

⑥
35-39

石斛试管苗快速繁殖研究概况

Review on the Rapid Propagation of In Vitro Seedlings of *Dendrobium*

S567.53

蒙爱东
Meng Aidong

(广西药用植物园 南宁 530023)
(Guangxi Botanical Garden of Medicinal, Nanning, 530023)

A **摘要** 简述20年来石斛试管苗在组织培养技术、培养条件、原球茎增殖、幼苗分化与生长、试管苗移栽等方面的研究情况。认为,以石斛成熟种子和分生组织为材料进行无菌培养,可极大节省常规方法所要求的时间和空间,在短时间内能大量繁殖苗,试管苗移植成活率达60%以上。但由试管苗育成的植株其成分含量有无变化,能否代替药材使用,以及变异的控制方法尚需进一步研究。

关键词 石斛 试管苗 组织培养 快速繁殖

中药, 兰科

Abstract The past 20 years of studies on the rapid propagation of in vitro seedling of *Dendrobium* are reviewed in the aspects of tissue culture technique, culture condition, proto-corm multiplying, young plant differentiation and growth, in vitro seedlings transplantation. Culturing riped seed and differentiated tissue can extremely save time and space from the normal method, and produce a great number of plants in a short time. Over 60% of in vitro seedlings transplanted can grow well. Whether the plants derived from tissue culture has steady components and can substitute for medicinal materials as well as their variation control method also need to be further studied.

Key words *Dendrobium*, in vitro seedlings, tissue culture, rapid propagation

石斛为常用中药,是兰科石斛属多种植物的新鲜或干燥茎,《神农本草经》上列为上品。有生津益胃、清热养阴的功能。治热病伤津、口干烦渴、病后虚热、阴伤目暗等^[1]。主产广西、云南、贵州、四川等省区。野生状态下,在有充足散射光的深山老林中,附生在阴凉潮湿的树干和岩石上,生长极为缓慢。其种子橄榄形,黄色粉末状,非常细小,仅由一个简单的胚及单层细胞的翅状种皮构成,无胚乳^[2,3]。在自然状态下,极少萌发成苗。通常以分株繁殖,繁

1996-06-24 收稿。

殖系数极低。

自 Knudson^[5] (1930年) 用 *Laelia cattleya* 杂种兰种子通过无菌培养, 使其萌芽长成植株; Morel^[6] (1960年) 培养兰属 (*Cymbidium*) 的茎尖分生组织诱导形成原球茎并分化成苗, 建立了兰花快速繁殖无性系的有效方法后, 我国学者为解决石斛属 (*Dendrobium*) 种苗问题, 从70年代后期开始, 进行石斛试管苗快速繁殖的研究, 到目前为止已建立起原球茎无性系, 大量生产试管苗, 并移栽成活。本文从组织培养技术、培养条件、原球茎增殖、幼苗分化与生长、试管苗移栽等方面, 简述近20年来石斛试管苗快速繁殖研究的概况。

1 组织培养技术

石斛的组织培养主要以种子无菌培养、分生组织培养两种方法进行。

1.1 种子无菌培养

石斛种子在完全培养基上, 不需另加外源激素就极易萌发^[2,3,6,7], 这与其他附生兰植物相似^[8,9]。

把还没开裂, 但种胚已成熟的石斛蒴果进行表面消毒, 先用70%乙醇擦洗1 min~2 min, 再用10%的次氯酸钙上清液或2%的过氧乙酸、5%安替福民等浸泡20 min后, 无菌水冲洗3次。在无菌超净工作台上切开果皮, 把粉末状的种子撒在已灭菌的培养基表面。

石斛种子培养1周后由黄变绿, 1个月后种胚突破种皮, 长成顶端有绿色叶原基, 球体基部有丝状毛的原球茎。这时原球茎的体积已是原胚体的7倍左右^[2,3]。

未成熟种子在培养基上播种后也可萌发, 但萌发率较成熟种子低, 有败育现象^[10]。

1.2 分生组织培养

用石斛嫩枝茎尖作为外植体进行培养, 可得到许多新枝芽。杨其光^[11]取老茎上当年萌生的嫩枝, 经常规消毒后切取0.1 cm~0.2 cm长的茎尖, 接种于KC+NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L培养基上, 培养约2个月长成1 cm~2 cm长的新枝, 而且在新的茎尖上又可以形成芽, 发展成新的分枝。

石斛腋芽再生能力强, 在快速繁殖中, 由于腋芽来源方便、广泛, 充分利用带芽的茎切段为外植体培养, 具有更大的优势。带芽的茎切段外植体可以从野生小苗, 经常规消毒得到, 也可以用无菌苗为材料^[12,13]。在无菌条件下, 将无菌的节段切成0.3 cm~0.5 cm长、带一个芽的小段, 插入培养基中。培养基用MS、W、RM附加NAA 0.05 mg/L~2 mg/L、6-BA 0.2 mg/L~1 mg/L、椰子乳等。茎切段培养2个月后, 在节部的潜伏芽开始萌动, 出现小芽点。约1个月小芽伸长, 长成小植株。当植株有4~5片叶展开时, 可再进行新植株的茎段切割培养, 即可达到扩大繁殖的目的。

从茎尖或节段培养得到的小苗, 大多数是无根小苗, 需转入1/2MS加马铃薯进行生根和壮苗培养, 才能出管移栽。

2 培养条件

光照10 h/d, 光照度为2 000 lx, 温度以25℃±2℃为宜。石斛种子萌发需要较高温度^[9,10], 在25℃以上萌发生长较快, 当温度低于10℃时, 即使满足营养条件也不能萌发。温度对原球茎的生长也产生影响, 在20℃~25℃时原球茎增殖较好, 温度超过25℃原球茎就开始分化成苗。

石斛采用蔗糖浓度2%~3%、pH值5.4~6.0固体培养基培养。培养基常用MS、1/2MS、KC (Knudson)、W (white)、VW (Vacin and Went)、RM; 激素种类有NAA、BA; 附加物为马铃薯、椰子乳、香蕉等。在进行石斛培养时, 要根据培养材料与培养目的物的不同, 选用不同的培养基、激素和附加物种类, 如表1所示。

表1 石斛培养常用培养基及激素与附加物

培养材料	培养基及激素与附加物	培养目的物
种 子	1/2MS 添加 NAA、BA	原 球 茎
	KC	原 球 茎
	1/2MS	原 球 茎、苗
	1/2MS 添加马铃薯提取液	苗
	KC 添加香蕉提取液	苗
	改进 MS	苗
茎 尖	KC 添加 NAA、BA	苗
茎 节 段	MS 添加 NAA、BA	苗
	W 添加 NAA、BA、椰子乳	苗
	RM 添加 NAA、BA	苗
原 球 茎	MS、1/2MS、VW、KC 添加马铃薯提取液	苗
	1/2MS 添加香蕉、BA、NAA	原 球 茎
小 苗	1/2MS 添加马铃薯提取液	苗

3 原球茎增殖

石斛原球茎极易增殖。在我们试验中, 把一小块原球茎放在1/2MS培养基上培养1个月, 就能产生许多新的原球茎, 增殖率为4倍以上。

原球茎必须定时转接, 继代培养时间过长, 会白化而死。当继代次数较多, 原球茎个体变小时, 应进行原球茎复壮工作。用1/2MS加马铃薯培养基继代培养1~2次, 可达到复壮目的。在较低温度时(20℃以下)原球茎增殖缓慢, 可用低温方式保存原球茎。

石斛原球茎可以不断分割, 不断增殖, 如此重复可达到大量繁殖的效果。

4 幼苗分化与生长

4.1 幼苗分化

增殖的原球茎要分化成苗, 受基本培养基、天然提取物和植物激素的影响^[15]。用VW、N6、B5、KC、MS、1/2MS等6种培养基培养原球茎, 均分化小苗, 但以1/2MS培养基分化率最高, 分化出的小苗叶色浓绿, 生长整齐。在培养基中添加马铃薯提取液, 能促进原球茎分化。植物激素对植物组织培养中器官的分化和发育起着重要的调控作用。石斛原球茎在前期分化(40d)和后期生长60d需要不同的BA和NAA浓度组合。在分化前期BA 2 mg/L和NAA

0.2 mg/L 加快原球茎分化;在后期生长中,BA 0.2 mg/L 和 NAA 2 mg/L 促进小苗生长。因此在进行原球茎分化成苗培养中,必须及时更换不同的植物激素。

石斛原球茎极易分化成苗。在我们试验中,已经继代培养5年的原球茎,用1/2MS加马铃薯提取液培养基培养,能正常分化成苗。

4.2 幼苗生长

幼苗用MS培养基比用KC培养基培养生长好^[10]。NAA、香蕉和马铃薯提取液能促进根系生长,从而使苗的生长加快。为促进幼苗生长,培养基中需添加较高浓度的NAA、香蕉或马铃薯提取液^[2,15]。试验中我们常采用MS、1/2MS为基本培养基,添加马铃薯提取液和NAA培养幼苗。

幼苗必须在试管中充分生长,达到一定大小才能出管移栽,这即为壮苗培养。在这个阶段中,为使幼苗各种代谢机能比较稳定,所应用培养基应该以比较简单为宜,而且培养基离子浓度不能太高,离子浓度太高幼苗生长停止或畸形,成为僵苗或畸形苗。试验中,我们自行选配了A、Q简化培养基,这两种培养基组成成分较少,配制方便快捷,小苗在这两种培养基上生长良好。因此用A、Q简化培养基可以替代成分复杂的MS、KC培养基进行幼苗培养^[16]。

壮苗培养3~6个月,幼苗需转接2~4次。为避免出现玻璃苗,继代培养时间不宜太长。当小苗长至5cm高,即能出管移栽。

5 试管苗移栽

当幼苗在试管中长到3cm~5cm高时,即可出管。为使试管苗移栽后适应自然环境,移栽前要先揭开瓶塞放在室内自然光下炼苗7d~10d,以提高小苗的抗性。出管取苗要小心操作,不能拆断根部。从试管取出的苗须洗净附着在其根部的琼脂,然后3~5株一丛种植。石斛苗具有群体抗性作用,丛栽比单株栽培效果好^[17]。春季气温逐渐回升,有利试管苗适应自然环境,最宜移栽试管苗^[18]。

石斛试管苗可直接栽在树干或岩石上,也可以盆栽。在阴凉潮湿、长有苔藓的树干和岩石上,栽种石斛苗成活率高。盆栽选用吸水石、砂岩、片麻岩等作基质,然后覆上苔藓或青杠树树皮粉进行栽种,效果较好^[19,20]。试管苗栽后宜放在荫棚内,荫蔽度要求60%~80%。石斛喜湿润,怕积水。积水会使根茎腐烂,叶片脱落而死。当移栽苗根伸长后,每月用MS大量元素1000倍稀释液喷施追肥,促进生长发育。

综上所述,近20年来对石斛试管苗的繁殖作了较系统的研究,以石斛的成熟种子和分生组织为材料进行无菌培养,可极大地节省常规方法所要求的时间和空间,在短时间内能大量繁殖苗,解决了种苗问题,对试管苗移栽也作了初步研究,移栽成活率达60%以上。

石斛作为一种常用中药,其所含的成分有一定要求,而试管苗在繁殖中由于激素或其他因素作用,可能产生变异,这种变异在培养中往往不易辨认,因此试管苗栽培得到的植株,其成分含量有无变化,能否代替药材使用,以及变异的控制方法等,还有待进一步研究。

参考文献

- 1 江苏医学院编. 中药大辞典(上册). 上海:上海人民出版社,1977. 586~590.
- 2 刘瑞驹等. 铁皮石斛试管苗快速繁殖研究. 药学学报,1988,23(8):636~640.

5. 反
- 3 徐云鹏等. 霍山石斛种子的萌发和试管苗的培养. 安徽农学院学报, 1984, (1): 48~52.
 - 4 Knudso L. Flower production by orchidgrown non-symbiotically. Bot. Gaz., 1989, (2): 192~199.
 - 5 Merel G M., Producing virus-free cymbidium. Amss Orchid Soc Bull. 1960, 29: 495~497.
 - 6 胡 忠等. 黑节草种苗的大量繁殖. 植物杂志, 1979, (3): 6~7.
 - 7 何静波等. 黑节草原胚体的繁殖. 云南植物研究, 1982, 4 (2): 211~212.
 - 8 吴应祥. 兰花的种子繁殖. 植物引种驯化集刊 1966, (2): 117.
 - 9 段全玉等. 在无菌条件下, 激素和种子处理对兰属十种植物种子萌发的影响. 云南植物研究, 1982, 4: 197.
 - 10 徐云鹏等. 霍山石斛种子试管苗的培养. 植物生理学通讯, 1984, (4): 35.
 - 11 杨其光. 霍山石斛嫩枝茎尖离体培养成苗. 植物生理学通讯, 1986, (2): 36.
 - 12 周月坤等. 兰花苗端和茎节离体培养. 植物学集刊, 1983, (1): 119~122.
 - 13 左春芬. 黑节草的组织培养. 植物生理学通讯, 1985, (4): 35.
 - 14 石友亭等. 金钗石斛组织培养初步研究. 河南中医, 1987, (增刊): 69.
 - 15 张治国等. 铁皮石斛原球茎分化适宜培养基的研究. 中国中药杂志, 1993, 18 (1): 16~19.
 - 16 邓锡青等. 铁皮石斛试管苗快速繁殖和栽培研究 I: 培养基简化和培养技术的改进. 中国药学会成立八十周年论文汇编, 1987.
 - 17 屈济逸等. 铁皮石斛试管苗移栽技术与栽培管理. 广西医学论文选编, 1994, (4): 903~906.
 - 18 徐云鹏等. 霍山石斛种子试管苗的栽培. 安徽农学院学报, 1985, 1: 1~4.
 - 19 蒙爱东等. 铁皮石斛试管苗快速繁殖和栽培的研究 V: 基质、容器、苗龄和季节对移栽的影响. 中国药学会西南五省区中药、天然药及民族药第八次学术会议广西论文汇编, 1993: 67~74.
 - 20 石友亭等. 曲茎石斛放养研究. 中国中药杂志, 1995, 20 (3): 149~150.

✓ 珍宝密醋开发成功

一种新型醋酸保健饮品珍宝密醋, 最近由广西科学院新技术研究开发中心开发成功。珍宝密醋以糯米香醋、菠萝香醋、珍珠层粉、桂圆密等为原料, 根据人体生理需要组方, 经现代科学技术精制而成, 它除含主成分酿造醋之外, 还含有多种氨基酸、葡萄糖、柠檬酸和乳酸, 以及人体所需的钙、铁、锌等微量元素, 故食用后可消除疲劳, 帮助消化, 增进健康。

(柯 兴)