

铁皮石斛茎段类原球茎的诱导及植株再生

袁 芳, 宋凯杰, 杨泽东, 王 兵, 蔡熙彤, 兰小中*

(西藏农牧学院, 西藏 林芝 860000)

摘 要:以铁皮石斛幼嫩的带节茎段为外植体,通过研究植物生长调节剂对类原球茎诱导、增殖和分化的影响,筛选出适宜铁皮石斛类原球茎植株高效再生的条件。结果表明:类原球茎诱导的最适培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+土豆泥 60 g/L+活性炭 0.5 g/L+蔗糖 25 g/L+琼脂 6.5 g/L,茎段接种 45 d后,类原球茎诱导率为97.78%;类原球茎增殖和分化的最适培养基为MS+6-BA 2.5 mg/L+IBA 1.0 mg/L,培养 30 d,增殖倍数为7.94,培养至 60 d,丛生芽诱导率为97.33%;再生苗在MS+NAA 0.5 mg/L培养基中培养 30 d,生根率达到100%。

关键词:铁皮石斛;茎段;类原球茎;植株再生;组织培养

中图分类号:Q813.1

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2019)04-0066-06

Protocorm-like Bodies Induction and Plant Regeneration from Stem Segments of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

YUAN Fang, SONG Kaijie, YANG Zedong, WANG Bing, CAI Xitong, Lan Xiaozhong*

(Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Nyingchi 860000, China)

Abstract: In order to establish an efficient plant regeneration system, young stem segments of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo were used as explants, and the effects of plant growth regulators on the protocorm-like body (PLB) induction, proliferation and differentiation were studied. The results showed that the optimum medium for PLB induction was MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L + mashed potato 60 g/L + acticarbon 0.5 g/L + sucrose 25 g/L + agar 6.5 g/L, and the PLB induction rate was 97.78% after cultured for 45 d. The optimum medium for PLB proliferation and differentiation was MS + 6-BA 2.5 mg/L + IBA 1.0 mg/L, the proliferation multiple of PLB reached 7.94 after cultured for 30 d, and the induction rate of cluster bud was 97.33% after cultured for 60 d. The optimum rooting medium was MS + NAA 0.5 mg/L, and the rooting rate was 100% after cultured for 30 d.

Keywords: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; stem; protocorm-like body; plant regeneration; tissue culture

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为兰科石斛属多年生草本植物,是中国特有的名贵药材,其新鲜茎或干燥茎均可入药。医学经典《道藏》中称铁皮石斛为中华“九大仙草”之首,民间将其称为“救命仙草”^[1-3]。《中国药典》记载:铁皮石斛味甘,性微寒,归胃、肾经;具有益胃生津,滋阴清热的功效^[4]。现代药理研究表明,铁皮石斛含有多糖类、生物碱类、倍半萜类及挥发油等多种药用成分,多糖和生物碱是其最重要的生物活性成分,具有提高免疫力、抗肿瘤、降血

糖、抗氧化等作用^[5-8]。野生铁皮石斛对生长条件要求苛刻,自然繁殖力极低,生长缓慢。因其具有极高的药用与经济价值,人们长期掠夺性的采挖,致使野生铁皮石斛资源濒临枯竭,已被《国家重点保护野生植物名录》(第二批讨论稿)列为Ⅰ级保护植物^[9]。为了解决这一供需矛盾,保护野生铁皮石斛资源,铁皮石斛的组培快繁技术研究一直受到关注。

目前铁皮石斛外植体材料选用最为广泛的是种子^[2, 10-12]和茎段^[13-18]。以种子为外植体诱导原球茎的一次成苗研究较多,原球茎增殖系数和分化率高,但种子可获得量少,生产出的种苗变异、混杂现象严重。用茎段为外植体主要诱导不定芽或丛生芽,发生过程简单,种苗性状稳定,但产量有限。而有关铁皮石斛茎段类原球茎诱导增殖的研究报道甚少,类原球茎诱导率低,增殖缓慢,组培

收稿日期:2018-11-27

基金项目:西藏自治区高校青年教师创新支持计划项目(QCZ2016-54)

作者简介:袁 芳(1983-),女,讲师,硕士,主要从事药用植物资源与开发利用研究。

通讯作者:兰小中,男,博士,教授,E-mail: lanxiaozhong@163.com

快繁体系不完善的问题仍然存在^[17-18]。类原球茎 (protocorm-like body, PLB) 是铁皮石斛组培过程中产生的类似原球茎的一种特殊组织结构, 具有易分散、增殖效率高、生长周期短、可实现规模化生产、分化后可得大量幼苗的特点, 并具备与原植物同样的形态发育和物质代谢潜能^[19-20]。因此, 以铁皮石斛的茎段为外植体, 系统研究不同种类及其不同质量浓度的植物生长调节剂组合对类原球茎诱导、增殖及植株再生的影响, 旨在建立一种铁皮石斛茎段类原球茎途径的高效快速繁殖方法, 为推进铁皮石斛产业化进程提供科学依据和理论基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

铁皮石斛为浙江雁荡山红杆软脚品种, 由浙江省乐清市大荆寒岩铁皮石斛经营部提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的预处理与消毒

选择生长旺盛的铁皮石斛幼嫩枝条, 剥去节上叶片和膜质叶鞘, 用洗洁精清洗后, 用解剖刀轻轻刮去表面脏物, 自来水冲洗 30 min。在超净工作台上将枝条剪成约 6 cm 长的茎段, 用 75% 乙醇消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次, 再放入 0.1% 的 Hg-

Cl₂ 溶液中消毒 10 min, 无菌水冲洗 3 次, 并用无菌水浸泡茎段 30 min; 消毒过程中不断轻轻摇动烧杯以便消毒剂 and 茎段充分接触。将消毒完毕的茎段置于无菌滤纸上吸干表面的水分, 剪成约 1.5 cm 长带茎节的小段, 接种到不同的不定芽和类原球茎诱导培养基上。

1.2.2 不定芽和类原球茎的诱导

根据文献报道^[2, 5, 13-17, 19-20], 用于铁皮石斛组织培养的基本培养基大多数为 MS、1/2 MS 培养基, 成功应用于种子原球茎诱导、增殖与分化的植物生长调节剂有 6-BA、KT、2, 4-D、NAA、IAA 和 IBA 等。根据本课题组前期研究, 本试验以 MS 为基本培养基, 添加不同质量浓度的 6-BA (1.0、2.0、3.0 mg/L)、IBA (0.5、1.0 mg/L) 和 NAA (0.5、1.0 mg/L), 配制成 12 种不同的类原球茎诱导培养基, 以不添加植物生长调节剂的培养基作为对照 (表 1)。将带节茎段以竖立的方式分别接种到试验培养基中, 每个处理接种 30 个外植体, 每瓶接种 10 个, 重复 3 次。观察不定芽和类原球茎的生长状态, 培养 45 d 后统计诱导率, 筛选出最适类原球茎诱导培养基。不定芽诱导率 = 萌发不定芽的外植体数 / 外植体总数 × 100%, 类原球茎诱导率 = 形成类原球茎的外植体数 / 外植体总数 × 100%。

表 1 不同植物生长调节剂组合对铁皮石斛茎段不定芽和类原球茎诱导的影响

培养基编号	植物生长调节剂种类及质量浓度 (mg/L)			不定芽诱导率 (%)	类原球茎诱导率 (%)
	6-BA	IBA	NAA		
A1	0	0	0	42.22±1.57 e	0.00 f
A2	1.0	0	0.5	66.67±2.72 c	0.00 f
A3	1.0	0	1.0	73.33±2.72 c	0.00 f
A4	2.0	0	0.5	87.78±4.16 b	13.33±2.72 e
A5	2.0	0	1.0	75.56±3.14 c	0.00 f
A6	3.0	0	0.5	96.67±2.72 a	32.22±3.14 d
A7	3.0	0	1.0	93.33±2.72 ab	0.00 f
A8	1.0	0.5	0	21.11±3.14 f	82.22±1.57 b
A9	1.0	1.0	0	5.56±1.57 g	97.78±1.57 a
A10	2.0	0.5	0	58.89±3.14 d	35.56±1.57 d
A11	2.0	1.0	0	53.33±2.72 de	46.67±2.72 c
A12	3.0	0.5	0	85.56±1.57 b	11.11±1.57 e
A13	3.0	1.0	0	90.00±2.72 ab	15.56±1.57 e

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

1.2.3 类原球茎的增殖培养

根据本试验 1.2.2 的试验结果, 将 6-BA 和 IBA 作为类原球茎增殖培养时的植物生长调节剂, 并优化其质量浓度。增殖培养基以 MS 为基本培养

基, 添加不同质量浓度的 6-BA (1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L) 和 IBA (0.5、1.0、1.5 mg/L), 并以最适类原球茎诱导培养基 (6-BA 1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L) 作为对照 (表 2)。将生长良好的类原球茎用镊子分离

成小团,分化尖向上,接种到增殖培养基中,每个处理接种3瓶,重复3次。培养30 d后,观察类原球茎的生长状态,统计类原球茎增殖倍数,筛选

出最适类原球茎增殖培养基。类原球茎增殖倍数(倍)=(增殖后类原球茎的重量-起始类原球茎重量)/起始类原球茎重量。

表2 不同质量浓度6-BA和IBA对铁皮石斛类原球茎增殖的影响

培养基编号	植物生长调节剂种类及质量浓度(mg/L)		类原球茎增殖倍数(倍)	生长状态			
	6-BA	IBA		颜色	形态	紧密程度	分化程度
B1	1.0	0.5	3.36±0.13 de	黄绿色	细弱	疏松	少量
B2	1.0	1.0	4.07±0.16 d	黄绿色	细弱	疏松	少量
B3	1.0	1.5	1.80±0.13 ef	黄绿色	细弱	疏松	未分化
B4	1.5	0.5	4.55±0.17 cd	浅绿色	细弱	紧密	少量
B5	1.5	1.0	4.21±0.17 cd	浅绿色	细弱	疏松	少量
B6	1.5	1.5	2.37±0.17 e	黄绿色	细弱	疏松	少量
B7	2.0	0.5	5.14±0.18 c	绿色	饱满	紧密	大量
B8	2.0	1.0	8.07±0.09 a	浅绿色	饱满	疏松	大量
B9	2.0	1.5	2.13±0.15 ef	绿色	细弱	疏松	少量
B10	2.5	0.5	3.17±0.17 de	深绿色	饱满	紧密	少量
B11	2.5	1.0	7.94±0.11 a	浅绿色	饱满	疏松	大量
B12	2.5	1.5	6.86±0.06 b	绿色	饱满	疏松	少量

1.2.4 类原球茎的分化培养

根据本试验1.2.3的试验结果,分化培养基以MS为基本培养基,添加不同质量浓度的6-BA(2.0、2.5 mg/L)和IBA(0.5、1.0 mg/L)(表3)。将增殖培养后的类原球茎分散开,选取生长情况基本相同、生长良好的类原球茎接种到分化培养基

中,每个处理接种50个类原球茎,重复3次。30 d后观察丛生芽的生长状态,统计类原球茎分化率,筛选出最适类原球茎分化培养基。丛生芽诱导率=分化后的丛生芽总数/起始类原球茎总数×100%。

表3 不同质量浓度6-BA和IBA对铁皮石斛类原球茎分化的影响

培养基编号	植物生长调节剂种类及质量浓度(mg/L)		丛生芽诱导率(%)
	6-BA	IBA	
B7	2.0	0.5	72.00±1.63 b
B8	2.0	1.0	95.33±0.94 a
B10	2.5	0.5	58.67±1.70 c
B11	2.5	1.0	97.33±1.89 a

1.2.5 生根培养

类原球茎分化培养60 d后,选取长势较好、茎叶健壮、高2~3 cm的无根丛生芽,分离成单株,接种到生根培养基中。生根培养基以MS为基本培养基,添加不同质量浓度的NAA(0.3、0.5、1.0 mg/L)、IBA(0.3、0.5、1.0 mg/L),以不添加植物生长调节剂的培养基作为对照。每个处理接种30株芽苗,每瓶接种15株,重复3次。30 d后统计生根率、生根数和根长,筛选出最适生根培养基。生根率=生根幼苗数/接种幼苗总数×100%。

1.2.6 培养条件

本试验中诱导、增殖分化和生根培养基中均添加土豆泥60 g/L、活性炭0.5 g/L、蔗糖25 g/L、琼

脂6.5 g/L,pH 5.6~5.8。培养室温度(25±2)℃、光照时间12 h/d、光照强度2 000 lx。

1.3 数据处理

试验数据采用Excel 2010进行整理和作图,SPSS 19.0进行差异显著性分析(P<0.05)。

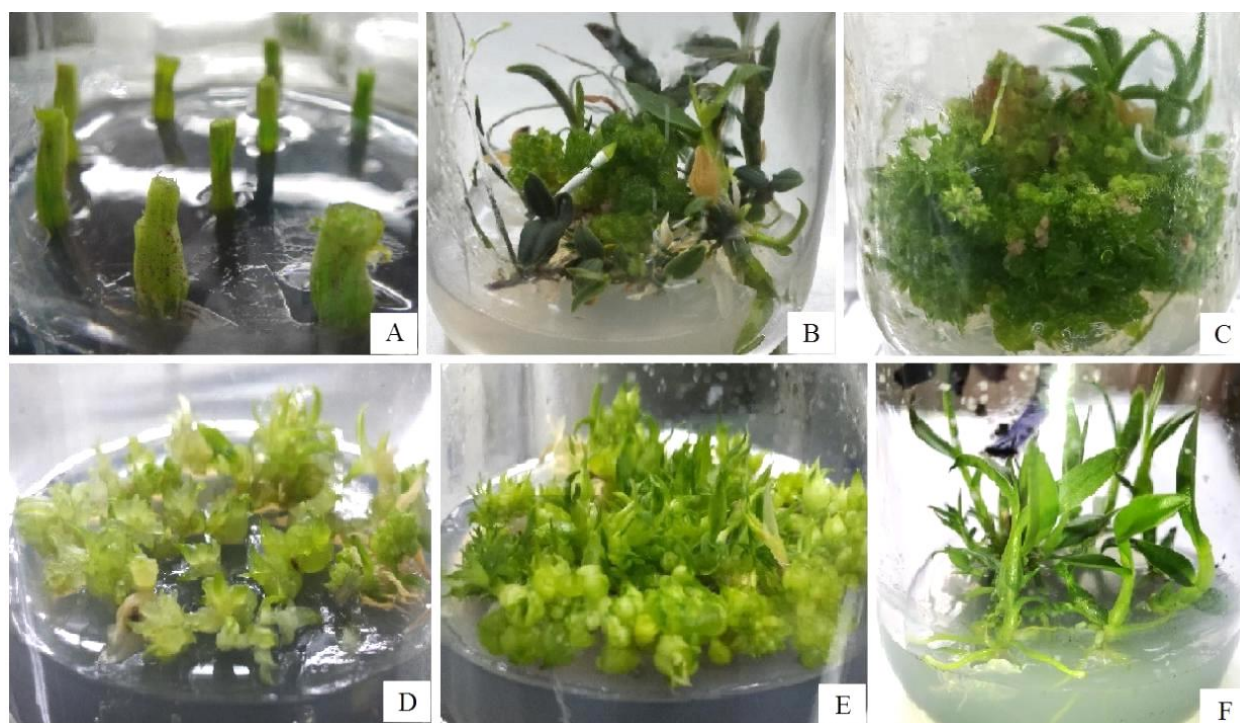
2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂组合对铁皮石斛茎段不定芽和类原球茎诱导的影响

将带节茎段接种到类原球茎诱导培养基中,培养45 d后统计不定芽和类原球茎的诱导情况,试验结果显示,不同质量浓度的6-BA、NAA和IBA对不定芽和类原球茎的诱导效果明显不同

(表1)。6-BA和NAA可以促进不定芽的形成,茎段接种后10 d左右,在茎节有不定芽萌动,而20 d左右形成不定根,但类原球茎诱导效果较差。随着6-BA和NAA质量浓度及6-BA/NAA比例的提高,仅有少数茎段或芽苗的茎基部愈伤化发育形成类原球茎。6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L处理条件下,不定芽诱导率最高,为96.67%,芽苗健壮,根系发达,生长旺盛,但类原球茎诱导率仅为32.22%,且形成的桑椹状类原球茎团的体积较小,增殖缓慢(图1-A、B)。6-BA和IBA各处理均能诱导不定芽和类原球茎。6-BA为同一质量浓度时,IBA的质量浓度从0.5 mg/L提高到1.0 mg/L,类原球茎诱导率明显提高。当6-BA为1.0 mg/L

时,类原球茎的诱导增殖随着IBA质量浓度的升高而占明显优势,不定芽则诱导率较低且长势差,有些叶片变黄枯死,幼茎愈伤化形成类原球茎。6-BA 1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L处理条件下,类原球茎诱导率最高,为97.78%,类原球茎呈浅绿色或绿色,颗粒状膨大,生长快,少量类原球茎开始分化,其形态学顶端有圆锥状的叶原基凸起(图1-A、C)。当6-BA的质量浓度大于2.0 mg/L时,不定芽诱导率明显提高,长势旺盛,对类原球茎的诱导和增殖产生抑制作用。不添加植物生长调节剂的MS培养基中,未观察到类原球茎的形成。因此,诱导铁皮石斛茎段类原球茎的最适培养基为A9:MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L。



A. 带节茎段; B. 茎段诱导的类原球茎和不定芽(A6培养基); C. 茎段诱导的类原球茎和不定芽(A9培养基);
D. 类原球茎增殖; E. 类原球茎分化形成丛生芽,同时增殖产生新的类原球茎; F. 生根试管苗

图1 铁皮石斛茎段类原球茎诱导形成再生植株的过程

2.2 不同质量浓度6-BA和IBA对铁皮石斛类原球茎增殖和分化的影响

铁皮石斛带节茎段在最适类原球茎诱导培养基(A9)中培养45 d左右,少部分类原球茎开始分化出叶原基,长势旺盛,这说明6-BA和IBA组合也是类原球茎增殖分化的关键因素,应优化其质量浓度。结果表明(表2),当6-BA的质量浓度分别为1.0 mg/L和1.5 mg/L时,类原球茎增殖倍数较低,且随着IBA质量浓度的提高,类原球茎的长势越差。当6-BA的质量浓度分别为2.0 mg/L和2.5 mg/L时,与IBA 0.5 mg/L组合的处理下,类原球茎颗粒饱满鲜绿,但类原球茎紧密的聚生在一起,

质地较硬,靠近培养基一侧的类原球茎褐化;与IBA 1.0 mg/L组合的处理下,类原球茎的增殖效果最好,6-BA 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L培养基中类原球茎增殖倍数为8.07,6-BA 2.5 mg/L+IBA 1.0 mg/L培养基中类原球茎增殖倍数为7.94,两者差异不显著,但从类原球茎的生长状态来看,后者增殖培养类原球茎颗粒饱满,长势更为均一,可见大量类原球茎上分化出的叶原基凸起(图1-D);与IBA 1.5 mg/L组合的处理下,类原球茎增殖倍数显著下降。因此,铁皮石斛最适的类原球茎增殖培养基为B11:MS+6-BA 2.5 mg/L+IBA 1.0 mg/L。

根据类原球茎增殖培养的试验结果,将B7、

B8、B10 和 B11 培养基上长势良好的类原球茎分别继代到同一培养基上。分化培养 30 d 后,不同质量浓度的 6-BA 和 IBA 对丛生芽的诱导效果明显不同。结果表明(表 3),当 6-BA 的质量浓度分别为 2.0 mg/L 和 2.5 mg/L 时,随着 IBA 质量浓度的提高,可显著促进类原球茎的分化,6-BA/IBA 的比值高会抑制丛生芽的诱导和生长。在 B11 培养基中,类原球茎分化率达到 97.33%,丛生芽色泽正常、健壮、成活率较高,有些丛生芽成为具有茎和叶的芽苗,但不具根,同时又有新的类原球茎产生(图 1-E)。因此,B11 培养基也适用于类原球茎的分化培养。

2.3 不同质量浓度 NAA、IBA 对铁皮石斛丛生芽

生根的影响

将分化培养 60 d 后,高 2~3 cm 的丛生芽接种到生根培养基中,结果表明(表 4),不同质量浓度的 NAA、IBA,以及不添加植物生长调节剂的 MS 培养基均能诱导铁皮石斛丛生芽生根。NAA 质量浓度为 0.3~1.0 mg/L,IBA 质量浓度为 1.0 mg/L 时,生根率都达到 100%,但生根数和根的长度差异较大,根的生长状态不同;其中当 NAA 质量浓度为 0.5 mg/L 时,平均生根数达到 5.5 条,根的平均长度达到 6.1 cm,根系发达,试管苗生长最旺盛(图 1-F)。因此,MS+NAA 0.5 mg/L 为铁皮石斛丛生芽最适宜的生根培养基。

表 4 不同质量浓度 NAA、IBA 对铁皮石斛丛生芽生根的影响

培养基编号	植物生长调节剂种类及质量浓度(mg/L)		生根率(%)	生根数(条)	根长(cm)	生长状态
	NAA	IBA				
C1	0	0	61.11±4.16 d	1.9±0.1 de	1.6±0.2 e	生长慢,根细弱,
C2	0.3	0	100.00±0.00 a	3.6±0.2 c	4.0±0.2 c	生长较快,根粗壮
C3	0.5	0	100.00±0.00 a	5.5±0.1 a	6.1±0.1 a	生长快,根粗壮
C4	1.0	0	100.00±0.00 a	2.7±0.2 d	3.3±0.1 d	生长慢,根粗壮
C5	0	0.3	86.67±5.44 c	2.2±0.1 d	3.1±0.1 d	生长慢,根细弱
C6	0	0.5	95.56±3.14 b	4.3±0.1 b	5.2±0.2 b	生长较快,根细弱
C7	0	1.0	100.00±0.00 a	5.1±0.2 a	5.6±0.1 b	生长快,根粗壮

3 讨论与结论

铁皮石斛是一种具有很高观赏价值和药用价值的兰科石斛属植物。目前,已有很多关于铁皮石斛组织培养的研究报道,但是有关铁皮石斛茎段类原球茎诱导及植株再生的研究报道甚少。林江波等^[17]将铁皮石斛茎段接种到 1/2 MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基中,培养 2 个月后将腋芽萌发长出的不定芽切下继代培养,3 个月后的类原球茎诱导率为 37.9%;在 MS+蔗糖 30 g/L 培养基中,有 13.9% 的类原球茎得到有效增殖;在 1/2 MS+土豆泥 10%+蔗糖 10 g/L 培养基中,类原球茎分化率为 7.8%;培养基 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L+土豆泥 10%+香蕉泥 10%能够诱导再生苗生根。李莉梅等^[18]的研究中,以铁皮石斛无菌组织培养苗的嫩茎为外植体,在 MS+PBU 2.0 mg/L+IAA 0.05 mg/L 培养基中愈伤诱导率达到 100%;在不添加植物生长调节剂的 MS 培养基中,愈伤组织没有分化出类原球茎;在 MS 培养基中添加不同植物生长调节剂组合后,愈伤组织既能分化出幼苗也能分化出类原球茎,但未具体说明植物生长调节剂的种

类和质量浓度,以及类原球茎的诱导情况。已有的文献报道^[2, 11~20]表明,一定质量浓度的 6-BA 和 NAA 配合使用,可高效促进铁皮石斛种子原球茎及茎段不定芽或丛生芽的诱导、增殖和分化。在本试验中,6-BA 和 NAA 可诱导铁皮石斛的茎段形成类原球茎,茎段在 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基中的类原球茎诱导率为 32.22%,6-BA/NAA 的比值较高有利于类原球茎的诱导,这与林江波等^[17]的研究结果相符。本试验结果表明,6-BA 和 IBA 比 6-BA 和 NAA 更有利于铁皮石斛茎段类原球茎的诱导,茎段在 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L 培养基中愈伤化进一步发育形成类原球茎,培养 45 d 后,可见球形或圆锥形的颗粒状类原球茎,聚生在一起呈桑葚状,诱导率达到 97.78%。另外,本试验中 6-BA 和 IBA 的植物生长调节剂组合对类原球茎的增殖和分化也有显著的促进作用,添加 6-BA 2.5 mg/L 和 IBA 1.0 mg/L 的 MS 培养基中,类原球茎增殖倍数为 7.94,97.33% 的类原球茎分化出丛生芽。在生根阶段,0.3~1.0 mg/L NAA 或 IBA 均能诱导芽苗生根,NAA 诱导生根的整体效果优于 IBA,这与前人

研究结果相符。

本研究以铁皮石斛的带节茎段为外植体,建立了铁皮石斛类原球茎途径植株高效再生体系。从茎段愈伤化发育形成类原球茎到获得苗高约5 cm的带根试管苗只需6~7个月,类原球茎诱导率、丛生芽诱导率及生根率均达到95%以上。与前人的研究结果^[17-18]相比较,本研究从茎段类原球茎的诱导、增殖分化及生根等方面对铁皮石斛进行了较为系统和全面的组培快繁研究,获得了较高的类原球茎诱导率、类原球茎增殖倍数、丛生芽诱导率和生根率,缩短了组培周期,节约了组培成本。

参考文献:

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 117.
- [2] 任海虹, 王景雪, 聂 菁. 铁皮石斛原球茎高效再生体系的研究[J]. 中草药, 2017, 48(19): 4057-4061.
- [3] 周玉飞, 康专苗, 彭竹晶. 珍稀濒危铁皮石斛的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(4): 1629-1635.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 282-283.
- [5] Yang F, Wei N N, Gao R, et al. Effect of several medium factors on polysaccharide and alkaloid accumulation in protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* during bioreactor culture [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37: 94-99.
- [6] 孙 恒, 胡 强, 金 航, 等. 铁皮石斛化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 225-234.
- [7] 雷思敏, 肖 榕, 章 莹, 等. 铁皮石斛中性多糖分离纯化及其体内免疫调节作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(6): 748-753.
- [8] 张雪琴, 赵庭梅, 刘 静, 等. 石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(13): 3174-3182.
- [9] 中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危植物名录[DB/OL]. <http://rep.iplant.cn/protlist>, 2013-12-16/2018-10-16.
- [10] 杨小兵, 王增利, 史 昊, 等. 光强对悬浮培养下铁皮石斛原球茎生长的影响[J]. 河南农业科学, 2014, 43(1): 116-119.
- [11] 卢 莉, 刘晓芳, Saad A R, 等. 铁皮石斛高效快速繁殖体系研究[J]. 山西农业科学, 2018, 46(6): 885-888, 909.
- [12] 李景燕, 张丽华, 张 宇. 中药材铁皮石斛组培苗不同培养基的筛选与优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(6): 2551-2557.
- [13] 朱启发, 朱亚雄. 铁皮石斛茎段离体快繁研究进展[J]. 安徽农学通报, 2015, 21(8): 37-38, 52.
- [14] 据淑明, 朱伟玲, 王伟亮, 等. 铁皮石斛茎段离体培养一次成苗技术研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2016, 51(1): 45-48.
- [15] 欧阳凡, 董文宾, 付 瑜, 等. 铁皮石斛茎段快繁技术的研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32(3): 63-67.
- [16] 郑子首, 孙晨瑜, 吕晓倩, 等. 铁皮石斛组培体系的建立[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2017, 48(4): 537-539, 548.
- [17] 林江波, 王伟英, 李海明, 等. 铁皮石斛茎段原球茎的诱导、分化与植株再生[J]. 福建农业学报, 2016, 31(10): 1075-1079.
- [18] 李莉梅, 魏丹璇, 蔡丹馥, 等. 不同植物生长调节剂对铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)再生的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(5): 2080-2089.
- [19] 孟志霞, 王春兰, 陈晓梅, 等. 铁皮石斛原球茎/类原球茎的研究与应用[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(19): 1620-1624.
- [20] 徐路加, 华允芬. 石斛原球茎的组织培养研究进展[J]. 北方园艺, 2014(6): 191-195.
- [16] 郭中校, 王明海, 包淑英, 等. 绿豆和红小豆氮磷钾肥适宜用量初探[J]. 东北农业科学, 2010, 35(2): 24-26.
- [17] 王胜华, 张凤萍. 壮园生态菌肥在大豆上的试验初报[J]. 中国农业信息, 2016(11): 110-111.
- [18] 王睿豪. 微生物菌肥对小粒黑豆生长发育及生理特性的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.