

## 铁皮石斛拟原球茎的发生过程

张启香<sup>1</sup>, 付素静<sup>2</sup>, 方炎明<sup>3</sup>, 陈娜<sup>3</sup>

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 铜仁学院 生化系, 贵州 铜仁 554300; 3. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 以铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 的茎尖为外植体, 在特定条件下诱导产生拟原球茎, 进一步培养形成幼苗。结果表明: 原球茎最优诱导培养基为 1/2MS(Murashige and Skoog)+ 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-苄基嘌呤(6-BA) + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> 萘乙酸(NAA) + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 激动素(KT) + 1.0 g·L<sup>-1</sup> 水解乳蛋白(LH)。复合添加物的试验表明, 土豆汁对拟原球茎(PLBs)的增殖有很好的促进作用。对铁皮石斛拟原球茎的解剖学研究表明: 拟原球茎是由位于顶端分生组织下的薄壁细胞脱分化形成的胚性细胞发育而来。外植体接种后 20 d 左右外植体基部开始膨大, 40 d 左右出现肉眼可见的乳白色突起, 这些突起逐渐增大, 成为圆形至卵圆形的乳白色拟原球茎。在条件适宜的拟原球茎增殖培养基上继续培养, 拟原球茎边缘的薄壁细胞继续脱分化, 进一步发育形成球形的细胞团, 可继续形成突起, 使拟原球茎不断增殖。图 1 表 2 参 13

**关键词:** 植物学; 铁皮石斛; 拟原球茎; 发生; 组织培养

**中图分类号:** Q943.1; S759.82      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1000-5692(2009)03-0444-05

## Protocorm-like body (PLB) development on *Dendrobium officinale*

ZHANG Qi-xiang<sup>1</sup>, FU Su-jing<sup>2</sup>, FANG Yan-ming<sup>3</sup>, CHEN Na<sup>3</sup>

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Department of Biology and Chemistry, Tongren University, Tongren 554300, Guizhou, China; 3. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** To determine the most effective medium for protocorm-like body (PLB) induction and growth, shoot tips of *Dendrobium officinale* were cultured on media. Then, several compound addenda were added to the media to determine the best treatment for PLB multiplication, and this was followed by anatomical observation of PLB formation on *D. officinale*. Results showed that the best medium for PLB induction and embling regeneration was 1/2MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> KT + 1.0 g·L<sup>-1</sup> LH with potato juice. The anatomical observation showed that the PLBs developed from the tissue behind the apical meristem, which could dedifferentiate into embryogenetic cells. The process was as follows: creamy global structures were visible after 40 d, and these gradually increased. Cells on the edge of the PLBs continued to dedifferentiate forming a global colony. These global structures grew into bumps when the PLBs multiplied. [Ch, 1 fig. 2 tab. 13 ref.]

**Key words:** botany; *Dendrobium officinale*; protocorm-like body(PLB); development; tissue culture

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 是兰科 Orchidaceae 石斛属 *Dendrobium* 多年生附生草本植物, 俗称铁皮枫斗, 是石斛属的一个珍贵品种。铁皮石斛种子极小, 无胚乳, 自然条件下需与某些真菌共生才能萌发, 很难用实生苗栽培, 而传统的分株、扦插等方式的繁殖率较低, 加上人为的过度采挖和生境破坏, 其资源已濒临灭绝, 已被国家列为重点保护的药用植物之一。目前, 国内外关于铁皮石斛组

收稿日期: 2008-09-19; 修回日期: 2008-12-24

作者简介: 张启香, 讲师, 博士, 从事植物发育生物学等研究。E-mail: njzhangqixiang@yahoo.com.cn。通信作者: 方炎明, 教授, 博士生导师, 从事植物生理生态学等研究。E-mail: jwu4@njfu.com.cn

织培养已有报道<sup>[1-6]</sup>，但大多由种子萌发形成原球茎，从茎尖诱导产生拟原球茎(PLBs)的报道较少。作者从组织培养入手，探讨拟原球茎的形成与发育过程，以提高拟原球茎增殖率以及试管苗的繁殖系数，为铁皮石斛的快速繁殖和工厂化生产提供形态学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

实验供试材料为铁皮石斛无菌实生苗；化学试剂为国产的分析纯。

### 1.2 试验方法

将铁皮石斛健壮无菌实生苗的茎尖接种于配制好的培养基中培养<sup>[7-8]</sup>。具体实验设计见表 1。培养条件：蔗糖质量浓度为 30.0 g·L<sup>-1</sup>，琼脂质量浓度为 6.8 g·L<sup>-1</sup>，pH 5.7，温度(25±2)℃，日光灯照明 13 h·d<sup>-1</sup>，光照强度为 1 000~1 500 lx。在拟原球茎诱导过程中取其各个阶段的培养材料用体积分数为 50% 万能固定液(FAA)固定，抽气，系列乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，旋转切片机切片，厚为 8 μm，番红-固绿染色，中性树胶封片<sup>[9]</sup>，Olympus 光学显微镜观察并拍照。实验分析方法：采用正交设计，用数据保护系统(DPS)进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 拟原球茎的诱导

本实验中选用基本培养基 (MS, Murashige and Shoog), 6-苄基嘌呤(6-BA), 激动素(KT), 萘乙酸(NAA)和水解乳蛋白(LH)等 5 个因素进行正交设计, 共 12 处理, 重复 3 次每个处理, 10 瓶每个重复, 接 10 个芽每瓶, 进行原球茎诱导的基本培养基、细胞分裂素、生长素以及复合添加物的优化筛选, 接种 8 周后统计结果。结果表明, 无论原球茎产生还是不定芽增殖, 均以盐分相对较低的 1/2MS 最为合适, 而 1/4 MS, 3/4MS 和 MS 的培养效果均次之。以 1/4MS 为基本培养基时, 外植体生长较细弱, 丛生芽呈黄绿色, 可能是由于营养物质过度缺乏所致。而以 3/4MS 和 MS 为基本培养基时, 丛生芽呈现玻璃化趋势, 且在 MS 中培养的材料玻璃化程度更高。以 1/2MS 为基本培养基时, 芽增殖系数都大于 150%, 未出现玻璃化现象或玻璃化程度较轻, 诱导拟原球茎诱导率较高, 如 4 号培养基的诱导率达 17%, 芽增殖率高达 200%(表 2), 与其他处理相比差异显著。以 1/4MS, 3/4MS 和 MS 为基本培

表 1 不同处理对铁皮石斛茎尖进行 PLBs 的诱导

Table 1 Different treatments on PLB formation from *Dendrobium officinale* shoot tips

| 处理 | 基本培养基 | 植物生长调节角质/(mg·L <sup>-1</sup> ) |     |      | 添加物 LH/(g·L <sup>-1</sup> ) |
|----|-------|--------------------------------|-----|------|-----------------------------|
|    |       | NAA                            | KT  | 6-BA |                             |
| 1  | 1/4MS | 0.00                           | 0.0 | 0.3  | 1.0                         |
| 2  | 1/4MS | 0.00                           | 0.0 | 0.5  | 0.0                         |
| 3  | 1/4MS | 0.05                           | 0.1 | 0.3  | 0.0                         |
| 4  | 1/2MS | 0.05                           | 0.1 | 0.5  | 1.0                         |
| 5  | 1/2MS | 0.00                           | 0.1 | 0.3  | 1.0                         |
| 6  | 1/2MS | 0.00                           | 0.1 | 0.5  | 0.0                         |
| 7  | 3/4MS | 0.05                           | 0.0 | 0.3  | 1.0                         |
| 8  | 3/4MS | 0.05                           | 0.0 | 0.5  | 0.0                         |
| 9  | 3/4MS | 0.00                           | 0.1 | 0.3  | 0.0                         |
| 10 | MS    | 0.00                           | 0.0 | 0.5  | 1.0                         |
| 11 | MS    | 0.05                           | 0.0 | 0.3  | 0.0                         |
| 12 | MS    | 0.05                           | 0.1 | 0.5  | 1.0                         |

表 2 不同处理对铁皮石斛茎尖进行 PLBs 的诱导率的影响

Table 2 Effect of different treatments on PLB formation from *Dendrobium officinale* shoot tips

| 处理 | PLBs 诱导率/% |    |    |         | 芽增殖率/% | 幼苗长势 |
|----|------------|----|----|---------|--------|------|
|    | 1          | 2  | 3  | 平均      |        |      |
| 1  | 9          | 8  | 6  | 7.6 Cc  | 50     | +    |
| 2  | 5          | 8  | 3  | 5.3     | 110    | +    |
| 3  | 0          | 5  | 3  | 2.6     | 10     | --   |
| 4  | 15         | 15 | 21 | 17.0 Aa | 200 Aa | ++++ |
| 5  | 5          | 4  | 7  | 5.3     | 200 Aa | ++   |
| 6  | 8          | 6  | 10 | 8.0 Bb  | 180 Bb | ++   |
| 7  | 0          | 0  | 0  | 0       | 120    | ++   |
| 8  | 2          | 0  | 4  | 2.0     | 110    | ++   |
| 9  | 0          | 0  | 2  | 0.6     | 120    | +    |
| 10 | 3          | 2  | 6  | 3.6     | 80     | +    |
| 11 | 0          | 5  | 2  | 2.3     | 130 Cc | --   |
| 12 | 0          | 3  | 5  | 2.6     | 120    | +    |

说明: +表示一般, ++表示较好, +++表示很好; 表中大小写字母分别表示 0.01 和 0.05 显著水平。

培养基时无拟原球茎(PLBs)产生或 PLBs 的诱导率较低,芽增殖系数均小于 150%,整齐度较差,畸形苗较多。细胞分裂素选用 6-BA 和 KT 组合,PLBs 诱导率在 6-BA 和 KT 质量浓度较低的范围内培养效果较好,畸形 PLBs 产生率低。在较低质量浓度范围内,PLBs 诱导率和芽增殖系数随着 6-BA 质量浓度的增加有所上升,LH 作为多种氨基酸的复合物,在 PLBs 诱导过程中具有良好的促进作用,用量以  $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为宜。生长素以 NAA 较合适,以  $0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为佳。稀土镧和叶酸在 PLBs 诱导过程中无明显的促进作用。方差分析结果表明:各处理间存在极显著差异,最优培养基为  $1/2\text{MS} + 0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 6\text{-BA} + 0.05\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NAA} + 0.1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KT} + 1.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{LH}$  (表 2)。

## 2.2 拟原球茎增殖

选择较健壮的 PLBs 在 4 号培养基上增加复合添加物进行培养。选用对照以及  $200\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  香蕉汁、土豆汁和椰子汁进行继代培养。实验结果表明,对照组 2 个月后增殖率为 50%,椰子汁对 PLBs 的增殖无明显促进作用,加入香蕉汁的增殖率为 110%,而在增加土豆汁的培养基中增殖率最高,达 230%。在培养过程中加上一定量的土豆汁后,能有效地抑制材料褐化对 PLBs 增殖造成的不利影响,缓冲培养基的 pH 值,且 PLBs 比未加土豆汁的更健壮,畸形发生率少,萌发率更高。

## 2.3 拟原球茎的发生及发育

外植体接种后 20 d 左右基部开始膨大,约 40 d 出现肉眼可见的乳白色突起。显微观察发现,在顶端分生组织后面,存在大量的排列疏松的薄壁细胞,PLBs 是由茎尖薄壁细胞经脱分化产生的细胞发育形成,乳白色突起常在最外层细胞进行平周分裂,形成排列较为整齐的表皮层(图 1-1),内层部分区域的细胞作垂周分裂(图 1-2),形成不规则突起,这些突起逐渐增大(图 1-3),成为圆形至卵圆形的乳白色 PLBs(图 1-4)。若在条件适宜的 PLBs 增殖培养基上继续培养,PLBs 边缘的薄壁细胞继

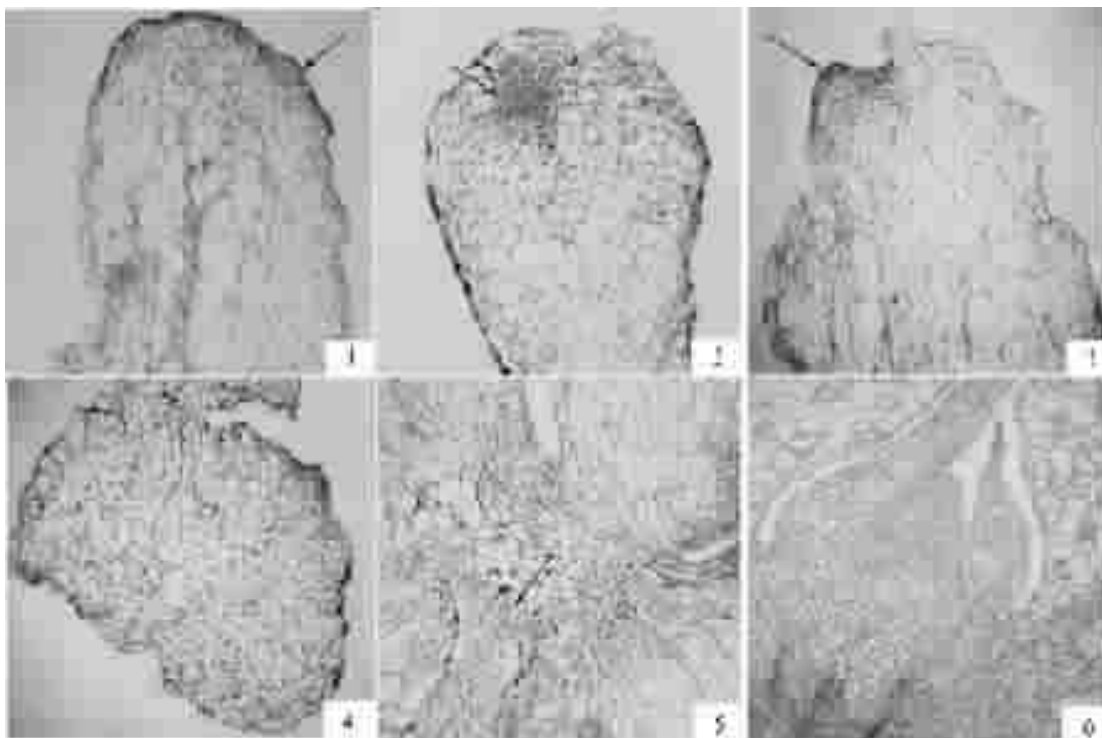


图 1 原球茎发育过程的显微结构

Figure 1 Anatomical observation on the PLBs of *Dendrobium officinale*

1. 乳白色突起边缘细胞分裂( $\times 100$ ); 2. 乳白色突起内部细胞脱分化形成胚性细胞团( $\times 100$ ); 3. 原球茎边缘细胞分化形成突起( $\times 100$ ); 4. 分化完成的原球茎( $\times 100$ ); 5. 原球茎内部细胞的二次分化( $\times 100$ ); 6. 具茎叶结构的原球茎( $\times 100$ )
1. edge of the cream colored calli division ( $\times 100$ ); 2. interior of the cream colored calli dedifferentiate into embryonic cells( $\times 100$ ); 3. edge of PLBs differentiate into lumps( $\times 100$ ); 4. differentiated PLBs( $\times 100$ ); 5. secondary differentiation of interior cells( $\times 100$ ); 6. PLBs which have completed stalks and leaves( $\times 100$ )

续脱分化, 细胞质浓厚, 细胞核较大, 细胞体积增大, 多次分裂形成球形的细胞团, 可继续形成突起, 使 PLBs 不断增殖<sup>[10]</sup>; 在某些条件下, 分生细胞可以从原胚性细胞群中产生(图 1-5)。若在合适的 PLBs 萌发培养基上进行培养, 乳白色 PLBs 逐渐出现极性, 同时 PLBs 伸长, PLBs 的顶端分生组织分化出叶原基, 发育形成幼叶, 形成茎叶系统, 在 PLBs 的基部出现根原基, 根原基细胞分裂、分化形成根系, 进一步形成具茎叶结构和完整根系的幼苗(图 1-6)。

### 3 讨论

近年来, 铁皮石斛组织培养的研究取得了较大的进展, 但有关 PLBs 发生和发育的组织细胞学研究相对较少, 作者以铁皮石斛实生苗的茎尖作为外植体进行 PLBs 的诱导, 可以防止新一代幼苗发生变异以及带病毒植株的产生, 使幼株有效地保持母株的优良性状。实验发现, 在铁皮石斛 PLBs 的诱导过程中, 1/2MS 为最适基本培养基, 这与侯丕勇等<sup>[10]</sup>结果一致, 但魏小勇<sup>[11]</sup>在建立铁皮石斛原球茎悬浮系时发现悬浮培养的最适基本培养基为 1/4MS, 而 Luo 等<sup>[12]</sup>以密花石斛 *Dendrobium densiflorum* 为外植体研究时发现最适基本培养基为 MS。这可能与外植体培养条件及外植体基因型有关。作者的实验细胞分裂素采用 KT 和 6-BA 组合, 在较低质量浓度下(分别为  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )原球茎发育良好, 且不定芽长势健壮。另外, 培养瓶内的空气湿度也是一个很重要的培养条件, 瓶内空气湿度过大易出现玻璃化苗和畸形苗, 从而严重影响铁皮石斛的植株再生以及移栽成活率。一定量的土豆汁 ( $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )能使幼苗健壮, 而香蕉汁和椰子汁的效果次之。液体培养较固体培养易褐化, 而活性炭能有效地防止褐化的发生。

铁皮石斛 PLBs 的诱导是经茎尖下部的薄壁细胞经脱分化而形成的分生组织细胞发育形成胚性细胞发育形成 PLBs, 进而发育成幼苗。在 PLBs 诱导的初始阶段, 诱导速率非常低, PLBs 对外部生长环境有一定的时间适应性, 不宜频繁更换培养基(一般在 2 个月以上), 在 PLBs 增殖培养的初期, 不宜将新产生的 PLBs 分得过小过少, 否则 PLBs 不易适应新环境而在较短的时间内褐化死亡。在适宜的培养条件中后期(2 个月以上)PLBs 增殖的速度相当快, 1 个月内增殖系数能达到 20 ~ 30。在 PLBs 的增殖过程中, 发现部分有次生胚产生, 从而导致拟原球茎发育的不同步化, 所以在实验过程中, 必须提高接种物的均匀性以及进一步探索抑制次生胚产生的方法<sup>[13]</sup>。通过解剖结构的观察, 发现了拟原球茎的形成过程, 为铁皮石斛 PLBs 的诱导和增殖提供了形态学依据, 有利进一步提高铁皮石斛的繁殖系数, 为解决铁皮石斛资源紧缺问题提供了一条有效的途径。

### 参考文献:

- [1] 詹忠根, 徐程, 张铭, 等. 铁皮石斛离体根尖经体细胞胚再生植株研究[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2005, **31** (5): 579 - 580.  
ZHAN Zhonggen, XU Cheng, ZHANG Ming, *et al.* Plant regeneration through somatic embryogenesis on root tip explants of *Dendrobium officinale* Kimura et Miga [J]. *J Zhejiang Univ Agric & Life Sci*, 2005, **31** (5): 579 - 580.
- [2] 张启香, 方炎明. 铁皮石斛组织培养及试管苗营养器官和原球茎的结构观察[J]. 西北植物学报, 2005, **25** (9): 1761 - 1765.  
ZHANG Qixiang, FANG Yanming. Tissue culture and in vitro seedling and protocorm-like body examination of *Dendrobium candidum* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2005, **25** (9): 1761 - 1765.
- [3] 王春, 郑勇平, 罗曼, 等. 铁皮石斛试管苗快繁体系[J]. 浙江林学院学报, 2007, **24** (3): 372 - 376.  
WANG Chun, ZHENG Yongping, LUO Man, *et al.* Micropropagation of *Dendrobium officinale* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2007, **24** (3): 372 - 376.
- [4] 张铭, 朱峰, 魏小勇, 等. 铁皮石斛种胚萌发和原球茎质量控制[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2000, **27** (1): 92 - 94.  
ZHANG Ming, ZHU Feng, WEI Xiaoyong, *et al.* Germination of *Dendrobium candidum* embryos and quality control of protocorm-like bodies [J]. *J Zhejiang Univ Sci Ed*, 2000, **27** (1): 92 - 94.
- [5] CHIA T F, CHAN Y S, CHUA N H. The firefly Gene as a non-invasive reporter for *Dendrobium* [J] *Transfoum Plant Med*, 1995, **61** (2): 1778.



- [6] 陈薇, 寸守铤. 铁皮石斛茎段离体快繁[J]. 植物生理学通讯, 2002, **38** (2): 145.  
CHEN Wei, CUN Shouxian. In vitro rapid propagation of stems of *Dendrobium candidum* [J]. *Plant Physiol Commun*, 2002, **38** (2): 145.
- [7] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 47 - 60
- [8] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版, 1996: 33 - 37
- [9] 稍伊 K. 植物解剖学[M]. 李正理, 译. 北京: 科学出版社, 1962: 100 - 103.
- [10] 侯丕勇, 郭顺星. 悬浮培养的铁皮石斛原球茎在固体培养基上生长和分化的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, **30** (10): 729 - 732.  
HOU Piyoung, GUO Sunxing. Studies on transplanting suspension-cultured protocorms of *Dendrobium candidum* onto solid culture medium[J]. *China J Chin Materia Med*, 2005, **30** (10): 729 - 732.
- [11] 魏小勇. 铁皮石斛原球茎悬浮培养研究[J]. 现代中药研究与实践, 2004 (18): 7 - 11.  
WEI Xiaoyong. Studies on lines of PLBs suspension culture of *Dendrobium candidum*[J]. *Res Pract Chin Med*, 2004 (18): 7 - 11.
- [12] LUO Jianping, WANG Ying, ZHA Xueqiang, *et al.* Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids [J]. *Plant Cell Tiss Cult*, 2008, **93**: 333 - 340.
- [13] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 79 - 91.

## 市校合作 共建现代生态城市

浙江林学院与临安市全面深化战略合作, 共建现代生态城市。2009年4月14日, 双方正式签订了合作框架协议, 同时成立共建现代生态城市战略合作促进委员会。今后将以“和谐社区和校园建设、城乡规划和新农村建设、科技和创新创业、基础教育和人才培育、旅游和现代服务业”五大领域为重点, 扎实推进合作。

14日上午, 临安市与浙江林学院共建现代生态城市战略签约仪式在市政府会议中心举行。浙江林学院党委书记陈敬佑、临安市市委书记邵毅分别在仪式上致辞。

陈敬佑表示, 浙江林学院建校50余年来坚持扎根临安办学, 学校的快速发展与临安市的支持密不可分。这次签约是探索市校合作新模式的一个新起点, 既是临安建设生态城市的需要, 也是浙江林学院实施“生态育人, 创新强校”发展战略迈出的重要一步。双方进一步建立起稳定、长期、全面的战略合作关系, 优势互补、共同发展, 必将取得更加丰硕的成果。