

铁皮石斛快速繁殖和离体种质保存的研究

罗吉凤, 程治英, 龙春林*

(中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650204)

摘要: 对铁皮石斛种子发芽、原球茎增殖、丛芽分化和壮苗培育进行了试验、观察和分析, 研究了培养基、植物激素、光强和添加剂等对其分化和生长的影响。结果显示: 种子在 1/2 MS+蔗糖 2% 的培养基上, 30 d 萌发 95% 以上。原球茎在 1/2 MS+椰子汁 25%+蔗糖 3% 的培养基上, 45~60 d 原球茎增殖速度可达 1:10。丛芽分化较适宜的培养基为 1/2 MS+BA 2 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹+蔗糖 3%, 45~60 d 芽丛增殖速度为 1:4~5。试管苗在 MS+香蕉泥 20%+蔗糖 2% 培养基上, 大约 60 d 苗快速长高, 茎粗壮且根系发达。离体保存材料可采用试管丛芽和原球茎两种方式, 以保持其遗传多样性。保存方法是: 在 15℃ 左右条件下, 保存离体材料, 继代间隔期为 12~18 个月; 也可以采用室温保存, 在 1/2 MS+蔗糖 1% 培养基上, 继代间隔期可延长至 10~12 个月。

关键词: 铁皮石斛; 快速繁殖; 离体种质保存

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)01-0069-05

Studies on the rapid propagation and *in vitro* storage of *Dendrobium candidum*

LUO Ji-feng, CHENG Zhi-ying, LONG Chun-lin*

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: The seed germination, protocorm multiplication (PLBS), differentiation of cluster buds and production of intact vigorous plants of *Dendrobium candidum* were examined, observed and analyzed. The impacts of basic medium, different exogenous hormones, light intensities, and complex complements on the induction and growth of multiple shoots were studied respectively. The results obtained from the present study were as follows: (1) The seed germination rate was about 95% on 1/2 MS+S 2% in 30 d; (2) The proliferation rate of PLBS could be 1:10 in 1/2 MS+CM 25%+S 3% in 45~60 d; (3) It was the ideal medium for cluster shoot formation in 1/2 MS+BA2+NAA 0.2+IBA 0.1. The proliferation speed reached to 1:4~5 per 45~60 d; (4) The plantlets transferred in MS+banana puree 20%+S 2% to help the production of vigorous plant, could be about 5 cm high in 60 d.

The cluster buds and PLBS were used as materials for *in vitro* storage. Their genetic diversity could be maintained. The slow growth method to culture shoot tips or PLBS under room temperature condition and 1/2 MS+S 1%, could reduce the subculture generation and be extended to 10~12 months. The *Dendrobium candidum* was stored under the temperature of 15℃ and its growth cycle could be as long as 12~18 months

收稿日期: 2004-11-01 修回日期: 2005-06-15

基金项目: 国家科技基础条件平台项目(2004DKA30430); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-117)资助[Supported by National Facilities and Information Infrastructure Foundation for Science and Technology(2004DKA30430); Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences(KSCX2-SW-117)].

作者简介: 罗吉凤(1963-), 女, 云南昆明人, 实验师, 主要从事植物种质资源离体保存研究。

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: <long@mail.kib.ac.cn>.

for one generation.

Key words: *Dendrobium candidum*; rapid propagation; *in vitro* germplasm storage

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)又称吊兰、铁皮兰、铁皮吊兰、云南铁皮,是兰科石斛属多年生草本植物。铁皮石斛有重要的药用价值,是名贵的传统中药,有西枫斗、铁皮斗等之称,有滋阴清热、生津益胃、止咳润肺之功效。尤其对嗓子沙哑的防治有特效。

近年来,随着研究的深入发现它含有石斛多糖(黄民权等,1994)、石斛碱、石斛苷、石斛胺和石斛次碱等(张明等,2000),以及18种氨基酸(阮金月,1997)和多种微量元素等物质,具有显著提高免疫力功能,抑制肿瘤生长和扩张肠系膜动脉血管(包正声等,2001)等作用,颇具市场开发价值。

铁皮石斛是石斛类药材的上品,但它自然繁殖率低,分布区域相当狭窄,仅在我国云、贵、川和广西等地海拔600~2500m的林下古树和水沟旁陡峭的岩壁上生长,且生长缓慢,分枝少,生物量低(王立安,1990)。近年来,由于人们对其过度采挖,导致其野生资源急剧减少,日趋濒危,现已被列为国家重点保护植物。为保护这一物种,扩充药源,我们进行了繁殖技术和保存方法的研究,以期今后实现其工厂化生产,满足社会经济发展的需要。

1 材料与方 法

1.1 材料

采自云南广南县,为野生未开裂的铁皮石斛果实。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 用95%酒精棉球仔细擦果实表面,再在70%乙醇中浸透,然后在酒精灯上烧,待果实稍冷却,将种子全部放入无菌水中,接种时用无菌吸管吸上来,放入诱导种子萌发的培养基即可。

1.2.2 培养条件 将种子分别接入MS、1/2MS、1/2N6、1/3N6和White培养基上,30d后统计种子萌发数(萌发标准以种子露白为准),萌发率,并比较了光培养和暗培养对种子萌发的影响。原球茎增殖培养基为1/2MS+CM25%+S2%。丛芽分化实验,我们采用了不同植物激素种类(如BA、KT、ZT、NAA、2,4-D、IAA和GA₃)及其不同组合(1/2MS+2,4-D1mg·L⁻¹(单位下同)与1/2MS+BA2+

NAA0.2+IBA0.1)。壮苗培养基比较了1/2MS+Kt2、1/2MS+BA2+NAA0.2,并试验了天然添加物(20%香蕉泥,10%番石榴泥和LH500mg·L⁻¹)和光强(3000lx和7000lx)对试管苗生长的影响。培养基pH5.5~5.8,培养温度27±1℃、15℃和室温,光照强度根据铁皮石斛生长发育需要,分别采用2000lx、3000lx和7000lx。光照时间12h/d。糖浓度1%、2%和3%三种设置(每种处理10瓶,8苗/瓶)。

1.3 三种移植炼苗基质

栽苗用具用0.2%多菌灵液消毒30s,栽苗基质采用0.5~1cm的粗砂粒和苔藓,用0.1%百菌清液消毒20min,备用。

2 实验结果

2.1 种子培养

2.1.1 种子的构造和发芽过程 铁皮石斛种子(在光学显微镜下)外形为长纺锤形,种子大小为长0.4mm宽0.09mm。种子构造十分简单,由疏松透明的一薄层细胞组成的种皮,种皮表面呈现网状纹饰,种子中央有一胚,卵型,无胚乳(图1)。种子接种后7~10d,可见胚长大(图2);15d左右,胚几乎充满整个种子,呈球形(图3);约20d胚突破种皮(图4);约25~30d长出假根1~2条(图7);球形胚的表层细胞分裂加速(图6);原球茎大量形成(图8)。

2.1.2 光和暗培养对种子发芽的影响 种子在光照和黑暗条件下培养均能萌发,但在光下培养的种子15d后胚呈绿色,20d胚长大逸出种皮并出现假根。而在黑暗条件下培养的种子15d时胚呈黄白色,25d胚才开始膨大,50d胚长大溢出种皮,并长假根。这说明光照条件下种子萌发比黑暗条件下大大提前,光更利于种子萌发。

2.1.3 基本培养基对种子萌发的影响 种子在各种培养基上均能萌发在MS、1/2MS、1/2N6和White培养基上,30d种子发芽率均达到95%,差异表现在原球体的直径上,分别是1、1.2、0.5mm和0.5mm。说明1/2MS更有利于种子萌发。1/3N6培养基上培养的种子,30d仅70%萌发,原球茎大小为0.5mm,表现最差。

2.2 原球茎的增殖

原球茎分别接种在 1/2 MS 和 1/2 MS+CM 25% 培养基上, 后者 45~60 d 原球茎增殖速度 1:

10 左右, 且原球茎颜色更绿、更亮, 个大。前者增殖速度还不到它的一半, 所以我们认为后者更适宜于原球茎的增殖。

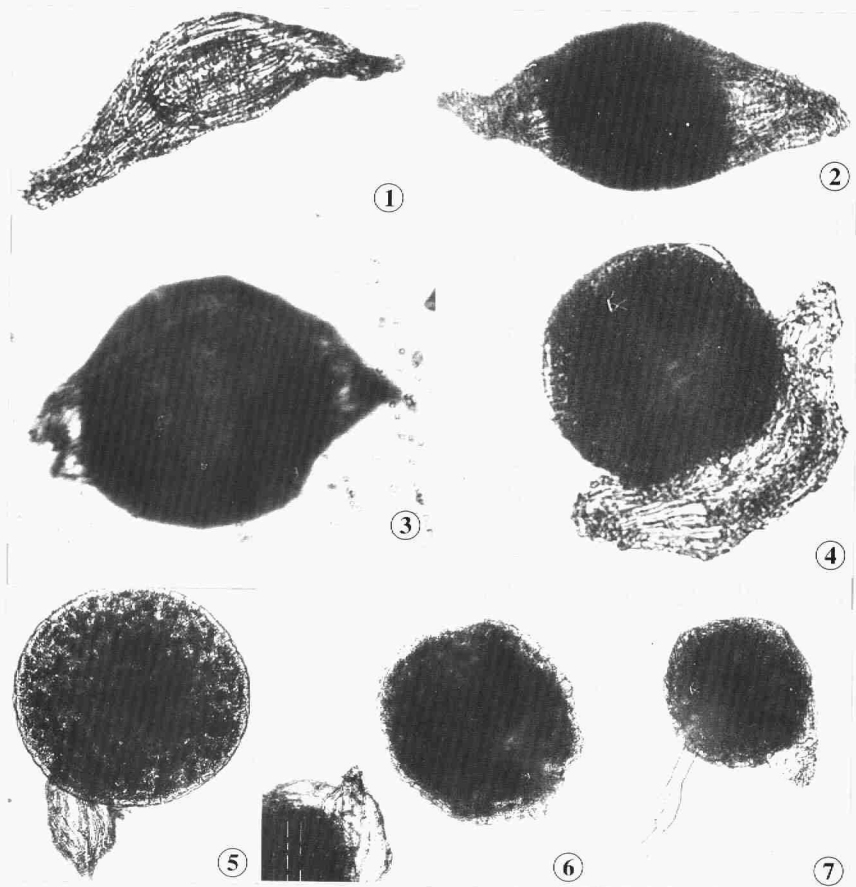


图 1-7 铁皮石斛种子发芽过程 1. 种子外形(放大 100 倍); 2. 培养 7~10 d 的胚; 3. 培养 15 d 的胚; 4. 培养 20 d 胚突破种皮发芽; 5. 20 d 胚; 6. 25~60 d 胚周边细胞分裂加速形成原球茎; 7. 胚及其形成的假根。

Figs. 1-7 Seed germination process of *Dendrobium candidum* 1. Seed shape ($\times 100$); 2. Embryo in 7~10 d; 3. Embryo in 15 d; 4. Embryo germinated from seed vessel in 20 d; 5. Embryo in 20 d; 6. Protocorm formation through cell division in 25~60 d; 7. Embryo and its pseudorhiza.

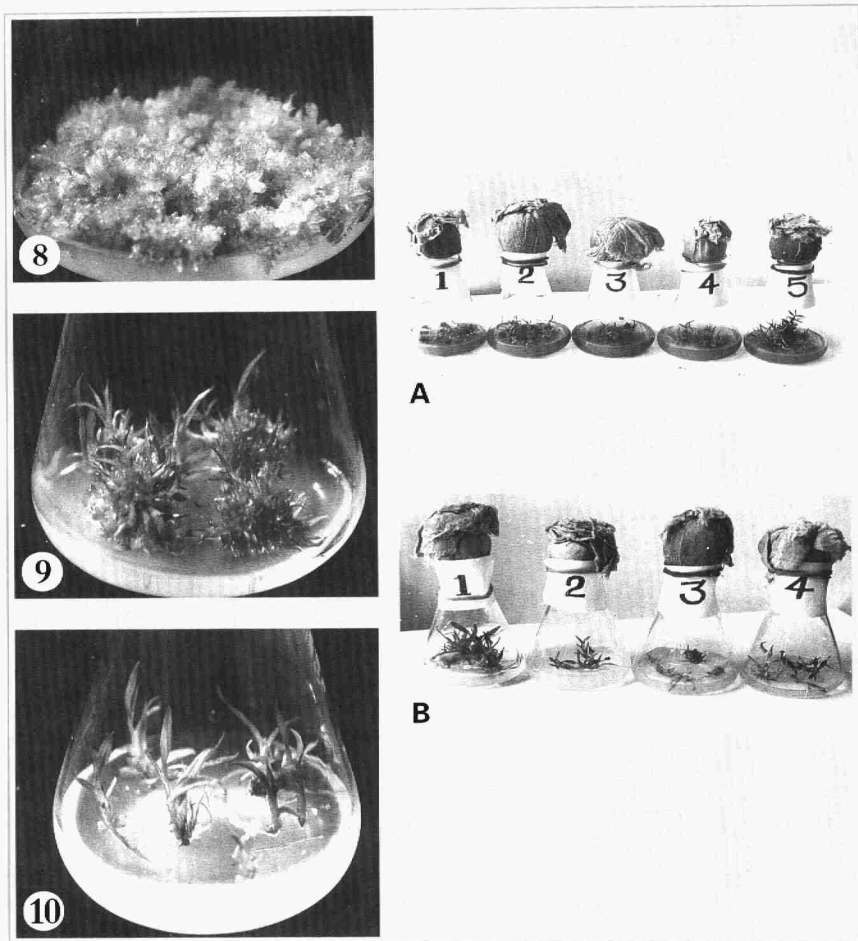


图 8-10 8. 原球茎; 9. 丛芽; 10. 完整试管苗。

Figs. 8-10 8. Protocorms; 9. Cluster buds; 10. Plantlets. A: 1. BA1; 2. Zt1; 3. IAA1; 4. GA1; 5. 2,4-D1. B: 1. 2,4-D2+CM 25%; 2. 2,4-D 0.5; 3. 2,4-D2; 4. 2,4-D1+Kt 0.2.

2.3 芽的分化

为了解植物激素种类和组合对丛芽分化的影响,我们做了以下实验(表 1)。从表 1 可以看出 1/2

MS+BA 2+NAA 0.2+IBA 0.1 的培养基较适宜丛芽分化,其次为 1/2 MS+2,4-D1 和 1/2 MS+2,4-D1+Kt 0.2。60 d 丛芽增殖率可达 1:3~4。

2.4 壮苗的培养

2.4.1 植物激素和添加物对培育壮苗的影响 我们实验了①MS+Kt2; ②MS+2,4-D1+CM 10%; ③MS+香蕉泥 20%; ④MS+香蕉泥 20%+NAA2; ⑤MS+2,4-D1+LH 500 和 ⑥MS+番石榴泥 10%。这 6 组实验均培养 60 d, 观察表明(表 2): 第 ⑥组最差, 表现为叶色淡绿, 苗高仅 1 cm 左右。第 5 组培养基有利根生长、增粗和根毛发生, 苗高约 3 cm。第③④组培养基较利壮苗, 第③组培养基上的苗根系发达, 苗高达 4~5 cm, 第④组培养基上苗高可达 5~6 cm, 但苗基部易产生丛芽, 不利试管苗的移栽, 因此, 我们选用 MS+香蕉泥 20%的培养基作壮苗培养基。

表 1 植物激素对不定芽分化和生长的影响

Table 1 The impact of plant hormones on the differentiation and growth of cluster buds

激素类型 Hormone types	丛芽分化状况 Cluster buds differentiation	芽高 Bud height (cm)	叶片 颜色 Leaf color	叶片大 小 ¹⁾ Leaf size (mm)
IAA1	+++	1.5	深绿	1.5×8
GA3	+	1.3	淡绿	1.5×7.5
Kt1	++ 根系发达	1.6	绿	1.5×12
BA1	++	1.1	绿	1×5
2,4-D0.5	++	2.5	深绿	1.5×7.5
2,4-D1	+++	2.0	绿	1.5×6.7
2,4-D2	+	1.6	白绿	1×5
Zt1	+	1.3	黄绿	1×6
NAA1	++	1.1	深绿	0.9×4
2,4-D1+Kt0.2	+++	3.0	绿	1.5×10
BA2+NAA0.2 +IBA0.1	++++	3.2	深绿	1.5×10
CK(1/2 MS)	++ 有原球体存在	1.9	深绿	2×11

¹⁾ 培养时间 60 d; 测量叶片大小时取最大叶; 基本培养基为 1/2MS。The culturing time was 60 d; The biggest leaf was selected for measurement; Basic medium was 1/2 MS.

2.4.2 光照强度对壮苗的影响 我们以 MS+2,4-D1 作为培养基, 选取具 2~4 叶, 高约 1.2 cm 的芽条, 放在光强分别为 3 000 lx 和 7 000 lx 的条件下培养。经过 60 d 培养, 芽条上平均叶数分别为 5 片和 6 片, 平均株高分别为 3.3 cm 和 5.8 cm。这表明在培育壮苗时, 适当增加光强是很有利的。

2.5 试管苗的移栽

将根系发达, 茎粗壮, 株高达 5 cm 左右的试管苗, 去掉根系上所粘附的琼脂, 2~3 苗一组用已灭过菌的苔藓包住根系, 放在填有碎砖粒的小盆内, 注意保湿, 通风和遮荫(70% 荫蔽度), 控制温度为 25 ± 2 °C, 30 d 后待长出新根系或叶时, 可去掉保湿用

的覆盖膜。每周施 1 次液肥, 浓度为 1/10 MS 液, 随着苗的生长, 施肥浓度逐渐增加。移栽成活率最高可达 80%。

3 离体保存

将试验所得的铁皮石斛原球茎和试管丛芽, 放入 15 °C 培养条件下保存, 继代间隔期可延长至 18 个月, 一旦需要取出来就可用于快速繁殖, 几乎无不正常现象。我们还对离体材料在室温下保存做了一些探索。结果显示: 在 1/2 MS+蔗糖 1% 限制碳源的培养基上, 培养的原球茎和丛芽, 继代周期也可延长 10~12 个月, 由此可见, 在没有低温设施的情况下, 也可用此方法达到限制生长和离体保存的目的。

表 2 植物激素和添加剂对壮苗的影响

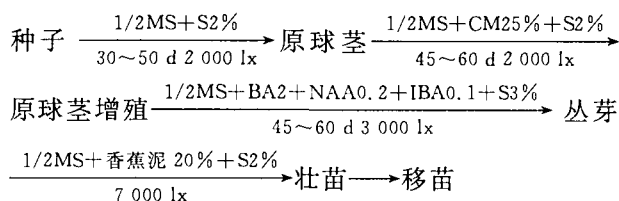
Table 2 The impact of plant hormones and organic supplement on plantlet

处理 Treatment (mg/L)	苗状况 Plantlet status	苗高(cm) Seedling height
①MS+Kt2	壮	1.5
②MS+2,4-D1+CM 10%	较弱	4.5
③MS+香蕉泥 20%	壮(根系发达)	4.5
④MS+香蕉泥 20%+NAA2	壮(苗基部有丛芽)	5.5
⑤MS+2,4-D1+LH 500	较弱(根系发达具根毛)	3.0
⑥MS+番石榴泥 10%	弱	1.0

4 讨论

叶秀萍等(1988)观察了种子成熟过程中的形态发育及其在离体培养时的表现, 而我们偏重观察种子离体培养时的萌发过程, 以及快繁程序及技术。

通过多年探索, 铁皮石斛组培苗的生产工艺如下:



在铁皮石斛丛芽增殖和壮苗培育中, 我们发现芽条有开花现象, 开花时间从 1 月底断断续续, 一直延续到 8 月底, 开花最多时可达 10%, 2 个月后, 其花开始枯萎。这意味着需要进一步探讨成花原因以达到人为控制的目的, 更重要的是有利于该物种的育种和品质改良。促进开发此种花的微型培养瓶, (下转第 62 页 Continue on page 62)

sm、m、t 和 st 型;而祁门过黄的分别是 sm、m、st、t、st 和 sm 型。诚然,在进行核型分析时,染色体上的一些差异有可能是人为因素导致的(洪德元,1986b),但本文研究的这两种植物,同种的不同居群间核型高度一致,而种间的核型却存在显著的差异,已超出了种内分化的水平和人为测量导致的可能。再加上祁门过路黄叶基部为心形,花常 1~3 朵,腋生,具总梗,绝不集生于茎端,具苞片,果柄伸长 4~8 cm 等外形特征与巴东过路黄叶基部楔形、截形或圆形,花 2~4 朵集生于茎端,无苞片,果柄不伸长,仅 0.6~3.0 cm 相区别,另立为新种处理是恰当的。

参考文献:

- 陈封怀,胡启明. 1989. 中国植物志(第 59 卷)[M]. 北京:科学出版社,59(1):88-96.
 洪德元. 1990. 植物细胞分类学[M]. 北京:科学出版社.
 Arano H. 1963. Cytological studies in subfamily carduoideae (Compositae) of Japan[M]. IX. The karyotype analysis and phylogentic considerations on *Pertya* and *Ainsliea*(2)[J]. *Bot Mag Tokyo*, 76:32-39.
 Hong DY(洪德元). 1986a. Biosystematic observation on 5 species of *Conaolida*(Ranunculaceae)(飞燕草属五个种的物种

- 生物学观察)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报),28(1):1-10.
 Hong DY(洪德元). 1986b. Karyotype uniformity of *Streptolirion voluibile* subsp. *volubile*(Commelinaceae) from China and Japan(中国和日本产竹叶子(亚种)(鸭跖草科)核型的一致性)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报),24(4):264-267.
 Li MX(李懋学),Chen RY(陈瑞阳). 1985. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants(关于植物核型分析的标准化问题)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究),3(4):297-302.
 Shao JW(邵剑文),Li XH(李晓红),Han L(韩露),et al. 2004a. A study on karyotypes of five species in *Lysimachia* (5种珍珠菜属植物的核型分析)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),26(4):427-433.
 Shao JW(邵剑文),Zhang XP(张小平),Guo XH(郭新弧). 2004b. A new species of *Lysimachia* in Primulaceae(珍珠菜属(报春花科)一新种)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究),24(4):389-391.
 Stebbins GL. 1971. Chromosomal evolution in higher plants [M]. London:Arnold.
 Xiong ZT(熊治廷),Chen XC(陈心启),Hong DY(洪德元). 1998. Karyotype evidence for distinguishing between *Hemerocallis esculenta* and *H. middendorffii*(北萱草与大苞萱草区分为不同物种的核型证据)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报),36(1):53-57.

(上接第 73 页 Continue from page 73)

以作为旅游小商品出售。

铁皮石斛快速繁殖的目的,是减轻野生资源的采挖压力和增加药源,这就要求组培苗保持野生苗的遗传性不变。此外,还有研究者比较了铁皮石斛野生苗与组培苗形态特征、药材性状以及有效成分的含量,并做了药理分析,证实了组培苗可以替代野生苗使用(冯德强,1999;顾慧芬等,1999)。

参考文献:

- 包正声,顺庆生,陈立钻,等. 2001. 中国药用石斛[M]. 上海:复旦大学出版社,6-8.
 Feng DQ(冯德强). 1999. Comparison on pharmacognosy of natural and Test-Tube plantlets of *Dendrobium candidum* (黑节草野生与栽培品种的生药学比较)[J]. *Acta Yunnan Coll Traditional Chinese Medicine*(云南中医学院学报),22(2):4-6.
 Gu HF(顾慧芬),Xin XJ(忻晓君),Zhou WT(周文婷),et al. 1999. Studies on plantlets' rapid growth of *Dendrobium candidum* in tissue culture and on the determination of polysaccharides(铁皮石斛试管苗快速生长与栽培研究及多糖含量

- 测定)[J]. *Chinese Tradition Patent Medicine*(中成药),21(12):658-659.
 Huang MQ(黄民权),Huang BH(黄步权),Cai TY(蔡体育),et al. 1994. Study on isolation, purification and analysis of polysaccharides of *Dendrobium candidum* (铁皮石斛多糖的提取、分离和分析)[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药),25(3):128-129.
 Ruan JY(阮金月). 1997. The analysis of amino acid content of *Dendrobium candidum* (铁皮石斛氨基酸组合分析)[J]. *The Chinese Traditional Drugs*(中药材),20(1):32-33.
 Wang LA(王立安). 1990. Expeditionary notes on habitat of *Dendrobium candidum* (铁皮石斛生境小记<丁>)[J]. *Plants*(植物杂志)(4):29.
 Ye XL(叶秀萍),Cheng SJ(程式君),Wang FX(王伏雄),et al. 1988. Morphology of immature seeds and development in vitro of *Dendrobium canidum* (黑节草未成熟种子的形态发育及其在离体培养时的表现)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),10(3):285-290.
 Zhang M(张明),Xia HX(夏鸿西),Zhu LQ(朱利泉),et al. 2000. Review on the rapid propagation of in vitro seedling of *Dendrobium*(石斛组织培养研究进展)[J]. *China J Chinese Materia Medica*(中国中药杂志),23(6):323-326.