

铁皮石斛种子无菌萌发

汪红梅², 罗鸣^{1*}

(1. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵州省现代中药材研究所, 贵州贵阳 550006; 2. 安徽省宿松县城关中学, 安徽宿松 246500)

摘要 [目的]研究铁皮石斛种子的无菌萌发方法。[方法]以改良 MS + 土豆熟汁液 2.0% + 蔗糖 2.0% + 琼脂 0.65% + 0.1 mg/L NAA 为种子萌发培养基, 将铁皮石斛种子播种后统计萌发率。[结果]铁皮石斛种子萌发率达 90% 以上, 继代培养后组培苗生长正常。[结论]该研究建立了铁皮石斛种子的无菌萌发体系, 为铁皮石斛实生苗的大批量生产奠定了基础。

关键词 铁皮石斛; 无菌萌发; 组培苗

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2013)07 - 02850 - 02

Axenic Germination of *Dendrobium candidum* Seeds

WANG Hong-mei et al (Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Institute of Modern Chinese Medicine of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550006)

Abstract [Objective] The aim was to study the axenic germination method of *Dendrobium candidum* seeds. [Method] The improved MS + potatoes cooked juice 2.0% + sucrose 2.0% + agar 0.65% + 0.1 mg/L NAA was taken seed germination medium, and the germination rate was calculated after *D. candidum* seeds sowing. [Result] The germination rate of *D. candidum* seeds exceeded 90%, and the tissue culture seedlings could grow well after subculture. [Conclusion] The study established a sterile germination system of *D. candidum* seeds, laying the foundation for the mass production of *D. candidum* seedlings.

Key words *Dendrobium candidum*; Axenic germination; Tissue culture seedling

《中国药典》(2010 版)^[1]将铁皮石斛作为单列药材品种, 明确提出珍稀名贵药草铁皮石斛为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 的干燥茎; 每年 11 月至翌年 3 月采收, 除去杂质, 剪去部分须根, 边加热边扭成螺旋形或弹簧状, 烘干, 或切成段干燥或低温烘干, 前者习称“铁皮枫斗”, 后者习称“铁皮石斛”。铁皮石斛具有益胃生津、滋阴清热的功效, 现代医学证明其还具有增强免疫功能和抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤等作用。因此铁皮石斛药材的市场需求大, 使其市场价格不断升高。铁皮石斛产于安徽西南部以及浙江、福建、广西、贵州、云南等地, 分布于海拔可达 1 600 m 左右的山地半阴湿岩石上。每个铁皮石斛蒴果内均含有几万到十几万粒种子, 种子细如粉尘, 无胚乳, 难存活, 导致铁皮石斛自然繁殖率极低, 难以获得实生苗, 加上滥采乱挖和生境破坏, 其野生资源已濒临灭绝^[2-6]。采用铁皮石斛种子进行无菌萌发, 用组织培养方法快速大量繁殖试管苗, 是解决种苗供不应求现象的有效途径, 是进行铁皮石斛资源保护与开发利用最为现实有效的手段。笔者对此展开了研究。

1 材料与方法

1.1 材料 从安徽收集铁皮石斛蒴果, 选取成熟的蒴果进行无菌播种。培养基: 以 MS 改良培养基为基本培养基, 添加土豆煮熟汁液 2.0%, 蔗糖 2.0%, 琼脂 0.65%, 0.1 mg/L NAA, 作为种子萌发培养基, 培养基灭菌前 pH 值为 5.8。

1.2 外植体预处理 取成熟但尚未开裂的蒴果, 在流水下

冲洗干净, 吸水纸吸干水分后, 置于超净工作台上用 75% 酒精浸泡的棉球擦蒴果表皮 2 次, 再用 0.1% 升汞浸泡 5 min, 无菌水冲洗 5 次, 用吸水纸吸干蒴果表面的水分。

1.3 接种和培养 在无菌超净工作台上用解剖刀剖开蒴果, 将其中的种子均匀散布在培养基表面, 然后立即封口, 置于培养室中培养, 培养室温度为 23 ~ 25 °C, 湿度 30% ~ 50%, 光照强度 1 200 ~ 2 000 lx, 光照时间 12 h/d。

1.4 统计方法 于铁皮石斛种子萌发出苗可进行转接时, 在超净工作台上随机选取 3 瓶, 打开培养瓶, 每瓶均分成 4 份统计萌发率。

2 结果与分析

试验显示铁皮石斛种子可在以 MS 改良培养基为基本培养基, 添加土豆煮熟汁液 2.0%, 蔗糖 2.0%, 琼脂 0.65%, 0.1 mg/L NAA 的培养基中正常萌发, 且萌发率都能达 90% 以上。其中细叶石斛种子第 9 ~ 14 天即从黄色转为绿色。值得一提的是, 一些培养瓶中, 种子播撒得不均匀或太厚, 前期虽然种子都能顺利转绿萌发, 但在其原球茎生长并长出第 1 片叶子期间, 播撒得不均匀或太厚的那一部分会有一小部分出现死亡的现象, 这可能是由于种子间的竞争导致。这种现象在细叶石斛种子中发生得较多, 因此, 其萌发率从开始的 95% 下降至 92% 左右。细叶石斛在第 80 天时才长出第 1 片叶子, 第 90 天时大部分种子均长出叶子, 植株高度在 0.2 ~ 0.4 cm 之间, 基部无根毛出现, 仍为一个类似圆形的原球茎, 叶子小, 颜色为绿色(图 1)。

3 结论

铁皮石斛作为国家二级保护植物濒危中药材, 目前已很少能在市场上见到其野生植株。但由于市场需求量较大, 导致铁皮石斛的产业化种植生产也势在必行, 这就造成了铁皮石斛实生苗供不应求现象的产生。该研究采用改良 MS + 土豆熟汁液 2.0% + 蔗糖 2.0% + 琼脂 0.65% + 0.1 mg/L NAA

基金项目 黔农科院专项(院 ZX[2009]029); 贵州省农业委员会项目“贵州省中药材现代产业技术体系建设专项”(GZCYTX - 02); 黔科合院所创能([2010]4002)。

作者简介 汪红梅(1972 -), 女, 安徽宿松人, 中二级教师, 从事生物学方面的研究与教学, E-mail: 498602350@qq.com。* 通讯作者, 硕士研究生, 从事中药材研究, E-mail: 2631988998@qq.com。

收稿日期 2013-02-25

为种子萌发培养基,建立了铁皮石斛种子的无菌萌发体系, 为铁皮石斛实生苗的大批量生产奠定了基础。

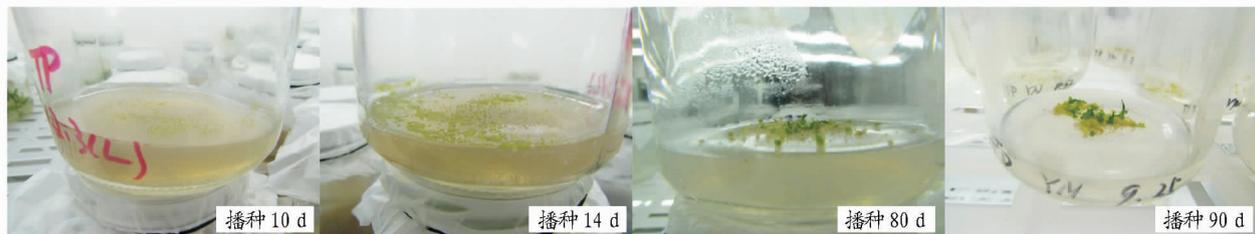


图1 铁皮石斛无菌萌发

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:265.
- [2] 王春,郑勇平,罗蔓,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.
- [3] 邵华,张玲琪,李俊,等. 铁皮石斛研究进展[J]. 中草药,2004,35(1):109-111.
- [4] 吴韵琴,斯金平. 铁皮石斛产业现状及可持续发展的探讨[J]. 中国中药杂志,2010,35(15):2033-2037.
- [5] LI Y, WANG X D, LUO P F, et al. Inoculation Effects of *Dendrobium officinale*

Mycorrhizal Fungi on Their Plantlets [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(11):1580-1584.

- [6] 唐桂香,黄福灯,周伟军. 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):1583-1586.
- [7] XI G J, ZHAO G H. Advances in the Cultivation Techniques of *Dendrobium officinale* [J]. *Medicinal Plant*, 2012, 3(5):67-70.
- [8] 曾洪学,屈兴红,董正仙. 铁皮石斛种苗繁育及设施栽培技术探讨[J]. 园艺与种苗,2012(5):46-49.

(上接第2832页)



图1 固体培养基甲烷氧化菌形态

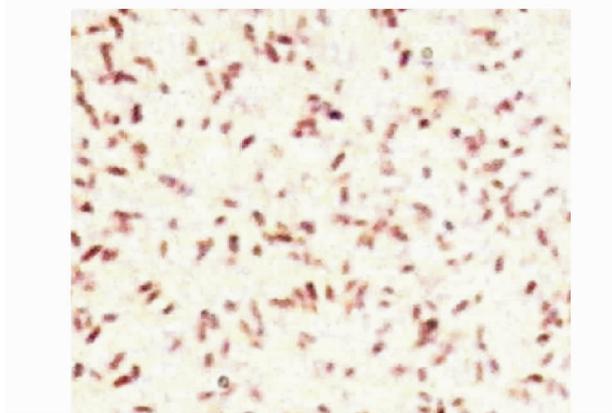


图2 甲烷氧化菌革兰氏染色

细菌以加快其生长速率。

3 结论

该研究成功地筛选出一株甲烷氧化菌。该菌属于革兰氏染色阴性菌,但是属于哪一属还有待于进一步研究。该菌株兼性以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等物质作碳源和能源,生长速率比以甲烷为碳源快速。

甲醇对甲烷氧化菌的生长速率有明显的促进作用,可用于对该菌的快速培养。甲醇促进甲烷氧化可能通过以下2种途径:甲醇作为生长底物,并产生能量;甲醇作为可连续氧化甲烷所必需的还原力的来源。这也可以用微生物二次生长现象来解释,即存在于土壤中少量的甲烷氧化菌首先利用较容易利用的碳源(甲醇)进行生长和繁殖,以达到较高的菌体数量;当甲醇消耗完以后,这些数量很多的甲烷氧化菌就可以利用甲烷为碳源继续生长和繁殖,从而表现出较强的甲烷氧化能力。所以,在某些甲烷氧化能力很弱的土壤中,可以加入适当浓度的甲醇以促进甲烷氧化。甲烷氧化菌是一种高效降解甲烷的细菌。今后,可以考虑用甲烷氧化菌清洁、有效地降解附着在煤层中的甲烷气体,为治理瓦斯气体开辟一条新的途径。

参考文献

- [1] JIANG H, CHEN Y, JIANG P X. Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 49(3):277-288.
- [2] STEPNIIEWSKA Z, SZMAGARA A, NIEWIAROWSKA M. The environmental requirements of methanotrophic bacteria inhabiting coal mine rocks [J]. *International Workshop on Management of Pollutant Emission from Landfills and Sludge*, 2008, 49(6):49-53.
- [3] CONRAD R. Soil microorganism as controllers of atmospheric trace gases (H_2 , CO, CH_4 , OCS, N_2O and NO) [J]. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(4):609-640.
- [4] 陈东科,王璐,金龙,等. 微生物降解煤矿瓦斯的研究[J]. 煤炭学报, 2006, 31(5):607-609.