

金钗石斛转基因体系的建立

王 昊, 邓柠檬, 张雅文, 梁 山*

(广东省植物发育生物工程重点实验室//华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

摘要: 以金钗石斛种子为外植体建立组织培养体系, 在含 1.5 mg/L 6-BA MS 培养基中添加 0.5 mg/L NAA 和 2% 蔗糖能有效地诱导原球茎, 诱导率达 91.67%; 添加 0.25 mg/L NAA 和 3% 蔗糖则更适于原球茎分化形成不定芽; 添加 0.10 mg/L NAA 和 2% 蔗糖适宜于不定根的诱导. 同时建立了根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 转化金钗石斛的方法和体系: 使用根癌农杆菌 EHA105 侵染 30 min, 共培养 3 d 时, 金钗石斛的根段、根尖和组培幼苗的转化率最高, 而含腋芽的茎节则需要共培养 5 d. 文章所建立的组培体系与转基因体系将为探讨金钗石斛的基因功能和调控机制等生物学问题及建立稳定转化的再生植株提供技术手段.

关键词: 金钗石斛; 组织培养; 转基因; 品种改良

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5463(2019)02-0062-07

The Establishment of Genetically Modified *Dendrobium nobile* Tissues

WANG Hao, DENG Ningmeng, ZHANG Yawen, LIANG Shan*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development//School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: This study attempts the establishment of the tissue culturing system using *Dendrobium nobile* seeds as the starting materials. It is found that the MS medium supplemented with 1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+2% sucrose is the most suitable for the induction of protocorm, showing an induction rate of 91.67% after being cultured for 15 days. Adding 0.25 mg/L NAA and 3% sucrose to the MS medium with 1.5 mg/L 6-BA is more suitable to form adventitious seedlings with dark green sturdy leaves, and the addition of 0.10 mg/L NAA and 2% sucrose to the MS medium with 1.5 mg/L 6-BA is suitable for root emergency and growth. The transgenic system for *Dendrobium nobile* tissues is also studied. It is found that compared with GV1301 strain, the *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 strain can be used to obtain higher transformation rates. The rate of transformation using root segments, root tips and tissue-cultured seedlings as the starting materials reaches the highest when they are soaked with EHA105 for 30 minutes and then co-cultured for 3 days, but the rate of transformation using nodes with axillary buds reaches the highest if co-cultured for 5 days. The results of the present study can provide meaningful techniques for further research on *Dendrobium nobile* and the breeding of *Dendrobium* varieties.

Keywords: *Dendrobium nobile*; tissue culture; genetic modification; breed improvement

兰科 (Orchidaceae) 植物是世界上最大和最具多样性的开花植物之一, 全科约有 700 属 20 000 种^[1]. 石斛属 (*Dendrobium*) 是兰科中仅次于石豆兰属 (*Bulbophyllum*) 的第二大属, 全球共计约 1 000 种^[2], 中国具有 74 种和 2 个变种^[3]. 金钗石斛 (*Dendrobium nobile*) 是我国原生种, 除了具有极高的

花卉观赏价值外, 也是常用的名贵中药, 享有人间仙草的美誉, 其药理活性主要集中在抗肿瘤、降血糖和治疗神经系统疾病等^[4]. 野生金钗石斛多生长于树皮或岩石上, 开花多, 结果少. 每个果实可容纳 100 万粒种子, 种子细如尘^[5]. 由于种子缺少胚乳组织, 自然环境下很难萌发, 萌发率不超过 5%^[6]. 由于长

期的过度采挖和生态环境的严重破坏,以及其自然繁殖率低、生长进程缓慢,野生的金钗石斛已经十分稀少,1987年被列为濒危灭绝植物之一^[7]。

金钗石斛漫长的生命周期及较低的繁殖率严重地限制了其物种的保育、大规模人工栽培和新品种培育的发展,同时也限制了对其生长发育、胁迫响应等生物学过程的研究。利用组织培养和转基因技术在一定程度上可以为解决以上问题提供方案。已有许多国内外学者对石斛属植物进行快速繁殖的研究报道。1984年,首次报道成功获得霍山石斛试管苗^[8]。利用铁皮石斛^[9]、束花石斛^[10]、兜唇石斛等^[11]不同外植体获得再生植株的后续报道也接踵而至。建立组织培养体系是为了便于其遗传转化的研究,重要的是,如何建立快速高效的基因功能分析及性状检测的系统迫在眉睫。本文对金钗石斛组织培养体系和转基因方案进行了摸索,成功获得了转基因的金钗石斛组织,为后续研究各种生物学过程的分子调控机制提供了实验体系。

1 材料与方法

1.1 材料

金钗石斛幼苗购自云南宁洱县新兴石斛种植农民专业合作社,然后种植于华南师范大学兰花种植研究中心。每年春季,取开花植株进行人工授粉,经9~10个月后收获长势一致且硕大的成熟果荚使用,其它组织直接从成苗上收集。

所用菌种为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株GV1301和EHA105。质粒载体为含有GUS报告基因的

CAMBIA1391Z-GUS

(华南植物园邓书林研究员惠赠)。使用时,将保存于-80℃的菌种在含50 mg/L大观霉素(Spectinomycin)和60 mg/L利福平(Rifampin)的YEB固体培养基上28℃划线培养;2~3 d后挑取单菌落,接种于含50 mg/L大观霉素和60 mg/L利福平的YEB液体培养基中,于28℃、200 r/min培养14 h;然后吸取培养液,以1%接种量在相同条件下2次活化14 h培养至OD₆₀₀约为0.8,收集菌体备用。

1.2 试剂

蔗糖(分析纯,天津市福晨化学试剂厂)、琼脂、肌醇、活性炭均购自广州斯佳生物科技有限公司,乙酰丁香酮(Acetosyringone)、植物生长素NAA、细胞分裂素6-BA均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 金钗石斛组织培养 外植体消毒:成熟金钗

石斛果荚用自来水冲洗干净后,用75%乙醇浸泡消毒30 s,无菌水冲洗2次,然后使用体积分数10%的NaClO溶液浸泡15 min,再用无菌水清洗5次,最后使用无菌滤纸吸干表面残留水分。

原球茎的诱导:在无菌条件下,将消毒后的金钗石斛种子,以成堆的形式,播于表1所示的含0.5 g/L活性炭以及不同配比的6-BA、NAA和蔗糖的MS固体培养基上。每瓶播5堆种子,每个处理至少3瓶。培养条件为:25±2℃,16 h/8 h的光/暗周期,白冷光灯,光照强度为35~50 μmol/(m²·s)。15 d后种子可诱导形成原球茎,计算诱导率(诱导率=可形成原球茎的总堆数/总堆数,仅未出现污染的接种堆被纳入计算)。

不定芽诱导:无菌条件下,将原球茎均匀平铺于含1.5 mg/L的6-BA、3%蔗糖及不同NAA质量浓度的MS固体培养基上(表2),同上培养条件下培养2个月后观察生长状况。

不定根诱导:无菌条件下,将发芽小苗移植于添加不同NAA质量浓度和不同蔗糖质量分数的固体MS培养基(表2)中培养,以诱导生根形成完整组培幼苗,统计肉眼可见的根数量,并利用Image J软件(National Institutes of Health, Version 1.41)测量幼苗生根长度。

1.3.2 金钗石斛组织的转基因 将活化过的含有

CAMBIA1391Z-GUS

表达载体的根癌农杆菌菌液离心10 min收集菌体,用含100 μmol/L乙酰丁香酮(Acetosyringone)的MS液体培养基重悬,使之OD₆₀₀约为0.6,此为侵染液。

分别截取金钗石斛茎段和根,用清水洗净,挖取厚1~2 cm含腋芽分生组织的茎节备用。将根切割成长1~2 cm的根段备用。组培瓶中长势一致的幼苗也用做本研究的转基因材料。将上述茎节、根段及组培幼苗浸泡于侵染液中,28℃下100 r/min缓摇侵染30 min或60 min,取出后用真空泵抽气10 min,然后用无菌滤纸吸干外植体表面残留液体,置于含100 μmol/L乙酰丁香酮的MS固体培养基上,黑暗共培养3 d或5 d。以不含

CAMBIA1391Z-GUS

表达载体的根癌农杆菌处理的茎节、根段和组培幼苗作为阴性对照。

1.3.3 转基因材料的GUS组织化学显色 参照JEFFERSON等^[12]的方法,将拟转基因材料浸泡于GUS显色液中,37℃避光温育1~2 d;染色后加入无水乙醇使植物组织脱色,期间多次更换无水乙醇。

1.3.4 统计学分析 应用SPSS软件(IBM公司, Version 22.0)单因素方差分析(One-Way Analysis of Variance)进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 利用种子外植体诱导成苗

2.1.1 原球茎的诱导 许多石斛属植物组培体系中使用椰汁或香蕉汁作为糖的补充成分. 考虑到这些成分的组成存在较大的批次差异, 本研究检测了使用香蕉汁和蔗糖的差别. 研究结果显示: 使用香蕉汁作为糖原时, 原球茎最高诱导率为 100%, 最低诱导率为 70%, 与蔗糖作为培养基的糖类补充对原球茎的诱导没有显著差异. 因此, 在后续研究中将来源和质量较为稳定的蔗糖添加到培养基中.

本研究重点摸索了 $\rho(6\text{-BA})$ 、 $\rho(\text{NAA})$ 、 $w(\text{蔗糖})$

对原球茎诱导的影响. 将种子播种于表 1 所示的培养基中, 15 d 后在各种不同的培养基上均可观察到球状的原球茎(图 1A 和 B), 其中 P7 和 P8 培养基对原球茎的诱导率最高, 分别为 90.56% 和 91.67%, 且与诱导率最低的 P3 和 P4 培养基相比差异有统计学意义(表 1). 这些结果表明: 1.5 mg/L 6-BA 最适合原球茎的诱导, 质量浓度过低或过高都会抑制原球茎的诱导和生长. 因此, 后续研究中在 MS 培养基中添加 1.5 mg/L 的 6-BA. 同时发现当原球茎培养至 30 d 时, 含 1.5 mg/L 的 6-BA 及高质量分数蔗糖(3%) 和高质量浓度 NAA(0.25~0.50 mg/L) 的处理组中, 原球茎已开始分化形成不定芽(图 1C), 表明高质量分数的蔗糖和高质量浓度 NAA 有助于不定芽的分化.

表 1 不同激素质量浓度和蔗糖质量分数对金钗石斛种子诱导原球茎的影响

Table 1 The effects of different concentrations of hormone and sucrose on the induction of protocorm

培养基编号	$\rho(6\text{-BA}) / (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{NAA}) / (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$w(\text{蔗糖}) / \%$	种子堆数	诱导率 / %
P1	1.0	0.00	0	32	70.00±0.08 ^b
P2	1.0	0.10	1	20	80.00±0.08 ^b
P3	1.0	0.25	2	14	63.33±0.09 ^c
P4	1.0	0.50	3	14	61.67±0.18 ^c
P5	1.5	0.00	1	14	85.00±0.08 ^b
P6	1.5	0.10	0	13	76.67±0.02 ^b
P7	1.5	0.25	3	33	90.56±0.04 ^a
P8	1.5	0.50	2	21	91.67±0.08 ^a
P9	2.0	0.00	2	14	80.00±0.12 ^b
P10	2.0	0.10	3	14	76.67±0.15 ^b
P11	2.0	0.25	0	22	72.50±0.06 ^b
P12	2.0	0.50	1	14	78.33±0.12 ^b

注: 同列内不同字母表示差异有统计学意义($P < 0.05$).

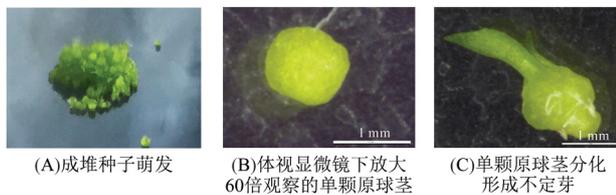


图 1 金钗石斛种子诱导原球茎

Figure 1 In vitro culturing of protocorm of *D. nobile* seed explants

2.1.2 不定芽的诱导 将原球茎平铺于含 1.5 mg/L 的 6-BA 和 3% 蔗糖的 MS 固体培养基中, 添加不同质量浓度的 NAA 以探讨生长素对不定芽诱导的

影响(图 2). 结果发现: 培养 60 d 后, 添加不同质量浓度的 NAA 均可使原球茎分化形成不定芽, 但生长情况各有差异. 添加 0.25 mg/L 的 NAA 可使幼苗生长粗壮高大, 茎节粗壮, 叶片硕大油绿, 更有助于不定芽的分化和生长; 添加 0.50 mg/L 的 NAA 可使幼苗深绿粗壮, 但茎节较矮小、叶片窄小; 而添加 0.75 mg/L NAA 后, 幼苗虽是深绿色, 生长发育却受到了抑制; 当 NAA 达到 1.00 mg/L 时, 对幼苗的生长抑制较为明显, 幼苗弱小且部分开始发黄. 可见, 0.25 mg/L NAA 更有利于不定芽的诱导.

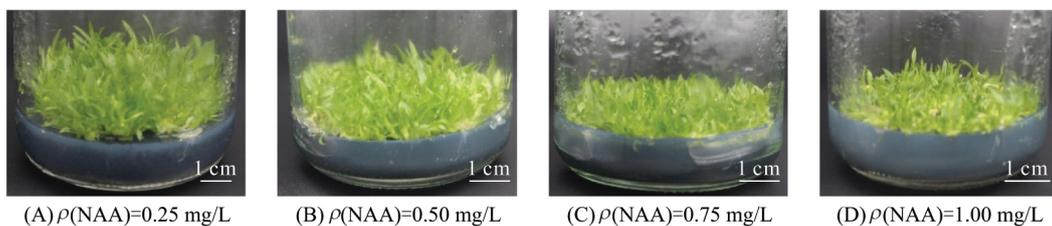


图 2 不同 NAA 质量浓度对不定芽诱导的影响

Figure 2 The effects of different concentrations of NAA on the induction of adventitious buds

2.1.3 不定根的诱导 选取 5 片叶片以上长势一致的组培幼苗, 转植至含不同质量分数蔗糖和不同质量浓度 NAA 的生根培养基中. 30 d 后大部分幼苗均有生根, 但生根情况各有差异(表 2). 1% 和 3% 蔗糖中的生根长度显著低于 2% 蔗糖中的根长度; 相同蔗糖质量分数下, 随着 NAA 质量浓度的升高, 根长度显著缩短(图 3A). 同样, 与含 1% 和

3% 蔗糖相比, 含 2% 蔗糖的培养基中幼苗平均生根数量最多, 但相同蔗糖质量分数下, NAA 对生根数量的影响不明显(图 3B). 以上结果表明: 添加 2% 蔗糖和较低质量浓度的 NAA 有助于金钗石斛幼苗生根, 而过高或过低质量分数的蔗糖及高质量浓度的 NAA 会抑制金钗石斛不定根的诱导和生长.

表 2 不同蔗糖质量分数和 NAA 质量浓度对诱导金钗石斛生根的影响

Table 2 The effects of different concentrations of NAA and sucrose on root emergence and growth

培养基编号	w(蔗糖) /%	ρ (NAA) / (mg·L ⁻¹)	株数	根数量	根长度 / cm
R1	1	0.10	24	1.50±0.13	0.40±0.02**
R2	1	0.25	24	1.58±0.15	0.44±0.03**
R3	1	0.50	24	1.58±0.16	0.33±0.03
R4	1	1.00	24	2.00±0.21*	0.27±0.02
R5	2	0.10	24	2.67±0.21**	0.55±0.03**
R6	2	0.25	24	2.42±0.23*	0.51±0.03**
R7	2	0.50	24	2.50±0.23**	0.45±0.03**
R8	2	1.00	24	2.17±0.21*	0.49±0.03**
R9	3	0.10	24	2.08±0.16*	0.39±0.04*
R10	3	0.25	24	1.92±0.16	0.31±0.02
R11	3	0.50	24	1.75±0.17	0.28±0.02
R12	3	1.00	24	1.67±0.17	0.30±0.02

注: 分别以 R1 培养基中的平均根数和 R4 培养基中的根长作为对照, 其它组分别与之比较进行差异显著性分析, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.001$.

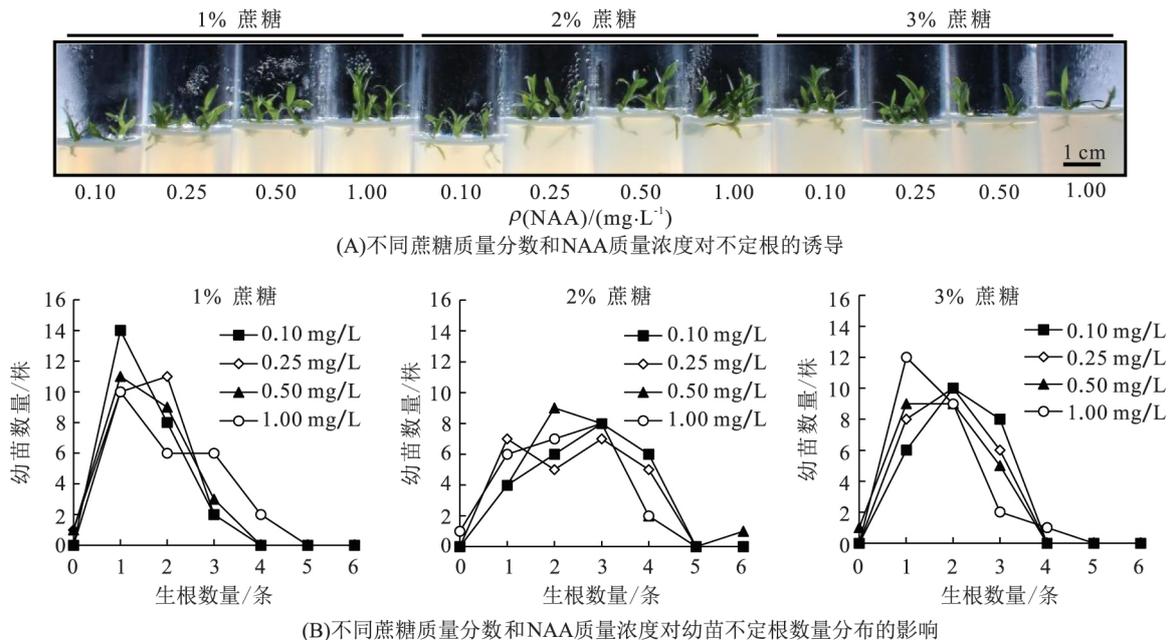


图 3 不同蔗糖质量分数和 NAA 质量浓度对不定根诱导的影响

Figure 3 The effects of different concentrations of sucrose and NAA on the induction of adventitious roots

2.2 金钗石斛转基因体系的摸索

本研究使用含有 GUS 报告基因的植物表达载体转化金钗石斛, 利用组织化学显色法检测 GUS 报

告基因的蛋白质产物的酶活性, 判断转基因成功与否. 利用这一检测方法, 探究了根癌农杆菌菌种、感染时间和共培养时间对金钗石斛不同组织和外植

体的转化率的影响.

2.2.1 不同组织转化的差异 根癌农杆菌菌种对金钗石斛不同组织的转化结果显示:金钗石斛茎节、根段、根尖和组培幼苗均能被转化.通过 GUS 显色发现 不含 GUS 载体的根癌农杆菌所侵染的茎节、根

段、根尖和组培幼苗均无显色反应;而使用含 GUS 报告基因的载体转化时 茎节的显色部位主要分布在腋芽分生组织处(图 4A),在根尖、根段的分生区以及生长区内部,GUS 显色同样明显(图 4B),原球茎及其分化而得的组培幼苗也能很好地被转化(图 4C).

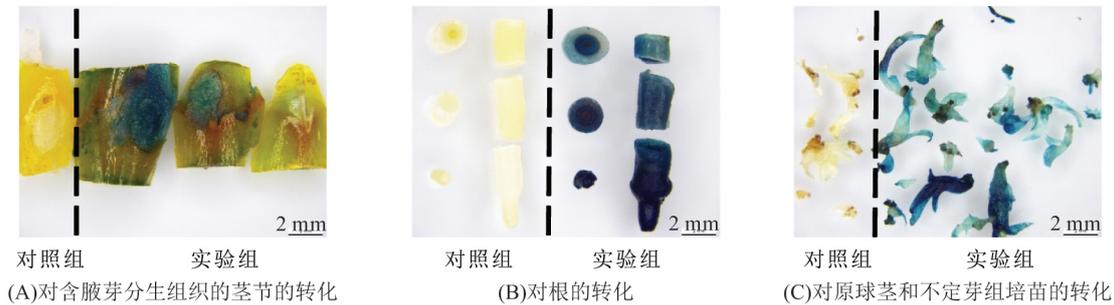


图 4 EHA105 对金钗石斛不同组织的转化

Figure 4 The transformation of *D. nobile* tissues with EHA105

2.2.2 不同根癌农杆菌菌种转化金钗石斛 农杆菌的选择是影响转化效率的重要因素,本实验选取了 GV1301 和 EHA105 转入了 *pCAMBIA1391Z-GUS* 的根癌农杆菌,分别转化金钗石斛的茎节、根尖、根段和不定芽组培苗.每次实验转化茎节 30 颗、根段 50 条、根尖 10 条和组培幼苗 150 棵.研究表明:在使用根癌农杆菌 OD_{600} 为 0.6 的侵染液侵染 30 min 后,黑暗共培养 3 d 的转化条件下,EHA105 对金钗石斛的茎节和组培幼苗的转化率显著高于 GV1301,平均转化率分别为 34.44% 和 82.44%;对根段(不含根尖)与根尖的平均转化率为 35.33% 和 73.33%,高于 GV1301,但差异没有统计学意义(图 5).由此表明:EHA105 对金钗石斛组织细胞的转化活性较高,更有利于金钗石斛不同组织间的转化.此外,在相同的转化条件下,金钗石斛组培幼苗和根尖的转化率最高,茎节的转化效率最低.

2.2.3 侵染时间对转化效率的影响 转化效率的高低除了受农杆菌菌种的影响外,侵染时间也是影响转化的重要因素.侵染时间过短,农杆菌侵染效果不好;侵染时间过长,农杆菌对外植体损伤严重,导致存活率降低而影响转化效率^[13].本研究比较了侵染 30 min 和 60 min 对金钗石斛茎节、根段、根尖和组培幼苗转化的影响(图 6),发现侵染茎节和根段中,侵染 60 min 比侵染 30 min 的转化率略高;根尖和组培幼苗则相反,侵染 30 min 的转化率相对要高一些.然而,对金钗石斛外植体的转化效率在 2 种侵染时间处理组间的差异无统计学意义,表明侵染时间对金钗石斛转化效率的影响不明显.

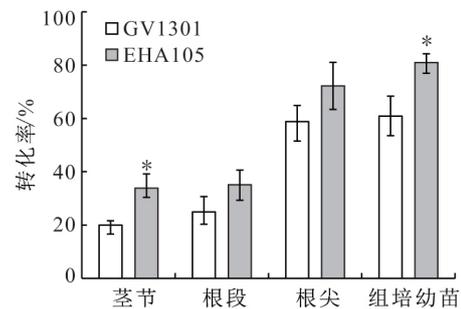


图 5 不同菌种对金钗石斛转化率的影响

Figure 5 The effects of different strains on the of *D. nobile* tissues conversion rate

注: * 表示相同外植体中不同处理间转化率的差异有统计意义, $P < 0.05$.

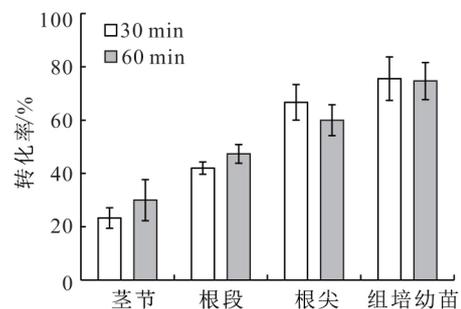


图 6 侵染时间对金钗石斛转化率的影响

Figure 6 The effects of infection time on the conversion rate of *D. nobile* tissues

2.2.4 共培养时间对转化效率的影响 共培养时间对转化效率的影响极大^[13],因此本研究也探索了金钗石斛不同外植体转化时的最佳共培养时间,将侵染 30 min 后的茎节、根段、根尖和组培幼苗与农杆菌 EHA105 分别共培养 3 d 和 5 d,统计 GUS 染

色情况. 结果表明: 茎节在共培养 5 d 的情况下平均转化率高达 38.89%, 显著高于共培养 3 d 时的平均转化率 24.44%; 但是根段、根尖和组培幼苗在共培养 5 d 的条件下, 平均转化率均有所降低, 分别为 36.00%、56.67% 和 64.44%, 尤其是组培幼苗转化率的下降与 3 d 相比差异具有统计学意义(图 7). 因此, 金钗石斛的茎节与农杆菌共培养 5 d 时更有利于转化, 而根段、根尖和组培幼苗则在共培养 3 d 的时候转化率更高.

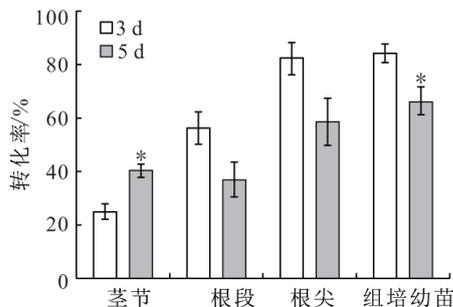


图 7 共培养时间对金钗石斛转化效率的影响

Figure 7 The effects of co-cultivation time on the transformation efficiency of *D. nobile* tissues

注: * 表示相同外植体中不同处理间转化率差异显著, $P < 0.05$

3 讨论

植物生长调节物质在愈伤组织、胚状体诱导和植株再生中起着重要作用. 尽管各类植物激素的生理作用有相对的专一性, 但在植物激素相互作用中, 彼此之间具有重叠和互补效应^[14]. 因此本研究在诱导原球茎和分化过程中采用了不同配比的 6-BA 和 NAA 以及蔗糖, 结果表明 6-BA 在原球茎的诱导过程中起到了关键的作用, 过低或过高质量浓度都会抑制原球茎的诱导和生长; 且 1.5 mg/L 的 6-BA 和 3% 的蔗糖促进了金钗石斛丛生芽的形成, 配合 0.25 mg/L 的 NAA 能更好地诱导其分化. 有研究表明: 当蔗糖质量分数达到 2% ~ 3% 时, 且具有 6-BA 的条件下, 对芽的形成有促进作用^[15-16], 与本研究结果相似.

在植物基因工程中, 以 A136、A281、C58 为染色体背景的 3 种根癌农杆菌菌株常被用于植物的遗传转化, 其侵染能力在应用于不同类型植株时也有很大的差异, A136 中的 EHA105 转化效果在很多种植物当中被认为是最好的^[17-18]. 本研究以 EHA105 和 GV1301 为侵染菌种, 同样发现 EHA105 的侵染能力更适合于转化金钗石斛的不同组织.

侵染时间是影响转化率的一个重要因素, 但是对金钗石斛不同组织分别侵染 30 min 和 60 min, 经 GUS 染色发现, 茎节、根段、根尖和组培幼苗都能转化, 但是差异无统计学意义, 因此, 适宜于金钗石斛转化的侵染时间是 30 min 或者更短. 贾彩红等^[19]利用农杆菌介导法转化石斛兰发现: 侵染 14 h 的类原球茎 PLBs (Protocorm-like bodies) 经 GUS 染色后没有 GUS 活性. 而柴明良和金斗焕^[20]利用农杆菌介导转化蝴蝶兰的研究显示: 农杆菌侵染时间为 10~30 min, 以 30 min 较好, 说明不同的兰花品种对农杆菌的敏感性不同.

共培养时间对转化效率具有重要的影响. 当对金钗石斛共培养 3 d 时, 金钗石斛的根段、根尖和组培幼苗的转化率都相对较高, 而茎节的转化率则偏低; 但是当共培养时间达到 5 d 时, 情况则相反. 石斛的茎表面具有角质层, 下表皮垂周壁厚, 角质纹理明显^[21], 农杆菌难以侵入. 而幼嫩的腋芽分生组织位于茎的下表皮内部, 是主要的 GUS 显色部位, 因此适当地延长共培养时间能有效地提高茎节的转化效率. 也有研究报道, 在蝴蝶兰的转化实验中, 随着共培养时间的延长, 转化效率不但没有增加, 反而因共培养时间过长导致外植体细胞组织坏死和死亡^[22]. 由此可见, 石斛不同组织细胞间转化所需共培养时间不同, 对于具有幼嫩组织细胞的根和组培幼苗, 长时间的共培养则可能会引起幼嫩细胞组织坏死.

利用组织培养是获得稳定转化植株的途径之一. 本研究发现金钗石斛原球茎在诱导分化条件下, 培养至 30 d 时已有叶的形态结构, 成为组培幼苗, 转化后 GUS 基因的表达多在叶基. 可是, 组培幼苗不适宜用作稳定转化的受体, 因为转化的植株可能是嵌合体, 也有可能后续筛选中死亡^[23]. 然而, 原球茎则不同. MISHIBA 等^[24]证实蝴蝶兰原球茎是转化的优良受体. 本研究的结果表明: 从金钗石斛的一个果实出发, 可获得数以万计的原球茎, 通过诱导分化不定芽和根则可以获得再生植株. 以金钗石斛种子诱导形成的原球茎不仅是组织培养的极佳材料, 且容易处理, 因此是理想的转化受体材料. 本研究建立的金钗石斛转化体系和组织培养体系为后续深入研究金钗石斛的基因功能及其调控机制提供了良好的实验体系.

参考文献:

- [1] FAY M F, PAILLER T, DIXON K W. Orchid conservation: making the links [J]. *Annals of Botany*, 2015, 116 (3): 377-379.

- [2] YU H ,GOH C J . Molecular genetics of reproductive biology in orchids [J]. *Plant Physiology* 2001 ,127(4) :1390-1393.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第十九卷[M]. 北京: 科学出版社 ,1999: 291-294.
- [4] 周威,夏杰,孙文博,等. 金钗石斛的化学成分和药理作用研究现状[J]. *中国新药杂志* ,2017(22) : 2693-2700.
ZHOU W ,XIA J ,SUN W B ,et al. Current research status of chemical constituents and pharmacological effects of *Dendrobium nobile* [J]. *Chinese Journal of New Drugs* , 2017(22) : 2693-2700.
- [5] VELLUPILLAI M ,SWARUP S ,GOH C J . Histological and protein changes during early stages of seed germination in the orchid ,*Dendrobium crumenatum* [J]. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* ,1997 , 72(6) : 941-948.
- [6] 张明,夏鸿西,朱利泉,等. 石斛组织培养研究进展[J]. *中国中药杂志* ,2000 25(6) : 323-326.
ZHANG M ,XIA H X ,ZHU L Q ,et al. Research progress on tissue culture of *Dendrobium* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* 2000 25(6) : 323-326.
- [7] 张建勇,刘涛,袁佐清. 石斛属植物组织培养及遗传转化研究进展[J]. *安徽农业科学* ,2007 ,35(3) : 656-657.
ZHANG J Y ,LIU T ,YUAN Z Q. Research progress in dendrobium tissue culture and genetic transformation [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences* 2007 35(3) : 656-657.
- [8] 徐云鹃,于力文. 霍山石斛种子试管苗的培养[J]. *植物生理学通讯* ,1984(4) : 35-36.
- [9] 王立安,沈淑瑜,李煜照,等. 铁皮石斛种子试管苗的大量繁殖[J]. *安徽大学学报(自然科学版)* ,1989 (1) : 83-86.
WANG L A ,SHEN S Y ,LI Y Z ,et al. A mass propagation of tube-plantlets by seeds in dendrobium officinale [J]. *Journal of Anhui University* ,1989(1) : 83-86.
- [10] 史永锋,付开聪,张宁,等. 束花石斛快繁育苗技术的研究[J]. *中草药* 2005 36(3) : 438-441.
SHI Y F ,FU K C ,ZHANG N ,et al. Rapid propagation and breeding seedling technique for dendrobium chrysanthum [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* ,2005 , 36(3) : 438-441.
- [11] 杜刚,来天超,杨海英. 兜唇石斛的组织培养研究[J]. *北方园艺* 2012(8) : 140-141.
DU G ,LAI T C ,YANG H Y. Study on the tissue culture of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch [J]. *Northern Horticulture* 2012(8) : 140-141.
- [12] JEFFERSON R A ,KAVANAGH T A ,BEVAN M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *The EMBO Journal* ,1987 6(13) : 3901-3907.
- [13] MEN S ,MING X ,LIU R ,et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *Dendrobium orchid* [J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 2003 75(1) : 63-71.
- [14] BAI Y ,QU R . Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue [J]. *Plant Breeding* 2010 ,120(3) : 239-242.
- [15] UDOMDEE W ,WEN P J ,LEE C Y ,et al. Effect of sucrose concentration and seed maturity on in vitro germination of *Dendrobium nobile* hybrids [J]. *Plant Growth Regulation* 2014 72(3) : 249-255.
- [16] 杨玉萍,李宜芸,李茜雯,等. 紫锥菊叶柄高效再生体系的建立[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)* , 2015 47(4) : 94-97.
YANG Y P ,LI Y Y ,LI Q W ,et al. Establishment of an efficient regeneration system for echinacea purpurea petiol [J]. *Journal of South China Normal University(Natural Science Edition)* 2015 47(4) : 94-97.
- [17] HOOD E E ,HELMER G L ,FRALEY R T ,et al. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA [J]. *Journal of Bacteriology* ,1986 ,168(3) : 1291-1301.
- [18] JIN S G ,KOMARI T ,GORDON M P ,et al. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281 [J]. *Journal of Bacteriology* ,1987 , 169(10) : 4417-4425.
- [19] 贾彩红,张建斌,金志强,等. 不同转基因方法转化石斛兰的研究[C]//2006年中国园艺学会观赏园艺专业委员会年会论文集. 北京: 中国农业出版社 ,2006: 651-654.
- [20] 柴明良,金斗焕. 农杆菌介导的蝴蝶兰基因转化系统的建立[J]. *园艺学报* 2004 31(4) : 537-539.
CHAI M L ,JIN D H. Establishment of agrobacterium-mediated transformation in phalaenopsis [J]. *Acta Horticulturae Sinica* 2004 31(4) : 537-539.
- [21] 李学农. 常用中药石斛显微鉴别[J]. *海峡药学* 2008 , 20(3) : 84-85.
- [22] BELARMINO M M ,MII M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid [J]. *Plant Cell Reports* 2000 ,19(5) : 435-442.
- [23] 陈之林,段俊,曾宋君,等. 原球茎为转化受体的农杆菌介导石斛遗传转化[J]. *中山大学学报(自然科学版)* 2007 46(1) : 86-90.
CHEN Z L ,DUAN J ,ZENG S J ,et al. Agrobacterium-mediated transformation of dendrobium orchid by targeting protocorms [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* 2007 46(1) : 86-90.
- [24] MISHIBA K I ,CHIN D P ,MII M . Agrobacterium-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination [J]. *Plant Cell Reports* 2005 24(5) : 297-303.

【责任编辑: 成文 责任校对: 成文 英文审校: 程杰】