

· 技术研究 ·

正交试验优选环草石斛 (*D. loddigesii* Rolfe.)
组培苗壮苗生产工艺吴明开¹, 朱国胜^{2,3}, 毛堂芬³, 刘作易^{2*}, 金家兴⁴, 毛秀华⁴

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵州 贵阳 550006; 3. 贵州省农科院生物技术研究, 贵州 贵阳 550006; 4. 兴义市吉仁堂药业公司, 贵州 兴义 562400)

摘要: 采取正交试验设计对环草石斛 (*Dendrobium loddigesii* Rolfe.) 组培苗壮苗进行了优化生产工艺研究, 以培养基(A)、添加物马铃薯汁液(B)、激素 NAA(C) 和 pH 值(D) 为因素, 以环草石斛组培苗的株高(cm)、茎粗(cm)、叶片数、叶面积(cm²)、根数、根长(cm)、丛生芽数、单株鲜重(g) 等各个性状的增加值为考察指标, 优选环草石斛组培苗壮苗的生产工艺。其中自己设计了一种改良培养基(WM), 结果显示, 改良培养基、添加物马铃薯汁液、激素 NAA 和 pH 值均对环草石斛组培苗壮苗产生显著影响, 其影响程度为培养基 > pH > 马铃薯汁液 > NAA。由此正交试验筛选出环草石斛组培苗壮苗较优生产工艺为 A₃B₃C₃D₂, 即培养基 WM, 添加马铃薯汁液 200 g/L, NAA 2 mg/L, pH 值 5.6。优选出的壮苗工艺经济, 简便, 苗壮根多且长, 适宜工厂化生产。

关键词: 环草石斛; 正交试验; 壮苗; 优选**中图分类号:** Q945**文献标识码:** A**文章编号:** 1007-7146(2008)02-0265-05Optimization to the Seedling Growth of *Dendrobium loddigesii*
Rolfe. *in vitro* by Orthogonal DesignWU Ming-kai¹, ZHU Guo-sheng^{2,3}, MAO Tang-fen³, LIU Zuo-yi^{2*}, JIN Jia-xing⁴, MAO Xiu-hua⁴

(1. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, Anhui, China; 2. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guiyang 550006, Guizhou, China; 3. Biotechnology Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, Guizhou, China; 4. Ji Ren Tang Pharmaceutical Co., Xingyi 562400, Guizhou, China)

Abstract: Optimization production techniques to the seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. *in vitro* was studied by orthogonal design L₉(3⁴), and the results showed that the best seedling technology was A₃B₃C₃D₂, namely which was WM medium supplemented with 200 mg/L potato juice and NAA 2 mg/L and the pH 5.6. The influence of factors were highly significant, and the efficiency was as follows: This technology is worthy of medium > pH > potato juice > NAA. This technology is inexpensive, simple and effective, which can be used as experimental basis of seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. in factory production.

Key words: *Dendrobium loddigesii* Rolfe.; orthogonal test; seedling growth; optimization石斛是常用名贵中药材, 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 多种植物的新鲜或干燥茎

* 收稿日期: 2007-05-26; 修回日期: 2007-11-21

基金项目: 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目[黔科合中药专字(2003)45号]**作者简介:** 吴明开(1970—), 男, 安徽枞阳人, 在读博士研究生, 研究方向为苔藓植物学, 生物技术。(电话) 0553-3878702; (电子信箱) bywmk1999@163.com

* 通讯作者: (电子信箱) liuzuoyi@yahoo.com.cn

的统称^[1]。环草石斛(*Dendrobium loddigesii* Rolfe.), 别名美花石斛、粉花石斛、小黄草等, 茎入药, 为贵州地道药材^[2], 早在《神农本草经》中就有记载, 并列为上品, 对西医感到很棘手的慢性萎缩性胃炎、心脑血管患、防癌抗癌以及防老抗衰等方面, 可能收到意外的满意疗效^[3]。环草石斛也为《中国药典》(2000 版) 收载, 主要分布于贵州的兴义、以及广西龙州等地区。由于其药用价值的开发逐渐深入和广泛利用, 需求量日益增多, 长期乱采滥挖, 加之人类活动的加剧, 大量采伐树木和环境污染, 环草石斛赖以生存的特异环境遭到破坏, 导致环草石斛资源日趋枯竭, 被国家列为三级濒危保护药用植物^[2]。为保护和综合开发利用环草石斛资源, 我们开展了环草石斛组培快繁的研究。通过组培快繁途径培育的大量组培苗, 通过壮苗阶段成为成苗, 才能出瓶到野外进行仿生栽培, 此阶段是从由实验室研究转化为工厂化大规模生产的关键环节之一。本文通过正交设计来优选环草石斛组培壮苗的生产工艺, 从壮苗阶段寻求环草石斛组培移栽成活技术的突破, 为工厂化大规模生产提供技术参考。

表 1 改良培养基(WM)的化合物成分(mg/L)
Tab.1 The composition of self-control culture medium

化合物成分 Compounds	NH ₄ NO ₃	KNO ₃	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂
化合物质量(mg) Mass of compounds	1 650	1 900	170	370	330

1 材料与方法

1.1 试验材料

环草石斛种子无菌萌发初代培养 50 天后, 经过在

1/2MS 培养基上的 60 天的继代培养, 选取 3 叶, 2~4 根生长状况基本一致的幼苗, 见图 1-10。

1.2 试验方法

正交试验设计: 以培养基(A)、添加物马铃薯汁液(B)、激素 NAA(C)和 pH 值(D)为因素, 采用 L₉(3⁴) 正交试验的方法(表 2), 以环草石斛组培苗的株高(cm)、茎粗(cm)、叶片数、叶面积(cm²)、根数、根长(cm)、丛生芽数、单株鲜重(g)等各个性状的增加值为考察指标, 优选环草石斛组培壮苗的生产工艺。其中自己设计了一种改良培养基(WM), 基本成分见表 1。每处理 12 瓶, 每瓶苗 5 株。

表 2 环草石斛组培壮苗正交试验因素水平表 L₉(3⁴)

水平 Level	因素 Factor			
	A 培养基	B 马铃薯汁液	C	D
	Culture medium	Potato juice(g/L)	NAA(mg/L)	pH
1	MS	0	0	5.0
2	1/2 MS	100	1.0	5.6
3	WM	200	2.0	6.2

2 结果与分析

从 2004-11-19 转接到 2005-04-04 出瓶, 出瓶前有照片(见图版 1-9), 每处理取 10 瓶, 前后两次测量并记录环草石斛组培苗的每株的株高(cm)、茎粗(cm)、叶片数、叶面积(cm²)、根数、根长(cm)、丛生芽数、单株鲜重(g), 求差, 计算平均值结果见表 3。本试验所用的数据处理的正交设计的直观分析是在 Excel 上自编程序进行处理。



图 1 以 MS, pH 5.0 处理环草石斛组培壮苗 105 天。
Fig.1 Seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. for 105 days by MS, pH 5.0.



图 2 以马铃薯汁液 100 g/L, NAA 1.0 mg/L, pH 5.6 处理环草石斛组培壮苗 105 天。
Fig.2 Seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. for 105 days by MS, potato juice 100 g/L, NAA 1.0 mg/L and pH 5.6.



图3 以MS,马铃薯汁液200 g/L,NAA 2.0 mg/L, pH 6.2处理环草石斛组培苗壮苗105天。

Fig.3 Seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. for 105 days by MS, potato juice 200 g/L, NAA 2.0 mg/L and pH 6.2.

图4 以1/2MS,NAA 1.0mg/L,pH 6.2处理环草石斛组培苗壮苗105天。

Fig.4 Seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. for 105 days by 1/2 MS, NAA 1.0 mg/L and pH 6.2.



图5 以1/2 MS,马铃薯汁液100 g/L, NAA 2.0 mg/L, pH 5.0处理环草石斛组培苗壮苗105天。

Fig.5 Seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. for 105 days by 1/2 MS, potato juice 100 g/L, NAA 2.0 mg/L, pH 5.0.

图6 以1/2 MS,马铃薯汁液200 g/L, pH 5.6处理环草石斛组培苗壮苗105天。

Fig.6 Seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. for 105 days by 1/2 MS, potato juice 200 g/L and pH 5.6.



图7 以WM,NAA 2.0 mg/L,pH 5.6处理环草石斛组培苗壮苗105天。

Fig.7 Seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. for 105 days by WM, NAA 2.0 mg/L and pH 5.6.

图8 以WM,马铃薯汁液100 g/L, pH 6.2处理环草石斛组培苗壮苗105天。

Fig.8 Seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. for 105 days by WM, potato juice 100 g/L and pH 6.2.



图 9 以 WM,马铃薯汁液 200 g/L, NAA 1.0 mg/L, pH 5.0 处理环草石斛组培苗壮苗 105 天。
Fig. 9 Seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. for 105 days by WM, potato juice 200 g/L, NAA 1.0 mg/L and pH 5.0.

图 10 环草石斛组培苗壮苗前
Fig. 10 Before seedling growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe.

表 3 环草石斛组培苗壮苗培养正交试验结果

Tab.3 Results of orthogonal design L₉(3⁴)

试验号 Test mark	株高 Plant height (cm)	茎粗 Stem width (cm)	叶片数 Leaf number	叶面积 Leaf area (cm ²)	根数 Root number	根长 Root length (cm)	丛生芽数 Shoot number	鲜重 Fresh weight (g)
1	2.25	0.00	0.08	0.96	3.78	0.3	1.04	0.51
2	4.57	0.03	1.02	1.69	2.35	3.73	0.65	0.83
3	2.91	0.03	0.82	0.97	2.33	2.78	0.96	0.73
4	3.31	0.04	0.2	1.69	2.35	2.34	1.05	1.01
5	3.19	0.08	1.01	1.15	1.65	0.87	0.94	0.57
6	4.39	0.1	1.64	1.98	4.83	0.96	0.78	1.03
7	4.91	0.14	1.47	1.93	4.61	3.75	1.48	1.26
8	2.17	0.06	0.34	0.78	3.4	1.73	0.95	0.61
9	2.81	0.11	0.42	1.16	2.74	4.42	1.12	0.53
平均数	3.39	0.06	0.78	1.37	3.12	2.32	1.00	0.79
标准差	0.95	0.04	0.52	0.43	1.04	1.38	0.22	0.25
极大值	4.91	0.14	1.64	1.98	4.83	4.42	1.48	1.26
极小值	2.17	0	0.08	0.78	1.65	0.3	0.65	0.51
极差	2.74	0.14	1.56	1.2	3.18	4.12	0.83	0.75
变异系数 cv(%)	28.0	65.2	67.5	31.4	33.4	59.3	21.9	31.7

表4 环草石斛组培苗多性状的综合评分

Tab.4 Comprehensive score of multi-character of seedling

试验号 Test mark	因素 Factor				各性状值之和 Sum of characters
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	9.92
2	1	2	2	2	16.87
3	1	3	3	3	14.53
4	2	1	2	3	15.99
5	2	2	3	1	14.46
6	2	3	1	2	21.71
7	3	1	3	2	26.55
8	3	2	1	3	18.04
9	3	3	2	1	22.31
1 水平评分和 Sum of scores in level	41.32	52.46	49.67	46.69	总和
2 水平评分和 Sum of scores in level	52.16	49.37	55.17	65.13	Total
3 水平评分和 Sum of scores in level	66.90	58.55	55.54	48.56	160.38
极差 R	25.58	9.18	5.87	18.44	
优选 Optimal selection				A ₃ B ₃ C ₃ D ₂	

表5 方差分析结果

Tab.5 Results of variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值
Source of variance	Square sum	Freedom	Mean square	
A	912.67	2	456.34	12.09**
B	1514.18	2	757.09	20.06**
C	1720.22	2	860.11	22.79**
D	1125.83	2	562.92	14.91**
误差	3058.07	81		

注：* * 表示极显著。
Note: * * Denote extremely remarkable, *P* < 0.01.

3 结论与讨论

从正交试验结果可看出,培养基、添加物马铃薯汁液、激素 NAA 和 pH 均对环草石斛组培苗壮苗产生显著影响,其影响程度依次为 A > D > B > C,即培养基 > pH > 马铃薯汁液 > NAA。环草石斛组培苗壮苗较优工艺路线是:A₃B₃C₃D₂,即 WM,马铃薯汁液 200 g/L, NAA 2 mg/L,pH 值 5.6。这与先前环草石斛单因子壮苗试验的结果比较一致^[5]。

在药用石斛组培苗研究中,普遍存在苗的质量不高,在实验室培养时间长,移栽成活率低,很难满足工厂化生产的要求^[4]。从试验结果看培养基对壮苗的影响最大,设计的改良培养基 WM 比一般在药用石斛组培苗壮苗中常用的培养基的壮苗效果更好^[1,5],不需要在培养基中加入微量元素、有机物、铁盐,用本地井水配制,只需要经过一次培养,苗壮根多且长,缩短

了在实验室的培养时间,大大节约了物力和人力,降低生产成本。同时简化培养方法是在锻炼环草石斛组培苗的壮苗阶段开始适应,其日后要面临的生长环境,有利于提高移栽存活率,为实现环草石斛工厂化生产以及对其资源保护提供技术保证。

References

[1] 杨显志,邵华,周成,等. 生物技术在药用石斛研究中的应用[J]. 中草药, 2002, 33(2):173-175.
YANG Xian-zhi, SHAO Hua, ZHOU Cheng, et al. Application of Biotechnology in Studies of Medicinal Plants *Dendrobium* Sw. [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002,33(2):173-175.

[2] 毛秀华,金家兴,刘作易,等. 环草石斛种子萌发培养的研究[J]. 贵州农业科学, 2004, 32(3):48-49.
MAO Xiu-hua, JIN Jia-xing, LIU Zuo-yi, et al. Study on Germinating of Seeds of *Dendrobium loddigesii* Rolfe[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2004, 32(3):48-49.

[3] 张纪立,何锦丽. 石斛药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(5):469-470.
ZHANG Ji-li, HE Jin-li. Advances in Pharmacology of *Dendrobium* Sw. [J]. Lishizhen Medicine and Material Medica Research, 2000, 11(5):469-470.

[4] 宋希强,罗毅波,钟云芳,等. 石斛属植物生物技术研究概况[J]. 园艺学报, 2005, 32(4):741-747.
SONG Xi-qiang, LUO Yi-bo, ZHONG Yun-fang, et al. Advances in the Biotechnology of *Dendrobium orchid*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32(4):741-747.

[5] 毛堂芬,刘作易,金家兴,等. 环草石斛试管苗壮苗培养的研究[J]. 种子, 2005, 24(6):22-24.
MAO Tang-fen, LIU Zuo-yi, JIN Jia-xing, et al. Studies on the Seedling Growth of *Dendrobium loddigesii* Rolfe in vitro [J]. Seed, 2005, 24(6):22-24.