

## 报春石斛再生体系的建立

张莹<sup>1,2</sup>, 王雁<sup>1</sup>, 李振坚<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400)

**摘要:** 以茎段为外植体, 建立了报春石斛 *Dendrobium primulinum* 的离体培养再生体系。结果表明: 愈合组织诱导以培养基 MS(Murashige and Skoog) + 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-苄氨基嘌呤(6-BA) + 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2, 4-D 为最优, 诱导率达 33.33%; 分化和增殖培养基均以 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 萘乙酸(NAA) + 体积分数 10% 椰子水为佳, 分化率最高可达 83.20%, 增殖倍数达 3.82, 外源物质椰子水可促进不定芽的形成及增殖。形成的无根苗转移到 1/2MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 g·L<sup>-1</sup> 活性炭培养基上诱导生根发育形成完整植株。图 1 表 4 参 12

**关键词:** 植物学; 报春石斛; 茎段; 再生体系

中图分类号: S682.31; S604.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2009)04-0603-04

## Regeneration system for *Dendrobium primulinum*

ZHANG Ying<sup>1,2</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, LI Zhen-jian<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Forestry, The Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Research Institute of Subtropical Forestry, The Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

**Abstract:** An in vitro plant regeneration system of *Dendrobium primulinum* was established using stem sections as explants. Results showed that the optimum callus inducing medium was Murashige and Skoog (MS) + 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 2, 4-D with an induction rate of 33.3%. Adventitious buds were effectively generated and proliferated on MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA + coconut water 10% with a differentiation rate of 83.2% and proliferation of 3.82 times. Exogenous coconut water promoted adventitious bud generation and proliferation. The best rooting medium was 1/2MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 g·L<sup>-1</sup> activated carbon. [Ch, 1 fig. 4 tab. 12 ref.]

**Key words:** botany; *Dendrobium primulinum*; stem sections; regeneration system

报春石斛 *Dendrobium primulinum* 为多年生草本植物, 花朵淡雅秀丽, 具有极高的观赏价值。石斛属 *Dendrobium* 植物在自然状态下很难获得种子, 即使通过人工授粉等方法获得种子, 也由于种子缺乏胚乳组织而极难萌发<sup>[1]</sup>。1960 年 Gmorel 首次利用石斛 *D. nobile* 茎尖培育出无病毒植株, 1984 年国内徐云鹏等<sup>[2]</sup>首次报道获得霍山石斛 *D. huoshanense* 试管苗。目前, 国外对石斛属植物组织培养的研究已有相关报道<sup>[3-5]</sup>, 但是国内的相关研究技术尚不成熟。本研究拟以报春石斛的茎段为外植体建立再生体系, 研究各个阶段的适宜培养基、激素配比及培养条件等, 以期报春石斛的快速繁殖提供技术依据。

### 1 材料与方 法

报春石斛由中国林业科学研究院花卉中心提供。选取报春石斛当年生长健壮的假鳞茎, 剪取上

收稿日期: 2008-09-10; 修回日期: 2009-03-10

基金项目: 国家林业局引进国际先进农业科学技术计划(948 计划)项目(2005-4-37; 2006-4-C07); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(RISF6801)

作者简介: 张莹, 研究实习员, 硕士, 从事园林植物应用等研究。E-mail: lingchenzy@163.com。通信作者: 王雁, 研究员, 博士, 从事园林植物应用研究。E-mail: wangyan@caf.ac.cn

部较幼嫩的茎段,放入洗洁精溶液中漂洗5~8 min,然后在自来水下冲洗干净,滤纸吸干。用体积分数为70%的乙醇溶液浸泡30 s,1.0 g·L<sup>-1</sup>氯化汞(HgCl<sub>2</sub>)消毒6 min,无菌水冲洗3次,剥除紧紧包裹茎段的叶鞘,再用1.0 g·L<sup>-1</sup>HgCl<sub>2</sub>消毒2 min,无菌水冲洗4~6次,切成长0.3~0.5 cm小段,接种到愈合组织诱导培养基中,每瓶接种3个,每处理10瓶,各重复3次。1 L培养基中均添加蔗糖20 g·L<sup>-1</sup>和琼脂6.0 g·L<sup>-1</sup>,pH 5.6~5.8,分装到150 mL的三角瓶中约40 mL。培养温度为(25±2)℃,光照强度为40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间为12 h·d<sup>-1</sup>。再生体系建立各阶段的培养基配方见表1。愈合诱导率(%)=(诱导出的愈合组织数/接种茎段总数)×100%;分化率(%)=(可分化的愈合组织数/接种愈合组织总数)×100%;增殖倍数=芽增殖后总数/接种的总芽数;生根率(%)=(生根的芽数/接种的总芽数)×100%。数据分析软件为SPSS 13.0。

表1 再生体系建立各阶段的培养基配方

Table 1 Test of establishment of regeneration system of *Dendrobium primulinum*

试验代号	基本培养基	植物生长调节物质质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )			添加物	目的
		6-BA	NAA	2,4-D		
①	MS	5.0	0	0.5	无	
②	MS	5.0	0	1.0	无	愈合组织诱导
③	MS	5.0	0	1.5	无	
④	MS	1.0	0.1	0	无	分化,继代
⑤	MS	2.0	0.1	0	无	分化
⑥	MS	3.0	0.1	0	无	分化
⑦	MS	1.0	0.1	0	体积分数10%椰子水	分化,继代
⑧	MS	0.5	0	0	无	继代
⑨	MS	1.0	0.5	0	无	继代
⑩	1/2MS	0.5	1.0	0	0.5 g·L <sup>-1</sup> 活性炭	生根

## 2 结果与分析

### 2.1 愈合组织的诱导

茎段在愈合组织诱导培养基上先暗培养7 d,然后转入光照条件下,大约培养20 d后,茎节处长出瘤状的黄绿色的愈合组织(图1a)。分别对处理30 d时愈合组织的诱导率进行统计,试验结果见表2。由表2可以看出,诱导率在培养基①与③上的差异显著,说明2,4-D质量浓度对诱导愈合影响较大,在6-苄氨基嘌呤(6-BA)质量分数相同的情况下,2,4-D质量浓度升高,诱导率也升高,其中以培养基③的诱导率最高,达33.33%。同时2,4-D质量浓度也影响愈合组织的生长状态,在低质量浓度的2,4-D培养基上愈合组织的长势稍好,主要呈疏松的黄绿色颗粒状,且表面湿润饱满;在高浓度的2,4-D培养基上愈合组织数量多而致密,呈淡黄色。鉴于此,本试验首先选择诱导率较高的培养基③诱导愈伤,以此获得较多的愈合组织,然后将愈合组织转接到培养基①上进行增殖,以提高愈合组织的质量。

### 2.2 愈合组织分化

将生长状况良好的愈合组织转接到分化培养基④⑤⑥⑦上,7 d后愈合组织周围便陆续分化出不定芽(图1b)。由表3可以看出,愈合组织在培养基④和⑦上的分化率明显高于培养基⑤和⑥,超过

表2 不同培养基对愈合组织诱导的效果

Table 2 Effects of different medium on callus induction

试验代号	平均诱导率/%	生长状况
①	21.11 b	++
②	25.56 ab	+
③	33.33 a	+

说明: +为生长状态一般; ++为生长势较好。

了 80%，说明低质量浓度的细胞分裂素 6-BA 对愈合组织的分化有利。添加了椰子水的培养基⑦的分化率略高于培养基④，可见，椰子水可以促进愈合组织的分化。另外，试验表明愈合组织的分化能力与其生长状态有关，湿润饱满、疏松状态的愈合组织分化时间比较短，分化出的不定芽长势较好；表面致密硬度稍大的愈合组织分化出的不定芽数量偏低，且分化时间较长。

表 3 植物生长调节物质质量分数及愈合组织的生长状态对愈合分化的影响

Table 3 Effects of concentrations of hormone and different callus on buds differentiation

试验代号	分化率/%	分化情况	
		新鲜饱满的愈合组织	致密坚硬的愈合组织
④	81.35 ± 1.09	每块愈合周边形成 5 ~ 7 个不定芽。	每块愈合周边形成 3~4 个不定芽,未分化部分逐渐褐化死亡。
⑦	83.20 ± 2.31	每块愈合周边形成 5 ~ 7 个不定芽。	每块愈合周边形成 3~4 个不定芽,未分化部分逐渐褐化死亡。
⑤	76.80 ± 3.94	每块愈合周边形成 4 ~ 5 个不定芽。	每块愈合周边形成 3~4 个不定芽,未分化部分逐渐褐化死亡。
⑥	74.24 ± 3.73	每块愈合周边形成 4 ~ 5 个不定芽。	每块愈合周边形成 3~4 个不定芽,未分化部分逐渐褐化死亡。

### 2.3 继代培养

分化后的不定芽在培养基④⑦⑧⑨上培养 7 ~ 10 d 后均开始增殖生长，茎段叶腋处长出幼芽，20 ~ 30 d 后即可长成健壮的幼苗(图 1c, d)。以 50 d 为一个继代增殖周期，计算每种培养基的增殖倍数。由表 4 可以看出，用于愈合组织分化的适宜培养基④和⑦同样是不定芽增殖的最适培养基。从 6-BA 和萘乙酸(NAA)的质量浓度比例可以看出，6-BA/NAA 的比值越低，不定芽的增殖倍数越小。在 4 种处理中，培养基⑦上不定芽的平均增殖倍数最高，显著大于培养基④，极显著大于培养基⑧和⑨；④与⑦相比可见，外源物质椰子水对丛生芽的增殖有较明显的促进作用。此结论与以芽生芽途径进行石斛的组培快繁结果相一致<sup>[6]</sup>。

表 4 不同培养基对不定芽的增殖效果

Table 4 Effects of different medium on embryoids multiplication

培养基 代号	6-BA/NAA	平均增殖倍数	显著水平	
			5%显著水平	1%显著水平
④	10	3.42	b	AB
⑦	10	3.82	a	A
⑧		3.04	c	BC
⑨	2	2.92	c	C

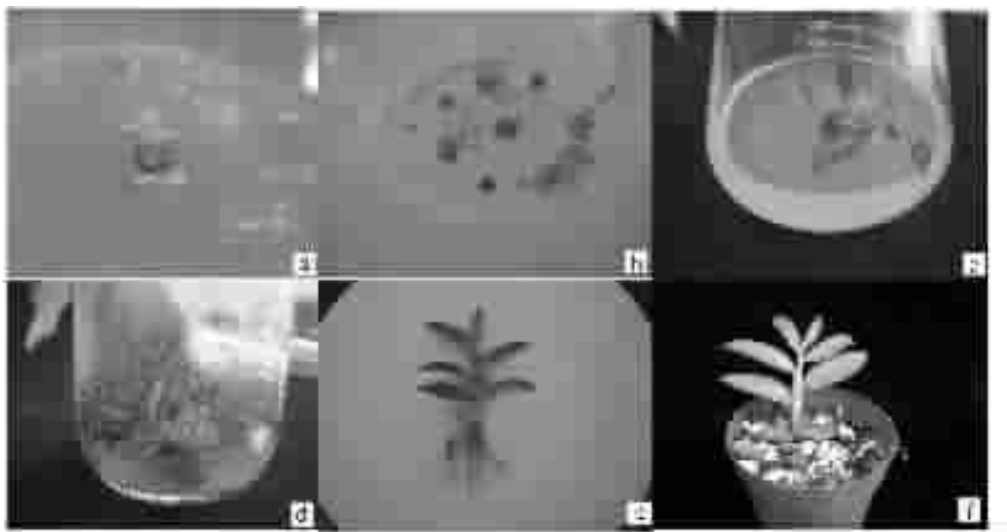


图 1 报春石斛的组织培养 (a. 愈合组织; b. 愈合组织分化; c, d. 继代增殖; e. 不定根; f. 移栽)

Figure 1 Tissue culture of *Dendrobium primulinum* (a. callus; b. callus differentiation; c, d. multiplication; e. root; f. transplanting)

## 2.4 生根及移栽

从丛生芽上切下的不定芽,在培养基⑩上诱导生根培养约20 d后,可长出3~5条不定根(图1e),形成了完整植株,生根率达85%。待根长2~3 cm,根系粗壮时,置于温室中,3~5 d后打开瓶盖,每天用喷壶喷水,防止幼苗失水,再过2~3 d后从培养瓶中取出幼苗,洗净根部的培养基,移栽入湿润的水苔中。保持环境温度20~25℃,成活率可达90%。待报春石斛生长健壮时,移栽于水苔、兰石及树皮的混合基质中(图1f)。

## 3 结论与讨论

很多研究表明,石斛属植物的不同外植体均可实现植株再生<sup>[7-9]</sup>。本试验也尝试了用报春石斛的幼嫩叶片为外植体诱导愈合组织,但愈合诱导率极低,接近于0,与叶秀彝<sup>[7]</sup>用石斛杂交种的嫩叶成功诱导出愈合组织结果不相一致,这说明不同品种相同外植体的再生能力差异很大。诱导愈合组织,生长素不可缺少,2,4-D的诱导效果好于NAA,吲哚乙酸(IAA)和吲哚丁酸(IBA)<sup>[10]</sup>,但生长素质量浓度过高时会影响愈合组织的分化,2,4-D的适宜质量浓度为0.5~1.0 mg·L<sup>-1</sup>。本试验通过2种途径获得了大量无菌苗,一种途径是将愈合反复增殖,然后直接分化而得幼芽,另一种是将不定芽反复继代<sup>[6]</sup>。比较2种途径,前者一次可形成大量幼苗,且所需时间较短,但是所得幼苗较后者小且细弱。石斛属植物茎段除大量繁殖外,其愈合组织和原球茎还可作为遗传转化受体进行转基因等技术的研究<sup>[11-12]</sup>。从总体来说,报春石斛的愈合组织诱导率较低,不足50%,适宜的激素浓度配比尚有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 王雁,李振坚,彭红明. 石斛兰:资源·生产·应用[M]. 北京:中国林业出版社,2007.
- [2] 徐云鹃,于文力. 霍山石斛种子试管苗的培养[J]. 植物生理学通讯,1984,25(4):35-36.  
XU Yunjuan, YU Wenli. Study on seeds in vitro of *Dendrobium* in Huoshan County [J]. *Plant Physiol Commun*, 1984, 25(4): 35-36.
- [3] CHUNG H H, CHEN J T, CHANG W C. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium chiengmai* pink and subsequent plant regeneration [J]. *In Vitro Cell Dev Bio-Plant*, 2005, 41(6): 765-769.
- [4] SHIAU Y J, NALAWADE S M, HSIA C N, et al. In vitro propagation of the Chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl., from axenic nodal segments [J]. *In Vitro Cell Dev Bio-Plant*, 2005, 41(5): 666-670.
- [5] DEVI J, BORTHAKUR B, DEKA P C. Clonal propagation of *Dendrobium moschatum* and *Cymbidium aloifolium* through shoot-tip culture [J]. *J Orchid Soc India*, 1997, 11(1/2): 19-21.
- [6] 张莹,王雁,李振坚. 报春石斛的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2007,43(4):749-750.  
ZHANG Ying, WANG Yan, LI Zhenjian. Tissue culture and rapid propagation of *Dendrobium primulinum* [J]. *Plant Physiol Commun*, 2007, 43(4): 749-750.
- [7] 叶秀彝. 石斛兰组织培养和细胞学观察[J]. 园艺学报,1995,22(1):83-87.  
YE Xiulin. Histocytological study of *Dendrobium* hybrid propagation in vitro [J]. *Acta Horti Sin*, 1995, 22(1): 83-87.
- [8] ROY J, BANERJEE N. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f [J]. *Sci Horti*, 2003, 97(3/4): 333-340.
- [9] MALABADI R B, MULGUND G S, KALLAPPA N. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections [J]. *J Plant Physiol*, 2005, 162: 473-478.
- [10] 李辛雷,陈发棣,王红,等. 菊花外植体再生体系的研究[J]. 上海农业学报,2004,20(2):13-16.  
LI Xinlei, CHEN Fadi, WANG Hong, et al. Study on regeneration system of chrysanthemum explants [J]. *Acta Agric Shanghai*, 2004, 20(2): 13-16.
- [11] MEN Shuzhen, MING Xiaotian, LIU Rongwei, et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *Dendrobium orchid* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2003, 75: 63-71.
- [12] YU H, YANG S H, GOH C J. Agrobacterium-mediated transformation of a *Dendrobium orchid* with the class 1 *knos* gene *DOH1* [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20(4): 301-305.