

铁皮石斛组织培养研究*

罗绍强

(肇庆市国有葵洞林场, 广东 广宁 526332)

摘要 以铁皮石斛 (*Dendrobium catenatum*) 嫩茎为试验材料, 建立组织培养体系。结果表明, 铁皮石斛嫩茎用 HgCl_2 试剂消毒 5~7 min 效果最好, 污染率和死亡率极低。最佳诱导培养基为 MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+KT0.2 mg/L+3% 蔗糖, 诱导率达到 96%。最佳继代培养基是 MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+KT0.2 mg/L+5% 香蕉提取液+5% 水解酪蛋白+3% 蔗糖, 增值系数达到 8.0。最适宜铁皮石斛组培苗生根的培养基为 1/2MS+6-BA0.1 mg/L+IBA1.0 mg/L+5% 香蕉提取液+2% 蔗糖, 生根率为 97%。移栽 30 d 后, 成活率达到 90% 以上。

关键词 铁皮石斛; 外植体; 组织培养

中图分类号: S723.1+3 文献标识码: A 文章编号: 2096-2053 (2017) 06-0080-04

Study on Tissue Culture of *Dendrobium catenatum*

LUO Shaoqiang

(Kui Dong State-owned Forest Farm of Zhaoqing, Guangdong 526332, China)

Abstract The tissue culture system was established by using the tender stems of *Dendrobium catenatum* as experimental materials. The results showed that the HgCl_2 reagent for the tender stems of *D. catenatum* had the best disinfection 5-7 min, and the pollution rate and death rate were very low. The best medium for proliferation was MS + 6-BA1.5 mg/L + NAA0.5 mg/L + KT0.2 mg/L + 3% S, the induction rate was 96%. The optimum medium for subculture was MS + 6-BA1.5 mg/L + NAA0.5 mg/L + KT0.2 mg/L+5% banana extract +5% casein hydrolysate + 3% S, the proliferation coefficient was 8.0. The rooting rate of 97% could be achieved in 1/2 MS + 6-BA0.1 mg/L + IBA1.0 mg/L + 5% banana extract + 2% S. After 30 days, the survival rate was more than 90%.

Key words *Dendrobium catenatum*; explants; tissue culture

铁皮石斛 (*Dendrobium catenatum*), 又名黑节草、云南铁皮, 为兰科石斛属多年生附生草本药用植物^[1]。其主要分布在亚热带地区, 而在我国主要分布于广西壮族自治区西北部、云南省东南部、安徽省西南部、浙江省东部、福建省西部等地^[2]。在道家医学典籍《道藏》中, 铁皮石斛被列为“中华九大仙草”之首, 并且在李时珍的《本草纲目》中也有记载^[3]。铁皮石斛内含有多种石斛碱、石斛多糖等^[4]。现代医学研究发现, 铁皮石斛的药用有效成分具有降低血糖、增强机体免疫力的作用^[5], 并

且具有良好的抗肿瘤、抗衰老作用^[6]。但是铁皮石斛对自然生长条件要求非常苛刻, 需要与某些真菌共生, 繁殖率极低, 为此何春梅等^[7]还针对菌根真菌对铁皮石斛的共生专一性与促进作用进行研究。所以对铁皮石斛进行组培快繁研究进而大量繁殖, 是推动其产业发展、发挥其药用价值的重要途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为广东省林业科学研究院培育的铁

* 作者简介: 罗绍强 (1962—), 男, 工程师, 主要从事森林培育及林业管理工作, E-mail: k-lc@163.com。

皮石斛 3 a 生健壮实生苗。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 从植株上剪取长度 4~10 cm 的中间茎段, 用肥皂水轻轻擦洗, 在流水下冲洗 1 h。然后在超净工作台上用 75% 的酒精消毒 1 min 后进行外植体消毒试验, 不同消毒处理分别为: 0.1% 的 HgCl_2 溶液消毒 3、5、7、9 min 和 NaClO_3 溶液消毒 5、10、15、20 min。再用无菌水冲洗 4~5 次, 置于灭菌后的滤纸上吸干水分, 将带芽茎段剪成 1.5 cm 左右接种于基础 MS 培养基上。每个处理 30 瓶, 每瓶 1 茎段。

1.2.2 诱导培养基的筛选 试验设置 6 种诱导培养基, 分别为:

(1) MS+6-BA0.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+KT0.2 mg/L+3% 蔗糖

(2) MS+6-BA0.5 mg/L+NAA1.0 mg/L+KT0.2 mg/L+3% 蔗糖

(3) MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L+KT0.2 mg/L+3% 蔗糖

(4) MS+6-BA1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L+KT0.2 mg/L+3% 蔗糖

(5) MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+KT0.2 mg/L+3% 蔗糖

(6) MS+6-BA2.0 mg/L+NAA0.5 mg/L+KT0.2 mg/L+3% 蔗糖

每个处理 30 瓶, 每瓶接种 3 茎段。观察记录, 30 d 后统计外植体的生长状况。

1.2.3 继代培养基的筛选 待新芽长成后, 将其剪成 1.5 cm 左右带芽茎段, 转接到继代培养基中。试验设置 4 种继代培养基, 分别为:

(1) MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+5% 香蕉提取液+KT0.2 mg/L+3% 蔗糖

(2) MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+5% 香蕉提取液+KT0.2 mg/L+5% 水解酪蛋白 500 mg/L+3% 蔗糖

(3) MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+5% 马铃薯提取液+KT0.2 mg/L+3% 蔗糖

(4) MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+5% 马铃薯提取液+KT0.2 mg/L+5% 水解酪蛋白 500 mg/L+3% 蔗糖

其中香蕉提取液是取成熟香蕉去皮, 加适量蒸馏水煮熟后, 用 4 层纱布过滤后的汁液。马铃薯提取液是将马铃薯洗净切片, 加适量蒸馏水煮

熟后, 用 4 层纱布过滤后所形成的汁液。

每个处理 30 瓶, 每瓶接种 3 茎段。观察记录, 30 d 后统计生长状况。

1.2.4 生根培养基的筛选 选取高 1.5 cm 以上生长健壮的幼苗, 接种于生根培养基上。生根培养基设 5 种激素组合, 分别为:

(1) 1/2MS+6-BA0.1 mg/L+IBA0.3 mg/L+5% 香蕉提取液+2% 蔗糖

(2) 1/2MS+6-BA0.1 mg/L+IBA0.5 mg/L+5% 香蕉提取液+2% 蔗糖

(3) 1/2MS+6-BA0.1 mg/L+IBA0.7 mg/L+5% 香蕉提取液+2% 蔗糖

(4) 1/2MS+6-BA0.1 mg/L+IBA1.0 mg/L+5% 香蕉提取液+2% 蔗糖

(5) 1/2MS+6-BA0.1 mg/L+IBA1.5 mg/L+5% 香蕉提取液+2% 蔗糖

每个处理 20 瓶, 每瓶接种 3 茎段, 观察记录生根情况, 50 d 后统计生根率。

1.2.5 炼苗移栽 生根培养 60 d 后, 将培养瓶移至温室中炼苗 1~3 d, 挑取生根健壮的组培苗, 用清水洗去根部附着的培养基, 移栽入配比好的基质中, 浇透水后用塑料覆盖以保湿保温, 每日进行透气, 保持湿度。7 d 后撤走覆盖物, 30 d 后统计移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂 and 消毒时间对铁皮石斛嫩茎诱导影响

如表 1 所示, 不同的消毒试剂以及消毒时间对外植体的诱导有着明显的影响。用 HgCl_2 处理的嫩茎随着消毒时间的增加, 污染数不断减少, 消毒 9 min 的嫩茎仅有 2 个污染, 但是随着消毒时间的增加, 外植体的死亡数也不断增加。结合污染率与死亡率可知, 在用 HgCl_2 消毒时, 消毒 5~7 min 最适宜。用 NaClO_3 处理的嫩茎污染数也随着消毒时间的增加而减少, 嫩茎死亡数增加, 处理约 15 min 的污染率与死亡率最小。但是与 HgCl_2 处理相比, 用 NaClO_3 处理的嫩茎污染率较高, 死亡率较小。综合考虑, 用 HgCl_2 试剂消毒 5~7 min 效果最好。

2.2 不同激素水平对铁皮石斛嫩茎诱导的影响

从表 2 可以看出不同生长激素的配比对铁皮石斛嫩茎的诱导有着明显影响。在 6-BA 质量体

积浓度为 0.5 mg/L 时, 铁皮石斛苗生长缓慢, 并且芽较少, 有的苗还产生了愈伤组织。随着 6-BA 质量体积浓度的提高, 芽多且小苗萌动加快, 在所有的诱导培养基中, 当 6-BA 质量体积浓度为 1.5、NAA 为 0.5 mg/L 时, 芽最多并且小苗生长茁壮, 诱导率达到了 96%, 再加上 0.2 mg/L 的 KT, 这个生长激素的配比最有利于芽的萌动和伸长。综上所述, 最适宜铁皮石斛嫩茎诱导的培养基为 MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+KT0.2 mg/L+3% 蔗糖。

2.3 不同培养基对铁皮石斛继代增殖的影响

从表 3 可以看到, 铁皮石斛组培苗在添加 5%

香蕉提取液的培养基中长势要好于添加 5% 马铃薯提取液的培养基。在添加 5% 马铃薯提取液的培养基中, 小苗芽较少, 长势较弱, 增值系数较低, 并且伴随有玻璃化的现象。而在添加 5% 香蕉提取液的培养基中加入 5% 的水解酪蛋白更有助于组培苗的增殖, 增值系数达到 8.0, 并且小苗叶片舒展, 生长健壮。所以, 最适宜铁皮石斛组培苗继代的培养基是 MS+6-BA1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+KT0.2 mg/L+5% 香蕉提取液 +5% 水解酪蛋白 + 3% 蔗糖。

2.4 不同培养基对铁皮石斛的生根影响

在生根培养中, 5 种处理对铁皮石斛的根诱

表 1 不同消毒试剂及消毒时间对铁皮石斛嫩茎诱导的影响

Tab.1 Effect of different disinfectant and disinfection time on the tender stems of *Dendrobium catenatum*

消毒试剂 Disinfection reagents	消毒时间 Disinfection time/min	接种茎段数 / 个 Number of inoculated stem segments	污染数 / 个 Number of pollution	污染率 Contamination rate/%	死亡数 / 个 Death count	死亡率 Death rate/%
HgCl ₂	3	30	6	0.20	0	0.00
	5	30	3	0.10	2	0.07
	7	30	3	0.10	2	0.07
	9	30	2	0.07	4	0.13
NaClO ₃	5	30	7	0.23	1	0.03
	10	30	7	0.23	2	0.07
	15	30	5	0.17	0	0.00
	20	30	4	0.13	2	0.07

表 2 不同激素水平对铁皮石斛嫩茎诱导的影响

Tab.2 Effect of different hormone levels on the induction of the tender stems of *D. catenatum*

编号 NO.	6-BA/(mg · L ⁻¹)	NAA/(mg · L ⁻¹)	KT/(mg · L ⁻¹)	诱导率 Inductivity/%	生长状态 Growth state
1	0.5	0.5	0.2	60	芽少, 生长缓慢, 部分出现死亡
2	0.5	1.0	0.2	72	芽少, 生长缓慢, 基部有愈伤产生
3	1.0	0.5	0.2	78	芽少, 生长较缓慢, 小芽发黄
4	1.0	1.0	0.2	80	芽多, 生长较快, 小芽不茁壮,
5	1.5	0.5	0.2	96	芽多, 生长迅速, 小苗嫩绿较茁壮
6	2.0	0.5	0.2	90	芽多, 生长较快, 小苗发黄不茁壮

表 3 不同培养基对铁皮石斛继代增殖的影响

Tab.3 Effects of different media on subculture proliferation of *D. catenatum*

编号 NO.	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	KT/ (mg · L ⁻¹)	香蕉提取液 / % Banana extract	马铃薯提取液 / % Potato extract	水解酪蛋白 / % Casein hydrolysate	增值系数 Enhancement factor	生长状态 Growth state
1	1.5	0.5	0.2	5	0	0	6.0	芽多, 生长较好
2	1.5	0.5	0.2	5	0	5	8.0	芽多, 长势好
3	1.5	0.5	0.2	0	5	0	3.0	芽少, 长势弱
4	1.5	0.5	0.2	0	5	5	4.0	芽少, 长势较弱, 部分玻璃化

表 4 不同培养基对铁皮石斛的生根影响
Tab.4 Effect of different culture medium on rooting of *D. catenatum*

编号 NO.	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	IBA/ (mg · L ⁻¹)	香蕉提取液 Banana extract/%	生根率 Rooting rate/%	生长情况 Growth state
1	0.1	0.3	5	80	主根较细, 侧根较少, 较细
2	0.1	0.5	5	87	主根较长, 侧根多, 较细
3	0.1	0.7	5	83	主根较长, 侧根较少且细
4	0.1	1.0	5	97	主根长, 粗壮, 侧根多而壮
5	0.1	1.5	5	92	主根长, 粗壮, 侧根多而细

导效果差异明显。从表 4 中可以看出, 随着培养基中 IBA 质量体积浓度的提高, 铁皮石斛的生根率也提高, 但是过高的 IBA 质量体积浓度又抑制了铁皮石斛的生根。其中, 在 IBA 质量体积浓度为 1.0 mg/L 时, 铁皮石斛的生根率最高, 达到了 97%, 并且试管苗长势良好, 茎粗壮, 主根又长又粗, 最粗可达 0.2 cm, 侧根多而壮。综上所述, 最适宜铁皮石斛组培苗生根的培养基为 1/2 MS+6-BA 0.1 mg/L+IBA 1.0 mg/L+5% 香蕉提取液 +2% 蔗糖。

2.5 炼苗移栽

将炼好的苗移栽到温室中, 30 d 之后统计的成活率高达 90% 以上, 植株生长迅速, 叶片舒展, 生根速度快, 茎段明显健壮, 为室外移栽的成活打下了良好的基础。

3 结论与讨论

3.1 试验表明, 铁皮石斛外植体嫩茎用 HgCl₂ 试剂消毒 5~7 min 效果最好, 最佳诱导培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L+3% 蔗糖, 最佳继代培养基是 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L+5% 香蕉提取液 +5% 水解酪蛋白 +3% 蔗糖 (增殖系数达 8.0), 最佳生根培养基为 1/2MS+6-BA 0.1 mg/L+IBA 1.0 mg/L+5% 香蕉提取液 +2% 蔗糖 (生根率达 97%), 炼苗后移栽成活率高达 90% 以上。

3.2 本实验在培养基中加入了香蕉提取液、马铃薯提取液以及水解酪蛋白等, 前人在研究中也曾尝试加入不同的天然提取液, 得到的结果也大不相同。张明等^[8]和罗万业等^[9]认为椰子汁对铁皮石斛的增殖效果最好, 而蒋林等^[10]和张华通等^[11]

认为苹果汁和香蕉汁更能促进试管苗根的生长。本实验研究发现, 5% 香蕉提取液加上 5% 的水解酪蛋白更有助于铁皮石斛苗的增殖。

参考文献

- [1] 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.
- [2] ZHAN G M, ZHONG G Y, DING J C. Investigation on Endangered Medicinal Material Natural Resources[J]. Endangered Mater Sci Lett (濒危物种科学通), 2004 (4): 126-128.
- [3] 陈存仁. 中国药学大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956.
- [4] 郭孟璧, 封良燕, 田茂军, 等. 人工培养铁皮石斛营养成分分析研究[J]. 云南化工, 2006, 33(2): 15-16.
- [5] 吴昊妹, 徐健华, 陈立钻, 等. 铁皮石斛降血糖作用及其机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29 (2): 160-163.
- [6] 王天山, 陆跃鸣, 马国祥, 等. 鼓槌石斛中化学成分对 K₅₆₂ 肿瘤细胞株生长抑制作用体外试验[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(2): 1-3.
- [7] 何春梅, 徐巧林, 王洪峰. 铁皮石斛菌根真菌研究进展[J]. 广东林业科技, 2015, 31(3): 106-112; 135.
- [8] 张明, 夏鸿西, 朱利泉, 等. 石斛组织培养研究进[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(6): 323-326.
- [9] 罗万业, 罗万周, 魏锦秋, 等. 铁皮石斛组培育苗与组培苗培植技术研究[J]. 广东林业科技, 2014, 30(2): 78-81.
- [10] 蒋林, 丁平, 郑迎冬, 等. 添加剂对铁皮石斛组织培养和快速繁殖的影响[J]. 中药材, 2003, 26(8): 539.
- [11] 张华通, 林晓萍, 张莹, 等. 铁皮石斛种子组织培养研究[J]. 林业与环境科学, 2016, 32(6): 40-43.