

· 药材与资源 ·

铁皮石斛培养的产业化研究

张泉锋¹, 毛碧增²

(1. 浙江省慈溪市棉花科学研究所, 浙江 慈溪 315300; 2. 浙江大学生物技术研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: 目的 筛选适宜的铁皮石斛不定芽增殖与生根培养基, 选择适合继代扩繁的不定芽高度。方法 在相同培养条件下, 不同高度的不定芽在不同的增殖与生根培养基中生长, 对结果所产生的不同生长状况, 进行显著性差异检验及综合分析。结果 不同高度的不定芽之间有显著差异, 不同的增殖与生根培养基之间有显著差异。结论 铁皮石斛继代以 (1.2 ± 0.1) cm 高的不定芽为宜, 增殖培养基以 MS 添加 BA 1.0 mg/L 、NAA 0.2 mg/L 为佳, 生根培养基以 $1/2 \text{ MS}$ 添加 NAA 0.2 mg/L 为佳。

关键词: 铁皮石斛; 不定芽; 培养基

中图分类号: R 282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)04-0438-03

Studies on industrialization cultivation of *Dendrobium candidum*

ZHANG Quan-feng, MAO Bi-zeng

(1. Cixi Institute of Cotton Science, Cixi 315300, China; 2. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: **Object** To optimize the fitting culture media for multiplication of adventitious bud and radication of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. and the length of adventitious bud for successive transfer multiplication. **Methods** In the same culture condition, the adventitious bud with different length developed in the various culture media for multiplication and radication. Facing the different growth status, the diversity test and general analysis were carried on for them. **Results** There were significant difference in different length of adventitious bud, difference between the multiplication and radication of culture media. **Conclusion** The adventitious buds in (1.2 ± 0.1) cm length are superior for successive transfer multiplication, MS adding BA 1.0 mg/L , NAA 0.2 mg/L is the best media for the adventitious buds multiplication, $1/2 \text{ MS}$ adding NAA 0.2 mg/L is the test media for radication.

Key words: *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.; adventitious bud; culture medium

铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. 为多年生草本, 俗称铁皮枫斗^[1], 因其老茎节外呈黑褐色, 又名黑节草^[2]。石斛是常用名贵中药, 应用历史悠久, 在《神农本草经》中被称为上品。据报道, 石斛含石斛碱、石斛次碱、石斛宁等多种生物碱, 并证实它具有抗菌消炎、滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、润喉明目、延年益寿之功效^[3]。它所含的多糖具抗癌、增强免疫功能的作用。铁皮石斛多生悬崖峭壁上, 自然繁殖率低, 且我国多年来对铁皮石斛的采集量远大于其生长量, 由于长期采挖, 自然资源枯竭, 已濒临绝迹^[5], 被国家列为重点保护的野生药材品种。为保护这一珍稀中药品种, 国内许多科研人员对铁皮石斛进行了无性快速繁殖技术的研究, 对影

响其种子萌发、原球茎生长及壮苗因素方面取得了一定的进展, 特别是对影响原球茎生长因素方面有了较为系统的研究, 并在适应工业化生产, 简化培养基, 降低试管苗成本进行了探索, 但对铁皮石斛不定芽生长方面的研究还未见报道。铁皮石斛不定芽的增殖率的高低、品质优劣、根系生长好坏直接影响试管苗生产的周期、质量及成本。因此, 本实验对不定芽适时继代及选择生长适宜的不定芽增殖和生根培养基进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料: 铁皮石斛原球茎分化生长得到的不定芽, 高为 (1.2 ± 0.1) , (0.8 ± 0.1) cm 两种, 1~2 片真叶, 无根, 由浙江大学生物技术研究所提供。

1.2 培养条件: 培养基均加入食糖 3%, 琼脂 0.9%, 用自来水定容, pH 5.6。灭菌条件: 121 , 0.105 MPa, 培养温度(24~ 25) , 日照 16 h, 1 200 lx。

1.3 方法

1.3.1 不同培养基对不同高度的不定芽增殖量的影响: 选取两种高分别为 (1.2 ± 0.1) , (0.8 ± 0.1) cm, 含 1~ 2 片真叶, 无根的铁皮石斛不定芽, 分别接种于 MS、B₅ 等 14 种培养基, 每个瓶子接种 8 个, 5 次重复, 对 14 种培养基进行编号(表 1)。60 d 后分别取出全部植株小苗及不定芽, 计数, 记录。对所得数据进行统计分析。

表 1 14 种不定芽增殖培养基

Table 1 Fourteen kinds of culture media on adventitious bud multiplication

编号	基本培养基	培养基					
		BA/ (mg · L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ / (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	食糖/ %	琼脂/ %	pH
1	MS	2.0	0	0.2	3	0.9	5.6
2	MS	1.5	0	0.2	3	0.9	5.6
3	MS	1.0	0	0.2	3	0.9	5.6
4	MS	0.5	0	0.2	3	0.9	5.6
5	MS	0	0	0	3	0.9	5.6
6	1/2MS	0	0	0	3	0.9	5.6
7	MS	0	100	0	3	0.9	5.6
8	B ₅	2.0	0	0.2	3	0.9	5.6
9	B ₅	1.5	0	0.2	3	0.9	5.6
10	B ₅	1.0	0	0.2	3	0.9	5.6
11	B ₅	0.5	0	0.2	3	0.9	5.6
12	B ₅	0	0	0	3	0.9	5.6
13	B ₅	0	0	0	3	0.9	5.6
14	B ₅	0	100	0	3	0.9	5.6

1.3.2 不同培养基对铁皮石斛不定芽生根的影响: 选取高为 (1.2 ± 0.1) cm, 含 1~ 2 片真叶的无根不定芽, 分别接种于 1/2MS 等 8 种培养基, 每个瓶子接种 8 个, 5 次重复, 对 8 种培养基进行编号(表 2)。60 d 后, 全部取出数根数, 测根长, 记录。对所得数据进行统计分析。

表 2 8 种生根培养基

Table 2 Eight kinds of culture media on radication

编号	基本培养基	培养基					
		AgNO ₃ / (mg · L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ / (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	食糖/ %	琼脂/ %	pH
1	1/2MS	0	0	0	3	0.9	5.6
2	1/2MS	0	1.0	0	3	0.9	5.6
3	1/2MS	4.0	0	0	3	0.9	5.6
4	1/2MS	4.0	0	0.2	3	0.9	5.6
5	1/2MS	0	0	0.2	3	0.9	5.6
6	1/2MS	0	0	0.5	3	0.9	5.6
7	MS	0	1.0	0	3	0.9	5.6
8	MS	4.0	0	0.2	3	0.9	5.6

1.3.3 驯化和移栽的观察: 观察铁皮石斛植株的生长状况, 统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对不同高度的铁皮石斛不定芽增殖量的影响: 不同高度的不定芽在 14 种培养基中生长, 经过 60 d 后, 统计增殖量见表 3、4(其中缺省数据由于环境污染导致)。

表 3 不同培养基对 (1.2 ± 0.1) cm 高不定芽增殖量的影响

Table 3 Influence of different culture media on multiplication of adventitious bud in (1.2 ± 0.1) cm height

培养基	每个瓶子中小苗与不定芽总数/个					平均值
1	40	37	-	-	-	38.5
2	31	24	24	23	-	25.5
3	51	39	45	40	-	43.8
4	29	42	32	26	30	31.8
5	36	28	22	19	22	25.4
6	27	21	18	16	23	21.0
7	26	19	32	23	30	26.0
8	28	34	33	23	33	30.2
9	34	32	33	29	30	31.6
10	26	34	21	22	30	26.6
11	33	23	17	-	-	24.3
12	25	27	20	25	31	25.6
13	18	24	22	30	22	23.2
14	27	25	25	17	-	23.5

表 4 不同培养基对 (0.8 ± 0.1) cm 高不定芽增殖量的影响

Table 4 Influence of different culture media on multiplication of adventitious bud in (0.8 ± 0.1) cm height

培养基	每个瓶子中小苗与不定芽总数/个					平均值
1	29	24	28	30	25	27.2
2	26	18	24	26	26	24.0
3	27	19	17	16	19	19.6
4	27	26	23	17	-	23.3
5	21	15	15	18	-	17.3
6	17	18	22	24	16	19.4
7	23	18	20	23	-	21.0
8	20	22	27	25	25	23.8
9	25	21	23	23	28	24.0
10	25	22	25	22	20	22.8
11	26	28	21	25	-	25.0
12	22	20	24	23	20	21.8
13	24	21	23	23	28	23.8
14	16	18	14	16	-	16.0

对高为 (1.2 ± 0.1) , (0.8 ± 0.1) cm 的不定芽两次接种后, 对其增殖量进行显著性差异分析, 不同高度的不定芽接种增殖量差异显著($P < 0.05$)。应选择高为 (1.2 ± 0.1) cm 的不定芽进行继代扩繁。对表 3 进行方差分析, 结果显示: 不同增殖培养基之间具极显著差异($P < 0.01$), 所以进行 q 测验。第 1 种与第 3 种间无差异, 第 1 种、第 3 种与其他 12 种

间有显著差异,其中第3种与其他12种差异已达到极显著,试验表明:不定芽继代培养以第3种(MS添加BA 1.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L)为佳。

2.2 不同培养基对铁皮石斛不定芽生根的影响: 60 d后对在8种培养基中生长所得植株根系进行平均生根数和根长的统计,见表5、6。

表5 不同培养基对不定芽生根(平均生根数)的影响

Table 5 Influence of different culture media on radication (average root number) of adventitious bud

培养基	每个瓶子中每株苗的平均根数/条					平均值
1	3.75	4.50	2.50	6.25	5.00	5.50
2	3.75	4.50	4.50	-	-	4.25
3	3.75	3.75	2.00	1.00	0.75	2.25
4	5.75	2.50	4.75	2.50	2.75	3.45
5	7.50	3.50	4.75	7.75	5.75	5.85
6	5.00	7.00	12.50	6.00	-	7.63
7	6.00	2.75	3.50	5.25	-	4.38
8	1.75	1.00	1.00	6.25	2.00	2.40

表6 不同培养基对不定芽生根(平均根长)的影响

Table 6 Influence of different culture media on radication (average root length) of adventitious bud

培养基	平均根长/cm					平均值
1	0.5	1.0	0.5	0.9	0.7	0.72
2	1.3	1.2	1.5	-	-	1.33
3	0.9	0.4	0.4	0.3	0.5	0.50
4	0.6	0.6	0.4	0.5	0.5	0.52
5	1.3	1.4	1.4	2.0	1.4	1.50
6	1.3	1.2	1.2	1.5	-	1.30
7	1.0	1.2	1.2	1.0	-	1.10
8	0.5	0.8	0.6	0.4	0.3	0.52

对表5进行方差分析,培养基间无显著性差异($F < 1$)。对表6进行方差分析,不同生根培养基间差异显著,第5种培养基与第2种,第6种无显著差异外,与其他的均有显著差异。经过对根数与根长数据进行统计综合分析,不定芽生根培养基以第5种(1/2MS添加0.2 mg/L NAA)为宜。

2.3 驯化与移栽:移栽时以苗高4~5 cm,根5~6条,根茎较粗壮为宜。直接打开瓶盖,轻轻洗净根部的培养基,移栽至基质,成活率90%以上,植株生长良好。

3 讨论

3.1 铁皮石斛不定芽继代扩繁时应选择高为(1.2±0.1) cm或者稍高一些的不定芽进行继代,增殖率效高。这是由于继代的不定芽过短,分化能力受抑制,整体生长能力较弱所致,主要表现在增殖数量少,苗细弱,黄叶较多。不定芽继代培养以第3种(MS添加BA 1.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L)为佳,增殖率高,所得植株健壮,叶片大而厚,深绿色,茎较粗,根量多,根系粗长。表明:外源激素用量的合理控制,对铁皮石斛不定芽生长发育有积极作用。不定芽生根培养基以第5种(1/2MS添加0.2 mg/L NAA)为佳,平均根数5.85,平均根长为1.50 cm,根系生长的优劣与移栽后的成活率有关。由不定芽生长得到的植株比原球茎生长得到的植株健壮,移栽时成活率高,并且移栽时以3~4群植为宜。

3.2 经过对铁皮石斛繁殖与栽培的研究及对前人所作研究的综合,已在生产繁殖组培苗的系数和质量上有所突破,为高效率高质量生产铁皮石斛组培苗提供依据,具有较高的经济价值与商业价值。铁皮石斛的繁殖与栽培是一项高新技术,对于保护资源,满足药用需要具有重要意义,对不定芽生长因素及其组培苗的营养成分方面研究有待进一步深入。

References

- [1] Xu J H, Li L, Zheng L Z, et al. Study on function of *Dendrobium candidum* and *Panax quinquefolium* L. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(2): 79-80.
- [2] Zhang Z G, Wang L, Liu L, et al. Study on the suitable media on protocorm differentiation of *Dendrobium candidum* [J]. *Acta Acad Med Zhejiang* (浙江省医学科学院学报), 1992, 6(10): 11-14.
- [3] Zeng C J, Cheng W J, Zhang J L, et al. Embryo culture and propagation of *Dendrobium in vitro* [J]. *Acta Horticulturae Sin* (园艺学报), 1998, 25(1): 75-80.
- [4] Liu R J. Study on the propagation of tissue seedling of *Dendrobium candidum* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1988, 23(8): 636.
- [5] Wang L A. Tissue culture of *Dendrobium huoshanense* [J]. *J Anhui Univ Nat Sci* (安徽大学学报·自然科学版), 1989 (1): 83.
- [6] Liu L, Zhang Z G. Study on the reducing cost of *Dendrobium candidum* tissue culture [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 1998, 15(3): 15-16.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和新闻出版署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确,必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”的广告。

电话: (022) 27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青