰子汁,从降低成本的角度考虑也可选择马铃薯为添加物。此外,在试验过程中观察到添加香蕉汁的处理中,发现有试管苗褐化现象,且易引起污染,不适合应用于春石斛的组培。徐宏英^[11]研究表明,大花惠兰壮苗生根中添加香蕉泥可以促进生根,与试验结果不同,这可能与种的不同有关。

表 4 不同天然物质对春石斛试管苗生根的影响
Table 4 Effects of various natural substances on rooting of *D. nobile* in vitro

天然物质 Natural substance	茎叶 Stem and leaf			根 Root				
	株高//cm	鲜重//mg	干重//mg	根长//cm	根数	鲜重//mg	干重//mg	生根率//%
	Plant height	Fresh weight	Dry weight	Root length	Number of root	Fresh weight	Dry weight	Rooting rate
对照 CK	4.3 c	687.6 d	59.3 d	3.4 c	5.5 c	168.4 c	9.6 c	95
椰子汁 Coconut milk	5.5 a	975.0 a	73.5 a	4.0 a	6.3 a	198.5 a	11.9 a	97
香蕉 Banana	4.7 b	721.6 c	60.4 c	3.5 c	5.7 b	180.0 b	10.5 b	92
马铃薯 Potato	4.8 b	874.5 b	68.4 b	3.8 b	5.8 b	180.2 b	10.7 b	97
苹果 Apple	4.1 d	597.5 e	50.2 e	3.2 d	4.5 d	142.8 d	8.9 d	76

表2 Str. 对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响

Table 2 Effects of streptomycin on callus induction and differentiation

Str. 浓度	接种外植体数//个	愈伤组织诱导率//%	不定芽分化率//%
Str. con-	Inoculated	Callus induction	Adventitious bud
centration	explants	rate	differentiation rate
0	45	100.0	97.8
100	45	64.4	51.1
200	45	42.2	26.7
300	45	24.4	8.7
400	45	11.1	0
500	45	0	0

作用较小。Crb. 浓度为 300 mg/L 时,愈伤组织诱导率、不定芽分化率和有效芽数与对照的差别不大;Crb. 浓度为 500 mg/L 时,有效芽数仍可达到 27 个,为对照的 37%。所以,用小叶作外植体转化宽叶刺槐时,选用 Crb. 作为农杆菌生长的抑菌剂较为合适,浓度以 300~400 mg/L 为宜。

表3 Crb. 对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响

Table 3 Effects of carbentcillin on callus induction and differentiation

Crb. 浓度	接种外植体数//个	愈伤组织诱导率//%	不定芽分化率//%
Crb. con-	Inoculated	Callus induction	Adventitious bud
centration	explants	rate	differentiation rate
0	45	100.0	93.3
100	45	100.0	91.1
200	45	97.8	88.9
300	45	95.6	86.7
400	45	77.8	64.4
500	45	60.0	42.2

3 结论与讨论

为了提高转化效率,应当使用对农杆菌抑制效果好同时又对外植体再生影响较小的抗生素^[11]。了解抑菌性抗生素对刺槐愈伤组织诱导和分化不定芽的抑制作用,有利于转基

因研究中选择合适的抗生素用量。该试验中宽叶刺槐小叶对 3 种抑菌抗生素的反应存在差异,表明在转基因试验中,应考虑到不同抗生素对刺槐外植体材料影响的差异。

Cef.、Crb. 和 Str. 是农杆菌介导植物遗传转化中的常用抑菌抗生素,对多数菌株的杀菌效果较好,但对植物组织有不良影响^[7]。试验结果表明,3 种抗生素对宽叶刺槐小叶愈伤组织诱导和不定芽分化的抑制作用 Str. 最强,Cef. 次之,Crb. 较小。随着抗生素浓度升高,愈伤组织诱导率和不定芽分化率而迅速减少,当 Cef. 浓度为 500 mg/L,Str. 浓度为 400 mg/L 时,没有不定芽发生,当 Crb. 浓度为 500 mg/L 时,有效芽数仍可达到 27 个。所以,用小叶作外植体转化宽叶刺槐时,宜选用 Crb. 为农杆菌的抑菌剂,用量为 300~400 mg/L。

参考文献

[1] 王树芝,田砚亭,李云. 生长调节物质对刺槐复叶再生的影响[J]. 核农学报,2004,18(3):207-211.
[2] DAVIS J M,KEATHLY D E. Toward efficient clonal propagation of mature black locust trees using tissue culture[J]. Nitrogen Fixing Tree Research Reports,1987,5:57-58.
[3] DAVIS J M,KEATHLY D E. Detection and anlysis of T-DNA in crown gall tumors and kanamycirr resistant callus of *Robinia pseudoacacia*[J]. Can J Forest Res,1989,19(4):1118-1123.
[4] HAN K H ,GORDEN M P,KEATHLEY D E. Genetic transformation of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) biotechnology in agriculture and forestry[J]. Transgenic Trees,2000,159:273-280.
[5] IGASAKI T,MOHRI T,ICHIKAWA H, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Robinia pseudoacacia* [J]. Plant Cell Reports, 2000,19(5):448-453.
[6] 夏阳,梁慧敏,陈受宜,等. 四倍体刺槐转甜菜碱醛脱氢酶基因的研究[J]. 中国农业科学,2004,37(8):1208-1211.
[7] 郑进,康薇,洪华珠. 抗生素在农杆菌介导植物转基因应用[J]. 林业科技开发,2006,20(3):8-11.
[8] 康薇,郑进,洪华珠. 链霉素对杨树叶片分化不定芽的影响[J]. 林业科技,2006,31(5):1-2.
[9] 牛正田,张秀梅,罗晓芳. 刺槐对 3 种抗生素敏感性测定[J]. 植物生理通讯,2004,40(1):98-99.
[10] 郑进,康薇,王慧,等. 杨树、刺槐对卡那霉素敏感性的测定[J]. 核农学报,2006,20(2):116-117.
[11] 郑进. 中嘉 8 号杨转 BtCry1A 基因的研究[D]. 武汉:华中师范大学,2006:53.

(上接第 12592 页)

3 讨论

试验结果表明,MS 培养基浓度对试管苗生根影响较大,试管苗在 1/2 MS 培养基中生根效果良好,生根率达到 95%,且茎叶生长旺盛。1/2 MS 培养基中加入 IBA 0.5 mg/L 以及活性炭 0.5 mg/L 时对试管苗的生根及生长有促进作用。天然物质的加入对春石斛试管苗生根的效果也明显,培养基中添加 100 g/L 椰子汁的效果最佳,生根率可达 97%。

参考文献

[1] 刘金,潘光华. 兰花[M]. 北京:中国农业出版社,1998:34-35.
[2] 乔佳伟. 春石斛栽培要点[J]. 中国花卉园艺,2005(8):18-19.
[3] 毛碧增,李凤玉,王春,等. 春石斛组织培养技术研究[J]. 浙江大学学报:理学版,2003,30(5):580-583.

[4] 王玉英,李枝林,余朝秀. 春石斛试管增殖研究初报[J]. 中国农学通报,2005,21(2):208-209.
[5] 蒋丽娟,孙友平,李培旺. 培养因子对绿玉树离体微型快繁的影响[J]. 广西科学,2003,10(3):232-237.
[6] 吴翠蓉,刘丽娜,于爱萍,等. 离体条件下几种不同的因子对芦笋诱导生根的研究[J]. 植物研究,2006,26(4):430-434.
[7] 吴辉,赵俊,宋锡全. 四种不同培养基对诱导金钗石斛幼苗生根的影响[J]. 贵州科学,2007,25(2):65-67.
[8] 黎建玲,黄肇宇,詹源庆,等. 金钗石斛试管苗生根研究[J]. 广西科学院学报,2006,22(2):87-89.
[9] 赖家业,杨振德. 活性炭在土朽椴组织培养中的作用[J]. 广西热作科技,1999(4):10-11.
[10] 韩文璞,袁明莲. 活性炭在甜樱桃组织培养中的应用[J]. 落叶果树,2001(3):7-8.
[11] 徐宏英,赵玉明,谢海军,等. 大花蕙兰组培快繁影响因素分析[J]. 园艺学报,2002,29(2):183-185.