

石斛的組織培養

吳金濱¹ 何惠雅¹ 胡雯茹¹ 廖容君¹ 陳忠川¹ 北中進²

中國醫藥大學 藥物化學研究所 中國藥學研究所¹

日本大學 藥學部 生藥學教室²

目的 藥用石斛繁殖力低且生長遲緩，多採自野生供藥用，導致自然資源缺乏，因此迫切需要對藥用石斛進行大量繁殖以滿足市場需要。

方法 將外植體培養側芽長至2公分左右時，移植於G-3培養基中(0.3% Hyponex 1 + 15% 馬鈴薯抽出物+15% 香蕉抽出物+15% 椰子水+0.5 mg/LBA + 2 g/L 活性碳與3% 蔗糖)，約90天後側芽長約5公分時去其根葉作切莖繁殖。切莖繁殖培養產生側芽後，側芽移置成苗培養基，比較馴化條件對於溫室栽種石斛生長影響。

結果 外植體培養：B5培養基配合BA的培養條件好側芽生長良好。切莖繁殖：以B5 + BA 2.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 3% 蔗糖的切莖沒有壞死，側芽作為成苗培養使用最適合。芽球狀組織塊(PLB)的固體培養基以B5 + BA 2.5 mg/L 最好。成苗培養：以G-3 最好，側芽(大於1公分)移植至同上培養基，90天後可長成4.5公分高，根2至3條，根長5至6公分。馴化條件：瓶苗置於溫室30天後，脫瓶移出的存活率高(85%)。

結論 利用上述的培養方法，適合大量繁殖藥用石斛，以解決中藥市場之匱乏。(中台灣醫誌 2003;8 Supplement:S22-8)

關鍵詞

石斛，組織培養，切莖繁殖，溫室栽培

前言

石斛(*Dendrobium moniliforme* (L.) Sw.)為蘭科(Orchidaceae)石斛屬植物，據日本的牧野新日本植物圖鑑[1]收載三種石斛中只有本種供藥用。中國藥典[2]收載五種最常用的為環草石斛(*Dendrobium loddigesii* ROLFE)、馬鞭石斛(*Dendrobium fimbriatum* HOOKER)、鐵皮石斛(*Dendrobium candidum* WALLICB ex LINDLEY)、黃草石斛(*Dendrobium chrysanthum* WALLICB LINDLEY)及金釵石斛(*Dendrobium nobile* LINDLEY)。藥用石斛在神農本草經中列為上品，

具有滋陰清熱、生津益胃、潤肺止咳之作用[3,4]，其主要化學成分為石斛鹼、多醣、氨基酸等[5-12]。近年來研究報導的藥理作用包括對消化系統與增強免疫作用、抗腫瘤、治療白內障、生津及明目作用等[13-16]。

目前櫻石斛(*Dendrobium linawianum*)、鐵皮石斛(*Dendrobium candidum* WALLICB ex LINDLEY)、曲莖石斛(*Dendrobium flexicaule* TSI. SUN. et XU)等已有組織培養之研究報告[17-21]，而石斛(*Dendrobium moniliforme* (L.) Sw.)僅見以滅菌種子進行栽培之研究[22]，尚未有組織培養與育苗之報告。

聯絡作者：吳金濱

地址：404台中市北區學士路91號

中國醫藥大學 藥物化學研究所

收文日期：2003年3月28日 修改日期：2003年4月25日

接受日期：2003年5月22日

材料與方法

實驗材料

本試驗材料為民國88年4月間，由日本大學

Table 1. Effect of basal medium and cytokinins on cutting culture of *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw. for explants after 30 days

Basal medium	Treatment (mg/L)			Average number of axillary shoots	Growth responses of axillary shoots
	BA	Z	Kin		
B5	25	0	0	0	0
B5	15	0	0	1	light yellow buds, no root
B5	10	0	0	2	light yellow buds, no root
B5	4	0	0	2	light yellow buds, root
B5	2	0	0	3	small buds, root
B5	0.2	0	0	3	small buds, root
B5	0.1	0	0	0	0
B5	0	0	0	0	0
MS	0	1	0	1	green buds; black explant
MS	0	0.5	0	0	0
MS	25	0	0	0	0
MS	15	0	0	2	green buds; black explant
MS	5	0	0	2	green buds; black explant
MS	0.5	0	0	0	0
MS	0	0	0	0	0
MS	0	0	2	0	0

For each treatment, 10 cutting stems in test tube.

藥學部生藥學教室北中進教授提供採集自日本九州鹿兒島而得，並經由形態與開花情形和比對文獻[1,23]，加以確認為石斛(*Dendrobium moniliforme* (L.) Sw.)。

培養方法

外植體的消毒

取培養於溫室中的外植體，先以中性洗碗精清洗乾淨後，再以75%酒精浸泡消毒30秒，然後用0.5%次氯酸鈉溶液(每100 mL含界面活性劑Tween 20兩滴，用以增加外植體的表面消毒效果)進行表面消毒十五分鐘，移置無菌操作臺用無菌水洗滌三次後，置於無菌濾紙上吸乾表面水分，進行外植體培養。

接種方式

將外植體的幼苗切莖長約1.0 cm分段作為培植體，置於內含10 mL之各式培養基中，檢測產生新芽的最佳繁殖條件。

另外，取帶有類原球體(PLBs)部份，分置於固體或液體培養基中，檢測芽球樣體組織塊的最適合繁殖條件。

培養基的配製

固體培養：本研究為了尋求石斛的良好發育條件，主要先以MS (Murashige & Skoog) [24]，B5基本配方[24]，添加3%蔗糖，及0.3%水晶洋

菜，並配合添加6-Benzyladenine (BA)，Kinetin (KIN)，Zeatin (Z)， α -Naphthalene Acetic Acid (NAA)各種植物生長調節劑。成苗培養基以0.3% Hyponex 1為基礎添加(G-1為15%馬鈴薯抽出物、G-2為15%香蕉抽出物、G-3為15%馬鈴薯抽出物+15%香蕉抽出物+15%椰子水)+0.5 mg/LBA + 2 g/L活性碳+3%蔗糖。類原球體養以B5 + 2.5 mg/LBA + 2 g/L活性碳為基礎，添加蔗糖濃度為(0, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%)。調製培養基時，先用1N HCl或1N NaOH將培養基溶液pH值調至 5.7 ± 0.1 ，然後以 121°C 、 15 lb/in^2 (1.05 Kg/cm^2)進行高壓滅菌25分鐘，待冷卻後備用。

液體培養：培養基配製步驟同固體培養基，但是不加水晶洋菜，pH值調整在 5.2 ± 0.1 。

培養的環境

接種後，將培養材料置於 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 恆溫室內，黑暗或光照中培養(固體培養光量2,500 Lux，液體培養光量2,500 Lux)液體培養則須將材料置於慢速旋轉器(每分鐘2轉)或平面迴轉式震盪器上以100 rpm之速度震盪，兩者的每日光照皆為14小時。

馴化與栽培

培養於G-3培養基三個月後的瓶苗，分別置

Table 2. Effect of 6-benzyladenine (BA) and naphthalene acetic acid (NAA) concentration on cutting stem culture of Dendrobium moniliforme (L.) Sw. for 40 days

B5 basal medium treatment (mg/L)		Number of necrosis	Number of axillary shoots	Average length of axillary shoots (cm)		
BA	NAA			Root	Stem	Leaf
10	0	2	2	0.0 ^d	1.5 ^a	1.0 ^{ab}
5	0	3	3	0.0 ^d	0.9 ^{bc}	0.8 ^{bc}
2.5	0	2	2	0.5 ^{ab}	0.8 ^{bc}	0.7 ^c
0.5	0	3	3	0.6 ^a	1.0 ^{bc}	1.0 ^{ab}
0.02	0	3	3	0	0	0
10	0.5	4	4	0.2 ^d	0.6 ^c	1.5 ^a
5	0.5	4	4	0.0 ^d	0.5 ^c	0.8 ^{bc}
2.5	0.5	0	0	0.6 ^a	1.5 ^a	1.0 ^{ab}
0.5	0.5	0	0	0.2 ^d	1.0 ^{bc}	0.7 ^c
0.02	0.5	0	0	0	0	0
10	2.5	8	8	0.5 ^{ab}	1.0 ^{bc}	1.0 ^{ab}
5	2.5	6	6	0.4 ^{bc}	0.9 ^{bc}	0.7 ^c
2.5	2.5	4	4	0	0	0
0.5	2.5	8	8	0	0	0
0.02	2.5	20	20	0	0	0
10	5	20	20	0	0	0
5	5	20	20	0	0	0
2.5	5	20	20	0	0	0
0.5	5	20	20	0	0	0
0.02	5	20	20	0	0	0

* Means with the same superscripts are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test.

恆溫的培養室(培養光量 2,500 Lux，溫度 25℃，光照 14 小時)與溫室中馴化 40 天。並將出瓶移栽的強壯種苗，分別置溫室栽種一年。

結果與討論

外植體培養

將 1 公分大小的培植體培養於以 B5 為基本鹽類添加 BA (0, 0.1, 0.2, 2, 4, 10 與 25 mg/L)，MS 為基本鹽類添加 BA (0, 0.5, 1, 5, 15 與 25 mg/L)、MSZ (0.5 與 1 mg/L) 與 B5Kin 等植物生長調節劑培養基中，經光照培養 30 天後，觀察其側芽的發芽結果。由 Table 1 顯示，在 B5BA (0.2, 2 與 4 mg/L) 培養基中，所得到的側芽數目最多約 2 到 3 個；外觀方面，以 MSBA (5 與 15 mg/L) 的側芽大且葉子深綠，但是培植體與容易變黑死掉而培養基變為深咖啡色，因此選擇 B5 培養基中含有 BA 作為本試驗之培養基。

切莖繁殖試驗

將切成 1 公分大小的莖段，培養於以 B5 為基本鹽類添加 BA (0.02, 0.5, 2.5, 5 與 10 mg/L) 及 NAA (0, 0.5, 2.5 與 5 mg/L) 的植物生長調節

劑中，經光照培養 40 天後，計算其側芽的發芽結果。由 Table 2 顯示，當添加高濃度比例的 NAA 5 mg/L 與 NAA 2.5 mg/L 的條件下，容易使培植體枯死，而在低濃度的 BA 0.02 mg/L 也不會有側芽增生；當添加 BA 0.5 mg/L 至 10 mg/L 的濃度時，隨著 BA 的濃度增加時側芽增多的現象，此時添加 NAA 0.5 mg/L 促進根的生長，有利於下階段的成苗培養。

成苗培養試驗

側芽大小與成苗的關係

將 0.5, 1, 1.5 與 2 公分的側芽不含有根，移置成苗培養基中，此時側芽必需超過 1.5 公分以上則側芽較不易枯死。而當側芽 0.5 公分以上含有根時，移置成苗培養基中，側芽存活容易並且生長快速。

成苗培養

將側芽移置 G-1、G-2、G-3 培養基含有 150 g/L 的馬鈴薯、香蕉汁與椰子汁中，經光照 14 小時培養 90 天，觀察其生長情形，由 Table 3 結果顯示以 G-3 處理的苗體成長約 4 到 5 公分，根也有 4 公分以上且葉子與莖呈深綠色，苗株粗壯有利於作為栽種的植株。而添加有馬鈴薯汁的培養

Table 3. Effect of 15% potato aqueous extract, 15% banana aqueous extract, and 15% coconut water on plantlet strength of *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw. for 90 days

Medium	Number of plants	Height of plant (cm)	Number of die	Average growth (cm)		
				Root	Leaf	Stem
G-1	20	>1	6	2.0 ^{c*}	1.5 ^b	1.0 ^c
G-1	20	<1	13	0.0 ^d	1.0 ^c	0.8 ^c
G-2	20	>1	5	2.0 ^c	1.0 ^c	1.0 ^c
G-2	20	<1	11	0.0 ^d	0.8 ^c	0.8 ^c
G-3	20	>1	0	5.5 ^a	3.5 ^a	4.5 ^a
G-3	20	<1	2	3.5 ^{ab}	2.0 ^{ab}	3.0 ^{bc}

G-1: 0.3% Hyponex 1 added with 15% potato aqueous extract, 0.5 mg/L BA, 3% sucrose and activated charcoal 2 g/L. G-2: 0.3% Hyponex 1 added with 15% banana aqueous extract, 0.5 mg/L BA, 3% sucrose and activated charcoal 2 g/L. G-3: 0.3% Hyponex 1 added with 15% potato aqueous extract, 15% banana aqueous extract, 15% coconut water, 0.5 mg/L BA, 3% sucrose and activated charcoal 2 g/L. *Means with the same are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test.

Table 4. Influence of acclimatisation on the survival of *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw. for 30 days

Acclimatisation place	Number of plantlet transplants	Survival plants
Greenhouse	120	103 (85%)
Temperature controlled room	120	67 (55%)

基，葉子較深綠且莖肥厚；香蕉汁的莖較細根細長。

類原球體(PLBs)形成條件

取在成苗培養中產生的類原球體(PLBs)，直徑約 0.5 至 1 公分。培養於液體培養基 B5BA (0.5, 1, 2.5, 5, 10 與 25 mg/L) 或 1/2 MS 中。經光照 14 小時培養 40 天後，以 B5BA 2.5 mg/L 產生之類原球體直徑約增大 1.5 倍，BA 濃度越大芽球不會增大反而呈現死亡的現象。再調整蔗糖濃度(0, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%)於 B5BA 2.5 mg/L 固體培養基中，經光照 14 小時培養 40 天後，以含有 5% 的蔗糖之類原球體產生較多，直徑約增大 3 倍(Fig. A)，但是芽球中有芽的分化，因此出現不同調的生長。將此條件改為液體培養時，液體培養基呈現淡褐色且芽球枯死。

馴化的條件不同對栽培的影響

馴化時以恆溫的培養室的生長最為快速且不易長霉，但是瓶苗鮮嫩且脆容易在移植出瓶時受傷。由(Table 4, Figs. B, C)顯示：瓶苗移植出瓶栽種時，恆溫的培養室中的瓶苗容易有完全葉子掉落乾枯死亡，損失大量瓶苗；而在溫室中的瓶苗雖然生長較為緩慢，但是受過自然環境氣候的調節，在移植出瓶時根莖不易拉斷瓶苗堅韌，不會因水分喪失而產生掉葉的現象，存活的瓶苗多，

因此選擇以溫室中馴化的瓶苗最適合栽種。

栽種於溫室一年後的生長情形

結果如(Fig. D)，選用莖段苗體培養，篩選出不同優勢的培養基。提供可移植出瓶移栽的強壯種苗，將此苗體栽種於平地溫室中，發現在充足的陽光(7,000 Lux)，較高溫(35 °C)的條件下：苗體的莖可抽高至 12 至 15 公分，葉子大且莖粗呈深綠色，適合石斛生長發育；而在光線不充足(2,000 Lux)，較低溫(26 °C)的條件下：石斛生長緩慢，這與其原來生長環境大不相同。以此作為石斛大量繁殖的方法，提供快速繁殖量產化的最佳條件。

致謝

本研究承蒙中國醫藥大學八十九學年度專題研究計劃(計劃編號：CMC89-PC-01)經費補助，謹此致謝。

參考文獻

1. 牧野富太郎。牧野新日本植物圖鑑。北隆館，1977:899。
2. 中藥彩色圖集。三聯書店，1995:114。
3. 中藥大辭典。上海科學技術出版社，2000:586-90。



Figure. The plantlets (*Dendrobium moniliforme* (L.) Sw.) were transferred to plastic cups, containing a mixture of cyantheaceae, scrap and small stones in 1:1 ratio and kept moist in greenhouse. A: Protocorm like bodies (PLBs). B: Acclimatization of plantlets at temperature controlled room. C: Acclimatization of plantlets in greenhouse. D: At greenhouse after one year.

- 謝文全。神農本草經之考察與重輯，中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文，台中，1995。
- 李滿飛，平田義正，徐國鈞等。流蘇石斛化學成分的研究。《中草藥》1992;23:227-8。
- Talapatra SK, Bhaumik A, Talapatra B. Denfigenin, a diosgenin derivative from *Dendrobium fimbriatum*. *Phytochemistry* 1992;31:2431-4.
- 丁亞平，楊道麒，吳慶生等。安徽霍山三種石斛總生物鹼的測定及其分布規律研究。《安徽醫病大學學報》1994;21:503-6。
- 吳麗琴，柯逢年，鄧哲明等。石斛的抗血小板凝集活性成分之研究。《中醫藥雜誌》1994;5:198-9。
- Chen CC, Wu LG, Ko FN, et al. Antiplatelet aggregation principles of *Dendrobium loddigesii*. *J Nat Prod* 1994;57:1271-4.
- Veerra Ju P, Prakasa Rao NS, Jaganmohana Rao L, et al. Bibenzyls and phenanthrenoids of some species of Orchidaceae. *Phytochemistry* 1989;28:3031-4.
- Lee YH, Park JD, Baik NI, et al. In vitro and in vivo antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Med* 1995;61:178-80.
- Miyazawa M, Shimamura H, Nakamura S, et al. Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile*. *J Agric Food Chem* 1997;45:2849-53.
- 徐建華，李莉，陳立站。鐵皮石斛與西洋參的養陰生津作用研究。《中草藥》1995;26:7980。
- 楊濤，梁康，張昌穎。四種中草藥對大鼠半乳糖性白內障防治效用的研究。《北京醫科大學學報》1991;23:97-9。
- 陳囿任。霍山石斛對腦神經細胞及視網膜色素上皮細胞作用機轉之研究。國立陽明大學生物藥學研究所碩士論文，台北，2000。
- Ma GX, LeBlance GA. The activity of erianin and chrysotoxine from *Dendrobium chrysotoxum* to reverse multidrug resistance in B16/n MDR-1 cells. *J Chin Pharm Sci* 1998;7:142-6.

17. 陳忠川。石斛類藥材之生藥學及櫻石斛組織培養之研究。中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文，台中，1995。
18. 張明，夏鴻西，朱利泉等。石斛組織培養研究進展。《中國中藥雜誌》2000;25:323-6。
19. 張艷，彭銳，范俊安。藥用石斛離體培養研究概述。《時珍國醫國藥》2000;11:763-4。
20. 劉擘，張治國。鐵皮石斛試管苗壯苗培養基的研究。《中國中藥雜誌》1998;23:654-6。
21. 李泉森，張明，金仕勇。石斛無土栽培基質的初步研究。《中國中藥雜誌》2000;25:23-4。
22. Chung JD, Chun CK, Young YK, et al. Studies on aseptic culture of seeds in *Dendrobium monile*. IV. Effect of light and/or dark treatment and various compositions of media on germination of seeds and growth of seedlings. *Jorunal of the Korean Society for Horticultural Science* 1981;22:139-45.
23. *Flora of Taiwan*. 1996;5:845.
24. 植物細胞工學入門。學會出版中心，1998:20-5。

Tissue Culture of *Dendrobium moniliforme*(L.) Sw.

Jin-Bin Wu, Hui-Ya Ho, Wen-Ju Hu¹, Jung-Chun Liao¹, Chung-Chuan Chen¹,
Susumu Kitanaka²

Institute of Pharmaceutical Chemistry,¹Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical University, Taichung, Taiwan; ²College of Pharmacy, Nihon University, Chiba, Japan.

Objectives. *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw. commonly known as shi-ho in Chinese, is a perennial herb indigenous to Japan. *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw. contains alkaloids and polysaccharides and is used in traditional Chinese medicine. This study attempted to establish propagation of *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw.

Methods. We cultured cut stems of the plant on B5 medium (pH5.7 ± 0.1) supplemented with suitable hormones at 23 ± 2°C. The stems were then transferred to G-3 medium for 60 days.

Results. Two to three axillary shoots grew from cut stems cultured on medium containing B5 salts with 2.5 mg/L 6-benzyladenine and 0.5mg/L naphthalene acetic acid and 3% sucrose at 23 ± 2°C. The plantlets from the axillary shoots cultured on G-3 medium grew better and were more healthy. The plantlets (stem length 4.5 cm) were transferred to a plastic cup containing a mixture of cyantheaceae scrap and small stones in 1:1 ratio and kept moist. Over 85% of the plantlets survived and they grew to about 15 to 20 cm after one year in the greenhouse.

Conclusions. Our tissue culture technique led to mass propagation of *Dendrobium moniliforme* and could resolve the deficiency of this herb on the traditional Chinese medicinal market. (**Mid Taiwan J Med 2003;8 Supplement:S22-8**)

Key words

Dendrobium moniliforme, tissue culture, propagation of cutting stem, planting greenhouse

Received : March 28, 2003.

Revised : April 25, 2003.

Accepted : May 22, 2003.

Address reprint requests to : Jin-Bin Wu, Institute of Pharmaceutical Chemistry, China Medical University, 91 Hsueh-Shih Road, Taichung 404, Taiwan, R.O.C.