

铁皮石斛优质试管苗繁育技术研究

周 丽¹, 王 苑¹, 叶元婷¹, 徐正海²

(1. 兴义民族师范学院 民族药用生物资源研究与开发重点实验室, 贵州 兴义 562400;

2. 黔西南州绿缘动植物科技开发有限公司, 贵州 兴义 562400)

摘 要:以野生铁皮石斛为试材, 采用限根培养法, 研究了铁皮石斛种子非共生萌发特性及优质试管苗繁育技术。结果表明:授粉 120 d 的种子达到生理成熟, 能够顺利萌发;授粉 140 d 种子达到形态成熟, 萌发率可达 98.51%;低温黑暗限制保存原球茎可控制其生长;在特定容器中用限根培养基 $MS+0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+$ 香蕉泥 $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养小苗可得到优质试管苗;把试管苗移栽到松树皮中, 成活率可达 97.62%, 该研究为铁皮石斛产业化育苗提供了新方法。

关键词:铁皮石斛;种子;非共生萌发;优质试管苗

中图分类号:S 567.21⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)10-0095-05

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 属兰科石斛属(*Dendrobium* Sw.) 多年生草本植物, 是名贵药用植物, 因其成株的节处未被叶鞘包被呈现紫黑色, 民间采药人称之为“黑节草”。铁皮石斛药用历史悠久, 在《神农本草经》中记载, 在《本草纲目》中被称为上品, 历代对其功效有详细记载。铁皮石斛性味甘, 微寒, 归胃、肾经;具有益胃生津、滋阴清热的功效, 主治干烦渴, 胃阴不足, 食少干呕、病后虚热不退, 劳热, 目暗不明, 筋骨痿软^[1]。现代药理研究和临床表明, 铁皮石斛适用于慢性萎缩性胃炎、高血压、糖尿病等病症, 具有抗肿瘤、抗衰老等作用^[2]。在自然条件下铁皮石斛种子萌发量少且速度慢, 野生数量的增加主要依靠分蘖繁殖, 繁殖系数极低;由于鸟虫喜食和人类无节制的采挖, 铁皮石斛在野外已濒临灭绝。目前, 国内大规模的人工栽培种苗来源于组培育苗。

20 世纪末, 随着植物组织培养技术的发展, 许多研究者开始进行铁皮石斛的组培育苗技术探究, 研究的内容有茎段快繁、丛生芽增殖、原球茎增殖、愈伤组织诱导、种子萌发等^[3-11], 虽然能够生产出大量生产所需的试管苗, 但是存在着定苗生根培养后, 试管苗的根系缠绕

在培养瓶底部, 盘根错节的根错综复杂交结在一起, 试管苗生长较弱(图 1A), 出瓶时伤根、伤叶, 导致成活率降低的现象, 另外由于出瓶和移栽的操作不便, 导致费时费力, 又增加了生产中劳动力成本支出, 所以对铁皮石斛试管苗生产技术进行创新, 简化育苗步骤, 提高幼苗质量对铁皮石斛生产有重要意义, 关于商业化的优质试管苗繁育技术创新尚鲜见报道。现研究了铁皮石斛种子非共生萌发特性, 简化育苗步骤, 采用限根培养法壮苗, 以期对铁皮石斛的产业化生产提供优质试管苗。

1 材料与方法

1.1 试验材料

兴义市则戎乡产的野生铁皮石斛, 用松树皮栽培于大棚内, 开花 5~7 d 内进行人工授粉, 加强水肥管理, 确保果实顺利成长。取不同时期的果实进行播种, 播种时剪取果实, 用 75% 酒精擦拭果实表面后, 置于 0.2% 升汞中处理 15 min, 再用无菌水冲洗 3 遍, 于无菌滤纸上切开蒴果, 将种子撒播于培养基上。

播种培养基:1/2MS 培养基, 加入 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, $7.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂粉, $100\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 椰子乳, $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉泥, pH 5.7, 种子在低盐、无生长调节剂的培养基中萌发效果好。

1.2 试验方法

1.2.1 不同培养条件对种子萌发的影响 为探究铁皮石斛种子的萌发特性, 设置了 4 种不同培养条件(表 1), 观察其对授粉后 140 d 种子萌发的影响(由于黑暗 4 ℃ 时种子处于一个相对静止状态, 所以该研究使用的是在光照 25 ℃ 条件下培养了 16 d 已启动萌发的原球茎)。

第一作者简介:周丽(1978-), 女, 贵州兴义人, 硕士, 副教授, 现主要从事植物组织培养及植物资源保育与开发利用等研究工作。E-mail:zhouli@xynun.edu.cn.

基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项资金资助项目(黔省专合字(2012)86 号);贵州省教育厅 2011 年教育质量提升资助项目(黔教高发[2011]278 号);贵州省教育厅教育创新团队资助项目(黔教合人才团队[2013]30 号)。

收稿日期:2015-12-30

种子萌发过程中观察种子形态变化,统计萌发率、分化率等指标。萌发率的统计在培养瓶内4个对角位置,挑取一定量种子放在载玻片上,于显微镜下观察种子萌发情况,胚膨大突破种皮者视为萌发,萌发率(%)=(观察到的萌发种子数/观察到的种子总数)×100;分化的标准为原球茎的形态学下端分化出指状突起物,形态学上端分化出第一片小叶,分化率(%)=(观察到的分化原球茎数/观察到的原球茎数)×100。

表1 种子培养条件

Table 1 Culture conditions of seeds

处理 Treatment	培养条件 Culture conditions
T1(光照 25℃)	光照时间 12 h·d ⁻¹ ,光照强度 1 500 lx;温度(25±2)℃
T2(光照 15℃)	光照时间 12 h·d ⁻¹ ,光照强度 1 500 lx;温度(15±2)℃
T3(黑暗 25℃)	光照时间 0 h·d ⁻¹ ,光照强度 0 lx;温度(25±2)℃
T4(黑暗 4℃)	光照时间 0 h·d ⁻¹ ,光照强度 0 lx;温度 4℃

1.2.2 限根培养法培养基的筛选 探究培养基内总物质含量对生根壮苗的影响,培养成分:MS培养基加入蔗糖 30 mg·L⁻¹、香蕉泥 80 g·L⁻¹、6-BA 0.3 mg·L⁻¹、NAA 0.6 mg·L⁻¹、琼脂粉 7.2 mg·L⁻¹,pH 5.7,制成 Z1 培养基,然后除琼脂粉含量不变外其它各种物质相应依次减半制成 Z2~Z5 培养基,形成一种类似于培养基中的物质被培养物逐渐消耗的梯度。另以 MS 为基本培养基,加入蔗糖 30 mg·L⁻¹、琼脂粉 7.2 mg·L⁻¹、香蕉泥 80 g·L⁻¹、pH 5.7,加入不同浓度的 NAA 和 6-BA,制成限根培养基,并用滤纸将培养瓶底部分隔成 16 个小区域,进行限根培养。将分化后具有 3~4 条根、3~4 片叶的小苗接种到相应的培养基中,每瓶 16 株苗,每种培养基接 10 瓶,培养 60 d 后观测试管苗质量。

1.2.3 练苗与移栽 定苗限根培养 80 d 后,将培养瓶转到室内或大棚中打开瓶盖,练苗 5~7 d,在培养基上长出菌斑前取出试管苗,洗净根部培养基,待试管苗表面水分蒸发,根表面微微发白时栽入塑料筐内(栽培所用松树皮或杉木块,用沸水煮 1 h 消毒),加强水分和光照管理,50 d 统计移栽成活率和生长状况,成活率(%)=(成活苗数/移栽苗数)×100。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛种子萌发特性

铁皮石斛授粉后果实生长发育较快,120 DAP(days after pollination)种子便已经达到生理成熟,播种后能够顺利萌发;140 DAP 种子生理和形态均成熟,种子播种后启动萌发早,萌发速度快;140 DAP 后至 170 DAP(蒴果开裂前)种子均能保持较高的萌发率。140 DAP 的种子(图 1B)长 0.281 3~0.375 2 mm,种子内球形胚呈浅黄色,球形胚长 0.162 5~0.187 5 mm、宽 0.081 3~0.096 9 mm,球形胚占据种皮内的大部绝大部分空间,种子的翅很短,种皮薄而透明。

光照 25℃条件下,播种 7 d 后可见球形胚吸水横向膨大,形成近等径的圆形(图 1C),膨大率达 91.11%,有极少种子突破种皮开始萌发;播种 28 d 后(图 1D)球形胚冲出种皮长成 0.231 5~0.358 8 mm 的球体,球体一端长出许多指状突起(图 1E),另一端开始分化第 1 片小叶的叶尖,萌发率达 74.43%;播种 47 d 后(图 1F)绝大部分原球茎均分化出第 1 片小叶原基,根部的指状突起长得更多更长,萌发率高达 98.51%;播种 110 d 后原球茎分化后较整齐生长(图 1G),长成具有 3~4 条根、3~4 片叶的小苗(图 1H),分化率为 96.37%。

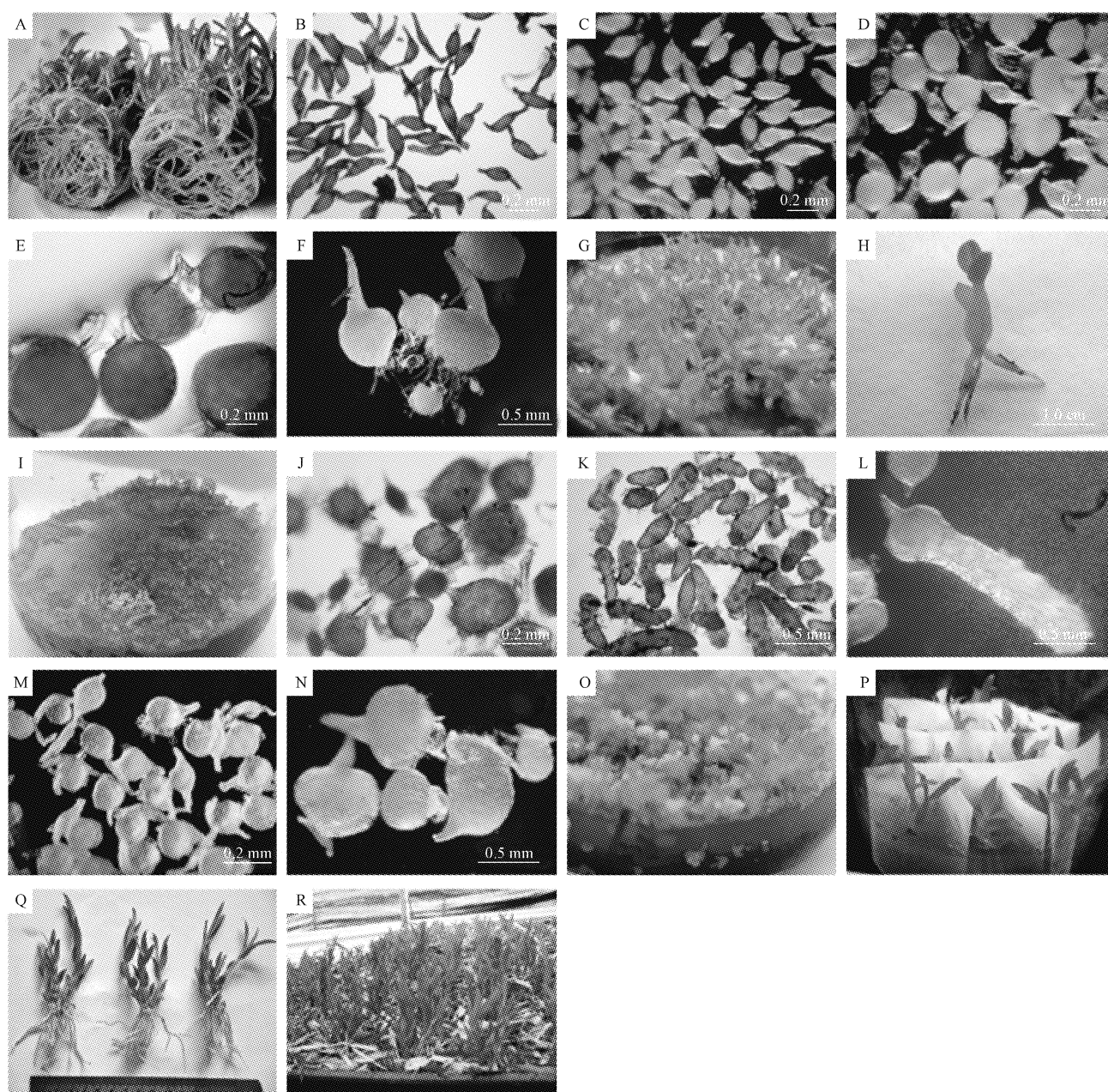
在光照 15℃条件下,种子萌发过程与光照 25℃条件下相似,但是由于温度较低种子萌发、分化速度较慢,培养 204 d 时仍然处于原球茎分化小叶的早期阶段(图 1I),分化率仅为 43.29%。

在黑暗 25℃条件下,种子能够快速萌发,萌发率高,培养到 28 d 时,种子萌发形成的白色原球茎不会转绿,形成的指状突起物分布位点多(图 1J);继续黑暗培养到 56 d 时,可见原球茎长成长柱形,除形态学上端外,其余部位分布着许多指状突起物,没有见到叶的分化(图 1K);培养 71 d 后将原球茎转入光照 25℃条件下培养 2 d 便可见形态学上端开始转绿并分化第 1 片小叶的叶尖(图 1L);见光培养 18 d 顶端部膨大成圆球形,小叶渐大,随着培养时间增加,能够分化成苗;但是如果黑暗培养超过 120 d 后才转入光照下培养的话,顶端部分球体能够转绿,但其下部会白化死亡无法分化出根,总体较难分化成苗。

将光照 25℃条件下培养了 16 d 已启动萌发的原球茎保存于黑暗 4℃条件,原球茎处于生理活动几乎停止状态,保存 174 d 的原球茎仍然与刚低温保存时萌发程度相似(图 1M),将其转入光照 25℃条件下培养 20 d 便可恢复生长(图 1N),培养 60 d 便可分化出可定苗培养的小苗(图 1O)。

2.2 培养基中内总物质含量对壮苗的影响

铁皮石斛种子萌发和分化过程均在种子接种密度较大时表现优良,如果一瓶培养基内接种的种子数较少,则萌发和分化速率均会下降,似乎有一种群体效应。在壮苗培养中如果接种小苗数过多则会导致试管苗生长弱、根系多而缠绕等不良结果,所以在保证定苗数量的情况下减少培养基中总物质含量,观察小苗生长的表现(表 2)。接种时小苗大小较为一致,均为有 2 个短小的节,3 片小叶,3 条 0.8 cm 小根,在 Z1~Z5 培养基中培养 60 d 后成苗差异很大,Z1 和 Z2 中成苗质量好,而 Z3~Z5 中幼苗弱,质量差无法用于生产,因此种子萌发和分化时需要较高的接种密度是由于其种子萌发时的群体效应,而不是要求培养基中无机盐等物质的浓度在较低水平,壮苗生根过程中培养基中各种物质含量不能过低,以 Z1 和 Z2 培养基为好。



注:A,根系缠绕的组培苗;B,成熟种子;C,播种7 d膨大的种子;D,萌发形成的球体;E,球体上的指状突起物(箭头处);F,刚分化形成的小叶原基(箭头处);G,播种110 d分化整齐的小苗;H,播种110 d形成的小苗;I,15 °C限温培养204 d时生长状况;J,25 °C黑暗培养28 d形成的多指状突起物(箭头处)原球茎;K,25 °C黑暗培养56 d形成的长柱形圆球茎;L,25 °C黑暗培养71 d后光照2 d顶端形成的绿色原球茎;M,4 °C黑暗抑制生长培养174 d的原球茎;N,4 °C黑暗培养174 d转入25 °C培养20 d的生长情况;O,4 °C黑暗培养174 d转入25 °C培养60 d长成可定苗培养的小苗;P,限根培养容器;Q,优质丛生试管苗;R,试管苗移栽。

Note: A, Circling roots of plantlets; B, The mature seeds; C, The expanding seeds after sows 7 days; D, Germination seeds grown into globules; E, The digitate vesicular aerifera on globule (the arrow); F, The differentiation leaf primordium (the arrow); G, The differentiation plantlets after sows 110 days; H, The differentiation plantlets after sows 110 days; I, The globules growth situation at 15 °C (temperature restriction) after sows 204 days; J, The digitate vesicular aerifera grown at 25 °C and dark condition after sows 28 days (the arrow); K, The columniform protocorms grown at 25 °C and dark condition after sows 56 days; L, The green protocorms grown at 25 °C and dark condition 71 days then transform into lighting conditions 2 days; M, The protocorms grown at 4 °C and dark condition after culture 174 days; N, Growth situation at 4 °C and dark condition 174 days then transform into 25 °C and lighting condition 20 days; O, Plantlets at 4 °C and dark condition 174 days then transform into 25 °C and lighting condition 60 days; P, The root restrictions container; Q, High quality plantlets; R, Transplanted plantlet.

图1 铁皮石斛种子萌发及优质试管苗培育技术

Fig. 1 Seed germination and high quality plantlets breeding technology of *D. officinale*

表 2

培养基总物质含量对幼苗生长的影响

Table 2

Effect of total material content in medium on plantlet elongation

编号 No.	培养基 Medium	幼苗生长情况 Growth situation of plantlets
Z1	Z1	茎长 3.5~3.8 cm, 具 5~6 个节, 茎粗壮, 叶大厚实, 叶片深绿具红晕, 根系粗壮, 具 3 个萌蘖芽
Z2	1/2 Z1	茎长 2.6~3.2 cm, 具 4~5 个节, 茎粗壮, 叶片大厚实深绿色, 根系粗壮, 具有 2 个萌蘖芽
Z3	1/4 Z1	茎长 1.9~2.5 cm, 具 3 个节, 茎细, 叶较大较薄, 叶色浅绿, 根系粗壮, 萌蘖芽极少
Z4	1/8 Z1	茎长 0.8~1.0 cm, 具 2 个短节, 茎细, 叶片很小薄失绿, 根系瘦弱细长, 无萌蘖芽
Z5	1/16 Z1	茎长 0.8 cm, 具 2 个节, 茎细, 叶片很小失绿, 根系瘦弱细长, 无萌蘖芽

2.3 限根培养法中培养基的筛选

为了限制铁皮石斛试管苗根系过长并防止缠绕, 首先采用机械隔离的方法将培养瓶分隔成近等的 16 个小格以限制根系的生长长度和方向(图 1P), 然后再筛选可让试管苗生长壮实同时根系又不会太长的培养基。由表 3 可知, 定苗培养 60 d 后的小苗生长, 在无生长调节剂的 T1 培养基中小苗长得较短, 不宜采用; 在无细胞分裂素类物质的 T2 培养基中茎基部无膨大现象, 此时又缺乏新萌芽, 不宜采用; 在其它较低的生长调节剂用量下, 小苗生长差异并不是很大, 综合考虑具新萌芽、茎基

部有膨大、根系长度适中等因素以 T6 培养基最为适合, 在限根培养培养容器中每小格内定植 2~3 个幼苗, 培养 80 d 后可形成具有 4~5 个幼苗的丛生优质试管苗(图 1Q), 练苗定植栽培时正好可栽于一个盆中, 不仅成活率高而且易于分蘖出新芽, 有利于增加产量。

2.4 试管苗移栽

将试验所得优质试管苗经过练苗处理后用消毒过的杉木块栽培在 50 cm×50 cm 的塑料筐中(图 1R), 保证空气湿度在 75%~90%, 中午和下午光照过强时增加大棚遮阴度, 移栽成活率可达 97.62%。

表 3

不同浓度 NAA 和 6-BA 对根系的影响

Table 3

Effect of different concentration of NAA and 6-BA on rooting

编号	生长物质浓度	Concentration of hormone/(mg · L ⁻¹)	幼苗生长情况
No.	NAA	6-BA	Growth situation of plantlets
T ₁	0.0	0.00	有 3~4 片叶,具 3~4 个较短的节,茎基部有明显部膨大,无新萌芽,根长 5.0~6.0 cm
T ₂	0.2	0.00	有 5~6 片叶,具 6~7 个节,茎粗度一致、基部有少数新萌芽,根长根长 5.0~6.5 cm
T ₃	0.2	0.05	有 5~6 片叶,具 4~5 个节,茎基部有膨大,且有新萌芽,根长 2.0~3.5 cm
T ₄	0.2	0.10	有 4~5 片叶,具 4~5 个节,茎基部有膨大,且有新萌芽,根长 2.0~3.0 cm
T ₅	0.3	0.05	有 5~6 片叶,具 4~6 个节,茎基部稍有膨大,新萌芽较少,根长 2.0~3.5 cm
T ₆	0.3	0.10	有 5~6 片叶,具 4~5 个节,茎基部膨大,新萌芽较多,根长 3.0~4.5 cm
T ₇	0.4	0.05	有 5~6 片叶,具 4~5 个节,茎基部无膨大,新萌芽少,根长 5.0~6.0 cm
T ₈	0.4	0.10	有 5~6 片叶,具 5~6 个节,茎基部稍有膨大,有新萌芽,根长 5.0~6.5 cm

3 结论与讨论

铁皮石斛种子细小, 种子的翅很短, 种皮薄而透明, 播种后萌发速度快且萌发率高, 原球分化容易。在产业化育苗时, 大量分化的小苗等待定苗培养, 需要短时间大量的人工进行定苗接种, 另外若不能及时转接、定苗培养小苗生长时间过长, 容易缺乏营养和生长不一致等问题, 不利于优质试管苗的培养, 由于黑暗低温条件可抑制铁皮石斛原球茎的生长和分化, 可将播种后 16 d 的原球茎转到 4℃黑暗条件下保存, 限制原球茎的进一步生长, 根据生长需要随时解除抑制恢复生长, 以达到一年四季都有刚萌发的原球茎在生长分化, 方便接种工人的操作。

铁皮石斛在组织培养中容易生根, 根系生长茂盛, 随着定苗培养时间的增加小苗逐渐长大, 试管苗的根系缠绕在培养瓶底部, 出瓶时极为不易, 会对试管苗的根、茎、叶造成很大的损伤, 大大降低了移栽成活率, 同时由于根系缠绕造成出瓶时操作不方便, 出瓶后不便洗去培养基, 致使移栽费时费工。该试验中用限根培养法, 即采用特定的底部分隔培养瓶, 配以限制根系生长培养基, 进行限根培养可以得到便于出瓶操作、移栽成活率的优质试管苗。在铁皮石斛产业化生产育苗

中, 结合低温限制保存和限根培养法可减少生产成本、提高育苗质量。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(1 部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 265-266.
- [2] 屠国昌. 铁皮石斛的化学成分、药理作用和临床应用[J]. 海峡药学, 2010, 22(2): 70-71.
- [3] 翟明恬, 刘红霞, 王亚妮. 铁皮石斛组织快繁及移栽培养[J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(1): 50-54.
- [4] 杨立昌, 乙引, 张宇斌, 等. 铁皮石斛快速繁殖体系研究[J]. 北方园艺, 2010(22): 136-138.
- [5] 胡佳丽, 戚正华, 马美兰, 等. 铁皮石斛种子组织培养条件的优化[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(8): 1399-1402.
- [6] 谢启鑫, 宋小明, 黄东华, 等. 铁皮石斛的种子培养[J]. 北方园艺, 2013(6): 90-91.
- [7] 朱艳, 秦民坚. 铁皮石斛茎段诱导丛生芽的研究[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(2): 56-57.
- [8] 潘梅, 王景飞, 姜殿强, 等. 铁皮石斛丛生芽增殖培养条件的优化[J]. 北方园艺, 2013(13): 128-130.
- [9] 张红梅, 刘建东, 王岩花, 等. 铁皮石斛茎段快繁技术研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2010, 30(6): 495-499.
- [10] 黄作喜, 张杨, 颜小玉, 等. 铁皮石斛原球茎高效增殖体系的构建[J]. 北方园艺, 2014(14): 107-110.
- [11] 杨瑞娟, 王桥美, 严亮. 铁皮石斛愈伤组织诱导研究[J]. 亚热带植物科学, 2014, 43(3): 259-261.

正交设计直观分析法优化苦瓜 SSR-PCR 反应体系

王心迪^{1,2,3}, 黄如葵^{2,3}, 冯诚诚^{2,3}, 梁家作², 黄熊娟^{2,3}, 刘杏连²

(1. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530001; 2. 广西农业科学院 蔬菜研究所, 广西 南宁 530007;

3. 广西作物遗传改良生物技术重点实验室, 广西 南宁 530007)

摘要:以苦瓜‘MC9’为试材,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验,对苦瓜 SSR-PCR 反应体系的 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、模板 DNA 量、Taq 聚合酶量、引物浓度等 5 个因素的 4 个水平进行优化试验,并通过正交设计直观分析法对 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、Taq 聚合酶量进行了单因素确定。结果表明:最佳反应体系为 $1 \mu L$ $10\times$ PCR buffer, Mg^{2+} 浓度为 $1.75 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, dNTPs 浓度为 $0.25 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, Taq DNA 聚合酶 1 U , DNA 100 ng , 引物 $0.20 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, ddH_2O 补足至 $10 \mu L$ 。

关键词: 苦瓜; 正交实验; 单因素设计

中图分类号: S 642.503.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2016)10-0099-05

苦瓜(*Momordica charantia* L.)属葫芦科苦瓜属一年生草本植物,其起源中心位于印度、缅甸,广泛分布于热带、亚热带及温带地区,在东非、亚洲、南美等世界各

地均有栽培,在我国也已有几百年的栽培历史。我国苦瓜种质资源丰富,品种间差异大,单独利用传统形态学标记方法很难对种质资源的遗传多样性做出准确有效的评价。近年来,随着 DNA 分子标记技术的发展,利用分子标记对 DNA 碱基序列进行比较和分析,为植物种质遗传多样性分析提供了新途径。其中,SSR 分子标记技为共显性标记,具有多态性丰富、试验重复性好等优点,已广泛地应用于目的基因的标记、连锁图谱的绘制、遗传资源的鉴定和分类等方面^[1]。目前,国内苦瓜的 AFLP、SRAP、ISSR、RAPD 等体系均已构建^[2-6],而关于 SSR 反应体系优化的研究尚鲜见报道,由于植物 PCR 体系的优化是进行后续相关分子生物学研究的前提与基

第一作者简介:王心迪(1991-),女,硕士研究生,研究方向为苦瓜核心种质筛选。E-mail: xindikaka@126.com

责任作者:黄如葵(1969-),女,博士,研究员,现主要从事蔬菜育种及种子学等研究工作。E-mail: rkhuang@gxaas.net

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-25);国家科技计划资助项目(2014BAD05B04);广西科学研究与技术开发计划资助项目(桂科合 14125008-2-19);广西农业科学院基本科研业务专项资助项目(2015YT66)。

收稿日期:2015-12-18

Study on High Quality Plantlets Propagation Technique of *Dendrobium officinale*

ZHOU Li¹, WANG Yuan¹, YE Yuanting¹, XU Zhenghai²

(1. Key Laboratory of National Medicinal and Biological Resources, Xingyi Normal University for Nationalities, Xingyi, Guizhou 562400;

2. Southwest Guizhou Lyuyuan Animal and Plant Technologies Co. Ltd., Xingyi, Guizhou 562400)

Abstract: Taking wild *Dendrobium officinale* as test material, using root restriction culture method, a high quality plantlets breeding technology of *Dendrobium officinale* was introduced by researching its characteristics of the asymbiotic seed germination. The results showed that the seeds of 120 days after pollination (DAP) reached maturity, the seeds could germinate; the seeds of 140 DAP could be morphologically mature, with a seed germination rate up to 98.51%; low temperature and darkness restriction could inhibit of protocorms growth; using medium of restrictions on root growth in a particular container could get high quality seedlings, restriction on root growth medium was $MS + 0.10 \text{ mg} \cdot L^{-1} 6\text{-BA} + 0.3 \text{ mg} \cdot L^{-1} \text{NAA} + 80 \text{ g} \cdot L^{-1}$ mashed banana; and the survival rate could be up to 97.62% when the plantlets were transplanted to pine bark. Therefore, this research provided a new method for the industrial production of *D. officinale*.

Keywords: *Dendrobium officinale*; seed; asymbiotic germination; high quality plantlets