

霍山石斛组培丛生芽诱导增殖及生根技术

谢寅峰 徐丽 王莹

(南京林业大学森林资源与环境学院)

摘要:以霍山石斛无根试管苗为试材,研究了丛生芽诱导增殖和生根技术。丛生芽诱导增殖通过4因素3水平正交试验,筛选出的最适培养基为1/2MS+0.2 mg/LKT+0.2 mg/L NAA+0.3 mg/L 6-BA。4个因子对霍山石斛丛生芽诱导的影响顺序依次为:KT>基本培养基>6-BA>NAA,其中,KT对霍山石斛丛生芽的诱导效果极为显著。添加不同浓度的生长素及香蕉泥进行生根诱导,其生根效果排序为:香蕉泥>IBA>NAA,最佳的生根培养基是MS基本培养基添加20%香蕉泥,生根率可达94.3%。

关键词:霍山石斛;组培;丛生芽;诱导增殖;生根

Studies on Clustered Shoots Induction, Proliferation and Rooting in Vitro of *Dendrobium huoshanense*

//XIE Yin-feng, XU Li, WANG Ying

Abstract: The clustered shoots induction, proliferation and rooting techniques of tube *Dendrobium huoshanense* seeding were developed in this paper. The optimal inducing and proliferating medium: 1/2MS+0.2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA+0.3 mg/L 6-BA, was selected by the orthogonal design of four factors and three levels. The results also showed that the orders of four factors to influence the tufted-bud induction of *Dendrobium huoshanense* were: KT > minimal medium > 6-BA > NAA, and KT was the most effect on *Dendrobium huoshanense*. The orders of different concentration of auxin and banana mud added to induce root formation were: banana mud > IBA > NAA. The optimal rooting medium was MS with 20% banana mud, and rooting rate was 94.3%.

Key words: *Dendrobium huoshanense*; Tissue culture; Clustered shoots; Induction and proliferation; Rooting

Author's address: College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, 210037, Nanjing, China

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C Z Tang et S j Cheng),又叫霍石斛、米斛,茎丛生,直立,肉质状,是安徽霍山特产的珍稀名贵中药,《本草纲目拾遗》中已有记载^[1,2]。霍山石斛含有石斛碱,多糖,黄酮等多种活性物质,具有益精强阴,生津止渴,补虚羸,去胃中虚火之功效。作为一种应用广泛的名贵中药,霍山石斛的市场需求量不断增加。过度的采伐利用、生长缓慢、生态环境的恶化和繁殖率低等原因的影响,使野生资源濒临灭绝。利用组织培养方法,对药用石斛进行离体快速繁殖,是解决生产中种苗问题的有效途径。目前虽有不少关于霍山石斛组培快繁的报道,但多为通过(类)原球茎方式增殖的研究^[3,4],由外植体直接诱导丛生芽增殖的研究尚少,试管苗生根率尚待进一步提高。本文通过正交试验的方法对影响霍山石斛丛生芽的诱导增殖因素进行系统研究,并对试管苗生根技术进行进一步探讨,为霍山石斛资源快繁及开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

霍山石斛来自南京林业大学植物学实验室的健壮无根试管苗。

1.2 试验方法

1.2.1 丛生芽诱导增殖培养

选取MS、6-BA、KT、NAA这4个因子,每个因子3个水平。选用 $L_9(3^4)$ 正交表,考察上面4个因素对霍山石斛丛生芽诱导的影响。根据设计安排9组实验,每组10瓶,以带节茎段为外植体,每瓶内接种7个外植体,3次重复。

计算公式:增殖系数=接种后芽数/接种前芽数。

因子水平设计见表1。培养基中均加入浓度为3%的蔗糖,pH值为5.7。约每隔4周转继代1次。

表1 霍山石斛丛生芽诱导增殖因素水平 $L_9(3^4)$ 正交设计

水平	因素			
	MS(A)	KT(B) /mg·L ⁻¹	NAA(C) /mg·L ⁻¹	6-BA(D) /mg·L ⁻¹
1	1/2	0.3	0.3	0.3
2	1/4	0.1	0.4	0.5
3	1	0.2	0.2	0.4

收稿日期:2007-08-09

修回日期:2007-09-05

基金项目:江苏省高校自然科学基金项目(编号:05KJB220053)资助。

第一作者简介:谢寅峰(1966-),男,副教授,主要从事植物生理生化研究。

1.2.2 生根培养

采用单因素试验,以 MS 为基本培养基,添加浓度为 0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L 的 IBA,浓度为 0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L 的 NAA 以及质量分数为 10%、20%、40% 的香蕉泥,每组 10 瓶,3 次重复。经过 30 d 的培养后,观测试管苗的平均生根数、平均根长、生根率,进而对其生根状况进行总体分析。培养基中均加入浓度为 20% 的蔗糖,pH 值 5.7,以琼脂为凝固剂。

1.2.3 培养条件

接种瓶置于培养室中培养。光照时间 12 h/d,光照强度 2 000 ~ 2 500 lx,培养温度(25 ± 1)℃。

2 结果与分析

2.1 基本培养基、KT、NAA 和 6-BA 对丛生芽诱导增殖的影响

经过基本培养基、6-BA、KT、NAA 3 个水平 9 个组合的正交试验(表 2),发现各种组合对霍山石斛丛生芽诱导的影响差异很大。对实验结果进行直观分析表明,这 4 个因子对霍山石斛丛生芽诱导的影响顺序依次为:KT > 基本培养基 > 6-BA > NAA。筛选出诱导霍山石斛丛生芽的最优培养基为: A₁B₃C₃D₁,即 1/2 MS+0.2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA+0.3 mg/L 6-BA。

表 2 霍山石斛丛生芽诱导增殖试验结果的直观分析

实验代号	因素				丛生芽平均增殖系数
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.00
2	1	2	2	2	2.04
3	1	3	3	3	2.49
4	2	1	2	3	1.60
5	2	2	3	1	2.11
6	2	3	1	2	2.29
7	3	1	3	2	1.60
8	3	2	1	3	1.69
9	3	3	2	1	2.27
K ₁	6.53	5.2	5.98	6.38	K = 18.09
K ₂	6.00	5.84	5.91	5.93	
K ₃	5.56	7.05	6.2	5.78	
K ₁ 平均	2.18	1.73	1.99	2.13	
K ₂ 平均	2.00	1.95	1.97	1.98	
K ₃ 平均	1.85	2.35	2.07	1.93	
R	0.33	0.62	0.10	0.20	
优水平	A ₁	B ₃	C ₃	D ₁	

但直观分析给不出误差的估计量,无法估计各因子各水平之间的差异是由于试验误差造成的,还是水平间实质性变化。通过对表 2 结果进一步进行方差分析和 F 检验发现,KT 对霍山石斛丛生芽诱导的影响极为显著($F = 30.245 > F_{0.05} = 19.00$),而其他 3 种因子

对霍山石斛丛生芽诱导的影响不显著($F < F_{0.1}$)。

直观分析及方差分析的结果表明,在霍山石斛丛生芽增殖中,KT 是影响最大的一种因素,添加的浓度直接影响到增殖系数。浓度过低无法达到明显的诱导效果,过高又将对诱导增殖起到抑制作用。当加入 0.2 mg/L KT 时,达到了最大的平均增殖系数 2.35。

2.2 添加生长素及香蕉泥对生根的影响

2.2.1 添加生长素对生根的影响

生长素 NAA 和 IBA 对霍山石斛试管苗具有相同的效应。随 NAA 和 IBA 浓度的提高,试管苗生根率下降,并且根、苗长势也呈现下降趋势,说明低浓度的生长素促进试管苗生根,苗生长茁壮,高浓度则抑制生根和苗的发育(见表 3、图 1)。当添加 0.5 mg/L 浓度 IBA 时,对试管苗生根最有利,其生根率、平均根长都是最好的,而且其试管苗生长也是最佳的。因此,添加浓度 0.5 mg/L 的 IBA 对霍山石斛试管苗的生根具有促进作用。而 NAA 的最佳生根浓度为 0.5 mg/L,但是通过表 4 平均生根数及根长的比较可以看出,IBA 的生根效果好于 NAA。

表 3 生长素对霍山石斛试管苗生根的影响

生长素	浓度/mg·L ⁻¹	平均生根数/条	平均根长/mm
IBA	0.5	4.5	4.3
	1.0	2.5	2.6
	2.0	1.5	1.4
NAA	0.5	3.2	3.7
	1.0	1.7	1.8
	2.0	0.8	0.9
对照	0	1.5	0.8

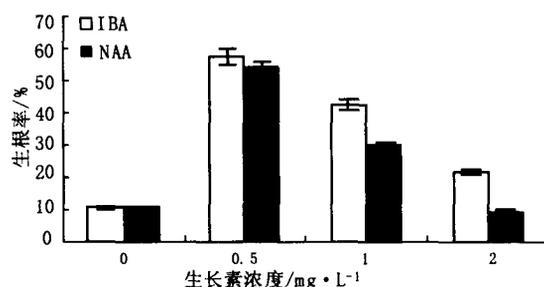


图 1 不同生长素水平对生根率的影响

2.2.2 添加香蕉泥对生根的影响

香蕉泥对霍山石斛试管苗生长极为有利。试管苗不但苗壮、根粗,而且生根率也很高。香蕉泥浓度为 20% 时,生根率达到 94.6% (表 4)。从表 4 可以看出:在培养基中添加不同浓度的香蕉泥对试管苗生根的影响非常大,相对于对照,均具有一定的促进作用,但是随着香蕉泥浓度的提高,生根率、生根数等有所下降。本试验中,浓度为 20% 的香蕉泥是最有利

技术开发

于霍山石斛试管苗的生根。

表4 香蕉泥对霍山石斛试管苗生根的影响

香蕉泥/%	生根率/%	平均生根数/条	平均根长/mm
0	11.3	1.5	0.8
10	75.3	5.6	4.3
20	94.6	6.6	4.8
40	56.3	4.1	3.5

3 结论与讨论

(1) 以带节茎段作为外植体,经过基本培养基、6-BA、KT、NAA 3 个水平 9 个组合的正交试验,直观分析结果表明诱导霍山石斛丛生芽的最优培养基为:1/2MS+0.2 mg/LKT+0.2 mg/LNAA+0.3 mg/L 6-BA;KT > 基本培养基 > 6-BA > NAA。进一步方差分析的结果表明,KT 对丛生芽诱导增殖的影响达到了极显著水平,过高或过低水平的 KT 都对诱导不利,选择最适的浓度才能达到最大的增殖系数。这与傅玉兰等^[5]的研究结果具有一定的差异,傅玉兰的试验结果表明丛生芽诱导中 6-BA 与 2,4-D 组合的作用最好,对腋芽的诱导作用强于 KT 与 2,4-D 的组合。而在本次试验中通过正交设计却发现 6-BA 在诱导霍山石斛丛生芽上不具有显著差异性。其原因是多方面的,包括与培养基中各个营养元素的配比,不同激素之间的互作等,有待于今后的进一步深入研究。此外,笔者还对 MS 基本培养基中无机盐的配比进行了适当的调配,以试图从中发现无机盐的含量比例对霍山石斛丛生芽诱导的影响程度,试验证明,MS 中无机盐的配比对丛生芽诱导的影响作用仅次于 KT。

(2) 生根培养中,通过 IBA、NAA 和香蕉泥单因素试验结果表明,MS 基本培养基添加 20% 香蕉泥时,生根效果最好,生根率可达 94.3%。以往石斛的

研究中,香蕉泥的应用十分广泛。最常用于原球茎分化、试管苗壮苗等方面。此外,有研究表明,香蕉泥对石斛多糖的合成也能起到一定的促进作用^[6]。在生根方面,金钗石斛、铁皮石斛等^[7-10]都有通过添加香蕉泥提高生根率的报道,本研究结果表明,霍山石斛添加香蕉泥的作用明显好于生长素,在生根率、生根数和苗高上均有一定改善。通过添加香蕉泥后获得的组培苗生长健壮,根系发达,为下一步的移栽工作打下了较好的基础,利于更广泛的推广利用。

参考文献

- [1]中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第十九卷)[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [2]陈晓梅,郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(1):70-75.
- [3]仲磊,徐宏强,刘海一. 铁皮石斛兰的袋式组织培养[J]. 林业科技开发,2006,20(4):72-73.
- [4]查学强,罗建平,石玮. 金属离子对霍山石斛类原球茎增殖及植株再生的影响[J]. 园艺学报,2006,33(1):179-181.
- [5]傅玉兰,谷凤,胡传明,等. 霍山石斛组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学,2004,32(3):522-523.
- [6]李小军,刘石泉,潘维陵. 香蕉提取物对霍山石斛试管苗壮苗的影响[J]. 江苏大学学报(自然科学版),2004,25(6):954-957.
- [7]孔琼,袁盛勇,张庭香. 梳唇石斛快速繁殖技术[J]. 江苏农业科学,2006(6):245-246.
- [8]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.
- [9]白美发,吴彤林,黄敏,等. 粉花石斛组织培养快速繁殖[J]. 种子,2004,23(9):44-45.
- [10]卢文芸,张宇斌,唐金刚,等. 环草石斛(*D. loddigesii* Rolfe.)快速繁殖研究[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版),2004,22(4):15-18.

(通讯地址:210037,南京市龙蟠路159号)

江西省九江县良种苗木开发站

苗木价格(单价:元/株)

栎树/喜树(米径5~10 cm),15~120;杜英/酸枣(米径5~10 cm),15~120;香椿/桉木(米径5~10 cm),20~120;紫薇(米径5~15),60~1600;女贞/重阳木(米径5~10 cm),20~180;白玉兰(米径10~15 cm),350~800;马褂木/水杉(米径5~10 cm),15~120,香泡(米径10~20 cm),300~1000;无患子(米径4~10 cm),20~300;乐昌含笑(米径5~10 cm),50~120;香樟,各种规格,面议;桂花,各种规格,面议。

一年生造林小苗(单价:元/株)

马尾松0.045,黄连木/厚朴0.40,湿地松0.20,木荷/杜仲0.20,杉木/水杉0.10,栎树0.25,枸桔0.10,油茶0.15。

种子价格(单价:元/500 g)

白玉兰/马褂木/木荷30.00,鸡爪槭/桉木40.00,重阳木/紫藤/红叶乌桕30.00,杉木/栎树/无患子15.00,马尾松/桂花/紫薇20.00,女贞/酸枣6.00,杜英/南天竹/中国槐20.00,刺槐/枫杨/苦楝4.00,香樟/臭椿/喜树10.00,香椿/枸桔子10.00,黄连木/青枫/杜仲20.00,红豆杉/水杉50.00/100.00,湿地松/枫香80.00,柳杉/油茶20.00/4.00。

地址:江西省九江县马回岭新村 邮编:332101

总经理:吴新金

电话:13879287318,0792-6920976

传真:0792-6920976