

铁皮石斛原球茎增殖条件的研究

莫昭展, 贝学军

(玉林师范学院化学与生物系, 广西 玉林 537000)

摘要: 研究了不同基本培养基、不同浓度的脱落酸和培养方式对铁皮石斛原球茎增殖的影响。结果表明在改良 MS 中加入 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱落酸, 进行固体培养或液体振荡培养, 原球茎增殖的效果都比较好。

关键词: 铁皮石斛; 原球茎增殖; 组织培养

中图分类号: S567.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-7351(2007)04-0055-04

Study on the protocorm multiplication of *Dendrobium Candidum*

MO Zhao-zhan, BEI Xue-jun

(Chemistry and Biology Department of Yulin Normal College, Yunlin, Guangxi 537000, China)

Abstract: In this paper the impact of different basic media, ABA concentrations and culture ways on protocorm multiplication of *Dendrobium candidum* was studied, the result showed that modified MS supplied with sucrose $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and ABA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ using liquid or solid culture was better for protocorm multiplication.

Key words: *Dendrobium candidum* wall. ex lindl; protocorm multiplication; tissue culture

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* wall. ex lindl)是2000年版《中国药典》收录的5种药用石斛之一,为多年生附生草本,是传统名贵中药,有滋阴清热、生津益胃、止咳润肺的功效。但由于其栖息地范围狭窄,野外生长周期长,资源十分有限,加上人们长期采挖,自然资源日趋枯竭^[1]。为保护这一珍贵中药品种,许多学者对铁皮石斛的组织培养技术进行了研究,但大多数试管苗增殖系数低,试管苗茎细小、细弱,移栽成活率不高,影响了铁皮石斛试管苗快繁和大规模的工厂化生产^[2-5]。在石斛组织培养过程中,石斛原球茎增殖是一个十分关键的环节,通过诱导石斛产生原球茎,将所得的原球茎进行分化形成丛生芽,再将丛生芽培养成小苗,从而达到快速繁殖的目的。本文用铁皮石斛茎段诱导出的原球茎通过在不同基本培养基、不同浓度脱落酸(ABA)及不同培养方式进行增殖,试图找出适合原球茎增殖的培养基以及培养方式,为工厂化育苗提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

铁皮石斛原球茎来源于玉林师范学院化学与生物系植物组织培养室用茎段诱导出的原球茎,原球茎呈小圆锥状,每一团原球茎包含多个原球茎,原球茎顶端有鳞片状的叶原基突起,呈淡绿色,尚未分化出真叶。

1.2 方法

1.2.1 基本培养基的筛选 选取相同条件下生长良好的原球茎,切割成直径为1.5 cm团块,每种培养基接种5瓶,每瓶接种3个原球茎团,以MS、1/2 MS、改良MS(NH_4NO_3 减少50%,其余与MS相同)、N₆、B5为基本培养基,并附加蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,固体培养,培养45 d后观察原球茎增殖情况。

1.2.2 不同ABA浓度筛选 选取相同条件下生长良好的原球茎,切割成直径为1.5 cm团块,每种培养基接种5瓶,每瓶接种3个原球茎团,以改良MS为基本培养基,附加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖及不同浓度的ABA进行固体培养,培养45 d后观察原球茎增殖情况。

收稿日期: 2007-04-26; **修回日期:** 2007-06-06

基金项目: 广西教育厅科技项目;玉林师范学院博士启动项目

作者简介: 莫昭展(1974-),男,广西玉林人,玉林师范学院副教授,博士,从事植物种质资源利用的教学与研究工作。

1.2.3 不同培养方式的筛选 选取相同条件下生长良好的原球茎,切割成直径为 1.5 cm 团块,每种培养基接种 5 瓶,每瓶接种 3 个原球茎团,以改良 MS 为基本培养基,附加 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖及 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA,分别在固体培养基、液体静止培养基、液体振荡培养基上培养。

1.2.4 培养条件 光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$,光照强度 $1\,000\sim1\,600\text{ lx}$,温度 $25^{\circ}\text{C}\pm1^{\circ}\text{C}$,固体培养加琼脂 $7.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,液体培养不加琼脂,振荡培养把培养瓶放置于振荡培养箱(摇箱)中培养,转速 $95\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2 结论与讨论

2.1 不同培养基对原球茎增殖的影响

原球茎接种于不同的培养基上,经 45 d 后,原球茎增殖的结果见表 1。在 5 种培养基中,原球茎增殖倍数均呈上升的趋势,其中改良 MS 的增殖倍数明显高于其他培养基。但在增殖过程中,在不同培养基培养相同的时间,原球茎增殖速度不同,并且在相同的培养基中,不同时段增殖的速度也不同。刚接种 10 d 内,原球茎几乎不增殖,而且有少量的变黄,可能是原球茎还没有适应新的培养基;

从 10 d 到 20 d 时,增殖的速度有所增加,当达 30 d 时,MS、1/2 MS、B5、N6 出现最高峰,原球茎生长旺盛,未分化,但在改良 MS 培养 40 d 后,才出现最高峰,颜色鲜绿,不过此后原球茎的增殖速度有所下降。不同培养基中原球茎的生长状况如图 1 所示。

表 1 不同基本培养基对原球茎增殖的影响

培养基	原球茎增殖程度	颜色	紧密度	分化程度
改良 MS	+++++	深绿	紧密	未分化
1/2MS	++++	绿色	紧密	少量分化
MS	+++	绿色	疏松	少量分化
N6	++	绿色	疏松	少量分化
B5	+	绿色	疏松	少量分化

*: +++++ 表示原球茎增殖程度优秀,++++ 表示良好,+++ 表示中等,++ 表示一般,+ 表示差,以下相同。

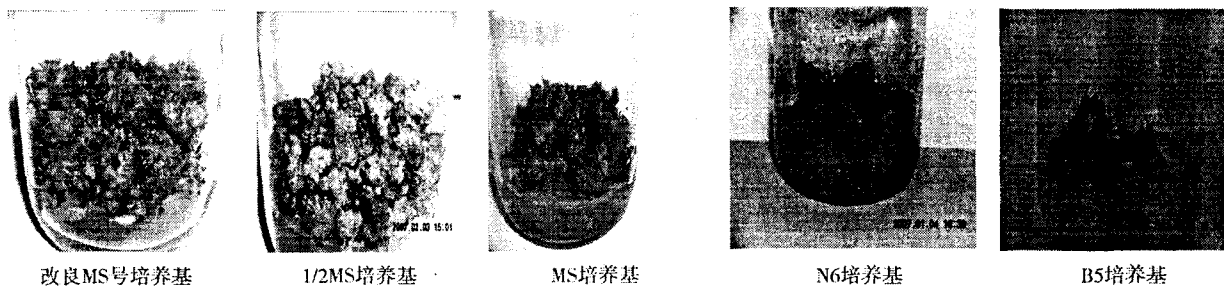


图 1 不同基本培养基对铁皮石斛原球茎增殖的影响

2.2 不同浓度 ABA 对原球茎增殖影响

将原球茎接种到 8 种 ABA 浓度不同的改良 MS 培养基中,原球茎增殖结果见表 2 和图 2。从表 2 可知,添加 ABA 对原球茎的增殖有明显的效果,尤其当 ABA 浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时效果最佳,但随 ABA 浓度的增加,原球茎增殖倍数呈现下降的趋势,同时分化加剧。

表 2 不同 ABA 浓度对原球茎增殖影响

ABA 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	原球茎增殖程度	颜色	紧密度	生长势	分化程度
0.1	++	浅绿	疏松	弱	少量分化
0.2	++	绿色	疏松	弱	少量分化
0.3	+++	绿色	紧密	强壮	未分化
0.4	+++	绿色	紧密	强壮	未分化
0.5	+++++	绿色	紧密	强壮	未分化
0.6	++++	深绿	紧密	较强壮	未分化
0.7	++++	深绿	疏松	较强壮	少量分化
0.8	++	深绿	疏松	强壮	高度分化

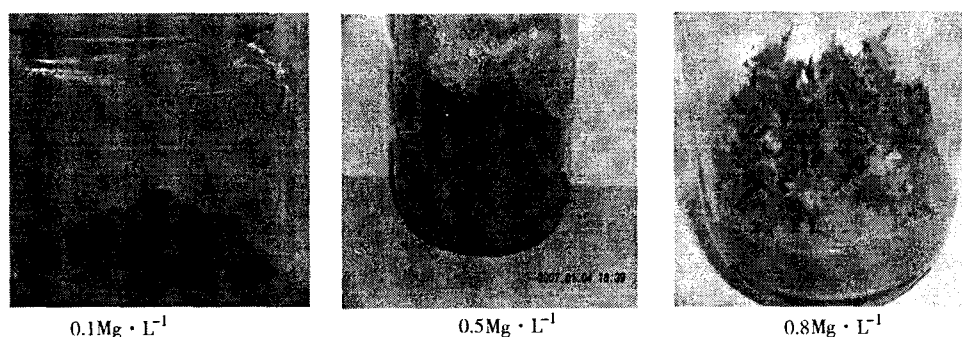


图2 不同 ABA 浓度对铁皮石斛原球茎增殖的影响

2.3 不同培养方式对原球茎增殖的影响

在原球茎接种改良 MS 的培养基上,附加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖及 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA,进行不同方式的培养,经 45 d 培养后,原球茎增殖结果见表 3,从表中可知,固体培养和液体振荡培养时原球茎增殖倍数均较高,显示固体培养和液体振荡培养是比较好的培养方式,其不同培养方式中原球茎生长状况如图 3。

表3 不同培养方式对原球茎增殖的影响

培养方式	原球茎增殖程度	颜色	紧密度	分化程度	颗粒大小	腐烂程度
固体培养	+++++	绿色	紧密	未分化	大	未腐烂
液体静止培养	+++	绿色	疏松	少量分化	小	严重腐烂
液体振荡培养	+++++	绿色	紧密	未分化	一般	未腐烂



图3 不同培养方式对原球茎增殖的影响

3 结论与讨论

1)用于石斛类植物组织培养的培养基有 MS, Nitch, Knudson C(KC), N6, B5, C17, SH, Kn, Vacin Went(vw), Winber(w), 1/2 B5, 1/2 N6, 1/2 SH, 1/2 C17, 1/2 MS, 1/2 VW 等^[6-9],但使用最多的是 MS。

本次研究结果表明在 5 种不同固体培养基中,改良 MS 培养基中的铁皮石斛原球茎增殖倍数最高,1/2 MS、MS 次之,N6 最差。在 MS、改良 MS、1/2 MS 中,大量元素的含量不同,微量元素含量相同,但铁皮石斛的原球茎增殖系数不同,说明铁皮石斛的原球茎的增殖与培养基中的无机盐浓度有关;在实验的过程中还发现,在不同培养基中原球茎的增殖速率到达高峰的时间有所不同,在改良 MS 培养基中的铁皮石斛原球茎增殖倍数最高,但到达增殖高峰的时间最长。

2)侯丕勇,郭顺星(2005)在对悬浮培养的铁皮石斛原球茎在固体培养基上的生长和分化状况进行研究的结果表明,NAA、IAA、IBA 和 GA 等激素有利于原球茎的生长与分化^[10]。

本次研究结果表明 ABA 激素浓度过高或过低都不利于铁皮石斛原球茎的增殖,适当的激素浓度才能有效地促进原球茎的生长增殖。当 ABA 浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,原球茎增殖最大,继续提高激素浓度时,原球茎的增殖速率下降,同时原球茎的分化加剧。

3)在 3 种培养方式中,固体培养和液体振荡培养时铁皮石斛的原球茎增殖倍数最高,显示这 2 种培养方式是比较适合铁皮石斛原球茎增殖的培养方式。液体静止培养的原球茎增殖倍数较低,并且在培养过

程中观察发现浸泡在培养基中的原球茎腐烂,培养一段时间后,打开瓶盖有恶臭味,这是因为原球茎浸泡在培养基中不能与空气充分接触,导致增殖受到抑制。

4)通过提高原球茎的净增殖系数,以大幅度提高细胞收获量,是药用植物细胞大量培养进行工业化生产中降低成本和提高生产率的重要途径之一。适宜的培养条件对铁皮石斛组织培养和快速繁殖非常重要,特别是原球茎增殖阶段,如果培养的条件不适宜原球茎的增殖,就很容易产生变异,从而影响试管苗的质量。所以为了提高试管苗的质量,仍需加大对原球茎增殖的条件研究,本实验通过不同基本培养基和不同 ABA 浓度以及不同碳源和不同培养方式的筛选,寻求适合铁皮石斛原球茎增殖的最佳培养基和 ABA 浓度以及碳源和培养方式,为以后铁皮石斛的研究以及开发应用提供技术依据。

参考文献:

- [1]陈瑞蕊,林先贵,施亚琴.药用石斛及其组培技术研究概要[J].江苏农业科学,2002(5):65-66.
- [2]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.
- [3]唐桂香,黄福灯,周伟军.铁皮石斛的种胚萌发及其离体繁殖研究[J].中国中药杂志,2005,30(20):1583-1586.
- [4]朱 艳,秦民坚.铁皮石斛茎段诱导丛生芽的研究[J].中国野生植物资源,2003,22(2):56-57.
- [5]蒋 波.铁皮石斛原球茎生长分化及生根壮苗研究[J].玉林师范学院学报:自然科学版,2005,26(3):66-69.
- [6]赵天榜,陈占宽.石斛组织培养与栽培技术的研究[J].河南农业大学学报,1994,28(2):128-133.
- [7]刘 骅,张治国.铁皮石斛试管苗壮苗培养基的研究[J].中国中药杂志,1998,23(11):654-656.
- [8]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,1999,17(4):231-235.
- [9]曾宋君.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.
- [10]侯丕勇,郭顺星.悬浮培养的铁皮石斛原球茎在固体培养基上生长和分化的研究[J].中国中药杂志,2005,30(10):729-731.

(上接第 50 页)

- [6]Parisa Monsef - Mirzai, Mythili Ravindran, William R. McWhinnie, et al. Rapid microwave pyrolysis of coal ——Methodology and examination of the residual and volatile phases [J].Fuel, 1995, 74(1): 20-27.
- [7]J.A. Menéndez, M. Inguanzo, J.J. Pis. Microwave - induced pyrolysis of sewage sludge [J]. Water Research, 2002, 36 (13): 3261-3264.
- [8]Liu Ronghou, Niu Weisheng, Yu Xiaofang, et al. Effects of biomass fast pyrolysis key parameter on yields and distributions of products [J]. Transactions of the CSAE, 2003, 19(5): 204-208.
- [9]W.T. Tsai, M.K. Lee, Y.M. Chang. Fast pyrolysis of rice straw, sugarcane bagasse and coconut shell in an induction - heating reactor [J]. J. Anal. Appl. Pyrolysis, 2006, 76 (1-2): 230-237.
- [10]潘丽娜.生物质快速热裂解工艺及其影响因素[J].应用能源技术,2004(2):7-8.
- [11]张素萍,颜涌捷,任铮伟,等.生物质快速裂解液体产物的分析[J].华东理工大学学报:自然科学版,2001,27(6):666-668.
- [12]Bridgwater, A.V., Meier, D., Radlein, D.An overview of fast pyrolysis of biomass[J]. Org. Geochem, 1999,30:1479-1493.
- [13]M E Boucher, A Chaala, C Roy. Bio-oils obtained by vacuum pyrolysis of softwood bark as a liquid fuel for gas turbines. Part I: properties of bio-oil and its blends with methanol and a pyrolytic aqueous phase [J]. Biomass Bioenergy, 2000, 19 (5): 337-350.
- [14]David Chiamonti, Anja Oasmaa, Yrjö Solantausta. Power generation using fast pyrolysis liquids from biomass [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2007, 11(6): 1056-1086.
- [15]施荫锐.GB/T13803.2-1999 木质净水用活性炭[S].北京:中国标准出版社,1999.