

# 基于正交实验法的铁皮石斛原球茎分化和生根条件研究

邵世光<sup>1,2</sup>, 侯北伟<sup>1</sup>, 周琪<sup>1</sup>, 张潇潇<sup>1</sup>, 卢蓓蓓<sup>1</sup>, 柏伟娅<sup>1</sup>, 邓余<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(2. 连云港师范高等专科学校, 江苏 连云港 222006)

[摘要] 利用 6-BA、IBA、pH 和培养基种类、琼脂浓度、KCl 浓度各三个因素三水平进行  $L_9(3^4)$  正交实验, 研究各因素对铁皮石斛原球茎分化和生根的影响。对实验统计通过极差分析及方差分析, 结果表明: 在基本培养基  $N_6$  中, 当 6-BA 的浓度为 2 mg/L、IBA 浓度为 0.2 mg/L、pH 值为 5.8 时, 原球茎最易于分化成丛生小苗; 影响原球茎分化程度的因素依次为 IBA 浓度 > 6-BA 浓度 > pH 值。铁皮石斛组培丛生苗生根的最优配方是:  $N_6 + 2.5 \text{ mol/L KCl} + 4 \text{ g/L}$  琼脂; 影响诱导生根的主要因素是 KCl 浓度, 其次是琼脂浓度, 最后是基本培养基种类。

[关键词] 铁皮石斛, 组织培养, 原球茎分化, 生根, 正交实验

[中图分类号] Q945 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)04-0098-05

## Studies on Condition Protocom Differentiation and Root Induction of *Dendrobium officinale* by Orthogonal Design

Shao Shiguang<sup>1,2</sup>, Hou Beiwel<sup>1</sup>, Zhou Qi<sup>1</sup>, Zhang Xiaoxiao<sup>1</sup>, Lu Beibei<sup>1</sup>, Bai Weiya<sup>1</sup>, Ding Xiaoyu<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences Nanjing Normal University, Nanjing 210046 China)

(2. Department of Biology, Lianyungang Teachers College, Lianyungang 222006, China)

**Abstract** To study the effects of different factors on protocorm differentiation and root induction of *Dendrobium officinale*, two groups of three kinds of factors on three levels were used by orthogonal design. The data were analyzed with range analysis and variance analysis. Results showed that the optimal media to induce cluster shoot from protocorm was  $N_6$  medium with 6-BA 2 mg/L and IBA 0.2 mg/L and the pH 5.8. The efficiency of the three factors was in sequence of IBA > 6-BA > pH. On the other hand,  $N_6$  medium with KCl 2.5 mol/L and agar 4 g/L was suitable for root induction of *Dendrobium officinale*. The main factor which influenced root induction was KCl concentration and the others minor factors were agar concentration and type of basic medium.

**Key words** *Dendrobium officinale*, tissue culture, protocorm differentiation, root induction, orthogonal experiment

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 系兰科 (Orchidaceae) 石斛属多年生草本植物, 为传统名贵中药, 具有养阴生津、温胃润肺、抗癌防老之功效<sup>[1,2]</sup>。铁皮石斛对生长环境要求苛刻, 多附生于悬崖峭壁的树干或岩石上, 种子需要与真菌共生才能萌发。近年来的过量采挖、生境的严重破坏, 造成其野生居群已濒临灭绝<sup>[3,4]</sup>。因此通过组织培养技术, 对铁皮石斛进行集约化人工栽培, 是保护和利用铁皮石斛资源的必要途径。

自 1960 年法国人 Gmorel 利用石斛茎尖组织培养无病毒植株的无性繁殖技术创立以来, 石斛组织培养技术逐步走向深入化<sup>[5]</sup>。目前, 有关铁皮石斛的原球茎分化和生根条件的研究大都基于单因素试验, 如不同培养基、激素浓度、无机盐浓度、碳源、pH 等以及香蕉、马铃薯等附加物<sup>[1,6-8]</sup>。但是铁皮石斛原球茎分化及生根受培养基中综合因素的共同影响, 不同因子的合理配置决定着培养基的科学性和高效性。运用正交实验设计可以精简试验次数、克服培养基配方设计的盲目性、大大提高工作效率和试验的可靠性。广东

收稿日期: 2009-05-08

基金项目: 国家自然科学基金 (30870234)、国家基础科学人才培养基金 (J0730650)、江苏省自然科学基金 (BK2008431) 资助项目。

通讯联系人: 丁小余, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物资源与生物技术。E-mail: dxyyn@263.net

省植物研究所关于籼稻花药的离体培养的报道,还相继在兰科植物中得到了应用<sup>[9]</sup>,但尚未应用于铁皮石斛的离体培养.本实验利用 6-BA、IBA、pH 和培养基种类、琼脂浓度、KCl 浓度各三因素三水平及空白对照分别设计两套  $L_9(3^4)$  正交实验<sup>[10]</sup>,以期分别得到有利于铁皮石斛原球茎分化和生根的理想培养基配方.

1 材料与方法

1.1 材料

铁皮石斛 (*D. officinale*) 种子于 2006 年 10 月 ~ 2008 年 11 月间采自浙江雁荡山山区用组织培养方法保存于南京师范大学生命科学学院植物资源与环境研究所的组培养室.

利用种子培养出的原球茎,在无激素 MS 培养基上经过多代的继代培养,达到生长旺盛状态.挑选处于同一生长期且没有分化的原球茎供原球茎分化实验,选择由原球茎分化出来的生长到 1 cm 的丛生苗供生根实验.

1.2 方法

1.2.1 原球茎分化及生根的正交实验

对 6-BA、IBA 及 pH 值三因素选取三水平研究其对原球茎分化的影响(表 1),设计  $L_9(3^4)$  正交实验形成 9 个不同的处理.将原球茎增殖后形成的拟原球茎分成直径 0.5~1.0 cm 大小接入待检培养基中.基本培养基为 N<sub>6</sub>,附加蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L,培养温度 25±1℃,每日光照 12 h 光照强度 1 600~2 500 lx 9 个待检培养基处理分别接种 10 瓶,每瓶接种 8 个,重复 3 次,50 d 后统计并参照下列公式计算繁殖系数.

繁殖系数 =  $\frac{\text{诱导产生芽的总数}}{\text{原球茎外植体的总数}}$

对培养基种类、琼脂浓度及 KCl 浓度三因素同样采取  $L_9(3^4)$  正交实验形成 9 个不同的处理对丛生苗生根条件进行研究(表 1).将丛生苗接种于待检培养基处理中,每个处理接种 10 瓶,每瓶接种 8 个,实验重复 3 次.培养基除该三因素外其他因素相同,即添加 NAA 0.2 mg/L、5% 土豆、30 g/L 的蔗糖、pH 5.8 培养时每日光照 12 h,光照强度 1 600~2 500 lx,培养温度 25±1℃,培养室湿度 60%~70%,45 d 后统计平均生根数、平均根长并观察根粗状况.

1.2.2 数据统计

依据方开泰的正交试验统计方法<sup>[10]</sup>,对观察及统计的数据利用 Excel 软件自编程序进行极差处理及方差分析.

2 结果与分析

为得到铁皮石斛原球茎分化及生根培养基的最优配方,对 9 个实验处理的 3 个重复试验结果取平均值进行统计.以空列数据估算模型方差,并参与正交试验的极差分析及方差分析,以便准确研究因素对比对原球茎分化及生根的影响.

2.1 不同实验处理对原球茎分化的影响

接种培养 7 d 后,原球茎颜色由淡绿色开始变为淡黄绿色,基部为白色透明状;14 d 后,原球茎开始出现膨大;30 d 左右,每个原球茎的茎顶均长出 2~3 片幼叶;40 d 后,原球茎分化形成簇生长的无根丛生芽,各处理组原球茎繁殖系数存在一定的差异.如表 2 所示,处理 4、5、7 繁殖系数较大而处理 1、6、8 繁殖系数较小.据观察繁殖系数较大的处理其分化状况也相对较好,其中处理 4 原球茎分化状况及繁殖系数均较好.

因素的主次以极差值的大小来衡量.极差值大表明此因素对试验的影响大,即此因素比较重要,反之

表 1 铁皮石斛原球茎分化及生根的参试因素及水平  
Table 1 Factors and levels in protocol differentiation and root induction of *Dendrobium officinale*

供试实验	因素	水平		
		1	2	3
分化条件	A: 6-BA 的浓度 (mg/L)	0.5	2	4
	B: IBA 的浓度 (mg/L)	0	0.2	0.5
	C: pH 值 (pH)	6.8	6.3	5.8
	D: 基本培养基	B <sub>5</sub>	MS	N <sub>6</sub>
生根条件	E: 琼脂含量 (g/L)	8	6	4
	F: KCl 浓度 (mol/L)	2	2.5	3

亦然. 不同处理对原球茎分化影响的直观分析见表 2 从原球茎的繁殖系数和各因素的 K 值及极差 (R) 值的结果可知, 该试验因素 B 即 IBA 的浓度的 R 值最大为 1.6, 而因素 C 即 pH 值的 R 值最小为 0.367, 因此可初步推断影响原球茎分化的主次程度为  $B > A > C$ . 根据各因素水平均值 ( $k_i$ ) 的大小, 可初步推断分化培养基的最优水平的组合为  $B_2A_2C_3$ .

以空列数据作模型误差, 以均方值低于模型误差的因素数据作实验误差, 对三因素 9 个处理进行方差分析. 结果见表 3 由表 3 可以看出试验因素 B (IBA 的浓度) 对原球茎分化的影响最大, 达到显著水平, 6-BA 浓度和 pH 值均未达到显著水平, 但 6BA 浓度方差处理结果较 pH 值大, 因此

就原球茎分化而言, IBA 的浓度对其影响占主导作用, 然后是 6-BA 浓度及 pH 值. 方差结果与极差分析结果一致, 验证了极差分析的准确性, 即最易使原球茎分化成丛生小苗的培养基因素配比为: IBA 浓度为 0.2 mg/L、6-BA 的浓度为 2mg/L、pH 值为 5.8

表 3 分化条件方差分析结果

Table 3 Variance analysis result of differentiation conditions

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	F <sub>α</sub>	显著水平
A	1.529	2	0.764	3.739	$F_{0.05}(2, 4) = 6.94$	
B	4.482	2	2.241	10.962	$F_{0.01}(2, 4) = 18.0$	*
C <sup>△</sup>	0.216	2	0.108	0.527		
误差 e	0.602	2	0.301			
误差 e <sup>△</sup>	0.818	4	0.204			
总和	6.829					

注: “\*”代表显著水平.

2.2 不同实验处理对丛生苗生根的影响

组培的丛生苗在生根培养基中培养 7 d 后, 根部略微膨大, 形成白色愈伤组织. 第 15 d 时有细根须出现, 随后根须逐渐变长变粗, 成簇状并且出现根毛, 45 d 后统计不同实验处理的生根情况略有差异. 从表 4 所示结果可见, 处理 8 中丛生苗的平均生根数、平均根长、根的粗壮等均较好, 生长状况最佳, 另外处理 2、4、9 的生长状况也较好.

表 4 生根条件正交试验结果

Table 4 Orthogonal experimental results of rooting conditions

实验处理	D: 基本培养基	E: 琼脂含量 /(g/L)	F: KC 浓度 /(mol/L)	空列	平均生根数	平均根长 /cm	根粗状况
1	1	1	1	1	4.8	2.6	++
2	1	2	2	2	6.9	3.4	+++
3	1	3	3	3	3.5	2.4	++
4	2	1	2	3	6.1	3.9	+++
5	2	2	3	1	3.1	2.5	+
6	2	3	1	2	5.7	3.6	++
7	3	1	3	2	2.6	2.9	+
8	3	3	2	1	7.6	4.3	+++
9	3	2	1	3	5.3	3.5	+++

对 9 个处理统计的平均生根数、平均根长及根粗状况分别进行极差分析, 其中根粗状况依据 “+” 号多少分别用数字 3、2、1 表示. 对三个统计量的极差分析结果见表 5 由分析结果可知, 影响平均生根数的三因素主次程度为  $F > E > D$ , 影响平均根长的三因素主次程度为  $F > D > E$ , 而影响根粗状况的三因素主次程度为  $F > D / E$ . 就生根的整体状况而言, F 因素即 KC 浓度对根的诱导产生及生长状况影响均最大, 虽

然对平均生根数及根长的影响在 D、E 因素上存在差异,但是生根培养基的最优水平的组合均为 F<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>3</sub>

表 5 生根条件极差分析结果

Table 5 Range analysis result of rooting conditions

因素水平	平均生根数				平均根长 /cm				根粗状况			
	D	E	F	空列	D	E	F	空列	D	E	F	空列
均值 1( <i>k</i> <sub>1</sub> )	5.067	4.500	5.67	5.167	2.800	3.133	3.233	3.133	2.000	2.333	2.333	2.000
均值 2( <i>k</i> <sub>2</sub> )	4.967	5.100	6.867	5.067	3.333	3.133	3.867	3.300	2.333	2.000	3.000	2.000
均值 3( <i>k</i> <sub>3</sub> )	5.167	5.600	3.067	4.967	3.567	3.433	2.600	3.267	2.333	2.333	1.333	2.667
极差 ( <i>R</i> )	0.200	1.100	3.800	0.200	0.767	0.300	1.267	0.167	0.333	0.333	1.667	0.667

对平均生根数统计结果进行方差分析,结果见表 6 由表 6 可以看到实验因素 F(KCl 浓度)比因素 E(琼脂含量)对原球茎生根数的影响较大,但两者均达到极显著水平,而因素 A 对生根数的影响甚微.对平均根长统计结果同样进行方差分析,结果显示因素 F、D 对根长的影响分别达到极显著及显著水平.根粗状况只是定性而非定量统计,因此未作方差分析.对生根状况的方差分析与极差分析结果也是高度一致,即诱导丛生苗生根生长最好的培养基因素配比为 2.5mol/L KCl 4 g/L 的琼脂并选择 N<sub>6</sub> 培养基.

表 6 生根数方差分析结果

Table 6 Variance analysis result of the number of roots

变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>F</i> <sub>α</sub>	显著水平
<i>D</i> <sup>△</sup>	0.060	2	0.030	1.000	<i>F</i> <sub>0.05</sub> (2,4)=6.94	
<i>E</i>	1.820	2	0.910	30.333	<i>F</i> <sub>0.01</sub> (2,4)=18.0	* *
<i>F</i>	21.840	2	10.920	364.000		* *
误差 <i>e</i>	0.060	2	0.030			
误差 <i>e</i> <sup>△</sup>	0.120	4	0.030			
总和	23.780					

注: “\* \*”代表极显著水平.

3 结论

3.1 三因素对原球茎分化的影响

IBA 作为植物生长素能促进细胞的生长,具有低浓度更有利于植物生长的特性,因此当 IBA 为 0.2mg/l 时原球茎的分化状况最好. 6-BA 在植物细胞分化中至关重要,过高或过低浓度都对分化不利,本实验结果与常俊等的实验结果一致<sup>[11]</sup>. 可能是因为 6-BA 直接或间接刺激了植物核酸代谢、诱导了相关基因表达,表现为翻译水平上的蛋白质大量合成和形态水平上的植物体生长加快.而 6-BA 与 IBA 浓度的比例合适才更有利于原球茎的分化和生长,本实验研究表明当 6-BA /IBA 的浓度达到 10: 1 时,对铁皮石斛原球茎退化现象的恢复效果最好.不同植物,植物的不同培养器官所需要的 pH 值也各不相同.植物组织离体培养选择 pH 的范围一般在 5.0~ 6.2 之间<sup>[12]</sup>.分析表明:当 pH 值过高时,原球茎易变黄,不太容易分化; pH 值为 5.8 时适宜原球茎的分化.

3.2 三因素对于丛生苗生根的影响

不同的培养阶段选择不同的培养基对植物培养的效果有一定的影响<sup>[13-15]</sup>.曾宋君等对 *D. officinale*, *D. loddigesii*, *D. waguii*, *D. densiflorum*, *D. finbriatum* 5 种石斛进行离体培养得出石斛的通用最适培养基是改良 N<sub>6</sub> 或 PT 培养基<sup>[16]</sup>.很多关于石斛的报道中都指出 N<sub>6</sub> 培养基更适于其生长<sup>[17]</sup>,这和本实验中得出的结论相一致.对培养基中琼脂浓度的影响则认为琼脂浓度对铁皮石斛诱导生根的影响远大于其对根生长状况的影响,可能因为琼脂的浓度低时培养基的质地较软,有利于根部的呼吸作用以及水分的交流,因而更有利于根的诱导及生长.在对石斛属植物离体培养中普遍应用酵母、马铃薯及香蕉泥等含钾离子的提取物作为添加剂,表明钾离子能够促进植物的生长发育特别是有利于根的生长<sup>[18]</sup>.本实验同样发现合适的 KCl 浓度不仅能诱导生根,对根生长如根的长短和根的粗壮等都有促进作用.

[参考文献]

[1] 李时珍. 本草纲目 (校点本) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1977: 383.

- [2] 吉占和. 中国石斛属的初步研究[J]. 植物分类学报, 1980, 18(4): 427-449
- [3] Chen K K, Chen A L. Analysis of Total Alkaloid in *Dendrobium nobile* Lindl [J]. Biology Chemistry, 1935, 111: 653-658
- [4] Nan G L, Tang C S, Kuehnle A R, et al. *Dendrobium orchid* contain an inducer of *Agrobacterium* virulence genes [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1997, 51(6): 391-399.
- [5] 张明, 夏鸿西. 石斛组织培养研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(6): 323-326
- [6] 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, (4): 231-235
- [7] Khosroushahi A Y, Valizadeh M, Ghasempour A, et al. Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata* [J]. Cell Biology International, 2006, 30(3): 262-269.
- [8] Nayak N R, Rath S P, Satyanarayan P. In vitro propagation of three epiphytic orchids *Cymbidium aloibium* (L) Sw, *Dendrobium aphyllum* (Roxb) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Han) Sw through thiazuron-induced high frequency shoot proliferation [J]. Scientia Horticulture, 1997, 71(3/4): 243-250
- [9] 黄闽敏, 刘晓芳, 曹青爽. 寒兰组培苗生根培养的多因子正交试验研究 [J]. 北方园艺, 2009(4): 53-55.
- [10] 方开泰, 马长兴. 正交与均匀实验设计 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 35-52
- [11] 常俊, 丁小余, 保曙琳, 等. 喇叭唇石斛组织培养的研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 313-316
- [12] 杜永光, 郝丽珍, 王萍, 等. 植物组织培养中琼脂浓度和 pH 对培养基凝固程度的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 623
- [13] Carlsw and B S, Stem W L, Judd W S. Comparative leaf anatomy and systematics in *Dendrobium*, sections *Aponum* and *Rhizobium* (Orchidaceae) [J]. International Journal of Plant Sciences, 1997, 158(3): 332-342
- [14] Lau D T, Shaw P C, Wang J, et al. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA [J]. Planta Medica, 2001, 67(5): 456-460
- [15] Reinert J, Bajaj Y P S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1977: 668-671.
- [16] 曾宋君, 程式君, 张京丽. 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究 [J]. 园艺学报, 1998, 25(1): 75-80
- [17] 王国梅, 韦鹏霄, 岑秀芬. 基本培养基和激素组合对金钗石斛原球茎增殖的影响 [J]. 广西农业科学, 2006, 37(1): 10-12
- [18] 谢寅峰, 徐丽, 王莹. 霍山石斛组培丛生芽诱导增殖及生根技术 [J]. 林业科技开发, 2007, 21(6): 72-74

[责任编辑: 孙德泉]