

铁皮石斛无糖组培快繁体系关键因素优化研究

陈宗瀚¹ 牟美如¹ 梁娇¹ 李晶² 牛燕芬¹ 江参³ 宁眺^{1*}

1 昆明学院农学与生命科学学院

2 香格里拉市藏美农业科技有限公司

3 迪庆松林文化旅游传播有限公司

DOI:10.32629/as.v9i7.4129

[摘要] 铁皮石斛(*Dendrobium officinale Kimura et Migo*)为我国传统名贵中药材,多糖与石斛碱为其主要活性成分。传统组织培养存在污染率高、炼苗成活率低等问题,而无糖组培技术以CO₂替代蔗糖作为碳源,可有效抑制微生物污染并促进植株光合自养。本研究以三年生铁皮石斛为材料,围绕外植体筛选、培养基质与营养液优化开展系统实验。结果表明:茎段为无糖组培中唯一能够成活并诱导新芽的外植体,成活率66.67%,诱导率88.32%;珍珠岩基质优于蛭石,其中无糖珍珠岩+WPM处理多糖含量最高(230.94 μg/mL),无糖珍珠岩+MS处理石斛碱含量最高(14.92 μg/mL)。综合优化后,推荐快繁阶段采用茎段+珍珠岩+改良MS,品质培养阶段采用茎段+珍珠岩+WPM。该体系在基质优化后污染率可控制在7.5%以下,成活率可达91.7%,活性成分含量显著优于传统组培。

[关键词] 铁皮石斛; 无糖组培; 外植体筛选; 培养基质

中图分类号: J522.3 文献标识码: A

Optimization of key factors for sugar free tissue culture and fast propagation system of *Dendrobium officinale*

Zonghan Chen¹ Meiru Mou¹ Jiao Liang¹ Jing Li² Yanfen Niu¹ Can Jiang¹ Tiao Ning^{1*}

1 College of Agriculture and Life Sciences, Kunming University

2 Shangri La Cangmei Agricultural Technology Co., Ltd

3 Diqing Songlin Cultural Tourism Communication Co., Ltd

[Abstract] *Dendrobium officinale Kimura et Migo* is a traditional and precious Chinese medicinal herb, with polysaccharides and dendrobine as its main active ingredients. Traditional tissue culture has problems such as high pollution rate and low survival rate of seedlings, while sugar free tissue culture technology uses CO₂ instead of sucrose as a carbon source, which can effectively inhibit microbial pollution and promote plant photosynthetic autotrophy. This study conducted a systematic experiment using three-year-old *Dendrobium officinale* as the material, focusing on the screening of explants, optimization of culture medium and nutrient solution. The results showed that stem segments were the only explants that could survive and induce new shoots in sugar free tissue culture, with a survival rate of 66.67% and an induction rate of 88.32%; The perlite matrix is superior to vermiculite, with the highest polysaccharide content (230.94 μg/mL) in the sugar free perlite+WPM treatment and the highest dendrobine content (14.92 μg/mL) in the sugar free perlite+MS treatment. After comprehensive optimization, it is recommended to use stem segments+perlite+improved MS in the fast propagation stage, and stem segments+perlite+WPM in the quality cultivation stage. After optimizing the substrate, the pollution rate of this system can be controlled below 7.5%, and the survival rate can reach 91.7%. The content of active ingredients is significantly better than traditional tissue culture.

[Key words] *Dendrobium officinale*; Sugar free tissue culture; Explant screening; culture medium

引言

铁皮石斛(*Dendrobium officinale Kimura et Migo*)素有

“中华九大仙草之首”的美誉,具有滋阴清热、增强免疫力、抗肿瘤、降血糖等多种药理作用,多糖和石斛碱为其主要活性成

分^[1]。近年来,野生资源因过度采挖而急剧减少,已被列为国家二级保护濒危药材。组织培养因繁殖速度快、不受季节限制而成为人工繁育的核心手段^[2]。

传统组培以MS培养基,污染率通常高达10%~40%^[3];加之长期异养条件下组培苗叶片蜡质层薄、气孔开合功能不完善,移栽炼苗时成活率低^[4]。国内对铁皮石斛无糖组培的研究仍处于起步阶段,已有报道主要涉及无糖组培与传统组培的对比^[5],而对外植体类型、培养基质和植物激素配比等关键因素的系统优化尚未开展。不同外植体的再生能力差异显著;基质的物理结构直接影响根区通气性和养分吸收;激素种类与浓度对比对成活率和次生代谢产物积累具有决定性作用^[6],且传统组培中优化的激素方案在无糖条件下未必适用。因此,本研究针对上述三个关键因素开展系统优化实验,旨在为铁皮石斛无糖组培快繁体系的建立提供科学依据。

1 材料与方法

1.1实验材料

实验材料为三年生铁皮石斛幼苗(高山山石斛有限公司提供)及昆明学院农学与生命科学院组培室的继代培养苗。选取生长一致、无病虫害的茎段(长度3cm)、丛生芽(1~2cm)和叶片作为外植体^[7]。

1.2实验设计与方法

1.2.1外植体筛选

以茎段、丛生芽、叶片为外植体,分别进行无糖组培(实验组)和传统有糖组培(对照组)^[8]。无糖组培基质为蛭石,浇注无糖培养基母液(含0.5mg/L6-BA和0.1mg/LNAA),CO₂浓度750±50 ppm, pH5.8, 温度25±3℃, 相对湿度60%~70%, 光照10h/d、2000lx。传统组培采用MS+0.5mg/L6-BA+0.1mg/LNAA+3%蔗糖+0.62%琼脂, pH5.8。每处理接种20株, 重复3次, 培养60天。

1.2.2培养基质与营养液筛选

以茎段为外植体, 设置2种营养液(去除有机成分的改良MS和WPM)×2种基质(蛭石和珍珠岩)共4个无糖处理, 另设传统MS和传统WPM为对照, 以及初始苗空白对照。CO₂浓度750±50ppm, 全白光照射6:00~18:00, 其余条件同实验一。每处理20株, 重复3次, 培养60天^[9]。

1.3数据分析

采用Excel2016整理数据, SPSS22.0进行单因素方差分析(ANOVA), Duncan新复极差法进行多重比较(P<0.05)。结果以平均值±标准差表示^[10]。

2 结果与分析

2.1外植体类型对铁皮石斛无糖组培苗品质的影响

2.1.1传统组培中不同外植体的诱导情况

在传统组培中(表1), 丛生芽表现最优: 成活率90.00%, 污染率10.00%, 诱导率88.89%, 10天出芽, 芽总数60~70个。茎段次之: 成活率60.00%, 污染率40.00%, 诱导率83.33%, 12天出芽。叶片不能诱导出芽。

2.1.2无糖组培中不同外植体的诱导情况

表1 传统组培不同外植体诱导情况

外植体	污染率%	成活率%	诱导率%	出芽天数	诱导芽生长情况
茎段	40.00±12.14	60.00±11.56	83.33±3.67	12	芽 30~40 个
丛生芽	10.00±6.81	90.00±8.43	88.89±2.66	10	芽 60~70 个
叶片	40.00±10.45	60.00±5.5	0.00	——	无芽

在无糖组培条件下(表2), 仅茎段能够成活并诱导出新芽, 平均成活率66.67%, 平均污染率30.83%, 平均诱导率88.32%, 出芽时间约22天, 芽总数20~30个, 生长细弱至健壮不等。丛生芽和叶片在培养15天后开始发霉死亡, 25天左右全部死亡。

表2 无糖组培不同外植体诱导情况

外植体	污染率%	成活率%	诱导率%	出芽天数	诱导芽生长情况
茎段	30.83±9.73	66.67±13.11	88.32±5.14	22	20~30 芽
丛生芽	14.17±3.44	0.00	0.00	——	死亡
叶片	44.58±7.76	0.00	0.00	——	死亡

2.2培养基质与营养液对铁皮石斛无糖组培苗品质的影响

2.2.1污染率与成活率

由表3可知, 无糖组培各处理污染率均显著低于传统组培(2.5%~7.5%), 证实无糖环境有效抑制了微生物繁殖。成活率方面, 传统组培在排除污染后可达100%, 而无糖组培成活率为81.6%~92.1%。其中, 珍珠岩基质成活率(92.1%)高于蛭石基质(81.6%)。

表3 不同培养基质对铁皮石斛污染率与成活率的影响

处理组	污染率(%)	成活率(%)
传统 MS	12.5	100.0
传统 WPM	17.5	100.0
无糖蛭石 MS	2.5	84.6
无糖蛭石 WPM	5.0	81.6
无糖珍珠岩 MS	7.5	92.1
无糖珍珠岩 WPM	2.5	91.9

2.2.2活性成分积累

表4显示, 无糖珍珠岩WPM处理的多糖含量高达230.94 μg/mL, 是无糖蛭石MS的3.4倍、传统MS的3.5倍, 差异极显著(P<0.01)。无糖珍珠岩MS处理的石斛碱含量为14.92 μg/mL, 同样显著高于其他处理。这表明珍珠岩基质配合适宜营养液可大幅促进次生代谢产物积累。

3 讨论

3.1外植体选择

表4 不同培养基质对多糖和石斛碱含量的影响

处理组	多糖含量(μg/mL)	石斛碱含量(μg/mL)
传统MS	64.26±4.50	6.69±0.47
传统WPM	59.57±4.17	8.49±0.59
无糖蛭石MS	66.82±4.68	5.92±0.41
无糖蛭石WPM	77.48±5.42	7.46±0.52
无糖珍珠岩MS	118.19±8.27	14.92±1.04
无糖珍珠岩WPM	230.94±16.17	13.76±0.96
CK(初始苗)	90.26±6.32	8.62±0.30

在无糖组培中,茎段是唯一能够成活并诱导新芽的外植体,这与传统组培中丛生芽表现最优的结果形成鲜明对比。无糖体系中植株须通过光合作用自养,丛生芽虽在传统组培中增殖力强,但其叶面积小、光合能力弱,缺乏外源糖供应后难以存活;叶片缺乏腋芽,需经愈伤组织分化,对异养条件依赖性强。茎段含有充足的营养储备和完整的腋芽,能较快启动光合作用,因此为无糖组培的首选外植体^[11]。

3.2 基质与营养液

珍珠岩多孔、质轻、排水透气性好,有利于根区供氧、促进根系发育和养分吸收。WPM配合珍珠岩时多糖含量最高,MS配合珍珠岩时石斛碱含量最高,表明不同营养液的元素组成对特定次生代谢途径可能有差异化的诱导作用。生产中可根据目标产物选择营养液:以多糖为主选用WPM,以石斛碱为主选用MS^[12]。

3.3 无糖组培的优势与不足

无糖组培在基质优化后污染率可降至2.5%~7.5%,远低于传统组培的12.5%~17.5%;组培苗含水量较低、根系发达。但成活率(81.6%~92.1%)仍低于传统组培(100%),可能与CO₂浓度控制不稳定、培养初期湿度偏高及外植体自身光合能力差异有关^[13]。

4 结论

本研究系统优化了铁皮石斛无糖组培快繁体系的两个关键因素。茎段为无糖组培最佳外植体;珍珠岩为最佳基质,配合WPM可促进多糖积累(230.94 μg/mL),配合MS可促进石斛碱积累(14.92 μg/mL)。综合优化后,快繁阶段推荐茎段+珍珠岩+改良MS,品质培养阶段推荐茎段+珍珠岩+WPM。

[基金项目]

昆明市政府春城计划青年拔尖人才项目(C201914005);云南省科技厅云南省中青年学术与技术带头人后备人才项目(云科发〔2021〕62号)。

[参考文献]

[1]吴樟桦,胡莉,李锦妍,etal.广西铁皮石斛核苷类成分和多糖的含量研究[J].广州中医药大学学报,2023,40(07):1766-72.

[2]牟宁宁,高亦珂.植物无糖组培技术研究进展[J].林业科技开发,2007,(01):10-2.

[3]郭国业,徐梦琴,张乃群,etal.铁皮石斛茎段组织培养技术研究[J].园艺与种苗,2022,42(11):6-8.

[4]姜燕燕,李建民.铁皮石斛的组织培养和快速无性繁殖[J].青海草业,2021,30(03):19-25.

[5]王立,余翠婷.金线莲和铁皮石斛无糖组培与传统组培的对照试验[J].基因组学与应用生物学,2020,39(09):4162-70.

[6]戴忠华,朱华,笄筋芳,etal.植物生长物质在铁皮石斛生长中的作用[J].中华中医药学刊,2017,35(01):109-11.

[7]远凌威.三个产地铁皮石斛组织培养及其抗寒生理研究[D].信阳师范学院,2012.

[8]蔡正旺.铁皮石斛组织培养研究[J].湖北农业科学,2022,61(13):161-4.

[9]陈美钦.铁皮石斛无土栽培基质选择与营养液配方的优化[D].福建农林大学,2015.

[10]戚辉,陈健,易燕群,etal.不同产地铁皮石斛形态及有效部位成分含量比较[J].广州中医药大学学报,2013,30(04):558-61+605.

[11]饶宝蓉,陈泳和,江文清,etal.铁皮石斛不同外植体组培快繁技术比较[J].安徽农业科学,2017,45(04):138-41+95.

[12]周艳荣.铁皮石斛组织培养快速繁殖技术的优化[D].内蒙古农业大学,2018.

[13]何梅,章金辉,王再花,etal.CO₂倍增对铁皮石斛光合特性和生长的影响[J].广东农业科学,2020,47(02):17-23.

作者简介:

陈宗瀚(1994--),男,汉族,重庆人,在读硕士研究生,主要从事资源利用与植物保护研究。

*通讯作者:

宁眺(1978--),女,汉族,四川成都人,教授,主要从事功效成分挖掘和功能基因评价研究。