

叶秀仙, 林榕燕, 黄敏玲, 等. 秋石斛原球茎液体增殖培养研究 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (9): 959—962.
YE X-X, LIN R-Y, HUANG M-L, et al. The Study on *Dendrobium* spp. PLB Propagation in Liquid Culture [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32 (9): 959—962.

秋石斛原球茎液体增殖培养研究

叶秀仙^{1,2,3}, 林榕燕^{1,2,3}, 黄敏玲^{1,2,3*}, 钟淮钦^{1,2,3}, 林 兵^{1,2,3}

(1. 福建省农业科学院作物研究所, 福州 福州 350013; 2. 福建省农业科学院花卉研究中心, 福建 福州 350013; 3. 福建省特色花卉工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘要: 以秋石斛‘三亚阳光’幼芽茎尖诱导形成的原球茎为增殖培养材料, 采用液体培养方式及正交设计法研究基本培养基、噁唑菌酮(TDZ)、椰汁和白糖4种因素对秋石斛原球茎增殖的影响, 以期筛选出各因子的最佳水平, 建立秋石斛‘三亚阳光’原球茎液体增殖培养技术。结果表明: 各试验因素对秋石斛原球茎增殖影响的主次关系为基本培养基>TDZ>白糖>椰汁; 筛选出秋石斛PLB适宜增殖培养基配方为改良HM2+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+椰子汁 20.0 mL·L⁻¹+白糖 30.0 g·L⁻¹, 增殖培养35 d平均增殖系数达6.65。

关键词: 秋石斛; 原球茎; 增殖; 正交设计; 液体培养

中图分类号: S 68

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2017) 09—959—04

The Study on *Dendrobium* spp. PLB Propagation in Liquid Culture

YE Xiu-xian^{1,2,3}, LIN Rong-yan^{1,2,3}, HUANG Min-ling^{1,2,3*}, ZHONG Huai-qin^{1,2,3}, LIN Bing^{1,2,3}

(1. Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Science, Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou, Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou, Fujian 350013)

Abstract: The protocorm-like body (PLB) induced from stem tips of *Dendrobium* spp. ‘Sanya Sunny’ were used as explants, The orthogonal design and the liquid media were used to study the effects of the key factors such as culture medium, TDZ, coconut water and sugar contained on PLB propagation of *Dendrobium* spp. ‘Sanya Sunny’. Through above research, it was tried to find the main factors and build up the PLB proliferation system in *Dendrobium* spp. ‘Sanya Sunny’ in the paper. The results showed that the main factors of PLB propagation are the basic medium, TDZ, sugar and coconut water. The best multiplication medium of PLB is improvement HM # 2 medium, TDZ 0.5 mg·L⁻¹, NAA 0.1 mg·L⁻¹, coconut water 20.0 mL·L⁻¹, and sugar 30.0 g·L⁻¹ to result in an averaged propagation coefficient of 6.25 in 35 days.

Key words: *Dendrobium* spp.; protocorm-like body; propagation; Orthogonal Design; liquid culture

秋石斛 *Dendrobium* spp. 为兰科石斛属常绿类石斛, 又称蝴蝶石斛、杜兰、石斛、石兰等。多是以原产于新几内亚的热带原生种蝴蝶石斛 *Dendrobium Phalaenopsis* 为亲本育成的杂交品种。秋石斛是近几年在中国插花市场上流行的花卉, 种类繁多, 花形花姿优美, 色彩艳丽, 花期长, 具有较高的观赏价值, 在国内切花和盆花的市场需求量逐年增加。

近年我国大陆引进了不少秋石斛兰品种, 但是种苗生产主要靠分株繁殖, 繁殖速度慢, 难以满足生产需求。利用植物组织培养技术可以解决秋石斛兰种苗快速繁殖的问题, 目前国内对秋石斛兰组织培养的技术报道仅见少量报道^[1-4], 且多集中采用固体增殖培养方式进行扩繁, 未见其原球茎液体培养相关研究报道。与固体培养相比, 液体培养有其自身的优点: 培养材料能充分、均匀吸收培养基的各

收稿日期: 2017-04-12 初稿; 2017-09-14 修改稿

作者简介: 叶秀仙 (1977—), 女, 副研究员, 主要从事花卉育种与组织培养技术研究 (E-mail: yxx7861@163.com)

* 通讯作者: 黄敏玲 (1960—), 女, 研究员, 主要从事花卉品种选育与生物技术研究 (E-mail: huangml618@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益科研院所基本科研专项 (2015R1026-8); 福建省财政专项——福建省农科院科技创新团队 PI 项目 (2016PI-39); 福建省农业科学院导师制基金项目 (2014QA-5)

种营养;培养材料产生的褐化物能及时扩散至培养基中,避免固体培养基中局部高浓度的褐化,这更有利于提高原球茎增殖培养效率与原球茎质量。本研究以秋石斛‘三亚阳光’原球茎为材料,采用正交试验设计与液体培养方式,探讨原球茎增殖优化条件,旨在探索原球茎途径组培快繁技术,为秋石斛种苗繁育及遗传转化等相关研究提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以秋石斛优良品种‘三亚阳光’(*Dendrobium* spp. ‘Sanya Sunny’)幼芽茎尖诱导形成的原球茎(protocorm-like body, PLB)作为培养材料。试验在福建省特色花卉工程技术研究中心花卉育种实验室进行。

1.2 试验方法

1.2.1 接种方法及称重 选取生长较为一致的PLB团块分割成直径为3~5 mm大小的切块,每瓶接入PLB 25~30块,在接种前称得培养容器和培养液的总重量,接种后再称得培养容器、培养基及接入PLB的总重量,二者相减可得出接种PLB的重量,即为增殖前的鲜重。

1.2.2 试验因素设定 采用4因素3水平L9(3⁴)正交设计,选择基本培养基、嚷重氮苯基脲(TDZ)、椰汁、白糖为试验因素,代号分别为A、B、C、D,各设置3个水平,详见表1。各处理培养基均附加NAA 0.1 mg·L⁻¹、活性炭0.5 g·L⁻¹,pH值5.4~5.6。每处理接种3瓶,每瓶接入PLB重量2.0~3.0 g,3次重复,共9个处理。

表1 L9(3⁴)因素及水平

Table 1 The orthogonal design L9(3⁴) factors and levels

| 处理编号 | 基本培养基 | TDZ/(mg·L ⁻¹) | 椰汁/(mL·L ⁻¹) | 白糖/(g·L ⁻¹) |
|------|-------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1 | 花宝1号 | 0.1 | 20.0 | 10.0 |
| 2 | 改良HM1 | 0.5 | 50.0 | 20.0 |
| 3 | 改良HM2 | 1.0 | 80.0 | 30.0 |

注:花宝1号用量3.0 g·L⁻¹。

改良HM1基本培养基的组分为:KNO₃ 1 900 mg·L⁻¹、NH₄NO₃ 1 750 mg·L⁻¹、KH₂PO₄ 250 mg·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 500 mg·L⁻¹、CaCl₂·2H₂O 440 mg·L⁻¹、MnSO₄·H₂O 16.9 mg·L⁻¹、ZnSO₄·7H₂O 8.6 mg·L⁻¹、H₃BO₃ 6.2 mg·L⁻¹、KI 0.83 mg·L⁻¹、Na₂MoO₄·2H₂O 0.25 mg·L⁻¹、

CoCl₂·6H₂O 0.025 mg·L⁻¹、CuSO₄·5H₂O 0.025 mg·L⁻¹、FeSO₄·7H₂O 27.8 mg·L⁻¹、Na₂·EDTA 37.3 mg·L⁻¹、盐酸硫胺素 10.0 mg·L⁻¹、烟酸 3.0 mg·L⁻¹、盐酸吡哆醇 1.0 mg·L⁻¹、甘氨酸 2.0 mg·L⁻¹、肌醇 100 mg·L⁻¹。

改良HM2基本培养基的组分为:花宝1号 15 000 mg·L⁻¹、KNO₃ 950 mg·L⁻¹、NH₄NO₃ 875 mg·L⁻¹、KH₂PO₄ 125 mg·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 250 mg·L⁻¹、CaCl₂·2H₂O 440 mg·L⁻¹、MnSO₄·H₂O 16.9 mg·L⁻¹、ZnSO₄·7H₂O 8.6 mg·L⁻¹、H₃BO₃ 6.2 mg·L⁻¹、KI 0.83 mg·L⁻¹、Na₂MoO₄·2H₂O 0.25 mg·L⁻¹、CoCl₂·6H₂O 0.025 mg·L⁻¹、CuSO₄·5H₂O 0.025 mg·L⁻¹、FeSO₄·7H₂O 27.8 mg·L⁻¹、Na₂·EDTA 37.3 mg·L⁻¹、盐酸硫胺素 15.0 mg·L⁻¹、烟酸 5.0 mg·L⁻¹、盐酸吡哆醇 1.0 mg·L⁻¹、甘氨酸 2.0 mg·L⁻¹、肌醇 150 mg·L⁻¹。

1.2.3 培养方式与培养条件 以三角瓶为培养容器,以摇床振荡方式进行培养,摇床转速100 r·min⁻¹,培养温度25℃,光强为800~1 000 lx,光照时间为12h·d⁻¹。见图1。



图1 秋石斛原球茎液体培养

Fig. 1 Liquid culture for *Dendrobium* spp. PLB

1.2.4 观测指标与数据分析 每隔7 d对PLB生长情况进行观察,包括PLB的颗粒大小、颜色等,增殖培养35 d时,进行PLB称重,即得出增殖后PLB鲜重。PLB增殖系数=(增殖后鲜重-增殖前鲜重)/增殖前鲜重。数据统计采用正交设计助手V3软件进行分析^[5]。

2 结果与分析

2.1 L9(3⁴)因素对原球茎增殖的影响

秋石斛PLB接种7 d时,切口部位开始膨大,14 d时不同处理组陆续增殖。增殖培养35 d时统计PLB增殖系数,试验统计分析结果见表2、3、9个处理秋石斛PLB增殖生长情况见图2所示。表2

结果表明, 从K值大小可以看出, 在秋石斛PLB增殖过程中, 以改良HM2为基本培养基较好, TDZ为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 椰子汁为 $20.0\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$, 白糖为 $30.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 从极差R值大小可以看出, 不同因素对原球茎增殖影响的主次关系为A>B>D>C, 这说明对秋石斛原球茎增殖起主要作用的是基本培养基, 其次是TDZ、白糖, 椰汁对增殖的影响较小。秋石斛原球茎增殖最佳处理组合是A₃B₂C₁D₃, 即改良HM2+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+椰子汁 20.0 mL·L⁻¹+白糖 30.0 g·L⁻¹, 液体培养35 d, 平均增殖系数达6.65, 且原球茎生长均匀、饱满(图2-H)。

表2 PLB液体增殖培养L9(3⁴)正交试验设计与极差分析
Table 2 The orthogonal design L9(3⁴) and the experiment result

| 处理 | 因素 | | | | PLB平均增殖系数 |
|-----------------------|---|----------------|----------------|----------------|-----------|
| | A | B | C | D | |
| 1 | 花宝1号 | 0.1 | 20 | 10 | 3.77 |
| 2 | 花宝1号 | 0.5 | 50 | 20 | 4.98 |
| 3 | 花宝1号 | 1.0 | 80 | 30 | 4.46 |
| 4 | 改良HM1 | 0.1 | 50 | 30 | 5.23 |
| 5 | 改良HM1 | 0.5 | 80 | 10 | 5.85 |
| 6 | 改良HM1 | 1.0 | 20 | 20 | 5.34 |
| 7 | 改良HM2 | 0.1 | 80 | 20 | 5.38 |
| 8 | 改良HM2 | 0.5 | 20 | 30 | 6.65 |
| 9 | 改良HM2 | 1.0 | 50 | 10 | 5.43 |
| <i>k</i> ₁ | 4.403 | 4.793 | 5.253 | 5.017 | |
| <i>k</i> ₂ | 5.473 | 5.827 | 5.213 | 5.233 | |
| <i>k</i> ₃ | 5.820 | 5.077 | 5.230 | 5.447 | |
| 极差R | 1.417 | 1.034 | 0.040 | 0.430 | |
| 主次顺序 | A>B>D>C | | | | |
| 优水平 | A ₃ | B ₂ | C ₁ | D ₃ | |
| 优组合 | A ₃ B ₂ C ₁ D ₃ | | | | |

注: 表中因素A为基本培养基; B为TDZ/(mg·L⁻¹); C为椰汁/(mL·L⁻¹); D为白糖/(g·L⁻¹)。

表3 原球茎增殖系数方差分析结果

Table 3 Analysis of variance in propagation rate

| 因素 | SS | df | F | F _{0.05} | 显著性 | F _{0.01} | 显著性 |
|-------|-------|----|----------|-------------------|-----|-------------------|-----|
| 基本培养基 | 3.272 | 2 | 1636.000 | 19.000 | * | 99.000 | * |
| TDZ | 1.711 | 2 | 855.500 | 19.000 | * | 99.000 | * |
| 椰汁 | 0.002 | 2 | 1.000 | 19.000 | | 99.000 | |
| 白糖 | 0.277 | 2 | 138.500 | 19.000 | * | 99.000 | * |
| 误差 | 0.00 | 2 | | | | | |

从表3可知, 基本培养基、TDZ和白糖这3

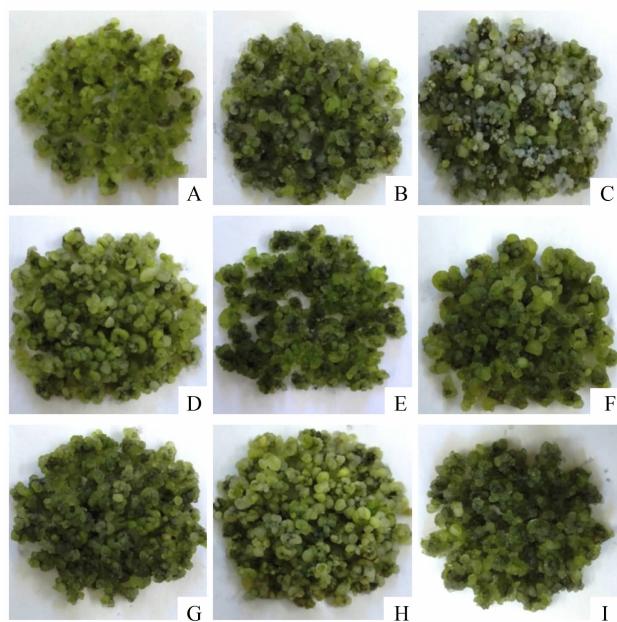


图2 9处理对秋石斛PLB增殖的影响

Fig. 2 Effect of 9 treatments of *Dendrobium* spp. PLB propagation

种因素均显著影响文心兰原球茎增殖系数, 但其影响程度的大小有较大差异, 表现为基本培养基>TDZ>白糖, 椰汁因素无显著影响, 与极差分析结果一致。

2.2 原球茎分化

将液体增殖培养后的原球茎接种至分化培养基上进行分化培养, 均能正常分化成苗, 优选配方增殖出的原球茎, 芽分化量大, 每克原球茎可平均分化出145个芽。其中分化、生根培养基配方均选用“用于秋石斛兰快速繁殖的培养基组”(专利受理号: 201710282270.X) 专利中的培养基组分。

3 讨论与结论

原球茎(protocorm-like body, PLB)的形成是兰花离体培养过程中特有的发育现象, 通过PLB的增殖可以在短时间内实现兰花试管苗的大量繁殖, 也是各种兰花开展工厂化种苗生产的关键环节。同其他兰花一样, 影响秋石斛PLB诱导与增殖的因素有很多, 但培养基类型、植物生长调节剂的种类和质量浓度、有机添加物及培养方式等是最关键的几个因素。

本试验利用正交试验设计方法, 以达到有效减少试验次数, 简化实验方法的目的, 主要选择基本培养基、TDZ、椰汁和白糖为关键试验因素, 探索了秋石斛‘三亚阳光’PLB液体增殖培养技术。试

验结果表明对秋石斛 PLB 增殖起主要作用的是基本培养基,其次是 TDZ、白糖,椰汁对增殖的影响较小。秋石斛 PLB 增殖适宜的液体培养基为改良 HM2+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+椰子汁 20.0 mL·L⁻¹+白糖 30.0 g·L⁻¹,培养 35 d 平均增殖系数达 6.65,且 PLB 生长均匀、饱满,为种苗繁育及遗传转化等提供了技术保障。

据文献报道,秋石斛组织培养主要以固体培养方式为主^[1-4],其组培过程中仍然存在原球茎生长不均衡、增殖与分化并存生长等问题,这可能与他们所用培养基的成分包括基本培养基、植物生长调节剂等因素有关。在其他兰花如文心兰组培中,何松林等^[6]比较了固体培养和液体培养 2 种培养方式对文心兰 PLB 增殖影响时发现,液体振荡及回旋培养较固体培养方式好,固体培养方式进行 PLB 增殖过程中幼苗形成率高,认为液体培养更适合文心兰 PLB 培养。崔广荣等^[7-8]也认为在文心兰 PLB 液体增殖培养较好。固体培养的最大优点是操作简单,但缺点是外植体只有底部表面接触培养基吸收养分,而上部较难充分吸收养分,影响生长速度^[9]。而液体培养可以克服这些缺点。因此,液体培养 PLB 在兰花组培快繁中具有一定优势,培养基配方的合理选择是 PLB 液体增殖培养的关键,

关于影响秋石斛 PLB 增殖除了本试验中考虑的因素,其他培养因素有待进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] 黄志明,林庆良,余慧敏.蝴蝶石斛兰工厂化育苗技术的研究[J].莆田学院学报,2002,9(3):22-26.
- [2] 罗岚,关仕港,刘建昌,等.秋石斛兰离体快速繁殖研究[J].佛山科学技术学院学报:自然科学版,2004,22(2):69-71.
- [3] 罗岚.秋石斛原球茎增殖培养[J].花木盆景,2003,6(8):4-7.
- [4] 陈亚鸿,洪磊,陈雄庭.减少秋石斛在组织培养中的褐化研究[J].现代农业科学,2009,16(3):44-48.
- [5] 盖均镒.试验统计方法[M].北京:中国农业出版社,2000:382-383.
- [6] 何松林,十鸟三和子,王献,等.不同基本培养基及培养方式对文心兰原球茎增殖的影响[J].华北农学报,2001,(1):88-91.
- [7] 崔广荣.文心兰组织培养及转基因研究进展[J].草业学报,2010,19(4):220-229.
- [8] 崔广荣,张子学,张从宇,等.文心兰原球茎液体增殖培养研究[J].激光生物学报,2007,16(3):338-343.
- [9] 潘瑞炽.植物组织培养[M].广州:广东高等教育出版社,2001:47-50.

(责任编辑:柯文辉)