

# 铁皮石斛原球茎常温保存研究

蒙爱东, 余丽莹\*, 董青松, 黄浩

(广西壮族自治区药用植物园, 南宁 530023)

**摘要:** 以铁皮石斛原球茎为材料, 通过不同培养基、蔗糖浓度、继代周期、保存时间等多种因素对原球茎在保存过程中增殖生长和分化成苗的影响, 进行铁皮石斛原球茎常温保存的研究。结果表明: 铁皮石斛原球茎常温((25±2)℃)保存的适宜培养基为1/2MS、蔗糖浓度为1%, 继代周期可达10个月; 原球茎在5年内能保持分化和增值能力, 随着保存年限的增加, 分化率越来越低, 可通过复壮和成苗培养提高分化成苗率。

**关键词:** 铁皮石斛; 原球茎; 常温保存

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)06-0808-04

## Conservation on the protocorms of *Dendrobium officinale* in room temperature

MENG Ai-Dong, YU Li-Ying\*, DONG Qing-Song, HUANG Hao

(Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China)

**Abstract:** The effects of different basal media, sucrose concentration, subculture period and conservation time on the propagation and differentiation of protocorms of *Dendrobium officinale* were studied. The results showed that the suitable basal medium was 1/2 MS, the optimum sucrose concentration was 1%, and the subculture period could last for 10 months under the room temperature. The protocorms would keep differentiation and propagation abilities in five years of conservation. As the conserved time being longer, the ability of differentiation became weaker.

**Key words:** *Dendrobium officinale*; protocorm; room temperature conservation

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)植物, 我国传统的名贵中药。其种子结构简单(刘瑞驹等, 1988), 在自然状态下, 繁殖率低, 多以分株法繁殖。野生铁皮石斛由于被大量采集, 已处于濒危状态, 被国家列为一级保护植物。为保护野生资源, 我国学者应用组织培养技术, 以种子、带芽茎段、原球茎为材料, 进行了试管苗繁殖技术研究(张治国等, 1992; 刘晔等, 1998; 王进红等, 2000), 并取得成功。对濒危植物铁皮石斛野生种质资源的保护, 除通过组织培养技术迅速扩大种源、人工种植增加种群数量外, 还可应用此技术进行种质资源保存。在室温下, 离体保存铁皮石斛的工作已有初步研究(史永忠等, 1999; 罗吉凤等, 2006), 但要达到长久保存的目的, 还需对铁皮

石斛无菌材料保存的条件和长久保存后材料的变化情况做细致的研究。为此, 我们以原球茎为材料, 通过不同培养基、蔗糖浓度、继代周期、保存时间等多种因素对原球茎在保存过程中增殖生长和分化成苗的影响, 探索铁皮石斛原球茎保存的适宜条件, 为今后建立种质资源离体保存库奠定技术基础。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

2000~2004年, 在广西药用植物园兰科药用植物种质圃中采集铁皮石斛带芽茎段, 经诱导培养获得的原球茎。

收稿日期: 2008-05-29 修回日期: 2009-01-25

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0322024-3A)Supported by Key Technology Research and Development Program of Guangxi(0322024-3A)]

作者简介: 蒙爱东(1962-), 女(壮族), 广西上林人, 副研究员, 从事药用植物组织培养和栽培研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: yuliying@vip.sina.com)

## 1.2 方法

1.2.1 培养基 用 1/2MS、1/2MS+200 g/L 马铃薯煮出液、MS、B5、KC 共 5 种不同培养基, 培养基加 2% 蔗糖, 原球茎来源于同一世代和培养周期, 保存期为 3 个月。

1.2.2 蔗糖浓度 设计 1%、2%、3%、4%、5% 五种浓度, 以 1/2MS 为基本培养基, 原球茎来源于同一世代和培养周期, 保存期为 3 个月。

1.2.3 继代周期 设计 4 个月、7 个月、10 个月 3 个继代周期, 以 1/2MS 为基本培养基, 加蔗糖 1%, 原球茎来源于同一世代和培养周期。

1.2.4 保存时间 设计 1 年、3 年、5 年 3 个保存时间, 从 2000 年至 2004 年, 每年 5 月从植株上采带芽的茎段, 用相同方法诱导和培养原球茎, 每 4 个月继代 1 次。

1.2.5 保存条件和比较方法 用 1/2MS 为基本培养基, 加 1% 蔗糖、0.4% 琼脂, pH 值 5.8, 装入 100 mL 容量的三角瓶中, 每瓶装 20 mL 培养基, 在 121 °C、1.1 kg/cm<sup>2</sup> 的压力下灭菌 20 min。在培养室内进行培养的光照时间为 10 h/d, 光照强度为 30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 温度(25±2) °C。每种实验中的每组接 5 瓶, 每瓶接 0.5 g 原球茎, 重复 3 次。实验结束时, 对每瓶原球茎称重, 并从每瓶取出 200 个样进行分化苗统计。以 5 瓶 3 次重复的原球茎平均增殖倍数和分化苗数进行比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对原球茎保存的影响

用 1/2MS、1/2MS+200 g/L 马铃薯煮出液、MS、B5、KC 共 5 种培养基保存 3 个月(90 d), 原球茎平均鲜重以 1/2MS+200 g/L 马铃薯煮出液培养最高, 增殖倍数为 7.60 倍, 分化率达到 72.6%。其次是 MS 和 1/2MS 培养基, 原球茎增殖倍数分别是 6.32 倍和 6.14 倍, 分化率为 56.1% 和 53.7%。而在 B5 和 KC 培养基原球茎增殖慢, 增殖倍数为分别为 5.28 和 5.16, 分化率也较低, 分别为 31.0 和 30.5(表 1)。

从表 1 看出, 在 1/2MS 添加马铃薯浸出液培养基中, 苗的分化率太高, 不宜保存原球茎。在 B5 和 KC 培养基中, 虽以原球茎增殖为主, 苗分化少, 但原球茎个小, 色偏黄, 生长不饱满, 也不宜保存原球茎。而在 1/2MS 和 MS 培养基中, 保存的原球茎生长好, 苗分化程度不很高, 适于保存原球茎, 1/2MS

培养基大量元素成分比 MS 培养基减少一半, 更经济, 所以选择 1/2MS 作为基本培养基最适宜。

### 2.2 不同蔗糖浓度对原球茎保存的影响

以 1/2MS 为基本培养基, 添加不同浓度的蔗糖, 进行原球茎接种保存。培养 3 个月后(90 d)原球茎增殖和分化以蔗糖浓度为 2% 和 3% 最好, 分化率分别是 52.2% 和 56.7%, 原球茎的增殖倍数是 5.90 和 6.13; 其次是 1% 蔗糖浓度, 原球茎的增殖倍数为 4.36, 有近一半的苗分化; 4% 和 5% 的蔗糖浓度下, 苗分化不到 10%, 原球茎增殖也少(表 2)。实验结果表明, 不同蔗糖浓度对原球茎的增殖和保存有影响。较高的蔗糖浓度(4%~5%), 可抑制原球茎分化成苗, 并使原球茎的生长速度减慢, 增殖倍数降低; 而较低的糖浓度(1%~3%) 有利于原球茎分化成苗, 并加快原球茎生长; 在较高糖浓度的培养基中, 原球茎颗粒松散, 体积较小, 颜色发黄, 生长质量较差; 在低糖浓度的培养基中, 原球茎颗粒紧密、饱满, 体积较大, 颜色浅绿, 生长质量较好。综合分析认为, 以蔗糖浓度为 1% 的培养基进行保存, 更能保证原球茎的生长质量。

表 1 培养基对原球茎保存的影响

Table 1 Effects of different media on protocorm conservation

培养基 Medium	平均接种 重量(g) Average weight of inoculation	平均鲜 重(g) Fresh weight of yield	增殖倍数 Multipli- cation times	分化率(%) Rate of differen- tiation
1/2MS	0.5	3.57	6.14	53.7
1/2MS+马 铃薯浸出液	0.5	4.30	7.60	72.6
MS	0.5	3.66	6.32	56.1
B5	0.5	3.14	5.28	31.0
KC	0.5	3.09	5.16	30.5

表 2 蔗糖浓度对原球茎保存的影响

Table 2 Effects of different sugar concentrations on protocorm conservation

蔗糖浓度 Concen- tration of sugar(%)	平均接种量(g) Average weight of inoculation	平均收获 鲜重(g) Fresh weight of yield	增殖倍数 Multipli- cation times	分化率(%) Rate of differen- tiation
1	0.5	2.68	4.36	49.5
2	0.5	3.45	5.90	52.2
3	0.5	3.57	6.13	56.7
4	0.5	2.35	3.70	9.5
5	0.5	2.27	3.54	8.0

### 2.3 继代周期对铁皮石斛原球茎保存的影响

把来源相同的原球茎, 接入 1/2MS 培养基中,

置培养室培养保存,当保存到4个月、7个月、10个月时,分别进行原球茎称重、取样、分化苗计数,观察分析原球茎增殖和分化情况(表3)。从表3看出,继代周期长短不同,原球茎增殖倍数没有明显差别。4个月、7个月、10个月三个不同继代周期里,原球茎增殖倍数相近。保存4个月与保存10个月原球茎鲜重增殖倍数只相差0.54,说明原球茎的增殖主

要是在前4个月,后3~6个月基本不生长,只处于维持阶段,这可能与培养基消耗有关。苗的分化率随着继代周期的延长而下降,从50.5%降至38.3%,但其分化能力并没有丧失。

## 2.4 不同保存时间对铁皮石斛原球茎增殖和苗分化率的影响

为研究常温长久保存对铁皮石斛原球茎增殖倍

表3 继代周期对原球茎保存的影响

Table 3 Effects of different subculture generation on protocorm conservation

继代周期 Subculture generation	平均接种量 Average weight of inoculation(g)	平均收获 鲜重(g) Fresh weight of yield	增殖倍数 Multiplication times	分化率 Rate of differentiation (%)	原球茎生长状况 Situation of protocorm growth
4个月	0.94	4.89	4.20	50.5	原球茎个大饱满,绿色培养基表面全部被原球茎铺满,并向深层生长,只在瓶底还看到一些培养基。
7个月	0.81	4.55	4.62	43.6	
10个月	0.87	4.99	4.74	38.3	

表4 不同保存时间对原球茎增殖和分化率的影响

Table 4 Effects of different conservation times on protocorm multiplication and rate of differentiation

保存时间 Conservation times(a)	继代次数 Times of successive transfer	平均收获鲜重 Fresh weight of yield (g)	增殖倍数 Multiplication times	分化率(%) Rate of differentiation
1	3	2.68	4.36	57.0
3	9	2.56	4.12	11.5
5	15	2.49	3.98	3.5

数和分化率的影响,分别取2000~2004年期间带芽茎段诱导的原球茎(至今最长已保存培养5年,共15代)进行统计和观察(表4)。

从表4看出,原球茎增殖能力并没有随着保存

时间加长而产生很大变化,其增殖倍数保持在4倍左右。随着保存年限的增加,原球茎的增殖较分化占绝对优势,通常在瓶内增殖的原球茎高度可达1.5~2.5 cm,而分化成苗仅占很少部分,并且分化能力随保存年限的增加而减少,在保存1年的分化率为57.0%,保存3年的原球茎分化率下降到11.5%,而保存5年的分化率更低,仅为3.5%。

## 2.5 复壮培养对原球茎分化率的影响

把在1/2MS培养基上保存了1年、3年、5年的铁皮石斛原球茎,分别接进1/2MS+200 g/L马铃薯浸出液的培养基上,经3个月的壮苗培养后,取样统计分化率和测量苗高、叶片数量、叶片大小、平均根

表5 复壮培养对原球茎分化率的影响

Table 5 Effects of rejuvenation cultivation on protocorms differentiation

保存时间(年) Conservation times	取样数(个) Number of protocorms	分化率(%) Rate of differentiation	苗高(cm) Seedling height	叶片数(片/株) Number of leaves	叶片大小 Leaf sizes (cm <sup>2</sup> )	平均根数(条/株) Average number of roots	平均根长(cm) Average length of roots
1	200	66.0	2.1	5	1.3×0.3	5	2.0
3	200	31.5	1.5	3	0.8×0.2	2	0.7
5	200	12.5	0.9	2	0.5×0.1	2	0.2

数、平均根长等,比较原球茎分化率和苗的生长状况(表5)。从表5看出,在相同培养基和培养条件下,经1个周期的成苗培养,不同保存年限的原球茎其成苗质量也有较大差别。保存年限短的原球茎分化生长的苗发育较好,苗高大,叶片多且大,发根多,根较长;而随着保存时间的不断延长,原球茎分化生长的苗越来越细弱,植株生长矮小,叶和根数少,且叶小根短。

## 3 讨论

野生铁皮石斛一般附生在树上,生长环境特殊,在自然条件下繁殖率较低,种群增加缓慢,因此以迁地保存的方式保存活体种质资源难度较大、成本较高,而成熟的离体培养技术为其种质资源保存提供

较好的途径。

常温下对植物种质资源进行保存,主要是通过改变培养基成分,如降低某些营养元素浓度、添加生长抑制剂、提高渗透压,以减缓生长,延长继代时间,确保其分化成苗能力,达到保存种质资源的目的。与超低温和低温保存相比,常温保存更为方便和廉价,不需要特殊的仪器设备。常温下保存的材料可随时转入繁殖阶段,不需长时间恢复,这对快速繁殖十分有利。我们从 2000 年开始,利用近 6 年的时间对铁皮石斛原球茎进行了常温保存试验,通过不同培养基、降低糖浓度、不同的继代周期、不同的保存时间对分化成苗率的影响等试验,筛选出一个适合铁皮石斛原球茎常温保存的方法。试验结果表明,常温保存时间在 1 年左右较佳,经复壮后的分化成苗率较高,而保存 3 年以后的分化率最高值不到保存时间为 1 年的一半。

#### 参考文献:

- Liu RJ(刘瑞驹), Meng AD(蒙爱东), Deng XQ(邓锡青), et al. 1988. Study on the rapid propagation of *Dendrobium candidum* *in vitro* (铁皮石斛试管苗快速繁殖的研究)[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 23(8): 636—640
- Liu Y(刘晔), Zhang ZG(张治国). 1998. Study on plantlet strengthening medium for *Dendrobium candidum* of clonal propagation *in vitro* (铁皮石斛试管苗壮苗培养基的研究)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 23(11): 654—656
- Luo JF(罗吉凤), Cheng ZY(程治英), Long CL(龙春林). 2006. Studies on the rapid propagation *in vitro* storage of *Dendrobium candidum* (铁皮石斛快速繁殖和离体种质保存的研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), 26(1): 69—73
- Shi YZ(史永忠), Pan RC(潘瑞炽), Wang XJ(王小菁), et al. 1999. *In vitro* conservation of germplasm at room temperature in *Dendrobium candidum* (铁皮石斛种质室温离体保存)[J]. *J South China Normal Univ(Nat Sci Edi)* (华南师范大学学报·自然科学版), 4: 73—77
- Wang JH(王进红), Zhang XM(张雪梅), Fu KC(付开聪). 2000. Rosette bud induction from stem segments of *Dendrobium candidum* (黑节草茎直接诱导丛生芽)[J]. *Lishizheng Med Mat Med Res* (时珍国医国药), 11(11): 1 052
- Zhang ZG(张治国), Liu Y(刘晔), Wang L(王黎), et al. 1992. Studies on culture conditions of protocorm proliferation in white *Dendrobium* (*Dendrobium candidum*) (铁皮石斛原球茎增殖的培养条件研究)[J]. *Chin Trad Herbal Drug* (中草药), 23(8): 431—433
- Tan MX(谭明雄), Wang HS(王恒山), Li X(黎雪). 2003. Studies on the chemical constituents from the Chinese traditional medicine *Rubus parvifolius* (中药茅莓化学成分研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), 23(3): 282—284
- Zhu ZH(朱志华), Zang HQ(张惠勤), Yuan MJ(袁模军). 1990. Pharmacological study of *Rubus parvifolius* (茅莓的药理研究)[J]. *China J Chin Mat Medica* (中国中药杂志), 15(7): 43—47
- 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 2002. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1 557—1 558
- 刘廷快, 陈邦树. 1990. 肝乐胶囊对实验性肝损坏的保护作用[J]. *中药新药与临床药理*, 10(4): 213—215
- Lei JS(雷久士), Guo ZH(郭子华), Zhu XM(朱晓明), et al. 1998. 前炎清对大鼠前列腺炎模型病理改变的影响[J]. *湖南中医学院学报*, 48(2): 22—23.
- 白希清. 1992. 病理学[M]. 第 4 版. 北京: 科学出版社, 535
- 吴阶平, 裘法祖, 黄家驷. 1997. 外科学[M]. 下册. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 1805
- 钱伯初, 史红, 郑晓亮. 2007. 慢性非细菌性前列腺炎动物模型研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 12(1): 14—18
- Zhu YD(朱宇狄), Ling ZM(林宗明), Yang CX(杨春欣). 2007. Effect of qingqianfang on experimental animal model with bacterial prostatitis (清前方对实验性非细菌性前列腺炎的影响)[J]. *Zhejiang J ITCWM* (浙江中西医结合杂志), 17(9): 539—541
- Wang JS(王继生), Qiu ZY(邱宗荫), Xia YP(夏永鹏), et al. 2006. The protective effects of total glycosides *Rubus parvifolius* on cerebral ischemia in rat (茅莓总皂苷对大鼠局灶性脑缺血的保护作用)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 31(2): 138—141

(上接第 862 页 Continue from page 862)

伯初等, 2007), 茅莓对非细菌性前列腺炎的影响机制可能与改善血液循环及调节炎症分子有关。

茅莓提取物能抑制角叉菜胶和消痔灵引起的大鼠前列腺炎模型前列腺腺体增生, 改善血液循环, 降低前列腺白细胞浸润, 并促进前列腺质地变软, 减轻炎症细胞浸润和损伤, 据有抗非细菌性前列腺炎的药用价值, 其药效成份及作用机制尚有待深入研究。

#### 参考文献: