

铁皮石斛幼苗壮苗培养的研究

余丽莹¹, 周雅琴¹, 韦莹¹, 余海霞¹, 谭小明^{1,2}

(1. 广西药用植物园, 广西 南宁 530023; 2. 中国医学科学院-北京协和医学院 药用植物研究所药用植物菌根研究室, 北京 100094)

摘要:以铁皮石斛无菌幼苗为外植体, 研究不同基本培养基、生长激素、天然添加物、蔗糖浓度和活性炭浓度对幼苗壮苗的影响。结果表明: 苗龄 4 个月的铁皮石斛幼苗最佳的壮苗培养基为: 1/2MS+1.0 mg/L NAA+30% 椰汁+30 g/L 蔗糖+2 g/L 活性炭+8 g/L 琼脂, pH 5.8。

关键词:铁皮石斛幼苗; 壮苗培养基; 椰汁; NAA

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)05-0132-03

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 属兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)多年生附生草本。常生长在海拔达 1 600 m 的山坡半阴湿的岩石上, 在我国主要分布云南东南部(石屏、文山、麻栗坡、西畴)、广西西北部(天峨)和浙江东部(天台、仙居)等地^[1]; 是《中国药典》2010 版收录的铁皮石斛药材的原植物, 是石斛药材中最珍贵的品种, 具有滋阴清热、益胃生津的功效, 用于热病津伤、口干烦渴、胃阴不足、食少干呕、病后虚热不退、阴虚火旺、骨蒸劳热、目暗不明、筋骨痿软^[2]。近年来化学和药理研究表明铁皮石斛中含有丰富的多糖类成分^[3], 这种多糖成分具有增强人体免疫力、抗癌抗癌、恢复嗓音等功效^[4-5]。加工后的铁皮石斛俗称为“铁皮枫斗”^[2], 市场价格昂贵, 是一种医用价值和经济价值都很高的名贵中药^[6-7]。近年来由于过度采挖、原始森林生态环境破坏等原因, 铁皮石斛野生资源逐年减少, 而其对生境要求苛刻、自身繁殖率低等生理因素, 导

致了铁皮石斛濒临灭绝^[8], 现已被列入《中国植物红皮书》^[9]。为了保护这一濒危的名贵中药, 国内的学者开展了铁皮石斛的组培快繁、种子萌发及菌根方面的研究^[10-13], 取得了一定的进展。但在铁皮石斛幼苗壮苗培养方面研究得还不够细致, 目前铁皮石斛试管苗弱、移栽成活率低、壮苗周期长还是铁皮石斛大规模生产的障碍。为此, 该试验探讨了基本培养基、生长激素、天然添加物和蔗糖及活性炭等对铁皮石斛幼苗壮苗的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

铁皮石斛(*D. officinale*)蒴果, 采自云南西双版纳(图 1 左)。将铁皮石斛蒴果用 70% 的乙醇消毒 1 min, 2.5% 次氯酸钠消毒 10 min, 无菌水冲洗 3 次。然后, 用无菌的手术刀切开果皮取出种子, 播种在 N6 培养基上。然后在 25℃ 光暗交替培养 4 个月, 即可获得该研究所需的无菌幼苗(图 1 右), 幼苗有 1~2 条根, 真叶 2~3 片。

1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基对幼苗生长的影响 研究 1/2MS (大量元素减半)、MS、B₅、KC、WT 等 5 种不同基本培养基对幼苗生长的影响。分别添加 NAA 1.0 mg/L、30% 椰汁和 30 g/L 蔗糖。

第一作者简介:余丽莹(1974-), 女, 硕士, 副研究员, 现主要从事药用植物资源学研究和药用植物保育工作。

基金项目:广西药用植物园青年基金资助项目(桂药基 200810); 广西自然科学基金资助项目(桂科自 0447040)。

收稿日期:2011-12-05

Study on Tissue Culture of *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch.

GU Yu, LI Long, XU Qiang

(College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

Abstract: With *R. trigyna* as material, influence of adventitious bud differentiation and adventitious root induced that effect by different medium and auxin ratio were studied, to establish *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch. rapid propagation system. The results showed that the best condition for *R. trigyna* adventitious bud differentiation was MS+1.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA, and the best culture conditions for adventitious roots induced was 1/2MS+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L VB₁.

Key words: *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch.; adventitious bud differentiation; adventitious roots induced

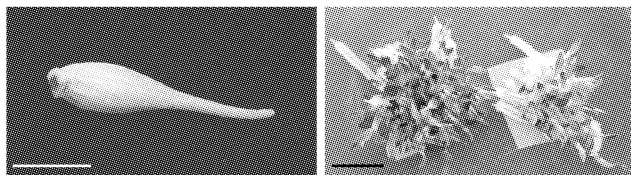


图1 铁皮石斛蒴果(左图)和无菌幼苗(右图)(Bar=1 cm)

1.2.2 不同生长激素及浓度对幼苗生长的影响 研究 IAA、NAA、IBA 等 3 种生长激素,在浓度分别为 0.5、1.0、2.0 mg/L 时对幼苗生长的影响,以不加生长激素的处理为空白对照。基本培养基为 1/2MS,附加 30 g/L 蔗糖和 30% 椰汁。

1.2.3 天然添加物及浓度对幼苗生长的影响 研究椰汁、土豆提取物和香蕉提取物,在浓度分别为 10%、20%、30% 时,对幼苗生长的影响。以不加添加物为空白对照。基本培养基为 1/2MS,附加 30 g/L 蔗糖。

1.2.4 不同蔗糖浓度对幼苗生长的影响 研究不同浓度蔗糖对幼苗生长的影响。浓度设计为:10、20、30、40、50 g/L。以 1/2MS 为基本培养基,添加 30% 椰汁。

1.2.5 不同活性炭浓度对幼苗生长的影响 研究不同浓度活性炭对幼苗生长的影响。浓度设计为:0、1、2、4 g/L。以 1/2MS 为基本培养基,添加 30 g/L 蔗糖和 30% 椰汁。

1.2.6 培养条件 上述培养基的琼脂均为 8 g/L, pH 5.8~6.0。培养条件为:温度(24±2)℃,每天光照 12 h,光照强度 1 500~2 000 lx,培养周期为 3 个月。

1.2.7 统计幼苗生长状况 幼苗接种 3 个月后,分别观察统计株高、分蘖数、叶色、新叶数、新根数、根的生长状况等。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对幼苗生长的影响

由表 1 可知,在添加了 1.0 mg/L NAA 和 30% 椰汁的 5 个基本培养基上,铁皮石斛幼苗都能分蘖,形成丛生芽。培养到 3 个月时,幼苗在 1/2MS 培养基上生长最好,苗高,叶色浓绿,根深绿色或稍白,平均单株分蘖倍数达到 6.51,在所有培养基中单株分蘖数最多;在 B₅ 培养基上,幼苗叶色绿,茎较粗,根绿;在 KC 培养基上,幼苗叶色绿,茎粗细一般,根绿;在 MS 培养基上,幼苗生长一般,根绿;在 WT 培养基上,幼苗生长明显不如 1/2MS 和 B₅,叶绿无光泽。

表 1 基本培养基对幼苗生长的影响

培养基	苗高/cm	分蘖数/株	根数/条	叶色
1/2MS	4.33	6.51	6.25	深绿
MS	3.01	4.23	5.75	浅绿
B ₅	3.55	6.05	6.25	绿
KC	3.31	5.99	5.75	绿
WT	2.79	4.23	6.05	浅绿

2.2 不同生长激素及浓度对幼苗生长的影响

由表 2 可知,在添加了椰汁的培养基上,NAA 等 3 种激素对幼苗的生根都有一定的作用;其中,添加 1.0 mg/L NAA 的培养基,幼苗的长势最佳,苗高,茎较粗,根多,长势健壮,随着浓度的增加,容易产生。这可能与根的健壮生长,同步地促进了幼苗对营养的吸收,加快了植株茎叶的生长有关。

表 2 不同生长激素及浓度对幼苗生长的影响

生长素	浓度/mg·L ⁻¹	苗高/cm	叶数/片	根数/条	叶色
CK	—	2.35	5.15	4.75	浅绿
NAA	0.5	2.96	5.42	5.05	绿
	1.0	3.35	6.00	6.55	绿
	2.0	3.20	5.75	5.45	绿
IBA	0.5	2.40	5.30	5.00	绿
	1.0	3.26	5.50	5.45	绿
	2.0	3.23	5.56	5.45	绿
IAA	0.5	2.50	5.05	4.85	绿
	1.0	2.67	5.35	5.15	绿
	2.0	2.66	5.35	5.55	绿

2.3 不同天然添加物及浓度对幼苗生长的影响

由表 3 可知,添加椰汁的培养基上,幼苗的健壮度优于香蕉和马铃薯。在 10% 椰汁培养基上,幼苗整齐,茎粗壮,叶浅绿、粗短,根系发达,根粗长;在香蕉培养基上,幼苗整齐,茎稍粗,叶绿、细长,根粗长,根系发达;在添加马铃薯提取物的培养基上,幼苗大小不一致,茎粗一般,叶浅绿、细长,根少。综合幼苗根、茎、叶的表现,椰汁和香蕉提取物对促进铁皮石斛壮苗有较好的作用。

表 3 不同天然添加物及浓度对幼苗生长的影响

添加物	浓度/%	苗高/cm	叶数/片	根数/条	叶色
椰汁	10	3.75	3~4	4.65	浅绿
	20	3.77	3~4	5.51	绿
	30	3.80	3~4	6.21	绿
香蕉	10	3.15	3~4	5.33	绿
	20	3.16	3~4	5.35	绿
	30	3.18	3~4	5.35	绿
土豆	10	2.55	3~4	4.10	绿
	20	2.87	3~4	4.45	绿
	30	2.91	3~4	4.50	绿

2.4 不同蔗糖浓度对幼苗生长的影响

由表 4 可知,蔗糖为铁皮石斛幼苗的生长提供必需的能量和碳源。在该试验条件下,随着蔗糖浓度的提高,幼苗的生长速度加快,群体长势均匀,茎节间伸长,茎粗,叶绿色,根绿色。当浓度达到 50 g/L 时,幼苗叶片枯黄,群体长势不一致,弱苗较多,茎节间短。因此,适宜的蔗糖浓度为 30 g/L。

表 4 不同蔗糖浓度对幼苗生长的影响

蔗糖浓度/g·L ⁻¹	苗高/cm	叶数/片	根数/条	叶色
10	3.95	3~4	4	浅绿
20	4.77	3~4	4	绿
30	4.80	3~4	4	绿
40	3.80	3~4	4	淡黄
50	3.40	3~4	4	淡黄

2.5 不同活性炭浓度对幼苗生长的影响

由表5可知,在培养基加入活性炭,一方面可促进幼苗生根;另一方面还可吸附植株新陈代谢过程中产生的酚类物质,防止培养基褐化,影响植物的生长。试验结果表明,随着培养基中活性炭浓度的提高,幼苗的生根数也相应增多,当浓度为2 g/L时,幼苗生长较快,茎粗,生根数达到5.34条,根长5 cm;当浓度为4 g/L时,植株的生根数为对照的4倍左右,但植物的生长较慢,根短,平均长度为2.5 cm左右;没有活性炭的培养基,植物生根较少,平均只有1~2条,根短。因此,适宜的活性炭浓度为2 g/L或4 g/L。

表5 不同活性炭浓度对幼苗生长的影响

活性炭浓度/g · L ⁻¹	根长/cm	根数/条
0	1.25	1~2
1	4.77	4~5
2	5.00	5~6
4	2.53	5~6

3 结论

近10 a来,为了保护野生铁皮石斛的种质资源,国内的学者开展了铁皮石斛的组培快繁、种子萌发及菌根方面的研究,取得了一定的进展。但在铁皮石斛壮苗培养方面研究得还不够细致。该试验从培养基、生长素、添加物等几方面,研究了影响铁皮石斛壮苗的因素。结果表明,苗龄4个月的铁皮石斛幼苗最佳的壮苗培养基为:1/2MS+1.0 mg/L NAA+30%椰汁+30 g/L蔗糖+2 g/L活性炭+8 g/L琼脂,pH 5.8。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 19卷. 北京: 科学出版社,1999.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2010.
- [3] 杨虹,王顺春,王峰涛,等. 铁皮石斛多糖的研究[J]. 中国药理学杂志, 2004,39(4):254.
- [4] 张红玉,戴关海,马翠,等. 铁皮石斛多糖对 S180 肉瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 浙江中医杂志,2009,44(5):380-381.
- [5] 孟志霞,房慧勇,郭顺星,等. 营养因子对铁皮石斛幼苗生长的影响[J]. 中国药理学杂志,2008,43(9):665-668.
- [6] 刘伟,陈美霞,魏日凤. 石斛属植物开发利用研究进展[J]. 亚热带农业研究,2011,7(2):87-91.
- [7] Razdan M K. The threatened wild plants used for medicine [J]. Biodiversity,2002,25(3):12-19.
- [8] 郭洪波,于晓丹,陈丽静,等. 铁皮石斛茎节离体培养的研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(11):2659-2660.
- [9] 傅立国. 中国植物红皮书-稀有濒危植物(I) [M]. 北京: 科学出版社,1992.
- [10] Wang H, Fang H Y, Wang Y Q, et al. In situ seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: the endangered Chinese endemic *Dendrobium*(Orchidaceae) [J]. World J Microbiol Biotechnol,2011,27:2051-2059.
- [11] 侯丕勇,郭顺星. 悬浮培养的铁皮石斛原球茎在固体培养基上生长和分化的研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(10):729-732.
- [12] 刘骅,张治国. 铁皮石斛试管苗壮苗培养基的研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(11):654-702.
- [13] 郭顺星,曹文琴,高微微. 铁皮石斛及金钗石斛菌根真菌的分离及其生物活性测定[J]. 中国中药杂志,2000,25(6):338-341.

Study on Strengthening Cultivation on the Seedlings of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo in vitro

YU Li-ying¹, ZHOU Ya-qin¹, WEI Ying¹, YU Hai-xia¹, TAN Xiao-ming^{1,2}

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning, Guangxi 530023; 2. Mycorrhizal Department of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medicinal Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094)

Abstract: Taking the seedlings of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo as explants, the effects of these factors including minimal medium, growth hormone, natural additives, sugar and activated carbon on the growth of strengthening plantlet in three months were studied. The results showed that the 1/2MS with 1.0 mg/L NAA, 30% (v/v) coconut juice, 30 g/L sugar, 2 g/L activated carbon and 8 g/L agar could be used as the best strengthening medium for *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; strengthening medium; coconut juice; NAA