

# 铁皮石斛多倍化诱导与鉴定研究

唐娅梅, 张臣良, 苏 兵, 成 倩, 纳海燕

(四川大学 生命科学院, 四川 成都 610064)

**摘 要:**以铁皮石斛拟原球茎为材料,利用秋水仙素作为诱导剂,研究不同浓度及时间条件下,秋水仙素对铁皮石斛多倍化的诱导效果。结果表明:秋水仙素浓度为 0.2%,处理时间为 48 h,诱导效果最佳,成活率达 78%,变异率为 32%;处理后的铁皮石斛在形态、气孔直径、染色体数目上都有变化,呈多倍体表型特征,其体细胞染色体数多为  $2n=68\sim 76$  条,而对照  $2n=38\sim 40$  条。

**关键词:**铁皮石斛;秋水仙素;多倍体

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0147-03

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.)属兰科石斛属(*Dendrobium* Sw.),俗称铁皮兰、黑节草,是一种传统名贵中药,为石斛属濒危物种之一,目前已基本无野生资源可用,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<sup>[1-2]</sup>。铁皮石斛作为药用石斛中优质品种的代表,具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、润喉明目之功效,在现代医学应用中其多糖、生物碱、氨基酸等化学成分在提高免疫功能、抑制肿瘤和延缓衰老等方面有明显的的作用,临床常用于治疗肺虚、肾虚、脾虚等引起的疾病<sup>[3-5]</sup>。铁皮石斛不仅具有较高的药用价值,也具有一定的观赏价值,作为观赏的铁皮石斛兰其切花花期较长,花色艳丽,可作为一种小型的观赏植物。

诱导植物多倍体在育种中具有重要地位,利用秋水仙碱已在许多园艺植物上诱导出有价值的多倍体<sup>[6-8]</sup>。多倍体诱变技术多用在农作物和花卉品种的培育上,在药用植物的育种方面的报道较少<sup>[9-11]</sup>,其中对石斛类植物的染色体加倍及新品种选育的研究也仅有少量报道<sup>[12-13]</sup>,该研究利用秋水仙素对铁皮石斛进行了多倍体诱导,以期培育筛选出花大、花色艳丽、花期较长的多倍体新品种,提高其观赏价值,同时提高产量和药用价值,增加中草药的种质资源,为选育观赏价值高、药物含量高的花药两用铁皮石斛提供新材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

成熟的铁皮石斛蒴果经种子萌发后形成的原球茎,

经过优化培养,以稳定正常生长的无菌拟原球茎为研究材料。

### 1.2 试验方法

1.2.1 蒴果灭菌和种子萌发培养 将未开裂的蒴果表面清洁后,用流水冲洗 5 min,在 0.1%的氯化汞溶液中浸泡 20 min,75%的酒精中消毒 1 min,再在超净台上用无菌水冲洗 3~5 次,置于灭菌的培养皿中,用滤纸吸干残余的水分。在无菌条件下将已灭菌的铁皮石斛蒴果切开,取出种子,均匀的播种于 1/4 MS+土豆 100 g/L+蔗糖 15 g/L(pH 5.6)的培养基表面上,然后观察有无污染发生以及种胚的萌发情况。培养条件为:温度  $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ,光照强度 1 000~1 500 lx。

1.2.2 继代培养 石斛种子萌发后筛选出生长良好的原球茎,接种到培养基 1/4MS+土豆 100 g/L+蔗糖 18 g/L (pH 5.6)中增殖出拟原球茎,再选择大小一致,分化旺盛的拟原球茎进行稳定培养,建立起拟原球茎的增殖培养体系。

1.2.3 多倍体植株的诱导 取增殖培养 20 d 的拟原球茎浸入到含不同浓度秋水仙素的液体培养基中,进行不同时间的处理(表 1)。处理条件为:温度  $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ,光照强度为 1 000~1 500 lx,摇床转速 100 r/min。拟原球茎处理后用无菌水冲洗 3 遍,在灭菌的滤纸上吸干水分,再接种于不含秋水仙素的固体继代培养基 1/4MS+土豆 100 g/L+蔗糖 18 g/L(pH 5.6)上进行恢复和增殖培养。约 30 d 继代 1 次,转入 1/4MS+土豆 100 g/L+蔗糖 20 g/L(pH 5.6)生根培养基上,待 3 个月后再转入壮苗培养基 1/4MS+土豆 100 g/L+香蕉 50 g/L+蔗糖 20 g/L(pH 5.6)上使其分化并长成大苗,即可观察和鉴定苗的形态特性,染色体的倍性和气孔大小及密度,统计成活率。所有材料均在同一条件下培养,以同步生长的材料作为对照。培养条件:温度  $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ,每天光照

第一作者简介:唐娅梅(1985-),女,在读硕士,研究方向为园林生物技术。E-mail:tym4864@163.com。

基金项目:昆明市科学技术基金资助项目(昆科技字 08G100115)。

收稿日期:2010-05-26

12 h。成活率的计算方法:成活率(%)=(成活的拟原球茎个数/拟原球茎的总个数)×100%。

表 1 秋水仙素处理方案

处理	秋水仙素浓度/%	处理时间/h
A1	0.1	48
A2	0.1	60
A3	0.1	72
B1	0.2	48
B2	0.2	60
B3	0.2	72
C1	0.3	48
C2	0.3	60
C3	0.3	72
CK	0.0	72

注:CK表示未经秋水仙素处理的试验对照。

1.2.4 多倍体植株的鉴定 形态观察:观察变异植株和对照植株在植株大小、叶片颜色、叶形等外部形态上表现出的差异。气孔观察:将变异植株和对照植株幼苗撕取叶下表皮进行制片,然后用显微镜观察测定其气孔大小及密度。染色体观察:取处理后的变异植株和对照植株的茎尖或根尖生长点,于0.1 N HCl,60℃水浴中解离8~10 min;用蒸馏水清洗干净后,经改良苯酚品红染液染色、压片,然后用显微镜观察其染色体数目。

## 2 结果与分析

### 2.1 种子萌发培养和原球茎增殖

铁皮石斛种子在播种后约30 d开始萌发,出现绿色点状突起。约培养45 d之后,种子在培养基表面大量萌

发出点状突起形成绿色小原球茎(图1)。将生长良好大小一致的原球茎接种到继代固体培养基上后,原球茎迅速生长并大量稳定的增殖,颜色嫩绿,生长状况良好。

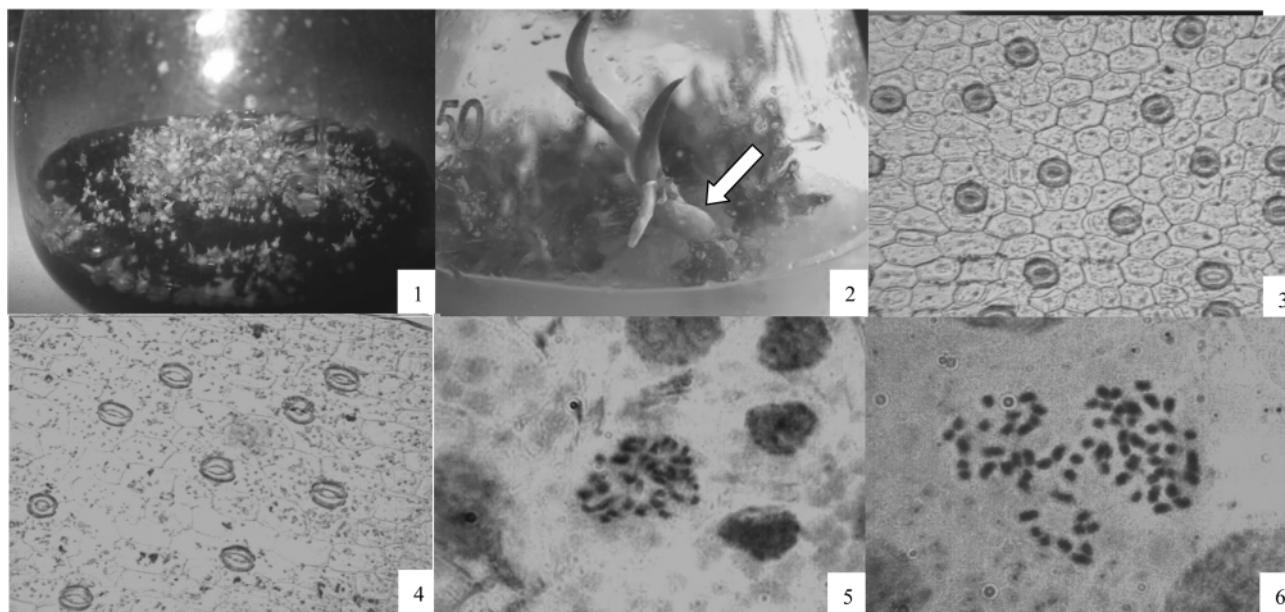
### 2.2 秋水仙素对多倍体植株的诱导结果

由表2可知,随着秋水仙素浓度和处理时间的逐步提高,拟原球茎成活率逐渐降低。浓度为0.1%,处理时间为48 h,拟原球茎的成活率最高,达78%;随着秋水仙

表 2 秋水仙素不同浓度和处理时间对铁皮石斛的诱变结果

秋水仙素浓度/%	处理时间/h	接种数	成活数	成活率/%	形态变异数	形态变异率/%
0.1	48	50	39	78	9	18
0.1	60	50	36	72	14	28
0.1	72	50	32	64	11	22
0.2	48	50	35	70	16	32
0.2	60	50	29	58	13	26
0.2	72	50	24	48	10	20
0.3	48	50	19	38	6	12
0.3	60	50	12	24	5	10
0.3	72	50	8	16	3	6
0.0	72	50	46	92	0	0

素浓度的增高,变异率也相应减少呈现由低—高—低的变化趋势,浓度为0.2%,处理时间为48 h,铁皮石斛的变异率最高,达32%。结果表明,用浓度为0.2%的秋水仙素处理铁皮石斛拟原球茎48 h,成活率达78%,变异率达32%,诱导效果最好。



图版

注:图1:种子萌发;图2:秋水仙素处理后的铁皮石斛形态变化;图3、4:二倍体植株气孔和多倍体植株气孔(二倍体气孔密度>多倍体气孔密度);图5:二倍体体细胞染色体(2n=38);图6:四倍体体细胞染色体(2n=72)。

### 2.3 多倍体植株的鉴定结果

2.3.1 外部形态观察 经秋水仙素处理的铁皮石斛表现出石斛多倍体形态特征(图2):植株粗壮,叶色深绿,叶片增厚,叶形和叶片大小与二倍体对照植株有明显差异,植株生长速度较为缓慢,有少量畸形苗出现。

2.3.2 气孔观察 用光学显微镜观察比较多倍体与二倍体幼苗叶片气孔后发现诱变的多倍体植株气孔增大,单位面积内的气孔数目减少(图3、4),多倍体植株的气孔形状接近圆形而二倍体植株的气孔形状多呈椭圆形。

2.3.3 染色体数目观察 对初步筛选出的变异植株和对照植株的茎尖或根尖生长点通过染色体压片计数,鉴定后发现,对照的二倍体铁皮石斛染色体数目  $2n=38\sim40$ (图5),而经秋水仙素处理的铁皮石斛染色体数目发生改变,其染色体数目变化范围为  $2n=68\sim76$ (图6),故处理后的植株应为四倍体。

### 3 讨论

诱导植物多倍体主要采用秋水仙素处理,而利用原球茎进行多倍体诱变是获得兰科植物多倍体新种质的有效途径,在国内外已有一些研究报道<sup>[14-16]</sup>。郑宝强<sup>[17]</sup>等初步研究了秋水仙素不同浓度、不同处理时间诱导杂种春石斛体细胞染色体加倍后发现,用组织培养结合多倍体诱导技术可获得稳定的多倍体变异株。该研究通过应用不同浓度的秋水仙素和不同的处理时间对铁皮石斛进行多倍体诱导及鉴定。结果表明,用浓度为0.2%的秋水仙素处理铁皮石斛拟原球茎48 h,成活率高,达78%,变异率达32%,诱导效果最好。研究表明秋水仙素的浓度与时间是诱导多倍体的关键,所以应适当掌握处理浓度和处理时间。处理浓度和处理时间若过长,极易产生畸变体甚至死亡。

诱导后的多倍体铁皮石斛染色体数目大多数呈现为  $2n=68\sim76$ ,为四倍体植株。此外,经诱导后的铁皮石斛试管苗生长速度有所减慢,导致假鳞茎膨大,根系粗短等形态上的变化,使其表现出了植株粗壮、叶片增厚等优良性状。同时在对气孔密度和大小的观察过程

中还发现保卫细胞内叶绿体数目的变化,有必要对其进行对比和深入研究。该研究针对铁皮石斛多倍体的诱导能为选育观赏价值高、药物含量高的花药两用铁皮石斛新优品种提供一定的参考价值。

### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1999:75-146.
- [2] Li M F, Xu G J, Xu L S. Investigation and identification of marketable *Dendrobium Herb*(II)[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1991, 22 (4): 173-180.
- [3] 邵华, 张玲琪, 李俊梅, 等. 铁皮石斛研究进展[J]. 中草药, 2004, 35 (1): 109-112.
- [4] 高建平, 金若敏. 铁皮石斛原球茎于原药材免疫调节作用的比较研究[J]. 中药材, 2002, 25(7): 487-489.
- [5] 吴昊妹, 徐建华, 陈立钻, 等. 铁皮石斛降血糖作用及其机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 160-163.
- [6] 邓樱, 周晔, 陈继敏. 秋水仙素诱导兰属‘素心黄’多倍体的方法研究[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(2): 38.
- [7] 张全美, 张明方. 园艺植物多倍体诱导研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2003, 25(4): 223.
- [8] 张志胜, 谢利. 秋水仙素处理兰花原球茎对其生长和诱变效应的影响[J]. 核农学报, 2005, 19(1): 19.
- [9] 陈素萍, 王莉. 党参多倍体育种的研究[J]. 中草药, 1991, 22(5): 224-227.
- [10] 高山林, 朱丹妮, 蔡朝晖, 等. 丹参多倍体性状和药材质量的关系[J]. 植物资源与环境, 1996, 5(2): 1-4.
- [11] 连雪斌. 兰州百合多倍体诱导试验报告[J]. 甘肃农业科技, 1995(6): 14-15.
- [12] 李涵, 郑思乡, 李枝林, 等. 齿瓣石斛多倍体的诱导初报[J]. 云南植物研究, 2005, 27(5): 552.
- [13] 李秀兰, 安东. 秋石斛同源四倍体诱导与鉴定[J]. 园艺学报, 2009, 36 (8): 1239-1242.
- [14] Cribb P, Butterfield I. Genus *Pleione* [M]. Borneo: Natual History Publications, 1999.
- [15] Lu M C. High frequency plant regeneration from callus culture of *Pleione formosana* Hayata [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Cuture, 2004, 78(1): 93.
- [16] 李涵, 郑思乡, 龙春林, 等. 沉香虎头兰多倍体诱导及其鉴定[J]. 园艺学报, 2005, 32(5): 853.
- [17] 郑宝强, 张莹, 王雁, 等. 春石斛的多倍体诱导[J]. 园艺学报, 2009, 36 (9): 1381-1384.

## Polyplod Induction and Identification of *Dendrobium candidum*

TANG Ya-mei, ZHANG Chen-liang, SU Bing, CHENG Qian, NA Hai-yan

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064)

**Abstract:** Taking protocorm-like bodies of *D. candidum* as material and colchicines as mutagen, the polyploid induction of colchicines on *Dendrobium candidum* under different concentrations of colchicines and period conditions were studied. The results showed that it resulted in the best inductive effect to use 0.2% colchicines to deal with the PLB of *D. candidum* of 48 h. Its survival rate reached 78% and mutation rate was 32%. The plant of *D. candidum* treated with colchicines was different from those of diploids in morphology, stoma diameter and chromosome numbers, showed a polyploid phenotype. Chromosome observation founded that the chromosome number of tetraploid cells was  $2n=68\sim76$ , while that of diploid cells was  $2n=38\sim40$ .

**Key words:** *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.; colchicines; polyploidy