



研究报告

Research Report

铁皮石斛液体振荡培养的形态学观察

李志英[✉], 徐立[✉]

中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室, 儋州, 571737

[✉] 通讯作者: xlzy@263.net; [✉] 作者

植物药与药理学杂志, 2014 年, 第 3 卷, 第 5 篇

收稿日期: 2014 年 2 月 6 日

接受日期: 2014 年 2 月 17 日

发表日期: 2014 年 2 月 27 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2014 年第 33 卷第 2 期 382-385 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

李志英, 徐立, 2014, 铁皮石斛液体振荡培养的形态学观察, 基因组学与应用生物学, 33(2): 382-385 ([10.13417/j.gab.033.000382](https://doi.org/10.13417/j.gab.033.000382))

引用格式(英文):

Li Z.Y., and Xu L., 2014, Investigation of Morphological Characteristics during Liquid Oscillation Propagation of *Dendrobium officinale*, Genomics and Applied Biology, 33(2): 382-385 ([10.13417/j.gab.033.000382](https://doi.org/10.13417/j.gab.033.000382))

摘要 铁皮石斛作为传统的中药材一直被广泛应用。由于铁皮石斛的种子直接萌发非常困难, 无菌播种就成为铁皮石斛种苗繁育的主要方法, 但不能完全保持母本优良特性。本研究以铁皮石斛茎段无菌腋芽诱导出的类原球茎体(PLBs)为外植体, 建立了其液体快速培养技术体系。该体系利用 MS+BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基, 液体振荡培养初期, 增殖量为 10%~15% (鲜重比), 2 个月后增殖量为 30%~50%。PLBs 最初乳白色, 后转变为半透明浅绿色, 多数成团, 少量为单个; 3~4 个月, 部分 PLBs 顶部变尖, 开始萌发。转接到 MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L 固体培养基上 PLBs 转为不透明的绿色, 并萌发出芽, 再转接到 MS+NAA 0.1 mg/L+香蕉 100 g/L 固体培养基上壮苗生根, 形成健壮的完整植株。该结果可为多种兰花种苗的快速繁育提供直观的参考。

关键词 铁皮石斛, 类原球茎体, 液体振荡

Investigation of Morphological Characteristics during Liquid Oscillation Propagation of *Dendrobium officinale*

Li Zhiying[✉], Xu Li[✉]

Institute of Tropical Crop Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences; Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Danzhou, 571737

[✉] Corresponding author, xlzy@263.net; [✉] Authors

Abstract *D. officinale* was widely used as traditional Chinese medicinal materials in China. Because the seeds of *D. officinale* were very difficult to germinating, tissue culture turn to the main propagations methods. Due to hybridization, this method could not keep the characters of the mother plants completely. In this study, we used the protocorm-like bodies (PLBs) induced from in vitro shoot axillary buds of *D. officinale* as explants and established the liquid oscillations rapid propagation system. In this system, the liquid medium was MS+BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The PLBs proliferation rate was 10%~15% during 2 months and increased to 30%~50% after 2 months. The PLBs were first oyster white and then turned to reseda and semitransparent. The cluster of PLBs began to germinate after 3~4 months. These PLBs were transplanted to solid medium MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L and the semitransparent PLBs turned to non-transparent green. After the PLBs germinated and developed to shoots, they were transplanted to solid medium MS+NAA 0.1 mg/L+banana 100 g/L to induced to rooting and forming whole seedlings. These results supplied visual reference for rapid propagation of orchids.

Keywords *D. officinale*, Protocorm-like bodies, Liquid oscillation culture

铁皮石斛为兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)的一种药用植物。铁皮石斛的茎经加工炮制, 边炒边扭成螺旋形称为铁皮枫斗, 味淡微咸, 不寒凉, 有生津益胃, 养阴清热除烦的功能。可治口干烦渴, 病后虚热或阴虚眼目不明, 老年人体虚津液不足等。铁皮石斛在民间有“神仙草”之称, 被《道藏》列为“中华九大仙草”(铁皮石斛, 天山雪莲, 三两重人参, 一百二十年首乌, 花甲之茯苓, 苁蓉, 深山灵芝, 海底珍珠, 冬虫夏草)之首。

铁皮石斛具有兰科植物的通用特性, 其种子微小如同灰尘, 因为没有胚乳, 无法像别的植物种子那样靠自身储存的营养生长, 必须在有兰根菌的环境中才能正常发芽生长成兰花(兰根菌为兰花幼苗提供养分)(Mohammad et al., 2013; Tan et al., 2014)。因此, 兰花播种难度大, 一般不作为种苗繁育的主要方法。而分株繁



育速度太慢, 不能满足市场需求。因此, 组织培养技术成为铁皮石斛种苗生产的主要途径。目前, 铁皮石斛组培苗生产技术已经非常成熟, 常用的生产铁皮石斛的组培方法, 是利用无菌播种来实现的(唐桂香等, 2005; 杨柳平等, 2012)。无菌播种利用的外植体是铁皮石斛的种子, 借助了石斛种子数量巨大的特点, 可直接获得大量种苗, 成本低, 速度快, 但不能完全保持母本的优良特性。因此, 探索铁皮石斛营养器官诱导出的类原球茎体(protocorm-like bodies, PLBs)的快速繁殖成为铁皮石斛产业化的关键。液体培养周期短, 比同样的固体培养速度快, 为铁皮石斛 PLBs 的快速繁殖提供了有利条件, 其培养条件都已经比较成熟(宋经元等, 2004; 韩晓红等, 2010)。但对于没有接触过铁皮石斛或其它兰花培养的业者而言, 由于不同兰花培养的条件不完全相同, 在何种状态时调整培养基配方转入下一阶段还是较难判断的。为此, 本研究展示了以铁皮石斛类原球茎体液体振荡培养过程中的形态学变化, 为铁皮石斛的工厂化生产和其它兰科植物的离体繁育技术控制提供了实用的参考。

1 结果与分析

1.1 类原球茎体的诱导

铁皮石斛茎段侧芽萌发形成的无菌苗, 切段后, 在 M2 培养基中培养 2~3 个月, 可诱导出浅色的类原球茎体(图 1 A)。这些 PLBs 与种子直接诱导的原球茎体不同的是, 其形状不太规则, 颜色发白, 没有毛状体。

1.2 液体培养体系的建立

将诱导获得的白色的 PLBs 转入培养基 M3 进行液体振荡培养, 在初期(1 个月内)振荡培养过程中, 类原球茎体主要以白色 PLBs 的状态进行增殖(图 1 B), 增殖量为 10%~15% (重量比)/10 d。

1.3 类原球茎体液体培养快速繁殖

液体振荡培养 1 个月后, PLBs 的增殖速度逐渐加快, 2 个月后, 可达到 30%~50%/15 d(重量比)的增殖速率。培养 2 个月后, 每 250 mL 三角瓶中的 PLBs 可达 200 mL, 各培养周期结束时, 瓶内添加的 200 mL 的液体培养基几乎没有剩余(图 1 C)。PLBs 多数簇生, 少量单个, 浅绿色半透明状, 并不断增生新的 PLBs。培养 2 个月后, 随着每瓶数量的增加, 部分 PLBs 开始出现萌发状态, 顶部变尖, 这类外植体肉眼可分辨(图 1 D~1 F)。此类 PLBs 应转移到萌发培养基进行萌发培养。

1.4 PLBs 的萌发、壮苗及生根

PLBs 在萌发培养基上培养 2 个月后, 由半透明状转为不透明的绿色, 第一片叶萌出。转接到壮苗培养基上, 萌发出第二叶片后, 进而转接到生根培养基进行生根培养(图 1 G~1 J)。

1.5 炼苗及移栽

无菌生根苗丛中有芽高 2 cm 以上, 根长 1~2 cm 时, 即可转入大棚炼苗。5 d 后, 清洗掉根部的培养基, 移栽到湿润的基质上, 遮阴保湿, 移栽成活率 90% 以上(图 1 K)。



图 1 铁皮石斛液体振荡培养 PLBs 发育过程图

注: A: 利用茎段诱导 PLBs; B: 液体振荡培养初期, 示白色 PLBs; C: 液体振荡培养中后期, 示三角瓶内 PLBs 增殖状态; D~G: 液体振荡培养后期下 PLBs 发育过程; PLBs 迅速增殖, 透明度减小, PLBs 出现萌发迹象, 线段代表 2 mm; H: PLBs 平铺在固体培养基上诱导 PLBs 萌发; I~K: PLBs 萌发过程及在瓶内生长状况, 线段代表 5 mm; L: 铁皮石斛移栽成活情况

Figure 1 Development of PLBs during liquid oscillation culture of *D. officinale*



Note: A: PLBs induced from shoot fragment; B: White PLBs during initial stage of liquid culture; C: Rapid propagations of PLBs during late liquid culture stage; D~G: Developmental process of PLBs in late liquid culture stage, bars mean 2 mm; The PLBs propagated rapidly and the transparency decreased; The PLBs began to germinating; H: PLBs transplanted on solid medium; I~K: Germination of PLBs; Bars mean 5 mm; L: Transplanting of *D. officinale*

2 讨论

大量的研究报道和生产实践表明, 由种胚获得的 PLBs 可以在固体培养基上增殖并发育成植株(唐桂香等, 2005; 杨柳平等, 2012), 利用液体悬浮培养进一步提高了 PLBs 的增殖速率(宋经元等, 2004; 韩晓红等, 2010)。液体悬浮培养, 可以使 PLBs 充分接触到培养基, 并有充足的空气, 因此 PLBs 的增殖迅速, 增殖系数明显高于同样成分的固体培养基。用于铁皮石斛的种苗生产, 可节省大量的人力。但 PLBs 在液体培养基中的培养时间可能会影响 PLBs 的变异率(苏钦和张晓南, 2009), 因此需要在适当的时期转至固体培养基上进行成苗诱导。本研究展示了铁皮石斛 PLBs 液体培养过程中各个阶段的 PLBs 的形态特征, 明确了 PLBs 转入固体培养基上的较佳时期。由于不同铁皮石斛种质、不同兰花种类的 PLBs 的繁殖速度不同, 因此, 以时间为标准确定该时期, 具有较大的误差, 影响繁殖进程。所以, 以 PLBs 的形态特征为标准进行培养基的更换, 对各种兰花 PLBs 的培养有更实用的参考价值。

3 材料与方法

3.1 材料

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)茎段。

3.2 方法

3.2.1 外植体消毒

取铁皮石斛落叶的茎段, 于工作台上清理膜质化的茎皮, 切成 2 cm 左右的段, 用 0.1% HgCl₂ (加吐温-80) 消毒 8 min, 期间不断摇动。然后用无菌水冲洗 4 次, 每次 2 min, 无菌纸吸干水分, 切成带一腋芽的茎段, 基部插入芽诱导培养基中(M1: MS 基部培养基+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+香蕉 70 g/L+卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8)。

3.2.2 PLBs 的诱导

萌发的无菌苗切段后, 接入 PLBs 诱导培养基(M2: MS 基部培养基+BA 10.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8), 获得白色的 PLBs。

3.2.3 液体振荡培养

将白色的 PLBs 2~5 g 转入液体培养基(M3:MS 基部培养基+BA2 mg/L+NAA0.1 mg/L, pH 5.8) (50 mL 三角瓶, 25 mL 培养基), 在 150 r/min, (26±1)°C 条件下培养 1 个月, 每 10 d 继代 1 次。然后继续利用培养基 M3 (250mL 三角瓶, 150~200mL 培养基)在 200 r/min, (26±1)°C 培养 2 个月, 每 15 d 继代 1 次, 获得大量的 PLBs。

3.2.4 PLBs 萌发成苗

将 PLBs 平铺在芽诱导培养基(M4:MS 基部培养基+BA0.2mg/L+NAA0.05mg/L+卡拉胶 6.5 g/L, pH5.8)培养 2 个月后, PLBs 初步萌发, 然后分丛转入壮苗培养基(M5: MS 基部培养基+BA 1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L+椰子乳 100 mL/L+卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8)培养 4 个月, 期间继代 1 次, 并根据苗量分瓶。

3.2.5 生根及移栽

取带有 2~5 个不定芽的芽丛, 转入生根培养基(M6: 1/2MS 基部培养基+NAA0.1 mg/L+香蕉 100 g/L,pH 5.8), 培养成健壮的生根苗。待根长 1 cm 时, 即转入大棚炼苗, 5 d 后, 移入湿润栽培基质(椰糠: 河沙:园田土:花生壳=2:1:1:1), 用 500 倍甲基托布津淋透, 然后遮阴保湿 15 d 以上, 带新根发出后, 逐渐去除遮盖物。

致谢

感谢本课题组黄碧兰副研究员、李克烈副研究员及其它同事在工作上的支持。本研究由农业部物种资源保护项目(14RZZY-42)资助。



参考文献

- Han X.H., Duan C.H., Yan H.J., Zhu X.Y., and Bai S., 2010, Research advanced on the protocorm liquid suspension culture of *Dendrobium candidum*, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agri. Sci.)*, 38(20): 10570-10572 (韩晓红, 段春红, 阎贺静, 朱雪云, 白松, 2010, 铁皮石斛原球茎液体悬浮培养研究进展, *安徽农业科学*, 38(20): 10570-10572)
- Mohammad M.H., Parveen R., Arvind G., Madhu S., 2013, Improved ex vitro survival of asymbiotically raised seedlings of *Cymbidium* using mycorrhizal fungi isolated from distant orchid taxa, *Scientia Horticulturae*, 159: 109-112
- Song J.Y., Guo S.X., and Xiao P.G., 2004, Suspension culture of protocorm in *Dendrobium candidum*, *Zhongcaoyao (Chinese Traditional and Herbal Drugs)*, 09: 87-91 (宋经元, 郭顺星, 肖培根, 2004, 铁皮石斛原球茎液体悬浮培养的研究, *中草药*, 09: 87-91)
- Su T., and Zhang X.N., 2009, Study on the induction and proliferation of protocorm in *Dendrobium officinale* by suspension culture, *Zhongguo Yesheng Zhiwu Ziyuan (Chinese Wild Plant Resources)*, 28(4): 54-56 (苏钰, 张晓南, 2009, 液体悬浮培养促进铁皮石斛原球茎高效诱导、增殖的研究, *中国野生植物资源*, 28(4): 54-56)
- Tan X.M., Wang C.L., Chen X.M., Zhou Y.Q., Wang Y.Q., Luo A.X., Liu Z.H., and Guo S.X., 2014, In vitro seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.), *Scientia Horticulturae*, 165(22): 62-68
- Tang G.X., Huang F.D., and Zhou W.J., 2005, Studies on the seed embryo germination and propagation of *Dendrobium candidum* in vitro, *Zhongguo Zhongyao Zazhi (China Journal of Chinese Materia Medica)*, 20: 23-26 (唐桂香, 黄福灯, 周伟军, 2005, 铁皮石斛的种胚萌发及其离体繁殖研究, *中国中药杂志*, 20: 23-26)
- Yang L.P., Liu C.Q., Zhao R.F., Zhang Z.Z., Zhu W.Z., and Dai W.L., 2012, Study on tissue culture and rapid propagation system of PLB induction by seeds of *Dendrobium candidum*, *Guangdong Nongye Kexue (Guangdong Agricultural Sci.)*, 07: 54-57 (杨柳平, 刘畅庆, 赵仁发, 张在忠, 朱伟宗, 戴伟林, 2012, 铁皮石斛种子诱导原球茎组培快繁体系的研究, *广东农业科学*, 07: 54-57)