

铁皮石斛的离体培养和快速繁殖

郑志仁¹, 朱建华², 李新国¹, 娄玉霞¹, 黎万奎^{3*}

(¹ 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; ² 上海市林业总站, 上海 200072;

³ 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

摘要: 以野生铁皮石斛种子为外植体, 研究了不同基础培养基、天然附加物和植物生长调节剂对铁皮石斛种子萌发、原球茎增殖与分化、试管苗生根的影响。结果表明, 铁皮石斛种子萌发的适宜培养基为 MS + 0.5 mg/L NAA + 10% 土豆汁; 原球茎增殖与分化的适宜培养基为 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 10% 土豆汁; 试管苗生根的适宜培养基为 MS + 0.2 mg/L NAA + 10% 土豆汁。在此条件下建立的铁皮石斛快速繁殖体系, 原球茎在增殖与分化培养基上培养 3 个月左右, 可分化出大量高约 1~2 cm 的试管苗, 转入生根培养基中培养 3 个月左右后诱导出大量根系, 即可进行大田移栽。

关键词: 铁皮石斛; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: Q943.1; S367.7

文献标识码: A

Culture *in vitro* and rapid propagation of *Dendrobium officinale*

ZHENG Zhi-ren¹, ZHU Jian-hua², LI Xin-guo¹, LOU Yu-xia¹, LI Wan-kui^{3*}

(¹ College of Life and Environmental Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; ² Shanghai Forestry Station, Shanghai 200072, China; ³ Institute of Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: To establish the protocorm culturing system of *Dendrobium officinale*, the effects of different basal media, natural additives and phytohormones on the seed germination, hyperplasia and differentiation of protocorm, and rootage of test-tube seedlings were studied. Results showed that the medium suitable for the seed germination was MS + 0.5 mg/L NAA + 10% potato extract, the medium suitable for protocorm propagation and differentiation was MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 10% potato extract, and the medium suitable for rootage of the test-tube seedlings was MS + 0.2 mg/L NAA + 10% potato extract.

Key words: *Dendrobium officinale*; Tissue culture; Rapid propagation

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo), 属兰科附生兰类, 其药材俗称铁皮枫斗, 又称黑节草, 是一种传统名贵中药, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、润喉明目之功效^[1]。现代医学研究表明, 铁皮石斛的多糖、生物碱、氨基酸等成分具有提高免疫功能、抑制血栓形成、抑制肿瘤和延缓衰老的作用^[2,3]。由于石斛属植物自然繁殖率低, 加上长年无节制采掘, 自然资源日渐枯竭。铁皮石斛作为药用石斛中优质品种的代表, 为石斛属濒危物种之一, 目前已基本无野生资源可用, 被列为国家重点保护药用植物、中国珍稀濒危二级保护植物和世界二类保护植物。为了保护和可持续利用这一珍稀中药品种, 笔者以野生铁皮石斛种子为外植体, 开展铁皮石斛离体培养和快速繁殖研究, 为铁皮石斛大规模人工栽培提供依据。

收稿日期: 2007-12-13 初稿; 2008-01-30 二改稿

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI06A16); 上海市科委中药现代化专项(07DZ19723)

作者简介: 郑志仁(1966-), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物组织培养方面的研究

* 通讯作者, Tel: (021)51323036; E-mail: li-wankui@hotmail.com

1 材料与 方法

1.1 植物材料

野生铁皮石斛材料采自浙江省江山市江郎山国家级自然风景区,经浙江省医学科学院张治国研究员鉴定为铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)。

1.2 培养基

MS、1/2 MS、B₅、N₆、Kc 培养基均按常规方法配制,添加 30.0 g/L 蔗糖、7.0 g/L 琼脂,pH 5.8,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.3 植物材料表面消毒

取铁皮石斛未开裂的蒴果,流水冲洗 1 h,在超净工作台上用 75%酒精处理 1 min 后再用 0.1%升汞液浸泡 12~15 min,倒去升汞液,用无菌水冲洗 4~5 次,每次不少于 5 min,后用无菌纸吸干果实表面水分。

1.4 人工培养条件

培养室培养温度为(24±1) ℃,光照强度为 1 500~2 000 lx,光照时间为 12 h/d。

1.5 铁皮石斛种子的萌发

在超净工作台上将消毒好的铁皮石斛蒴果切开,挑取种子分别洒播于表 1 所示的 MS、1/2 MS、B₅、N₆、Kc 培养基中,培养 1 个月统计种子萌发率,考察不同基础培养基对种子萌发的影响。以 MS 为基本培养基,一部分按表 2 添加激素,得 MS1、MS2、MS3、MS4 培养基,一部分按表 3 分别添加天然添加物,得 MS5、MS6、MS7 培养基,以上培养基分别播入种子,培养 1 个月统计种子萌发率,以 MS0 为对照,考察不同激素组合和天然添加物对种子萌发的影响。

表 1 不同基本培养基对种子萌发的影响

Table 1 Effects of different basal media on seed germination

基本培养基 Basal medium	种子萌发率/% Seed germination rate
MS	
1/2MS	
B ₅	
N ₆	
Kc	

表 2 不同激素组合对种子萌发的影响

Table 2 Effects of different phytohormones on seed germination

培养基 Medium	激素/mg·L ⁻¹ Phytohormone		种子萌发率/% Seed germination rate
	6-BA	NAA	
8MS0	0	0	85
8MS1	0.5	0	68
7MS2	1.0	0	56
6MS3	0	0.5	93
8MS4	0	1.0	91

1.6 铁皮石斛原球茎增殖、分化培养

按表 4 分别在 MS、1/2 MS、B₅、N₆、Kc 中添加 0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 配制不同培养基,按 2.0 g/瓶分别接入原球茎,培养 12 周后,考察原球茎增殖及分化情况;以 MS 为基本培养基,一部分按表 5 中的激素组合分别配制 MS8、MS9、MS10、MS11 培养基,一部分以 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 为基本培养基,按表 6 分别添加天然添加物配制 MS12、MS13、MS14 培养基,分别考察不同基本培养基、激素组合、天然添加物对原球茎增殖、分化的影响。

1.7 铁皮石斛试管苗生根培养试验

以 MS 为基本培养基,一部分按表 7 所示激素组合分别配制 MS15、MS16、MS17、MS18 培养基,一部分按表 8 添加天然添加物分别配制 MS19、MS20、MS21 培养基,上述培养基按 10 株/瓶分别接入由原球茎分化得到的小苗(苗高约 1.0 cm,真叶约 2~3 片,具 0~2 条短根),每种培养基接种 10 瓶,培养 12 周后检测苗高、单株芽数、根数等指标,并观察试管苗生长情况,考察不同激素组合、天然添加物对试管苗生长的影响。

2 结果与 分析

2.1 铁皮石斛种子萌发试验

2.1.1 种子的萌发

将铁皮石斛蒴果(图 1A)中的种子(图 1B)分别于 MS、1/2 MS、B₅、N₆、Kc 培养基中培养约 10 d 后,均可见到原胚逐渐萌动膨大,20 d 左右种皮一端破裂,突破种皮的胚呈小圆锥状,即为原球茎,以后原球茎顶端由原半凹状产生突起,出现鳞片状叶原基,3 个月左右发育成 1.0~1.5 cm 左右小苗,见图 1(C、D)

(图1见封三)。

2.1.2 不同基本培养基对种子萌发的影响

试验显示铁皮石斛种子在 MS、1/2 MS 培养基上萌发率较高,在 K_c 培养基上次之,均达到 80% 以上,而在 B₅、N₆ 培养基上较低(表 1)。综合考虑材料来源及价格等因素,确定后续试验选用 MS 作为基本培养基。

2.1.3 不同激素组合对种子萌发的影响

从表 2 中可以看出,含 6-BA 的 MS1 和 MS2 培养基上种子萌发率明显较未添加激素的 MS0 培养基低,提示 6-BA 对种子萌发具有抑制作用,且抑制效果随其浓度升高而增强,而含 NAA 的 MS3、MS4 培养基上种子萌发率明显高于未添加激素的 MS0 培养基,表明 NAA 对铁皮石斛种子萌发具有促进作用。

2.1.4 天然附加物对种子萌发的影响

椰汁、土豆汁和香蕉汁等天然附加物均有利于铁皮石斛种子的萌发(表 3)。综合考虑取材方便及价格等因素,选择土豆汁作为种子萌发培养基的天然附加物。

2.2 铁皮石斛原球茎增殖、分化培养

2.2.1 圆球茎的增殖和分化

圆球茎接入各培养基中培养 12 周后增殖明显,圆球茎数量不断增加,并伴随有高约 0.5 cm,具 1~2 片真叶的苗分化出来。因单个圆球茎体积增加并不明显,且集聚成团的圆球茎计数困难,为方便统计,可通过圆球茎鲜重考察其增殖情况。

表 3 不同天然附加物对种子萌发的影响
Table 3 Effects of different natural additives on seed germination

培养基 Medium	天然附加物 Natural additive	种子萌发率/% Seed germination rate
MS0	无 Nil	83
MS5	10% 椰汁 10% Coconut milk	92
MS6	10% 土豆汁 10% Potato juice	90
MS7	10% 香蕉汁 10% Banana juice	88

表 4 不同基本培养基对原球茎增殖、分化的影响
Table 4 Effects of different basal media on hyperplasia and differentiation of protocorm

基础培养基 Basal medium	每瓶培养物鲜重/g Fresh weight of culture per bottle	分化率/% Differentiation rate	分化整齐度 Uniformity
MS	20.3	50	整齐 Uniform
1/2 MS	18.5	40	整齐 Uniform
B ₅	25.6	18	不整齐 Irregular
N ₆	11.5	15	不整齐 Irregular
KC	13.7	19	不整齐 Irregular

2.2.2 不同基础培养基对原球茎增殖、分化的影响

从表 4 可以看出,添加有 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 的不同基础培养基上,铁皮石斛原球茎(包括小苗)增殖明显,增重量 B₅ > MS > 1/2 MS > K_c > N₆,表明 B₅、MS 相对于 K_c、N₆ 更有利于原球茎的增殖。而从原球茎分化情况看,MS 和 1/2 MS 培养基原球茎分化率高,分别达到 50% 和 40%,有利于原球茎分化。B₅ 培养基虽然原球茎鲜重最高,但原球茎分化形成小苗所占比例低,不利于原球茎分化。

2.2.3 不同激素组合对原球茎增殖、分化的影响

结果表明(表 5),不同激素组合对原球茎分化影响十分显著,在不含激素的 MS0 培养基及含 NAA 浓度较高、6-BA 浓度低的 MS 培养基上 100% 原球茎分化形成小苗,而无原球茎增殖发生,培养物鲜重增加是由于原球茎分化形成小苗及小苗生长所致。在含 6-BA 浓度较高而 NAA 浓度低的 MS 培养基上,既有原球茎增殖又有部分原球茎分化形成小苗,但小苗生长速度不及含 NAA 浓度较高的培养基。

表 5 不同激素组合对原球茎增殖和分化的影响
Table 5 Effects of different phytohormones on hyperplasia and differentiation of protocorm

培养基 Medium	激素 /mg · L ⁻¹ Phytohormone		每瓶原球茎鲜重/g Fresh weight of protocorm per bottle	分化率/% Differentiation rate	分化整齐度 Uniformity
	6-BA	NAA			
MS0	0	0	16.9	100	不整齐 Irregular
MS8	0.5	0.1	21.4	40	相对整齐 Relatively uniform
MS9	1.0	0.1	23.2	30	不够整齐 Inadequately uniform
MS10	0.1	0.5	26.8	100	十分整齐 Very uniform
MS11	0.1	1.0	21.5	100	整齐 Uniform

2.2.4 不同天然附加物对原球茎增殖和分化的影响

以 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 不加天然附加物为对照,结果(表 6)表明添加 10%土豆汁和 10% 香蕉汁有利于培养物鲜重增加,培养物中既有原球茎增殖,又有小苗分化,而且原球茎分化为小苗的比例有显著提高。因此,10%土豆汁或 10%香蕉汁既有利于原球茎增殖又有利于分化小苗,而添加 10%椰汁培养物鲜重较对照有提高,但原球茎分化为小苗比例降低,表明 10%椰汁有利于原球茎增殖。

表 6 不同天然附加物对原球茎增殖、分化的影响
Table 6 Effects of different natural additives on hyperplasia and differentiation of protocorm

培养基 Medium	天然附加物 Natural additive	每瓶原球茎鲜重/g Fresh weight of protocorm per bottle	分化率/% Differentiation rate	分化整齐度 Uniformity
MS0	无 Nil	20.8	50	整齐 Uniform
MS12	10%椰汁 10% Coconut milk	23.7	30	不整齐 Irregular
MS13	10%土豆汁 10% Potato juice	29.6	80	十分整齐 Very uniform
MS14	10%香蕉汁 10% Banana juice	26.5	60	整齐 Uniform

2.3 铁皮石斛试管苗生根培养试验

2.3.1 不同激素浓度对试管苗生长的影响

结果(表 7)显示,在不加激素及添加 6-BA 或 NAA 的 MS 培养基中,铁皮石斛小苗均能生长,添加 NAA 的培养基小苗叶色浓绿,不形成分枝,苗高达4.7 cm(NAA 0.2 mg/L)和 4.5 cm(NAA 0.5 mg/L),而添加 6-BA 的培养基中,小苗叶色较浅,形成 2~3 个分枝,苗高为 3.7 cm(6-BA 0.2 mg/L)和 3.3 cm (6-BA 0.5 mg/L),表明 NAA 有利于小苗伸长生长,而无促进分枝效果,而 6-BA 对小苗伸长的促进作用不及 NAA,但有利于分枝的形成。从根系发育看,添加 NAA 的培养基根系发育良好,有根 4~5 条,长 3~4 cm,而添加 6-BA 的培养基的小苗根数、根长均不及添加 NAA 的培养基,表明 NAA 有利于石斛根系的发育,而 6-BA 则有抑制作用。

表 7 不同激素浓度对试管苗生长的影响
Table 7 Effects of different phytohormone concentrations on growth of test-tube plantlets

培养基 Medium	激素/mg·L ⁻¹ Phytohormone		苗高/cm Plant height	单株芽数 Number of sprouts per plant	单株根数 Number of roots per plant	根长/cm Root length
	6-BA	NAA				
MS15	0.2	0	3.7	2.1	2.5	2.3
MS16	0.5	0	3.3	2.6	1.6	1.6
MS17	0	0.2	4.7	1.0	4.7	4.2
MS18	0	0.5	4.5	1.0	5.0	3.6

2.3.2 不同天然附加物对试管苗生长的影响

添加 10%的椰汁、香蕉汁及土豆汁对石斛小苗的生长均有促进,以 10%土豆汁为最佳,苗高达 5.7 cm(表 8)。从根系发育看,10%土豆汁和 10%香蕉汁对根系伸长的促进作用明显,而 10%椰汁则抑制根系的发育。

表 8 不同天然附加物对试管苗生长的影响
Table 8 Effects of different natural additives on growth of test-tube plantlets

培养基 Medium	天然附加物 Natural additive	苗高/cm Plant height	单株芽数 Number of sprouts per plant	根数 Number of roots per plant	根长/cm Root length
MS0	无 Nil	4.3	1	4.4	4.0
MS19	10%椰汁 10% Coconut milk	4.6	2.3	3.2	3.7
MS20	10%土豆汁 10% Potato juice	5.2	1	4.6	5.3
MS21	10%香蕉汁 10% Banana juice	5.7	1	4.4	5.6

2.4 铁皮石斛快繁体系的建立

综合分析上述各因素对铁皮石斛种子萌发、原球茎增殖与分化、试管苗生根的影响,确定铁皮石斛种子萌发的适宜培养基为:MS+0.5 mg/L NAA+10%土豆汁;原球茎增殖与分化的适宜培养基为:MS+

0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 10% 土豆汁; 试管苗生根的适宜培养基为: MS + 0.2 mg/L NAA + 10% 土豆汁。

在此条件下, 已成功建立铁皮石斛快速繁殖体系, 铁皮石斛原球茎在增殖与分化的适宜培养基上培养 3 个月左右, 可分化出大量高约 1~2 cm 的试管苗(图 2A), 但大多数无根, 尚不能够移栽, 转入生根培养基中培养 3 个月左右, 可诱导出大量根系(图 2B), 即可进行移栽(图 2C、D)(图 2 见封三)。

3 讨 论

铁皮石斛每个蒴果有数万至数十万种子, 但其种子非常细小(平均 $277\ \mu\text{m} \times 93\ \mu\text{m}$), 是由 1 个简单的胚(平均 $126\ \mu\text{m} \times 84\ \mu\text{m}$)及单层细胞的翅状种皮构成, 无胚乳, 因此在自然条件下不易萌发, 需依靠土壤中的共生真菌供给营养。目前, 兰属及石斛属植物种子萌发大都采用无菌条件下培养种子试管苗的手段, 但有关铁皮石斛的研究报道较少, 对其种子在试管繁殖过程中所需外界条件的研究也不够全面。本研究通过培养基的筛选试验发现, MS、1/2 MS、K_C 培养基适合铁皮石斛种子萌发, 其次是 B₅、N₆ 培养基, 与唐桂香^[4]的结果一致。植物激素是对植物生长发育产生显著作用的微量有机物, 在植物细胞和组织培养中广泛使用, 在石斛属不同植物组织培养中许多研究者也使用了不同的植物激素。本试验结果表明, 0.5~1.0 mg/L 6-BA 抑制铁皮石斛种子萌发, 但有促进原球茎增殖效果, 而 0.5~1.0 mg/L NAA 则有促进铁皮石斛种子萌发, 不仅萌发率增高, 而且萌发整齐, 与曾宋君^[5]结论相同, 而与杨联河^[6]培养曲茎石斛种子时添加 6-BA 浓度达 0.5 mg/L 的结论不一致。另外, 在兰科植物组织培养过程中, 加入一定浓度的有机添加物如椰汁、土豆汁或香蕉汁对其种子萌发均有一定的促进作用, 这可能是由于这些有机添加物中含有一定浓度的植物激素所致。

铁皮石斛种苗的获得除可采用种子作外植体培养种子试管苗外, 还可通过原球茎发生途径采用无性繁殖方式大量生产种苗, 这一点在工厂化生产过程中需周年供苗显得尤其重要。原球茎的获得可以通过多种途径, 如茎尖诱导发生、鳞茎诱导发生、茎段诱导发生、幼叶诱导发生等^[7,8], 本研究采用种子萌发生原球茎, 将原球茎置于 MS + 0.5~1.0 mg/L 6-BA 的培养基上, 原球茎可无限增殖, 从而建立原球茎培养系统, 方法简便易行。

在原球茎增殖、分化过程培养中, 适宜的基础培养基、合适浓度的激素组合以及有机添加物的加入不仅影响原球茎增殖, 而且对原球茎分化也起到十分重要的作用。试验表明, 铁皮石斛原球茎在 MS 或 1/2 MS 培养基上既能增殖又有一定程度分化, 适用于大规模生产, B₅ 培养上原球茎能大量增殖, 但分化频率较低。此外, 高浓度 6-BA、低浓度 NAA 的激素组合既有原球茎增殖, 同时又有原球茎分化, 而高浓度的 NAA、低浓度的 6-BA 激素组合中 100% 原球茎分化形成小苗。因此在实际生产过程中, 可采用高浓度 6-BA 低浓度 NAA 激素组合来不断扩大培养规模, 在转接过程中可将分化小苗移出进行壮苗培养。当达到一定培养规模需获得大量小苗时, 可采用高浓度的 NAA、低浓度的 6-BA 激素组合, 促使原球茎分化形成小苗。

参 考 文 献

- [1] 邵 华, 张玲琪, 李俊梅, 等. 铁皮石斛研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 109-112.
- [2] 高建平, 金若敏. 铁皮石斛圆球茎于原药材免疫调节作用的比较研究 [J]. 中药材, 2002, 25(7): 487-489.
- [3] 吴昊姝, 徐建华, 陈立钻, 等. 铁皮石斛降血糖作用及其机制的研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 160-163.
- [4] 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.
- [5] 曾宋君, 程式君. 石斛的试管苗快速繁殖 [J]. 中药材, 1996, 19(10): 490-491.
- [6] 杨联河, 何俊彦. 曲茎石斛组织培养研究 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(11): 658-659.
- [7] 温明霞, 聂振朋, 林 媚, 等. 铁皮石斛组织培养与快速繁殖研究进展 [J]. 广西农业, 2007, 38(3): 227-230.
- [8] 廖俊杰, 许继勇, 李进进, 等. 铁皮石斛试管种苗产业化生产的技术因素分析 [J]. 中药材, 2006, 29(6): 533-535.

郑志仁,等:铁皮石斛的离体培养和快速繁殖

ZHENG Zhi-ren, et al: Culture *in vitro* and rapid propagation of *Dendrobium officinale*

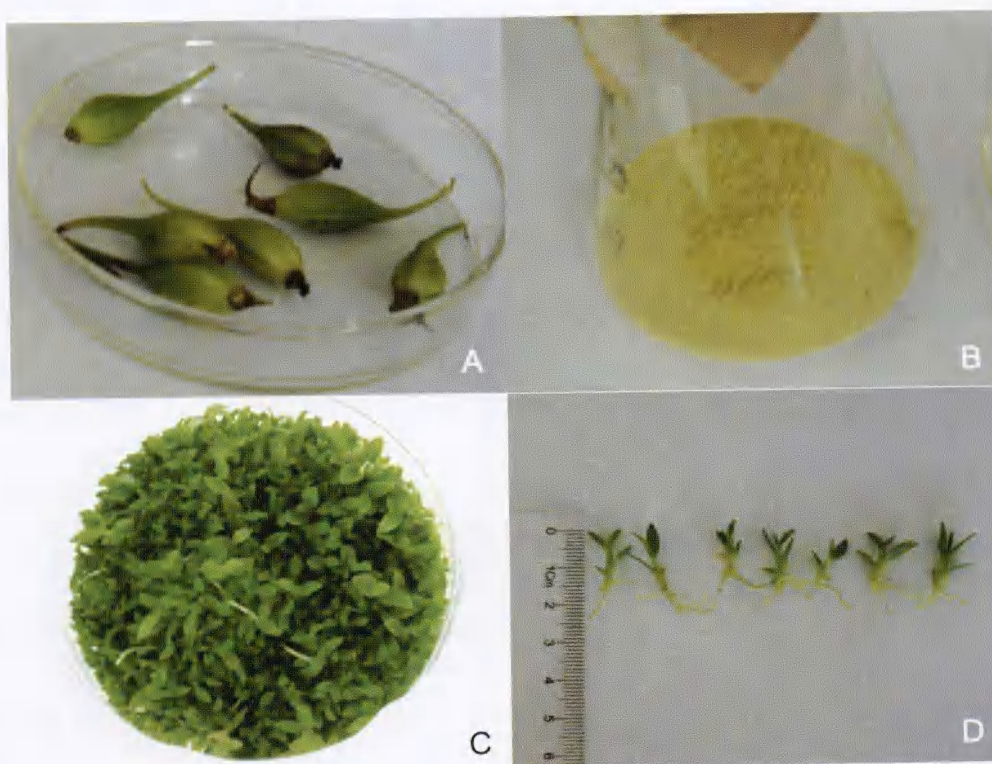


图1 铁皮石斛蒴果(A),种子(B)及籽播苗(C,D)

Fig. 1 Fruit (A), seeds (B) and seedlings (C,D) of *Dendrobium officinale*

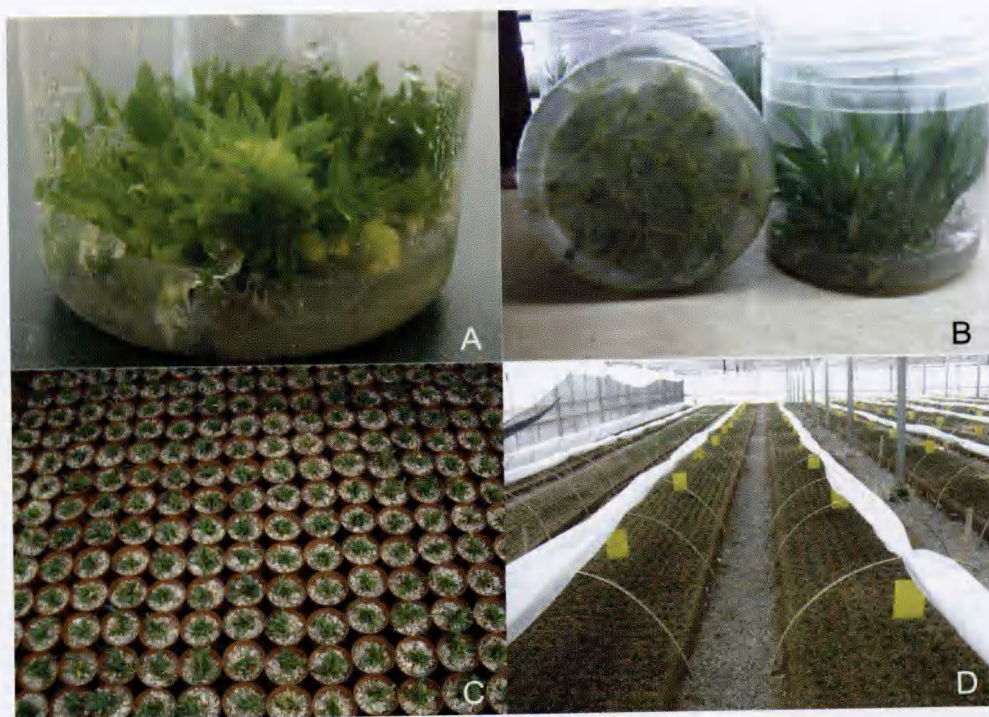


图2 原球茎增殖、分化培养(A),壮苗培养(B),炼苗(C)及移栽(D)

Fig. 2 Hyperplasia and differentiation of protocorm (A), culture of sound seedlings (B), hardening of seedlings (C) and transplanted seedlings (D)