

秋石斛胚性愈伤组织诱导及再生体系的建立

李志晴^{1,2}, 李亚梅^{2,3,5*}, 李崇晖^{2,3}, 尹俊梅^{2,3,4*}

1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业农村部华南作物基因资源与种质创制重点实验室/海南省热带作物资源遗传改良与创新重点实验室, 海南海口 571101; 3. 海南省热带观赏植物种质创新利用工程技术研究中心, 海南儋州 571737; 4. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572330; 5. 中国热带农业科学院海口实验站, 海南海口 571101

摘要: 秋石斛 (*Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*) 花姿优美、花色丰富, 是热区重要观赏植物, 具有极高的产业价值。本研究以秋石斛杂交种迷你 (*Den. Yaya Victoria*)、水蜜桃 (*Den. Swirl*)、三亚阳光 (*Den. Sonia Hiasakul*) 原球茎和无菌苗幼嫩茎段为外植体, 探讨不同植物生长调节剂组合对不同品种秋石斛胚性愈伤诱导、不定芽分化及植株再生的影响。结果表明: 在胚性愈伤组织诱导阶段, 原球茎和生长 2 个月的幼苗茎段作为外植体诱导效果最佳, 暗培养 30 d 即可获得胚性愈伤。3 个品种的愈伤组织诱导最佳培养基是以 MSD (MS+30 g/L 葡萄糖+1 g/L 花宝 1 号+8 g/L 琼脂) 为基本培养基, 添加 0.5 mg/L KT 和 0.2~0.5 mg/L 2,4-D。迷你、水蜜桃、三亚阳光的胚性愈伤诱导率最高分别为 31.11%、22.78% 和 50%, 其中迷你品种仅需 15 d 即可获得胚性愈伤。最佳胚性愈伤增殖培养基为 MSD+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L KT, 胚性愈伤状态保持良好且不发生分化, 增殖倍数 0.9。最佳分化培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L IBA+0.15 mg/L KT, 在光照条件下, 接种后的胚性愈伤组织能够快速诱导形成芽点, 30 d 内分化形成 2~3 片叶的幼苗, 相同培养基中保持 60 d 能够自行生根获得完整再生苗。最佳生根培养基为 1/2 MS+30 g/L 蔗糖+0.5 mg/L NAA+8 g/L 琼脂, 生根率为 100%, 平均生根数 5 条, 根长约 1.3 cm。本研究所使用的胚性愈伤组织诱导、增殖和分化培养基具有一定的广谱性, 可为后续秋石斛胚再生途径及分子育种研究奠定基础。

关键词: 秋石斛; 茎段; 胚性愈伤; 植株再生

中图分类号: S682.31 文献标志码: A

Establishment of Embryogenic Callus Induction and Regeneration System for *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*

LI Zhiqing^{1,2}, LI Yamei^{2,3,5*}, LI Chonghui^{2,3}, YIN Junmei^{2,3,4*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Tropical Crop Germplasm Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture & Rural Affairs / Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Genetic Improvement and Innovation of Hainan Province, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Engineering Technology Research Center of Tropical Ornamental Plant Germplasm Innovation and Utilization, Danzhou, Hainan 571737, China; 4. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572330, China; 5. Haikou Experiment Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium* is an important ornamental plant in tropical area and has high market values, with beautiful flower appearance and abundant flower colors. In this study, the protocorms and young seedling's stem segments of commercial varieties, *Den. Yaya Victoria*, *Den. Swirl* and *Den. Sonia Hiasakul*, were used as the explants. The effects of different phytohormone combination on embryogenic callus induction, adventitious bud differentiation

收稿日期 2023-06-27; 修回日期 2023-10-17

基金项目 海南省自然科学基金青年基金项目 (No. 322QN359); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630032022002); 海南省重点研发项目 (No. ZDYF2024XDNY239)。

作者简介 李志晴 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 观赏园艺学。*通信作者 (Corresponding author): 尹俊梅 (YIN Junmei), E-mail: yinjunmei2004@163.com; 李亚梅 (LI Yamei), E-mail: lym6137@163.com。

and plantlet regeneration were investigated. During the embryogenic callus (EC) induction stage, the best induction explants were protocorms and 2-month-old seedling stem segments and EC could be obtained after 30 days culture in dark condition. The best medium for EC induction of was MSD (MS+30 g/L glucose+1 g/L Hyponex+8 g/L agar) as the basic medium with 0.5 mg/L KT and 0.2–0.5 mg/L 2,4-D. The highest average induction rate of EC was 31.11%, 22.78%, and 50% for *Den. Yaya Victoria*, *Den. Swirl* and *Den. Sonia Hiasakul*, and the induction time for *Den. Yaya Victoria* was only 15 days from explants to EC. The best proliferation medium was MSD+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L KT, which maintaining EC in good condition without differentiation and the multiplication rate was 0.9. The best medium for differentiation was 1/2 MS+0.5 mg/L IBA+0.15 mg/L KT under light condition of 16 h one day, EC quickly differentiating and forming 2–3 leaf adventitious buds within 30 days, and finally regenerating into plantlet after 60 days in the same medium. The best rooting medium was 1/2 MS+30 g/L sugar+0.5 mg/L NAA+8 g/L agar, with rooting rate 100% and five roots in length 1.3 cm per plantlet. In this research, the EC induction, proliferation and differentiation media have a wide-spectrum and the EC regeneration pathway could lay a solid foundation for further molecular breeding of *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*.

Keywords: *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*; stem segments; embryogenic callus; plant regeneration

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.06.009

秋石斛 (*Phalaenopsis*-type *Dendrobium*) 花姿优美, 形似纷飞的蝴蝶, 花色丰富, 喜欢在高温、多湿、阳光充足的热带环境中生长和开花, 花期长且主要集中在秋冬季, 是我国花卉市场常见的盆栽及切花植物。海南省因具有得天独厚的地理优势, 已发展为我国秋石斛的主产区^[1]。近年来, 秋石斛盆花在海南的栽种面积逐年扩大, 据统计, 海南每年出货量达到 500 万盆以上, 占广州该类花卉市场份额的 95%以上。目前, 我国秋石斛新品种培育主要通过杂交育种和诱变育种实现, 而建立高效的胚性愈伤组织再生体系将有利于基因工程育种研究。

秋石斛常用组织培养方法是以种子播种获得原球茎, 再以无菌苗的茎段为外植体, 诱导、分化、生根获得再生植株是进行工厂化育苗的理想手段^[2]。此外, 以优良株系的茎段、茎尖、叶片、花梗等为外植体, 经过消毒处理, 诱导类原球茎分化不定芽或诱导丛生芽进行增殖、生根, 从而获得大量组培苗, 也为秋石斛种苗繁育提供了技术支持^[3-9]。兰科植物现有的遗传转化方法构建主要以类原球茎为外植体, 即通过器官发生途径获得转基因植株, 由于原球茎已处于分化阶段, 因此该方法获得纯合转基因植株相对困难^[10-11], 相比之下, 胚性愈伤再生途径遗传转化产生的嵌合体较少, 广泛应用于作物基因工程育种^[12]。本研究以秋石斛杂交种迷你 (*Den. Yaya Victoria*)、水蜜桃 (*Den. Swirl*) 和三亚阳光 (*Den. Sonia Hiasakul*) 来源的原球茎、无菌幼苗茎段为外植体, 通过不同的基本培养基、植物生长调节剂组合测

试, 进行胚性愈伤诱导、增殖、分化及生根研究, 以期建立高效的秋石斛胚性愈伤诱导及胚发生途径再生体系, 为秋石斛多倍体育种、体细胞杂交、突变体和无性系变异株系获得及转基因分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验供试品种迷你、水蜜桃和三亚阳光果荚来源于中国热带农业科学院热带花卉研究中心种质圃。基本培养基 MS (Murashige and Skoog) 购于国药集团。植物生长调节剂 2,4-D、Kinetin、6-BA、NAA 和 IBA 购于西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司。

1.2 方法

除特殊说明外, 本研究所用的秋石斛组织培养基本培养基 (MSD): MS+30 g/L 葡萄糖+1 g/L 花宝 1 号+8 g/L 琼脂, pH 为 5.8~6.0, 121 °C 高温条件下灭菌 20 min。组织培养条件: 温度 25~28 °C, 环境相对湿度 70%~80%, 光照培养的光周期 16 h/d, 光照强度 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

1.2.1 果荚消毒及无菌苗的获取 取秋石斛的成熟果荚置于无菌组培瓶中, 2% NaClO_3 消毒 15 min, 无菌水清洗 3~5 遍; 转入 95%乙醇润洗 2~3 s 后用酒精灯烧去多余乙醇, 重复该步骤 2~3 次; 最后将消毒后的果荚置于无菌平皿中, 切开果荚, 用无菌手术刀将种子接种至种子培养基 (1/2 MS+3 g/L 花宝 1 号+2 g/L 蛋白胨+0.5 g/L 活性炭+30 g/L 蔗糖+8 g/L 卡拉胶), 1 个月后即可

获得原球茎，2~3 个月后获得 2~3 叶期无菌幼苗。

1.2.2 外植体的选择 选用迷你、水蜜桃和三亚阳光原球茎（生长 1~2 个月）、茎段 2（2~3 叶期，生长 2~3 个月，有 2~3 片叶）和茎段 1（4~5 叶期，生长 4~5 个月，有 4~5 片叶）的无菌苗茎段作为外植体进行胚性愈伤组织诱导。

1.2.3 胚性愈伤的诱导 用手术刀划伤原球茎，无菌苗去除叶片取茎段幼嫩部分横切，分别置于胚性愈伤诱导培养基 CIM1~CIM7（MSD+0.5 mg/L KT+0.1/0.2/0.3/0.4/0.5/1.0/2.0 mg/L 2,4-D）中暗培养诱导胚性愈伤组织，每个处理接种 10 皿，每皿 9 个外植体，30 d 后观察诱导效果并统计胚性愈伤诱导率，筛选出最适宜胚性愈伤诱导的培养基。以上每组实验最少重复 2 次，胚性愈伤诱导率=(诱导出胚性愈伤外植体数/接种外植体数)×100%。

1.2.4 胚性愈伤增殖 将诱导获得的胚性愈伤挑出，去除芽和多余组织，转入胚性愈伤增殖培养基 P₁、P₂、P₃、P₄ 中暗培养，30 d 为 1 个继代周期，统计胚性愈伤增殖量并观察是否发生分化。胚性愈伤增殖倍数=培养 30 d 后每皿胚性愈伤的体积/接种时胚性愈伤体积。胚性愈伤增殖培养基分别为 P₁: MSD+0.1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT; P₂: MSD+0.1 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT; P₃: MSD+0.5 mg/L IBA+0.15 mg/L KT; P₄: MSD+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L KT。

1.2.5 胚性愈伤分化及植株再生 挑取嫩黄致密、生长状态一致的胚性愈伤转入如下 F₁ 和 F₂ 分化培养基中，30 d 后观察胚性愈伤分化情况并统计分化率，60 d 后统计植株再生数。分化率=(分化出不定芽胚性愈伤数/胚性愈伤数)×100%; 植株再生数=(再生不定芽胚性愈伤数/胚性愈伤数)。测试用分化培养基分别为 F₁: 1/2 MS+3 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA; F₂: 1/2 MS+0.5 mg/L IBA+0.15 mg/L KT。

1.2.6 不定芽生根 将生长茁壮、体型良好的不定芽转入 R₁ 和 R₂ 生根培养基中进行生根试验，观察不同生根培养基对秋石斛不定芽生根率、生根数及根长的影响。待再生植株长至 4~5 cm 后转入以苔藓为基质的培养基中炼苗。测试用生根培养基分别为 R₁: 1/2 MS+30 g/L 蔗糖+0.5 mg/L NAA; R₂: 1/2 MS+30 g/L 蔗糖+0.5 mg/L NAA+ 0.5 mg/L KT。

1.3 数据处理

试验数据采用统计学软件 SPSS 25 进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 外植体的选择对胚性愈伤诱导的影响

以生长无菌苗茎段 1 为外植体进行胚性愈伤诱导（图 1），一个月后观察发现，迷你、水蜜桃胚性愈伤组织平均诱导率分别为 0.42%和 0，且外植体容易诱导出芽，说明生长时间较长的无菌苗茎段不适于作为胚性愈伤诱导的外植体。采用原球茎和无菌苗茎段 2 为外植体，发现脱分化效果好，胚性愈伤诱导率高，诱导率约 30%（表 1）。不仅如此，迷你品种从接种到获得胚性愈伤周期短，培养 15 d 后即出现胚性愈伤萌动。本研究结果发现，以原球茎和无菌苗茎段 2 为外植体不仅可以显著提高胚性愈伤诱导效率，还可以缩短诱导周期。

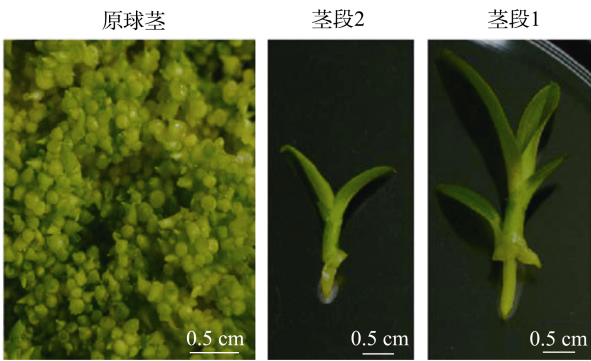


图 1 秋石斛迷你品种组培苗不同生长时期
Fig. 1 Different growth stages in vitro of *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium* Yaya Victoria

表 1 外植体对秋石斛胚性愈伤诱导率的影响
Tab. 1 Effects of explants on embryogenic callus (ECs) induction rate of *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*

品种 Cultivar	外植体 Explant	外植体接 种数 No. of explants	胚性愈伤诱 导数 No. of ECs	胚性愈伤诱导率 ECs induction rate/%
迷你	茎段 1	120	0.50±0.71 ^b	0.42±0.59 ^b
	茎段 2	120	35.00±1.41 ^a	29.17±1.18 ^a
	原球茎	120	37.50±0.71 ^a	31.25±0.59 ^a
水蜜桃	茎段 1	120	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
	茎段 2	120	30.00±2.83 ^b	25.00±2.36 ^b
	原球茎	120	37.00±1.41 ^a	30.84±1.18 ^a

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著（P<0.05）。
Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference (P<0.05).

2.2 植物生长调节剂 2,4-D 对胚性愈伤诱导的影响

将无菌幼苗茎段 2 置于不同愈伤组织诱导培养

基上, 1 周内未观察到胚性愈伤萌动现象, 2 周内开始出现白色近透明的微小颗粒, 一个月内, 这些微小颗粒随着培养基中 2,4-D 浓度差异而发生不同的变化。在高浓度 2,4-D (1、2 mg/L 2,4-D) 培养基上, 微小颗粒逐渐褐化或变成灰白色, 小部分茎段诱导出不定芽, 大部分茎段不能诱导出愈伤组织或不定芽, 直接褐化或转化为灰白色。继续放置 60 d 后, 观察发现有少量新的愈伤从褐化的茎段上长出, 可能是随着培养时间延长, 2,4-D 的浓度降低或功能活性减弱, 对外植体的毒害作用减少。该研究结果说明, 高浓度 2,4-D 并不适合秋石斛胚性愈伤诱导, 外植体容易出现褐化、死亡现象。

在低浓度 2,4-D (0.1~0.5 mg/L 2,4-D) 培养基

上, 可以诱导出不定芽、白色或淡黄色的胚性愈伤组织。30 d 后观察统计, 结果显示迷你在 CIM2 (MSD+0.2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L Kinetin) 培养基中的诱导效果最佳(图 2), 胚性愈伤诱导率为 31.11% (表 2), 但 0.1 mg/L 2,4-D 与 0.2 mg/L 2,4-D 诱导效果无显著差异; 水蜜桃在 CIM3 (MSD+0.3 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L Kinetin) 上形成颗粒状聚集胚性愈伤组织, 诱导率最高可以达到 22.78%; 三亚阳光在 CIM5 (0.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L Kinetin) 培养基中的诱导效果最佳, 平均诱导率高达 50%, CIM3-5 中的平均诱导率均高于 30%。以上结果表明, 2,4-D 浓度范围在 0.1~0.5 mg/L 间均有利于秋石斛胚性愈伤组织诱导。

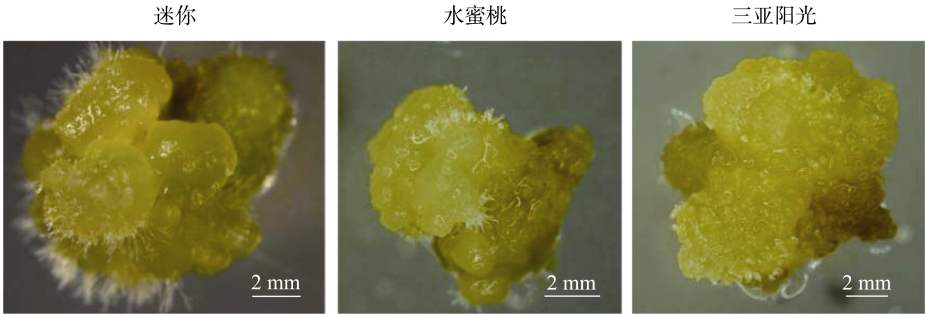


图 2 不同品种秋石斛胚性愈伤诱导

Fig. 2 Embryogenic callus (ECs) induce from different cultivars of *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*

表 2 2,4-D 对秋石斛幼嫩茎段胚性愈伤诱导及诱导率的影响

Tab. 2 Effects of 2,4-D on embryogenic callus (ECs) induction and induction rate from stem segments of *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*

培养基 Medium	2,4-D (mg·L ⁻¹)	KT (mg·L ⁻¹)	外植体 接种数 No. of explant	迷你 <i>Den. Yaya victoria</i>		水蜜桃 <i>Den. Swirl</i>		三亚阳光 <i>Den. Sonia Hiasakul</i>	
				胚性愈 伤诱导数	平均诱导率	胚性愈 伤诱导数	平均诱导率	胚性愈伤 诱导数	平均诱导率
				No. of ECs	Induction rate/%	No. of ECs	Induction rate/%	No. of ECs	Induction rate/%
CIM1	0.1	0.5	90	24.50±2.12 ^{ab}	27.23±2.35 ^{ab}	13.00±2.83 ^{ab}	14.45±3.15 ^{ab}	25.00±4.24 ^c	27.78±4.72 ^c
CIM2	0.2	0.5	90	28.00±1.41 ^a	31.11±1.57 ^a	7.00±1.41 ^b	7.78±1.57 ^b	25.50±2.12 ^c	28.34±2.35 ^c
CIM3	0.3	0.5	90	23.00±1.41 ^b	25.56±1.58 ^b	20.50±6.36 ^a	22.78±7.07 ^a	28.50±0.71 ^{bc}	31.67±0.78 ^{bc}
CIM4	0.4	0.5	90	13.00±2.83 ^c	14.45±3.15 ^c	5.50±0.71 ^b	6.12±0.78 ^b	34.00±2.83 ^b	37.78±3.14 ^b
CIM5	0.5	0.5	90	8.50±0.71 ^d	9.45±0.78 ^d	4.00±0.00 ^b	4.44±0.00 ^b	45.00±2.83 ^a	50.00±3.14 ^a
CIM6	1	0.5	90	2.00±1.41 ^e	2.22±1.57 ^e	6.00±5.66 ^b	6.67±6.29 ^b	19.00±1.41 ^d	21.11±1.57 ^d
CIM7	2	0.5	90	0.50±0.71 ^e	0.56±0.78 ^e	4.00±5.66 ^b	4.45±6.29 ^b	9.50±0.71 ^e	10.56±0.78 ^e

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 (P<0.05)。
Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference (P<0.05).

2.3 不同植物生长调节剂组合对秋石斛胚性愈伤增殖的影响

为进一步增殖并优化胚性愈伤的状态, 将诱导 30 d 左右的胚性愈伤转入 P₁、P₂、P₃、P₄ 增殖培养基中进行增殖研究。胚性愈伤在 4 种培养基

中继代 1 周时并无明显生长变化, 2 周后胚性愈伤开始出现增殖变大, 3 周后一些胚性愈伤表面出现芽点, 同时愈伤颜色变得更为嫩黄。以三亚阳光为例, 胚性愈伤在 P₄(MSD+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L KT) 中继代获得的胚性愈伤 (ECs) 颜

色嫩黄、形态致密，该状态为胚性愈伤组织较佳状态；在 P₁（MSD+0.1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT）中出芽率较高，并伴随出现胚性愈伤褐化现象（图 3）。从胚性愈伤形态上观察，IBA 与 KT 生长调节剂组合对秋石斛胚性愈伤的增殖效果虽然一般，但基本能够保持愈伤不分化。

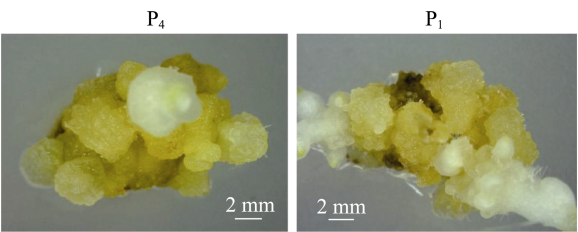


图 3 三亚阳光胚性愈伤增殖
Fig. 3 Embryogenic callus (ECs) proliferation of *Den. Sonia Hiasakul*

由表 3 可知，4 种培养基中的胚性愈伤增殖倍数因品种不同有所差异，但整体增殖倍数均不超过 1。水蜜桃胚性愈伤在 P₄ 培养基中增殖倍数显著高于 P₁、P₂，可见 IBA 与 KT 的组合优于 2,4-D 与 KT；三亚阳光胚性愈伤在 4 种培养基上的增殖效果差异不显著，但 P₄ 培养基中胚性愈伤的增殖倍数依旧最高。水蜜桃愈伤在 P₄ 培养基中增殖倍数显著高于 P₁、P₂，可见 IBA 与 KT 的组合较优于 2,4-D 与 KT。从胚性愈伤不定芽分化情况观察，3 个品种中，IBA 与 KT 植物生长调节剂组合不定芽分化率均显著低于 2,4-D 与 KT 的组合。结果说明生长素 IBA（吲哚丁酸）和细胞分裂素 Kinetin 组合有利于秋石斛胚性愈伤的增殖与保持。

表 3 不同植物生长调节剂组合对秋石斛幼嫩茎段胚性愈伤增殖的影响
Tab. 3 Effects of different hormone combinations on Embryogenic Callus (ECs) proliferation from Stem Segments of *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*

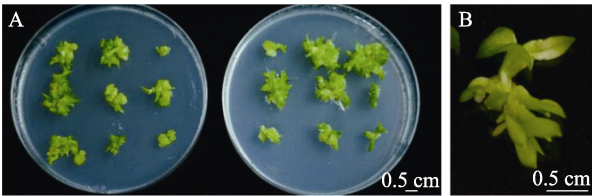
培养基 Medium	植物生长调节剂组合 Hormone combination		ECs 接种数 No. of ECs	迷你 <i>Den. Yaya victoria</i>		水蜜桃 <i>Den. Swirl</i>		三亚阳光 <i>Den. Sonia Hiasakul</i>	
				增殖倍数 Multiplication factor	不定芽分化率 Adventitious bud differentiation rate/%	增殖倍数 Multiplication factor	不定芽分化率 Adventitious bud differentiation rate/%	增殖倍数 Multiplication factor	不定芽分化率 Adventitious bud differentiation rate/%
P ₁	0.1 mg/L 2,4-D	0.5 mg/L KT	90	0.93±0.23 ^a	72.23±7.86 ^a	0.38±0.10 ^b	58.34±3.92 ^a	0.42±0.30 ^a	52.23±7.86 ^b
P ₂		0.1 mg/L KT	90	0.51±0.15 ^b	50.00±7.86 ^b	0.42±0.18 ^b	62.78±7.07 ^a	0.52±0.39 ^a	67.23±2.35 ^a
P ₃	0.5 mg/L IBA	0.15 mg/L KT	90	0.37±0.16 ^b	26.11±3.93 ^c	0.58±0.35 ^{ab}	31.11±3.14 ^b	0.69±0.56 ^a	38.34±3.92 ^{bc}
P ₄		0.5 mg/L KT	90	0.36±0.22 ^b	30.56±3.92 ^c	0.74±0.44 ^a	28.45±4.08 ^b	0.90±0.68 ^a	26.11±5.50 ^c

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ($P<0.05$).

2.4 植物生长调节剂组合对胚性愈伤分化不定芽的影响

研究表明培养基 1/2 MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 最有利于秋石斛顶芽和腋芽诱导原球茎，MS+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 适合于原球茎增殖^[5]。在此基础上，本研究将以上 2 种培养基进行融合改良，以 1/2 MS 为基本培养基，添加 1 g/L 花宝 1 号，采用 3.0 mg/L 6-BA 与 1.0 mg/L NAA 的生长调节剂组合。在进行胚性愈伤增殖过程中发现，0.5 mg/L IBA 与 0.15 mg/L KT 的组合，在光照条件下，分化状态更佳。因此尝试应用 IBA 和 KT 生长调节剂组合进行胚性愈伤分化研究，将嫩黄、致密且状态一致的胚性愈伤分别接种到 F₁ 和 F₂ 培养基上，16 h/d 光周期条件下比较胚性愈伤分化情况，结果显示胚性愈伤在

F₁ 和 F₂ 培养基中均可分化出不定芽（图 4），60 d 后即可分化获得形态完整、翠绿且生根的小苗。胚性愈伤在分化成不定芽的过程中，会先转变成类原球茎，然后迅速发展成不定芽，促进更多芽点的产生形成丛生芽。由表 4 可知，3 种秋石斛



A：分化 30 d 不定芽；B：分化 60 d 再生植株。
A: Adventive bud from 30 d differentiation of embryogenic callus;
B: Regeneration plant comes from 60d differentiation.

图 4 秋石斛分化再生过程（三亚阳光）
Fig. 4 The process of differentiation and regeneration of *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium* (*Den. Sonia Hiasakul*)

胚性愈伤在 F₂ 培养基上的不定芽再生率均高于 F₁, 平均每团愈伤出苗数多 1 株, 但 2 种培养基的分化效果无显著差异。

2.5 植物生长调节剂组合对组培苗生根的影响
生长素 NAA 和细胞分裂素 KT 对 3 种秋石斛不定芽生根的影响进行了研究。30 d 后统计发现,

单独使用 NAA 或 NAA 与 KT 组合使用均能使不定芽生根 (表 5, 图 5), 平均每株生根数在 5 根左右, 根长约 1.3 cm, 2 种生根培养基生根效果无显著差异。由此可见, 是否添加 KT 不是影响秋石斛生根的主要因素, 而采用 0.5 mg/L NAA 作为生根培养基较为合适。

表 4 不同植物生长调节剂组合对不同品种秋石斛胚性愈伤分化的影响
Tab. 4 Effects of different hormone combinations on embryogenic callus differentiation to different cultivar of *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*

分化培养基 Differentiation medium	品种 Cultivar	胚性愈伤数 No. of ECs	不定芽胚性愈伤数 No. of ECs differentiation	胚性愈伤分化率 Rate of ECs differentiation/%	植株再生数 No. of plantlets regeneration per ECs
F ₁	迷你	24	21.00±1.41 ^a	87.50±5.90 ^a	6.00±2.30 ^a
	水蜜桃	24	22.00±1.41 ^a	91.67±5.89 ^a	3.92±2.15 ^a
	三亚阳光	27	20.50±0.71 ^a	85.42±2.95 ^a	4.08±1.24 ^a
F ₂	迷你	24	24.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	6.92±1.44 ^a
	水蜜桃	24	22.50±0.71 ^a	93.75±2.94 ^a	5.00±0.95 ^a
	三亚阳光	27	23.50±0.71 ^a	97.92±2.95 ^a	5.00±2.30 ^a

注: 相同小写字母表示处理间差异不显著 (P>0.05)。
Note: Same lowercase letters indicate insignificant difference among treatments (P>0.05).

表 5 NAA 和 KT 对不同品种秋石斛不定芽生根的影响
Tab. 5 Effect of NAA and KT on the rooting of adventitious shoots to different cultivar of *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*

生根培养基 Rooting medium	NAA (mg·L ⁻¹)	KT (mg·L ⁻¹)	品种 Cultivar	生根率 Rooting rate/%	平均根数 Average rooting number	平均根长 Average rooting length/cm
R ₁	0.5	0	迷你	100	5.30±1.06 ^a	1.45±0.41 ^a
			水蜜桃	100	5.00±1.33 ^a	1.42±0.39 ^a
			三亚阳光	100	7.90±1.10 ^a	1.12±0.14 ^a
R ₂	0.5	0.5	迷你	100	4.20±1.03 ^a	1.39±0.35 ^a
			水蜜桃	100	4.30±1.25 ^a	1.37±0.35 ^a
			三亚阳光	100	5.10±2.51 ^a	1.02±0.28 ^a

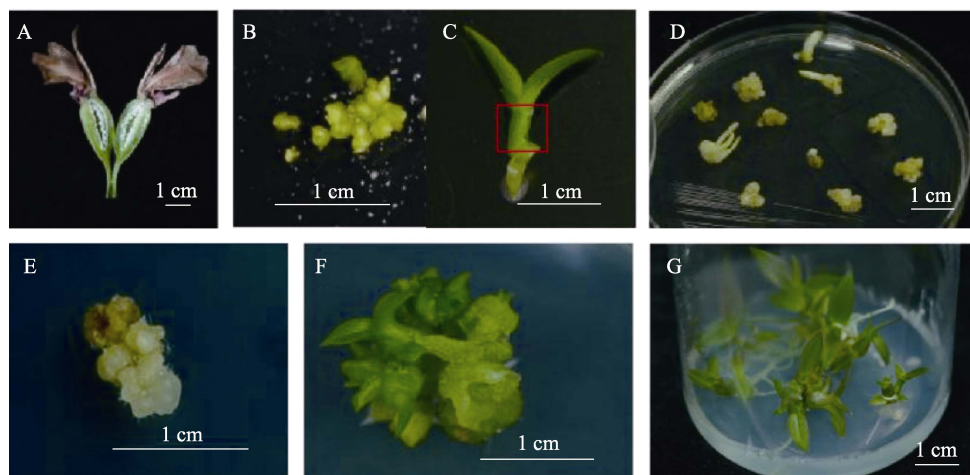
注: 相同小写字母表示处理间差异不显著 (P>0.05)。
Note: Same lowercase letters indicate insignificant difference among treatments (P>0.05).



图 5 秋石斛不定芽生根
Fig. 5 Rooting of *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium* adventitious shoots

2.6 秋石斛胚性愈伤再生途径的构建
从迷你品种可以看出, 将果荚消毒后接种于

苗培养基 (图 6A), 待原球茎和幼苗形成后, 手术刀处理原球茎或去除幼苗叶片与根部取幼茎为外植体 (图 6B), 放入胚性愈伤诱导培养基, 30 d 后诱导获得嫩黄、致密胚性愈伤组织 (图 6C); 然后将胚性愈伤切下, 转入继代培养基中暗培养进行增殖, 1~2 个月后即可获得嫩黄、质地均一的胚性愈伤组织 (图 6D); 将胚性愈伤转入分化培养基 1 个月后分化获得幼胚 (图 6E); 继续培养 2 个月后获得幼苗, 或转入生根培养基 (苗培养基) 30 d 后获得生长状态良好胚性愈伤再生植株 (图 6F)。因此, 建立了一套较为高效的秋石斛胚性愈伤诱导及植株再生方法。



A: 果荚及种子; B: 种子萌发 1 月后原球茎; C: 2~3 个月无菌幼苗 (红色框表示诱导胚性愈伤外植体); D: 诱导 30 d 后获得胚性愈伤; E: 胚性愈伤增殖; F: 胚性愈伤再生 30 d 获得幼胚; G: 秋石斛再生苗生根。

A: Victoria pod and seed; B: Formation of protocorms after 1 month of seed germination; C: Sterile seedlings growing for 2~3 months (red box indicates explant use for ECs induction); D: Embryogenic callus obtained after 30 days of induction; E: ECs proliferation; F: ECs regeneration for 30 days to obtain somatic embryos; G: Plantlet rooting.

图 6 秋石斛迷你胚性愈伤诱导及植株再生流程图

Fig. 6 Schematic diagrams for *Den. Yaya Victoria* embryogenic callus induction and somatic embryo regeneration

3 讨论

3.1 基因型及外植体的选择是决定胚性愈伤诱导的主要因素

秋石斛胚性愈伤再生体系构建需要综合评价不同品种基因型、外植体类型和外植体生长阶段,筛选出最适宜的品种作为实验品系。本研究最初选取了 5 个品种进行胚性愈伤诱导试验,其中原生种 *Dendrobium bigibbum* 胚性愈伤诱导耗时长,诱导率低;粉红女孩杂交种自交结实率虽高,但胚性愈伤诱导率低,仅在 CIM3 培养基中可诱导少量胚性愈伤。因此,这 2 个品种都不适合作为遗传转化研究材料。相比之下,三亚阳光杂交种胚性愈伤诱导、分化效果都非常好,但由于该品种自交不亲和性,转基因性状无法通过有性繁殖遗传到下一代;迷你、水蜜桃 2 个品种则最佳,不仅自交亲和,且易于与其他品种杂交,该结果有利于后续转基因研究中获得纯合株系并将外源基因渗入到其它品系。本研究采用生长 2 个月的原球茎为外植体,该外植体更为幼嫩,脱分化效果佳,更适合用于胚性愈伤诱导,应用该外植体显著提高了胚性愈伤的诱导效率。

3.2 不同植物生长素和细胞分裂素的组合使用有利于胚性愈伤诱导及植株再生

生长素 2,4-D 常作为不同外植体体胚发生的主要诱导剂^[13-17],植物内源生长素 IBA 的分布对体细胞发生至关重要^[18]。本研究胚性愈伤诱导、

增殖、体胚分化及再生均为不同生长素和细胞分裂素组合使用。胚性愈伤诱导时植物生长调节剂的最佳配比是 0.1~0.5 mg/L 2,4-D 组合 0.5 mg/L KT; 2,4-D 是诱导出胚性愈伤的关键因素,这一结论与金青等^[19]诱导霍山石斛愈伤组织相似。胚性愈伤增殖继代时采用 0.5 mg/L IBA 组合 0.5 mg/L KT 具有较好的增殖与保持效果,所获得的胚性愈伤嫩黄、致密,生长状态均一;在分化出芽时将细胞分裂素 KT 0.15 mg/L 与 IBA 0.5 mg/L 组合,可以较好的分化获得不定芽;最后利用 0.5 mg/L NAA 实现秋石斛快速生根。不同阶段使用不同生长素,也能促进胚性愈伤诱导及胚发生途径植株再生^[20]。

3.3 秋石斛类原球茎与胚性愈伤之间容易相互转变

理论上,植物任何一部分均可以再生成完整植株,本研究中选用了不同外植体进行胚性愈伤诱导试验,结果发现在相同植物生长调节剂下,茎段诱导胚性效果最佳,且愈幼嫩的茎段对 2,4-D 及 KT 愈敏感。分化过程中,胚性愈伤逐渐转化为类原球茎^[21],从而形成大量不定芽。因此,在秋石斛中类原球茎与胚性愈伤相互之间是一个极易转变的过程,这是兰科植物中普遍存在的现象^[22]。研究过程中还发现 3 种秋石斛胚性愈伤增殖效果一般,容易形成类原球茎,可能是抑制胚性愈伤增殖的主要原因,这一现象与大花蕙兰黄金小神

童胚性愈伤诱导过程相似^[23]。

目前,关于石斛兰胚性愈伤诱导及再生的研究已有许多报道^[13-14, 17, 24-25],但秋石斛胚性愈伤途径再生的研究几乎未见报道。常见的石斛兰遗传转化通常以胚性愈伤或原球茎作为外植体^[12]。相比原球茎,胚性愈伤作为转基因外植体则无需经过脱分化,可直接将外源基因转入干细胞分化为转基因幼胚,再生形成完整植株,该转化途径能有效避免转基因嵌合体植株产生,是较理想的转化受体细胞。因此,本研究建立的秋石斛胚性愈伤再生体系将有利于后续秋石斛转基因分子育种研究。

参考文献

- [1] 尹俊梅, 陈金花, 杨光穗, 易双双. 海南热带花卉产业科技创新发展现状及建议[J]. 农业科技管理, 2016, 35(5): 57-60.
YIN J M, CHEN J H, YANG G S, YI S S. Discussions on current situation and suggestions of tropical flower industrial scientific and technological innovation in Hainan province[J]. Management of Agricultural Science and Technology, 2016, 35(5): 57-60. (in Chinese)
- [2] 徐路加, 华允芬. 石斛原球茎的组织培养研究进展[J]. 北方园艺, 2014, 309(6): 191-195.
XU L J, HUA Y F. Research advances on the tissue culture of protocorm of *Dendrobium*[J]. Northern Horticulture, 2014, 309(6): 191-195. (in Chinese)
- [3] 游云飞. 秋石斛茎段离体再生体系的建立[J]. 亚热带农业研究, 2018, 14(4): 271-275.
YOU Y F. Establishment of *in vitro* stalk regeneration system from stem explants of *Dendrobium hybrida*[J]. Subtropical Agriculture Research, 2018, 14(4): 271-275. (in Chinese)
- [4] 叶秀仙, 林榕燕, 黄敏玲, 钟淮钦, 林兵. 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, ZHONG H Q, LIN B. The study on *Dendrobium spp.* PLB propagation in liquid culture[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2017, 32(9): 959-962. (in Chinese)
- [5] 陆顺教, 易双双, 冷青云, 尹俊梅. 秋石斛原球茎途径再生体系的建立[J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 1014-1021.
LU S J, YI S S, LENG Q Y, YIN J M. The construction of regeneration system of *Dendrobium hybrida* through protocorm induction[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(3): 1014-1021. (in Chinese)
- [6] 陈齐明, 鲍晓红, 高小坤, 舒婷. 秋石斛丛生芽诱导增殖技术研究[J]. 福建林业, 2017, 193(6): 33-37.
CHEN Q M, BAO X H, GAO X K, SHU T. The techniques of cluster bud induction and propagation for *Dendrobium hybrida*[J]. Fujian Forestry, 2017, 193(6): 33-37. (in Chinese)
- [7] 叶秀仙, 林榕燕, 陈艺荃, 林兵, 钟淮钦. 秋石斛离体快速繁殖技术研究[J]. 福建农业学报, 2017, 32(8): 874-879.
YE X X, LIN R Y, CHEN Y Q, LIN B, ZHONG H Q. Rapid propagation of *Dendrobium spp.* using tissue culture[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2017, 32(8): 874-879. (in Chinese)
- [8] 陆顺教, 易双双, 任羽, 冷青云, 黄少华, 杨光穗. 秋石斛新生侧芽中部茎段组培快繁体系的建立[J]. 南方农业学报, 2015, 46(8): 1436-1441.
LU S J, YI S S, REN Y, LENG Q Y, HUANG S H, YANG G S. Establishment of tissue culture and rapid propagation system for middle stem of *Dendrobium hybrida* young lateral bud[J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(8): 1436-1441. (in Chinese)
- [9] 龚建英, 王华新, 陈宝玲, 唐迢冥, 蒙芳, 苏莉花. 泼墨石斛高位芽组培快繁体系的建立[J]. 南方农业学报, 2019, 50(1): 125-130.
GONG J Y, WANG H X, CHEN B L, TANG Q M, MENG F, SU L H. Establishment of tissue culture and rapid propagation system of *Dendrobium Enobi Purple* 'Splashi' [J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(1): 125-130. (in Chinese)
- [10] TEIXEIRA DA SILVA J A, WINARTO B. Somatic embryogenesis in two orchid genera (*Cymbidium*, *Dendrobium*)[J]. Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2016, 1359: 371-386.
- [11] LI C W, LIAO C H, HUANG X, CHAN M T. Orchids (*Orchidaceae* and *Phalaenopsis*)[J]. Methods in Molecular Biology, 2015(1224): 331-346.
- [12] DA SILVA J A, DOBRANSZKI J, CARDOSO J C, CHANDLER S F, ZENG S J. Methods for genetic transformation in *Dendrobium*[J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(3): 483-504.
- [13] 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.
YANG R J, WANG Q M, YAN L. Study on callus induction of *Dendrobium officinale*[J]. Subtropical Plant Science, 2014, 43(3): 259-261. (in Chinese)
- [14] 许丁帆, 李建科, 刘艳军, 罗锐, 白燕娇, 曹凌峰, 丁鹏玮, 黄俊轩. 铁皮石斛愈伤组织稳定培养体系的建立[J]. 天津农业科学, 2018, 24(8): 67-69, 90.
XU D F, LI J K, LIU Y J, LUO R, BAI Y J, CAO L F, DING P W, HUANG J X. Establishment of stable culture

- system of *Dendrobium candidum* callus[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2018, 24(8): 67-69, 90. (in Chinese)
- [15] HABIBAH N A, SAFITRI S, PRATIWI Y R, WIJAWATI N, MUSAFI F, PUSPITASARI A D S, YUNIASTUTI A. Callus induction from tuber of lesser yam (*Dioscorea esculenta*) on MS media supplemented by 2,4-D and kinetin[J]. Journal of Physics: Conference Series, 2021, 1918(5): 052029.
- [16] WAHYUNI D K, ROHMATIN N, PRAJOGA B, WARDOYO E, JUNAIRIAH, PURNOBASUKI H. Callus induction of *Justicia gendarussa* leaf explant (*Justicia gendarussa burm. f.*) with growth regulator 2,4-D, IBA and kinetin[J]. International Journal of Recent Technology and Engineering, 2019, 7(6): 452-456.
- [17] REFISH N M R, WANG L Q, FU C H, XU X P, JIN W W, LI M T, YU L J. Establishment and optimization of high efficiency embryogenic callus induction system in *Dendrobium candidum*[J]. African Journal of Plant Science, 2016, 10(4): 77-83.
- [18] CHEN Z, DEBERNARDI J M, DUBCOVSKY J, GALLAVOTTI A. Recent advances in crop transformation technologies[J]. Nature Plants, 2022, 8(12): 1343-1351.
- [19] 金青, 马绍璿, 蔡永萍, 何金铃, 林毅, 皮瑞. 霍山石斛类原球茎诱导及其发育过程研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(10): 1525-1530.
- JIN Q, MA S Y, CAI Y P, HE J L, LIN Y, PI R. Induction of protocorm-like bodies and its development from stem segments of *Dendrobium huoshanense*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(10): 1525-1530. (in Chinese)
- [20] 杨维, 刘心怡, 曾晶珏, 吴坤林, 房林, 吴沙沙, 翟俊文, 曾宋君. 朱顶红曼谷玫瑰愈伤组织途径再生体系的建立[J]. 热带作物学报, 2023, 44(5): 977-985.
- YANG W, LIU X Y, ZENG J Y, WU K L, FANG L, WU S S, ZHAI J W, ZENG S J. Establishment of callus regeneration system of *Hippeastrum* 'Bangkok Rose'[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(5): 977-985. (in Chinese)
- [21] 曾宋君, 郭贝怡, 孔鑫平, 房林, 李琳, 陈砚, 符稳群, 吴坤林. 兜兰离体快繁技术研究进展[J]. 热带作物学报, 2020, 41(10): 2080-2089.
- ZENG S J, GUO B Y, KONG X P, FANG L, LI L, CHEN X, FU W Q, WU K L. Advances in propagation *in vitro* of *Paphiopedilum*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(10): 2080-2089. (in Chinese)
- [22] 陈继敏, 高铤, 杨镇明, 梁擎中, 蓝伟泉, 邓樱. 兰科植物组织培养中原球茎与体胚概念的辨析[J]. 农业科技通讯, 2008, 36(10): 169-170.
- CHEN J M, GAO T, YANG Z M, LIANG Q Z, LAN W Q, DENG Y. Explanation of the concepts of protocorm and somatic embryo in tissue culture of Orchidaceae plants[J]. Bulletin of Agricultural Science and Technology, 2008, 36(10): 169-170. (in Chinese)
- [23] 席银凯, 杨武德. 大花蕙兰 '黄金小神童' 胚性愈伤组织诱导及植株再生研究[J]. 广西植物, 2022, 42(4): 682-690.
- XI Y K, YANG W D. Embryogenic callus induction and plant regeneration of *Cymbidium* Golden Elf 'Sundust'[J]. Guihaia, 2022, 42(4): 682-690. (in Chinese)
- [24] 张爱香, 左利兵, 刘会清, 常美花. 春石斛兰愈伤组织的诱导及分化培养基的筛选[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2011, 27(1): 36-37.
- ZHANG A X, ZUO L B, LIU H Q, CHANG M H. Selection of medium of induction and differentiation of callus of *Dendrobium nobile lindl*[J]. Journal of Hebei North University (Natural Science Edition), 2011, 27(1): 36-37. (in Chinese)
- [25] BUNNAG S, PIMDA W. Callus induction, plant regeneration, and cryopreservation of *Dendrobium findlayanum* based on an encapsulation-dehydration technique[J]. Acta Horticulturae, 2019, 1262(20): 149-160.