

铁皮石斛组织培养与快速繁殖研究进展

温明霞¹, 聂振朋¹, 林媚¹, 冯先桔¹, 陈荣桂²

(1. 浙江省柑桔研究所, 浙江台州 318020; 2. 上垟林特站, 浙江台州 318024)

摘要:铁皮石斛是一种生长缓慢、自然繁殖率很低的兰科附生植物,具有很高的药用价值,有“救命仙草”、“药中黄金”之美称。目前关于其组织培养及快速繁殖的研究颇多,用于外植体的有种子、无菌苗幼苗茎段、原球茎及人工种子等;再生植株的获得途径主要有种子→原球茎→小植株,种子→原球茎→无菌苗茎段→小植株,种子→愈伤组织→原球茎→小植株等;原球茎的增殖、分化与培养基的选择有不同的结论,需要作进一步验证。针对铁皮石斛组培快繁中存在的组培苗生产成本高、移栽苗成活率低、标准化生产程度低等问题,提出了相应的解决办法,为进一步开发利用铁皮石斛资源提供了依据。

关键词:铁皮石斛;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S682.31

文献标识码:A

文章编号:1002—8161(2007)03—0227—04

Advances in tissue culture and rapid propagation of *Dendrobium Candidum*

WEN Ming-xia¹, NIE Zhen-peng¹, LIN Mei¹, FENG Xian-ju¹, CHEN Rong-gui²

(1. Zhejiang Citrus Research Institute, Taizhou, Zhejiang 318020, China; 2. Shangyang Special Forest Product Station, Taizhou, Zhejiang 318024, China)

Abstract: *Dendrobium Candidum* is a orchidaceae aerophyte with slow growth and lower natural propagation rate, and it has very high medicinal value called as “Gold in Herbs”. At present, there were plenty of researches on the tissue culture and rapid propagation of *D. Candidum*, and the explants might be used by seeds, aseptical seedling young stem, protocorm, artificial seeds and so on. The approaches of producing plant regeneration were consisted of seeds→protocorm→plantlets, seeds→protocorm→aseptic seedling stem→plantlets, seeds→callus→protocorm→plantlet and so on. There were many different reports on the multiplication and differentiation of protocorm and the choice of culture media, but they need further test and verify in practice. The corresponding solution was put forward against the existing problems on the high production cost of plantlets, low success ratio of transplanting seedlings and lower degree of standardized production, which would provide the basis on further developing and utilizing the resources of *D. Candidum*.

Key words: *D. Candidum*; tissue culture; rapid propagation

石斛是我国传统名贵中药,分为铁皮、黄草、金钗、霍山、环草、马鞭等数十个品种,其中铁皮石斛(干品又称铁皮枫斗)最为珍贵^[1~3],居“中华九大仙草”之首,是石斛中的极品。古语云:“北有人参,南有枫斗”,民间也有“救命仙草”、“中华仙草”、“药中黄金”之美称。主产于我国云南、贵州、浙江、四川、广西、安徽等地,多生长于高温多湿的热带、亚热带高山峻岭、悬崖峭壁及岩石缝隙之间,是一种生长缓慢、自身繁殖能力很低的兰科附生植物,且十分娇

嫩,遇强光、直射光或暴雨、雪冻即会死亡,水分过多也会使其根部腐烂,甚至整株死亡。由于铁皮石斛具有巨大的药用价值,导致了长期无节制的采摘,致使资源濒临枯竭。1987年国家已将铁皮石斛列为重点保护野生珍稀药材品种,国家第一批《中国珍稀濒危保护植物名录》也将其列入其中。为了更好地保护铁皮石斛野生资源,变野生为家种,应大力发展规模化人工栽培,切实保障铁皮石斛资源的可持续利用。从20世纪70年代起,国内外有关机构便开始了铁皮石

收稿日期:2006-12-26

作者简介:温明霞(1973-),女,河南洛阳人,硕士,主要从事植物营养及生物学方面的研究。

斛的研发工作,尤其在铁皮石斛的组织培养与快速繁殖技术、人工栽培技术方面进行了大量研究,现就这方面的研究进展作一综述,以期为进一步开发利用铁皮石斛资源提供依据。

1 外植体

利用组织培养技术繁殖试管苗是解决铁皮石斛种苗的有效途径,关于铁皮石斛试管苗移栽成功的报道也日渐增多。目前,铁皮石斛用于外植体的主要有种子^[4~8]、无菌幼苗茎段^[9]、原球茎^[10~12]及人工种子^[13]等。据研究,由种子诱导的愈伤组织分化能力较强,由种胚培养的原球茎的质量也较高^[14]。

2 再生植株的获得和培养

目前再生植株获得的途径主要有:种子→原球茎→小植株;种子→原球茎→无菌苗茎段→小植株;种子→原球茎→愈伤组织→丛芽→生根苗;种子→愈伤组织→原球茎→小植株;原球茎→人工种子→幼苗;茎尖→愈伤组织→丛芽→生根苗^[3]等。

铁皮石斛种子自然成熟约需230d,3个月以上胚龄的种胚在无菌播种下的萌发率一般在90%以上,成熟的种子在KS、SH、VW、PTV、MS、改良的N6、1/2MS及RM多种基本培养基上均可萌发生长。添加一定浓度的NAA、6-BA或NAA+6-BA组合,可提高种子的萌发率;而加入2,4-D,胚萌发率显著低于对照组;附加0.5mg/L KT或IAA,萌发率与对照组相近;加入不同植物提取液,如椰子汁、香蕉汁、马铃薯汁和豆芽汁,均可使种子的萌发率达90%以上,而加入蕃茄汁仅有65%^[3]。

3 原球茎的增殖、分化与培养基的选择

在植物组织培养中,试管苗的增殖很关键,通过原球茎诱导产生丛生芽,再将丛生芽培养成丛生小苗,从而达到快速扩大种苗繁殖的目的。铁皮石斛的原球茎呈松散桑椹状,其数量和质量对于增殖培养极为重要,原球茎发育成丛生芽时,如果没有适合的培养基,就会影响到苗的形态建成及试管苗的质量,产生畸形苗,影响试管苗的扩繁。在铁皮石斛原球茎增殖和分化的过程中,培养基中激素浓度配比是一个非常关键的因素。蒋波等^[15]对铁皮石斛原球茎生长分化及生根壮苗的研究表明:在6-BA 2.0mg/L+NAA 0.5mg/L和6-BA 3.0mg/L+NAA 0.5mg/L

中原球茎的增殖系数较大,而在6-BA 3.0mg/L+NAA 0.2mg/L中,丛生芽的形态建成较好,说明激素浓度偏高或偏低均不利于铁皮石斛原球茎的生长和分化。根据试验结果,应将激素浓度控制在6-BA 2.0~3.0mg/L、NAA 0.2~0.5mg/L范围之内,而且在试验结果相差不大的情况下,最好选择低浓度激素组合,以免过度扰乱植物体内的激素水平,造成细胞变异,产生畸形苗。

张治国等^[16,17]报道,原球茎增殖的适宜条件为1/2MS培养基+3%蔗糖+0.8%琼脂,25℃,光照;原球茎分化的适宜条件为1/2MS培养基+2%蔗糖+20%马铃薯提取液+2mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA,25℃,光照。蒋林等^[18]报道,适量活性炭和1.0mg/L NAA比较适合铁皮石斛原球茎的增殖;1/2MS添加0.5mg/L NAA和0.5%活性炭比较适宜原球茎的分化;添加0.5%活性炭和香蕉汁、苹果汁能促进试管苗生根和生长。适宜的培养条件对铁皮石斛组织培养和快速繁殖至关重要,活性炭能使原球茎的增殖量显著增加,这可能是活性炭吸附了某种不利于原球茎增殖的物质,使根系长得粗壮,芽苗生长良好;苹果汁对原球茎的增殖有较好的效果,且能促进原球茎的分化,使根系长得粗壮;马铃薯汁能促进原球茎的分化,但对芽苗的生长有抑制作用;香蕉汁对原球茎的增殖有抑制作用,但对原球茎的分化无抑制作用,这可能是由于香蕉中含有某种不利于原球茎增殖的物质,但香蕉汁能使根系长得粗壮;适当浓度的NAA对原球茎的增殖、分化和芽苗生长均有促进作用。

由于植物组织培养的培养物被置于密封的培养瓶中,培养物与培养瓶外部环境几乎没有发生物质交换,光合作用较低,其主要是靠培养基中的蔗糖来维持自身的生命活动。因此,当蔗糖缺乏时,直接影响到培养物的生长,导致叶子纤细泛黄,苗形态建成较差。研究表明,30%的蔗糖浓度即能保证瓶苗不会因长时间的培养而缺乏碳源,而蔗糖浓度为40%的瓶苗与30%的瓶苗生长情况基本一致,但从经济方面考虑,选择30%的浓度比较合算^[7,17]。刘骅等^[19]用食用白糖代替分析纯蔗糖时,未发现对试管苗的生长有明显影响,反而在根数和根长上更具优势,这可能与食用白糖中含有各种微量元素有关。

在组织培养中,椰子、香蕉、马铃薯等常作为附加物添加到培养基中,其基本原理是:附加物中可能含有某种人类尚未知道的物质,且这种物质对植物

的生根壮苗起到一定的作用。研究表明^[9,11,13],香蕉提取液是铁皮石斛苗形态建成中作用效果较好的一种附加物;在马铃薯提取液样苗中,根虽长但较为纤细;而在胡萝卜提取液样苗中,根系长得虽好,但叶子质量不如香蕉提取液样苗。综合根、茎、叶等特点,香蕉是生根壮苗环节中稳定性较好的添加物,但由于其又可作为培养基的缓冲剂,因此,在配制培养基时,应严格调控培养基的pH值。

此外,在培养基中加入白萝卜提取液、水解酪蛋白(CH)和椰乳(CM),对铁皮石斛试管苗有明显的壮苗效果,可在继代壮苗环节适量加入上述有机物;在移植生根培养基内加入适量香蕉提取液,能促进多发不定根,有利于提高移植成活率,或者加入椰乳和青苹果提取液,也有明显的促进生根效果;在不加任何有机物的情况下,铁皮石斛试管苗繁殖系数最高,这和前人的研究结果^[6,7]相吻合,若加入适量水解酪蛋白也能保持较高的繁殖率,并有很好的壮苗效果^[20]。至于各类有机物的加入量以多少为最佳,还有待于进一步研究。

4 存在问题及展望

从目前的研究进展来看,铁皮石斛组培快繁技术应用于规模化育苗栽培还需解决以下几个问题:①组培苗的高生产成本。在铁皮石斛快繁过程中,不仅转接培养次数多,而且周期长,消耗大量动力、人力和原材料,因而生产上应注重提升苗的质量,并尽可能从各个方面降低生产成本,如用白糖替代培养基中的蔗糖等。②移栽苗的成活率较低。移栽苗成活率的高低是快繁技术能否应用于规模化栽培的关键。要解决这一问题,应从以下四个方面入手:一是改进各个环节的培养条件,获得生长健壮的瓶苗,通过丛栽提高栽培苗的群体抗性作用;二是出瓶前炼苗;三是改进移栽棚的栽培条件,实施严格的管理措施,使基质、光照、湿度、温度、通风等条件接近或达到工艺规程的要求,同时根据苗的生长发育状况,有针对性地施肥和防治病虫害;四是合理利用菌根真菌制剂及菌肥,以改善移栽棚微生态条件,提高移栽苗的抗病、抗逆能力。③标准化水平有待提高。铁皮石斛主要用作加工铁皮枫斗、功能食品和药品的原料,因此质量卫生标准的制定和无公害栽培技术的实施是扩大销售的前提,应从组织培养、栽培、加工、检验、包装、仓储及运输等各个环节加大规范化标准的实施力度,提高标准化生产水平。

总之,经过多年的研究开发,已经为铁皮石斛规模化栽培提供了较强的技术保障,生产实践中,只要不断降低育苗和栽培成本,提高产品的内在和外在质量,致力于生产无公害药材原料药,那么现代生物技术在保护濒危药用植物资源、发展地方特色药材种植以及增加药农收入等方面将起到愈来愈重要的作用。

参考文献:

- [1] Li M F, Xu G J, Xu L S. Investigation and identification of marketable *Dendrobium* Herb (II) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1991, 22(4): 173-180.
- [2] Pelectis Florae Reipublicae Popularis Sicac, *Agendae Academiae Sinicae Edits. Flora Reipublicae popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1999. 67-75.
- [3] 邵华, 张玲琪, 李俊梅, 魏蓉城. 铁皮石斛研究进展[J]. 中草药, 2004, (1): 109~112.
- [4] Wang G Y, Cai N H, Liu P, Xu Z H. Effect of ABA on the *in vitro* induction of floral buds of *Dendrobium Candidum* Wall. ex Lindl. [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1995, 37(5): 374-378.
- [5] Liu R J, Meng A D, Deng X Q. The study on tissue culture of *Dendrobium officinale* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1988, 23(8): 636-640.
- [6] Zeng S J, Cheng S J. Tissue culture and rapid propagation of *Dendrobium* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1996, (10): 490-491.
- [7] Zeng S J, Cheng S J, Zhang J L. Embryo culture and propagation of *Dendrobium in vitro* [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 1998, 25(1): 75-80.
- [8] Zhang M, Zhu F, Wei X Y, LUO Z J. Germination of *Dendrobium candidum* embryos and quality control of protocorm-like bodies [J]. *J Zhejiang Univ - Sci Edit* (浙江大学学报·理学版), 2000, 27(1): 92-94.
- [9] 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.
- [10] 刑福桑, 冯锦东, 刘凌峰, 郑焕强. 铁皮石斛栽培技术的研究概况[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(9): 559~560.
- [11] Zhang Z G, Liu H, Wang L, Zhang L. The study on culture conditions of multiplication of protocorm-like bodies of *Dendrobium Candidum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23(8): 431-433.
- [12] Zhang Z G, Wang L, Liu H. The research on medi-

- um of proliferation of protocorm of *Dendrobium Candidum*[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1993,18(1):16-19.
- [13] Guo S X, Cao W Q, Zhang J H, Xu J T. Studies on the preparation process and germination of White *Dendrobium* (*Dendrobium candidum*) artificial seeds [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1996,27(2): 105-107.
- [14] Fu K C, Lian S C, Feng D Q. The application and development of *Dendrobium officinale* resource[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1990,30(9):708-711.
- [15] 蒋波,杨存亮,黄捷,詹源庆,李喜兵. 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, 2005,(3):66~69.
- [16] 张治国,刘骅,王黎. 铁皮石斛原球茎增殖的培养条件研究[J]. *中草药*,1992,23(8):431.
- [17] 张治国,刘骅,王黎,张玲. 铁皮石斛原球茎适合培养基研究[J]. *中国中药杂志*,1993,18(1):16.
- [18] 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):539~541.
- [19] 刘骅,张治国. 铁皮石斛试管苗繁殖降低成本的研究[J]. *中国现代应用药学杂志*,1998,15(3):15~17.
- [20] 周江明. 不同有机物对铁皮石斛试管苗生长发育的影响[J]. *中国农学通报*,2005,21(8):49~51.

(责任编辑 林 涛)