

兜唇石斛的组织培养研究

杜 刚, 来天超, 杨海英

(云南民族大学 化学与生物技术学院, 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘 要:以兜唇石斛的成熟蒴果作为外植体, 比较不同的培养基、激素等因素对种子发芽及试管苗生根的影响。结果表明:以成熟蒴果为外植体能够诱导成苗, 种子萌芽的最适培养基为: MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+GA 1.0 mg/L+香蕉汁 150 g/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 8 g/L+活性炭 2 g/L, 适宜的生根培养基为: 1/4MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+香蕉汁 150 g/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 8 g/L+活性炭 2 g/L。

关键词:兜唇石斛; 组织培养; 种苗; 培养基

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)08-0140-02

石斛(*Herb dendrobii*)为《中国药典》历版所收载的名贵中药材, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等功效。现代研究发现石斛属植物具有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、抗血小板聚集、扩张血管等多种活性^[1]。兜唇石斛(*Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch)为兰科石斛属附生植物, 别名无叶石斛大光节、水草石斛, 是名贵中药材。国内主要分布在广西、贵州和云南, 生长在海拔 400~1 500 m 的疏林树干上或山谷岩石上^[2]。

兜唇石斛为市场石斛流通品种, 已有研究者进行过其化学成分及多糖的研究^[3-5], 在云南德宏已有人工种植, 但未见组织培养的报道。现以云南德宏兜唇石斛饱满而未开裂的成熟蒴果作外植体进行萌发和育苗研究, 以期对兜唇石斛的规模化育苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用兜唇石斛的成熟蒴果采自云南德宏。

1.2 试验方法

1.2.1 兜唇石斛种子萌发诱导 取饱满未开裂的成熟果实, 放入烧杯中加 4~5 滴洗洁精, 加 500 mL 水搅拌 10 min, 纱布封烧杯口自来水冲洗 15 min, 在超净工作台上用 75%酒精表面灭菌 30 s, 无菌水冲洗 1 次, 用 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min, 无菌水冲洗 5 次。将灭菌好的果实表皮切开, 把种子置于装有无菌水的烧杯中, 振荡使其均匀, 用药勺转接入种子萌发诱导培养基上。诱导培养

基为 MS+蔗糖 20 g/L+香蕉泥 100 g/L+活性炭 10 g/L, NAA(0.5、1.0 mg/L)、6-BA(1.0、2.0、4.0 mg/L)、GA(0.1、0.2、0.5 mg/L), 每种培养基接种 10 瓶, 结果取其算术平均值。培养温度为(27±2)℃, 暗培养 20 d 后改为光照培养, 光照强度为 2 000 lx, 每天光照 14 h。

1.2.2 兜唇石斛的继代培养 6 周后把种子萌芽试验中的一部分小苗用来进行继代培养, 继代培养基为 MS 培养基加活性炭 2 g/L、琼脂 8 g/L、蔗糖 20 g/L、香蕉汁 150 g/L, NAA 0.2 mg/L, 6-BA 1.0 mg/L, 2 周培养后观察结果。

1.2.3 兜唇石斛根的诱导培养 选择 1~2 cm 的石斛苗接种于生根培养基, 每瓶 15 棵原生苗, 基本培养基为 1/4MS 培养基, 加活性炭 2 g/L、琼脂 8 g/L、蔗糖 20 g/L、香蕉汁 150 g/L, 添加不同植物激素。培养温度为(27±2)℃, 光照强度为 2 000 lx, 每天光照 14 h。

2 结果与分析

2.1 兜唇石斛种子的萌发

光照培养 10 d 左右兜唇石斛种子开始看得到绿色原球茎(图 1), 经过 50 d 培养, 统计在培养基中兜唇石斛种子萌发情况。由表 1 可知, 7 种培养基中都可诱导种子萌芽, 其中 GA 对种子萌发的影响最大, 加 NAA 比不加好, 但 NAA 影响较小, 6-BA 较适宜的浓度为 2.0 mg/L, 最佳激素组合为 NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+GA 1.0 mg/L。

2.2 兜唇石斛的继代培养

由于采用的是兜唇石斛的原生苗进行转接繁殖, 小苗长势比较整齐, 叶片翠绿(图 3)。在原来的苗基部萌发出粉花石斛小芽。

2.3 兜唇石斛的生根培养

生根培养小苗经 2 周培养开始长根, 每株有 2~6

第一作者简介:杜刚(1973-), 男, 硕士, 副教授, 现主要从事植物组织培养及天然产物生物催化研究工作。E-mail: dugang2006@yahoo.com.cn。

基金项目:云南民族大学青年基金资助项目(11QN04); 云南省教育厅科学研究基金重点资助项目(2011Z005)。

收稿日期:2012-02-20

条根,7 周后观察到根长度可达 5 cm 左右(图 4),由表 2 可看出,6-BA 有利于根的生长,最好激素组合为 NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L。

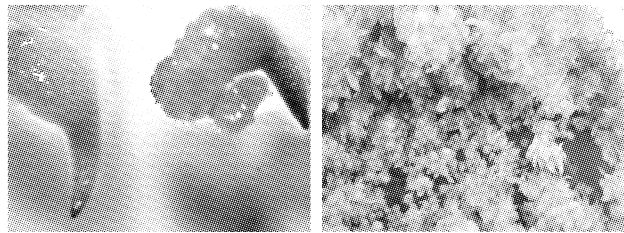


图 1 兜唇石斛种胚形成的原球茎 图 2 兜唇石斛丛生芽
Fig. 1 Protocorm from the seeds of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch Fig. 2 Buds of *Dendrobium aphyllum*(Roxb.) C. E. C. Fisch

表 1 兜唇石斛种子芽诱导
Table 1 Seedling inducing of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch

培养基 Medium	激素 Hormone/mg · L ⁻¹			种子萌发数 Germinate amount of seed/个
	NAA	6-BA	GA	
1	0	1.0	0	77
2	0	2.0	0	88
3	0	4.0	1.0	101
4	0.5	2.0	1.0	142
5	0.5	1.0	1.0	108
6	0.5	4.0	0	90
7	1.0	1.0	2.0	97

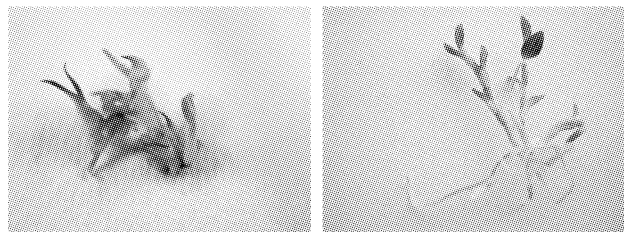


图 3 兜唇石斛继代培养苗 图 4 兜唇石斛生根苗
Fig. 3 Subculture of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch Fig. 4 Root seedlings of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch

表 2 兜唇石斛种子苗生根培养
Table 2 Seedling inducing of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch

培养基 Medium	激素 Hormone/mg · L ⁻¹		每株生根数 Root amount of per plant/条
	NAA	6-BA	
1	2.0	0.2	3.8
2	2.0	0.5	4.2
3	1.0	—	2.1
4	0.5	1.0	2.8

3 讨论与结论

石斛蒴果中种子数量极多,若撒入培养基,会由于种子密度过大,造成萌发生长过于拥挤。所以该试验取先撒入无菌水,再用药勺进行均匀播撒。

通过种子培养可获得组培苗,GA 是打破种子休眠的植物激素。结果表明,在诱导兜唇石斛种子萌芽过程中,GA 可明显促进种子萌发,培养基 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+GA 1.0 mg/L+香蕉汁 150 g/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 8 g/L+活性炭 2 g/L 的培养基诱导出的小苗数目最多,萌发率最高,长势最好。在继代培养过程中,由于用的是原生苗进行转接,继代主要是为生根作准备。在生根培养试验中,适当添加细胞分裂素有利于根的生长。由 1/4MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+香蕉汁 150 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 8 g/L+活性炭 2 g/L 诱导的根系生长最好。

参考文献

[1] 林萍,毕志明,徐红,等. 石斛属植物药理活性研究进展[J]. 中草药, 2003,34(11):19-22.
[2] 云南省植物研究所. 云南植物志[M]. 1 卷. 北京:科学出版社,1977: 8-13.
[3] 邵莉,黄卫华,张朝凤,等. 兜唇石斛的化学成分研究(D)[J]. 中国中药杂志,2008,33(14):1693-1695.
[4] 张朝凤,邵莉,黄卫华,等. 兜唇石斛酚类化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(24):2922-2925.
[5] 赵永灵,王世林,李晓玉. 兜唇石斛多糖的研究[J]. 云南植物研究, 1994,16(4):392-396.

Study on the Tissue Culture of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch

DU Gang,LAI Tian-chao,YANG Hai-ying

(Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry,State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education,College of Chemistry and Biotechnology,Yunnan University of Nationalities,Kunming,Yunnan 650500)

Abstract: Taking mature capsule of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch as explant, the effect of different medium and phytohormones on seeds germination and root induction of seedlings of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch. were studied. The results showed that seedlings could be induced from seed. The most appropriate medium for seedling inducing was MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+GA 1.0 mg/L+banana juice 150 g/L+sugar 20 g/L+agar 8 g/L+activated carbon 2 g/L. The most appropriate rooting medium was 1/4MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+banana juice 150 g/L+sugar 20 g/L+agar 8 g/L+activated carbon 2 g/L.

Key words: *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch;tissue culture;seedling;medium