

齿瓣石斛的胚培养*

王兰新, 曾彩云

(西双版纳国家级自然保护区科研所, 云南 景洪 666100)

摘要: 齿瓣石斛植株在自然状态下分植繁殖速度较慢, 种子极小, 且胚发育不完全, 不易发芽, 须借助共生菌类供给养料才能萌发。文章对齿瓣石斛的最适萌发胚龄, 最佳萌芽、增殖培养基, 不同激素、天然提取物对胚培养的影响进行了研究。

关键词: 齿瓣石斛; 胚培养; 组织培养; 培养基

中图分类号: Q944.4 文献标识码: A 文章编号: 1671-3168 (2006) 05-0128-03

Embryo Breeding of *Dendrobium devonianum*

WANG Lan-xin, ZENG Cai-yun

(Institute of Xishuanbanna National Nature Reserve, Jinghong 666100 Yunnan, China)

Abstract: Under the natural conditions, *Dendrobium devonianum* has the characteristics of slow speed of propagation and ramification, tinny seed, undeveloped embryo, hard to germinate, sprouting only with the help of the nutriment from symbiosis fungus. The paper studies the most favorable embryo age for germination, optimum culture medium, impacts of different hormones and natural extractant on embryo breeding of *Dendrobium devonianum*.

Key words: *Dendrobium devonianum*; embryo breeding; tissue culture; culture medium

齿瓣石斛 (*Dendrobium devonianum* Paxt.) 又名紫皮石斛, 属兰科植物, 产于云南省和广西省, 附生于海拔 550 ~ 2 000m 的树上或沟谷岩石上, 在云南省西双版纳勐海、勐腊有分布。茎圆柱形, 长 10 ~ 50cm, 花期无叶, 总状花序, 有花 2 朵, 花淡玫瑰色, 唇瓣上有 2 个黄色斑点, 花期 4 ~ 6 月, 果实成熟期 12 ~ 次年 2 月。

齿瓣石斛为药用石斛种类之一, 具有较高的药用价值。主治热病伤津、阴虚内热、病后津枯虚热

等症。齿瓣石斛附生于高山岩石和树上, 近年来由于森林的破坏、环境变化及大量毁灭性采收, 使得野生石斛资源遭到严重破坏, 对石斛资源的保护和利用已迫在眉睫。齿瓣石斛常规的繁殖方法有分株繁殖、分离萌孽子株、扦插等, 但这些繁殖方法速度慢、增殖率低。而采用种子繁殖, 由于种子极其细小, 胚发育不全, 在没有共生菌的条件下直接播入土中不能成活, 必须在人工培养基上进行无菌发芽, 因此, 研究齿瓣石斛的组织培养技术, 对野生

* 收稿日期: 2006-02-09

作者简介: 王兰新 (1968-), 女, 云南景洪人, 工程师, 主要从事自然保护区管理工作。

-
- [J]. 西南师范学院学报 (自然科学版), 1989, 14 (3): 16 ~ 26.
- [4] 钟章成. 常绿阔叶林生态学研究 [M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 1988, 596 ~ 614.
- [5] 王建修, 赵富平, 刘玉成. 雪宝山自然保护区国家重点保护野生植物资源调查研究 [J]. 重庆林业科技, 2003, (4): 27 ~ 30.
- [6] 刘玉成. 重庆国家重点保护野生植物区系地理 [J]. 西南师范大学学报 (自然科学版), 2000, 25 (4): 439 ~ 447.
- [7] 余顺慧, 刘玉成. 重庆的国家重点保护植物研究 [J]. 重庆环境科学, 2000, 22 (4): 16 ~ 19.
- [8] 张祖荣. 四面山森林植被在旅游开发中的作用 [J]. 四川林业科技, 2001, 22 (4): 71 ~ 74.

石斛资源的保护和合理开发利用具有重要的意义。

1 方法和过程

1.1 胚培养

选取各阶段不同胚龄的无病虫害、机械损伤的果实, 去除宿存花被, 先用 0.1% 高锰酸钾液浸泡 15min 后用清水冲洗干净置于无菌操作台上, 用 75% 酒精表面消毒后浸入 0.1% HgCl 溶液中浸泡消毒灭菌 10~15min, 再用无菌水冲洗 3~5 次。用无菌滤纸把种子表面水份吸干, 用解剖刀把种子切开, 用接种勺将胚均匀地撒播在各种培养基上。为了使种子能均匀地分散在培养基中, 可将培养瓶倾斜, 使培养瓶壁上的水珠集中于一处, 培养瓶加盖后轻轻地晃动, 使种子块散开; 必要时, 也可以滴入适量无菌水, 促使种子块散开。

1.2 培养条件

胚培养基为 1/2MS + 香蕉 5%, 增殖、生根、壮苗培养基为 MS + 香蕉 5%, 各种培养基内均加 0.6% 琼脂、2% 蔗糖, pH5.5~6.0。培养温度 (25±1)℃, 光照强度 1 500~2 000lx, 每日光照 9~10h。

2 结果与讨论

2.1 胚龄对胚培养的影响

将不同胚龄的种子播种在同一种培养基 (1/2MS + 香蕉 5%) 上, 实验结果表明, 不同胚龄其萌发率不同。当胚龄在 3 个月以前, 萌发率极低, 萌发经历时间长, 即使萌发也难形成胚状体而成苗。随着胚龄的增长, 其萌发期逐渐缩短, 萌发率逐渐升高, 成苗率也逐渐升高。但到一定胚龄后, 差异并不明显。种子成熟时 (8~10 个月) 其胚达到最大萌发率、最短萌发期和最高成苗率。如种子过熟 (11 个月以上), 则消毒灭菌时容易开裂, 胚失落, 灭菌不彻底, 污染率高。不同胚龄种子萌发情况详见表 1。

表 1 不同胚龄的种子萌发情况

胚龄/月	萌发时间/d	萌发率 %	成苗率 %	污染率 %
3	70	5	0	20
4~6	50	20	30	20
8~10	30	90	90	20
11 以上	30	90	90	50

2.2 培养基种类对胚培养的影响

不同培养基上胚的萌发率不同。在改良 N6

[改良 N6 培养基中 KNO₃ 的含量为 300mg·L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 为 200mg·L⁻¹, 其它成分同 N6 培养基]、KC、MS 及 1/2MS 共 4 种培养基中均附加 NAA0.2mg·L⁻¹、椰子乳 10%、香蕉 5%。试验结果表明, 齿瓣石斛在 1/2MS 培养基上, 萌发率和成苗率最高, 其萌发率可高达 95% 以上, 并有大量圆球茎及小苗生成。其次是 MS 培养基, 在改良 N6 培养基上萌发率也高, 但圆球茎较细小偏黄, 成苗率不高。在 KC 培养基上萌发率最差, 且圆球茎较黄。详见表 2。

表 2 胚在不同培养基上的萌发情况

培养基	萌发率 %	成苗率 %	圆球茎长势	增殖情况
1/2MS	95	98	饱满较绿	较多
MS	90	90	饱满	多
改良 N6	80	75	偏小	较少
KC	70	60	偏小较黄	基本不增殖

2.3 激素种类和浓度对苗生长的影响

在 1/2MS 培养基中分别加入 2, 4-D、6BA、NAA 等激素, 结果表明培养基中 2, 4-D 浓度在 0.1~1mg·L⁻¹ 时胚的萌发率、成苗率低, 其浓度越大, 萌发率越低。6-BA 浓度在 0.5~3mg·L⁻¹ 时对胚的萌发和成苗起促进作用, 以浓度为 2mg·L⁻¹ 时增殖最佳, 苗长势最好 (详见表 3)。适宜的 NAA 浓度对胚的萌发有利, 浓度在 1mg·L⁻¹ 时对壮苗、生根有利。

表 3 不同 6-BA 浓度对苗生长的影响

6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	苗高 /cm	增殖数 /株·瓶 ⁻¹	根数 /根	苗长势
0.5	2.8	20	2	较细弱
1.5	4.5	40	4	壮苗
2.0	4.6	50	4	壮苗且较粗
3.0	3.0	80	2	苗较多但细弱

在大规模生产中, 为节约成本, 一般情况下不加任何激素, 对萌发和成苗无太大影响, 且激素会引起药用成分的变异。

2.4 不同天然提取物浓度和活性碳对胚培养的影响

在改良 N6 + NAA0.2mg·L⁻¹ 培养基中分别加入不同浓度的椰乳、香蕉汁、活性碳等, 结果表明, 2 种天然提取物对胚的萌发、成苗及生根都有促进作用, 在幼胚萌发中以椰乳效果较好, 萌发率较

高,但圆球茎较小而偏黄,生根效果不理想。最佳浓度在 5%~10%。香蕉汁对幼胚的萌发、成苗、生根效果都较好,且成本较低,最佳浓度为 5%~10%。在改良 N6 培养基中分别加入 0.5%、1.0%、2.0% 的活性碳对胚萌发和成苗的影响不大,只是在生根培养时加入活性碳能使根系长得更为粗壮,浓度以 1.0% 为佳,详见表 4。

表 4 不同活性物质对胚培养的影响

活性物	胚的萌发率 %	成苗率 %	根的生长情况
椰乳	95	80	根细小而少
香蕉汁	90	90	根粗壮
活性碳	75	70	根粗壮而长

不同浓度的椰乳对增殖壮苗及生根影响也不同,当椰乳浓度在 10%~20% 时有利增殖壮苗,当浓度高于 35% 时基本不增殖,甚至有部分苗黄化死亡。浓度在 10% 时有利于壮苗,20% 时有利于根的生成,详见表 5。

表 5 不同椰乳浓度对齿瓣石斛生长的影响

椰乳浓度 %	苗高 /cm	增殖数 /株·瓶 ⁻¹	茎粗 /cm	根数 /根	根长 /cm	圆球茎生成情况
0	5.5	25	0.15	2	0.5	有但少
10	4.5	120	0.34	3	1.3	有且多
20	5.0	70	0.25	4	2.2	有且较多
35	3.0	10	0.14	2	1.1	无
40	3.5	3	0.16	1	1.1	无

注:基本培养基为改良 N6 + NAA2ml·L⁻¹、糖浓度为 20%。

2.5 齿瓣石斛试管苗的出瓶移栽及管理

齿瓣石斛从接种外植体胚开始,10d 后就有少量胚萌动变绿,圆球茎生成。30d 绝大多数胚萌动变绿,萌发率可高达 90% 以上,大约 30~40d 后可进行续代增殖培养。第 1 次续代约 30d 后,苗高 1~2cm,40~60d 后将小苗继续增殖,大苗转入壮苗培养基上壮苗、生根,大约每瓶移植 6~8 株,1 个月后苗较粗壮有 2~3 条 1~2cm 根生成。40~50d 后苗高 3~4cm,有 3~4 条 1~2cm 新根时,就可出瓶移植。

一般全年均可出瓶,但 2~6 月成活率最高。

出瓶前最好在自然漫射光的室内炼苗 10~15d 时间:①将试管苗带瓶从培养室移到炼苗房不揭开瓶盖约 7d;②松开瓶盖(皮筋)2d;③揭开瓶盖约 5d。使根系发达、粗壮以增强适应力。

试管苗出瓶后用清水将苗根部的培养基清洗干净后,移栽在通风透气、排水又能保持水分且经消毒过的基质上。基质一般用碎砖块、碎木炭、珍珠岩、蕨根等材料混合而成。将空气湿度保持在 85%~95%,遮光率为 60%,环境温度控制在 18~22℃。经过 1~2 个月即可到大田定植。

参考文献:

- [1] 高江云.西双版纳石斛资源的保护利用[J].云南植物研究,1995,17(4):5~9.
- [2] 徐红,刘峻,王峥涛,等.鼓槌石斛组织培养研究[J].中国中药杂志,2001,26(6):379~381.
- [3] 曾宋君,程式君,张京丽,等.五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究[J].园艺学报,1998,25(1):75~80.