

铁皮石斛组培快繁技术的研究

曹天旭¹, 宿肇辉², 韩超慧¹

(1. 黑龙江农业经济职业学院, 黑龙江 牡丹江 157041; 2. 牡丹江市第二人民医院, 黑龙江 牡丹江 157000)

摘要:为了建立铁皮石斛快速繁殖体系,以其茎段为材料,研究了不同培养基组分、激素浓度对铁皮石斛增殖和生根的影响。结果表明:铁皮石斛在初代培养中用酒精消毒 30 s 后再用 0.1% 升汞杀菌 6 min 最为适宜;最适培养基为 MS 基本培养基;在 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA 中铁皮石斛的增殖效果最佳,在 MS 培养基中添加 3.0 mg·L⁻¹ IBA 生根效果最好,生根率可达 100%;试管苗移栽的最佳基质为苔藓,单独使用成活率可达 90.6%。

关键词:铁皮石斛;丛生芽;组织培养

中图分类号:S682.31

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)05-0030-05

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Kmiura et Migo)为兰科气生草本植物,又名黑节草、铁皮枫斗、千金草,为石斛之极品^[1]。铁皮石斛作为传统名贵中药材,主要分布于我国浙江、云南、安徽和福建等地,其植株中含有石斛碱、石斛次碱等生物碱及次甲基石斛素、石斛醌、挥发油和多糖等成分,具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、润喉明目、延年益寿之功效,被称为中华九大“救命仙草”之首^[2-6]。铁皮石斛因具有很高的药用价值,使得其具有较高的经济价值,目前国际市场干品价已达 1 000 美元·kg⁻¹以上^[7]。

野生铁皮石斛对生长条件要求苛刻,自然条件下种子萌发率较低,加之过度采挖,如今野生资源匮乏,已成为了濒危物种。铁皮石斛传统的无性繁殖系数低,无法满足大规模栽培的需求^[8]。因此,探寻快速有效的繁殖方法势在必行。该文以铁皮石斛茎段为材料,研究不同的培养基种类、植物生长调节剂及浓度对其发根、生长和增殖的影响,并对试管苗驯化后适宜的栽培基质进行了筛选,旨在提高铁皮石斛的繁殖系数和移栽成活率,为工厂化育苗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用材料为 2007 年引自浙江乐清铁皮石斛。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒体系的建立 选择长势旺盛的幼嫩枝条,除去所有叶片,切取除顶芽外的幼嫩茎段作为外植体。把经过预处理的材料在无菌条件下,放入 75% 酒精中,约 30 s 后用无菌水冲洗 2~3 遍,再用 0.1% 的升汞浸泡,消毒时间分别为 2、4、6、8 和 10 min,共 5 个处理,消毒过程中,轻轻晃动三角瓶,使药液与外植体充分接触,然后用无菌水冲洗 5 遍。将材料切成 1 cm 左右的茎段,接种于配制好的培养基中,每组接种 10 瓶,每瓶 1 个茎段,重复 3 次,7 d 后统计成活率。

1.2.2 不同基本培养基对铁皮石斛生长的影响 选择 MS、B₅、SH 和 White 为基本培养基,各添加 BA 2.0 mg·L⁻¹、NAA 0.5 mg·L⁻¹、蔗糖 30.0 g·L⁻¹ 及琼脂粉 5.5 g·L⁻¹,共 4 个处理。pH5.8,培养温度为 25℃,光照强度 2 000 lx,光照时间 16 h·d⁻¹,每个处理接种 5 个带节的茎段,培养 60 d 后统计试管苗鲜重、干重和株高。

1.2.3 BA 和 NAA 组合对铁皮石斛丛生芽增殖的影响 以 MS 为基本培养基,加入 BA 和 NAA,其浓度分别为 0、1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹ 和 0.5、1.0、1.5 mg·L⁻¹,两者完全随机组合,以空白为对照,附加蔗糖 30.0 g·L⁻¹ 和琼脂粉 5.5 g·L⁻¹,pH5.8,培养条件及调查方法同 1.2.2。

1.2.4 IBA 浓度对铁皮石斛生根的影响 以 MS 为基础培养基,附加蔗糖 20.0 g·L⁻¹、琼脂粉 5.0 g·L⁻¹ 和活性炭 1.0 g·L⁻¹,再加入浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 和 6.0 mg·L⁻¹ 的 IBA,pH5.8,共 10 个处理,培养条件及调查方法同 1.2.2。

收稿日期:2014-01-16

第一作者简介:曹天旭(1980-),男,吉林省农安县人,硕士,讲师,从事园艺植物组织培养和栽培育种研究。E-mail:3958053@qq.com。

1.2.5 试管苗移栽基质的选择 打开已发好根的试管苗培养瓶盖,注入一定量的自来水,在驯化室炼苗 3~4 d,用温清水洗净根部的培养基,分别移栽到草炭土、河沙、蛭石、苔藓中,共设置 4 个处理。基质事先灭菌后使用,移栽的铁皮石斛放于塑料小拱棚内,覆盖 40% 双层遮阳网,白天温度控制在 25℃ 左右,夜间 23℃ 左右,空气相对湿度最初为 100%,然后慢慢降低,15 d 后揭去塑料膜,进行常规管理,45 d 后调查成活率和生长状况。

1.2.6 数据分析 采用 Excel 和 SPSS 17.0 邓肯氏新复极差法进行比较分析,显著水平 $P \leq 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对铁皮石斛成活率的影响

使用同一浓度的酒精对铁皮石斛嫩茎消毒 30 s 后,随着升汞消毒时间的不同,外植体的成活率不同。从表 1 可以看出,升汞消毒时间过长或过短均不利于芽的成活。在消毒 6 min 时,成活率最高,达到 85%。

表 1 升汞的不同消毒时间对铁皮石斛组培成活率的影响

Table 1 Effects of different sterilization time for $HgCl_2$ on survival rate of tissue culture of *Dendrobium candidum*

处理 Treatments	消毒时间/min Sterilization time	成活率/% Survival rate				平均值 Average
		I	II	III		
1	2	20	30	26	25	
2	4	60	60	62	61	
3	6	80	90	85	85	
4	8	70	60	79	70	
5	10	50	50	53	51	

2.2 基本培养基种类对铁皮石斛增殖的影响

所有处理的外植体在培养 15 d 左右时,节间的腋芽开始突出,并逐渐伸长,但是分化的数目不多。新长出的小芽一般为黄绿色,随着培养时间的延长逐渐转为深绿色,而后继续生长成深绿色的成苗。

从表 2 可以看出,在 MS 和 SH 培养基中,铁皮石斛的成苗数、鲜重和干重显著高于 White 和 B_5 培养基,两者之间无显著差异;MS 培养的节数

和株高显著高于 SH、 B_5 和 White;MS 培养基中芽数分化最多,达到 2.08 个,显著高于 SH 和 White 培养基,但是与 B_5 之间差异不显著。

调查发现,SH 培养基中大部分成苗弱小、叶色发黄、生长势较弱,相比之下,MS 培养的试管苗颜色深绿,生长旺盛。综上所述,铁皮石斛丛生芽的诱导和生长要求营养成分比较全面的培养基,而 B_5 和 White 培养基成分简单,不利于健壮芽的诱导和生长。

表 2 培养基种类对铁皮石斛增殖和生长的影响

Table 2 Effect of medium on proliferation and growth of *Dendrobium candidum*

培养基种类 Medium types	节数/个 Number of knots	成苗数/个 Number of seedlings	丛生芽数/个 Number of cluster buds	株高/cm Plant height	鲜重/mg Fresh weight	干重/mg Dry weight
MS	9.50 a	2.29 a	2.08 a	4.24 a	0.89 a	0.0983 a
SH	6.48 b	1.83 a	1.12 b	2.91 b	0.74 a	0.0881 a
B_5	4.45 c	1.04 b	1.56 ab	2.65 b	0.35 b	0.0551 b
White	2.23 d	0.73 b	1.05 b	1.87 c	0.24 b	0.0366 b

注:小写字母为 0.05 显著水平的多重比较结果。下同。

Note: The lowercases mean significant multiple comparisons at 0.05 level. The same below.

2.3 激素种类和浓度对铁皮石斛增殖的影响

以 MS 为基本培养基,分别添加不同浓度的 NAA 和 BA,以空白为对照,比较不同浓度配比对铁皮石斛增殖的影响。从表 3 可以看出,在增殖芽数方面各处理间差异不明显,都有一定数量的增殖。处理 3 与处理 8 以及处理 4 与处理 5 的株高无显著差异,但显著高于其它处理。处理 3

的鲜重与处理 8 无显著差异,但显著高于其它处理。处理 3 与处理 8 的干重无显著差异,且二者显著高于除了处理 10 以外的其它处理。从经济方面考虑,选择处理 3,即 $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ 为铁皮石斛增殖的适宜培养基。

表 3 生长素浓度对铁皮石斛增殖的影响

Table 3 Effects of auxin concentration on proliferation of *Dendrobium candidum*

处理 Treatments	BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	丛生芽数/个 Number of cluster buds	株高/cm Plant height	鲜重/mg Fresh weight	干重/mg Dry weight
1	0	0	3.06 abc	1.42 c	0.48 f	0.0462 cd
2	0	0.5	4.50 ab	1.45 c	0.71 def	0.0549 bcd
3	1	0.5	4.83 a	2.15 a	1.33 a	0.0943 a
4	2	0.5	2.13 c	1.74 ab	0.51 ef	0.0375 d
5	3	0.5	2.08 c	1.72 ab	0.82 cde	0.0642 bc
6	0	1.0	3.50 abc	1.54 bc	0.74 cdef	0.0675 bc
7	1	1.0	3.60 abc	1.71 b	0.75 cdef	0.0636 bc
8	2	1.0	2.89 abc	2.13 a	1.16 ab	0.0909 a
9	3	1.0	3.50 abc	1.43 c	0.92 bcd	0.0671 bc
10	0	1.5	4.31 ab	1.48 c	0.90 bcd	0.0749 ab
11	1	1.5	4.43 ab	1.52 bc	0.87 bcd	0.0665 bc
12	2	1.5	3.53 abc	1.48 c	0.86 bcd	0.0653 bc
13	3	1.5	4.28 ab	1.33 c	0.85 cd	0.0679 bc

2.4 生长素浓度对铁皮石斛生根的影响

除对照外,不同的 IBA 浓度处理,其铁皮石斛的生根率均达到 100%,但对根和地上部的生长有差异。从表 4 可知,3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IBA 诱导出的铁皮石斛根最多,达到 14 条,根长、根鲜重和干重均显著高于其它处理。通过调查地上部的生长状况发现,3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 处理的株高、地上

部鲜重及地上部干重也明显优于其它处理;2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 处理的成苗数最多,与 0、1.5、2.5、3.0、5.0、6.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 处理间无显著差异;4.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 处理的丛生芽数最多,与 0 和 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 处理间差异显著,而与其它处理间差异不显著(见表 5)。

表 4 IBA 浓度对铁皮石斛生根的影响

Table 4 Effect of IBA concentration on the rooting of *Dendrobium candidum*

IBA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	根数/条 Number of roots	根长/cm Root length	根鲜重/mg Root fresh weight	根干重/mg Root dry weight
0	1.70 f	0.18 h	0.0007 e	0.0005 d
0.5	2.64 ef	0.37 fh	0.016 de	0.0015 d
1.0	3.15 e	0.60 ef	0.030 de	0.0030 cd

续表 4

Continuing Table 4

IBA/ mg·L ⁻¹	根数/条 Number of roots	根长/cm Root length	根鲜重/mg Root fresh weight	根干重/mg Root dry weight
1.5	5.50 d	0.95 de	0.045 cde	0.0051 cd
2.0	8.57 c	1.37 c	0.086 c	0.0090 c
2.5	10.71 b	2.41 b	0.156 b	0.0165 b
3.0	14.00 a	3.57 a	0.278 a	0.0302 a
4.0	8.43 c	2.43 b	0.069 cd	0.0069 cd
5.0	5.57 d	1.50 c	0.057 cde	0.0059 cd
6.0	4.63 d	1.13 cd	0.049 cde	0.0050 cd

表 5 IBA 浓度对铁皮石斛地上部生长的影响

Table 5 Effects of IBA concentration on the growth of the overground part of *Dendrobium candidum*

IBA/ mg·L ⁻¹	株高/cm Plant height	成苗数/个 Number of seedlings	丛生芽数/个 Number of cluster buds	地上部鲜重/mg Overground fresh weight	地上部干重/mg Overground dry weight
0	2.81 e	2.33 abc	1.45 b	0.455 de	0.044 c
0.5	2.85 e	1.83 c	1.50 ab	0.447 de	0.046 c
1.0	3.10 de	1.87 bc	1.37 b	0.414 e	0.041 c
1.5	3.40 d	2.27 abc	1.51 ab	0.474 de	0.048 c
2.0	4.03 c	2.80 a	1.53 ab	0.566 cd	0.065 b
2.5	4.57 b	2.00 abc	1.59 ab	0.678 bc	0.070 ab
3.0	5.47 a	2.33 abc	1.64 ab	0.928 a	0.086 a
4.0	5.20 a	2.67 b	1.87 a	0.763 b	0.080 ab
5.0	5.27 a	2.00 abc	1.60 ab	0.752 b	0.077 ab
6.0	4.67 b	2.17 abc	1.54 ab	0.691 bc	0.070 ab

2.5 移栽基质对铁皮石斛试管苗生长的影响

试管苗因一直生活在无菌、温湿度适宜、营养物质充足的培养基中,对外界环境的适应性较差,因此,选择适宜的栽培基质对提高其移栽成活率至关重要。试验对石斛试管苗在 4 种栽培基质中的生长状况进行了比较。由图 1 可知,单独使用苔藓作为铁皮石斛试管苗移栽的基质,其成活率高达 96.3%,生长发育状况最好;其次为蛭石,移栽成活率达到 90.6%,但幼苗的颜色发黄、细弱;草炭土和园土虽富含无机和有机元素,但其透水、透气性差,移栽成活率较低。因此,铁皮石斛试管苗驯化移栽的最适基质为苔藓。

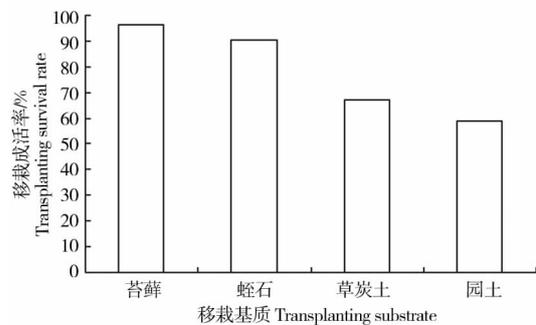


图 1 移栽基质对铁皮石斛试管苗生长的影响
Fig. 1 Effect of transplanting substrate on growth of *Dendrobium candidum* plantlets *in vitro*

3 结论与讨论

铁皮石斛常年生活在高温高湿的环境中,且与一些菌类有共生关系,所以外植体上容易滋生杂菌。用漂白粉等常规方法对外植体消毒效果不理想,因而选用杀菌效果较强的0.1%升汞进行消毒,并适当延长杀菌时间效果较好,但切忌时间过长不利于外植体的成活。

植物生长调节剂是培养基中的关键成分,虽然用量很小,但在植物组织培养中起着重要的调节作用^[9]。组培中通常使用的激素有生长素和细胞分裂素,而NAA和6-BA组合常用于诱导原球茎,该试验研究了NAA和6-BA组合对铁皮石斛增殖的影响,结果表明NAA与6-BA组合诱导丛生芽效果比单用NAA好,MS+1 mg·L⁻¹ BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA的组合对铁皮石斛增殖效果最佳。因此,生长素和细胞分裂素的浓度对铁皮石斛形态分化起着极其重要的作用。

许多研究证明^[7,9-11],生长素是诱导试管苗生根最重要的影响因子,它对不定根的分化是必需的,第一个根原细胞分裂有赖于生长调节物质的存在。较常使用的生长素主要有IBA、NAA和IAA。蒋向辉等^[7]认为IBA进入植物组织后可迅速被氨基酸结合而成为无活性的结合态生长素,或转化为IAA而起作用。该研究表明,IBA在诱导不定根的发生方面能力较强,诱导生根率均可达100%,当IBA为3.0 mg·L⁻¹时效果最佳,

平均根数达14条,根长为3.57 cm,植株叶色浓绿,茎秆粗壮。但随着浓度的升高,生根率及其它方面的指标均有不同程度的下降。该试验只研究了IBA浓度对发根的影响,有关NAA与生长素以及生长素的相互组合对生根的诱导效果有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 沈保安. 中国常用中草药石斛[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1992:310-311.
- [2] 赵冬青. 铁皮石斛[J]. 农业知识,2008(7):17-18.
- [3] 江苏新医学院《中药大辞典》编写组. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.
- [4] 陈云龙,何国庆,华允芬,等. 细茎石斛多糖的提取分离纯化和性能分析[J]. 中国药学杂志,2003,38(7):494-497.
- [5] 郁美娟,孟庆华,黄德音,等. 石斛属植物有效成分及药理作用研究[J]. 中药学,2003,25(11):918-921.
- [6] 张禧庆,康冀川,何劲,等. 两株石斛内生炭角菌的鉴定及活性成分初步研究[J]. 西南农业学报,2008,21(2):317-322.
- [7] 蒋向辉,余朝文,王善粉,等. 不同激素浓度对铁皮石斛高效快繁体系的影响[J]. 江苏农业科学,2009,36(6):76-78.
- [8] 郑宽瑜,邓君浪,赵辉. 铁皮石斛试管苗栽培技术研究[J]. 云南农业科技,2010(3):21-22.
- [9] 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]. 仲恺农业技术学院学报,2005,18(1):23-26.
- [10] 魏凤娟. 铁皮石斛组织培养与栽培技术研究进展[J]. 广东农业科学,2010(4):81-85.
- [11] 杨立昌,乙引,张宇斌,等. 铁皮石斛快速繁殖体系研究[J]. 北方园艺,2010(22):136-138.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Dendrobium candidum*

CAO Tian-xu¹, SU Zhao-hui², HAN Chao-hui¹

(1. Heilongjiang Agricultural Economy Vocational College, Mudanjiang, Heilongjiang 157041; 2. Mudanjiang Second People's Hospital, Mudanjiang, Heilongjiang 157000)

Abstract: In order to establish the rapid propagation system of *Dendrobium candidum*, taking its stem as materials, the effects of medium types, hormone concentration on proliferation and rooting of *Dendrobium candidum* were studied. The results showed that the best sterilization method for explants was to treat by 75% ethyl alcohol for 30 s and then 0.1% HgCl₂ for 6 min. The optimum basic medium was MS. The greatest number of propagation and shoot forming were found in the MS medium supplemented with 1 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.5 mg·L⁻¹ NAA. Roots were easily formed by the addition of IBA, and the treatment of 3.0 mg·L⁻¹ IBA in MS medium was more effective for growth of roots *in vitro*. The planting survival rate achieved 90.6% in simplex growing medium with moss, it was higher than the other growing media.

Key words: *Dendrobium candidum*; cluster-buds; tissue culture