

铁皮石斛试管苗培养技术的研究

陈 媛, 谢吉容

(重庆文理学院 生命科学与技术学院, 重庆 永川 402160)

摘 要: 研究了不同量激素浓度、天然添加物及植入密度对石斛试管苗生长的影响。结果表明: 使用 1/2MS 培养基并且在其他条件不变的情况下, 当 6-BA 的含量在 3.0 mg/L 时, 丛生芽数量多且有原球茎的发生; 香蕉汁具有明显的壮苗和诱导芽增殖的效果; 当铁皮石斛茎段植入密度为 10~12 个瓶/时, 对其分蘖和生长有利。

关键词: 铁皮石斛; 组织培养; 激素; 香蕉; 植入密度

中图分类号: S 567.21⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)07-0122-03

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl)又名黑节草, 俗称铁皮枫斗, 为兰科石斛属多年生常绿草本植物, 是一种名贵药材^[1], 早在 1 500 年前就被载入《神农本草经》而作药用, 具有生津益胃、清热养阴的功用。现代药理学研究发现, 石斛还具有抗衰老和扩张血管的作用, 可用于治疗具有阴虚证的急性及慢性咽喉炎、急性支气管炎、结核病、甲状腺机能亢进、糖尿病、慢性萎缩性胃炎等症^[2-3]。

铁皮石斛属于兰科石斛属, 石斛属是兰科的第二大类, 我国分布有 74 种和 2 变种, 主产我国安徽西南部、浙江东部、福建西部、广西西北部、四川、云南东南部地区, 生长在 1 600 m 的山地半阴湿的岩石上^[4], 在自然条件下的发芽率不到 5%, 且实生苗生长十分缓慢, 故其自然繁殖力极低。加之其作为一种重要的药用植物, 人为开采严重, 使野生环境下的石斛数量骤减, 至 1987 年, 铁皮石斛被列为国家重点保护野生植物, 在 1991 年出版的《中国植物红皮书》中被列为濒危种。

正是因为石斛的自然繁殖率低和市场的大量需求, 才使其对快繁技术的研究显得尤为必要。目前人们采用组织培养与快速繁殖技术, 对其试管苗进行人工栽培, 改善铁皮石斛繁殖系数低的现状, 提供石斛试管苗, 从而解决市场需求问题, 最终达到保护野生自然资源的目的。该研究旨在进一步探究铁皮石斛的快繁体系, 为进行其工厂化培育提供参考。

第一作者简介: 陈媛(1987-), 女, 本科在读, 现从事植物生理学方向研究。E-mail: chenyan_517@126.com。

通讯作者: 谢吉容(1966-), 女, 重庆永川人, 博士, 副教授, 现从事植物种质资源和品种选育研究工作。E-mail: xiejirong@tom.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC 2008BB1205); 重庆文理学院学生科技研究重点资助项目(XZ2008014)。

收稿日期: 2009-02-20

Constraction of Tissue Cuture System of *Dendrobium Nobile* Lindl Through Protocorm-like Body

ZHANG Ai-xiang¹, CHANG Mei-hua¹, LIU Hui-qing¹, LI Su-qin²

(1. College of Science and Technology of Agriculture and Forestry, Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075131, China; 2. Hebei Wanquan Seed Co. LTD, Wanquan, Hebei 076250, China)

Abstract: PLB is successfully induced using the aseptic nodal segments of shoots, the best effect of PLB inducing was obtained by the use of KC+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.5 mg/L, the best effect of PLB proliferation was obtained by the use of MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; The highest efficiency of bud differentiation was obtained by the of MS+NAA 1.0 mg/L+KT 1.5 mg/L; the optimal medium to induce roots was 1/2MS or MS+NAA 0.5 mg/L.

Key words: *Dendrobium nobile* lindl; Tissue culture; Protocorm-like body; Induce; Proliferation; Differentiation; root

1 材料与方法

1.1 试验材料

重庆文理学院光照培养室内生长情况良好、一致的铁皮石斛试管苗。

1.2 试验条件

1/2MS 培养基, 蔗糖 30.0 g/L, NAA 0.5 mg/L, 琼脂 5 g/L, pH 值 5.8, 光照培养室温度 (25±2)℃, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 12 h/d。

1.3 激素浓度诱导试验

取培养室内生长情况良好, 株高在 2 cm 以上的无菌试管苗, 进行无菌操作, 剥去老黄叶片, 切割为具有 1~2 个腋芽的短小茎段, 分别植于 6-BA 浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L 的 A、B、C、D 4 组培养基中, 每组 50 瓶, 控制茎段植入密度均为 10 个/瓶。放于光照培养室内培养, 30 d 后观察结果。

1.4 添加物试验

配制 1/2MS 培养基, 均设置 6-BA 浓度 2.0 mg/L, 控制茎段植入密度为 10 个/瓶, 分为 3 组: A、B、C, 每组 50 瓶, 其中 A 组参入香蕉汁作为添加物, B 组加入椰汁, C 组不加入任何添加物以作对照。30 d 后观察结果。

1.5 植入密度试验

设置 6-BA 的浓度为 2.0 mg/L, 均不加入任何添加物, 分为 A、B、C、D 4 组, 每组 50 瓶, 分别以 2 个/瓶, 6 个/瓶, 10 个/瓶, 14 个/瓶的密度植入石斛茎段。30 d 后观察结果。

2 结果与分析

2.1 6-BA 浓度对石斛丛生芽数量的影响

在一定激素浓度范围内(即当 6-BA 的加入量在 1.0~3.0 mg/L), 随着 6-BA 浓度的增加, 石斛丛生芽的增殖系数也相应增加, 当 6-BA 的浓度从 1.0 mg/L 上升为 2.0 mg/L 后, 丛生芽的数量增加, 且增幅明显; 当 6-BA 的浓度从 2.0 mg/L 增加到 3.0 mg/L 后, 丛生芽的平均诱导倍数增加, 增幅不如前一个梯度的改变突出, 但在该 6-BA 的浓度下伴有原球茎的发生。相反, 当 6-BA 的浓度达到 4.0 mg/L 时, 丛生芽的诱导数量却有所下降(见表 1)。

表 1 不同 6-BA 浓度对铁皮石斛丛生芽数量的影响

组别	A	B	C	D
6-BA 的浓度/mg · L ⁻¹	1.0	2.0	3.0	4.0
平均芽诱导倍数	2.9	5.0	5.6	4.7

6-BA 即 6-苄氨基嘌呤, 是一种细胞分裂素, 其作用是促进芽的形成, 也可以诱导愈伤组织发生, 培育无根芽。改变培养基内 6-BA 的浓度, 会对试管苗的生长情况产生影响。适当的增加培养基中 6-BA 的含量有利于石斛细胞的分裂, 对原球茎的生长和分化有利。但是当

浓度过高时, 会对细胞的分裂产生一定程度的抑制作用。

实验室中铁皮石斛的快繁主要目的是得到数量较多的试管苗。根据试验结果, 可先在培养基中加入浓度为 3.0 mg/L 的 6-BA, 诱导原球茎, 再依据温明霞^[3]等的试验, 将 6-BA 的浓度降低为 2.0 mg/L, 加大原球茎的增殖系数, 从而达到在较短时间内得到较多石斛试管苗的目的。

2.2 不同添加物的壮苗和芽诱导作用

A、B、C 3 组石斛试管苗的生长情况呈现出一定程度的差别(见表 2)。较之 C 组, 加入香蕉汁及椰汁添加物的培养基丛生芽的诱导倍数增高, 芽体和根更健壮, 可见香蕉汁和椰汁在铁皮石斛试管苗丛生芽的诱导和壮苗状根上都有积极的作用。其中含有香蕉汁的 A 组效果最明显, 添加椰汁的 B 组诱导倍数和苗健壮程度均介于 A、C 组之间。

表 2 不同添加物对铁皮石斛根苗健壮程度和诱导倍数的影响

组别	A	B	C
添加物	香蕉	椰汁	—
平均芽诱导倍数	6.1	5.4	5.0
苗健壮程度	++++	+++	++

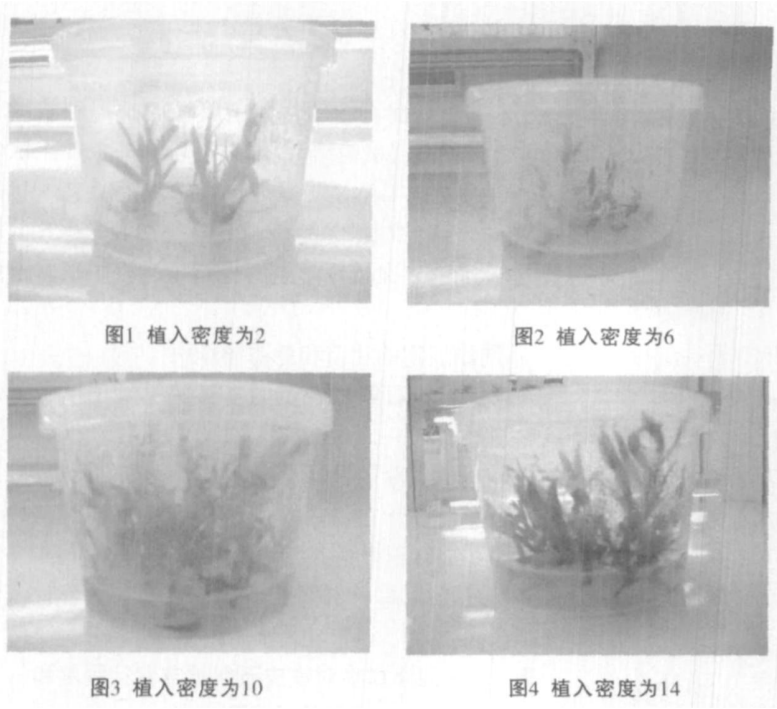
注: + 弱; ++ 一般; +++ 健壮; + 无

天然添加物的某些成分在培养基中一定程度上充当了缓冲剂, 能够调节培养基的 pH 值, 为石斛提供一个稳定的培养环境。目前人类对天然培养基所含成分尚不完全了解, 其中可能含有某些物质, 对植物的生长有利, 而香蕉中所含的物质对铁皮石斛的芽增殖和壮苗效果突出。

在组织培养扩繁阶段, 石斛试管苗多为无根芽, 不需要根系帮助其吸收养分, 所以在这一阶段没有必要使用香蕉汁。但是在石斛将从无菌环境移至自然环境的过程中, 植物体及其根系强壮与否直接影响练苗存活率和其在自然环境中的生存力。因此在石斛的生根阶段往培养基中加入香蕉汁, 强壮植株和根系, 将对下一步的练苗有利。

2.3 植入密度与诱导倍数的关系

在一定范围内(植入密度为 2 个/瓶、6 个/瓶、10 个/瓶时), 铁皮石斛丛生芽的诱导倍数与植入密度呈现出的正相关的关系, 当植入密度增大时, 除 D 组外 A、B、C 组丛生芽的平均诱导倍数均随之升高(表 3), 生长速率也依次加快, 且 3 组丛生芽的形态构建也随植入密度的加大而变得良好。D 组植入密度最大, 丛生芽的平均诱导倍数却没有相应上升, 反而较 C 组下降, 芽的形态构建也并未随植入密度的增加而变得更好(图 1~4)。



自然环境下生长的铁皮石斛喜阴湿,在试管苗的培养中,植入密度太低会造成光照过强,与其自然的生活环境相差太大,不利于生长。适当的增加植入密度(10~12个/瓶),有利于保持试管环境中的空气湿度和减弱部分叶片所接收到的光照,使其在培养室瓶中的生存环境更趋近于自然条件下的阴湿环境。但石斛茎段的植入数量并不是越多越好,植入数量过多,造成营养供应不充分,反而影响生长。

鉴于快繁实际中石斛的生长和试验的花费,应当在培养基能充足供应养分的情况下,最大化的植入石斛茎段(10~12个/瓶),这样不仅有利于石斛试管苗的生长也可节约一定的生产成本。

表3 不同植入密度对铁皮石斛芽诱导倍数的影响

组别	A	B	C	D
植入密度/个·瓶 ⁻¹	2	6	10	14
平均芽诱导倍数	2.7	3.4	5.0	4.2
丛生芽形态构建	+	++	++++	+++

注+ 差; ++ 一般; +++ 好; ++++ 很好。

3 结论

在铁皮石斛试管苗的培养过程中,影响其生长的因素很多,该试验在其他条件一定的情况下,通过改变6-BA的浓度,加入天然添加物和改变植入密度以探究单一因素变化对石斛试管苗生长的影响。试验结果表明:使用1/2MS培养基并且在其他条件不变的情况下,当

6-BA的含量在3.0 mg/L时丛生芽数量最多(诱导倍数为5.6)并伴有原球茎的发生,香蕉汁对石斛试管苗丛生芽的诱导和壮苗壮根效果突出,适当的密植(10~12个/瓶)对石斛丛生芽的诱导和生长有利。

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] 王雁, 岳桦. 石斛属的利用价值与应用[J]. 中国城市林业, 2007(5): 2.

[3] Lin P, Bi Z M, Xu H, et al. Advances in studies on pharmacology of plants from Dendrobium Sw[J]. China Tradit Herb Drugs, 2003(11): 19-22.

[4] 王立安. 铁皮石斛生境小记[J]. 植物杂志, 1990(4): 29.

[5] 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]. 广西农业科学, 2007, 38(3): 227-228.

Study on Vitro Culture Techniques of *Dendrobium candidum*

CHEN Yuan, XIE Ji-rong

(Department of Life Science and Technology, Chongqing University of Arts and Sciences Yongchuan, Chongqing 402168, China)

Abstract: *Dendrobium candidum* is one of the rare Chinese herbal medicines which are in danger. In order to further understanding the artificial propagation system, the experiment studied the effects of different hormone levels, nature additives and implantation densities. The results showed that in the same circumstance, using 1/2 MS culture medium, when 6-BA in the content of 3.0 mg/L, there was a larger number of buds and also PLBs occur, banana juice had an obvious effect on sprouts strength and bud-induced proliferation, it is good for the tiller and the growth of *Dendrobium candidum*, when the implantation density was 10~12/bottle.

Key words: *Dendrobium candidum*; Tissue culture; Hormone; Banana; Implantation density