

春石斛优良品种‘森禾2006’组培快繁体系的建立

贾梦雪¹, 徐瑾¹, 叶香娟², 刘芊¹, 王喆², 刘燕^{1*}

¹北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京100083; ²浙江森禾种业股份有限公司, 杭州310012

摘要: 本文研究了春石斛‘森禾2006’的拟原球茎(PLBs)诱导、增殖、分化及壮苗和生根, 建立了其组培快繁体系。结果表明: ‘森禾2006’ PLBs最适诱导培养基为1/2MS+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+水解酪蛋白2.0 g·L⁻¹; PLBs增殖培养基为1/2MS+水解酪蛋白2.0 g·L⁻¹; PLBs分化培养基为1/2MS+KT 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹; 壮苗生根培养基为MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+香蕉泥100.0 g·L⁻¹。

关键词: 春石斛; 拟原球茎(PLBs); 组培快繁; 种苗

Establishment of Rapid Propagation System for Elite Variety of *Dendrobium nobile* Lindl. ‘Senhe 2006’ by Tissue Culture

JIA Meng-Xue¹, XU Jin¹, YE Xiang-Juan², LIU Qian¹, WANG Zhe², LIU Yan^{1*}

¹National Engineering Research Center for Floriculture, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²Zhejiang Senhe Seed Company Limited, Hangzhou 310012, China

Abstract: To achieve the mass-scale multiplication of *Dendrobium nobile* ‘Senhe 2006’, the optimal media for the induction, multiplication and differentiation of protocorm-like bodies (PLBs), strengthening and rooting were studied and the rapid propagation system by tissue culture was established. The results showed that 1/2MS+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+casein hydrolysate 2.0 g·L⁻¹ was optimal for PLB induction. 1/2MS+casein hydrolysate 2.0 g·L⁻¹ was the most suitable for PLB multiplication. 1/2MS+KT 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹ was the most efficient for PLB differentiation. The optimum medium for strengthening and rooting was MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+banana homogenate 100.0 g·L⁻¹.

Key words: *Dendrobium nobile*; protocorm-like bodies (PLBs); tissue culture and rapid propagation; plantlets

春石斛是兰科(Orchidaceae)石斛属多年生宿根花卉, 与卡特兰、蝴蝶兰、万带兰并称为观赏价值最高的四大观赏兰花(王伟等2009)。我国春石斛的栽培与研究起步较晚, 目前国内花卉市场的春石斛品种大多数是日本等国外种苗公司的二、三代种苗(毛碧增等2003), 部分企业通过多年引种试验, 选出了一些适宜我国栽培的优良品种。生产上主要靠扦插繁殖, 其周期长, 繁殖系数低, 国产的高品质春石斛种苗供不应求(陈文贞和张孟锦2010), 尚不足以支撑规模化商品生产, 从而大大限制了春石斛在花卉市场上的推广应用(王华和付玉兰2012)。春石斛优质种苗的组织培养繁殖是实现其规模化、标准化生产的有效途径。拟原球茎(protocorm-like bodies, PLBs)诱导繁殖是春石斛组培快繁的重要途径之一, 与丛生芽途径相比, 其取材更广泛, 繁殖系数更大, 成苗更快。本研究以春石斛优良品种‘森禾2006’组培无菌苗的茎尖

为材料, 诱导PLBs产生, 并研究了PLBs增殖、分化、生根培养基, 建立了组培快繁体系, 为春石斛优良品种的种苗生产提供技术支撑。

材料与方法

1 材料

春石斛品种‘森禾2006’ (*Dendrobium nobile* Lindl. ‘Senhe 2006’)苗高2~3 cm的组培瓶苗由浙江森禾种业股份有限公司提供。

2 方法

2.1 PLBs诱导培养基的筛选

采用L₉(3⁴)正交试验设计, 以1/2MS为基本培养基(蔗糖20 g·L⁻¹, pH 5.4), 设置TDZ (0.1、0.3、0.5 mg·L⁻¹)、NAA (0、0.1、0.2 mg·L⁻¹)、水解酪蛋

收稿 2013-08-06 修定 2013-09-18

资助 国家“十二五”支撑计划课题(2011BAD12B02-01)。

* 通讯作者(E-mail: chbly@sohu.com; Tel: 010-62336062)。

白(0、1.0、2.0 g·L⁻¹)三因素三水平,共9个处理。每个处理接种4~6瓶,每瓶接种1个外植体,重复3次。在超净台上切取3 mm无菌苗茎尖,接入培养基,置于120 r·min⁻¹的摇床,培养50 d后统计诱导率。PLBs诱导率=[培养50 d后诱导出PLBs的茎尖个数/(接种数-污染数)]×100%。

2.2 PLBs增殖培养基的筛选

以1/2MS为基本培养基(蔗糖20 g·L⁻¹,琼脂6.0 g·L⁻¹,pH 5.4),设置水解酪蛋白0、2.0 g·L⁻¹两个浓度处理,考察水解酪蛋白对PLBs增殖的影响。每处理接种3瓶,每瓶接种1块PLBs,重复3次。在超净台上用电子天平按每瓶0.05~0.1 g称取PLBs,接入培养基,接入PLBs的鲜重记为 W_1 ,培养15 d后称量每瓶PLBs的鲜重,记为 W_2 。PLBs增殖倍数=(W_2-W_1)/ W_1 。

2.3 PLBs分化培养基的筛选

以1/2MS为基本培养基(蔗糖30 g·L⁻¹,琼脂6.5 g·L⁻¹,pH 5.4),设置KT (1.0、2.0 mg·L⁻¹)和NAA (0.1、0.5 mg·L⁻¹)两因素两水平试验,共4个处理。每处理接种2瓶,每瓶接种3块PLBs,重复3次。在超净台上用电子天平按每瓶每块约0.1 g称取PLBs,接入培养基,40 d后统计PLBs分化率。PLBs分化率=(培养40 d后分化成不定芽的PLBs块数/接种总块数)×100%。

2.4 无菌苗壮苗和生根培养基的筛选

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以MS为基本培养基(蔗糖20 g·L⁻¹,琼脂6.0 g·L⁻¹,pH 5.4),设置IBA

(0.1、0.5、1.0 mg·L⁻¹)、NAA (0、0.1、0.5 mg·L⁻¹)、添加物质(1.0 g·L⁻¹活性炭、100.0 g·L⁻¹香蕉泥、不添加)三因素三水平,共9个处理。每瓶接种3株PLBs分化出的无菌苗,分别于接种时和40 d后,观测无菌苗根数,记为 g 和 g' ;用电子天平分别称量无菌苗重量,记为 W 和 W' 。重复3次。根增加数= $g'-g$;鲜重增加量= $W'-W$;褐化率=(褐化无菌苗株数/接种总株数)×100%。

以上培养条件均为光照时间14 h·d⁻¹,光照强度40 μmol·m⁻²·s⁻¹,培养温度(23±2)℃。

实验结果

1 春石斛茎尖诱导PLBs的适宜培养基

切取‘森禾2006’无菌苗茎尖约3 mm,接入培养基中,进行PLBs诱导培养,35 d后可见PLBs出现,诱导50 d后PLBs生长情况见图1-A。不同培养基上的PLBs诱导率从11.1%~58.3%不等,其中,诱导率最高的培养基为1/2MS+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+水解酪蛋白2.0 g·L⁻¹(表1);未诱导出PLBs主要是由于接种的外植体褐化所致。对正交试验结果进行级差分析,诱导率的 K 值分析结果表明,培养基中各成分对PLBs诱导影响作用的大小顺序为NAA>水解酪蛋白>TDZ,PLBs诱导率随着TDZ及水解酪蛋白浓度的增加而升高,以不加NAA的效果最好。

2 诱导春石斛PLBs增殖的适宜培养基

将诱导出的PLBs培养30 d后转移到1/2MS、

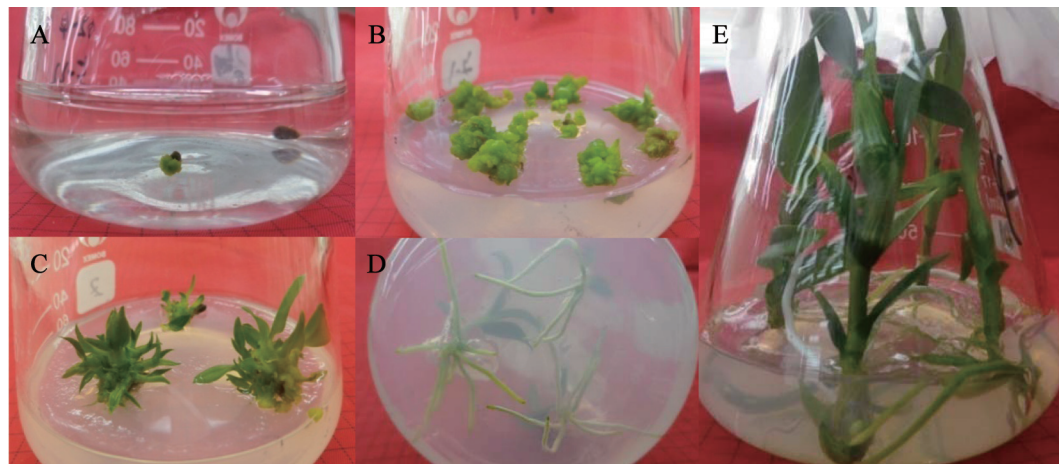


图1 ‘森禾2006’茎尖诱导PLBs

Fig.1 PLBs induced from shoot tips of ‘Senhe 2006’

A: PLBs诱导培养50 d; B: PLBs增殖培养20 d; C: PLBs分化培养40 d; D和E: 无菌苗壮苗和生根培养40和70 d。

表1 不同浓度TDZ、NAA和水解酪蛋白对‘森禾2006’茎尖诱导PLBs的影响
Table 1 Effects of different concentrations of TDZ, NAA and casein hydrolysate on the PLB induction from shoot tips of ‘Senhe 2006’

编号	TDZ浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	水解酪蛋白浓度/g·L ⁻¹	诱导率/%	褐化率/%
1	0.1	0	0	36.4 ^{ab}	27.3 ^{bc}
2	0.1	0.1	1.0	30.0 ^{ab}	30.0 ^{bc}
3	0.1	0.2	2.0	22.2 ^b	55.6 ^{bc}
4	0.3	0	1.0	30.0 ^{ab}	30.0 ^{bc}
5	0.3	0.1	2.0	33.3 ^{ab}	66.7 ^{ab}
6	0.3	0.2	0	12.5 ^b	87.5 ^a
7	0.5	0	2.0	58.3 ^a	25.0 ^c
8	0.5	0.1	0	11.1 ^b	66.7 ^{ab}
9	0.5	0.2	1.0	25.0 ^b	66.7 ^{ab}
K ₁	29.4	41.6	19.3		
K ₂	24.9	24.9	28.5		
K ₃	31.4	19.3	37.9		
R	6.5	22.6	18.6		

采用Duncan多重比较法,小写英文字母表示在0.05水平上的差异显著;表3和表4同此。

添加或不添加水解酪蛋白的培养基上进行增殖培养(图1-B),培养过程中每20~25 d继代培养一次,否则极易分化出不定芽,影响增殖速率。从表2中可看出,添加水解酪蛋白的培养基上PLBs的增殖倍数为2.67,与未添加的相比有显著差异,可见添加水解酪蛋白可促进PLBs增殖。因此,‘森禾2006’PLBs增殖适宜培养基为1/2MS+水解酪蛋白2.0 g·L⁻¹,增殖倍数约为2.7倍。

表2 添加水解酪蛋白对‘森禾2006’PLBs增殖的影响

Table 2 Effect of casein hydrolysate on PLB multiplication of ‘Senhe 2006’

编号	水解酪蛋白浓度/g·L ⁻¹	PLBs增殖倍数
1	2.0	2.67±0.05 ^a
2	0	2.00±0.19 ^b

采用 t -检验,小写英文字母表示在0.05水平上的差异显著。

3 诱导春石斛PLBs分化的适宜培养基

将未分化且发育良好的PLBs接入分化培养基,培养25 d左右开始陆续出现不定芽(图1-C)。从表3可看出,在1号培养基中,PLBs的分化率最高,为72.3%,明显高于其他培养基,且褐化率最低,为27.7%。NAA对PLBs分化的影响大于KT,低浓度的NAA更利于PLBs的分化。培养过程中,PLBs的褐化现象较为严重,不同培养基上,接种外植体褐

表3 不同浓度KT和NAA对‘森禾2006’PLBs分化的影响

Table 3 Effects of different concentrations of KT and NAA on PLB differentiation of ‘Senhe 2006’

编号	KT浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	分化率/%	褐化率/%
1	1.0	0.1	72.3 ^a	27.7 ^b
2	1.0	0.5	27.7 ^b	61.0 ^a
3	2.0	0.5	27.8 ^b	44.3 ^{ab}
4	2.0	0.1	55.7 ^{ab}	38.8 ^{ab}

化率为27.7%~61.0%。

4 春石斛无菌苗的壮苗生根适宜培养基

将PLBs分化出的高1~2 cm无菌苗接入不同的生根培养基中,进行生根培养(图1-D和E)。结果表明,在2、4、5号培养基上无菌苗的生根数较多,但生根数和褐化率均无显著差异;在5号培养基上,无菌苗鲜重增加量高于2和4号培养基(表4)。因此,5号培养基(MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹)适宜无菌苗生根和鲜重增加。对正交试验的结果进行级差分析,生根数的 K 值分析结果表明,培养基成分中对生根影响作用的大小顺序为NAA>IBA>添加物,最佳组合的培养基为:MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+香蕉泥100.0 g·L⁻¹(表4),适合无菌苗诱导生根。另外,当培养基中加有低浓度的IBA和NAA时,添加活性炭可以明显抑制褐化发生。

表4 不同浓度IBA、NAA和添加物对‘森禾2006’无菌苗壮苗和生根的影响
Table 4 Effects of different concentrations of IBA, NAA and additives on strengthening and rooting of *in vitro* plantlets of ‘Senhe 2006’

编号	IBA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	添加物浓度/g·L ⁻¹	生根数/条	鲜重增加量/g	褐化率/%
1	0.1	0	活性炭1.0	3.0±0.6 ^{ab}	0.11±0.01 ^a	0 ^b
2	0.5	0	香蕉泥100.0	3.6±0.6 ^a	0.06±0.01 ^{ab}	11.1 ^b
3	1.0	0	0	3.0±0.4 ^{ab}	0.02±0 ^b	55.6 ^a
4	0.1	0.1	香蕉泥100.0	4.0±0.5 ^a	0.05±0.01 ^{ab}	11.1 ^b
5	0.5	0.1	0	3.9±0.7 ^a	0.10±0.05 ^a	22.2 ^b
6	1.0	0.1	活性炭1.0	2.3±0.5 ^{ab}	0.06±0.01 ^{ab}	0 ^b
7	0.1	0.5	0	1.4±0.5 ^b	0.04±0.01 ^{ab}	11.1 ^b
8	0.5	0.5	活性炭1.0	2.7±0.6 ^{ab}	0.05±0.01 ^{ab}	11.1 ^b
9	1.0	0.5	香蕉泥100.0	2.1±0.5 ^{ab}	0.03±0 ^b	11.1 ^b
K ₁	2.6	3.2	2.7			
K ₂	3.4	3.2	3.1			
K ₃	2.4	2.0	2.6			
R	0.8	1.2	0.5			

讨 论

已有细胞学观察结果认为PLBs是单细胞起源的体细胞胚(詹忠根2006)。PLBs繁殖途径取材广泛,繁殖系数大,成苗快,适合石斛的组培快繁。采用该方法已在铁皮石斛(张启香等2009)、金钗石斛(陈庭等2005)、霍山石斛(孙廷等2007)、春石斛(孟金玲2011)等植物的快繁中成功获得组培苗。春石斛品种不同,培养基配方差异很大(孟金玲2011)。因此,本研究针对春石斛品种‘森禾2006’进行了PLBs繁殖途径的组培快繁研究。

研究表明,茎尖更容易诱导出PLBs,而腋芽容易形成丛生芽(周辉明等2006)。单独用NAA、6-BA或TDZ都能诱导出PLBs(侯大强2006; Chung等2007),TDZ直接诱导形成PLBs的效果比6-BA好,且所需浓度相对较低(Roy等2007; Sujjarittharakarn和Kanchanapoom 2011)。另外,水解酪蛋白对PLBs的诱导起重要作用(黄萍萍等2003)。本研究发现,TDZ在0.1~0.5 mg·L⁻¹浓度范围内,随浓度升高PLBs诱导率呈上升趋势,但对PLBs诱导影响不显著,可加大TDZ不同水平间梯度,以确定最佳适宜浓度。添加2.0 g·L⁻¹水解酪蛋白诱导效果较好,而NAA对PLBs诱导表现出显著抑制作用。培养过程中,茎尖褐化会严重影响PLBs诱导,因此,采取不同措施,降低外植体褐化极为重要。褐化发生受基因型、植物的生理状态、培养基、培养环境

等众多因素的影响(周俊辉等2000)。已有研究表明,暗处理(赵伶俐等2006),添加天然复合物椰乳(姚丽娟等2006)、香蕉泥(殷丽青等2006)、活性炭(莫昭展等2009),抗氧化剂维生素C、柠檬酸、聚乙烯比咯烷酮(郑超等2013)等措施均可以抑制褐化发生,因此春石斛组培快繁中还可以进一步优化PLBs诱导培养基配方。

研究表明,春石斛PLBs在不加任何激素的培养基中增殖效果最好(周辉明等2006),加入水解酪蛋白能有效促进PLBs的增殖(侯大强2006),这与本研究结果一致。研究中还发现,PLBs接种大小及转接的周期对增殖影响较明显,其最佳条件有待进一步研究。

PLBs分化出的无菌苗长势不均,生长细弱。较小的无菌苗转接时,容易褐化,严重降低了成苗率。因此,进行无菌苗壮苗和生根至关重要。有研究表明,低浓度的NAA和IBA对石斛兰生根有较好的诱导效果(郑宽瑜等2009),添加香蕉泥对石斛兰的壮苗和生根有明显促进作用(孔琼等2005; 张晓申等2007; 谢寅峰等2007)。本研究结果表明,在培养基中添加0.5 mg·L⁻¹ IBA和0.1 mg·L⁻¹ NAA,试管苗生根效果最好。添加香蕉泥的培养基明显促进无菌苗的生根,这与前人的研究结果一致。而加入活性炭能有效防止无菌苗褐化,根系更粗壮,叶色浓绿,并促进无菌苗鲜重的增加,与曾宋君等(1998)的报道一致。因此,可将二者结合使用,设

置不同梯度组合, 进一步探讨其对无菌苗壮苗生根的作用。

参考文献

- 陈庭, 叶庆生, 刘伟(2005). 金钗石斛类原球茎诱导及增殖的正交试验. 华南农业大学学报, 26 (3): 60~63
- 陈文贞, 张孟锦(2010). 春石斛栽培技术规程. 广东农业科学, (7): 64~65
- 侯大强(2006). 春石斛离体培养、再生过程生理变化及转基因初步研究[硕士论文]. 杭州: 浙江大学
- 黄萍萍, 潘伟彬, 张永柏, 廖福琴(2003). 石斛兰组培快繁研究初探. 闽西职业大学学报, (3): 85~86
- 孔琼, 袁盛勇, 查应洪, 袁寒, 薛春丽(2005). 梳唇石斛成熟胚的离体培养和植株再生. 植物生理学通讯, 41 (5): 644
- 毛碧增, 李凤玉, 王春, 李德葆(2003). 春石斛组织培养技术研究. 浙江大学学报(理学版), 30 (5): 580~583
- 孟金玲(2011). 春石斛(*Dendrobium nobile*)组织培养快繁体系的构建[硕士论文]. 杭州: 浙江农林大学
- 莫昭展, 施福军, 梁海清, 符韵林(2009). 细叶石斛原球茎组培褐化抑制与试管苗生根. 林业科技开发, 23 (2): 22~24
- 孙廷, 王胜利, 胡如善, 杨玉珍(2007). 霍山石斛原球茎的离体培养研究. 江苏农业科学, (5): 185~187
- 王华, 付玉兰(2012). 春石斛丛生芽组培快繁研究. 亚热带植物科学, 41 (1): 51~54
- 王伟, 黄为昌, 金荷仙, 陈香波(2009). 观赏石斛兰研究进展. 安徽农业科学, 37 (2): 589~591
- 谢寅峰, 徐丽, 王莹(2007). 霍山石斛组培丛生芽诱导增殖及生根技术. 林业科技开发, 21 (6): 72~74
- 姚丽娟, 徐晓薇, 林绍生, 陈中林, 陈义增(2006). 洋兰组培快繁褐变抑制因子探讨. 北方园艺, (4): 162~163
- 殷丽青, 王广东, 张建军, 王新其, 沈革志, 杜永芹, 李秀芬(2006). 大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)离体快速繁殖技术. 上海交通大学学报(农业科学版), 24 (4): 365~369
- 曾宋君, 程式君, 张京丽, 赵逢畔(1998). 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究. 园艺学报, 25 (1): 75~80
- 詹忠根(2006). 铁皮石斛根尖诱导丛生芽研究. 中草药, 37 (6): 928~931
- 张启香, 付素静, 方炎明, 陈娜(2009). 铁皮石斛拟原球茎的发生过程. 浙江林学院学报, 26 (3): 444~448
- 张晓中, 王慧瑜, 李晓青(2007). 春石斛组织培养的研究. 陕西农业科学, (6): 50~52
- 赵伶俐, 范崇辉, 葛红(2006). 黑暗预处理对蝴蝶兰组培中外植体褐化的影响. 西北农业学报, 15 (5): 248~250
- 郑超, 徐晟, 夏冰, 郑玉红, 贺佳, 彭峰, 汪仁(2013). 三种抗氧化剂对曼地亚红豆杉愈伤组织褐化及相关物质含量的影响. 植物生理学报, 49 (3): 259~263
- 郑宽瑜, 邓君浪, 赵辉(2009). 铁皮石斛组培快繁技术体系研究. 云南农业科技, (S2): 57~59
- 周辉明, 叶炜, 罗庆国(2006). 春石斛的组织培养和快速繁殖. 三明农业科技, (3): 23~24
- 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 王国彬, 祝展平(2000). 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展. 园艺学报, 27 (S1): 481~486
- Chung HH, Chen JT, Chang WC (2007). Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. Biol Plantarum, 51 (2): 346~350
- Roy J, Naha S, Majumdar M, Banerjee N (2007). Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae). Plant Cell Tiss Organ Cult, 90 (1): 31~39
- Sujjarittharakarn P, Kanchanapoom K (2011). Efficient direct protocorm-like bodies induction of dwarf *Dendrobium* using thidiazuron. Not Sci Biol, 3 (4): 88~92