

铁皮石斛组织培养与快速繁殖研究进展

魏丽芳, 于桂芬, 冯国宝, 杨亚平 (潞安矿业(集团)有限责任公司林业处, 山西长治 046204)

摘要 铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.)是我国传统名贵中药材,自然繁殖率低,野生资源稀缺,近些年对其人工快繁技术研究进展较快。从外植体、原球茎增殖与分化、生根与壮苗、移栽等方面对铁皮石斛组织培养与快速繁殖研究进行了综述。提出当前研究存在的问题:种苗培养周期较长,成本较高;大田移栽技术研究相对薄弱,移栽后的种苗成活率较低;对于种苗培养过程中药用有效成分积累规律的研究较少。针对当前研究存在的不足,指出今后的研究方向:加强光照、温度、湿度等环境条件与原球茎增殖分化相关性研究,缩短种苗培养周期,提高生产效率;加强大田移栽技术基础研究,提高移栽成活率;加强组织培养过程中种苗药用有效成分积累规律以及与培养条件关系研究,提高种苗药用有效成分含量。该研究可为铁皮石斛规模化生产提供参考。

关键词 铁皮石斛;组织培养;快速繁殖

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)35-13561-03

Advances in Tissue Culture and Rapid Propagation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.

WEI Li-fang et al (Forestry Department of Lu'an Mining (Group) Corporation Ltd., Changzhi, Shanxi 046204)

Abstract *D. candidum* Wall. ex Lindl. is a traditional Chinese medicinal herb with low natural propagation and wild resource scarcity, the research of *D. candidum* rapid propagation has made great progress in recent years. In this paper, the researches of tissue culture and rapid propagation of *D. candidum* Wall. ex Lindl. were reviewed from the aspects of selection of explants in tissue culture, protocorm multiplication and differentiation, rooting and strengthening seedling and transplanting. The deficiencies of current researches were proposed, i. e. long cultivation circle of seedlings, high cost; poor researches on transplanting techniques, low survival rate of transplanted seedlings; limited researches on accumulation of active ingredients in seedling cultivation. In view of the problems, the future research directions were discussed, i. e. researches on illumination, temperature and humidity, multiplication and differentiation of protocorm, shortening seedling cultivation circle, improving production efficiency; devoting more in fundamental researches on transplanting techniques, improving transplanting rate; enhancing researches on the relationship between accumulation of active ingredients and cultivation conditions in tissue culture, improving concentration of active ingredients of seedling. The research provides references for the large-scale production of *D. candidum* Wall. ex Lindl. .

Key words *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.; Tissue culture; Rapid propagation

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.)为兰科石斛属多年生草本植物^[1],是我国传统名贵中药材,含有多糖、芪类、生物碱类、氨基酸类、酚类、蒽醌类、倍半萜类、香豆素及挥发油等多种药用有效成分^[2]。传统中医认为,铁皮石斛具有滋阴清热、益胃生津、明目安神、润肺止咳等功效;现代药理和临床研究表明,铁皮石斛具有抗肿瘤、抗疲劳、抗氧化、抗衰老、降血糖、提高人体免疫力和刺激造血等多种功效^[3]。

野生铁皮石斛主要分布在安徽、福建、浙江、江西、四川、广西、云南、贵州、广东、河南等地,生长在水沟旁的岩石缝隙或树干上,喜阴凉、湿润、通风多雾的气候环境。近年来,由于铁皮石斛极高的药用价值,以其为原料制成的“铁皮枫斗”价格昂贵,野生资源遭到了疯狂采挖与破坏,目前铁皮石斛已被列为国家二级珍稀濒危保护植物。

为了保护野生资源环境,满足市场需求,亟需加快铁皮石斛的繁殖速度,然而,由于铁皮石斛种子无胚乳,自然条件下需要和真菌共生提供营养才能萌发,人工栽培与繁殖比较困难,繁殖率很低,采用传统的扦插、分株等方法,增殖速度也很慢。组培快繁技术是一种有效提高种苗生产效率的方法,20世纪末,国内外学者开始了铁皮石斛快繁技术研究,经过多年大量试验研究工作,取得了显著成果。为此,笔者对国内外的相关研究进展情况进行了整理与分析,从外植体、

原球茎增殖与分化、生根与壮苗、移栽等方面进行了综述,分析现阶段铁皮石斛快繁技术研究的不足,提出了今后研究的方向,以期能为铁皮石斛规模化生产提供参考。

1 外植体

种子、茎段、叶片、根、腋芽、试管苗等均可作为铁皮石斛组织培养外植体材料,但不同外植体培养出的新一代性状、原球茎的质量、成苗的时间等存在差异。种子和茎段是常用的外植体材料,以种子作为外植体,操作简单,增殖系数高,诱导出的愈伤组织分化能力较强,培养出的原球茎质量也较高,但后代性状不稳定,易出现变异,以茎段培养的后代可较好地保持母体性状,成苗速度也较快。

1.1 种子培养 由铁皮石斛种子获得再生植株的途径有:种子→原球茎→再生植株;种子→愈伤组织→原球茎→再生植株;种子→原球茎→无菌苗茎段→再生植株;种子→原球茎→愈伤组织→丛芽→再生植株等。

铁皮石斛种子在自然条件下需要真菌共生才能萌发,但在离体无菌培养条件下可以直接萌发,并且萌发率较高,最高可以达到95%以上^[4]。有研究表明,接种到MS、1/2MS、N6、SH、KS、VW、White等培养基上的铁皮石斛种子均能萌发,但萌发效果不同。各种培养基相比较,在萌发率方面,接种到MS、1/2MS、N6和White这4种培养基上的种子在30d后萌发率均达到95%;在成苗率方面,N6培养基上接种的种胚成苗率最高,优于MS、1/2MS、SH、VW等培养基,并且多数基本培养基成苗率优于其减半培养基;在种胚苗生长方面,基本培养基上生长的种胚苗也优于减半培养基^[5]。

铁皮石斛种子萌发率与种龄密切相关。有研究表明,对

作者简介 魏丽芳(1981-),女,山西长治人,工程师,硕士,从事植物组织培养与快繁技术研究。

收稿日期 2013-10-25

于60~180 d种龄的种子,种龄越长,萌发时间越短,萌发率越高^[6],但超过一定种龄后,萌发时间和萌发率差异不显著^[7]。在N6培养基上,60 d种龄以下的种子萌发率最高达到6%,90 d种龄的种子14 d就可萌发,萌发率达到87%,120~180 d种龄的种子萌发更快,接种7 d后就会萌发,萌发率达到95%以上^[4,6-7]。比较而言,120~180 d种龄的种子适宜作离体培养材料。

在基本培养基中加入适宜浓度的植物生长调节物质、天然添加物和碳源可促进铁皮石斛种子萌发。在基础培养基中加入一定浓度的NAA可促进种子萌发^[7-10],而加入6-BA^[7,10]、2,4-D^[6,8-9]、ABA^[9,11]等或者浓度大于1 mg/L的KT、IAA^[7]等会抑制种子萌发或生长;在培养基中加入椰子汁、马铃薯、香蕉等提取物可加快种子萌发速度,提高萌发率和原球茎发生率^[7,12];在培养基中加入白糖、片糖等碳源,可促进种子萌发和种苗生长^[7];在培养基中加入活性炭,可吸附代谢过程中的废弃物,防止组织褐变,促进胚胎发生与生根^[4,8]。

1.2 茎段培养 铁皮石斛同一枝条不同位置的茎段培养出的再生植株生长状况不同,以茎尖最好,茎中次之,茎基较差^[13]。由茎段获得再生植株的途径为茎尖→愈伤组织→丛芽→再生植株。

在茎段接种培养过程中,枝条的来源、茎段在培养基上的放置方式、切割次数等对再生植株的繁殖倍数、生长等均有影响。由生长旺盛的试管苗诱导出的再生植株茎粗壮,叶片浓绿,移栽成活率高,优于栽培植株的新枝条^[14-15];在培养基上水平放置的茎段可以获得完整的再生植株,极向垂直插入培养的茎段无丛芽发生,不久即褐化枯死,倒向插入的茎段褐化较少^[16-17]。切割超过6代的植株易衰老退化,成活率低^[13]。

由MS、1/2MS、B5、N6等不同培养基上离体培养的茎段生长情况不同,N6培养基上形成丛芽数量最多,生长健壮,效果最好^[18]。在培养基中加入一定浓度的植物生长调节物质、天然添加物可以促进茎段再生植株的生长。在MS培养基中加入适宜浓度的NAA、6-BA、IBA等植物生长调节物质,可提高茎段原球茎诱导率,促进原球茎的增殖、分化与生根^[19-20];在培养基中加入适宜比例的马铃薯汁、香蕉汁等添加物,能够促进茎段再生苗的生长^[13]。

2 原球茎增殖与分化

原球茎的增殖与分化是种苗快速繁殖的关键,在铁皮石斛组织培养过程中,获取一定数量和质量的原球茎,并转移到适宜的培养基上进行分化培养,才能达到迅速扩繁的目的。有研究表明,培养基的种类、植物生长调节物质、天然添加物、碳源等均会影响原球茎的增殖与分化。

接种到N6、1/2MS、VW、B5、KC等6种培养基上的原球茎增殖与分化研究结果表明,6种培养基均可促进原球茎分化,其中1/2MS是原球茎增殖与分化最适宜的培养基^[21-22]。在培养基中加入适宜浓度的KT、NAA、6-BA等植物生长调节物质均可对原球茎的增殖与分化起到促进作用,1/2MS+1.0

mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA^[23]、1/2MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA^[24]、1/2MS+3.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA^[24]、1/2MS+0.2 mg/L KT+1.0 mg/L NAA^[25]、MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA^[26]可促进原球茎增殖;MS+1.0 mg/L KT+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L LNAA^[26]、1/2MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA或1/2MS+3.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA^[24]可促进原球茎的分化。

在基本培养基中加入适宜浓度的天然添加物、碳源等也能够促进原球茎增殖与分化。马铃薯汁^[21]、苹果汁^[25]、椰子汁^[4]等可以促进原球茎的增殖与分化,但香蕉汁^[21,25]抑制原球茎增殖与分化。果糖、蔗糖、葡萄糖等碳源常用于原球茎的增殖分化培养过程中,目的是维持培养物生长发育需求。有研究表明,一定浓度蔗糖更有利于原球茎增殖培养^[27-28];浓度30 g/L的蔗糖有利于原球茎的生长,蔗糖浓度为30~60 mg/L时,随着浓度增加,会抑制原球茎生长,延长生长周期,蔗糖浓度大于60 mg/L时,原球茎生长受到明显抑制^[29];3%的蔗糖浓度为原球茎增殖与分化的临界值,2%~3%为原球茎分化的适宜蔗糖浓度,当蔗糖浓度大于3%时,原球茎将不再分化^[22,27]。

3 生根与壮苗

铁皮石斛生根壮苗常用的基本培养基有MS、1/2MS^[4-5,30]、N6^[5,8,30]、B5^[30-31]、KC^[30]、VW^[8]等,其中以N6培养基效果最好^[5,30]。在培养基中加入适宜浓度的IAA^[26,31]、NAA^[5,10,23,25-26,33]、IBA^[26,31-32]等植物生长调节物质有利于促进试管苗生根和生长,其中以适宜浓度的NAA效果最好^[23],在1/2N6培养基中加入1.0~2.0 mg/L NAA^[5],或者在1/2MS培养基中加入0.5 mg/L NAA^[33],石斛种苗生根效果最明显,生根率和生根数均得到明显提升。在基本培养基中加入香蕉汁^[4,7-8,25-26]、苹果汁^[25]、马铃薯汁^[5,7,10,30-31]、椰子汁^[24]、绿豆芽汁^[7]等天然添加物,也可以促进铁皮石斛根系发育,与促进原球茎增殖分化不同的是香蕉汁促进铁皮石斛种苗生根作用明显^[5,7,25,30-31],而其他添加物,如马铃薯汁,培养出的种苗根系虽然较长,但较纤细。在生根培养基中加入一定量的蔗糖、食用白糖^[13,34]、活性炭^[6]等,有利于铁皮石斛种苗的生长,培养出的种苗根系更加粗壮,成活率提高。

4 移栽

铁皮石斛对生长环境要求比较严格,在阴凉、湿润、通风良好环境条件下长势较好,最适宜的环境温度为18~28℃。经试验统计,在简易大棚内移栽的铁皮石斛试管苗成活率不到50%,并且生长缓慢,在温湿度、通风控制较好的大棚内,试管苗成活率能达到95%,并且生长迅速,茎粗壮^[35-36]。因此,试管苗的移栽务必要选择或创造适宜的环境条件。

铁皮石斛移栽适宜的栽培基质是1/2松树皮(发酵过)+1/2碎石、1/2花生壳(发酵过)+1/2碎石、1/2碎木屑(用3%尿素拌湿后发酵)+1/2碎石、1/3泥炭+1/3锯末+珍珠岩,再覆以苔藓类,移栽成活率可达到95%以上,在移栽之前,栽培基质需要灭菌^[25,37-38]。

铁皮石斛移栽之前,需要经过 7 d 的炼苗,以更好地适应外界环境。移栽时,用清水洗净其根部沾附的培养基,避免伤及幼嫩组织,移栽后 7 d 内不浇水,7 d 之后适量浇水,保证基质含水率和透气性,诱发气生根的生长,15 d 后每 7 d 施加 1 次叶面肥以促进根部生长,可选“花宝 5 号”或“花多多”稀释 3 000 倍后均匀喷洒^[39]。

5 讨论与展望

从国内外研究进展来看,铁皮石斛组培快繁技术取得了明显进步,在野生资源保护和满足市场需求方面发挥了积极作用,但在应用于规模化生产方面还存在一些不足:①种苗培养周期较长,成本较高。从铁皮石斛种子、茎段等外植体培养成种苗需经过多次培养基转接,培养周期较长,过程繁琐,人力、物力成本较高。②大田移栽技术研究相对薄弱,移栽后的种苗成活率较低。目前对于光照、温度、湿度、施肥等田间环境与技术措施对移栽苗生长情况的基础研究相对较少,种苗移栽成活率较低。③对于种苗培养过程中药用有效成分积累规律的研究较少。近些年的组培快繁技术研究主要集中在提高组培苗的繁殖系数方面,对于不同方式方法培养出的种苗药用有效成分差异以及不同培养条件下的种苗药用有效成分积累规律还不清楚。

因此,针对当前研究存在的不足,铁皮石斛快繁技术今后的研究方向主要在 3 个方面:①加强光照、温度、湿度等环境条件与原球茎增殖分化相关性研究,缩短种苗培养周期,提高生产效率;②加强大田移栽技术基础研究,提高移栽成活率;③加强组织培养过程中种苗药用有效成分积累规律以及培养条件关系研究,提高种苗药用有效成分含量。

参考文献

- [1] 吉占和. 中国植物志:第 19 卷[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [2] 张光浓,毕志明,王峰涛,等. 石斛属植物化学成分研究进展[J]. 中草药,2003,34(6):1005-1008.
- [3] CHENG X M, GUO S X. Study progress of the *Dendrobium* plants in chemical constituents and pharmaceutical activity[J]. Nat Prod Res Dev, 2001,13(1):70-74.
- [4] 罗吉凤,程治英,龙春林. 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):69-73,62.
- [5] 赵天榜,陈志香,陈占宽,等. 石斛组织培养与栽培技术研究[J]. 河南农业大学学报,1994,28(2):128-133.
- [6] 叶秀麟,程式君,王伏雄,等. 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]. 云南植物研究,1988,10(3):258-290.
- [7] 曾宋君,程式君,张京丽,等. 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究[J]. 园艺学报,1998,25(1):75-80.
- [8] 曾宋君,程式君. 石斛的试管苗快速繁殖[J]. 中药材,1996,19(10):490-491.
- [9] 张铭,朱峰,魏小勇,等. 铁皮石斛种胚萌发和原球茎质量控制[J]. 浙江大学学报:理学版,2000,27(1):75-80.
- [10] 刘瑞驹,蒙爱东,邓锡青,等. 铁皮石斛试管苗快速繁殖的研究[J]. 药学学报,1988,23(8):636-640.
- [11] 郑志仁,朱建华,李新国,等. 铁皮石斛的离体培养和快速繁殖[J]. 上

海农业学报,2008,24(1):19-23.

- [12] 蒋慧萍,虞韦花,张向军,等. 铁皮石斛种子胚培养的产业化研究[J]. 江苏农业科学,2009(2):72-75.
- [13] 刘仲健,张玉婷,王玉,等. 铁皮石斛快速繁殖的研究进展[J]. 植物科学学报,2011,20(6):763-772.
- [14] 罗冠勇,代正福,宋希强,等. 铁皮石斛的快速繁殖[J]. 热带农业工程,2010,34(3):9-11.
- [15] 何涛,淳泽,汪天杰,等. 铁皮石斛腋芽的快速繁殖[J]. 中国野生植物资源,2010,29(1):58-61.
- [16] NAYAK N R, RATH S P, SATYANARAYAN P. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium alofolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch.-Hum.) Sw., through Thidiazuron induced high frequency shoot proliferation[J]. Sci Hoit, 1997,71(3/4):243.
- [17] 王康正,高文远. 石斛属药用植物研究进展[J]. 中草药,1997,28(10):633-635.
- [18] 李进进. 铁皮石斛茎段离体初代培养研究[J]. 作物杂志,2010(1):79-80.
- [19] 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.
- [20] 陈薇,寸守铤. 铁皮石斛茎段离体快繁[J]. 植物生理学通讯,2002,38(2):145.
- [21] 张治国,刘骅,王黎,等. 铁皮石斛原球茎增殖的培养条件研究[J]. 中草药,1992,23(8):431.
- [22] 张治国,刘骅,王黎,等. 铁皮石斛原球茎分化适宜培养基研究[J]. 中国中药杂志,1993,18(1):16.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 蒋林,丁平,郑迎冬. 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.
- [26] 陈兆贵,谭俊. 不同激素配比对铁皮石斛组织培养的影响[J]. 惠州学院学报:自然科学版,2006,26(3):11-14.
- [27] 周根余,谢薇,程磊. 影响铁皮石斛原球茎生长的若干因素[J]. 江西科学,1999,17(4):231-235.
- [28] 莫昭展,贝学军,韦江萍,等. 不同培养条件对铁皮石斛原球茎增殖的影响[J]. 安徽农业科学,2007,35(22):6835-6836,7036.
- [29] 何铁光,杨丽涛,李杨瑞,等. 蔗糖对铁皮石斛原球茎生长于多糖积累的影响[J]. 安徽农业科学,2007(13):3817-3819.
- [30] 张玲,张治国. 铁皮石斛种子试管苗适宜培养基研究[J]. 浙江省医学科学院学报,1997,29(3):4-6.
- [31] 刘骅,张治国. 铁皮石斛试管苗壮苗培养基的研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(11):654-656.
- [32] 顾慧芳,忻晓君,周文婷,等. 铁皮石斛试管苗快速生长与栽培研究及多糖含量测定[J]. 中成药,1999,21(12):658-659.
- [33] 王春,郑勇平,罗曼,等. 铁皮石斛试管苗快繁体系[J]. 浙江林学院学报,2007,24(3):372-376.
- [34] 刘骅,张治国. 铁皮石斛试管苗繁殖降低成本的研究[J]. 中国现代应用药学杂志,1998,15(3):15-17.
- [35] 郑勇平,王春,俞继英,等. 铁皮石斛试管苗移栽技术[J]. 林业科技开发,2006,20(6):56-58.
- [36] 郑宽瑜,邓君浪,赵辉. 铁皮石斛试管苗栽培技术研究[J]. 云南农业科技,2010(3):21-22.
- [37] 蒙平,张向军,何新民. 铁皮石斛组培苗移栽新技术[J]. 中国热带农业,2007(4):52-53.
- [38] 朱艳,秦民坚. 促进铁皮石斛试管苗移栽成活的研究[J]. 中国野生生物资源,2004,23(3):62-63.
- [39] 冯杰,杨生超,萧凤回. 铁皮石斛人工繁殖和栽培研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(1):81-85.

(上接第 13560 页)

- [4] 何俊平,涂小云. 不同培养基配方对铁皮石斛生根培养的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):57-59.
- [5] 罗冠勇,杨冬华,符以福,等. 铁皮石斛工厂化生产成本控制探讨[J].

中国园艺文摘,2012(12):186-189.

- [6] 丁长春. 浅议铁皮石斛种苗工厂化组培生产与驯化移栽技术[J]. 文山学院学报,2012,25(6):35-41.