

# 铁皮石斛快速繁殖体系研究

杨立昌, 乙引, 张宇斌, 宋庆发, 林俊清

(贵州师范大学 生命科学院 贵州 贵阳 550001)

**摘要:**以铁皮石斛愈伤组织为试材,比较培养基组分、植物激素种类、浓度及添加剂等对铁皮石斛增殖、壮苗及生根的影响。结果表明:愈伤组织增殖最适培养基为:MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;不定芽诱导的最适培养基:1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;幼苗壮苗的最适培养基为:MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+香蕉汁 30%;根诱导培养基:MS+IBA 0.4 mg/L+NAA 0.3 mg/L。

**关键词:**铁皮石斛;愈伤组织;增殖;诱导

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)22-0136-03

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为兰科石斛属多年生草本植物,俗称铁皮枫斗,又名黑节草,因其表皮呈铁绿色而得名<sup>[1]</sup>。铁皮石斛具有独特的药用价值,秦汉时期《神农本草经》有“主伤中、除痹、下气、补五脏虚劳羸瘦、强阴、久服厚肠胃”的记载,《本草纲目》中亦有“强阴益精,厚肠胃,补内绝不足,平胃气,长肌肉,益智除惊,轻身延年”的记载。道家医学经典《道藏》将铁皮石斛列为“中华九大仙草”之首<sup>[2]</sup>,民间称其为“救命仙草”,是常用名贵中药<sup>[3]</sup>。铁皮石斛具有提高免疫力、抗衰老、防治肿瘤和心血管疾病以及改善睡眠、防治

白内障等疾病的功能,临床上用于治疗慢性咽炎、消化系统疾病、眼科疾病、血栓闭塞疾病、癌症和辅助治疗,特别是近几年用于癌症放疗、化疗后的副作用消除和体能恢复,效果显著<sup>[4]</sup>。现代药理研究表明:铁皮石斛还具有抗肿瘤、抗衰老,增强人体免疫力及扩张血管的作用<sup>[5]</sup>。

铁皮石斛生长缓慢且自身繁殖能力低,对生境要求苛刻,自然产量极为稀少,更因药用价值高遭到人们的过度采挖,致使野生资源濒临绝种<sup>[6]</sup>。目前,我国野生铁皮石斛资源日趋减少,被列为国家二级保护植物<sup>[7]</sup>。因此,亟需开展铁皮石斛快速繁殖研究。现拟通过对铁皮石斛增殖、壮苗和生根过程中培养基、激素和添加剂的研究,以为铁皮石斛的快速繁殖提供理论数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

铁皮石斛愈伤组织由贵州师范大学生命科学学院应用分子生物学校级重点实验室提供。

**第一作者简介:**杨立昌(1974),男,硕士,讲师,现主要从事药用植物学研究工作。

**通讯作者:**乙引(1967),男,博士,教授,现主要从事药用植物开发与利用研究工作。E-mail: yiyin@gznu.edu.cn。

**基金项目:**贵州省中药现代化科技产业研究开发专项资助项目(黔科合社字[2009]5043号);贵州省科技创新人才团队建设资助项目(黔科合人才团队[2009]4007号)。

**收稿日期:**2010-08-19

## Tissue Culture and Rapid Propagation of *Hydrocotyle vulgaris*

CHEN Tong, HE Cai-ming, JIANG Ming

(College of Life Sciences, Taizhou University, Linhai, Zhejiang 317000)

**Abstract:** A tissue culture and rapid propagation system of *Hydrocotyle vulgaris* was established. The results showed that stem was the best explant for the induction of callus. The most suitable medium for callus induction and adventitious bud proliferation was MS+BAP 3.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L; The best rooting medium was MS+NAA 0.1 mg/L.

**Key words:** *Hydrocotyle vulgaris*; tissue culture; rapid propagation

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配制与消毒 愈伤组织的增殖培养基: MS+6-BA (2. 0、2. 5、3. 0 mg/L)+NAA (0. 1、0. 2、0. 3 mg/L)+蔗糖 3%+琼脂 0. 8%; 不定芽诱导培养基: MS 或 1/2 MS+6-BA (0. 5、1. 0 mg/L)+NAA (0. 1、0. 2 mg/L)+蔗糖 3%+琼脂 0. 8%; 壮苗培养基: MS+6-BA (1. 0、1. 5、2. 0 mg/L)+NAA (0. 1、0. 2、0. 3 mg/L)+香蕉汁(10%、20%、30%)+蔗糖 3%+琼脂 0. 8%; 根诱导培养基: MS+IBA (0. 3、0. 4、0. 5 mg/L)+NAA (0. 3、0. 4、0. 5 mg/L)+蔗糖 3%+琼脂 0. 8%和 MS+6-BA (0. 5、1. 0、1. 5 mg/L)+NAA (0. 2、0. 4、0. 6 mg/L)+蔗糖 3%+琼脂 0. 8%。用 0. 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 调节至 pH 5. 8 121℃下湿热灭菌 20 min。

1.2.2 培养条件 将接种的培养基置于温度(25±2)℃,光照 12 h/d,光强为 1 000~1 500 k 培养室培养。每周观察 1 次并记录结果。

2 结果与分析

2.1 不同激素对铁皮石斛愈伤组织增殖的影响

以 MS 为基本培养基,培养 30 d 后,不同激素组合对铁皮石斛愈伤组织增殖的影响(表 1)。7 号培养基的愈伤组织增重率最高,为 42%;3 号培养基的增重率最低,为 20%。其余培养基的增重率均处在 3 号和 7 号培养基之间。因此,铁皮石斛愈伤组织增殖的最适培养基为 MS+6-BA 3. 0 mg/L+NAA 0. 1 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 0. 8%。

表 1 不同激素组合对铁皮石斛愈伤组织增殖影响

培养基序号	培养基组成			净重 / g	增重率 / %
	基本培	6-BA	NAA		
	培养基	/mg·L <sup>-1</sup>	/mg·L <sup>-1</sup>		
1	MS	2. 0	0. 1	0. 046	25
2	MS	2. 0	0. 2	0. 044	28
3	MS	2. 0	0. 3	0. 048	20
4	MS	2. 5	0. 1	0. 045	28
5	MS	2. 5	0. 2	0. 051	30
6	MS	2. 5	0. 3	0. 046	35
7	MS	3. 0	0. 1	0. 057	42
8	MS	3. 0	0. 2	0. 050	33
9	MS	3. 0	0. 3	0. 053	30

表 2 培养基和激素对愈伤组织不定芽的诱导

培养基名称	培养基组成		接种数/瓶	出芽数/株
	NAA/mg·L <sup>-1</sup>	6-BA/mg·L <sup>-1</sup>		
MS	0. 1	0. 5	30	45
MS	0. 2	0. 5	30	38
MS	0. 1	1. 0	32	56
MS	0. 2	1. 0	30	43
1/2MS	0. 1	0. 5	31	37
1/2MS	0. 2	0. 5	32	60
1/2MS	0. 1	1. 0	35	65
1/2MS	0. 2	1. 0	35	57

2.2 培养基和激素对铁皮石斛不定芽诱导的影响

表 2 结果表明,铁皮石斛愈伤组织在 1/2MS 培养基上的出芽率比 MS 培养基好,说明低盐培养基有利于不定芽的分化。植物激素浓度及其组合对铁皮石斛不定芽的诱导也有明显的影响 当培养基中的激素组合为 6-BA 1. 0 mg/L 和 NAA 0. 1 mg/L 时,出芽数为 65 株,其次为 6-BA 0. 5 mg/L 和 NAA 0. 2 mg/L 的组合,其出芽数为 60 株。因此,铁皮石斛不定芽诱导的最适培养基为 1/2MS+6-BA 1. 0 mg/L+NAA 0. 1 mg/L。

2.3 激素和添加物对铁皮石斛幼苗壮苗的影响

以 1/2MS 培养基为基本培养基,将组培苗接种于添加了不同浓度的天然成分物和植物激素中,接种 1 周后试管苗基本上无变化,到第 10 天,茎和叶的生长比较明显,但还未见长根的现象,3 周后可观察到组培苗的底部冒出白色的根。45 d 后,对苗的生理指标及长根情况进行测量统计。

由表 3 可知,不同激素和添加物的组合对铁皮石斛幼苗壮苗有极大的影响,接种后前 10 d 幼苗基本无变化,20 d 后组培苗叶子出现较深的绿色,进入生长高峰期,45 d 后 3 号培养基的平均净重量最低,为 0. 138 g;8 号培养基的平均净重量最高,为 0. 165 g,其次为 5 号,平均净重量 0. 163 g,分别为 3 号培养基的 1. 19 和 1. 18 倍。由表 3 可知,铁皮石斛幼苗壮苗的最适培养基为: MS+6-BA 1. 5 mg/L+NAA 0. 1 mg/L+香蕉汁 30%。

表 3 不同激素和添加物的组合对铁皮石斛幼苗壮苗的影响

培养基序号	培养基组成			接种数 / 瓶	平均净重/g
	香蕉汁	6-BA	NAA		
	/ %	/mg·L <sup>-1</sup>	/mg·L <sup>-1</sup>		
1	10	1. 0	0. 1	28	0. 150
2	10	1. 5	0. 2	28	0. 146
3	10	2. 0	0. 3	27	0. 138
4	20	1. 0	0. 2	26	0. 162
5	20	1. 5	0. 3	28	0. 163
6	20	2. 0	0. 1	26	0. 157
7	30	1. 0	0. 3	28	0. 154
8	30	1. 5	0. 1	29	0. 165
9	30	2. 0	0. 2	27	0. 156

2.4 激素组合对铁皮石斛幼苗根诱导及生根的影响

由表 4. 5 可知,生长素和细胞分裂素的作用机制不同,添加 IBA 0. 4 mg/L 和 NAA 0. 3 mg/L 的组合对根的诱导效果最好,其诱导率为 85%;6-BA 1. 5 mg/L 和 NAA 0. 4 mg/L 的组合对根的诱导次之,其诱导率为 82%。从根的生长来看,IBA 0. 3 mg/L 和 NAA 0. 5 mg/L 的组合能促进铁皮石斛根的生长,其次为 6-BA 0. 5 mg/L 和 NAA 0. 6 mg/L 的组合。

表 4 NAA 和 IBA 组合对铁皮石斛幼苗根诱导影响					
NAA	IBA	接种数	平均生根数	生根率	根长度
/mg·L <sup>-1</sup>	/mg·L <sup>-1</sup>	/瓶	/株·条 <sup>-1</sup>	/%	/cm
0.3	0.3	28	3.0	71	0.12~0.33
0.3	0.4	28	4.1	85	0.14~0.45
0.3	0.5	27	2.5	72	0.20~0.38
0.4	0.3	26	2.5	78	0.08~0.25
0.4	0.4	28	3.1	74	0.15~0.32
0.4	0.5	26	2.0	76	0.14~0.46
0.5	0.3	28	2.3	81	0.33~0.54
0.5	0.4	29	2.1	80	0.16~0.49
0.5	0.5	27	3.0	86	0.18~0.47

表 5 NAA 和 6-BA 组合对铁皮石斛幼苗根诱导及生根的影响					
NAA	6 BA	接种数	平均生根数	生根率	根的长度
/mg·L <sup>-1</sup>	/mg·L <sup>-1</sup>	/瓶	/株·条 <sup>-1</sup>	/%	/cm
0.2	0.5	28	1.5	43	0.21~0.32
0.2	1.0	28	2.2	60	0.15~0.45
0.2	1.5	29	2.6	68	0.14~0.34
0.4	0.5	27	1.5	78	0.16~0.40
0.4	1.0	26	3.4	80	0.08~0.35
0.4	1.5	28	2.3	82	0.15~0.38
0.6	0.5	26	1.8	75	0.24~0.46
0.6	1.0	29	2.5	75	0.21~0.50
0.6	1.5	27	2.4	69	0.18~0.47

3 结论与讨论

植物生长调节物质(植物激素)是培养基中的关键物质,虽然用量小,但在植物组织培养中起着重要的调节作用<sup>[8]</sup>。通常,在植物组织培养中使用的激素包括生长素、细胞分裂素等,而 NAA 和 6-BA 组合常用于诱导生根。该研究比较了 NAA 与 6-BA 和 IBA 的组合对生根的影响,发现 NAA 与 IBA 的组合生根效果比 NAA 与 6-BA 的组合好(表 4、5)。推测可能的原因是 IBA 经根吸收后,不易被吡哆乙酸氧化酶分解,从而导致其生物活性持续时间较长<sup>[9]</sup>。通过比较 MS 和 1/2MS 对不定芽的诱导发现,1/2MS 的效果比 MS 好,推测培养基的高盐浓度对幼苗产生了一定的盐害。

植物生长素的作用是启动植物细胞脱分化,植物细胞分裂素的作用是使已经脱分化的细胞或细胞团保持分裂,从而使细胞团能进行继代培养<sup>[10]</sup>。在该研究中,6-BA 3.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 的组合对铁皮石斛愈伤组织增殖影响最大,6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 能很好地诱导不定芽产生,6-BA 1.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L 和香蕉汁 30%的组合能增强壮苗效果。这些结果表明,在铁皮石斛的生长发育过程中,生长素和细胞分裂素的浓度对其形态分化起着极其重要的作用。

通过组织培养的方式可在短时间内提供大量种苗,对于铁皮石斛 GAP 种植具有重要意义。通常,组织培养过程不仅要提高铁皮石斛的产量,还要保证铁皮石斛的质量。该研究只解决了前者,对于后者还有待进一步深入研究。

参考文献

[ 1 ] 王宪楷,赵同方.石斛属植物的化学成分与中药石斛[ J ].药学通报 1989, 21( 11 ): 666-669.

[ 2 ] 朱艳,秦民坚.铁皮石斛茎段诱导丛生芽的研究[ J ].中国野生植物资源 2003, 22( 2 ): 56-57.

[ 3 ] 蔡体育.石斛多糖对 T 细胞巨噬细胞活性的影响[ J ].中山医科大学学报 1989, 10( 2 ): 66-69.

[ 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( 4 ): 23-27.

[ 5 ] 张治国,俞巧仙.名贵中药—铁皮石斛[ M ].上海:上海科学技术文献出版社,2003.

[ 6 ] 郑博仁.云南石斛属药材现状及其原植物[ J ].中国中药杂志 1990, 15( 1 ): 9.

[ 7 ] 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.

[ 8 ] 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, 2005, 18( 1 ): 23-26.

[ 9 ] 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.

[ 10 ] 刘颖,魏景芳,李冬杰.甘草愈伤组织培养中激素优化组合的研究[ J ].中草药, 2006, 37( 6 ): 931-933.

Study on Rapid Propagation of *Dendrobium candidum*

YANG Li-chang, YI Yin, ZHANG Yu-bin, SONG Qing-fa, LIN Jun-qing  
(School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001)

**Abstract:** Using method of tissue culture, the effect of medium components, plant hormones and additive agents on callus propagation, seedling growth and root induction of *Dendrobium candidum* were studied. The results showed that the best culture medium for callus propagation was MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, that the best for bud induction was 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, that the best for seedling growth was MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+30%banana juice, and that the best for root induction was MS+IBA 0.4 mg/L+NAA 0.3 mg/L.

**Key words:** *Dendrobium candidum*; callus; proliferation; induction