

继代周期对霍山石斛试管苗生长及培养基成分的影响

贾书华, 王 娣, 高 桦, 蔡永萍*, 林 毅

(安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:目的 研究继代周期对霍山石斛试管苗长势及培养基成分的影响, 确定最佳的继代周期时间。方法 测定不同继代周期试管苗的株高、分蘖数、鲜质量、叶绿素量及培养基 pH、含水量、含糖量的变化, 并计算石斛试管苗生长所需的培养基和其他的成本。结果 继代周期为 40 d, 试管苗的株高比继代前增加了 282.86%, 分蘖数比继代前增加了 3.5 倍, 试管苗的鲜质量最大, 叶绿素的量趋于最大值; 培养基的含水量、可溶性糖的量最低; pH<4.75, 已不适合石斛试管苗的生长, 石斛苗生长所需成本较低。结论 40 d 为霍山石斛试管苗生长的最佳继代周期。

关键词:霍山石斛; 继代周期; 试管苗; 培养基

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)08-1239-04

Influence of subculture cycle on tube plantlet growth of *Dendrobium huoshanense* and medium composition

JIA Shu-hua, WANG Di, GAO Yuan, CAI Yong-ping, LIN Yi

(School of Life Sciences, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

Abstract: **Objective** To optimize the best subculture cycle through studying the influence of subculture time on tube plantlet growth of *Dendrobium huoshanense* and the change of medium composition. **Methods** Height, tiller, fresh weight, and chlorophyll content of the tube plantlet and pH value, water content, and sugar content of the medium were measured after different cycles of the subculture, the cost of culture medium for subculture was calculated as well. **Results** The height of the tube plantlet increase 282.86%, the tiller increase by 3.5 times, fresh weight reaches its maximum, chlorophyll content of the tube plantlet almost reaches its maximum after 40 d subculture; while water content and sugar content of the medium are decreased to the lowest point, pH value of medium (<4.75) could not be suitable to the growth of plantlet. Cost for culturing *D. huoshanense* plantlets is very low. **Conclusion** 40 d is the best subculture cycle time for the tube plantlet culture of *D. huoshanense*.

Key words: *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng; subculture cycle; plantlet; medium

霍山石斛是安徽省的名贵中药材, 国家重点保护的名贵药用植物^[1,2], 为兰科多年生常绿草本植物, 对生态环境要求十分严格, 多为附生或丛生。野生多分布在 300~700 m 的低山区, 生长在河边山谷旁的悬崖上, 以及阴凉湿润透风的环境中, 常与苔藓、石苇等植物生长在一起。由于对生长条件的特殊要求, 生长繁殖困难^[3], 自 1984 年, 徐云鹄和于力文首次获得了霍山石斛试管苗^[4], 许多学者致力于研究石斛组织培养技术的研究, 长期以来, 对石斛组织培养的研究主要集中在外植体、培养基和培养条件等方面^[5], 但有关石斛试管苗生长的最佳继代周期尚未见报道。本实验研究了继代周期对霍山石斛试管苗形态指标、生理生化特性以及培养基成分的

变化的影响, 以期找到既能保证石斛试管苗处于最佳的生长状态, 又充分经济地利用培养基的最佳继代时间, 为霍山石斛工厂化生产提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理: 供试材料为霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng 试管苗。取大小长势均一的石斛试管苗接种于 Kundson+NAA 1.0 mg/L+6-BA 2.5 mg/L, pH 为 5.8 的培养基中, 分别以 10、20、30、40、50、60 d 作为继代周期, 每个处理重复 3 瓶, 每瓶 5 株石斛试管苗。培养 120 d 后, 对每个处理各 15 株石斛试管苗进行形态、生理指标的测定; 同时对培养基成分

收稿日期: 2006-12-01

基金项目: 安徽省教育厅重点项目 (2006KJ054A) 和安徽省教育厅“十五”学术带头人基金资助 (2002 年度)

作者简介: 贾书华 (1978—), 女, 山东嘉祥县人, 硕士研究生, 研究方向为中药材组织培养及遗传育种。

* 通讯作者 蔡永萍 E-mail swkx12@ahau.edu.cn

测定,每个处理重复 3 次。

1.2 试管苗株高、分蘖数、鲜质量测定:株高用直尺测量,单株鲜质量用电子天平称量。分别测 15 株石斛苗的株高、鲜质量、分蘖数,取平均值。

1.3 试管苗叶绿素量测定:取试管苗第 3 片叶片 0.05 g,用 95% 乙醇 5.0 mL 提取叶绿素,将 TU—1800 SPC 紫外可见分光光度计波长分别调至 649、665 nm 处,读取吸光度值,用 Arnon 公式计算叶绿素量。

1.4 培养基 pH 的测定:培养基在水浴锅中熔化,取 5.0 mL 培养基,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 pH 计测定 pH 值。

1.5 培养基含水量的测定:准确称取 1.0 鲜培养基,于 80 ℃ 烘箱烘干至恒重,用电子天平称重,重复 3 次,计算含水量,含水量(%)=(鲜质量—干质量)(%)。

1.6 培养基可溶性糖量的测定:可溶性总糖量用硫酸蒽酮法。准确称取 1.0 g 干培养基,热水反复浸提,用 TU—1800 SPC 紫外—可见分光光度计于 620 nm 比色测定。以葡萄糖对照品作标准曲线。方程为: $Y=0.0061X-0.0115$, $r=0.9986^{**}$ 。

1.7 石斛试管苗生长所用培养基、封口膜及劳务费的计算:石斛苗所需成本费按 120 d 所需继代次数计算。培养基成本费=每瓶培养基的成本×继代次数;封口膜成本费=每个封口膜所需费用×继代次数;劳务费=转接每瓶试管苗所需费用×继代次数。

2 结果与分析

2.1 继代时间对石斛试管苗株高的影响:由图 1 可以看出,随着继代周期时间的增加,石斛的株高增长速度逐渐降低。继代周期为 10 d,石斛株高最高为 2.86 cm,比继代前增加 308.57%。继代周期为 20、30、40 d 时,石斛株高增长速度下降幅度较缓,分别比继代前增加了 297.14%、285.71% 和 282.86%。继代周期为 50、60 d 时,石斛株高增长速度有较大幅度的下降,当继代周期为 60 d 时,石斛株高最低为 2.32 cm,仅比继代前增加了 231.14%。

2.2 继代时间对石斛试管苗分蘖数的影响:随着继代周期时间的增加,石斛的分蘖数逐渐减少(图 2)。其中继代周期为 10 d,石斛的分蘖数最多,为 5.80 蘖/株;分别比继代周期为 20、30、40、50、60 d 高 11.54%、20.83%、21.85%、31.82%、45.00%。其中继代周期为 30、40 d 的分蘖数相差不大,继代周期为 40 d 分蘖数仅比 30 d 时降低了 4.90%。

2.3 继代时间对石斛试管苗鲜质量的影响:图 3 表

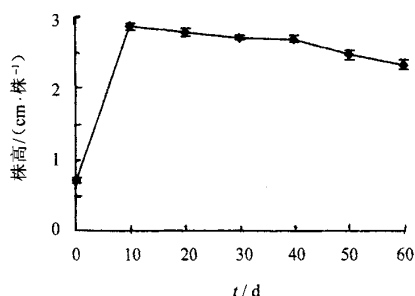


图 1 继代时间对石斛试管苗株高的影响 ($n=15$)

Fig. 1 Effects of subculture time on tube plantlet height of *D. huoshanense* ($n=15$)

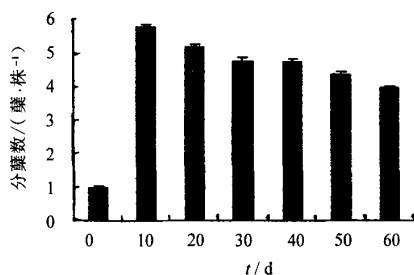


图 2 继代时间对石斛试管苗分蘖数的影响 ($n=15$)

Fig. 2 Effects of subculture time on tube plantlet tiller of *D. huoshanense* ($n=15$)

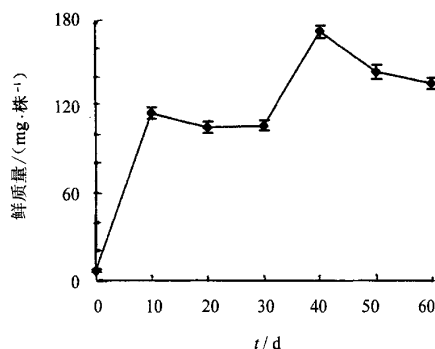


图 3 继代时间对石斛试管苗鲜质量的影响 ($n=15$)

Fig. 3 Effects of subculture time on tube plantlet fresh weight of *D. huoshanense* ($n=15$)

明,随着继代周期时间的增加,石斛试管苗的鲜质量先上升再降低。继代周期为 40 d 时,石斛的鲜质量达到最高值,为 172.92 mg/株,比继代前增加了 25 倍;且明显高于其他继代周期时间,比继代周期为 20 d 的石斛试管苗质量增加了 64.43%,当继代周期为 50、60 d 时,石斛试管苗的鲜质量又逐渐下降。

2.4 继代时间对石斛试管苗叶绿素量的影响:从图 4 可以看出,随着继代周期时间的增加,石斛试管苗的叶绿素量逐渐升高,继代周期为 20、30 d 时,石斛叶绿素的量上升趋势比较缓和,继代周期为 40 d

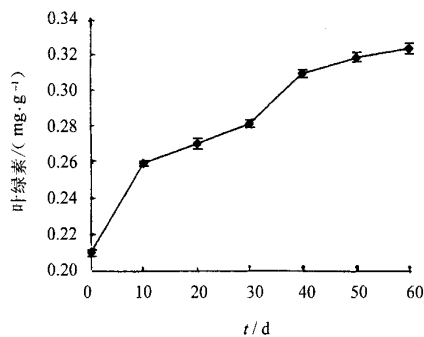


图 4 继代时间对石斛试管苗叶绿素量的影响 (n=15)
Fig. 4 Effects of subculture time on tube plantlet chlorophyll content of *D. huoshanense* (n=15)

时,叶绿素的量明显上升,当继代周期为50、60d时,石斛叶绿素量的上升趋势又趋于缓和,在继代周期为60d时,叶绿素量达到最高,但和继代周期为40d时的叶绿素量相比差异不显著。

2.5 继代时间对培养基 pH 的影响:经测定,随着继代周期时间的增加,培养基的 pH 逐渐下降(表1)。当继代周期为50、60d时,培养基的 pH 下降到4.5以下,并且观察到培养基有液化现象,试管苗已不能再生长,这与以上试管苗生长变化一致。

表 1 继代时间对培养基 pH 值的影响 (n=3)
Table 1 Effects of subculture time on pH value of culture medium (n=3)

继代时间/d	pH 值	继代时间/d	pH 值
0	5.42±0.03	40	4.75±0.03
10	5.22±0.02	50	4.47±0.03
20	5.01±0.04	60	4.23±0.05
30	4.92±0.02		

2.6 继代时间对培养基含水量的影响:图5表明,随着继代周期时间的增加,培养基的含水量呈先下降后上升的趋势。继代前培养基含水量为鲜质量的96.60%;继代周期为40d,培养基含水量达到最低为鲜质量的95.27%,比继代前下降1.33%。继代周期为50、60d时,培养基的含水量又有所上升,这和培养基 pH 下降到4.50以下,且培养基有液化现象一致。

2.7 继代时间对培养基可溶性糖量的影响:从图6可知,随着继代周期时间的增加,继代周期为20、30、40d时,培养基可溶性糖的量呈显著下降趋势,继代周期为40d时,培养基可溶性糖的量最低,为82.23%;比继代前培养基的可溶性糖量降低了15.27%。继代周期为50、60d时,培养基可溶性糖量又呈上升趋势,这可能是培养基琼脂液化所致^[6],有待于进一步研究。

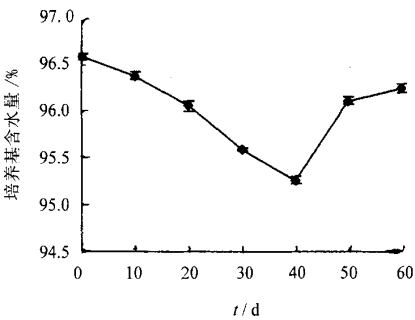


图 5 继代时间对培养基含水量的影响 (n=3)
Fig. 5 Effects of subculture time on water content of culture medium (n=3)

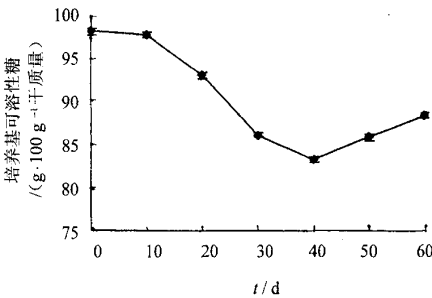


图 6 继代时间对培养基可溶性糖量的影响 (n=3)
Fig. 6 Effects of subculture time on soluble sugar content of culture medium (n=3)

2.8 继代时间对培养基及其他成本的影响:表2表明,在石斛试管苗生长的一定时间内,随着继代周期时间的增加,继代次数减少,石斛苗试管生长所需培养基、封口膜以及劳务费逐渐降低,继代时间为10~40d,下降幅度较大;继代时间为40~60d时,下降幅度缓慢。当继代时间为10、20、30d时,所用总成本分别比40d高300%、100%、33%,而当继代时间为50、60d时所用总成本分别比40d低20%、33%。虽然继代时间为50、60d时所用的成本低,但以上结果表明其培养基营养已消耗,pH下降,培养基液化;试管苗生长缓慢,已不适合试管苗的生长。石斛苗所需成本费用按120d中所需继代次数计算。

3 讨论

3.1 继代时间对石斛试管苗的影响:随着继代周期时间的增加,霍山石斛试管苗的株高、分蘖数逐渐降低,在继代周期为50d时,下降幅度较大;鲜重呈现先上升后下降的趋势,在继代周期为40d达到最大;叶绿素量随着继代周期时间的增加逐渐升高,在继代周期为40d时有明显的上升,随后上升趋势又趋于缓和。这可能是由于继代周期越短,培养基中激

表2 继代时间对石斛试管苗所需成本费用影响

Table 2 Effect of subculture time on cost of media on tube plantlet of *D. huoshanense*

继代时间 /d	继代次数/ (次·120 d)	培养基 成本/元	封口膜 成本/元	劳务费/ 元	总计/ 元
10	12	3.00	0.60	1.20	4.80
20	6	1.50	0.30	0.60	2.40
30	4	1.00	0.20	0.40	1.60
40	3	0.75	0.15	0.30	1.20
50	2.4	0.60	0.12	0.24	0.96
60	2	0.50	0.10	0.20	0.80

素(NAA、6-BA)的量越高,相对高的激素量,利于生长点细胞的分裂与非生长点细胞的伸长,表现为试管苗株高较高和繁殖能力较强,分蘖较多;随着继代周期时间的增加,培养基内的激素和营养成分因不断被吸收利用而减少,对试管苗生长分化的促进作用逐渐减弱,培养基中的各种营养元素,如碳源、氮源、维生素等都被大量消耗而不能满足试管苗生长需要。当继代周期时间为40 d时,试管苗株高比继代前增加了282.86%,分蘖数比继代前增加了3.5倍,鲜重比继代前增加了25倍,叶绿素量已趋于最大值。从石斛试管苗的株高、鲜质量及叶绿素量等形态生理指标来看,继代周期为40 d时,石斛试管苗长势趋于最好。

3.2 继代时间对培养基的影响:随着继代周期时间的增加,培养基的含水量、可溶性糖量呈现先下降后上升的趋势,均在40 d降到最低值。培养基pH随着继代周期时间的增加逐渐降低。这是因为随着继代周期时间的增加,培养基中水分、可溶性糖被石斛试管苗吸收利用而大量减少,在继代周期时间为40 d时,培养基含水量、可溶性糖量降到最低值。当继代周期时间大于40 d时,培养基的含水量、可溶性糖量又有所上升,这可能是由于石斛试管苗在生长过程中吸收培养基中的成分或向培养基中释放了次生代谢物质使培养基pH降低^[7]、琼脂液化所致^[6]。综合不同继代周期培养基含水量、可溶性糖量以及pH的变化,当继代周期时间大于40 d时,培养基的水分、碳源已经不能满足试管苗生长的需要,过低的

pH不利于石斛试管苗生长^[8]。继代时间40 d为石斛试管苗的最佳继代周期。

4 讨论

通过以上的研究结果表明:当继代时间为40 d时,试管苗的株高比继代前增加了282.86%,分蘖数比继代前增加了3.5倍,鲜质量达到最高值为172.92 mg,比继代前增加了25倍,叶绿素量已趋于最大值,此时石斛试管苗的长势最佳;培养基的含水量、可溶性糖量在继代周期时间为40 d时均降低到最低值,过酸的培养基也已经不适合石斛试管苗的生长。另外,结合不同继代时间石斛苗生长所需培养基、封口膜及劳务费等计算表明继代周期40 d所需的成本较低。所以,继代周期40 d为霍山石斛试管苗生长的最佳继代周期。

References:

- [1] Cai Y P, Yu L W, Zhang H Y, et al. Determination of some resistant-oxide enzymes and activated substances of three *Dendrobium* in Huoshan county [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 1996, 31(11): 649-651.
- [2] Cai Y P, Li L, Lin Y, et al. Effects of content of endogenesis hormones on stemgrowth of *Dendrobium* in Huoshan [J]. *Acta Laser Biol Sin* (激光生物学报), 2004, 13(5): 345-348.
- [3] Cai Y P, Li H S, Luo B S, et al. Study on the growing rhymes of the three *Dendrobium* in Huoshan and its relation with ecological factors [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物研究), 2003, 21(4): 351-355.
- [4] Xu Y C, Yu L W. Seed germination and plantlets culture of *Dendrobium huoshanense* [J]. *J Anhui Agric Univ* (安徽农学院学报), 1984 (1): 48-52.
- [5] Zhang M, Xia H X, Zhu L Q, et al. Advances in studies on plant tissue culture of *Dendrobium* [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2000, 25(6): 323-326.
- [6] Du Y G, Hao L Z, Wang P, et al. The influence of agar concentration in plant tissue culture and pH on concretion degree of culture medium [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2005, 41(5): 623.
- [7] Jiang X M, Bai X F, Zhao J P, et al. Relationship between plant tissue culture factors and pH value of medium [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2005, 41(6): 802-804.
- [8] Fu Y L, Gu F, Hu C M, et al. Research on the tissue culture and rapid propagation of *Dendrobium huoshanense* [J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2004, 32(3): 522-523.

本刊重要启事

承蒙广大作者、读者的厚爱 and 大力支持,本刊稿源十分丰富,为了进一步缩短稿件刊出周期,增加信息量,本刊由A4开本每期120页扩版为160页,现定价为19.80元。

衷心感谢广大读者、作者、编委和协办单位对本刊的关心和支持,编辑部将不辜负大家的期望,与时俱进,开拓创新,为把《中草药》杂志办成知名的精品期刊而努力奋斗!

《中草药》杂志编辑部