

DOI:10.11937/bfyy.201612041

金钗石斛叶艺性状保持及丛生芽增殖研究

杨 澜¹, 刘鹏飞², 王爱华¹, 许红娟¹, 谢双萍¹, 陈之林¹

(1. 贵州省园艺研究所, 贵州 贵阳 550006; 2. 贵州省亚热带作物研究所, 贵州 兴义 562400)

摘 要:以金钗石斛稳定的叶艺个体(植物嵌合体)茎段作为外植体, 1/2MS 为基本培养基, 采用单因素试验研究了不同植物生长调节剂及浓度水平对茎段腋芽处的丛生芽增殖效果。结果表明:通过茎段增殖方式, 各处理均能较好的保持丛生芽的叶艺性状, 保持率均在 87.2% 以上; 植物生长调节剂的不同处理水平对金钗石斛腋芽处丛生芽的增殖均有不同程度的促进作用。该试验中, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 较适合金钗石斛茎段丛生芽的诱导; 6-BA 较 KT、TDZ 更适合金钗石斛茎段丛生芽的生长培养, 其中 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 效果最好。

关键词:金钗石斛; 叶艺个体; 增殖; 丛生芽

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)12-0166-05

金钗石斛属兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium* Sw.) 多年生附生草本植物, 以其茎入药, 具益胃生津、滋阴清热等功效, 是常用传统名贵中药材。长期以来, 国内对石斛研究主要集中在药用成分方面^[1-4]。金钗石斛花及茎叶均可作为主要的观赏性状, 其花色艳丽, 花量丰富, 花姿优美, 具有很高的观赏价值。兰花(包括国兰和洋兰)中有一类观赏性很高的植物嵌合体(plant chimera)品种, 称之为叶艺兰, 该类植物的茎尖分生组织由 2 种或 2 种以上遗传型不同的细胞组成, 并由这些细胞共同发育成的完整植株, 不同于杂种。在嵌合体中, 含有不同遗传物质的 2 种细胞并没有发生融合, 仅仅是一种嵌合状态^[5]。课题组在组织培养过程中筛选到的金钗石斛嵌合体个体具有很高的观赏价值, 但数量较少, 且常规的繁殖方式容易导致叶艺性状的丢失。有研究指出利用组织培养技术对金钗石斛进行无性快速繁殖, 可在短期内提供大量试管苗^[6]。大多数双子叶植物和部分单子叶植物, 其顶端分生组织由 3 个细胞原层组成, 最外层为 LI, 中间层为 LII, 最内层为 LIII^[7]。植物嵌合体茎尖分生组织保持稳定的嵌合状态是嵌合体稳定

传递的保障, 可以通过无性繁殖方法进行植物嵌合体繁殖, 特别是利用组织培养技术经腋芽诱导途径可以长期保存和繁殖嵌合体, 而通过有性繁殖方式无法达到有效保存和繁殖嵌合体的目的^[8]。该试验以金钗石斛叶艺个体(植物嵌合体)的茎段作为外植体, 通过设计单因素试验, 研究 3 种植物生长调节剂 6-苄基嘌呤(6-Benzylaminopurine, 6-BA)、激动素(kinetin, KT)、噻苯隆(thidiazuron, TDZ)的不同浓度对金钗石斛茎段腋芽的诱导效果, 筛选适合丛生芽增殖的植物生长调节剂及浓度, 以期能在组培生产上获得大量植物嵌合体的组培苗, 进而获得商业价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为多代稳定增殖的金钗石斛(*Dendrobium nobile*)叶艺组培苗, 以其茎段作为外植体进行茎段丛生芽的诱导增殖。

1.2 试验方法

取相同培养条件下生长状态基本一致的金钗石斛叶艺无菌苗, 切割成含有 3~4 节的茎段, 以 1/2MS 作为基础培养基, 分别附加 6-苄基嘌呤(6-Benzylaminopurine, 6-BA)、激动素(kinetin, KT)、噻苯隆(thidiazuron, TDZ), 每种植物生长调节剂设置 4 个浓度梯度, 设置 1 组对照, 共 13 个处理。每处理接种 3 瓶, 每瓶接 3 个外植体, 试验重复 3 次。各培养基均加入蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.4。培养条件: 温度 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 光照 $1\,000 \sim 1\,500 \text{ lx}$, 光照时间 $11 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。定期观察并记录。

第一作者简介:杨澜(1990-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为花卉分子生物学。E-mail: 281806994@qq.com.

责任作者:陈之林(1974-), 男, 博士, 副研究员, 现主要从事花卉遗传育种等研究工作。E-mail: chenzhilin@126.com.

基金项目:贵州省科技农业攻关计划资助项目([黔科和]NY 字[2012]3032 号); 贵州省农科院院专项资助项目([2010]026 号); 贵阳市院地合作资助项目(农科合字[2014]9 号)。

收稿日期:2015-12-18

表 1 丛生芽诱导培养基

Table 1 Induction medium of multiple shoots

处理	植物生长调节剂种类及浓度
Treatment	Type and concentration of plant growth regulators/(mg · L ⁻¹)
处理 1	6-BA 0.5
处理 2	6-BA 1.0
处理 3	6-BA 2.0
处理 4	6-BA 5.0
处理 5	KT 0.05
处理 6	KT 0.10
处理 7	KT 0.50
处理 8	KT 1.00
处理 9	TDZ 0.1
处理 10	TDZ 0.2
处理 11	TDZ 0.5
处理 12	TDZ 1.0
对照 CK	—

1.3 项目测定

不同植物生长调节剂诱导丛生芽增殖处理 60 d 后,统计金钗石斛丛生芽增殖率及其叶艺芽的数量,150 d 后统计苗高。增殖系数=增殖芽数(个)/诱导出丛生芽的腋芽数目(个);叶艺保持率(%)=带叶艺性状丛生芽数量(个)/丛生芽总数量(个);平均苗高(cm)=同一处理苗高之和(cm)/苗数量(个)。取金钗石斛茎段上已生长 60 d 并带叶艺的丛生芽,移入 1/2MS+0.5 mg · L⁻¹ NAA 培养基中进行成苗培养,培养条件同上。

1.4 数据分析

采用 Excel 处理试验数据,SAS 9.0 软件 Duncan 氏法对不同激素处理后的丛生芽增殖效果进行差异显著

表 2 不同植物生长调节剂处理对金钗石斛丛生芽增殖的影响

Table 2 Regeneration effect of *Dendrobium nobile* by multiple shoots treat with different plant growth regulators

处理	诱导出丛生芽的腋芽数目	丛生芽数	叶艺芽数	增殖系数	叶艺保持率
Treatment	Induced number of multiple shoots/个	The number of multiple shoots/个	The number of chimera shoots/个	Multiplication coefficient	Retention rate of chimera/ %
处理 1	12	27	27	2.25	100.0
处理 2	25	47	43	1.88	91.5
处理 3	21	49	44	2.33	89.7
处理 4	32	78	68	2.44	87.2
处理 5	7	14	13	2.00	92.9
处理 6	18	42	40	2.33	95.2
处理 7	11	25	25	2.27	100.0
处理 8	10	21	19	2.10	90.5
处理 9	16	44	40	2.75	90.9
处理 10	40	94	93	2.35	98.9
处理 11	18	44	41	2.44	93.2
处理 12	10	24	20	2.40	89.9
对照 CK	10	12	10	1.20	83.3

由图 1 可知,不同植物生长调节剂诱导金钗石斛茎段腋芽处生长出叶艺性状明显的丛生芽,其叶片中间为黄色,边缘为绿色,颜色对比明显。从图 2 可以看出,金钗石斛茎段诱导处理 60 d 后,3 种植物生长调节剂诱导

性检验。

2 结果与分析

2.1 金钗石斛茎段丛生芽增殖

将切好金钗石斛带腋芽的茎段接种在添加了 6-BA 培养基中,接种后 7 d 就发现开始出现少量腋芽,60 d 后出现丛生芽,待丛生芽长出 3~4 片新叶,统计丛生芽的增殖率。由表 2 可知,在 6-BA 的 4 个处理中,处理 2 (1.0 mg · L⁻¹ 6-BA)的丛生芽增殖系数最低(1.88),随着 6-BA 浓度增加,增殖系数不断增加,处理 4 (5.0 mg · L⁻¹ 6-BA)诱导出丛生芽的腋芽数目为最多(32 个),其丛生芽的增殖系数也达到最大值(2.44),但叶艺保持率较低,增殖的丛生芽虽多却弱。

KT 的 4 种浓度处理中,以 0.10 mg · L⁻¹ KT(处理 6)诱导金钗石斛茎段丛生芽的增殖效果最佳,增殖系数为 2.33,但叶艺保持率却不是最高。随着浓度水平的增加,其增殖系数会逐渐下降,KT 浓度过高或者过低都会影响金钗石斛丛生芽的增殖数量。

TDZ 具有很强的细胞分裂活性,在培养基中添加适宜浓度的 TDZ,可以强烈促进侧芽及不定芽的发生^[9]。从表 2 可以看出,不同浓度 TDZ 对于诱导金钗石斛丛生芽增殖的促进作用存在着一定的差异。0.1 mg · L⁻¹ TDZ(处理 9)诱导丛生芽增殖为 13 个处理中最佳处理,增殖系数最大(2.75)。TDZ 浓度增大会在一定程度上抑制丛生芽的增殖。

丛生芽增殖的效果明显优于无激素处理,且丛生芽的叶艺性状保持率较高:6-BA 92.1%,KT 96.4%,TDZ 95.8%。差异性显著分析发现,不同处理诱导茎段丛生芽增殖的效果与对照 CK 间效果差异显著($P<0.05$)。

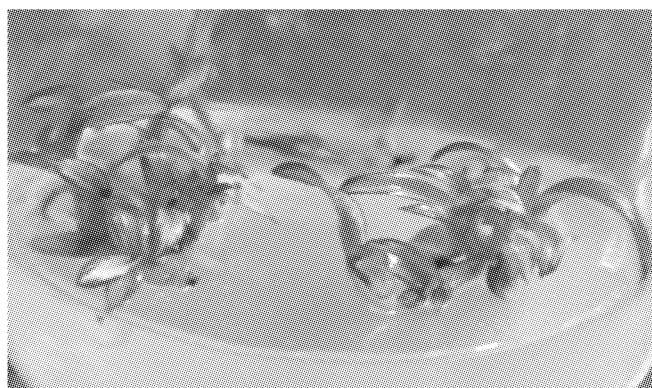


图1 金钗石斛叶艺嵌合体

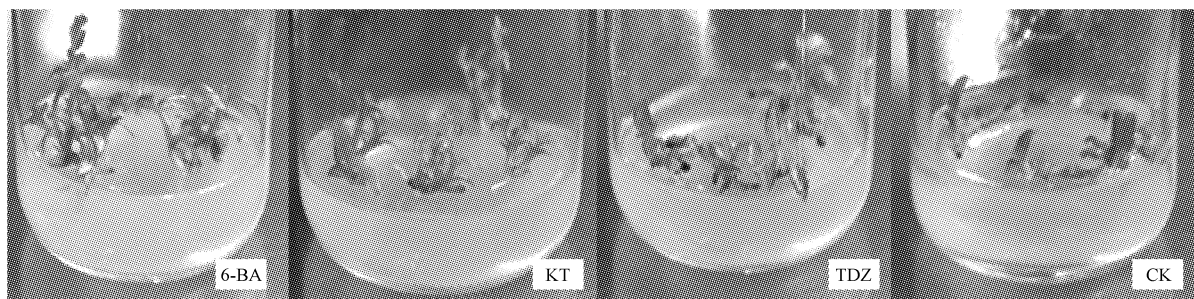
Fig. 1 *Dendrobium nobile* chimera

图2 不同植物生长调节剂处理 60 d 后的丛生芽增殖情况

Fig. 2 Propagation of *Dendrobium nobile* by multiple shoots treat with different plant growth regulators after 60 days

2.2 金钗石斛茎段丛生芽苗的生长情况

切取金钗石斛茎段上叶艺芽接入育苗培养基。新的培养基上培养 90 d 后统计不同植物生长调节剂处理金钗石斛丛生芽苗的株高和根长, Duncan 多重比较分析发现不同处理间的结果差异显著(表 3)。但丛生芽苗根多细长、茎节间较长且叶片狭长。TDZ 处理结果却与之相反, 茎节间缩短变粗, 叶伸展宽大, 但根生长慢甚至难生根。该试验中, 经过 6-BA 处理过的金钗石斛丛生芽在成苗培养中株高和根长均小于 KT, 但其根多且粗短、茎粗壮, 生长状况均优于 KT、TDZ 及空白对照。6-BA 的 4 个浓度梯度中又以处理 3(6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 效果最佳(表 4)。

表 3 金钗石斛丛生芽苗株高及根生长量的多重比较

Table 3 Multiple comparisons of *Dendrobium nobile* multiple shoots height and root length

指标	6-BA	KT	TDZ	对照
Index	6-Benzylaminopurine	Kinetin	Thidiazuron	CK
株高 Height	2.84b	4.65a	0.51c	2.85b
根长 The root length	3.32c	4.90a	2.27d	3.98b

注: 同行不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same line show significant difference at 0.05 level.

表 4 不同处理下金钗石斛丛生芽的生长状况

Table 4 The growing of *Dendrobium nobile* by multiple shoots treat with different plant growth regulators

处理	株高	根长	根生长情况
Treatment	Height/cm	The root length/cm	The growth of root
处理 1	2.91e	2.58c	根多, 短粗
处理 2	3.50d	2.42c	根多, 短粗
处理 3	4.01cd	3.92b	根多, 短粗
处理 4	2.85ef	2.44c	根多, 短粗
处理 5	4.53bc	4.38ab	根多, 细长
处理 6	4.99ab	4.40ab	根多, 细长
处理 7	4.85ab	4.77a	根多, 细长
处理 8	5.25a	5.04a	根多, 细长
处理 9	2.38efg	0.63d	根极少
处理 10	2.27fg	0.56d	根极少
处理 11	2.23g	0.46d	根极少
处理 12	2.15g	0.38d	根极少
对照 CK	4.17c	2.90c	根少

3 讨论与结论

植物嵌合体在观赏植物育种上的应用价值前景广阔, 因为嵌合体在植物花瓣和叶片的形状、大小和颜色上有很大的变化空间, 对丰富观赏植物的种类和提高植物的观赏性很有价值。因此, 植物嵌合体倍受花卉育种者的追捧, 也是花卉育种者追逐的目标之一^[10-11]。嵌合

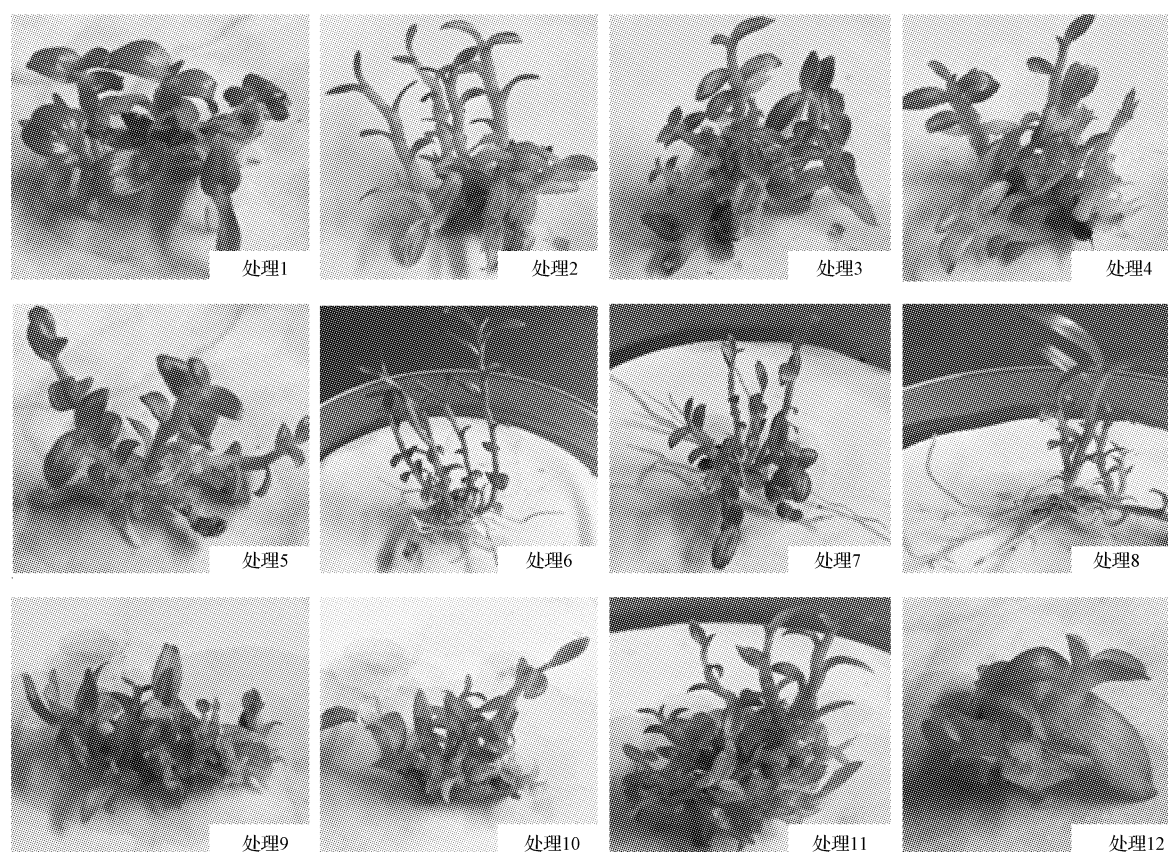


图3 不同植物生长调节剂处理 120 d 后的丛生芽增殖情况

Fig. 3 Propagation of *Dendrobium nobile* by multiple shoots treat with different plant growth regulators after 120 days

体的特征一般只表现在部分器官,且只能靠无性繁殖保留嵌合体特性^[12]。稳定性是任何一种作物作为商业品种的关键因素^[13]。该研究以金钗石斛增殖了多代且叶艺性状稳定的叶艺个体茎段为外植体,直接诱导腋芽萌发,并通过丛生芽的方式增殖,不仅取材方便直接,且较好的保持了嵌合体性状。植物生长调节剂对器官的分化调节起着重要作用,6-BA 能够促进植物芽的分化、侧芽的生长^[14]。该研究表明,6-BA 对增殖系数、株高及根长均有显著影响,6-BA 浓度为 $1.0 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着质量浓度的增高,丛生芽增殖率随之增大(表 2),这与刘莉等^[15]的研究结果相似。 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA(处理 3)处理后的叶艺丛生芽经过成苗培养后,其芽苗的生物增长量均高于 6-BA 的其它浓度处理。KT 在植物组织培养中具有促进生根的作用, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT(处理 8)处理后,丛生芽苗的株高及根长均为 13 个处理中的最大值,且与其它处理差异极显著($P < 0.01$),但芽苗茎节间细长,叶片狭长且根细长,芽苗并不健壮,不利于后期的出瓶移栽。TDZ 具有很高的细胞分裂素活性,不仅能促进芽繁殖,还有利于芽的再生^[16]。 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ(处理 9)诱导金钗石斛茎段的丛生芽增殖系数为所有处

理中的最高的。差异性检验结果表明,不同植物生长调节剂处理之间,茎段丛生芽的增殖系数差异性显著($P < 0.05$),叶艺性状保持率差异并不显著($P > 0.05$)。TDZ 诱导茎段的丛生芽增殖系数显著高于 6-BA 和 KT。但高浓度的 TDZ 使得植物细胞长时间保持较高的分裂、分化能力,诱导丛生芽多、矮小且根长的较慢,质量显著降低。无植物生长调节剂的对照处理(CK),其茎段的丛生芽增殖系数(1.20)明显低于添加了植物生长调节剂的处理,对照 CK 的芽萌发时间也晚于处理。试验结果表明,虽然 6-BA、KT 与 TDZ 都具有促进丛生芽增殖的作用,但不同的植物种类在离体培养中偏好的激素种类有所不同,这与孟志霞等^[17]、赵元增等^[18]的研究结果相同。

综上所述,培养基中添加一定量的植物生长调节剂有利于金钗石斛叶艺茎段的丛生芽诱导。当培养基中无激素时,腋芽难萌发或萌发数量较少。该试验中,添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 的处理丛生芽诱导率最高,6-BA 较 KT、TDZ 更适合金钗石斛茎段丛生芽的生长培养,其中 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的效果最佳。各处理间的叶艺性状保持率差异不显著($P > 0.05$),均能较好的保持丛生芽的叶艺性状。

参考文献

- [1] 李满飞,徐国钧,吴厚铭,等.金钗石斛精油化学成分研究[J].有机化学,1991(11):219-224.
- [2] 王康正,高文远.石斛属药用植物研究进展[J].中草药,1997,28(10):633-635.
- [3] 邓银华,徐康平,谭桂山.石斛属植物化学成分与药理活性研究进展[J].中药材,2002,25(9):677-680.
- [4] LAVARACK B, HARRIS W, STOCKER G. *Dendrobium* and its relatives[M]. England: Workman Pub Co, 2002:14.
- [5] 任跃英.药用植物育种学[M].北京:中国农业出版社,2011.
- [6] 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.
- [7] SATINA S, BLAKESLEE A F, AVERY A G. Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras[J]. Am J Bot, 1940, 27: 895-905.
- [8] 朱雪云,陈利萍.植物嵌合体的研究与应用[J].核农学报,2010,24(6):1185-1191.
- [9] 谢寅峰,张志敏,尚旭岚,等.青钱柳茎段腋芽萌发和丛生芽增殖[J].林业科学,2011,47(1):1777-1780.
- [10] 李明银,何云晓.植物遗传嵌合体及其在观赏植物育种中的应用[J].植物学通报,2005,22(6):641-647.
- [11] 栗茂腾,余龙江,王丽梅,等.菊花花色遗传及花色嵌合体发现[J].遗传,2005,27(6):948-952.
- [12] 李天非.典型植物嵌合体:鸡冠花嵌合体的遗传学研究[D].武汉:湖北大学,2002.
- [13] BURGE G K, MORGAN E R, SEELYE J F. Opportunities for synthetic plant chimeral breeding, past and future[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2002, 70: 13-21.
- [14] SONG J T, CHOI J N, SONG S I, et al. Identification of a potexvirus in Korean garlic plants[J]. Agricultural Chemistry and Biotechnology, 1995, 38(1):55-62.
- [15] 刘莉,李智敏,李晚谊.金钗石斛的研究进展[J].云南大学学报(自然科学版),2009,31(SD):509-513.
- [16] 宋晓娣,陈建华.红哺鸡竹丛生芽诱导的初步研究[J].湖南林业科技,2009,36(1):18-20.
- [17] 孟志霞,郭顺星,于雪梅,等.植物生长调节剂对福建金线莲丛生芽增殖的影响[J].中国药理学杂志,2008,43(23):1777-1780.
- [18] 赵元增,杨靖,孙海燕.不同激素配比对太行菊不定芽增殖与生长的影响[J].河南科技学院学报,2015,43(3):16-20.

Research of Keeping Leaf Chimera and Proliferation of Multiple Shoots on *Dendrobium nobile*

YANG Lan¹, LIU Pengfei², WANG Aihua¹, XU Hongjuan¹, XIE Shuangping¹, CHEN Zhilin¹

(1. Horticulture Research Institute of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550006; 2. Subtropical Crops Research Institute of Guizhou Province, Xingyi, Guizhou 562400)

Abstract: The stem segment of *Dendrobium nobile* with axillary buds were used as explants and cultured on 1/2MS medium. Effects of the different concentration of different plant growth regulators on the propagation of the buds were studied by the single factor experimental. The results showed that each treatment could better keep the plant be chimeras traits by propagation through the stem, keeping rates was above 87.2%; all treatments promoted propagation of multiple shoots to some degree. 0.1 mg · L⁻¹ of TDZ had a significant impact on induction of multiple shoots. 6-BA in comparison with KT and TDZ was more suitable for growth of multiple shoots of *Dendrobium nobile* and 2.0 mg · L⁻¹ 6-BA was recommendable for bud growing in this experiment.

Keywords: *Dendrobium nobile*; variegation; propagation; multiple shoots

“镰刀弯”政策科普系列(三)

“镰刀弯”地区玉米结构调整意见(二):

知识窗

“镰刀弯”地区玉米结构调整的思路目标和重点任务

- 指导思想** 以市场需求为导向、以提质增效为目标,坚持生态保护优先,强化政策扶持,依靠科技创新,加强信息引导,尊重农民意愿,加快构建“镰刀弯”地区粮经饲统筹、农牧结合、种养加一体、产业融合的现代农业生产体系,着力提高农产品市场竞争力,走产出高效、产品安全、资源节约、环境友好的可持续发展之路。
- 基本原则** 坚持因地制宜,做到有压有保;坚持市场导向,尊重农民意愿;坚持多业并举,推进产业融合;坚持

创新驱动,促进提质增效;坚持着眼全球,确保产业安全。

3. 重点任务 构建时空匹配的布局结构;构建用养结合的种植结构;构建农牧结合的种养结构;构建产加销结合的产业结构。

4. 技术路径 适宜性调整;种养结合型调整;生态保护型调整;种地养地结合型调整;有保有压调整;围绕市场调整。
(摘自:农业部官方网站)