

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2012.02.018

铁皮石斛无菌播种产业化繁育技术研究

付传明, 赵志国, 黄宁珍, 何金祥*, 唐凤鸾, 石云平

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西 桂林 541006)
中国科学院

摘要:以铁皮石斛的蒴果为外植体,采用种子→原球茎→完整植株→移栽的途径快速成苗进行工厂化生产,对各阶段培养基进行筛选,以及其他一些影响因子进行比较研究。结果表明:人工授粉后生长60~180 d的铁皮石斛种子在离体条件下均能萌发,其中授粉150~180 d种子的萌发效果最好,萌发率为87.2%~94.4%,适宜的萌发培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+马铃薯汁 200 g/L+AC 1.0 g/L;原球茎增殖的最佳培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+香蕉汁 100 g/L+AC 1.0 g/L,繁殖系数约为20倍/50 d;原球茎在MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+马铃薯汁 200 g/L+AC 1.0 g/L培养基上进行分化培养,分化的同时还能进行一定的增殖;将已分化的芽苗转接到壮苗培养MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+香蕉汁 100 g/L+AC 1.0 g/L上培养1代后,转接到生根培养基1/2MS+NAA 0.8 mg/L+无机盐 A 0.2~0.5 mg/L+香蕉汁 100 g/L+AC 1.0 g/L上,培养50~70 d后,生根率100%,无机盐 A可以有效地控制愈伤或原球茎的形成,明显提高生根苗的数量和质量。在桂林地区,生根苗以3~5月和9~10为最佳移栽期,以通过高温处理并堆沤腐熟的松树皮为基质,移栽成活率可达90%。

关键词:铁皮石斛; 无菌播种; 原球茎; 产业化

中图分类号: S682 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)02-0238-05

Study on technology of aseptic sowing and rapid propagation of *Dendrobium officinale*

FU Chuan-Ming, ZHAO Zhi-Guo, HUANG Ning-Zhen,
HE Jin-Xiang*, TANG Feng-Luan, SHI Yun-Ping

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: Seeds of *Dendrobium officinale* could be used as explants to rapid propagate by the way of seed→protocorm→the whole plant→transplant, and medium in each culture stage and some other factors were studied comparatively. The results showed that all seeds of *D. officinale* which were 60-180 d, especially 150-180 d after pollination could germinate, with a germination rate of 87.2%-94.4%. The suitable medium for seed germination was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+potato 200 g/L+active carbon 1.0 g/L. The best medium for the formation and multiplication of protocorm was MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+banana mud 100 g/L+active carbon 1.0 g/L, the propagation coefficient was about 20 times/50 d. And the protocorm differentiated on MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+potato 200 g/L+active carbon 1.0 g/L medium, which could have some multiplication in the meantime. After being cultured on MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+banana mud 100 g/L+active carbon 1.0 g/L for a generation, the vigorous plantlets were transferred to rooting medium which was 1/2MS+NAA 0.8 mg/L+mineral salt A 0.2-0.5

① 收稿日期: 2011-07-04 修回日期: 2011-12-13

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 10100012-5); 广西林业厅项目(桂林科学[2011]第 16 号); 桂林市科学研究与技术开发计划项目(20110107-1); 广西植物研究所基本业务费项目(桂植业 12008)[Supported by Key Technology Research and Development Program of Guangxi(10100012-5); Program of Guangxi Provincial Forestry Department(2011-16); Scientific Research and Technology Development Program of Guilin(20110107-1); Fundamental Research Fund of Guangxi Institute of Botany(12008)]

作者简介: 付传明(1980-),男,湖北公安人,助理研究员,从事药用植物生物技术及环境微生物研究,(E-mail)fuchuanming2007@yahoo.com.cn。

* 通讯作者: 何金祥,研究员,主要从事病理生理及病虫害防治研究,(E-mail)hejinxiang@gxin.cn。

mg/L + banana mud 100 g/L + active carbon 1.0 g/L and were cultured for 50–70 d, with 100% rooting rate. Mineral salt A could effectively control the formation of callus or protocorm, and obviously improve the quality and quantity of root regeneration plants. The best time for the transplantation of root regeneration plants was March–May and September–October in Guilin area. The plantlets were transplanted into rotten pine bark handled with high temperature in seedbed of greenhouse resulted in more than 90% survival rates.

Key words: *Dendrobium officinale*; aseptic sowing; protocorm; industrialization

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 多年生草本植物, 是我国传统名贵珍稀中药材, 分布广泛, 具有益胃生津、滋阴清热等功效, 并以其味甘、质重、柔韧和黏性大而被视为药材珍品, 中华人民共和国药典 (2010) 从石斛药材中单列出来。铁皮石斛是一种生长缓慢、自身繁殖能力很低的兰科附生植物, 从开花授粉至果实成熟约需 6 个月。铁皮石斛自然条件下结果甚少, 果实为蒴果, 成熟时容易裂开, 种子随风飘荡散落, 这些细小的种子的种皮内只含未成熟的胚, 不含胚乳, 自然繁殖十分困难。而传统的分株、扦插等方式的繁殖率极低, 加上人为的过度采挖和破坏生境, 野生铁皮石斛已濒临灭绝。目前, 铁皮石斛已被列为国家重点保护药用植物、中国珍稀濒危二级保护植物和世界二类保护植物, 并被列入中国植物保护红皮书 (傅立国, 1992)。

随着生物工程技术的迅速发展, 组织培养工厂化育苗已在许多濒危物种上取得了成功, 采用植物组织培养技术对铁皮石斛进行工厂化生产, 不仅可以解决市场需求不足的问题, 对保护国家植物品种及维护国家生态都有深厚的意义。植物组织培养中, 外植体的选择是十分关键的因素, 选择不同的外植体培养的结果也不一样。目前已有的关于铁皮石斛组培快繁的研究报道, 多以茎段为材料, 繁殖速率较低, 无法达到工厂化快速大量生产种苗的要求。本实验研究中, 我们以铁皮石斛人工授粉获得的蒴果为外植体, 通过无菌播种诱导种子产生大量的原球茎途径进行增殖培养, 建立了铁皮石斛的快繁体系并应用于生产中, 其繁殖速度是丛芽增殖方式的数十倍, 出苗时间缩短, 出苗量大, 大大的节约生产成本, 提高经济效益, 在商业生产上具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

铁皮石斛野生植株引自广西、贵州和云南等地, 种植于广西桂林广西植物研究所内的兰花资源圃

内, 待开花后进行人工授粉并挂牌标记, 取优良株系的蒴果进行试验及生产。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件 以 MS 或 1/2MS 为基本培养基, 植物生长调节剂选用 6-BA 和 NAA, 根据实验目的和材料的生长情况添加不同的外源添加物, 包括马铃薯汁 (马铃薯洗净去皮切成小块, 加水煮烂, 用四层纱布过滤)、香蕉汁、红薯汁、玉米粉和麦麸粉, 并附加 20~30 g/L 蔗糖、1.0 g/L 的活性炭 (AC) 及 6.0 g/L 的琼脂粉, pH 值为 5.8。培养基配置分装后于 121 °C、压力为 105 Pa 的条件下灭菌 25 min。冷却后接入植物材料, 在温度 (25±3) °C、光照强度 30~40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间 12 h/d 的条件下培养。

1.2.2 种子的灭菌消毒 采摘人工授粉后生长 60~180 d 的尚未开裂的蒴果, 用自来水洗去表面灰尘, 并用刀片轻轻削去表面的脏物, 然后移至超净工作台内进行无菌操作, 先放入 75% 酒精中浸泡 30 s 后, 转入 0.1% HgCl_2 溶液中消毒 10 min, 期间不断摇动, 无菌水漂洗 5 遍, 用无菌滤纸吸干材料表面水分后将蒴果纵向剖开, 将里面细小的种子取出, 均匀的洒在培养基的表面。

1.2.3 种子的萌发 (1) 成熟度对种子萌发的影响: 分别选取人工授粉后生长 60、90、120、150 d 和 180 d 的铁皮石斛蒴果, 接种到培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+马铃薯汁 200 g/L+蔗糖 30 g/L+AC 1.0 g/L 上, 培养 30 d 后观测不同成熟度种子的萌发情况, 记录萌发所需时间并在 80 d 后于解剖镜下统计萌发率, 以胚膨大形成绿色原球茎为萌发标准。(2) 植物生长调节剂对种子萌发的影响: 选取人工授粉后生长 150~180 d 未开裂的铁皮石斛蒴果, 接种到培养基 MS+6-BA 0~2.0 mg/L+NAA 0~1.0 mg/L+马铃薯汁 200 g/L+蔗糖 30 g/L+AC 1.0 g/L 上, 培养一段时间后观测种子的萌发情况。

1.2.4 原球茎的继代增殖及分化培养 以 MS 为基本培养基, 添加不同的激素组合 (6-BA 0~2.0 mg/

L、NAA 0~0.1 mg/L)及添加物(马铃薯汁、香蕉汁、红薯汁、玉米粉和麦麸粉),接入由种子萌发的原球茎,培养 60 d 后,观测原球茎增殖及分化情况,筛选出铁皮石斛原球茎继代增殖及分化的最佳培养基配方。

1.2.5 生根及移栽 将经过壮苗培养的健壮丛芽分离成单芽,转移到不同的生根培养基中培养,实验中选定 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度的 NAA (0~1.0 mg/L),生根培养 60 d 后统计生根率[生根率(%)=(生根苗数/外植体数)×100]和平均根数(平均根数=根数/生根苗数)等指标,综合苗的生长情况,确定最佳生根培养基。

2 结果与分析

2.1 种子的萌发培养

铁皮石斛种子经消毒灭菌后播种到诱导萌发培养基上进行培养,通常 20 d 左右可观察到种子吸胀变大,由淡黄色变成绿色;30~50 d 时便可观察到种子变为绿色小球体状,即原球茎;继续培养原球茎便开始分化,发出绿色的芽尖,逐步长成芽苗。

2.1.1 不同成熟度对种子萌发的影响 铁皮石斛蒴果在成熟过程中,授粉 60 d 以内的蒴果内部种胚的颜色呈乳白色,90~180 d 时内部种胚由浅黄至黄色再逐渐变成白色粉状。比较发现,不同成熟度种子的萌发情况不同(表 1)。人工授粉后生长 60 d 以内的种子,萌发需时较长(60 d 以上),生长缓慢,萌发率仅为 38.5%,繁殖率低,大部分种子出现变黑、死亡的情况;授粉后 90~120 d 的种子,浅黄色,萌发时间短(25~40 d),生长较快,萌发率 73.9%~82.9%,少量种子变黑并死亡;授粉 150~180 d 的黄色或白色种子,萌发时间最短(15 d 左右),30 d 萌发率高达 94.4%,且长出的原球茎饱满、健壮,成苗率也有所提高。因此,铁皮石斛无菌播种应采用授粉后生长 150~180 d 未开裂的蒴果为佳。

2.1.2 不同激素组合对铁皮石斛种子萌发的影响 在铁皮石斛种子萌发过程中,通常选用 MS 为基本培养基,种子萌发率较高,原球茎生长效果好。培养基中添加不同的激素组合对铁皮石斛种子萌发及生长存在一定的影响(表 2)。相对较高的细胞分裂素浓度(6-BA 1.0~2.0 mg/L)有利于种子的快速萌发,而在相对较低的细胞分裂素浓度下种子萌发比较慢,但并不是细胞分裂素浓度越高越好。表 2 的

结果表明,6-BA 浓度高于 2.0 mg/L 时,尽管种子萌发速度快且萌发率高,但获得的原球茎在生长后期出现明显的玻璃化现象。生长素浓度对铁皮石斛种子萌发影响不如细胞分裂素大,NAA 使用浓度为 0.1~0.5 mg/L 时的种子萌发差别不明显,但 NAA 0.1 mg/L 种子萌发后原球茎的生长效果最好,适宜原球茎的增殖培养。在实验中我们还发现种子萌发培养基中添加 200 g/L 的马铃薯汁和 1.0 g/L 的活性炭对种子萌发后原球茎的生长效果更好,原球茎分化整齐,芽较健壮。因此,铁皮石斛种子萌发适宜的培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+马铃薯汁 200 g/L+AC 1.0 g/L。

表 1 不同成熟度种子的萌发情况
Table 1 The germination of *Demdrobium officinale* seeds with diferent maturities

培养基组成 Media	种子成熟度 Capsule maturity	种胚颜色 Embryo color	萌发所需时间 Germination time (d)	萌发率 Germination rate (%)
MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/ L+ 马铃薯汁 200 g/L+ AC 1.0 g/L	60 d	乳白色	60~80	38.5
	90	浅黄色	35~50	73.9
	120	淡黄色	30~40	82.9
	150	黄色	30~40	87.2
	180	黄色或白色	25~40	94.4

表 2 不同激素组合对种子的萌发的影响
Table 2 Effects of different hormone combination on seed germination

激素组合 Hormone combination 6-BA+NAA (mg/L)	萌发率 Germination rate (%)	原球茎生长情况 Protocorm growth
0+0	66.1	增殖少,深绿色,分化多,芽苗健壮
0.5+0.1	70.9	增殖少,深绿色,分化多,芽苗健壮
1.0+0.1	87.2	增殖多,深绿色,分化少,色较绿,适宜增殖
2.0+0.1	89.7	增殖多,浅绿色,分化少,后期玻璃化明显
1.0+0.2	86.4	增殖多,深绿色,分化少,色较绿
1.0+0.5	82.0	增殖多,深绿色,分化少,色较绿

2.2 原球茎的继代增殖及分化培养

将种子萌发获得绿色小球状原球茎,转接到不同配方的培养基中进行继代增殖培养,结果表明,不同激素组合及添加物对铁皮石斛原球茎的继代增殖和分化有较大的影响。

2.2.1 激素组合对原球茎继代增殖及分化的影响

从表 3 可以看出,在不加任何激素和添加物的 MS 培养基上,原球茎增殖少,分化的芽苗颜色浅绿、生长速度慢。当激素组合为 6-BA 1.5 mg/L、NAA

表 3 不同培养基上铁皮石斛原球茎增殖及分化情况

Table 3 Proliferation and differentiation of *Demdrobium officinale* protocorm on different mediums

编号 No.	培养基组成 Composition of medium	原球茎增殖、分化情况 Proliferation and differentiation of protocorm
1	MS	增殖少, 颜色浅绿; 少部分分化, 生长速度慢
2	MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.1mg/L+香蕉汁 100g/L+AC 1.0g/L	增殖速度中等, 生长良好, 颜色鲜绿; 少部分分化, 芽苗粗壮
3	MS+6-BA1.0mg/L+NAA 0.1mg/L+香蕉汁 100g/L+AC 1.0g/L	增殖速度中等, 生长良好, 颜色鲜绿; 少部分分化, 芽苗粗壮
4	MS+6-BA1.5 mg/L+NAA 0.1mg/L+香蕉汁 100g/L+AC 1.0g/L	增殖速度快, 生长良好, 颜色鲜绿; 少部分分化, 芽苗粗壮
5	MS+6-BA2.0mg/L+NAA 0.1mg/L+香蕉汁 100g/L+AC 1.0g/L	增殖速度快, 部分呈玻璃化现象; 少部分分化, 芽苗粗壮
6	MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.1 mg/L+马铃薯汁 200g/L+AC 1.0g/L	增殖少, 部分呈玻璃化现象; 分化较多, 色泽绿, 长势好
7	MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.1mg/L+红薯汁 100g/L+AC 1.0g/L	增殖少, 部分呈玻璃化现象; 少部分分化, 芽苗粗壮
8	MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.1mg/L+玉米粉 50g/L+AC 1.0g/L	生长及增殖速度慢; 少部分分化, 芽苗矮小
9	MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.1mg/L+麦麸粉 50g/L+AC 1.0g/L	增殖速度中等; 少部分分化, 芽苗矮小

0.1 mg/L 时, 原球茎增殖速度快, 颜色鲜绿, 长势较好, 繁殖系数约为 20 倍/50 d。当激素组合为 6-BA ≥ 2.0 mg/L、NAA 0.1 mg/L 时, 原球茎增殖速度很快, 但培养中后期逐渐出现玻璃化现象, 对下一步的壮苗和生根培养不利。因此, 铁皮石斛原球茎增殖的最佳激素组合为 6-BA 1.5 mg/L、NAA 0.1 mg/L。

2.2.2 添加物对原球茎继代增殖及分化的影响 培养基中添加物不同, 原球茎继代增殖及分化效果也不同。本试验所使用的 5 种添加物中, 玉米粉和麦麸粉对原球茎的生长不利, 而香蕉汁和红薯汁有利于原球茎的继代增殖, 其中以香蕉汁的效果最好, 原球茎增殖速度快, 生长良好, 颜色鲜绿。马铃薯汁能明显促进原球茎的分化, 芽苗分化最多, 分化向四面八方, 颜色鲜绿。

综合上述结果, 以培养基 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+香蕉汁 100 g/L+AC 1.0 g/L 对原球茎的增殖、MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+马铃薯汁 200 g/L+AC 1.0 g/L 对原球茎的分化效果最好。

2.3 壮苗培养

铁皮石斛的工厂化繁育种苗过程中, 由原球茎分化获得的芽苗经过一代壮苗培养更利于后面的生根培养及移栽, 可大大提高瓶苗质量和移栽成活率。壮苗培养时, 挑选高 2 cm 以上的小苗, 2~4 株每丛接种于壮苗培养基 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+香蕉汁 100 g/L+活性炭 1.0 g/L 中, 45 d 后, 苗长高到 3 cm 以上, 茎杆粗壮, 叶片平展且厚、深绿色, 便可用于生根培养。培养过程中还发现, 除了激素作用外, 香蕉汁和活性炭对壮苗有明显的促进作用。因此, 铁皮石斛壮苗培养基为 MS+6-

BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+香蕉汁 100 g/L+AC 1.0 g/L。

表 4 不同 NAA 浓度对铁皮石斛生根的影响

Table 4 Effects of different NAA concentration on *Demdrobium officinale* rooting

NAA 浓度 NAA concentration (mg/L)	生根率 Rooting rate (%)	平均根数(条) Average root number	平均根长 Average length of root (cm)	平均株高 Average height of plant (cm)
0	61	2.6	1.3	4.0
0.2	74	3.4	1.7	3.6
0.4	89	3.1	2.0	3.5
0.6	100	3.9	2.0	3.2
0.8	100	4.5	2.3	4.4
1.0	100	4.3	2.4	4.1

2.4 生根培养

未经多次继代培养的铁皮石斛芽苗活力较旺, 容易诱导根系的发生; 在生根的同时, 有一定的分蘖能力, 同时愈伤和原球茎的诱发能力也较强。培养基中低浓度的无机盐和蔗糖含量有利于铁皮石斛的生根。表 4 的结果表明, NAA 对诱发生根的作用十分明显, 其中 NAA 浓度为 0.6~1.0 mg/L 的生根率均达到 100%, 比较不同 NAA 浓度下根系形态和芽苗生长情况, 以 0.8 mg/L 的浓度平均根数多, 根系粗壮, 且芽苗生长良好。另外, 在多次实验中我们发现, 生根过程很容易诱发和形成一定数量的愈伤和原球茎, 这些愈伤和原球茎与正常生根苗竞争生存空间和营养, 在很大程度上降低了正常苗的数量和质量; 通过研究和探索, 我们发现, 在生根培养基中添加特殊的无机盐 A 0.2~0.5 mg/L, 对抑制铁皮石斛无效的愈伤组织或原球茎的形成十分明显, 且不影响苗的正常分蘖和生根, 还有促进生根苗长高长壮的作用。因此, 铁皮石斛适宜的生根培养基

为 1/2MS+NAA 0.8 mg/L+无机盐 A 0.2~0.5 mg/L+香蕉汁 100 g/L+蔗糖 20 g/L+AC 1.0 g/L。

2.5 驯化移栽

铁皮石斛组培苗适合的移栽季节,不同地区略有差异,在广西桂林通常为 3~5 月及 9~10 月。出瓶前,可将铁皮石斛试管苗转移到温室大棚内炼苗 15~20 d,然后打开瓶盖,将生长健壮的试管苗从瓶中取出,小心地将根部附着的培养基洗净,摊开,晾干植株表面水分便可种植,通常以 2~5 个单株聚集成一丛进行种植;移栽基质以腐熟的松树皮最佳,移栽后保持温度为 22~28 °C、湿度为 75%~80%,40 d 后统计,成活率达 90%。

3 结论与讨论

无菌材料的获得是植物组织培养的关键步骤,只有这一步骤做好了,才能为以后的生产提供足够的材料。铁皮石斛无性快繁采用的外植体材料主要有种子、茎段、叶片和根等,均能成功地再生出铁皮石斛种苗(赵天榜等,1994;秦廷豪,2008)。此外,詹忠根等(2004)试图以叶肉原生质体为外植体进行培养,但未获得再生植株。在所用的外植体材料中,研究茎段和种子外植体最多,效果最好(高立献等,1994;周俊辉等,2005),其中以茎段为外植体时的培养周期相对最短,培养 120 d 时可获得根系发达的完整种苗,以种子为外植体时,可以一步获得大量的原球茎,经过 300 d 左右的培养后可以获得数量巨大的优质种苗。可见,选用种子为外植体进行组培快繁在规模化和产业化上更具优势,这也是我们采用种子为快繁外植体的主要原因。

不同成熟度的铁皮石斛种子萌发情况不一样,授粉 60 d 以下的种子为乳白色,萌发率极低,萌发所需时间最长;60~120 d 的乳白或浅黄色种子,萌发期逐渐缩短,萌发率逐渐升高;120~180 d 的黄色或白色种子的萌发效果最好。在曾宋君等(1996)的研究中亦得到类似的结论。

植物生长调节物质对铁皮石斛种子萌发、原球茎增殖、原球茎分化及诱导生根等环节均有重要的影响。研究表明,一定浓度的 NAA 可促进种子的萌发,浓度为 0.2~0.5 mg/L 时最适合种子的萌发和生长(曾宋君等,1998;周丽,2006)。在原球茎增殖和分化阶段,6-BA 2.0 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L 的组合对原球茎的分化最好(张治国等,1993;罗吉

凤,2006);在培养基内添加 1.0 或 2.0 mg/L 的 NAA,可提高石斛种苗分蘖率 6.00~7.14 倍(赵天榜等,1994)。无菌苗生根时,0.5 mg/L 的 NAA 对试管苗的生根效果最好(唐桂香等,2005)。

在本研究中,我们发现,6-BA 和 NAA 浓度对种子的萌发率影响较小,但对原球茎的增殖及分化影响较大,铁皮石斛原球茎增殖和分化的最佳 6-BA 浓度分别为 1.5 mg/L 和 1.0 mg/L;浓度高于 2.0 mg/L 时,培养后期原球茎玻璃化现象严重,分化的芽苗质量较差。蒋慧萍等(2009)也发现,高浓度 6-BA 导致铁皮石斛原球茎出现水渍化的玻璃化现象,进一步证实了 6-BA 对铁皮石斛原球茎增殖和分化的作用,高浓度的 6-BA 虽可提高增殖速度,同时也降低了芽苗的质量,甚至出现变异。另外,铁皮石斛组培苗在生根过程中,通常诱发形成一定数量的愈伤或原球茎,消耗大量的营养和空间,降低组培生根苗的数量和质量。通过多年的研究和探索,在生根培养基中添加特殊无机盐 A 0.2~0.5 mg/L,可以有效地控制愈伤或原球茎的形成,明显提高生根苗和数量和质量。

参考文献:

- 周丽. 2006. 铁皮石斛胚培养与快速繁殖[J]. 黔西南民族师范高等专科学校学报[J], (3): 88-90
- 高立献,魏厚太,贺天顺. 1994. 铁皮石斛和曲茎石斛无菌播种试管育苗试验研究[J]. 中国林副特产, (1): 6-7
- 傅立国,金鉴明. 1992. 中国植物红皮书一稀有濒危植物[M]. 北京: 科学出版社: 492-493
- 蒋慧萍,庾韦花,张向军,等. 2009. 铁皮石斛种子胚培养的产业化研究[J]. 江苏农业科学, (2): 72-75
- Luo JF(罗吉凤), Cheng ZY(程治英), Long CL(龙春林). 2006. Studies on the rapid propagation and *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
- Qin TH(秦廷豪). 2008. Rapid propagation of *Dendrobium candidum in vitro* (铁皮石斛的组织培养与快速繁殖)[J]. *Chin J Trop Agric*(热带农业科学), 28(1): 25-29
- Tang GX(唐桂香), Huang FD(黄福灯), Zhou WJ(周伟军). 2005. Studies on the seed embryo germination and propagation of *Dendrobium candidum in vitro* (铁皮石斛的种胚萌发及其离体繁殖研究)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药志), 30(20): 1583-1588
- Zeng SJ(曾宋君), Cheng SJ(程式君). 1996. Tissue culture and rapid propagation of *Dendrobium* (石斛的试管苗快速繁殖)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材), 19(10): 490-491
- Zeng SJ(曾宋君), Cheng SJ(程式君), Zhang JL(张京丽), et al. 1998. Embryo culture and propagation of *Dendrobium in vitro* (下转第 273 页 Continue on page 273)

看,挥发性相同的化合物有 33 种,10 种主要成分中相同的有 7 种。说明水蒸气蒸馏法虽然对水香薷中不稳定成分有一定影响,但影响不到主要成分。

3.2 不同地方产水香薷挥发性成分比较

与白晓莉等(2011)报道数据相比较,云南产的水香薷挥发性主要成分包括油酸乙酯(24.22%)、乙酸丁香酚酯(11.71%)、邻苯二甲酸丁基酯 2-乙基己基酯(11.43%)、十六酸乙酯(8.66%)、邻苯二甲酸二丁酯(5.51%)等。与本文所得的数据差异较大。

表 2 水香薷挥发性成分的体外抑菌作用

Table 2 The antimicrobial activity of volatile chemical constituents of the *E. kachinensis* in vitro

供试菌株 Tested strains	抑菌圈直径 (mm) Diameter of zone of inhibition	最小抑菌浓度(MIC) ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Minimal inhibitory concentration
金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)	9/20*	640/0.3
枯草芽孢杆菌(ATCC 9372)	10/22	320/0.2
大肠杆菌(ATCC 25922)	7/18	1300/0.64
铜绿假单胞菌(ATCC 27853)	6/14	1300/4.2

注: 9/20*, 斜杠前的数值 9 为水香薷的对应值, 斜杠后的数值 20 为环丙沙星的对值。

Note: 9/20*, the number before the slash 9 is *Elscholtzia kachinensis*'s response value, the number after the slash 20 is ciprofloxacin's response value.

3.3 水香薷挥发性成分的体外抑菌作用

很多植物挥发油具有抗菌作用,水香薷挥发性成分也显示出具有广谱抗菌作用,由于成分复杂,很难了解到究竟是哪些成分发挥抗菌效果。几百年来,贵州省榕江县当地侗族人民保持了食用生鲜香薷的习惯,认为能预防肠道感染,本试验为水香薷的民间用法提供了科学依据。

致谢 贵州省、中科院天然产物化学重点实验室对样品进行气相色谱-质谱联用分析。

参考文献:

- 赵树年,等. 1999. 萜类化合物大全[M]. 云南科技出版社:145-465
- 施钧慧,汪聪慧. 1992. 香料质谱图集[M]. 北京:中国质谱学会
- Bai XL(白晓莉),Zheng Lin(郑琳),Liu YY(刘煜宇),et al. 2011. *Elscholtzia kachinensis* prain as flavor and the analysis of volatile composition(水香薷香料的制备及挥发性成分分析)[J]. *Chin Food Add(中国食品添加剂)*,3:144-146
- He FZ(何福江),Shi XF(石晓峰). 1995. Studies on volatile components of *Elscholtzia kachinensis* (香薷挥发油化学成分的研究)[J] *Chin J Pharm Anal(药物分析)*,5
- Li JE(李景恩),Nie SP(聂少平),Yang MY(杨美艳). 2008. Determination of polysaccharides in *Elscholtzia kachinensis* (香薷中多糖含量的测定)[J]. *Food Sci(食品科学)*,29(9):487-490
- Tao C(陶晨),Wang DP(王道平),Yang XS(杨小生),et al. 2011. Solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry method for the determination of 8 kinds of apple aroma components (固相微萃取气相色谱质谱法对 8 种苹果香气成分的测定)[J]. *J Gansu Agric Univ(甘肃农业大学学报)*,46(1):122-126
- Tao C(陶晨),Luo YN(罗亚男),Yang XS(杨小生),et al. 2011. Analysis of chemical component of volatile oil of *Gaultheria yunnanensis* root in Guizhou(黔产透骨香根挥发油化学成分分析)[J]. *J Anhui Agric Sci(安徽农业科学)*,39(1):114-117
- Yuan MZ(袁卯祉),Mao ZX(毛志先). 1990. Chemical constituents of *Elscholtzia kachinensis* (水香薷的化学成分)[J]. *Chin Trad Patent Med(中成药)*,12(10):31-32
- Zhang ZH(张忠华),Yin JZ(殷建忠). 2008. Pharmacological effect and research progress of development and application of *Lamiaceae elsholtzia* phyto-chemical constituents(唇形科香薷属植物化学成分药理作用及开发应用研究进展)[J]. *Yunnan J Trad Chin Med(云南中医中药)*,29(8):48-50
- Alam MT,Karim MM,Khan SN. 2009. Antibacterial activity of different organic extracts of *Achyranthes aspera* and *Cassia alata*[J]. *J Sci Res*,1(2):393-398

(上接第 242 页 Continue from page 242)

(五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究)[J]. *Acta Hort Sin(园艺学报)*,25(1):75-80

Zhan ZG(詹忠根),Xu C(徐程),Zhang M(张铭). 2004. Study on isolation and culture of mesophyll protoplasts of *Dendrobium officinale*(铁皮石斛叶肉原生质体的分离与培养研究)[J]. *J Zhejiang Univ(浙江大学学报)*,31(2):193-196

Zhang ZG(张治国),Wang L(王黎),Liu H(刘骅),et al. 1993. Studies on culture medium for protocorm differentiation in *Dendrobium*(铁皮石斛原球茎分化适宜培养基研究)[J]. *China J*

Chin Mat Med(中国中药杂志),18(1):16-19

Zhao TB(赵天榜),Chen ZK(陈占宽). 1994. Study on *Dendrobium* tissue culture and planting techniques(石斛组织培养与栽培技术的研究)[J]. *Acta Agric Univ Henan(河南农业大学学报)*,28(2):128-133

Zhou JH(周俊辉),Zhong XF(钟雪锋),Cai DW(蔡丁稳). 2005. Study of tissue culture and rapid propagation in *Dendrobium candidum*(铁皮石斛的组织培养与快速繁殖研究)[J]. *J Zhongkai Univ Agric Tech(仲恺农业技术学院学报)*,18(1):23-26