

不同日本春石斛兰品种组培繁殖系数的差异

张新平^{1,2},朱根发²,王 飞¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100;2 广东省农业科学院 花卉研究所,广东 广州 510640)

【摘 要】 【目的】研究不同春石斛兰品种组培繁殖能力的差异及 6-BA 质量浓度对春石斛兰增殖系数的影响,为优化春石斛兰培养基配方和工厂化生产提供技术依据。【方法】以 23 个引自日本的春石斛兰品种为材料,在诱导培养基(1/2 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+卡拉胶 7.0 g/L+蔗糖 20 g/L+椰子乳 100 mL/L+细菌学蛋白胨 2.0 g/L)和相同培养条件下,运用 SAS 软件分析了 23 个春石斛兰品种间启动率、增殖率和增殖系数 3 个指标的差异性;在此基础上,选出增殖系数高、中、低的 3 个代表品种 022,021 和 026,利用 Excel 分析了增殖系数与 6-BA 质量浓度的关系。【结果】在相同诱导培养基和培养条件下,23 个春石斛兰品种间的启动率和增殖率差异显著,增殖系数差异极显著;在观察的 483 个外植体中,平均增殖系数为 1.89,低于 2.0 的观测值占总数的 51.97%;3 个代表品种 021,022 和 026 的拟合曲线表明,其增殖系数随 6-BA 质量浓度的增加呈现先增后减的变化趋势,增殖系数取最大值时的 6-BA 质量浓度分别为 2.07,3.39 和 1.92 mg/L。【结论】不同品种春石斛兰的组培增殖能力差异较大,001,002,004 和 022 等 4 个品种适合在 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+卡拉胶 7.0 g/L+蔗糖 20 g/L+椰子乳 100 mL/L+细菌学蛋白胨 2.0 g/L 诱导培养基上实现快速繁殖,适合春石斛兰组培增殖的有效 6-BA 质量浓度为 1.9~3.4 mg/L。

【关键词】 春石斛兰;增殖系数;启动率;增殖率

【中图分类号】 S682.310.4⁺3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)09-0118-05

Differences of propagation coefficient in 23 nobile-type
Dendrobium varieties introduced from Japan

ZHANG Xin-ping^{1,2},ZHU Gen-fa²,WANG Fei¹

(1 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Floricultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: 【Objective】 The propagation ability differences of different variety nobile-type *Dendrobium* and the effect of 6-BA concentration on their propagation coefficient during tissue culture were studied in order to offer technical basis for their large-scale production. 【Method】 The bud tips of 23 varieties nobile-type *Dendrobium* introduced from Japan were incubated to the induction medium: 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+carrageenan 7.0 g/L+sucrose 20 g/L+coconut water 100 mL/L+bacterial peptone 2.0 g/L, the percent germination of 23 varieties were compiled after 30 d culture under dark condition. They were subcultured 30 d once, percent propagation and propagation coefficient were compiled after the second subculture, the differences of percent germination, percent propagation and propagation coefficient among 23 varieties were analyzed by SAS statistical software; On the basis of above results, the three representative varieties 022, 021 and 026, which had the maximum propagation coefficient, were centered

* [收稿日期] 2007-09-26
[基金项目] 广东省科技攻关项目 (2004B50201004, 2003A2010401, 2006A20201001)
[作者简介] 张新平 (1981—), 男, 陕西柞水人, 在读硕士, 主要从事园林植物与观赏园艺研究。
E-mail: jhonxinping81@yahoo. com. cn
[通讯作者] 朱根发 (1968—), 男, 江西瑞金人, 研究员, 主要从事花卉育种及生物技术研究。 E-mail: zhugf@tom. com

and the minimum value were selected. Their bud tips were incubated to the inducing medium supplemented with NAA 0.5 mg/L and 6-BA 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0 mg/L respectively, their propagation coefficients were compiled after 30 d dark culture and one subculture, their quadratic regression equations associated with the relationship between propagation coefficient and 6-BA qualitative concentration were obtained by software Excel. 【Result】 The differences of percent germination and percent propagation among 23 varieties nobile-type *Dendrobium* were significant. The differences of propagation coefficient were extremely prominent, while they were cultured on the same inducing medium, among the 483 observed explants, their mean propagation coefficient equaled to 1.89, the percent of observation value below 2.0 was 51.97%; The regression equations of three representative varieties 021, 022 and 026, showed that their propagation coefficients had the tendency to increase first and decrease then, associated with the 6-BA qualitative concentration increase, and obtained the 6-BA qualitative concentration that were the solutions of the regression equation when their propagation coefficient reached maximum, 2.07, 3.39 and 1.92 mg/L respectively. 【Conclusion】 The differences of tissue culture propagation ability in different varieties of nobile-type *Dendrobium* were more distinct. The induction medium was suitable for rapid propagation of the four varieties, 001, 002, 004 and 022, the margin 6-BA qualitative concentrations of the three representative varieties demonstrated that the available 6-BA qualitative concentration range suit for tissue culture propagation of nobile-type *Dendrobium* was 1.9–3.4 mg/L.

Key words: nobile-type *Dendrobium*; propagation coefficient; percent germination; percent propagation

春石斛(nobile-type *Dendrobium*)为节生花序类型的石斛兰,花色丰富,花期长达 35~56 d,某些有香味。其主要以扦插或高位芽方法进行繁殖,繁殖率极低。近年来,随着春石斛兰作为高档年宵花的兴起,其市场需求量越来越大。为解决石斛兰繁殖率极低的问题,许多研究者进行了春石斛部分品种的组培繁殖研究^[1-9],但对自日本引进的不同春石斛品种组培繁殖能力的差异研究尚未见报道。本研究以 23 个引自日本的春石斛兰品种为材料,在相同培养基和培养条件下,研究了不同基因型春石斛兰品种间外植体的启动率、增殖率和增殖系数的差异,并在此基础上选择有代表性的品种,研究了增殖系数与培养基中 6-BA 质量浓度之间的关系,以期为进一步优化春石斛兰培养基配方和工厂化生产提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:供试的 23 个春石斛兰品种引自日本,栽培在广东省农业科学院花卉研究所花卉种质资源圃,选取未展叶片的嫩芽(长 1~3 cm)为外植体。

诱导培养基:1/2 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+卡拉胶 7.0 g/L+蔗糖 20 g/L+椰子乳 100 mL/L+细菌学蛋白胨 2.0 g/L。

1.2 春石斛兰丛生芽诱导体系的建立

取春石斛兰未展叶新芽,用洗衣粉水浸泡 5 min,流水冲洗 10 min 后,用棉花蘸取体积分数 75%酒精擦拭芽表面,徒手剥掉芽外面较老的组织,露出幼嫩组织,然后在超净工作台上用体积分数 75%酒精表面灭菌 8~10 s,无菌水冲洗 2 遍,在 1 g/L 氯化汞溶液中浸 8 min,无菌水冲洗 3~5 遍,在灭菌铝盘中用镊子剥取茎尖。用无菌吸水纸吸干茎尖表面的水分后,将茎尖接种于诱导培养基上,在培养温度(26±1)℃、环境湿度 60%~80%条件下培养,建立无菌苗培养体系。每瓶转接单芽 1 个,每品种每次接芽 10~30 瓶,重复 3 次。第 1 次诱导采用暗培养,培养 30 d 后统计各品种启动率。30 d 后转瓶,采用光培养(光照强度 1 500 lx,光照 12 h/d)。每 30 d 转接 1 次,转接 2 次后,每重复随机抽取 7 瓶,重复 3 次,共取 21 瓶统计增殖率和增殖系数^[10-11]。

启动率/%=启动的外植体数/未污染外植体总数×100%;

增殖率/%=增殖外植体数/未污染和未褐化外植体总数×100%;

增殖系数=增殖的新芽数/每瓶接入的芽数。

1.3 6-BA 质量浓度对春石斛兰增殖系数的影响

根据 1.2 的试验结果,从 23 个春石斛兰品种中分别选取增殖系数最高、居中和最低的品种,探讨增

殖系数与培养基中 6-BA 质量浓度之间的关系。将 NAA 质量浓度固定在 0.5 mg/L,6-BA 质量浓度分别设置为 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 和 6.0 mg/L,每个 6-BA 质量浓度下接种外植体 5 个,重复 3 次。30 d 后转接 1 次,继代培养 30 d 后统计各处理的增殖系数。外植体的选取、消毒方法和基本培养基配方同 1.2。

1.4 数据统计方法

启动率和增殖率进行反正弦转换后,采用 SAS V 8.02 统计分析软件,先利用 UNIVARIATE 过程中的 Shapiro-Wilk 对启动率反正弦、增殖率反正弦

和增殖系数进行正态性检验,对于符合正态分布的数据进行单因素 ANOVA 法方差分析和 LSD 法(最小显著差法)多重比较分析,对于不符合正态分布的数据采用 NPAR1WAY 进行品种间差异的非参数检验^[12]。

2 结果与分析

2.1 23 个春石斛兰品种芽增殖情况的总体特征

运用 SAS 统计分析软件,对 23 个春石斛兰品种的芽增殖系数进行简单描述统计,结果见图 1。

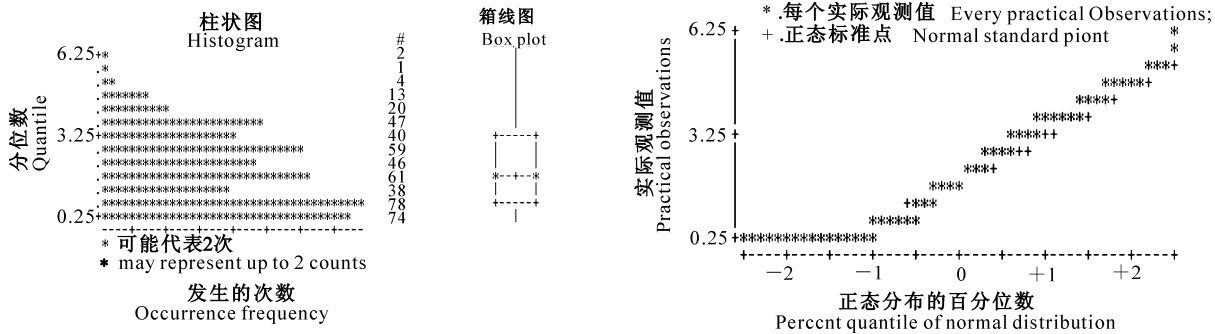


图 1 23 个春石斛兰品种增殖系数的茎叶图和正态分布图

Fig. 1 The stem leaf-box plot and normal probability plot of propagation coefficients in 23 nobile-type *Dendrobium*

正态概率图表明,23 个春石斛兰品种的增殖系数整体数据基本符合正态分布。由茎叶图知,在 483 个实际观测值中,春石斛兰的平均增殖系数为 1.89,标准差为 1.39,最大值为 6.25,最小值为 0.25,极差为 6.00,变异系数为 73.46;偏度系数为 0.39>0,表明增殖系数大多数在均值 1.89 以上;峰度系数为 -0.78<0,说明均值两侧的极端数据较少;中位数为 1.80,表示至少有 50% 的供试春石斛兰繁殖系数在 1.80 以下。在 483 个实际观测值中,众数为 0.50,出现 78 次,出现频率为 16.15%。在植物组培快繁中,若繁殖系数低于 2.0,则难以满足种苗工厂化生产需要^[10]。本试验中,增殖系数 2.0 以上的出现 232 次,占 48.03%,2.0 以下的出现 251 次,占 51.97%。说明在 483 个接种外植体中,51.97% 的外植体在本试验诱导培养基中,不适宜进行大规模工厂化繁殖。

2.2 不同春石斛兰品种增殖的差异分析

对相同培养条件下不同品种春石斛兰的启动率、增殖率和增殖系数的差异进行统计分析,结果(表 1)表明,不同春石斛兰品种启动率通过 Shapiro-Wilk 正态性检验(样本数 $N < 2\,000$ 时,SAS 系统利用 Shapiro-Wilk 中的 W 统计量来检验正态性。 W

统计量是指用基于次序统计量线性组合平方的方差最佳估计与通常校正平方和估计之比($0 < W < 1$)。当样本符合正态分布时,由样本构造的 W 统计量值应接近 1。), $W = 0.977$,统计量 W 与 1 接近概率为 0.236>0.05,说明启动率服从正态分布,进一步进行方差分析,启动率均值为 43.40%,由 F 测验得 $F = 1.81$,统计量 F 显著的概率为 0.045<0.05,表明不同品种间启动率差异显著;LSD 法多重比较显示,启动率最高的 001 与 002,003,005,006,014,015,016,020,021,026,028,029 和 038 间差异显著。

不同春石斛兰品种的增殖率均值为 55.0%,Shapiro-Wilk 正态性检验结果表明, $W = 0.952$,统计量 W 与 1 接近的概率为 0.011<0.05,说明增殖率不服从正态分布,由非参数的 Kruskal-Wallis χ^2 检验得,Pr>Chi-Square=0.016<0.05,即不同品种间的增殖率存在显著差异。

不同春石斛兰品种的增殖系数通过 Shapiro-Wilk 正态性检验, $W = 0.970$,统计量 W 与 1 接近的概率为 0.094>0.05,说明增殖系数服从正态分布,进一步进行方差分析,由 F 测验得 $F = 54.03$,统计量 F 显著的概率为 $P = 0.000\,1 < 0.01$,表明不同

品种间增殖系数的差异极显著。LSD 法多重比较 春石斛兰品种间差异极显著。
显示,增殖系数最高的 022 与除 001 外的其他供试

表 1 不同春石斛兰品种的启动率、增殖系数的 LSD 多重比较

Table 1 LSD Multiple Range Test for percent germination and propagation coefficients
in different varieties nobile-type *Dendrobium*

编号 No	品种名 ^[13] Variety	启动率反正弦 The asin of percent germination	增殖率反正弦 The asin of percent propagatio	继代 2 次后的增殖系数 Propagation coefficient after twice subculture
001	<i>Den.</i> fairy flake ‘Garmen’	0.87±0.20 a	0.43±0.32	3.78±0.85 BA
002	<i>Den.</i> Spot Right	0.40±0.07 ebdgcf	0.73±0	3.03±0.47 ECD
003	<i>Den.</i> Kazuki	0.21±0.12 gf	0.59±0.12	0.67±0.37 MLON
004	<i>Den.</i> Yohkon ‘Peach Boy’	0.65±0.36 ebdac	0.58±0.08	3.24±0.54 BCD
005	<i>Den.</i> YohKou ‘cat’s Eyes’	0.31±0.18 edgcf	0.56±0.23	1.25±0.68 IJH
006	<i>Den.</i> Full Bloom ‘Hanahime’	0.25±0.17 egf	0.11±0.12	0.10±0.14 O
009	<i>Den.</i> VUtopia ‘Messenger’	0.54±0.26 ebdcgaf	0.42±0.10	1.34±0.96 IKJ
010	<i>Den.</i> Tomofleak ‘Naporì’	0.59±0.12 ebdcgaf	0.87±0.60	2.50±1.10 EFG
014	<i>Den.</i> Casiflake	0.32±0.37 edgcf	0.70±0.80	3.50±0.71 BC
015	<i>Den.</i> Emur	0.18±0.05 g	0.53±0.20	1.00±0.76 MLKJ
016	<i>Den.</i> Tubuyaki	0.23±0.33 egf	0.26±0.26	2.37±0.99 FG
019	<i>Den.</i> Yaotome	0.63±0.42 ebdacf	0.88±0.60	2.03±0.90 HG
020	<i>Den.</i> Red Arce	0.23±0.14 edgcf	0.73±0	3.38±0.89 BC
021	<i>Den.</i> Yukidaruma ‘Queen’	0.31±0.18 edgcf	0.52±0.18	1.00±0.75 MLKJ
022	<i>Den.</i> Love Story	0.78±0.69 ba	1.07±0.47	4.20±1.03 A
025	<i>Den.</i> Second Love ‘tokimeki’	0.69±0.19 bdac	0.94±0.22	2.76±0.69 EFD
026	<i>Den.</i> ‘Benikujaku’	0.23±0.26 edgcf	0.08±0.15	0.33±0.51 ON
027	<i>Den.</i> Oriental Sprit‘Rudoruph’	0.44±0.09 ebdagcf	0.52±0.20	2.00±0.93 HG
028	<i>Den.</i> Sekand Rave‘Yakigipon’	0.27±0.24 edgf	0.35±0.30	0.79±0.7 MLKN
029	<i>Den.</i> Shirasagi	0.39±0.23 ebdgcf	0.75±0.71	1.47±0.75 IH
030	<i>Den.</i> Marchen Color	0.71±0.12 bac	0.29±0.11	0.65±0.42 MLON
038	<i>Den.</i> Pittero Gold‘Princess’	0.33±0.17 edgcf	0.88±0.17	1.66±0.61 hiIH
052	<i>Den.</i> Yellow Magic‘Carnival’	0.65±0.24 ebdac	0.53±0.12	0.42±0.41 mnMON

注:不同小写字母代表在 0.05 水平上差异显著,不同大写字母代表在 0.01 水平上差异显著
Note: Different small leters and capttal letters represent significant difference at 0.05 and 0.01 level, respetively.

从启动率、增殖率以及继代 2 次后的增殖系数 3 方面综合分析认为,23 个引进的春石斛兰品种中,启动率和增殖率在 0.4 以上、继代 2 次后的增殖系数在 3.0 以上的品种有 001,002,004 和 022 共 4 个品种;启动率不超过 0.27、继代 2 次后的增殖系数不超过 1.0 的品种有 003,006,015,026 和 028 共 5 个品种。其余 14 个品种介于这 9 个品种之间,即:001,002,004 和 022 这 4 个品种比较适合 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+卡拉胶 7.0 g/L+蔗糖 20 g/L+椰子乳 100 mL/L+细菌学蛋白肽 2.0 g/L 培养基配方,而其余品种还需进一步进行培养基配方的选择。

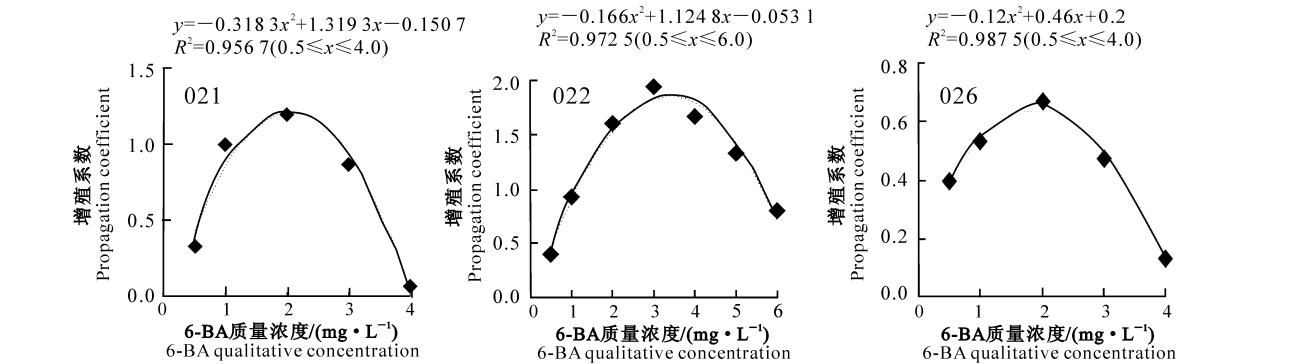


图 2 6-BA 质量浓度对 021,022 和 026 3 个春石斛兰品种增殖系数的影响
Fig. 2 The effect of 6-BA qualitative concentration on propagation coefficient of 021,022 and 026 nobile-type *Dendrobium*

2.3 6-BA 质量浓度对春石斛兰增殖系数的影响

根据以上试验结果,以平均增殖系数为纵坐标,6-BA 质量浓度为横坐标作散点图,在拟合品种 021 和 026 曲线时发现,6-BA 质量浓度为 5.0 和 6.0 mg/L 时,增殖系数远远偏离整体的散点图趋势线,这可能是由 6-BA 质量浓度过高造成的。图 2 表明,021 和 026 这 2 个春石斛兰品种在增殖方面不适应高的 6-BA 质量浓度,因此在拟合曲线时舍去了 5.0 和 6.0 mg/L 两点。根据散点图趋势线,拟合成二次曲线比较合理。分别求出春石斛兰品种 021,022 和 026 的增殖系数所拟合曲线的一阶导数的驻点,得到其各自增殖系数取极大值时的 6-BA 质量浓度分别为 2.07,3.39 和 1.92 mg/L。

3 讨 论

王玉英等^[4]以春石斛试管苗为材料,在 1/2 MS+KT 1.5 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+香蕉泥 80 g/L 培养基上培养不定芽,增殖效果较好,增殖率可达 78.59%。周辉明等^[6]用春石斛的腋芽和茎尖培养外植体,在 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.8 mg/L 培养基上培养,40 d 后腋芽大多数形成丛生芽,极少数诱导出原球茎;茎尖大多数诱导出原球茎;单独用 NAA 或 6-BA 都能诱导出原球茎,NAA 的诱导效果较 6-BA 好,6-BA 和 NAA 组合使用效果较单独使用 NAA 差。廖飞雄等^[7]研究认为,春石斛假茎产生的侧芽在 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的激素配比下诱导出丛生芽,在 KT 与 NAA 的组合中,丛芽苗的基部诱导类原球茎的形成。韩磊等^[9]用春石斛 1~3 mm 茎尖作外植体,以 1/2MS 为基本培养基,在 6-BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L 的激素配比下,可以诱导单株产生 3 个不定芽。在参考上述研究结果的基础上,本试验配制了 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+卡拉胶 7.0 g/L+蔗糖 20 g/L+椰子乳 100 mL/L+细菌学蛋白胨 2.0 g/L 的诱导培养基,用于研究春石斛兰组织培养的基因型差异,结果表明不同春石斛兰品种的组培增殖能力差异较大,品种间启动率和增殖率差异显著,增殖系数差异极显著,仅有 4 个品种比较适合该诱导培养基。

6-BA 质量浓度对春石斛兰组培增殖有重要的影响。徐雨^[13]研究发现,在相同的 NAA 质量浓度下,随着 6-BA 质量浓度的升高,分化的芽数也逐渐增加,6-BA/NAA 质量浓度比值越大,增值率越高。

廖福琴等^[14]研究认为,当 6-BA 质量浓度由 4.0 mg/L 增加到 5.0 mg/L 时,芽增殖倍数开始下降,说明较高质量浓度的 6-BA 对芽的分化有抑制作用。本试验结果表明,在有效的 6-BA 质量浓度范围内,3 个代表品种的增殖系数均随着 6-BA 质量浓度的增加呈现先增后减的变化规律,这一结果与徐雨^[13]和廖福琴等^[14]的试验结论基本一致。从本试验得出的 3 个代表品种的边际 6-BA 质量浓度来看,其质量浓度应在 1.9~3.4 mg/L,但此质量浓度能否适用所属组的其他品种,还有待于进一步验证。

【参考文献】

[1] Nihar R N, Shiba P R, Satyanarayan P. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) SW., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham)SW. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation [J]. *Scientia Horticulturae*, 1997, 71:243-250.

[2] 毛碧增, 李凤玉, 王 春, 等. 春石斛组织培养技术研究 [J]. 浙江大学学报:理学版, 2003, 30(5):580-583.
Mao B Z, Li F Y, Wang C, et al. Study on the micropropagation of *Dendrobium nobile* [J]. *Journal of Zhejiang University: Science Edition*, 2003, 30(5):580-583. (in Chinese)

[3] Jonojit R, Nirmalya B. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. Var. *oculatum* Hk. f [J]. *Scientia Horticulturae*, 2003, 97:333-340.

[4] 王玉英, 李枝林, 余朝秀. 春石斛试管增殖研究初报 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(2):208-209.
Wang Y Y, Li Z L, Yu C X. Preliminary study on tissue culture and proliferation of *Dendrobium nobile* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(2):208-209. (in Chinese)

[5] Ravindra B M, Gangadhar S M, Nataraja K. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162:473-478.

[6] 周辉明, 叶 炜, 罗庆国. 春石斛的组织培养和快速繁殖 [J]. 三明农业科技, 2006(3):23-24.
Zhou H M, Ye W, Luo Q G. Tissue culture and rapid multiplication of nobile-type *Dendrobium* [J]. *Sanming Agricultural Science and Technology*, 2006(3):23-24. (in Chinese)

[7] 廖飞雄, 王恒明, 黄群慧. 春石斛的工厂化快速繁殖技术研究 [J]. 西南农业学报, 2006, 19(5):943-946.
Liao F X, Wang H M, Huang Q H. Studies on micropropagation techniques *in vitro* of *Dendrobium nobile* [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2006, 19(5):943-946. (in Chinese)

[8] Martin K P, Madassery J. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium hybrids* through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies [J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 108:95-99.