

金钗石斛类原球茎诱导及增殖的正交试验

陈 庭¹, 叶庆生², 刘 伟³

(1 深圳市园林科学研究所, 广东 深圳 518003; 2 华南师范大学 生命科学学院, 广东 广州 510631;

3 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 通过正交试验, 筛选了金钗石斛 *Dendrobium nobile* 类原球茎 (protocrom-like bodies, PLBs) 诱导及增殖适宜的培养基. 以 1/2MS 附加 8 g·L⁻¹ 琼脂为基本培养基, 诱导以 NAA、TDZ(噻二唑苯基脲, thidiazuron)、CPPU[N-(2-氯-4-吡啶基)-N¹-苯胺] 做三因子四水平试验, 增殖则以 NAA、BA、蔗糖、pH 值做四因子四水平试验, 根据 L₁₆(4⁵) 正交表设计, 分别以 PLBs 诱导率和增殖质量率为指标, 筛选了适宜于 PLBs 诱导和增殖的培养基. 结果显示: 1/2 MS+30 g·L⁻¹ 蔗糖+8 g·L⁻¹ 琼脂+0.01 mg·L⁻¹ TDZ+0.005 mg·L⁻¹ CPPU, pH 5.6 的培养基适宜于 PLBs 诱导, 1/2MS+20 g·L⁻¹ 蔗糖+8 g·L⁻¹ 琼脂+20 g·L⁻¹ 香蕉汁+1.0 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ BA, pH 5.6 的培养基增殖效果较好; 诱导率和增殖质量率分别为 46.00% 和 756.74%. 在各因子中, NAA 对 PLBs 诱导率的影响最大, 并对 PLBs 的诱导起抑制作用; 蔗糖质量浓度对 PLBs 增殖质量率影响最大, 且较低的质量浓度更为适宜; 筛选出的 PLBs 诱导和增殖培养基经重复试验, 结果相对稳定.

关键词: 正交试验; 金钗石斛; 类原球茎 (PLBs); 诱导; 增殖

中图分类号: Q94

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0060-04

The orthogonal test of induction and proliferation of *Dendrobium nobile* protocrom-like bodies (PLBs)

CHEN Ting¹, YE Qing-sheng², LIU Wei³

(1 Shenzhen Institute of Landscape Gardening, Shenzhen 518003, China;

2 College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

3 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Medium of induction and multiplication of *Dendrobium nobile* protocrom-like bodies (PLBs) was screened out by orthogonal test. Added 8 g·L⁻¹ agar in the basic medium of 1/2 MS, NAA, TDZ and CPPU were selected as factors in PLBs induction, NAA, 6-BA, sucrose and pH value were selected as factors in proliferation. Experiment was designed by the orthogonal test table of L₁₆(4⁵). The results showed that the optimal medium for induction was 1/2 MS+30 g·L⁻¹ sucrose+8 g·L⁻¹ agar+0.01 mg·L⁻¹ TDZ+0.005 mg·L⁻¹ CPPU and 1/2 MS+1.0 mg·L⁻¹ NAA+0.2 mg·L⁻¹ BA+20 g·L⁻¹ sucrose+8 g·L⁻¹ agar+20 g·L⁻¹ banana juice for proliferation. The rate of induction was 46.00% and multiplication was 756.74%. NAA had inhibitory effect on PLBs induction and sucrose concentration was the most important factor in PLBs proliferation. The effect of selected medium was confirmed by the repeated experiments.

Key words: orthogonal test; *Dendrobium nobile*; protocrom-like bodies (PLBs); induction; proliferation

金钗石斛 *Dendrobium nobile* 为兰科石斛属多年生附生草本植物, 在我国主要分布于陕西、四川、湖

北、广东、广西、贵州、云南、台湾等省区. 因其花色艳丽、花姿优美、清香宜人而成为世界著名的观赏花

收稿日期: 2004-11-19

作者简介: 陈 庭(1974-), 男, 助理研究员, 硕士, 通讯作者; 刘 伟(1964-), 男, 副教授, 博士; E-mail: liuwei@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目(003062); 广东省高新技术成果转化项目(98FF32); 广东省科技计划资助项目

(99M0380G)
©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

卉^[1], 还是软茎类(nobile type)观赏春石斛最重要的育种亲本。金钗石斛也是我国药用石斛的药原植物之一, 具有重要的经济价值。石斛属植物对生境要求苛刻, 且自然繁殖率低, 加之日益增加的人工采挖, 导致其资源日渐贫乏^[3]。为了在保护的前提下合理利用这一珍贵资源, 需要解决的首先是种苗问题, 国内外近年来对石斛组织培养的研究比较多^[2-6], 并认为离体快繁技术, 是解决这一问题的有效方法。虽然石斛的组织培养近 20 年来发展迅速, 在各方面日趋成熟, 但仍存在类原球茎(protochrom-like bodies, PLBs)诱导率低、增殖速率较低、培养周期较长以及试管苗移栽成活率低等问题^[7]。针对石斛 PLBs 诱导率和增殖率较低的问题, 通过正交试验方法筛选适宜 PLBs 诱导和增殖的培养基, 取得了较好的结果。

1 材料与方 法

1.1 材料选择

PLBs 诱导试验选择金钗石斛无菌苗长度约 0.5 cm 的幼嫩茎段为外植体, 而增殖试验则选择本实验室继代培养 40 d 左右且无分化的金钗石斛 PLBs 为材料。

1.2 培养方 法

将金钗石斛无菌苗的幼茎切成段接入按正交试验方案配制的 PLBs 诱导培养基里, 培养 60 d 后统计 PLBs 诱导率。于超净台上用电子天平按每瓶 0.6 ~ 1.0 g 称取 PLBs, 接入按正交试验方案配制的 PLBs 增殖培养基里, 记录下每瓶接入 PLBs 的量。培养 45 d 后称取每个培养瓶 PLBs 的量, 记录结果。PLBs 诱导率 = 诱导产生 PLBs 的外植体数 / 接入外植体数 × 100%; PLBs 增殖质量率 = (培养 45 d 后 PLBs 的质量 - 接种时 PLBs 的质量) / 接种时 PLBs 的质量 × 100%。基本培养基选用 1/2MS, 培养条件为 (25 ± 1) °C 下光照培养, 光强为 2 000 ~ 2 500 lx, 每天光照 12 h。

1.3 正交试验方 案

PLBs 诱导试验以 NAA(A)、TDZ(B)、CPPU(C) 三因素, 各设四水平(表 1)。PLBs 增殖试验则以 NAA(A)、BA(B)、蔗糖(C)及 pH 值(D)四因素, 各设四水平(表 2), 2 个试验均选 L₁₆(4⁵)表进行正交设计,

表 1 PLBs 诱导正交试验因子水平表

Tab. 1 Factors and levels of L₁₆(4⁵) for PLBs induction

水平	A	B	C
level	$\rho(\text{NAA})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{TDZ})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{CPPU})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
1	0	0	0
2	0.2	0.01	0.005
3	0.5	0.10	0.050
4	1.0	1.00	0.500

表 2 PLBs 增殖正交试验因子水平表

Tab. 2 Factors and levels of L₁₆(4⁵) for PLBs proliferation

水平	A	B	C	D
level	$\rho(\text{NAA})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{BA})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{蔗糖 sucrose})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	pH
1	0	0	20	5.2
2	0.2	0.2	30	5.6
3	0.5	0.5	40	6.0
4	1.0	1.0	50	6.2

分别以 PLBs 诱导率和增殖质量率为指标, 各有 16 个试验处理组合。每处理接种 6 瓶。

2 结果与分析

2.1 不同激素对 PLBs 诱导率影响的分析

PLBs 诱导的正交试验结果见表 3。

表 3 不同组合培养基的 PLBs 诱导效果

Tab. 3 The induction effect of PLBs on different combination medium

组合号	$\rho(\text{NAA})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{TDZ})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{CPPU})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	诱导率
combination code				induction rate/%
1	0	0	0	16.47 ± 5.49
2	0	0.01	0.005	46.00 ± 6.17
3	0	0.10	0.050	12.63 ± 3.49
4	0	1.00	0.500	11.25 ± 3.15
5	0.2	0	0.005	17.50 ± 4.79
6	0.2	0.01	0	7.14 ± 3.39
7	0.2	0.10	0.500	11.11 ± 4.35
8	0.2	1.00	0.050	2.86 ± 1.94
9	0.5	0	0.050	15.56 ± 4.14
10	0.5	0.01	0.500	18.67 ± 5.68
11	0.5	0.10	0	11.25 ± 4.46
12	0.5	1.00	0.005	9.23 ± 4.31
13	1.0	0	0.500	0.00 ± 0.00
14	1.0	0.01	0.050	0.00 ± 0.00
15	1.0	0.10	0.005	0.00 ± 0.00
16	1.0	1.00	0	10.67 ± 3.84

根据正交试验结果, 各因素对 PLBs 诱导率的极差分析见表 4。图 1 显示组合号为 2 的培养条件下, 类原球茎体诱导情况。

表 4 各因素对 PLBs 诱导率的极差分析

Tab. 4 Range analysis on PLBs induction rate for different factors

因素 factors	1	2	3	4	极差 range
A(NAA)	21.59	9.65	13.68	2.67	18.92
B(TDZ)	12.38	17.95	8.75	8.50	9.45
C(CPPU)	11.38	18.18	7.76	10.26	10.42



图1 金钗石斛类原球茎体的诱导

Fig. 1 PLBs induction of *Dendrobium nobile*

从表4可以看出, A因子极差最大, 为18.92, C因子和B因子极差次之, 分别为10.42和9.45。这说明NAA对PLBs诱导率的影响最大, 其次是CPPU和TDZ。从诱导率的角度看, PLBs诱导以 $A_1B_2C_2$ 组合效果最好, 即培养基中不加NAA, TDZ取 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、CPPU取 $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱导效果最好, 其诱导率可达到46.00%。

2.2 各因素对PLBs增殖率影响的分析

不同组合培养基的PLBs增殖的正交试验结果见表5, 各因素对PLBs增殖质量率影响的极差分析见表6。

表5 不同组合培养基的PLBs增殖结果

Tab. 5 The multiplying effect of PLBs on different combination medium

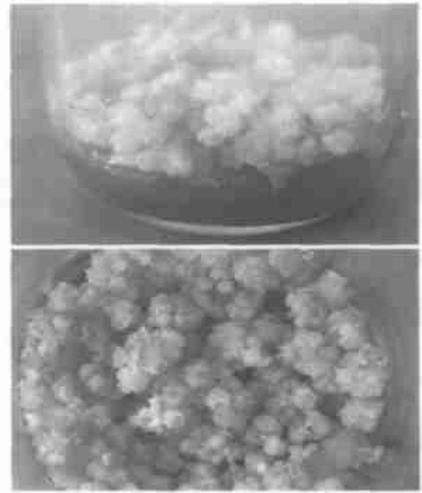
组合号 combination code	$\rho(\text{NAA})/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{BA})/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{蔗糖}$ sucrose)/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	pH	增殖质量率 rate of proliferation/ %
1	0	0	20	5.2	596.65 ± 92.94
2	0	0.2	30	5.6	539.32 ± 52.33
3	0	0.5	40	6.0	332.98 ± 29.84
4	0	1.0	50	6.2	187.32 ± 17.90
5	0.2	0	30	6.0	241.85 ± 17.55
6	0.2	0.2	20	6.2	689.25 ± 38.81
7	0.2	0.5	50	5.2	166.37 ± 10.45
8	0.2	1.0	40	5.6	324.45 ± 43.19
9	0.5	0	40	6.2	244.64 ± 30.47
10	0.5	0.2	50	6.0	232.13 ± 6.19
11	0.5	0.5	20	5.6	756.74 ± 55.50
12	0.5	1.0	30	5.2	237.44 ± 24.36
13	1.0	0	50	5.6	372.64 ± 44.06
14	1.0	0.2	40	5.2	504.25 ± 55.83
15	1.0	0.5	30	6.2	375.65 ± 58.97
16	1.0	1.0	20	6.0	657.32 ± 33.86

表6 各因素对PLBs增殖质量率的极差分析

Tab. 6 Range analysis on rate of mass growth of PLBs for different factors

因素 factors	1	2	3	4	极差 range
A(NAA)	414.07	355.48	367.74	477.47	121.99
B(BA)	363.95	491.24	407.94	351.63	139.61
C(蔗糖 sucrose)	674.99	348.57	351.58	239.62	435.37
D(pH)	376.18	498.29	366.07	374.22	132.22

从表6可以看出, 4个因素对PLBs增殖质量率的影响程度为 $C > B > D > A$, 蔗糖浓度对PLBs增殖质量率影响最大, 极差为435.37, 且各水平差异很明显; 影响程度最小的是NAA, 极差仅为121.99, 且各水平差异不大。从正交试验结果来看, PLBs增殖以 $A_4B_2C_1D_2$ 组合为最好(图2)。

图2 类原球茎体在 $A_4B_2C_1D_2$ 组合培养基上的增殖情况Fig. 2 Proliferation of *Dendrobium nobile* PLBs on medium of $A_4B_2C_1D_2$ combination

2.3 重复试验

在PLBs诱导试验中, 用 $A_1B_2C_2$ 组合配制的培养基来接种金钗石斛的幼嫩茎段, 发现其PLBs诱导率均可达到46%左右, 而在PLBs增殖试验中, 用 $A_4B_2C_1D_2$ 组合配制的培养基接种PLBs进行增殖, 45d后测PLBs增殖质量率, 其平均增殖质量率可达到872.32%, 证实了正交筛选结果。

3 讨论

在培养基的各成分中, 植物生长物质对外植体的脱分化过程有重要的调控作用, 是最重要的影响因素之一, 2种细胞分裂素配合使用或2种以上的激素配合使用, 往往能够更好地促进愈伤组织形成或芽的增殖^[8]。

裂活性的苯基脲衍生物, 它们的细胞分裂素活性比 BA、KT 等嘌呤类化合物要高出许多倍^[9, 10]。Victor^[11]在研究 TDZ 诱导花生 *Arachis hypogaea* 体细胞胚发生时, 发现 TDZ 能引起腺嘌呤、腺苷、玉米素和二氢玉米素物质的积累。Bruce 等^[12]以烟草愈伤组织的最大鲜质量来表示这些化合物的活性大小, 发现在相同条件下 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CPPU 所诱导的愈伤组织生长量是玉米素 ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 2 倍。可见其活性是玉米素的千倍以上^[13]。在预试验中, 笔者发现在离体培养中最常用的细胞分裂素 BA 对金钗石斛类原球茎诱导效果较差, 并且在不断提高浓度时, 诱导效果提高不显著, 负效应表现突出, 外植体极易白化死亡。而 TDZ 和 CPPU 则表现出较好的诱导效果。

利用具高细胞分裂活性的 TDZ 和 CPPU 与 NAA 配合使用, 有效地提高了 PLBs 的诱导率, 但 NAA 在试验中表现出 PLBs 发生的抑制。

影响 PLBs 增殖的因素较多, 如基本培养基、培养方式、蔗糖浓度、天然提取物、植物激素、pH 值等。对石斛 PLBs 增殖条件的研究报道较多^[12, 13], 周根余等^[14]研究了影响铁皮石斛原球茎生长的若干因素, 进行了大量的单因子试验, 但生长率最高仅达到 315.9%, 远低于笔者试验中 756.74% 的增殖率, 并且无法了解因子之间的相互作用。引入正交设计, 有效降低了多因子试验的工作量, 有效地扩大了培养基的筛选范围, 更好地了解因子间的相互作用, 使试验筛选更加有效。

孙廷等^[4]和宋锡全等^[5]在近年都报道了金钗石斛离体培养的工作, 然而都未涉及类原球茎体的诱导, 其方式是通过茎段再生植株, 再进行增殖。由于未进行类原球茎体的诱导, 植株的增殖倍数往往较低。笔者的工作重点在于类原球茎体的诱导和增殖。由于类原球茎体的增殖倍数极高, 对于快繁过程中提高效率和降低成本都具有重要的价值。

参考文献:

- [1] 唐树梅, 陈雪华, 饶义平. 营养胁迫对石斛兰植株形态和叶表面微结构的影响[J]. 电子显微学报, 1999, 18(5): 503-506.
- [2] 王琳, 叶庆生, 刘伟. 金钗石斛研究概况[J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(2): 73-76.
- [3] 高培元, 陈健妙, 甘铨. 金钗石斛的茎段组织培养与植株再生[J]. 中草药, 2002, 33(11): 1031-1033.
- [4] 孙廷, 杨玉珍, 胡如善. 金钗石斛的组织培养和快繁技术[J]. 河南科技大学学报(农学版), 2004, 24(3): 35-37.
- [5] 宋锡全, 宋琴曲. 金钗石斛茎段培养再生绿色植株[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2003, 21(3): 80-82.
- [6] 张艳, 范俊安, 李泉森, 等. 金钗石斛培养初步研究[J]. 资源开发, 2001, 12(3): 189-190.
- [7] 徐红, 王峥涛, 丁家宜, 等. 药用石斛生物技术的研究概况[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(1): 1-4.
- [8] KERNS H R, MEYER M J R. Tissue culture propagation of *Acer X freemanii* using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation[J]. Hortsci, 1986, 21(5): 1209-1210.
- [9] 侯勇, 马国瑞, 夏中梅, 等. CPPU 研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 1999, 5(2): 106-114.
- [10] 陈肖英, 叶庆生, 刘伟. TDZ 研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(3): 59-63.
- [11] VICTOR J M R. Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L)[J]. Plant Growth Regulation, 1996, 28: 41-47.
- [12] BRUCE M I, ZWAR J A. Cytokinin activity of some substituted urea and thioureas[J]. Proc Roy Soc, 1966, 165: 245-265.
- [13] 张铭, 朱峰, 魏小勇, 等. 铁皮石斛种胚萌发和原球茎质量控制[J]. 浙江大学学报(理学版), 2000, 27(1): 92-94.
- [14] 周根余, 谢薇, 程磊. 影响铁皮石斛原球茎生长的若干因素[J]. 江西科学, 1999, 17(4): 231-235.

【责任编辑 李晓卉】