

文章编号: 1000-5692(2007)03-0372-05

铁皮石斛试管苗快繁体系

王 春, 郑勇平, 罗 蔓, 周芳勇, 余琼芳

(浙江森禾种业股份有限公司, 浙江 杭州 310021)

摘要: 铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 是一种名贵药用植物, 野生资源亟待保护, 必须通过试管苗快繁技术研究, 才能满足人们对它的需要。通过不同基本培养基对铁皮石斛进行种子发芽试验, 不同消毒方法对茎尖进行存活率试验, 不同植物生长调节物质组合对不定芽、原球茎和壮苗及根系的诱导试验的结果表明: 铁皮石斛胚培养最佳培养基为 $1/2$ MS (Murashige and Skoog) + 添加物 A + $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖; 4 种消毒方法中最佳消毒方法为 B, 外植物茎尖存活率可达 76.2%。不定芽诱导最佳培养基为 $1/2$ MS + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-苄基腺嘌呤(BA) + $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 萘乙酸(NAA), 诱导倍数 4.7。原球茎诱导最佳培养基为 $1/2$ MS + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, 诱导率为 58%。不定芽最佳生根培养基为 $1/2$ MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, 生根率为 100%, 平均生根数为 7.1 条。建立了铁皮石斛试管苗快繁体系, 为其广泛应用提供了依据。图 1 表 5 参 11

关键词: 植物学; 铁皮石斛; 组织培养; 不定芽; 原球茎

中图分类号: S723.1; Q943.1 **文献标志码:** A

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 又名黑节草, 俗称铁皮枫斗, 为兰科 Orchidaceae 石斛属 *Dendrobium* 多年生常绿草本植物, 是一种名贵药材, 《道藏》中它被列为中华九大仙草之首^[1]。产于安徽西南部, 浙江东部, 福建西部, 广西西北部, 四川、云南东南部, 生于海拔 1 600 m 的山地半阴湿的岩石上。主要药用成分石斛多糖是一种免疫调节剂。被国家列为重点保护的野生药材品种。铁皮石斛蒴果成熟时易开裂, 且种子粒径小, 自然繁殖率低。自古以来铁皮石斛药材来源主要依赖于野生资源。随着铁皮石斛在生物制药领域的广泛应用, 各类制品如铁皮枫斗晶、胶囊、粉剂等上市, 造成过量采收, 导致铁皮石斛野生资源枯竭, 原材料供应紧张, 无法满足市场需求, 以致用其他石斛冒充铁皮石斛, 损害消费者利益^[2,3]。近年来, 科研工作者对铁皮石斛组织培养快繁等技术进行了大量的研究, 在种子培养、茎尖培养和茎段培养等方面取得了一定的结果^[4-14]。作者通过实生苗培养和外植体灭菌方法对茎尖存活率的影响、不定芽诱导、原球茎诱导和分生苗生根培养等进行研究, 实现了铁皮石斛植株再生, 为获得大量优质的试管苗探索了一条有效的途径。

1 材料与方法

1.1 实生苗培养

1.1.1 蒴果选择 10~11 月是铁皮石斛蒴果成熟时期, 当蒴果外表转为褐色, 达到形态成熟而尚未开裂时采收。时间过早, 种子胚发育不全, 影响发芽率; 时间太迟, 蒴果破裂, 造成不必要的损失。

收稿日期: 2006-06-07; 修回日期: 2007-01-16

基金项目: 浙江省科学技术重点项目(2005C22082)

作者简介: 王春, 工程师, 从事花卉组培研究。E-mail: wangchun@senhe.com

1.1.2 蒴果消毒 先用体积分数为 70% 的乙醇脱脂棉擦拭果壳表面沟纹, 然后将整个果荚放入 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的次氯酸钠 (NaClO) 溶液中(加 2 滴吐温 20), 充分摇荡, 消毒 20 min, 再以蒸馏水冲洗 4~5 次。

1.1.3 培养基制备 采用 5 种培养基进行种子的发芽比较试验, 分别为 MS (Murashige and Skoog), 1/2 MS, 1/2 MS+添加物 A, Hyponex 1 ($3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 及 Hyponex 2 ($3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。所有培养基蔗糖质量浓度为 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂质量浓度 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.4~5.6。

1.1.4 播种培养 将蒴果用解剖刀切开, 用播种勺刮取种子均匀地播种在培养基上。30 d 后随机抽样, 每个小样 100 粒, 3 次重复, 统计发芽率、生长速度和胚的颜色。

1.2 分生苗的培养

1.2.1 外植体消毒 材料来源于广西西部野生铁皮石斛。选择高为 3~5 cm 的健康植株, 用刀片切取茎段, 用以下 4 种方法进行灭菌消毒: 方法 A, 将外层的叶和叶鞘剥去, 把整个茎尖切下, 放于体积分数为 70% 的乙醇中 30 s, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 升汞 (加 2 滴吐温 20) 中浸泡 8 min, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaClO 溶液中 20 min, 蒸馏水洗 4~5 次。方法 B, 先用体积分数为 70% 的乙醇脱脂药棉擦洗整个带叶和叶鞘的的幼茎, 再剥去下部叶和叶鞘, 留下包裹茎尖的 1~2 片叶, 在 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 升汞 (加 2 滴吐温 20) 中浸泡 8 min, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaClO 溶液中 20 min, 蒸馏水洗 4~5 次, 用刀背挤出茎尖接种。方法 C, 除在 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 升汞(加 2 滴吐温 20)中浸泡时间为 10 min, 其余同方法 B。方法 D, 除在 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 升汞(加 2 滴吐温 20)中浸泡时间为 6 min, 其余同方法 B。接种 2 周后, 统计各种消毒方法的污染情况。

1.2.2 培养基与培养条件 不定芽诱导培养基为 $1/2 \text{ MS}+0 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA}+0 \sim 0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}+100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 椰乳+ $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 海藻胶+ $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, 共 10 个处理。原球茎诱导培养基和原球茎增殖培养基均为 $1/2 \text{ MS}+0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA}+0 \sim 0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}+100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 椰乳+ $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 海藻胶+ $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, 共 19 个处理。pH 5.4~5.6。培养 45 d, 统计不定芽和原球茎诱导情况。隔 40~50 d 继代 1 次。

1.2.3 生根培养 当幼苗长到 2~3 cm 高, 有 3~4 张叶片, 3~4 条根时, 将幼苗移入生根培养基进行培养。每种培养基移入 100 株幼苗, 3 次重复。培养 60 d 后观测苗高、根系数量及长度。

2 结果分析

表 1 不同基本培养基对铁皮石斛无菌播种的影响

Table 1 Effects of culture mediums on *Dendrobium officinale* seedlings

2.1 不同基本培养基对铁皮石斛实生苗培养的影响

播种后前 5 d 进行暗培养, 之后进行光培养。培养 7~15 d 后, 胚开始膨大, 逐渐撑破种皮, 形成淡黄色原球茎。30 d 后

培养基编号	发芽率 /%	生长速度	胚颜色
MS	54	较快	黄绿(其中部分褐色)
1/2 MS	89	较快	黄绿
1/2 MS+添加物 A	100	快	绿
Hyponex 1	100	较快	绿
Hyponex 2	30	慢	黄(其中部分褐色)

顶端分生组织突出, 原球茎慢慢转变成绿色, 下半部有放射状吸收毛发生。从表 1 中看出, 发芽率以 1/2 MS+添加物 A 和 Hyponex 1 培养基最高, 达 100%, 胚的颜色为绿色, 生长健壮。1 MS 和 Hyponex 2 培养基的播种苗的胚为黄色, 部分胚呈褐色, 没有正常发芽而死亡。综合评判以 1/2 MS+添加物 A 培养基为最佳培养基配方, 说明添加物 A 对铁皮石斛种子萌发及生长有很好的促进作用。培养基 Hyponex 1 (氮 7:磷 6:钾 19) 比 Hyponex 2 (氮 20:磷 20:钾 20) 对种子萌发好, 说明氮素质量浓度过高不利于种子发芽, 会造成部分胚褐化而死亡。

2.2 不同消毒方法对外植体存活率的影响

不同消毒方法对外植体茎尖存活率有较大的影响。表 2 中可以看出, 铁皮石斛茎尖对消毒剂很敏感, 不同消毒方法的存活率之间存在很大差异。方法 A 和 C 消毒后大部分茎尖变白死亡, 说明消毒剂

表 2 不同消毒方法对外植体存活率的影响

Table 2 Effects of disinfectant methods on explant's livability

消毒方法	外植体数 / 个	污染数 / 个	白色枯死数 / 个	存活数 / 个	存活率 / %
A	98	8	75	15	15.3
B	101	11	13	77	76.2
C	96	6	61	29	30.2
D	103	73	0	30	29.1

在杀死菌类的同时也扼杀茎尖生长点。方法 D 消毒后茎尖大部分受污染而死亡, 说明灭菌不彻底。而方法 B 消毒后茎尖存活率达到 76.2%。

2.3 不同植物生长调节物质组合对不定芽诱导的影响

接种后 45 d 观察统计不定芽诱导生长情况。从表 3 可以看出:

1, 2, 5 和 8 号 4 种植物生长调节物质组合的培养基诱导倍数均低于 2 倍, 3 号培养基诱导倍数最高, 为 4.7 倍。培养基 BA 质量浓度小于 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 叶型都正常, BA 质量浓度过高, 容易出现茎节肿大, 节间变短和叶畸

形, 且叶色变浅。NAA 质量浓度小于 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时无根系发生, NAA 质量浓度在 0.50 和 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, BA 质量浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 有根系发生。综合评判激素组合 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 对不定芽的诱导率较高, 不定芽叶形正常, 且根系生长量少。

2.4 不同植物生长调节物质组合对原球茎诱导和增殖的影响

采用 19 种不同植物生长调节物质组合对原球茎(茎尖)的诱导, 经过 2~3 个月的时间, 观察其诱导率。结果表明(表 4): BA 大于 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有原球茎(PLB)发生; $1/2 \text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 组合的诱导率最高。原球茎增殖中发现 BA 大于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 PLB 虽然会增殖, 但 PLB 出现

表 3 不同植物生长调节物质组合的培养基对不定芽诱导的影响

Table 3 Effects of different plant growth regulators on buds induction

组合编号	NAA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	BA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	诱导倍数/倍	不定芽生长情况
1	0	0	1.0	正常, 无根
2	0.25	0.5	1.6	正常, 无根
3	0.25	1.5	4.7	正常, 根系生长量少
4	0.25	3.0	6.2	不定芽叶畸形, 无根
5	0.50	0.5	1.3	正常, 有根
6	0.50	1.5	3.2	正常, 有根(根较短)
7	0.50	3.0	3.6	不定芽叶形畸形, 无根
8	0.75	0.5	1.1	正常, 有根
9	0.75	1.5	2.3	正常有根(根较长)
10	0.75	3.0	2.8	不定芽叶畸形严重, 无根

表 4 不同植物生长调节物质组合的培养基对原球茎诱导和增殖的影响

Table 4 Effects of different plant growth regulators on protocorm induction and proliferation

组合编号	NAA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	BA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	原球茎诱导率 / %	增殖倍数/倍	愈合组织转化率 / %
1	0	0	0	1.2	0
2	0.25	0.25	0	3.1	0
3	0.25	0.50	0	5.6	0
4	0.25	0.75	24	6.8	54
5	0.25	1.00	28	7.1	100
6	0.25	1.25	21	7.2	100
7	0.25	1.50	16	6.4	100
8	0.50	0.25	0	2.4	0
9	0.50	0.50	0	3.8	5
10	0.50	0.75	38	6.7	48
11	0.50	1.00	58	6.9	100
12	0.50	1.25	43	6.5	100
13	0.50	1.50	24	5.9	100
14	0.75	0.25	0	2.3	0
15	0.75	0.50	0	3.0	8
16	0.75	0.75	13	5.8	56
17	0.75	1.00	32	7.2	100
18	0.75	1.25	37	6.8	100
19	0.75	1.50	46	5.5	100

玻璃化现象, 水渍状, 失去胚性, BA 小于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 PLB 增殖速度较慢。PLB 增殖最佳培养基为 $1/2\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$, 松散有绒毛状, 无变异, 40~50 d 继代 1 次, 每次可增殖 7~8 倍, 当达到一定量后可以放置于培养基中催芽, 培养 30~40 d。

2.5 不同植物生长调节物质组合对壮苗及根系诱导的影响

不定芽长到 2~3 cm 时, 移入生根培养基中进行生根培养, 当苗高 4~5 cm, 5 片以上叶片和 4~6 条根时, 就可移出瓶外种植。幼苗移入生根培养基 60 d 后观测记载苗高、根系条数和根系长度。从表 5 中可以看出, 3 号和 5 号组合, 即 $1/2\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 香蕉 *Musa nana* 和 $1/2\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA} + 100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 香蕉等 2 种培养基配方生根情况较理想, 生根率可达到 100%, 苗高达 7.1~7.6 cm, 根数达 6.7~7.1 条, 根长达 5.3~6.2 cm。说明 NAA 与 IBA 都能促使根与茎的生长, 且根长和根数与对照比较, 都明显增加, 最佳质量浓度均为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 5)。两者相比, 3 号配方的生根数量略多 (图 1)。

表 5 不同植物生长调节物质组合对壮苗及根系诱导的影响

Table 5 Effects of different plant growth regulators on growth and root induction

组合编号	NAA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	IBA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	苗高 /cm	根数/条	根长 /cm
1	0	0	5.4	3.5	4.5
2	0.25	0	5.8	5.5	5.3
3	0.50	0	7.1	7.1	6.2
4	0	0.25	6.3	4.8	4.1
5	0	0.50	7.6	6.7	5.6

3 讨论与小结

铁皮石斛无菌苗的不定芽诱导和增殖实验结果表明: 铁皮石斛对植物生长调节物质敏感, 提高 BA 质量浓度可导致叶片畸形。在原球茎诱导阶段, 必需有植物生长调节物质的诱导作用, 但在增殖阶段应该减少或不用植物生长调节物质。通过有机、无机和氨基酸及附加物成分调整培养基配方, 添加了水解酪蛋白和椰乳等, 效果明显。

铁皮石斛实生苗培养、器官发生途径实现植株再生(不定芽诱导和增殖成苗)和体胚发生途径实现植株再生(原球茎诱导和增殖成苗)等 3 种快繁技术各有优缺点。

实生苗培养技术优点为铁皮石斛每颗成熟蒴果有 10 000 粒以上的种子, 因此用少量的材料可以得到大量的无菌苗, 缺点是从播种到出瓶时间为 8~10 个月, 导致工作量较集中, 用工较难安排; 另外种子成熟一般在 10~11 月, 出苗在 6 月以后, 错过 3~5 月最好的练苗期。成熟蒴果极易开裂, 如何延长种子的储藏期需进一步研究。器官发生途径可以达到周年供苗, 但相对用工量多, 组培室占用面积大, 成本较高。体胚发生途径增殖速度较快, 可以达到周年供苗, 成本较低, 但铁皮石斛原球茎增殖 10 代以后就会出现退化, 表现为原球茎胚性消失, 只增殖不分化且有玻璃化现象, 应及时进行复壮或淘汰。



图 1 3 号组合配方中培养 2 个月的试管苗生长情况

Figure 1 Test-tube plantlets on No. 3 culture medium in 60 days

参考文献:

- [1] 陈存仁. 中国药学大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956.
- [2] 王世林, 郑光植, 何静波, 等. 黑节草多糖的研究[J]. 云南植物研究, 1988, 10(4): 389.
- [3] 包雪声, 顺庆生, 张申洪, 等. 中国药用石斛图志[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2004.
- [4] 曾宋君, 程式君, 张京丽, 等. 5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.
- [5] 蒋林, 丁平, 郑迎冬. 添加剂对铁皮石斛组织培养和快速繁殖的影响[J]. 中药材, 2003, 26(8): 539.
- [6] 陈薇, 才宁铄. 铁皮石斛茎段离体快繁[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(2): 145.
- [7] 周俊辉, 钟雪峰, 蔡丁稳. 铁皮石斛的组织培养与快速繁殖研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(1): 23-26.
- [8] 魏小勇. 铁皮石斛原球茎悬浮培养研究[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(4): 7-11.
- [9] 顾慧芬, 忻晓君. 铁皮石斛试管苗快速生长与栽培研究及多糖含量测定[J]. 中成药, 1999, 21(12): 658-659.
- [10] 王春. 石斛兰组织培养及快繁技术研究[J]. 浙江林业科技, 2002, 22(2): 39-40.
- [11] WILLMER C M, PADMASREE K, RAGHAVENDRA A S. A novel method of measuring volume changes of mesophyll cell protoplasts and the effect of mercuric chloride on their osmotically-induced swelling[J]. *J Exp Bot*, 1999, 50: 401-408.

Micropropagation of *Dendrobium officinale*

WANG Chun, ZHENG Yong-ping, LUO Man, ZHOU Fang-yong, YU Qiong-fang

(Zhejiang Senhe Seed Co., Ltd Hangzhou 310020, Zhejiang, China)

Abstract: *Dendrobium officinale* (iron-sheet dendrobium) is a rare plant species for medical use. Its present resource cannot satisfy the needs. Tissue culture is a quick and convenient path to produce more iron-sheet dendrobium. The tiny seeds were sowed on the basic culture medias of MS (Murashige and Skoog), half of MS ($1/2$ MS), Hyponex1 and Hyponex 2. And the fresh stems were sterilized in different ways, then cultured in the basic media added NAA or BA in different amounts. The results showed that $1/2$ MS + A (the additive substance) + $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sugar was the best medium for seeding; Method B was the best disinfection with the livability 76.2%; $1/2$ MS + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA was better for adventitious buds induction, with 4.7 buds on each explant; $1/2$ MS + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA was fine for protocorm induction, with the rate of 8%; $1/2$ MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA was better for rooting, with a 100% rate and 7.1 roots on each explants. The proliferation system can enlarge the application of *Dendrobium officinale*. [Ch, 1 fig, 5 tab, 11 ref.]

Key words: botany; *Dendrobium officinale*; tissue culture; adventitious buds; protocorm