

药用植物马鞭石斛组织培养与快速繁殖

李 翠, 张 占 江, 韦 莹, 李 林 轩, 凌 征 柱, 韦 坤 华

(广西壮族自治区药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023)

摘 要:以马鞭石斛(*Dendrobium fimbriatum* Hook. var. *oculatum*. Hook.)的种子为外植体进行了组织培养快速繁殖技术研究,以期筛选出适合各个阶段培养的培养基配方。结果表明:马鞭石斛种子萌发原球茎诱导的最佳培养基为 MS+GA 0.1 mg/L+6-BA 1.5 mg/L,诱导率达 85%;KT 0.5 mg/L+6-BA 2.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 的 MS 培养基最适宜马鞭石斛原球茎增殖及幼苗分化,分化率为 90%;最适宜马鞭石斛生根的培养基为 MS+AC 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L,生根率为 100%。

关键词:马鞭石斛;组织培养;原球茎;生根

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0105-03

马鞭石斛主产于广西、贵州、云南等地,是国家三级珍稀濒危保护植物^[1-2],同时被《中华人民共和国药典》2010 年版收录。马鞭石斛具有益胃生津、滋阴清热等功效,可以治疗阴伤津亏、口干烦渴、食少干呕、病后虚热、目暗不明等症状,其抗肿瘤效果尤为明显,研究表明其抗宫颈癌的效果好于铁皮石斛^[3-6]。随着人们对健康的重视和养生理念的增强,近年来马鞭石斛市场需求日渐增加,原本稀缺的自然资源加之盲目采挖,根本无法满足消费需求,应用生物技术手段大量生产是解决种源短缺的重要手段。该试验通过组织培养技术进行马鞭石斛的快速繁殖研究,以为马鞭石斛资源的可持续利用开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

马鞭石斛(*Dendrobium fimbriatum* Hook. var. *oculatum*. Hook.)成熟蒴果采自广西壮族自治区药用植物园引种圃。

1.2 试验方法

将采回的成熟饱满的马鞭石斛未开裂果实去除表面污垢,用自来水冲洗干净后置于超净工作台上,用 70%酒精表面消毒 30~45 s,无菌水冲洗 3 次后再放入 0.1%升汞浸泡灭菌 5~8 min,并不停振荡,无菌水冲洗

3~5 次^[7]。在高压消毒过的布上用解剖刀剖开果皮,用镊子等挑取均匀量的马鞭石斛种子放入已经灭菌的诱导培养基,经培养获得无菌苗,截取无菌苗的茎段为外植体进行诱导培养。MS 为基本培养基,附加不同浓度的激素(2,4-D、6-BA、NAA)和添加物(活性炭),蔗糖 3%,琼脂 0.5%,pH 5.8~6.2,培养温度(26±2)℃,光照强度 1 500~2 200 lx,光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 原球茎的诱导

截取通过种子无菌培养获得的无菌苗的茎段,接种于诱导培养基中诱导原球茎的生成,为寻找最适宜诱导原球茎生成的培养基,设计成表 1 各处理。每个处理接种茎段 20 个,接种 40 d 后统计结果。由表 1 可以看出,GA 和 6-BA 对马鞭石斛原球茎的萌发率均具有显著影响,GA 和 6-BA 的浓度在一定范围内有利于马鞭石斛原球茎的萌发。当 GA 浓度为 0.1 mg/L 时,原球茎诱导率随着 6-BA 浓度的增加而增大。而当 GA 浓度为 0.5 mg/L 时,原球茎诱导率随着 6-BA 浓度的增加而降低。根据原球茎萌发率确定的最适合培养基激素浓度为 6-BA 1.5 mg/L+GA 0.1 mg/L,在此培养基上,马鞭石斛原球茎分化率达到 85%。

表 1 不同浓度 GA 和 6-BA 组合对马鞭石斛原球茎诱导的影响

处理	GA/mg · L ⁻¹	6-BA/mg · L ⁻¹	接种数/个	原球茎生成个数/个	诱导率/%
1	0.1	0.5	20	7	35
2	0.1	1.0	20	10	50
3	0.1	1.5	20	17	85
4	0.5	0.5	20	14	70
5	0.5	1.0	20	12	60
6	0.5	1.5	20	9	45

第一作者简介:李翠(1982-),女,硕士,研究实习员,现主要从事药用植物生理研究工作。E-mail:licuicui941@yahoo.cn.

责任作者:韦坤华(1983-),女,博士,助理研究员,现主要从事药用植物生物技术研究工作。E-mail:divinekh163.com.

基金项目:广西医疗卫生重点科研资助项目(重 200908)。

收稿日期:2012-11-09

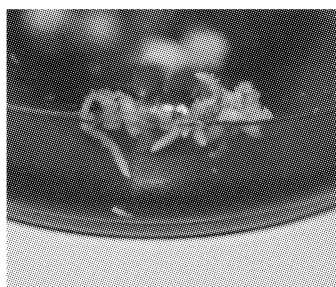


图1 原球茎诱导

2.2 原球茎的增殖及幼苗的分化

原球茎的增殖及幼苗的分化关系到马鞭石斛繁殖速度的快慢和增殖系数的高低。为寻找最适宜马鞭石斛原球茎幼苗分化的最适培养基,通过正交实验设计,以MS为基本培养基,附加不同浓度的KT、6-BA和NAA,每个处理接种20个原球茎,培养40d后统计结果(表2),方差分析结果见表3。由表2、3可以看出,3种激素对马鞭石斛幼苗分化的影响顺序为A(KT)>C(NAA)>B(6-BA),初步统计马鞭石斛幼苗分化率最高的培养基为 $A_2B_3C_3$,但此时的材料长势一般,叶色较淡,6-BA作为细胞分裂素,较高浓度时促使细胞分裂的效果更强,经过进一步试验验证其浓度由1.5 mg/L调整为2.5 mg/L时为最适宜马鞭石斛原球茎诱导及幼苗分化,培养基激素配比为 $A_2B_3C_3$,即KT 0.5 mg/L+6-BA 2.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L。方差分析结果表明,KT对马鞭石斛原球茎诱导分化及幼苗分化具有显著影响,适当浓度的KT可以增加试管苗的分化效率。方差分析结果表2

马鞭石斛幼苗分化培养基
筛选正交实验 $L_9(3^3)$ 结果

	A(KT)	B(6-BA)	C(NAA)	D	原球茎分化个数/个
1	1(0.1)	1(0.5)	1(0.0)	1	9
2	1	2(1.5)	2(0.5)	2	11
3	1	3(2.5)	3(1.0)	3	14
4	2(0.5)	1	1	3	16
5	2	2	2	1	20
6	2	3	3	2	18
7	3(1.0)	1	1	2	17
8	3	2	2	3	15
9	3	3	3	1	13
K1	34	42	42	42	$\Sigma=133$
K2	54	46	40	46	CT=1 965.44
K3	45	45	51	46	A>C>B
R	6.67	1.33	3.67	1.33	

表3 马鞭石斛幼苗分化培养基筛选方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F值	P
A	66.69	2	33.44	23.15	$0.01 < P < 0.05$
B	2.89	2	1.44	1.00	$P > 0.1$
C	22.89	2	11.44	7.92	$P > 0.1$
D	2.89	2	1.44	1.01	
SE	2.89	2	1.44		

注: $F_{1-0.01(2,2)}=99.0$, $F_{1-0.05(2,2)}=19.0$, $F_{1-0.1(2,2)}=9.0$ 。

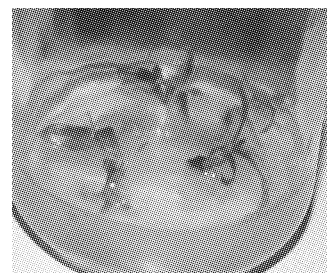


图2 继代培养

果也表明,6-BA和NAA对马鞭石斛原球茎诱导和幼苗分化没有显著影响。

2.3 壮苗生根

为了寻找马鞭石斛无菌苗生根壮苗的最适合培养基,设置不同处理(表4),将生长健壮,高2~3 cm的无根苗接种于4种不同处理的生根培养基上,每种培养基接种20株,培养40d后统计结果。NAA是具有较好生根作用的植物生长素,该试验在MS培养基中分别添加1.0和2.0 mg/L的NAA,结果表明较高浓度的NAA不利于马鞭石斛组培苗的生根,添加1.0 mg/L的NAA生根效果明显好于2.0 mg/L。同时在植物组织培养过程中,活性炭(AC)可提供生根的暗环境,防止褐变,提高培养物体内可溶性蛋白和总糖的含量,吸附植物生长调节剂与其它有利生根的物质^[8]。试验中当NAA浓度1.0 mg/L较低时,活性炭浓度的增加有利于马鞭石斛的生根,但是NAA浓度增加到2.0 mg/L时,活性炭浓度的增加反而会对马鞭石斛的生根具有一定的抑制作用。从以上结果可知,马鞭石斛最佳的生根培养基配方为MS+AC 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L,生根率达到了100%。

表4 不同植物培养基对马鞭石斛壮苗生根的影响

处理	NAA /mg·L ⁻¹	活性炭 /mg·L ⁻¹	接种数 /个	生根数 /个	生根率 /%	平均根数 /根
1	1.0	0.1	20	18	90	4.7
2	1.0	0.5	20	20	100	5.1
3	2.0	0.1	20	17	85	4.0
4	2.0	0.5	20	16	80	3.3



图3 生根培养

2.4 移栽

当瓶苗长至3~5 cm高,有3片以上叶和3~5条根时,即可出瓶移栽。为使无菌苗移栽后适应自然环境,出瓶前在实验室散射光下练苗2 d,转移至走廊处练苗3 d,将生根试管苗小心地从培养瓶中取出,用水洗净根部残留的培养基,3~5株1丛栽入基质(木屑:草炭土=3:1),其上覆盖一层苔藓,置于室内1周,2 d浇1次水,保持土质湿润80%左右。温度18~25℃。苔藓、木屑保水性和透气性都很好,移栽的成活率达到78%。



图4 生根培养

3 结论与讨论

在无菌播种的全部培养基中,种子均能萌发形成原球茎,而外植体诱导原球茎时,激素的配比很关键。该试验所得的马鞭石斛原球茎生成的最适宜培养基为MS+GA 0.1 mg/L+6-BA 1.5 mg/L。原球茎的增殖和幼苗分化受培养基中激素比例的影响更为明显,最适合马鞭石斛原球茎分化的培养基为KT 0.5 mg/L+6-BA 2.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L,其分化苗较健壮整齐,叶色较正。生长素NAA和添加物活性炭对马鞭石斛的壮苗生根起重要作用,MS+AC 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L的培养基为最适宜马鞭石斛壮苗生根的培养基。移栽的关键是选取适宜植物生长的栽培基质,石斛喜欢较高的空气湿度,该研究采用的基质为上覆一层苔藓的木屑与草炭土的混合基质。

马鞭石斛对生态环境要求苛刻,自然繁殖率低,生长缓慢,传统的分株、扦插、高芽繁殖率不高^[9-11],使得大规模基地建设和技术推广存在种苗数量不足的问题,使得产量和质量的提高受到限制。所以进行马鞭石斛优质种苗快速繁殖和培育研究并将其应用到规范化种植基地建设,可以有效解决这一瓶颈问题^[12-13]。该试验通过种子无菌播种获得的原球茎为外植体进行诱导、增殖、壮苗生根,建立了马鞭石斛快速繁殖体系,为规模化开发利用马鞭石斛奠定基础。

参考文献

- [1] 邓家刚,韦松基. 广西道地药材[M]. 北京:中国中医出版社,2007:125-134.
- [2] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:705-709.
- [3] 陈晓梅,郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(1):70-75.
- [4] 徐琼,陈素红,吕圭源. 3种不同石斛的化学成分及相关药理学研究进展[J]. 亚太传统医药,2010,6(4):115-119.
- [5] 毕志明,王峥涛,徐璐珊,等. 流苏石斛化学成分研究[J]. 药学学报,2003,38(7):526-529.
- [6] 张光浓,毕志明,王峥涛,等. 石斛属植物化学成分研究进展[J]. 中草药,2003,34(6):附5-8.
- [7] 田雪琪,张铁. 细茎石斛组织培养研究[J]. 文山师范高等专科学校学报,2007,2(3):114-116.
- [8] 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.
- [9] 郑虎占,董泽宏,余静. 中药现代研究与应用[M]. 3卷. 北京:学院出版社,1997:1377-1787.
- [10] 包雪声,顺庆生,陈立钻. 中国药用石斛彩色图谱[M]. 上海:上海医科大学出版社,复旦大学出版社,2001.
- [11] 白音,包英华,金家兴,等. 我国药用石斛资源调查研究[J]. 中草药,2006,37(9):4-6.
- [12] 卢文芸,唐金刚,乙引,等. 五种药用石斛快速繁殖的研究[J]. 种子,2005,24(5):23-25,28.
- [13] 叶秀妹,刘炜嫫,赖钟雄. 铁皮石斛组织培养研究进展[J]. 亚热带农业科学,2012,8(1):1-5.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Dendrobium fimbriatum* Hook. var. *oculatum*. Hook

LI Cui,ZHANG Zhan-jiang,WEI Ying,LI Lin-xuan,LING Zheng-zhu,WEI Kun-hua

(Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Conservation and Genetic Improvement, Nanning, Guangxi 530023)

Abstract: Taking the seeds of *Dendrobium fimbriatum* Hook. var. *oculatum*. Hook. as materials, the tissue culture and rapid propagation *in vitro* of it were studied, in order to screen the suitable medium in every stage. The results showed that the best medium for protocorm-like body induction was MS+GA 0.1 mg/L+6-BA 1.5 mg/L, with the inductivity 85%. The best bud differentiation and proliferation medium was MS+KT 0.5 mg/L+6-BA 2.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L, with the differentiation rate 90%. The best medium for rooting was MS+AC 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L, with the rooting rate 100%.

Key words: *Dendrobium fimbriatum* Hook. var. *oculatum*. Hook.; tissue culture; protocorm-like body; rooting