

铁皮石斛原球茎高效再生体系的研究

任海虹, 王景雪*, 聂 菁

山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006

摘要: 目的 以铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 实生种子为外植体, 研究铁皮石斛原球茎的增殖、分化、诱导生根等条件, 筛选出适宜铁皮石斛原球茎高效再生的诱导条件, 建立高效的再生体系。方法 以铁皮石斛种子为外植体, 在培养基上诱导产生原球茎, 经过增殖培养后, 转移到分化培养基中诱导芽苗分化, 待分化的芽苗长到 1~2 cm 时, 转移到生根培养基诱导生根, 最终长成完整的再生植株。结果 适宜铁皮石斛生长的基本培养基为 1/2 MS; 原球茎诱导的培养基为 1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+50 g/L 土豆泥; 原球茎增殖的最适培养基为 1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, 最高增殖系数达 23; 最佳分化培养基为 1/2 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, 平均分化率最高达 95%; 最佳生根培养基为 1/2 MS+0.3 mg/L NAA+50 g/L 土豆泥, 生根率达 100%。结论 铁皮石斛实生种子是铁皮石斛离体繁殖的优良外植体来源。以铁皮石斛种子诱导获得的高效再生技术体系可以为铁皮石斛快速繁殖和工厂化生产提供理论基础。

关键词: 铁皮石斛; 快速繁殖; 原球茎; 生根; 再生植株; 再生体系

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)19-4057-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.024

Protocorm proliferation and regeneration of *Dendrobium officinale*

REN Hai-hong, WANG Jing-xue, NIE Jing

School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To establish an efficient tissue culture and rapid propagation system, and study the protocorm proliferation and regeneration conditions using seeds as explants in *Dendrobium officinale*. **Methods** Seeds of *D. officinale* were used as explants, protocorm was induced on inducement medium. After proliferation, the protocorm were transferred to the regeneration medium. Then the regenerated shoots were transferred into rooting medium to induce rooting of plantlets, and developing complete plant. **Results** The basic culture medium for *D. officinale* growth was 1/2 MS; The best culture medium formula for inducing protocorms was 1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+50 g/L mashed potato; The optimal proliferation medium for protocorm was 1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, and the maximum multiplication factor could reach 23. The optimal regeneration medium was 1/2 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, regeneration rate can reach 95%; The best culture medium for seedling rooting was 1/2 MS+0.3 mg/L NAA+50 g/L potato juice, and rooting rate reached 100%. **Conclusion** This research provides an effective way for keeping good varieties of features and rapid propagation of *D. officinale*, at the same time helps to solve some theoretical problems in factory production of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; rapid propagation; protocorm; rooting; regeneration plant; proliferation system

石斛是兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年生草本植物, 又名黄草, 也称吊兰和金钗, 是一种名贵稀有的中药材, 素有“千金草”“人间仙草”之称。医学经典《道藏》中称铁皮石斛为中华九大仙草之首, 民间将其称为救命仙草^[1]。铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 又名黑节

草, 俗称铁皮枫斗, 为我国特有的名贵药材。东汉末年的《神农本草经》中就有应用铁皮石斛的记载, 《本草纲目》《中药大词典》等我国古代多部医学著作中都有铁皮石斛入药的记载。现代生物技术分析表明, 石斛含有多糖类、生物碱类、菲类和联苄类、氨基酸类、蒽酮类、倍半萜类、香豆素类及挥发油

收稿日期: 2017-04-26

基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目 (2013-023)

作者简介: 任海虹 (1991—), 男, 硕士在读, 主要研究方向为生物工程。E-mail: haihong1258@163.com

*通信作者 王景雪 E-mail: jingxuew@sxu.edu.cn

类等多种药用成分^[2], 多糖和生物碱是铁皮石斛兰中最重要的生物活性成分^[3], 具有滋阴清热、清音明目、益胃生津、止痛、提高免疫力等功效。野生铁皮石斛对生长条件要求苛刻, 多分布于海拔几百到一千多米的山地森林中, 是一种典型的附生植物, 常附生悬崖石壁或大树上, 自然繁殖力极低, 生长缓慢。因其种子极小、无胚乳, 需结合共生菌才能正常萌发, 因此很难用实生苗栽培。传统的无性繁殖方式所需时间长、繁殖率极低, 难以满足大面积栽培需求。铁皮石斛是我国医学宝库的珍贵资源, 属国家一级保护植物, 具有极高的药用与经济价值, 人们长期掠夺性的采挖, 致使野生铁皮石斛资源日渐枯竭, 资源极其匮乏。为了解决这一日益突出的供需紧张尖锐矛盾, 石斛属植物的组培和快繁方法的研究一直受到人们的关注。利用组织培养技术对铁皮石斛进行快速繁殖, 是目前解决生产种苗短缺的有效方法。目前铁皮石斛组培快繁的外植体主要有根尖^[4]、种子^[5-7]、茎段^[8-9]等, 虽然国内外学者已在铁皮石斛快繁等方面做了大量的研究, 但仍然存在栽培成本高、幼苗弱、增殖率低等现象。为此, 本研究利用实生种子诱导产生原球茎, 通过对原球茎增殖以及再生条件的研究, 旨在建立铁皮石斛高效快速繁殖体系。

1 材料

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 种苗购于江苏丰收大地种业发展有限公司, 由山西大学王景雪教授鉴定, 种子来源于铁皮石斛种苗人工授粉。

2 方法

2.1 无菌系建立

取人工授粉后, 成熟保持新鲜且尚未开裂的蒴果, 用洗洁精溶液清洗蒴果表面, 并用自来水冲洗 30 min, 用解剖刀轻轻削去表面脏物。冲洗干净后, 在超净工作台上用 75%乙醇消毒 1 min, 再将蒴果放入 0.1%的 HgCl_2 溶液中消毒 10 min, 消毒过程中不断轻轻摇动烧杯以便消毒剂和蒴果充分接触, 然后用无菌水冲洗 5~6 次, 置于无菌滤纸上吸干表面水, 用解剖刀将蒴果纵向劈开, 使种子可以倒出, 用镊子夹住蒴果, 将种子轻轻抖动在少量无菌水中, 用无菌针管将种子接种于诱导培养基上。接种好的种子置于植物组培室中进行无菌培养。

2.2 铁皮石斛种子诱导产生原球茎

根据本课题组前期研究, 在无菌条件下, 将铁皮石斛种子播种在 1/2 MS+30 g/L 蔗糖+1.0 mg/L 6-BA+

0.2 mg/L NAA+50 g/L 土豆泥的培养基上, 诱导铁皮石斛种子产生原球茎。45 d 后统计原球茎诱导率。

2.3 铁皮石斛原球茎增殖培养最适培养基的筛选

根据文献报道^[9-12]用于铁皮石斛组织培养的基本培养基大多数为 MS、1/2 MS 培养基。为了研究基本培养基对石斛原球茎增殖培养的影响, 本实验分别选择 MS、1/2 MS 和花宝一号^[11]为基本培养基, 同时添加 6-BA 0.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L, 诱导铁皮石斛原球茎增殖。每个处理重复 3 次。

在最适合的基本培养基选择的基础上, 以 1/2 MS 为基本培养基, 对铁皮石斛原球茎增殖所需要的植物生长调节剂进行了选择。在基本培养基中添加不同质量浓度的 6-BA (0.5、1.0、2.0 mg/L) 和 NAA (0.1、0.2、0.5 mg/L), 研究不同植物生长调节剂组合对铁皮石斛原球茎增殖的影响。

实验选取相同条件下种子萌发后培养的生长良好的原球茎, 接种于试验培养基中, 每个处理重复 3 次。45 d 后统计增殖系数。对所得结果进行统计分析。

原球茎增殖系数=增殖后的有效原球茎总数/起始接种总数

2.4 诱导铁皮石斛原球茎分化最适培养基的筛选

以 1/2 MS 为基本培养基, 研究 6-BA (2.0、3.0、5.0 mg/L) 和 NAA (0.1、0.2、0.5 mg/L) 这 2 种植物生长调节剂不同质量浓度组合对原球茎分化的影响。接种外植体时取生长情况基本相同、生长良好的原球茎进行接种。每个处理重复 3 次, 45 d 后统计原球茎分化率。对所得结果进行统计分析。

原球茎分化系数=分化后的有效丛芽总数/起始原球茎总数

2.5 诱导生根培养

以 1/2 MS 为基本培养基, 加入土豆泥或香蕉泥 50 g/L。采用单因素不同质量浓度 NAA (0、0.2、0.3、0.5 mg/L) 进行瓶苗生根试验。原球茎分化培养 60 d 后, 选取长势较好、茎叶健壮、具有 2~3 片真叶的无根丛生苗, 分别接种到不同培养基中。每种培养基重复 3 次, 培养条件同上, 于 45 d 后统计结果。

生根率=产生不定根的幼苗数/接种幼苗总数

实验中所有的培养基中蔗糖浓度均为 3%, 并添加 1.0 g/L 活性炭、琼脂 6.5 g/L。培养基 pH 5.8, 121 °C 灭菌 20 min。所有处理的外植体均在组培室内进行培养, 培养温度 (25±1) °C, 全光谱 LED 灯照射, 光照强度 1 500~2 000 lx, 光照周期为 16 h 光照、8 h 黑暗, 空气湿度为 65%~80%。

2.6 统计指标

实验所得数据均采用 Excel、SPSS 软件处理分析, 差异显著检验用 LSD 法。

3 结果与分析

3.1 铁皮石斛种子诱导原球茎

按“2.2”项所述方法, 用铁皮石斛的种子诱导原球茎。种子在诱导培养基上培养 8~19 d 后, 种子颜色逐渐变得鲜绿, 并可见胚慢慢长大, 呈球形; 30~45 d 发育成原球茎。铁皮石斛种子诱导原球茎诱导率在 95% 以上, 诱导出的原球茎颜色碧绿, 颗粒状膨大, 长势较好。

3.2 铁皮石斛原球茎增殖培养最适合的培养基

为研究铁皮石斛原球茎增殖的最佳培养条件, 以 MS、1/2 MS 和花宝一号培养基为基本培养基, 添加相同质量浓度的 6-BA 和 NAA 诱导原球茎增殖, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 以 3 种基本培养基进行原球茎的增殖时, 相同植物生长调节剂浓度下, 1/2 MS 基本培养基平均增殖系数最高。

以 1/2 MS 为基本培养基, 分别添加不同质量浓

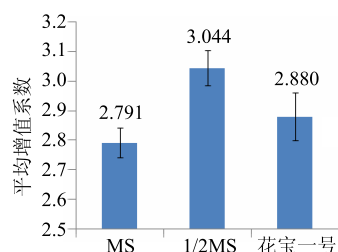


图 1 MS、1/2 MS、花宝一号培养基上原球茎增殖的情况

Fig. 1 Conditions of protocorm proliferation on MS, 1/2 MS and Hyponex No.1 medium

度的 6-BA 和 NAA 诱导原球茎增殖, 结果见表 1。由表 1 结果可知, 在 9 种植物生长调节剂组合处理中, 当 NAA 质量浓度为 0.5 mg/L 时, 6-BA 质量浓度分别为 1.0 和 0.5 mg/L 时, 原球茎的增殖系数明显高于其他的植物生长调节剂组合处理, 尤其是 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 平均增殖系数为 4.93 ± 0.05 , 最大增殖系数可达 23 (图 2-C)。

从表 1 中还可以看出, 6-BA 和 NAA 配合使用有利于原球茎的增殖, 当 6-BA 和 NAA 浓度差异较小时, 原球茎的增殖系数较大, 随着浓度差异变大, 原球茎增殖系数降低, 但过高的 6-BA 浓度易使原球茎分化, 不能有效增殖, 如 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 平均增殖系数最低, 仅为 1.50 ± 0.06 。因此, 在增殖培养基中应使用较低质量浓度的 6-BA,

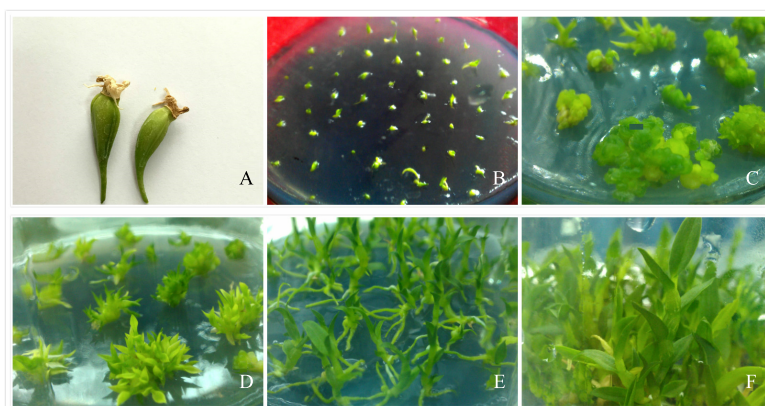
表 1 1/2 MS 培养基上原球茎增殖的情况

Table 1 Conditions of protocorm proliferation on 1/2 MS medium

6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	平均增殖系数/%	原球茎长势
0.5	0.1	1.79±0.05 e	长势较差, 淡绿色
0.5	0.2	3.54±0.07 c	长势较好, 绿色
0.5	0.5	4.89±0.07 a	长势好, 绿色
1.0	0.1	3.23±0.04 d	长势较好, 淡绿色
1.0	0.2	3.96±0.05 b	长势较好, 绿色
1.0	0.5	4.93±0.05 a	长势好, 绿色
2.0	0.1	1.50±0.06 f	长势较差, 淡绿色
2.0	0.2	1.73±0.08 e	长势很差, 淡绿色
2.0	0.5	1.84±0.08 e	长势很差, 有玻璃化

不同字母差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$)



A-果荚 B-种子诱导的原球茎 C-原球茎增殖 D-原球茎分化 E-幼苗生根 F-成苗

A-infruit B-protocorm induced by seeds C-proliferation of protocorm D-differentiation of protocorm E-seedling rooting F-mature seedling

图 2 铁皮石斛快繁过程

Fig. 2 Process of rapid propagation of *D. officinale*

且 6-BA 和 NAA 的质量浓度差异不宜过大。由本实验结果可知, 铁皮石斛原球茎增殖培养最适合的培养基为 1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+NAA 0.5 mg/L。

3.3 不同植物生长调节剂对铁皮石斛原球茎分化的影响

为研究影响铁皮石斛原球茎分化的因素, 以 1/2 MS 为基本培养基, 附加 NAA、6-BA 等进行不同植物生长调节剂配比试验。培养 45 d 后统计原球茎分化的情况, 结果见表 2。由表 2 可知, 添加一定质量浓度的 NAA、6-BA 可以增加分化芽数, 不同质量浓度的植物生长调节剂对比对石斛原球茎增殖的作用不同。总体看来, 6-BA、NAA 的配合使用可以有效地促进铁皮石斛原球茎的分化。供试组合的分化率为 66%~95%。但不同的植物生长调节剂浓度组合, 原球茎分化率不尽相同。2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 植物生长调节剂组合, 原球茎的分化率最高, 达 95% (图 2-D)。

表 2 不同植物生长调节剂配方对原球茎分化的影响

Table 2 Effects of different hormone formulas on protocorm differentiation

6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	原球茎平均分化率/%	芽苗长势
2.0	0.1	68	长势较好, 苗羸弱
3.0	0.2	92	长势较好, 苗正常
5.0	0.5	82	长势差, 苗部分畸形
2.0	0.2	95	长势好, 苗粗壮
3.0	0.5	85	长势较好, 苗较壮
5.0	0.1	66	长势差, 苗羸弱
2.0	0.5	78	长势较好, 苗较壮
3.0	0.1	72	长势较好, 苗正常
5.0	0.2	75	长势差, 苗羸弱

3.4 NAA 对铁皮石斛生根的影响

待上述分化得到的铁皮石斛幼苗生长到 2~3 cm 高时, 将芽苗切下, 移入加或不加 NAA 的 1/2 MS 培养基中, 诱导芽苗生根, 45 d 后统计生根情况, 结果见表 3。

由表 3 可知, 添加不同质量浓度的 NAA 对铁皮

表 3 NAA 对铁皮石斛生根的影响

Table 3 Effects of NAA on seedling rooting

NAA/(mg·L ⁻¹)	平均生根数/条	生根率/%
0	3.3	85
0.2	6.2	95
0.3	9.8	100
0.5	9.4	100

石斛生根有较大影响。虽然铁皮石斛芽苗在 1/2 MS 培养基中可以生根, 但是生根率比较低, 生根条数也比较少。添加适当浓度的 NAA 有利于石斛生根。在培养基中加入 0.3~0.5 mg/L NAA 时, 生根率达 100% (图 2-E)。添加 10% 土豆泥、有利于促进芽苗生根, 而且幼苗的长势也较强 (图 2-F)。所以, 最佳生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.3 mg/L+土豆泥 50 g/L。在幼苗的生长势较强的情况下, 尽量降低植物生长素的使用浓度, 有利于提高组培苗移栽成活率^[9]。

4 讨论

植物生长调节剂对植物的生长发育具有显著影响, 被广泛应用于植物细胞和组织培养, 在石斛属不同植物组织培养中许多研究者也使用了不同的植物生长调节剂并取得了一定的效果。

铁皮石斛从种子诱导产生原球茎, 原球茎通过增殖和分化进而形成完整植株要经历诱导期、增殖期、分化期、生根期等几个时期。其生长过程主要受培养基和培养条件等因素的共同影响, 其中植物生长调节剂的种类和浓度是至关重要的^[10]。不同研究者由于所用材料不同, 研究结果不尽相同。唐桂香等^[7]认为, BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 在 1/2 MS 基本培养基上有利于原球茎的诱导增殖。通过在 KC 培养基中加入葡萄糖和椰子汁, 同时使用 200 d 的种子可以提高微体繁殖频率^[12], 原球茎经过一段时间培养后形成膨胀的米粒状的原球茎。本实验在原球茎诱导阶段添加了土豆泥 50 g/L, 原球茎长势较好。在接下来的实验中应设计添加不同的添加剂, 以寻求更好的添加剂及其质量浓度, 提高原球茎诱导率和长势。

使用不同浓度的植物生长调节剂配比可以进行原球茎的增殖和分化诱导, 有时原球茎和不定芽交织在一起形成一团块状愈伤组织体。陈兆贵等^[13]报道在培养基中添加 6-BA 和 NAA 后可加快原球茎的分化, 添加 NAA 1.0 mg/L+6-BA 3.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 的 MS 基本培养基上, 45 d 原球茎分化率可达 84%。蒋波等^[14]认为, 添加 BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 或 6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的植物生长调节剂 1/2 MS 基本培养基, 对原球茎的分化有利。而本实验得出的原球茎分化的适宜培养基是 1/2 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+琼脂 6.5 g/L+活性炭 1.0 g/L, 分化率达到 95%, 这与蒋波的报道一致。

在基本培养基中加入土豆泥^[15]、苹果汁^[16]、香

蕉汁^[17]、椰子乳^[18]等能促进铁皮石斛幼苗的生长和根系的发育。决定石斛生根的条件是植物生长调节剂,而土豆泥等添加物仅有促进作用,不起决定作用。本实验也采用在生根阶段,向培养基中加10%土豆泥的方法,来促进铁皮石斛生根,发现向培养基中加10%土豆泥能增加生根的条数。

本研究在前人研究成果基础上选取MS、1/2MS和花宝一号为基本培养基,以6-BA、NAA 2种植物生长调节剂为变量进行实验,并添加土豆泥、香蕉泥2种有机物,最后得出了以铁皮石斛种子为外植体,诱导产生原球茎,经过增殖并诱导出再生植株的高效再生体系,旨在为铁皮石斛种苗的快速繁殖和工业化生产奠定基础。

参考文献

- [1] 孙永玉,欧朝荣,李 昆. 药用石斛丰产栽培技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2014.
- [2] 张光浓,毕志明,王峥涛,等. 石斛属植物化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(6): 1005-1008.
- [3] Yang F, Wei N, Gao R, *et al.* Effect of several medium factors on polysaccharide and alkaloid accumulation in protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* during bioreactor culture [J]. *Acta Physiol Plant*, 2015, 37: 94-99.
- [4] 詹忠根. 铁皮石斛根尖诱导丛生芽研究 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 928-931.
- [5] 杜 刚,杨海英,朱绍林,等. 铁皮石斛种子诱导成苗试验 [J]. 中药材, 2007, 30(10): 1207-1208.
- [6] 谢启鑫,宋小明,黄东华,等. 铁皮石斛的种子培养 [J]. 北方园艺, 2010(8): 90-91.
- [7] 唐桂香,黄福灯,周伟军,等. 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): 1583-1585.
- [8] 吴 菊,严中琪,杨 飞,等. 铁皮石斛组培快繁关键技术研究 [J]. 浙江农业科学, 2014(4): 492-497.
- [9] 徐步青,李振中,张 俊,等. 不同培养条件对铁皮石斛类原球茎生物反应器培养的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 709-713.
- [10] 宋 顺,许 奕,王必尊,等. 不同培养基成分对铁皮石斛组织培养的影响 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(13): 133-139.
- [11] 聂 菁,刘丽凤,王景雪,等. 蝴蝶兰类原球茎诱导、增殖及植株再生条件初步研究 [J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2016, 39(2): 318-324.
- [12] Long B, Niemiera A. X, Cheng Z, *et al.* *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae) [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cul* (PCTOC), 2010, 101(2): 151-162.
- [13] 陈兆贵,谭 俊. 不同激素对比对铁皮石斛组织培养的影响研究 [J]. 惠州学院学报: 自然科学版, 2006, 26(3): 11-14.
- [14] 蒋 波,杨存亮,黄 捷,等. 铁皮石斛原球茎生长分化及生根壮苗研究 [J]. 玉林师范学院学报: 自然科学版, 2005, 26(3): 66-69.
- [15] 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): 539-541.
- [16] Shiau Y, Nalawade S. M, Hsia C, *et al.* *In vitro* propagation of the chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl, from axenic nodal segments [J]. *In Vitro Cell Devel Biol Plant*, 2005, 41(5): 666-670.
- [17] 罗吉凤,程治英,龙春林,等. 铁皮石斛快速繁殖和离体种质保存的研究 [J]. 广西植物, 2006, 26(1): 69-73.
- [18] Cui H, Murthy H N, Moh S H, *et al.* Establishment of protocorm suspension cultures of *Dendrobium candidum* for the production of bioactive compounds [J]. *Horti Env Biotech*, 2015, 56(1): 114-122.