

铁皮石斛的组织快繁研究

王云, 张二芹, 高婉丽, 朱佳佳, 牛荣荣 (南阳师范学院, 河南 南阳 473061)

摘要: 研究了不同培养基和不同浓度激素对铁皮石斛组织快繁愈伤组织诱导的影响。结果表明: 诱导愈伤组织时, 培养基以 N₆ 培养基对愈伤组织的诱导效果最好; 添加 6-BA, 浓度以 1.0 mg/L 诱导愈伤组织效果最好。

关键词: 铁皮石斛; 组织快繁; 愈伤组织

中图分类号: S682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-1631 (2008) 05-0069-02

Study on Tissue Rapid Culture of *Dendrobium officinale*

WANG Yun, ZHANG Er-qin, GAO Wan-li, ZHU Jia-jia, NIU Rong-rong
(Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

Abstract: The effect of different culture mediums and concentration of hormones on callus induction during the rapid propagation of *Dendrobium officinale* was conducted. Result showed that the optimal inducing medium was N₆ medium. In addition, the best effort was adding 1.0 mg/L of 6-BA into the medium among four different concentrations.

Key words: *Dendrobium officinale*; Tissue rapid culture; Callus

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 俗称铁皮枫斗, 是一种珍稀的药用植物和室内观赏植物^[1-3]。其含有石斛碱、石斛次碱和石斛宁等多种生物碱, 具有滋阴清热、生津益胃、抗肿瘤、抗衰老和扩张血管的作用^[4-6]。铁皮石斛繁殖率低, 自然条件下发芽率不足 5%^[7-9], 多年来一直靠采挖野生植株供应市场, 采集量远大于生长量, 使得野生铁皮石斛成为濒危植物^[10,11]。为使该植物得到保护和发展, 以铁皮石斛为研究材料, 其嫩叶为外植体, 对其组织培养过程中愈伤组织的诱导所需基本培养基和激素的浓度进行研究, 旨为其快速繁殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

铁皮石斛, 采自河南省西峡县伏牛山。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 在无菌室内进行培养, 培养温度 25℃, 日光灯照射, 光照强度 1500~2000 lx, 光照时数为 12 h/d。

1.2.2 不同基本培养基的配制 在 MS、N₆、B₅ 和 RM 4 种培养基中各添加 NAA 0.5 mg/L、6-BA 0.5 mg/L、蔗糖 20 g/L 和琼脂 8 g/L, 每种培养基配制 500 mL, 调节 pH 值至 5.8。分别将 500 mL 的培养基装入 100 mL 的锥形瓶中, 每瓶约装 30 mL。分装完后立即封好瓶口, 注明培养基名称、配制日期。

1.2.3 不同浓度的 6-BA 培养基的配制 在 N₆ 基本培

养基中添加 NAA 0.5 mg/L、蔗糖 20 g/L 和琼脂 8 g/L, 分别添加 6-BA 0.1、0.5、1.0、1.5 mg/L, 配制 4 种激素浓度的培养基, 每个浓度配 500 mL, 调节 pH 值至 5.8, 装入 100 mL 的锥形瓶中, 每瓶约装 30 mL, 然后封口、标明浓度和日期。

1.2.4 培养基灭菌 把培养基及其他需灭菌的用具 (用牛皮纸包扎好的剪刀、镊子、解剖刀、培养皿) 和蒸馏水, 进行灭菌。

1.2.5 接种外植体

1.2.5.1 不同基本培养基接种外植体。接种前, 将铁皮石斛嫩叶用自来水冲洗干净, 将试验将要用到的解剖刀、剪刀、镊子和培养皿等先放入超净工作台, 打开紫外灯照射 20 min。20 min 后携带外植体进入无菌室, 用 75% 的乙醇擦拭超净工作台面、双手及接种工具。金属接种工具每次使用前都要在酒精灯上灼烧灭菌。先用 75% 的乙醇对铁皮石斛嫩叶进行表面消毒, 再用 0.1% 的 HgCl₂ 灭菌 5~8 min, 用无菌水冲洗 3 次。重复进行 3 次, 将已灭菌的石斛嫩叶, 在无菌条件下切成 3 mm²。每种培养基接种 5 瓶, 每瓶接种 4 个嫩叶小块, 接种后标明接种时间。

1.2.5.2 不同浓度的 6-BA 培养基接种外植体。接种前的准备工作同“1.2.5.1”, 而后在超净工作台上, 每个浓度的培养基接种 5 瓶, 每瓶接种 4 个嫩叶小块, 以叶的背面接触培养基, 接种后标明接种时间。

观察愈伤组织诱导情况。

2 结果与分析

2.1 4 种基本培养基对铁皮石斛愈伤组织诱导的影响

试验表明, 接种 8 d 后, 在 N₆ 培养基上培养的嫩叶开始出现愈伤组织; 接种 9 d 后, 在 B₅ 培养基上培养的

收稿日期: 2008-01-24

基金项目: 南阳师范学院项目 (nytc200405)

作者简介: 王云 (1979-), 女, 河南社旗人, 讲师, 从事生态学方面的教研工作。

嫩叶开始出现愈伤组织；接种 11 d 后，在 MS 和 RM 培养基上培养的嫩叶才开始出现愈伤组织。接种 21 d 后，不同基本培养基对铁皮石斛愈伤组织的诱导结果见表 1。由表 1 可知，4 种基本培养基对铁皮石斛愈伤组织诱导率不同，用 N₆ 培养基对铁皮石斛的愈伤组织诱导效果最好，其次是 B₅ 培养基。用这 2 种培养基培养的铁皮石斛嫩叶，诱导出愈伤组织所需的时间相对短，而且诱导出的愈伤组织数目相对多，健壮度也较好。

表 1 4 种培养基对铁皮石斛愈伤组织诱导的影响
Table 1 Effect of four medium on the callus induction of *D. officinale*

培养基种类	外植体数 (个)			诱导率 (%)
	接种体数	愈伤组织数	污染数	
N ₆	20	15	4	75
B ₅	20	14	3	70
MS	20	12	5	60
RM	20	9	3	45

2.2 不同浓度的 6-BA 对铁皮石斛愈伤组织诱导的影响

试验发现，接种 8 d 后，6-BA 浓度为 1.0 mg/L 的培养基上培养的嫩叶开始出现愈伤组织；接种 9 d 后，6-BA 浓度为 0.5 mg/L 的培养基上培养的嫩叶开始出现愈伤组织；接种 10 d 后，6-BA 浓度为 1.5 和 0.1 mg/L 的培养基上培养的嫩叶出现愈伤组织。接种 21 d 后，不同浓度的 6-BA 对铁皮石斛愈伤组织的诱导效果不同 (表 2)，6-BA 浓度为 1.0 和 0.5 mg/L 的培养基上培养出的愈伤组织数量多，而且健壮度较好，诱导所需的时间相对较短，其中，6-BA 浓度为 1.0 mg/L 的培养基诱导效果最好；6-BA 浓度为 1.5 和 0.1 mg/L 的培养基上培养出愈伤组织数量少，而且健壮度差。

表 2 不同浓度的 6-BA 对铁皮石斛愈伤组织诱导的影响
Table 2 Effect of different concentrations 6-BA on the callus induction of *D. officinale*

浓度 (mg/L)	外植体数 (个)			诱导率 (%)
	接种体数	愈伤组织数	污染数	
0.1	20	10	4	50
0.5	20	14	3	70
1.0	20	15	4	75
1.5	20	7	5	40

3 小结

比较 4 种培养基配方，可以看出 B₅ 和 N₆ 培养基的

成分相似，各成分浓度也相似，MS 和 RM 培养基的成分和无机盐浓度相似。由于植物的幼嫩部位进行生命活动需要较多的钾离子，当钾离子充足时，能促进植物幼嫩部位生长和增强植物的健壮度，而 B₅ 和 N₆ 培养基都以钾离子作为主要的阳离子，因此愈伤组织的诱导效果较好。MS 和 RM 培养基含有的氨盐浓度相对高，该营养成分可能对培养物的生长有抑制作用，特别是浓度高时，其抑制作用更强，导致用 MS 和 RM 培养基培养铁皮石斛嫩叶时，诱导的愈伤组织效果不好。

总之，铁皮石斛的嫩叶作为组织快繁的外植体是可行的，其具体操作技术还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 吉占和. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 85-88.
- [2] 徐建华, 陈立钻. 铁皮石斛与西洋参的养阴生津作用研究 [J]. 中草药, 1995, 26 (2): 79-80.
- [3] 周根余, 谢薇. 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.
- [4] 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, 7011.
- [5] 马国祥, 徐国钧, 徐璐珊. 鼓锥石斛及化学成分的抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药科大学学报, 1994 (3): 188-189.
- [6] 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, 2005, 26 (3): 66-69.
- [7] 张明, 夏鸿西. 石斛组织培养研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25 (6): 323-326.
- [8] 张建勇, 刘涛, 袁佐清. 石斛属植物组织培养及遗传转化研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (3): 656-657, 670.
- [9] 傅玉兰, 谷风, 胡传明, 等. 霍山石斛组培快繁技术研究 [J]. 安徽农业科学, 2004, 32 (3): 522-523.
- [10] Razdan M K. The threatened wild plants used for medicine [J]. Biodiversity, 2002, 25 (3): 12-19.
- [11] 傅玉兰, 张志平, 姚萍. 春石斛组培快繁技术研究 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34 (3): 464-465.

参考文献著录格式

期刊: 作者. 题名 [J]. 刊名 (外文刊名可缩写, 不加缩写点), 出版年份, 卷号 (期号): 起页一止页.

专著: 作者. 书名版本 (第一版不写) [M]. 出版地: 出版者, 出版年. 起页一止页.

论文集: 作者. 题名 [A]. 论文集编者. 论文集名 [C]. 出版地: 出版者, 出版年. 起页一止页.

学位论文: 作者. 题名 [D]. 保存地点: 保存单位, 年份.