

福建铁皮石斛人工繁育技术研究

林江波, 戴艺民, 邹 晖, 王伟英, 吴水金

(福建省农业科学院甘蔗研究所, 福建 漳州 363005)

摘要: 以福建铁皮石斛种子为材料, 开展种子萌芽、壮苗生根适宜培养基配方试验研究, 并对组培苗的移栽基质进行筛选。结果表明: 以 MS+蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为培养基, 种子萌芽快, 萌芽率高; $1/4\text{MS} + \text{蔗糖 } 40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1} + \text{马铃薯提取液 } 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{琼脂 } 7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 是壮苗生根的最佳培养基; 木屑: 泥炭 (1:2) 的基质, 组培苗移栽成活率、平均新芽数及大于 3 cm 平均新芽数等 3 项指标最好。

关键词: 铁皮石斛; 组织培养; 基质

中图分类号: S 576. 23

文献标识码: A

On breeding *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl

LIN Jiang-bo, DAI Yi-min, ZOU Hui, WANG Wei-ying, WU Shui-jin

(Sugarcane Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005, China)

Abstract: On an appropriate medium, Fujian's *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl was studied for its seed germination, plantlet strength, rooting and transplantation. The results indicated that the seeds germinated well and quickly on the medium consisting of MS + sucrose $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + agar $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. To strengthen the plantlet and encourage root formation, the best formulation was found to be $1/4\text{MS} + \text{sucrose } 40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1} + \text{potato extract } 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{agar } 7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The transplanting survival rate, average number of new buds and average number of new buds that were longer than 3 cm could best be obtained when the mixture of sawdust and peat in the ratio of 1:2 was used for the plantlet transplantation.

Key words: *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl; tissue culture; medium

铁皮石斛 (又名耳环石斛或黑节草, *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl) 为多年生附生草本, 属兰科石斛属植物^[1], 近代医学研究表明: 铁皮石斛具有祛痰^[2]、抗氧化^[3-4]、提高机体的免疫功能^[5-7]、降血糖^[8]和抗癌^[9]等功效。加工后的铁皮石斛又称铁皮枫斗, 是一种经济价值和医用价值都很高的名贵中药。根据铁皮石斛茎的形态结构和我国铁皮枫斗加工的具体情况, 铁皮石斛分为 F 型居群与 H 型居群^[10-12]。福建铁皮石斛鲜品总多糖含量高于云南、广西、广东、江西和湖南品种, 纤维素含量低于广西、雁荡、广东和江西品种, 属 F 型范畴, 茎相对短而柔软, 具粘性^[12], 是适用于铁皮枫斗加工的品种。

铁皮石斛种子无胚乳, 需与某些真菌共生才能萌发^[13], 自然繁殖率低, 虽分布广, 但生境窄, 加上长年无节制采掘, 自然资源日渐枯竭, 产量不能满足目前市场需求。扩大人工种植中的种源供应只能通过组织培养, 有关铁皮石斛的组织培养已有

研究报道^[14-17], 但有关福建铁皮石斛的组培研究却鲜有报道。本研究以福建铁皮石斛的种子为材料, 开展人工繁育技术研究, 为福建铁皮石斛种质资源保护及进一步推广种植奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

福建铁皮石斛种子, 产自福建省龙岩市连城冠豸山石崖上 (由连城县冠江铁皮石斛有限公司提供)。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的诱导培养 去掉荚果干枯部分, 用自来水冲洗干净, 后用 70% 酒精浸泡 30 s, 再用 0.1% 升汞消毒 8 min, 最后用无菌水冲洗 3 次。在无菌条件下切开荚果, 把种子播种于 6 种诱导培养基上 (①MS; ②MS+6-BA0.1 mg·L⁻¹; ③1/2MS; ④1/2MS+6-BA0.1 mg·L⁻¹; ⑤B5; ⑥B5+6-BA0.1 mg·L⁻¹), 播种量为种子覆盖培养

收稿日期: 2010-04-12 初稿; 2010-06-11 修改稿

作者简介: 林江波 (1976-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事农业生物技术研究

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2009R10031-1)

基表面 50%。所有培养基均加入蔗糖 30 g · L⁻¹，琼脂 7 g · L⁻¹，pH 5.4，培养 2 个月。每处理 3 次重复，每重复接 20 瓶，培养条件为温度 26~28℃，光照强度 2 000 Lx（下同）。

1.2.2 壮苗及生根培养 正交试验设计：以 MS 基本培养基大量元素、NAA、蔗糖和马铃薯提取液浓度为因素，采用 L₁₆（4⁵）正交试验设计（表 1），每瓶接 8 株，每株高约 0.5 cm（茎基部至茎尖）。培养 3 个月后统计株高、茎粗、根长和根数。

表 1 正交试验因素水平表 L₁₆（4⁵）

Table 1 Factors and levels of orthogonal L16(45) design

水平	因素			
	MS 大量元素 (倍) (A)	NAA (mg·L ⁻¹) (B)	蔗糖 (g·L ⁻¹) (C)	马铃薯提取液 (mg·L ⁻¹) (D)
1	1.5	0	10	0
2	1	0.5	20	100
3	1/2	1	30	200
4	1/4	1.5	40	300

1.2.3 组培苗移栽 将具有 2~5 条根，2~3 cm 高的生根试管苗经过常规炼苗处理后移栽于温室大棚。以木屑、泥炭土、椰糠和蛭石为基质，按不同比例调配（表 5），每处理 3 次重复，每重复 32 株。移栽后按常规管理，湿度保持在 70%~90%，6 个月后调查成活率、平均新芽数及大于 3 cm 的平均新芽数。

1.3 数据统计方法

1.3.1 移栽成活率 移栽成活率（%）=（成活株数/32）×100%

1.3.2 平均新芽数 平均新芽数（个）=新芽总数/成活株数

1.3.3 大于 3 cm 的平均新芽数 大于 3 cm 的平均新芽数（个）=大于 3 cm 的新芽总数/成活株数

1.3.4 统计分析 正交试验结果采用正交试验方差分析，方差分析的差异显著性用新复极差法进行平均数的多重比较，数据分析采用 DPS 软件^[18]。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对种子萌芽的影响

试验结果表明：①号培养基种子转绿较快，15 d 种子开始转绿，2 个月后大约有 90% 的种子转绿，并开始萌芽。用③、⑤号培养基转绿速度较慢，1 个月后种子开始转绿，2 个月后约 70% 种子转绿，未见有种子萌芽。其他培养基种子转绿比率都较低，转绿的种子很快分化，到两个月时未转绿

种子出现白化、死亡。将培养 2 个月后的种子转接到①号培养基，继续培养 2~3 个月，种子长成 0.5 cm 高的小苗。

2.2 不同培养基成分对壮苗及生根的影响

将高 0.5 cm 的无根小苗转接到壮苗生根培养基，培养 3 个月后进行数据统计（表 2）。采用极差分析方法对试验结果进行分析（表 3），由 4 因素的 R 值大小可得出，不同因素对福建铁皮石斛的壮苗生根培养影响的主次关系为蔗糖>MS 大量元素>马铃薯提取液>NAA。

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

处理	因素					株高 (cm)	茎粗 (mm)	根数(条)	根长 (cm)
	A	B	C	D	E				
1	1	1	1	1	1	1.2	2.3	2.5	0.9
2	1	2	2	2	2	1.5	2.5	3.7	1.3
3	1	3	3	3	3	1.5	2.5	3.1	1.2
4	1	4	4	4	4	1.7	2.8	2.8	1.4
5	2	1	2	3	4	1.7	2.6	2.6	1.4
6	2	2	1	4	3	1.5	2.5	2.3	1.2
7	2	3	4	1	2	2.0	2.8	2.8	1.3
8	2	4	3	2	1	1.6	2.7	3.9	1.4
9	3	1	3	4	2	1.5	2.8	3.5	1.7
10	3	2	4	3	1	1.9	3.4	4.1	3.0
11	3	3	1	2	4	1.2	2.4	2.7	1.9
12	3	4	2	1	3	1.4	2.9	2.8	2.9
13	4	1	4	2	3	2.2	3.0	4.4	4.1
14	4	2	3	1	4	1.5	2.4	3.1	2.1
15	4	3	2	4	1	1.5	3.3	3.4	2.3
16	4	4	1	3	2	1.5	2.2	2.8	2.6

表 3 极差分析结果

Table 3 Results of range analysis

	A	B	C	D
K1	33.01	38.51	31.76	34.82
K2	34.36	37.88	37.78	40.58
K3	40.10	36.05	36.43	38.14
K4	42.24	37.27	43.72	36.16
k1	2.06	2.41	1.99	2.18
k2	2.15	2.37	2.36	2.54
k3	2.51	2.25	2.28	2.38
k4	2.64	2.33	2.73	2.26
R	0.58	0.15	0.75	0.36

通过对处理因子各水平的 SSR 检验（表 4），MS 大量元素和蔗糖对铁皮石斛壮苗生根的影响达到极显著水平，MS 大量元素以 1/4、蔗糖浓度以 40

$g \cdot L^{-1}$ 培养效果最好;马铃薯提取液对铁皮石斛壮苗生根的影响达到显著水平,以 $100 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 浓度培养效果最佳;NAA 各浓度水平间差异不显著。因此福建铁皮石斛壮苗生根培养的最佳培养基为 $1/4MS +$ 蔗糖 $40 \text{ g} \cdot L^{-1} +$ 马铃薯提取液 $100 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 。

2.3 不同栽培基质对移栽成活率及新芽生长的影响

不同的栽培基质对福建铁皮石斛的移栽成活率及新芽生长的影响不同(表 5)。参试的 19 种基质中,木屑、泥炭、木屑:泥炭(1:1)、木屑:泥炭(2:1)、木屑:泥炭(1:2)、木屑:泥炭(3:1)和木屑:泥炭(1:3)的移栽成活率为 97.8%~100.0%,与其他基质达到极显著差异;从平均新芽数和大于 3 cm 的平均新芽数来看,木屑:泥炭(1:2)的基质最好,平均新芽数和大于 3 cm 的平均新芽数分别为 2.20 和 1.31,与其他基质达极显著差异;其次是木屑:泥炭(2:1)和木屑:泥炭(1:1)。

表 4 不同处理因子各水平 SSR 检验

Table 4 SSR analysis on level of different factors

处理	水平	均值	5% 显著水平	1% 极显著水平
MS	4	2.6	a	A
	3	2.5	a	AB
	2	2.1	b	BC
	1	2.1	b	C
NAA	1	2.4	a	A
	2	2.4	a	A
	4	2.4	a	A
	3	2.3	a	A
蔗糖	4	2.7	a	A
	2	2.4	b	AB
	3	2.3	bc	B
	1	2.0	c	B
马铃薯提取液	2	2.5	a	A
	3	2.4	ab	A
	4	2.3	ab	A
	1	2.2	b	A

表 5 不同栽培基质对铁皮石斛成活率及新芽生长的影响

Table 5 Effect of medium on plant survival rate and new buds growth of *D. candidum*

序号	基质	成活率 (%)	平均新芽数 (个)	大于 3cm 平均新芽数 (个)
1	木屑	97.92 aA	1.19 gFG	0.31 eE
2	泥炭	100.00 aA	1.42 fE	0.91 cC
3	椰糠	34.39 ijG	0.61 jJ	0.00 gG
4	蛭石	62.50 gE	1.07 hH	0.00 gG
5	木屑:泥炭(1:1)	100 aA	1.74 bcBC	1.11 bB
6	木屑:椰糠(1:1)	51.04 hF	1.25 gF	0.08 gFG
7	木屑:蛭石(1:1)	89.58 bB	0.85 iI	0.00 gG
8	木屑:泥炭(2:1)	97.93 aA	1.78 bB	1.12 bB
9	木屑:椰糠(2:1)	63.54 fgE	1.20 gF	0.10 FfgG
10	木屑:蛭石(2:1)	75.00 eD	1.21 gF	0.00 gG
11	木屑:泥炭(1:2)	100.00 aA	2.20 aA	1.31 aA
12	木屑:椰糠(1:2)	35.43 Gi	1.09 GHh	0.09 FfgG
13	木屑:蛭石(1:2)	89.58 bB	1.19 FgG	0.10 FfgG
14	木屑:泥炭(3:1)	97.93 aA	1.68 cdBC	0.95 cC
15	木屑:椰糠(3:1)	66.66 fE	1.66 dCD	0.50 dD
16	木屑:蛭石(3:1)	84.38 cC	1.46 fE	0.54 dD
17	木屑:泥炭(1:3)	100.00 aA	1.57 eD	0.97 CcB
18	木屑:椰糠(1:3)	31.24 Gj	0.67 Jj	0.20 efEF
19	木屑:蛭石(1:3)	80.23 dC	1.03 hH	0.04 gG

注:同列不同大、小写字母分别表示在 1%和 5%水平上差异显著。

3 结论与讨论

影响植物组织培养的主要因素有基本培养基、

激素、有机附加物及培养条件等。唐桂香等^[19]研究表明:添加 5%香蕉泥和 20%马铃薯提取物的 1/2 MS 培养基可明显提高种胚的萌发率,种胚萌发率

分别为 52.5% 和 79.37%, 而在未添加任何天然附加物的 1/2 MS 培养基上, 种胚的萌发率为 0。张铭等^[20]研究表明: NAA 在浓度 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能促进种胚萌发, 而 2,4-D 对种胚的萌发有抑制也有促进作用。本研究的结果表明: 福建铁皮石斛种子在全量 MS 基本培养上的转绿及萌发的效果最好, 在 1/2MS 培养基上也有 70% 的萌发率, 但添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 会抑制种胚的萌发。

陈兆贵等^[21]研究发现铁皮石斛壮苗生根以 1/2MS + IBA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 水解酪蛋白 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 香蕉提取液 10% 为最佳; 周江明^[22]研究不同有机物对浙江省江山市江郎山铁皮石斛的试管苗生长发育的影响, 结果表明: 在培养基内添加萝卜提取液、水解酪蛋白、椰乳对苗生长最为有利, 添加香蕉提取液、马铃薯提取液及马铃薯和香蕉提取液各半对苗生长也有一定的正面影响, 但作用较弱, 而不加有机物或添加青苹果提取液和酵母提取液长势最差。在本研究中发现马铃薯提取液对福建铁皮石斛壮苗生根存在显著影响, 最适宜浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而其他有机附加物对福建铁皮石斛的壮苗生根培养是否更为有利还有待进一步研究。

铁皮石斛喜温暖、多雾、微风、清洁、散射光环境, 忌阳光直射和曝晒。其根是气生根, 有明显的好气性和浅根性。在移栽过程中要创造最佳的生长环境, 基质以疏松透气、排水良好、不易发霉、无病菌和害虫潜藏者为宜。日平均气温在 $15 \sim 30^\circ\text{C}$ 时都可移栽。朱艳等^[23]研究结果表明: 铁皮石斛移栽基质中泥炭土的多少对铁皮石斛试管苗的移栽成活率影响不大, 关键是看移栽基质的透水、透气性, 最适宜的基质是 1/3 泥炭 + 1/3 锯末 + 1/3 珍珠岩, 覆以苔藓类伴生植被, 成活率为 76.7%。李进进等^[24]研究结果表明: 移栽的基质以松树皮与碎石、花生壳与碎石综合效果较好, 移栽成活率达到 95% 以上。本研究发现福建铁皮石斛移栽时基质的透气性与保水性是高移栽成活率的关键, 而基质的营养是移栽成活后新芽萌发与生长的限制因子, 过低或过高都不利于成活后新芽的萌发与生长, 这可能与铁皮石斛的生长速度较慢有关。

参考文献:

[1] 徐昭玺. 中草药种植技术指南 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 403-405.
[2] 郑高利, 周彦刚, 许衡均, 等. 铁皮石斛提取物的祛痰作用 [J]. 浙江省医学科学院学报, 1998, 35: 24-25.

[3] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCP1a-1 对氧自由基和脂质过氧化的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 410-414.
[4] 查学强, 王军辉, 潘利华, 等. 石斛多糖体外抗氧化活性的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28 (10): 90-93.
[5] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCP1a-1 的理化性质及抗肿瘤活性 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 578-583.
[6] 杨明晶, 俞萍, 陆罗定, 等. 铁皮枫斗西洋参胶囊对小鼠免疫调节功能的影响 [J]. 江苏预防医学, 2008, 19(4): 11-13.
[7] 高建平, 金若敏. 铁皮石斛圆球茎于原药材免疫调节作用的比较研究 [J]. 中药材, 2002, 25 (7): 487-489.
[8] 吴昊妹, 徐建华, 陈立钻, 等. 铁皮石斛降血糖作用及其机制的研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29 (2): 160-163.
[9] 鲍丽娟, 王军辉, 罗建平. 4 种石斛水提物对人宫颈癌 HelaS3 细胞和肝癌 HepG2 细胞的抑制作用 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36: 15968-15970.
[10] 丁小余, 王峥涛, 徐珺珊. F 型、H 型居群的铁皮石斛 rDNA ITS 区序列差异及 SNP 现象的研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (2): 85.
[11] 丁小余, 徐珺珊, 王峥涛, 等. 铁皮石斛居群差异的研究 (I) —植物体形态结构的差异 [J]. 中草药, 2001, 32 (9): 828-831.
[12] 徐程, 詹忠根, 廖苏梅. 8 种不同地域铁皮石斛农艺性状及多糖和纤维素分析 [J]. 浙江大学学报: 理学版, 2008, 35 (5): 576-579, 585.
[13] 邵华, 张玲琪, 李俊梅, 等. 铁皮石斛研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35 (1): 109-112.
[14] 詹忠根. 铁皮石斛根尖诱导丛生芽研究 [J]. 中草药, 2006, 37 (6): 928-931.
[15] 秦廷豪. 铁皮石斛的组织培养与快速繁殖 [J]. 热带农业科学, 2008, 28 (1): 25-29.
[16] 鲍顺淑, 贺冬仙, 郭顺星. 可控环境下光照时间对铁皮石斛组培苗生长发育的影响 [J]. 中国农业科技导报, 2007, 9 (6): 90-94.
[17] 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.
[18] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 43-71, 94-99.
[19] 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.
[20] 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): 92-96.
[21] 陈兆贵, 谭俊. 不同激素对比对铁皮石斛组织培养的影响研究 [J]. 惠州学院学报: 自然科学版, 2006, 26(3): 11-14.
[22] 周江明. 不同有机物对铁皮石斛试管苗生长发育的影响 [J]. 中国农学通报, 2005, 21 (8): 49-51.
[23] 朱艳, 秦民坚. 促进铁皮石斛试管苗移栽成活的研究 [J]. 中国野生植物资源, 2004, 23 (3): 62-63.
[24] 李进进, 廖俊杰, 许继勇, 等. 铁皮石斛试管苗栽培技术研究 [J]. 中药材, 2006, 29 (11): 1133-1134.

(责任编辑: 柯文辉)