

铁皮石斛组培体系的建立

郑子首,孙晨瑜,吕晓倩,侯文秋,李 滨*

山东农业大学 生命科学学院, 山东 泰安 271018

摘要: 铁皮石斛作为一种重要的抗癌抑癌药物, 在全民养生的今天越来越多的成为了人们消费的热点。然而, 由于野生的铁皮石斛非常稀少而且非常昂贵, 不适合大众消费。所以建立一套适合工业化生产的组培体系成为了发展的趋势。以幼嫩的铁皮石斛带节茎段为原材料, 1/2MS 作为培养基, 探究了不同激素浓度及其他因素对铁皮石斛快繁和组培的影响。再以组培出的幼苗为原材料, 研究了温度、水质、培养基质及浇水方式等对铁皮石斛炼苗的影响。结果表明, 铁皮石斛快繁的最佳激素浓度为 6-BA,1.0 mg/L 和 NAA, 1.0 mg/L, 及 1%的活性炭, 诱导率为 12.5%; 组培的最佳激素浓度为 6-BA,1.5 mg/L 及 NAA,2.0 mg/L 或 6-BA, 0.5 mg/L,NAA,0.5 mg/L 和 2,4-D,1.5 mg/L, 诱导率都在 80%以上。铁皮石斛的最优炼苗条件为 25 °C, 光照过的自来水浇灌; 最适合的培养基质为水苔+直径约为 0.5~1.0 cm 的树皮。

关键词: 铁皮石斛; 组培

中图分类号: S567.239;Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2017)04-0537-03

Tissue Culture System Establishment of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

ZHENG Zi-shou, SUN Chen-yu, LV Xiao-qian, HOU Wen-qi, LI Bin*

College of Life Sciences/Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract: As an important medicine for anticancer, *Dendrobium officinale* Kimura et Migo becomes a hot topic during the health-preserving society. Wild *Dendrobium officinale* is very rare and very expensive and not suitable for public consumption. So the establishment of the tissue culture system suitable for industrial production has become the tendency.

We used its stalk as material and 1/2 MS as basal culture medium, investigated the effects of different hormone concentration and other factors on the tissue culture of *D. Officinale*, and then used these plants cultivated as material to explore the effects of temperature, water quality, culture medium and watering method on the seedling of *Dendrobium officinale*. The results showed that the best medium of rapid multiplication was basal culture medium+1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/LNAA+1% PAC, and it's inductivity was 12.5%. The best medium of tissue culture was basal culture medium+1.5 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L NAA or 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA or 0.5 mg/L NAA + 1.5 mg/L 2,4-D, and their inductivities were all over 80%. The best conditions to hardening-seedlings was 25 °C+lighted tap wate, the most suitable culture medium was sphagna+ 0.5~1.0 cm barks in diameter.

Keywords: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; tissue culture

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)是一种名贵的中药材, 在民间, 被誉为“救命仙草”, 具有抗癌、防癌、抗辐射、抗衰老, 提高人体免疫力、扩张血管、抗血小板凝结等多种功能。但铁皮石斛自然结实率很低, 仅为 0.31%。目前全国野生的铁皮石斛越来越少, 已不足 500 kg, 全国市场上每年流通的正宗野生铁皮枫斗不到数十公斤, 而早在 87 年就被国家列为野生药材重点二级保护濒危植物。

近年来, 铁皮石斛在组培快繁方面取得了部分的进展, 国内外的研究内容涉及了培养基选择^[1-3]、外植体选择^[4-7]、激素配比^[5-6,8-10]等诸多方面。然而, 对于天然添加物的种类、浓度、添加时机等方面的结论差异较大。李筑等^[2]对石斛炼苗的基质进行了详细的研究, 但还有水源等几个方面没有考虑到, 有进一步研究的价值。

1 材料与方

1.1 材 料

1.1.1 组培原料 选用纯种的生长状况均一的铁皮石斛为快繁和组培的原料。

1.1.2 炼苗原料 组培获得的生长状况相同的幼苗。基质: I直径大约为 0.5~1 cm 的树皮。II直径大约

收稿日期: 2016-04-12

修回日期: 2016-04-10

作者简介: 郑子首(1996-),男,本科生. E-mail:775618761@qq.com

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail:agribiolab@163.com

为 0.5~1 cm 树皮+直径大约为 1 cm 的砖头。III水苔+直径大约为 0.5~1 cm 的树皮。IV腐殖土。V腐殖土和少量珍珠岩配成的混合基质。

1.2 方法

1.2.1 快繁 I外植体消毒:选取生长旺盛无病害的粗壮植株茎段,每一节为一段,剥去茎表皮,用去离子水洗净,放入超净工作台中。用 75%酒精消毒 30 s,用 5%的 NaClO 消毒 8 min,最后用去离子水洗净,切去边缘。II外植体的培养:将处理过的茎段接入 1/2 的 MS+3%的蔗糖+0.1%的活性炭的培养基中,用不同激素进行处理。然后将其放入光照培养箱中培养 70 d 左右。

1.2.2 组培 I外植体消毒:方法同上。II愈伤组织的形成:将横切过的铁皮石斛带节茎段放入不同激素的 1/2MS +3%蔗糖的固体培养基中并用不同激素进行处理。III当诱导分化出的不定芽长到大约 3 cm 时,将不定芽沿根部的愈伤组织切下,并转移到最佳生根培养基中,诱导其分化成不定根。本文着重研究不同激素处理对铁皮石斛脱分化形成不定芽的影响。

1.2.3 炼苗 I原材料的选取:从组培苗中选取生长状况相近,茎秆健壮,高度相差较小的铁皮石斛组培苗若干,洗净根部的培养基,并消毒备用。II培养基质的配置:购买实验所需的各种土壤基质,配制成为以下几种培养基质:①直径约为 0.5~1 cm 的树皮。②直径约为 0.5~1 cm 树皮+直径约为 1 cm 的砖头。③水苔+直径约为 0.5~1 cm 的树皮。④腐殖土。⑤腐殖土+少量珍珠岩配成的混合基质。(以下称①、②、③、④、⑤) III分组对照:按照温度、培养基质、水源的不同将选取的铁皮石斛组培苗平均分成大小株数相近的 30 组,并设置一组重复组作为对照,培养观察,并进行记录。

2 结果与分析

2.1 不同激素处理对铁皮石斛的快繁的影响

野生石斛体内存在大量的内生共生菌,普通灭菌方法难以根除,加入活性炭后能够显著降低铁皮石斛的染菌率。用不同浓度的激素(表 1)进行处理后得出外植体在培养 30 d 左右就可以明显发现石斛腋芽的出现,60 d 石斛幼苗几乎发育完全,可以进行炼苗。经实验证明,铁皮石斛茎段在(1)条件下诱导率最高,为 12.5%,(2)、(3)分别为 11.2%和 5.0%。结果表明,铁皮石斛快繁最佳培养基为 1/2MS 培养基+1.0 mg/L 的 6-BA, 3%的蔗糖+0.1%的活性炭,并对外植体进行切割处理。(图 1)

表 1 铁皮石斛快繁不同激素处理

Table 1 Different phytohormone in micropropagation rapid propagation of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

NAA	6-BA	切割茎段 Cut size	编号 No.
1	1	+	(1)
0.5	1	+	(2)
1	0.5	-	(3)



图 1 铁皮石斛快繁

Fig.1 The result of micro-propagation rapid propagation of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

2.2 不同激素处理对铁皮石斛的组培的影响

用不同浓度的激素(表 2)对铁皮石斛大量进行处理,最终获得了几组诱导率很高的浓度配比。其中,诱导率最高的是 1.5 mg/L 的 6-BA 和 2.0 mg/L 的 NAA,其诱导率为 96%,其次是 0.5 mg/L 的 6-BA, 0.5 mg/L 的 NAA 和 1.5 mg/L 的 2, 4-D,其诱导率是大约 83%。其他浓度诱导率都在 50% 以下。因为加入活性炭具有良好的抑菌效果,因此在组培过程中依旧保存着 0.1%的活性炭。(愈伤组织见图 2)

表 2 铁皮石斛组培不同激素处理

Table 2 Different phytohormone in tissue culture of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

编号 No.	NAA/mg/L						
	0.2	0.5	0.8	1.0	1.25	1.5	1.75
0.5	01	02	03	07	11	15	19
1.25	\	\	04	08	12	16	20
1.5	\	\	05	09	13	17	21
1.75	\	\	06	10	14	18	22

备注: 01 号中另加 2.5 mg/L 的 2,4-D; 02 号中另加 1.5 mg/L 的 2,4-D
 Note: 2,4-D 2.5 mg/L was added in No.01; 2,4-D 1.5 mg/L was added in No.02.

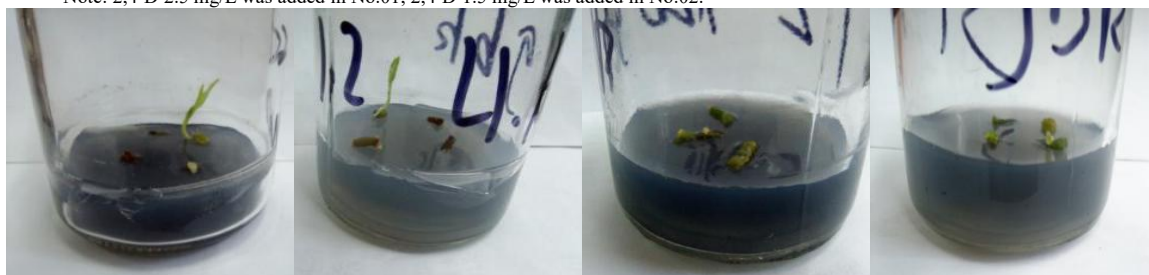


图 2 铁皮石斛愈伤组织

Fig.2 The callus of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

2.3 铁皮石斛的炼苗

经预实验发现一次性浇透水过后, 3 天之后基质干透, 需再次浇水, 为防止水分过多烂根, 水分较少根部枯萎, 浇水周期定为 3 天。每隔十天观察记录一次现象, 大约 3 个月之后, 对数据进行生物统计学统计, 统计出组培苗的成活率和幼苗的生长速率, 可得出最适宜石斛炼苗的条件和对其影响最大的外界因素, 从而实现对铁皮石斛进行的生产培育工作。通过对铁皮石斛的温度、培养基质、水源等影响因素进行分组处理(表 3、4), 经一年的观察, 以及对出芽时间和数量的记录, 得出了铁皮石斛炼苗最快恢复(以分化出第一芽的时间为依据)的培养条件为 30 °C, ⑤号培养基质并用光照过的自来水浇灌, 第一芽分化的时间只有 10 d。但这种条件对于铁皮石斛日后生长不利, 极易会出现枯死、烂根等情况。后期有利于铁皮石斛生长(以植株长势及最后出芽总数为依据)的培养条件是 25 °C, ③号培养基质。水质方面, 自来水与光照过的自来水效果差不多, 但均优于去离子水。在此条件下幼苗全部存活并且长势良好, 浇水次数方便人工管理, 适合大面积炼苗(图 3)。

表 3 30 °C 时的实验处理

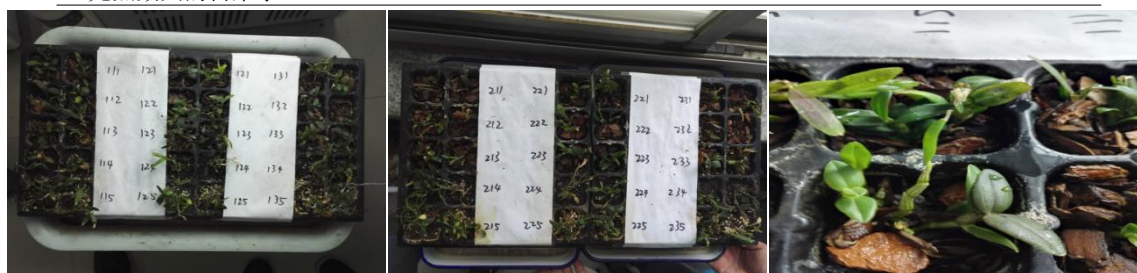
Table 3 The number cultivated in 30 °C

T=30 °C	I	II	III	IV	V
去离子水	111	112	113	114	115
自来水	121	122	123	124	125
光照数天的自来水	131	132	133	134	135

表 4 25 °C 时的实验处理

Table 4 The number cultivated in 25 °C

T=25 °C	I	II	III	IV	V
去离子水	211	212	213	214	215
自来水	221	222	223	224	225
光照数天的自来水	231	232	233	234	235



1:25 °C 整体 2:30 °C 整体 3:部分苗生长状况

1. The seedlings cultivated in 25 °C; 2. The seedlings cultivated in 30 °C; 3. Some parts of their conditions

图 3 铁皮石斛炼苗情况

Fig.3 The conditions of hardening-seedlings of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo