

· 栽培与育种 ·

杜鹃兰离体快繁技术研究

毛堂芬¹, 刘涛², 刘作易^{3*}, 朱国胜^{1,3}, 黄永会^{1,3}

(1. 贵州省生物技术研究, 贵州贵阳 550006; 2. 贵州省柑橘科学研究所, 贵州罗甸 550100; 3. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵州贵阳 550006)

摘要 以杜鹃兰的种子和假鳞茎作外植体均诱导获得原球茎及再生植株。原球茎增殖培养基以 $B_5 + 2\%$ 白糖 + 0.1% 活性炭较好, 增殖系数可达 6~10 倍; 在原球茎继代增殖时分化出完整植株; 移栽到全蛭石基质上, 成活率可达到 96.67%。

关键词 杜鹃兰; 快速繁殖

中图分类号: R282.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-4454(2007)-09-1057-03

Rapid Propagation of *Cremastra appendiculata* in Vitro

MAO Tang-fen¹, LIU Tao², LIU Zuo-yi³, ZHU Guo-sheng^{1,3}, HUANG Yong-hui^{1,3}

(1. Guizhou Biotechnology Institute, Guiyang 550006, China; 2. Guizhou Orange Institute, Luodian 550100, China; 3. The Key Laboratory for Agri. Biotechnology of Guizhou, Guiyang 550006, China)

Abstract The protocorms and regenerated plant were induced from the seeds and the pseudobulbs of *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino with $B_5 + 2\%$ sugar + 0.1% activated carbon. The coefficient of reproduction ranges can be achieved 6 to 10. The optimum transplantation medium was vermiculite and the survival rate was 96.7%.

Key words *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino; Rapid propagation

兰科杜鹃兰 *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino 又名毛慈姑、算盘七, 以干燥假鳞茎作中药山慈姑, 主要产于贵州、四川等地。其根茎含粘液及葡配甘露聚糖, 味甘微辛、性寒, 有小毒。具有消肿化痰、解毒散结等功效, 主要用于治痈疽疔肿、瘰癧、喉痹肿痛、淋巴结结核及蛇、虫、狂犬伤等症, 在临床上亦作抗癌中药配伍使用。

杜鹃兰主要靠分株繁殖, 繁殖系数极低。一般一个假鳞茎 1 年只生长一个新的球茎, 而一个假鳞茎种植 2 年只能繁殖二株。种子非常细小, 胚只是一团细胞, 在自然条件下很难发育成幼苗。由于市场需求较大, 导致野生资源严重枯竭。本文报道杜鹃兰快速繁殖技术, 为组培苗工厂化生产提供技术参考。

1 材料与方法

试验用杜鹃兰成熟种子和假鳞茎由贵州信邦制药有限公司黔东南药材种植基地提供。

1.1 外植体 (1) 在超净工作台上, 将采集的杜鹃兰未开裂蒴果用 70% 酒精棉球擦拭表面, 再将蒴果蘸上 95% 酒精, 在酒精灯上点火燃烧灭菌。用无菌解剖刀剖开蒴果, 将细小的种子均匀地撒播在附加

NAA0.5 mg/L 的 1/2MS 固体培养基表面, 置于黑暗条件培养, 萌发后采用光照培养。(2) 选取生长健壮的假鳞茎, 先用自来水冲洗附着的泥土, 晾干装入无菌三角瓶, 倒入 70% 酒精消毒处理 20 s, 再用 0.1% 升汞液浸泡 8 min, 无菌水清洗 5 次, 每次 2~3 min。用灭菌滤纸吸干水分, 然后用无菌解剖刀切取假鳞茎上的芽眼, 接种于 MS 固体培养基。

1.2 原球茎增殖培养 选用 MS、1/2MS、 N_6 、 B_5 、VW、KC 等 6 种培养基, 另设白糖、激素及活性炭等不同浓度试验。接种的原球茎分别放置光照 12 h/d 和全黑暗条件下培养。基本培养基均附加 2% 白糖、0.8% 琼脂粉和 0.2% 活性炭, pH5.8。用 1/100 天平称量原球茎, 每瓶接种 0.20 g 左右, 每个处理接种 10 瓶。培养 45 d 后, 去除培养基, 称取根状原球茎的重量, 计算增殖率。

1.3 再生植株诱导 将增殖得到的根状茎分切成 0.5~1.0 cm 大小, 接种在 B_5 固体培养基上培养。

1.4 炼苗移栽 选用苔藓、蛭石、珍珠岩和腐殖土为炼苗基质, 按照不同的体积比, 混合配制成 7 种移栽基质。将选用的基质在太阳光下晒 2 d, 然后按不同比例混合分装于塑料盆内, 用 500:1 的甲醛溶液

基金项目: 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(黔科合中药专字[2004]17号)

作者简介: 毛堂芬(1970-), 女, 副研究员, 主要从事药用植物生物技术研究。

* 通讯作者: 刘作易, E-mail: liuzuoyi@yahoo.com.cn。

喷洒淋透,再用塑料膜密封处理1个月。使用前揭开塑料膜透气2 d后,装入营养钵。移栽前将培养瓶置室温自然条件下炼苗2~3 d后揭去封口膜炼苗,2 d后用镊子轻轻夹出瓶苗,自来水洗去根部的培养基,用800倍液的多菌灵消毒10 min,清水洗净后栽入已消毒处理的基质,每个营养钵栽种1株。栽好后淋透水,置温室大棚内。1星期后结合浇水喷施营养液。栽种40 d后统计成活率及生长情况。

1.5 培养条件 培养温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,光照时间12 h/d,光照强度1 500~2 000 lx,特别说明除外。

2 结果与分析

2.1 原球茎获得 杜鹃兰种子在黑暗条件下培养半年后,极少数开始萌发形成白色的原球茎,初期为圆球形,随后逐渐生长变长;移置光照条件下培养,白色的原球茎开始增殖生长成绿色,形成类似桑果状的凸起,呈丛生型原球茎;部分凸起生长较快,形成条状的根状茎,其表面长有白色的根毛状物。从假鳞茎上切下的芽眼培养10 d左右开始萌动,其上长出新的球形原球茎,表面也长有白色的根毛状物,随着生长,颜色逐渐转变成绿色,形成根状茎。

2.2 不同培养基对原球茎增殖的影响 在6种培养基上原球茎增殖生长表现出较大差异(表1),在 B_5 培养基上原球茎增殖速度快,长势较好,形成又粗又长的根状茎,色绿,其表面长有许多白色根毛状物,增殖率达518.18%;其次为1/2MS培养基的增殖速度较快,长势亦较好,色绿;MS培养基上原球茎的增殖速度慢,长势较差,有的色绿,有的成白色,后变褐死亡; N_6 培养基上原球茎增殖较少,有部分死亡;VW和KC培养基上的接种材料有的呈水渍状,有的变白变褐,绝大多数死亡。

表1 不同培养基对原球茎增殖的影响

培养基	接入原球茎重量(g)	培养后重量(g)	增殖率(%)	生长势
MS	0.22	0.87	295.45	++
1/2MS	0.21	0.99	371.43	+++
B_5	0.22	1.36	518.18	++++
N_6	0.21	0.76	261.90	+
VW	0.21	0.54	157.14	-
KC	0.21	0.51	142.86	-

注:“-”为生长势极差,“+”为生长势差,“++”为生长势较差,“+++”为生长势较好,“++++”为生长势最好。下表同

2.3 白糖浓度对原球茎增殖的影响 从表2可以看出,培养45 d后,在 B_5 培养基中添加2%白糖,原球茎增殖速度快,长势最好,色绿,表面白色根毛状物多;1%白糖浓度的原球茎增殖最慢,生长细弱,根毛状物少。

表2 白糖浓度对原球茎增殖的影响

白糖浓度(%)	接入原球茎重量(g)	培养后重量(g)	增殖率(%)	生长势
1.0	0.22	0.78	254.55	+
2.0	0.21	1.43	580.95	++++
3.0	0.22	1.32	500.00	+++
4.0	0.21	1.00	376.19	++

2.4 激素对原球茎增殖的影响 激素对杜鹃兰原球茎增殖有较大差别。单独添加细胞分裂素6-BA 3.0 mg/L时,形成的丛生型原球茎较多,但有的生长不正常;附加NAA 0.5 mg/L的培养基上原球茎增殖形成的细条状较多,顶端及侧端有较多分化成芽;添加6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,只有分化趋势;而不加激素(对照)的原球茎的增殖速度快,生长正常,色绿。

2.5 活性炭浓度对原球茎增殖的影响 图1显示,在 B_5 培养基中添加0.1%活性炭,原球茎增殖速度最快,色绿,较粗壮,增殖率达到1065.00%,且有利于形成根状茎直接栽种出苗;附加0.2%活性炭,原球茎增殖较快,多呈丛生型,色绿,表面长有许多白色根毛状物,适合继代增殖培养;活性炭浓度增加到0.8~1.0%,原球茎增殖生长较差,大部分呈细条状;在没有添加活性炭的培养基上,原球茎多变褐死亡。

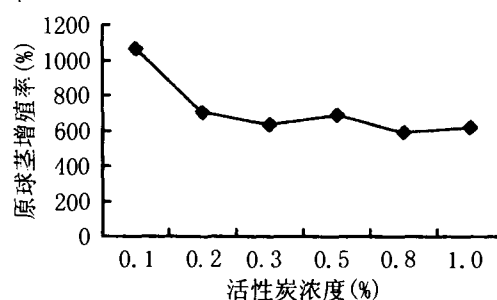


图1 活性炭浓度对原球茎增殖的影响

2.6 pH值对原球茎增殖的影响 pH值为5.0~6.0时,原球茎增殖速度快(图2),长势好,色绿,增殖倍数达10倍左右;而pH 5.0以下和pH 6.0以上,原球茎增殖速度较慢,长势差,生长不正常。

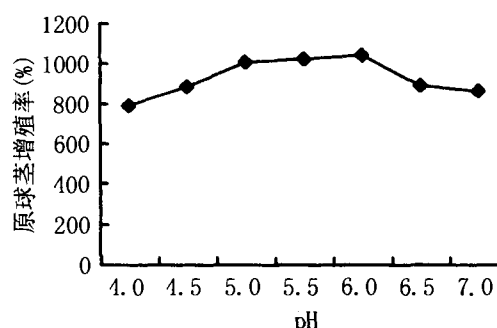


图2 pH值对原球茎增殖的影响

2.7 光照及培养方式对原球茎增殖的影响 在每天12 h的光照培养条件下,原球茎增殖速度快,长势好,色绿,表面有许多白色的根毛;全黑暗条件下原球茎增殖较少,色白,多分化成芽。

2.8 根状茎诱导成苗及生根培养 增殖的根状茎顶端及侧端分化出芽;芽生长过程中,也同步分化生

表3 不同基质对组培苗生长的影响

基质	栽种株数	成活率(%)	生长情况
全蛭石	30	96.67	叶色绿;根1-5条,并长出新的根尖
蛭石+珍珠岩(1:1)	30	96.67	叶色绿,但较多叶尖萎蔫;根1-5条,并长出新根尖
蛭石+腐殖土(1:1)	29	93.10	叶色绿;根1-5条,较多根变黑死亡,少数根尖发出新根
蛭石+苔藓(2:1)	30	93.33	叶色绿,部分叶尖萎蔫;根1-5条,部分根生长
蛭石+腐殖土(1:1)	30	93.33	叶色绿,部分叶尖萎蔫;根1-5条,多数根尖变黑死亡,少数长新根
蛭石+苔藓(2:1)	30	96.67	叶色绿,部分叶尖萎蔫;根1-5条,部分根尖伸长
蛭石+腐殖土+苔藓(1:1:1)	29	86.21	叶色绿,部分叶尖萎蔫;根1-5条,多数根变黑死亡,极少数生长

长。培养约30 d后,芽长成1.0 cm左右高的小苗,基部陆续长出辐射状小根,且长有白色根毛,生根率达100%。待组培苗根长到1.0~2.0 cm时可炼苗处理。

2.9 基质种类对组培苗生长的影响 组培苗在不同混合基质中的生长情况见表3。在全蛭石基质中,苗生长得最好,叶色绿,并长出新根,成活率达96.67%;而蛭石+腐殖土+苔藓,根生长差,死亡较多,成活率仅为86.12%。

3 讨论

杜鹃兰假鳞茎和种子均能诱导获得原球茎,但假鳞茎易采集易诱导。原球茎的增殖是杜鹃兰快速增殖的关键。在B₅培养基上增殖速度快,原球茎又粗又长,且色绿;不加激素的培养基对原球茎的增殖生长较好,色绿,对保持原球茎继代扩繁的遗传稳定性具有重要意义;添加适宜浓度活性炭,能明显促进增殖生长,且长势良好。

由原球茎增殖的完整再生植株,可直接炼苗移栽。移栽采用全蛭石基质较好。

(2006-12-19 收稿)

2007-04-02 修回)

杂交景天组织培养和植株再生

赵银萍,胡洁,张九东

(西安文理学院生命科学系,陕西西安710065)

摘要 以杂交景天子叶、胚轴为外植体,接种在附加不同激素组合的MS培养基形成的愈伤组织有红、绿两种类型。子叶在MS+6-BA 1 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L和MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基上的愈伤组织诱导率高达80%~82%。愈伤组织用MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L可诱导产生丛生不定芽,壮苗生根培养基为1/2 MS。组培苗移栽成活率达80%。

关键词 杂交景天;组织培养;快速繁殖

中图分类号: R282.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4454(2007)09-1059-03

Tissue Culture and Regeneration of *Sedum hybridum*

ZHAO Yin-ping, HU Jie, ZHANG Jiu-dong

(Department of Life Science, Xi'an College of Arts and Sciences, Xi'an 710065, China)

Abstract The cotyledons and hypocotyl of *Sedum hybridum* were used as explant to induce callus on MS media supplemented with different concentration of hormone. There were formed two kind of calluses, one was red while other was green. The cotyledon was the ideal explant for the callus induction, its induction rate could be reached 80%~82% either on MS medium with 6-BA 1 mg/L and 2,4-D 0.5 mg/L or with 6-BA 1 mg/L and NAA 0.5 mg/L. Numerous adventitious buds could formed from calluses on the MS medium

基金项目: 陕西省科学技术计划[2004K18-G12(8)]; 陕西省教育厅自然科学专项课题(06JK199)

作者简介: 赵银萍(1963-),女,副教授,硕士,主要从事植物生理及植物组织培养研究, E-mail: yinping019@163.com, Tel: 029-81209922。