

生物技术在我国石斛产业上的应用

包英华, 白 音, 任安祥, 潘春香

(广东韶关学院英东生物工程学院, 512005)

摘 要: 石斛是重要的药用和观赏植物, 对植物快繁技术、原生质体融合和基因转化等生物技术在石斛产业化中的应用作一综述, 并对石斛的开发利用和产业化生产中存在问题和补救措施作了分析。

关键词: 石斛; 生物技术; 应用

中图分类号: S 687 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)04-0086-03

石斛属(*Dendrobium* Sw.)为兰科多年生附生草本植物。全球计有 1 500 种, 我国共有 74 种, 2 个变种^[1], 分布于秦岭、淮河以南的云南、四川、贵州、广西、广东、海南、福建、台湾等省区。石斛属植物既是名贵中药(药用石斛), 又为美丽的观赏兰花(石斛兰), 其新鲜或干燥茎入药, 具有“滋阴清热, 生津益胃, 润喉明目, 延年益寿”的功效, 被誉为“中华九仙草”之首, 它富含多糖、生物碱和氨基酸及微量元素, 能增强人体免疫机能, 具有抗癌、抗衰老、扩张血管以及有效减轻肝脏病理损害等功效, 对眼科疾病也有明显的治疗作用^[2~5]。另外, 石斛花姿优雅, 彩丰色丽, 且花枝长、花大又多、花期长, 作为盆栽品种的春石斛(节生型)和作为切花的秋石斛(蝶花型)均有很高的观赏价值。

由于石斛的深入开发和广泛利用, 需大量原材料投入到药品和花卉的研制和生产, 野生石斛资源几乎遭到了毁灭性的开发, 加上环境污染和大量采伐树木, 石斛赖以生存的野生生境遭到破坏。石斛的人工栽培又存在着成活率低、产量低、进入盛产期年限长等问题而导致资源严重匮乏, 产量骤减, 产生石斛中药市场和花卉市场供不应求的现象。随着生物技术的发展, 尤其石斛组织培养技术的开发和应用, 既能保护珍稀石斛资源, 又将带来巨大的经济效益和社会效益。我国著名药用植物专家肖培根院士指出:“对于珍稀濒危野生植物如铁皮石斛等, 应加强就地保护或移地保护, 同时应采用生物技术手段, 加速繁殖, 扩大数量”。目前, 石斛种子萌发技术的进步、组培快繁技术的应用、新品种的不断育出和种苗生产技术的突破, 使石斛在世界各地逐渐走上产业化的道路。

第一作者简介: 包英华(1973-), 女, 讲师, 从事于植物生理与分子生物学研究, Tel: 0751-8121376, E-mail: byinghua@126.com。

基金项目: 韶关市科技计划项目(2005-10)。

收稿日期: 2006-12-10

1 石斛的组织快速繁殖

传统的石斛繁殖主要靠分株繁殖来实现, 繁殖系数低、速度慢, 无法满足生产的需要; 有性繁殖时, 由于种子小, 没有胚乳, 需与真菌共生才能萌发, 萌发率低而影响繁殖速度。植物快速繁殖技术, 带动了石斛的产业化生产, 解决了石斛的原材料瓶颈, 有助于短期内提供大量的试管苗, 确保石斛资源的保持和可持续利用, 且对于抢救处于濒危的野生石斛产生重大效果。目前, 石斛原球茎的诱导、继代培养和壮苗培育等技术方面的研究都已取得很大突破, 在工厂化育苗技术上, 我国石斛组织培养和工厂化生产技术已获得成功。

1.1 外植体来源

除石斛茎尖、叶片和种子以外, 茎段、茎节、侧芽、叶柄、叶尖、根尖、根段、花序和花梗等器官均能成为组织培养外植体来源。茎尖是最早用于石斛快速繁殖的外植体, 一般带 1~2 个叶原基的茎圆锥成活率高。叶片作为外植体既可减少对母株的伤害, 取材又不受季节的限制, 且数量多, 是比较理想的外植体材料来源。石斛的种子用于组织培养极富前景, 已有大部分石斛(如铁皮石斛、美花石斛、玫瑰石斛、广东石斛、马鞭石斛等)的种子, 在无菌培养基上均能萌发形成试管苗。使用其它外植体时应选生理年龄小、幼嫩的、无病虫害材料即可。

1.2 培养基及培养条件

组织培养的成功与否取决于材料本身因素和培养基种类及其成分。用于石斛组织培养的基本培养基有 MS、Nitch、KC、N₆、B₅、CH、White、SH、Kn、VW、W 以及其改良的培养基, 使用最多的是 MS 培养基, 可根据不同种而选择合适的培养基。

培养基成分中首先是要筛选适宜的植物生长激素, 因激素是启动植物器官分化的重要诱导子, 它在植物体内的不均匀分布而导致植物器官建成和分化方向的差异性。通过添加不同种类和不同浓度的外源激素对植物体进行培养, 改变植物体内的激素水平, 从而达到控

制其器官分化方向的目的。石斛组织培养常用的外源激素主要有生长素类(如 IAA、2,4-D、IBA 和 NAA) 和细胞分裂素类(如 BA、ZT、TDZ、CPPU、PP₃₃₃ 和 KT) 以及 GA₃ 和 ABA 等。对不同种石斛来说,在不同的生长发育阶段所需激素的量和种类都不尽相同,但激素种类组合不当及激素浓度过高或过低都不利于器官发生或原球茎的增殖,只有适当的激素种类组合及浓度才能有效地促进器官发生或原球茎的生长增殖。此外,由于石斛组培过程中的营养要求复杂,因此在适宜的激素配比的基础上加入天然提取物(如苹果汁、香蕉汁、土豆汁、马铃薯汁、白萝卜汁、椰汁、黄瓜汁、绿豆芽汁、酵母提取物、水解酪蛋白、荸荠提取物、番石榴泥、水解乳蛋白等)往往可以达到很好的效果。其次是要选择碳源,石斛组织培养中大多用蔗糖(浓度为 2%~3%)作为培养基碳源,因蔗糖中含有刺激石斛生长的矿物质,能促进组培苗的生长,而且价格十分低廉,可以降低组培成本。再次是活性炭(浓度为 0.1%~0.5%),在培养基中适当添加活性炭可吸附代谢过程中产生的废弃物,防止组织褐变,还能刺激胚性细胞的生长。活性炭还能减弱光照,使根生长加快,根系发达,增强根系吸收培养基中营养成分的能力,从而促进了茎、叶生长。此外,培养基 pH 值也影响细胞的透性、代谢和培养物的生长和分化,石斛喜酸性环境,故须培养基的 pH 值维持在 5.0~6.0,尤其原球茎在 pH5.6~5.8 的环境中生长最好,过酸或近中性的环境都不合适。

适宜的培养条件也对石斛的组织培养和快速繁殖起非常重要的作用。石斛培养温度一般为 26℃±2℃,石斛种子在 25℃ 以上萌发生长较快,当温度低于 10℃ 时,即使满足营养条件也不能萌发,在 20℃~25℃ 时原球茎增殖较好,温度超过 25℃ 原球茎就开始分化成苗。光照强度为 800~3 000Lx、光照时间为 12~16h/d 之间较适宜。

1.3 试管苗移栽

组织培养获得的试管苗能否应用于生产,是否有效益,取决于试管苗移栽成活率,这个问题正是石斛产业化的瓶颈。目前,应用于石斛试管苗移栽的措施为,在实验室先把试管苗(高约 3cm 以上)进行驯化或练苗 1~2d,然后清洗根部,放在 0.1% 高锰酸钾液或 800~1000 倍的多菌灵可湿性粉剂液中浸泡 10~15min,随后出瓶移栽或盘练(移栽时要注意需 3~5 株一丛种植,因石斛苗具有群体抗性作用,丛栽比单株栽培效果好),然后放在干净、排水好的温室里。在初期(20d 左右)应保持较高的空气湿度,初期培养后,将石斛苗进行容器移栽或直接栽在树干或岩石上。在阴凉潮湿、长有苔藓的树干和岩石上,栽种石斛苗成活率高。容器移栽要选用吸水石、砂岩、片麻岩等作基质,覆上苔藓或树皮粉进行栽

种。石斛移栽试验发现,以木屑为基质的试管苗成活率在 90% 以上,其次是木屑与腐叶土或小石子等量混合的基质,成活率在 80% 左右。此外,移栽季节最好选春季,因春季气温逐渐回升,有利试管苗适应自然环境,最宜移栽试管苗,如在广东地区,大多数石斛种类在 3~11 月均可出瓶,但移栽成活率以温度较高、湿度较大的 4~6 月最高,8 月份由于高温干燥和骤雨,对石斛幼苗成活和生长不利,易导致死苗。总之,不同石斛种的组培苗移栽基质的要求有所差别,不过移栽基质越接近该种石斛的野生生长环境,其成活率越好,生长速度越快。因此,为了组织培养技术更好地为石斛生产服务,就地研究和工厂化生产是石斛保护和可持续利用石斛的最佳策略。

2 石斛的育种研究

种质资源和组织培养是石斛育种的基础,多种育种途径(原生质体融合、基因转化)有效结合是今后培育石斛的主要方法。

2.1 引种驯化育种

我国石斛资源中有些野生种具有很高的药用和观赏价值,是最适宜引种驯化的种类。目前我国栽培的石斛品种绝大多数都是由野生种类引种驯化而来。在引种驯化过程中,首先应引种到与原产地生态条件相近的地区栽培驯化,然后再引种到其他地区用人工设施创造与石斛要求相近的环境进行栽培。不过引种驯化所得的新品种靠传统的分株方法进行繁殖,其产生商品效应的时间长,不能满足市场发展的需求。因此,寻找有效的良种繁育方法势在必行。

2.2 原生质体融合育种

长期以来,石斛的育种以自然选种为主,自种子无菌萌发成功后,开展了石斛品种间、种间及属间的杂交育种。石斛原生质体融合为石斛育种开辟了新的途径,而且倍受日益发达的石斛产业的关注,因为通过这种技术能够培养远缘杂交产生的新品种,对石斛产业的发展有着不可估量的价值。原生质体融合技术能使遗传基因高频率重组,克服杂交不亲和性,将植物基因在不同种属间相互转移,从而集双亲优良性状于一体,达到改良植物的目的。将亲源关系较远的两种植物原生质体融合成功获得杂种细胞并分裂,这在遗传上是一个突破,可能与体细胞杂交中双亲的染色体通过消减而降低双亲遗传物质的不平衡有关,可能当双亲遗传物质在杂种细胞中达到平衡恢复分裂分化能力,说明这两种植物可能存在再生互补效应。如建立铁皮石斛与绞股蓝体细胞杂交细胞系,为采用生物反应器大规模培养该杂种细胞提供了依据,这样就有可能直接从杂种细胞提取药用成分,满足药材市场的需求,从而提高生产效率,为两种药材的工业化和商业化生产药用成分提供了技术

基础^[6]。目前,已从石斛中分离得到原生质体。试验证实,从试管苗幼叶能得到高质量的原生质体,存活率达90%,通过电融合,融合率可达10%,研究者们还从酶液、培养方式及培养基的选择等方面进行了有益的探索,取得了一些突破。把从国外引进的名贵兰花蝴蝶石斛与美花石斛杂交,尽管其杂交胚早期不育,但利用早期胚培养技术,克服了这种远缘杂交的不亲和性,育成了蝴蝶石斛×美花石斛这种具较高观赏价值的名贵花卉^[7]。

2.3 基因工程育种

通过遗传基因转化,将克隆的具有高观赏价值或药用价值的基因导入石斛,一方面可以提高石斛价值,另一方面可以创造新品种,丰富扩大石斛的种质资源。石斛基因工程起步晚,进展缓慢,因为石斛对基因载体根瘤农杆菌或发根农杆菌不敏感,缺乏合适的载体,而一些直接转移的方法如PEG介导和电激法成功率又不高,但YangHH等从一种石斛兰细胞中分离出了色素合成基因,并且得到了高度表达^[8]。但石斛花色基因工程(改变花色、花卉株形、花卉气味、花卉贮藏与保鲜)和抗病毒、抗细菌、抗真菌、抗虫基因工程等方面的研究仍欠缺,转基因石斛兰在花卉市场中所占的比率极有限。近年来,许多研究机构和公司投入了大量的精力致力于开发基因工程花卉新品种,但大部分的努力仍是在发展新花卉再生和转化体系,只有少数的实验室转化技术成为真正常用的技术手段。

3 结束语

虽然生物技术对石斛的产业化生产发挥了极大的作用,但国内石斛产业链条环节还是存在问题。第一,石斛组培技术要求较高,操作严格,价格不菲,只有具备了一定的经济和设备条件,才能实现规模化生产。第二,石斛试管苗出瓶后的成活率低,生长缓慢,苗期的管

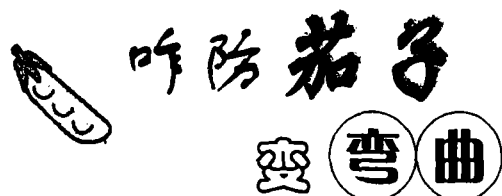
理十分困难,限制石斛的生产。第三,控制污染技术环节不够完善而造成巨大资源浪费。第四,观赏石斛兰品种单调,新品种和品种数量少,种类欠缺,无法成为花卉产业的主流。

对此,国内许多单位在以下几个方面集中研究:一是石斛试管苗的工厂化生产过程中如何降低生产成本及如何控制污染;二是石斛特殊生理需求的机理及各类养分供应对于苗期石斛生长的作用;三是石斛根系与菌根真菌怎样共生生长;四是由组培苗长成的石斛与野生石斛相比,主要成分含量和品质是否发生变化;五是用基因工程与分子生物学技术,有目的和方向性培育新品种等。

总之,应加大石斛产业化对策保护力度,加强科学研究,鼓励项目支持力度,重视科学与产业结合,同时运用现代生物技术,尽快实现石斛的规模化、集约化及产业化栽培,带来显著的经济效益、社会效益和生态效益。

参考文献:

- [1] 吉占和, 陈心启, 罗毅波, 等. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999, 68.
- [2] 施红, 陈玉春. 石斛复方制剂的抗氧化和免疫功能的相关研究[J]. 福建中医学院学报, 1997, 7(4): 13-15.
- [3] 王天山, 陆跃鸣, 马国祥. 鼓槌石斛中化学成分对K562肿瘤细胞株生长抑制作用的体外实验[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(2): 123.
- [4] 黄民权, 阮金月. 铁皮石斛氨基酸组分分析[J]. 中药材, 1997, (1): 32-33.
- [5] 黄玲, 施红, 刘如玉. 石斛复方制剂的药物微量元素含量测定及意义[J]. 福建中医学院学报, 1998, (3): 28-30.
- [6] 魏小勇, 张铭. 铁皮石斛与绞股蓝原生质体融合的初步研究[J]. 中草药, 2004, 35(7): 811-813.
- [7] 曾宋君, 程式君, 张京丽. 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究[J]. 园艺学报, 1998, 25(1): 75-80.
- [8] Yang H H, Chua N H. Isolation and characterization of genes involved in the pigment biosynthesis of orchids[C]. Proceedings of 13th World Orchid Conference, 1990, 48.



茄子弯曲长不直, 应采取以下措施进行防治: 控制苗龄, 早作定植准备, 及时定植, 促进秧苗缓苗。控制氮肥的施用量, 一般宜采用深沟高畦栽培方式, 以促进根系生长。

1 采用深中耕的物理办法切断部分根系, 控制植株生长。

2 适时适量整枝打叶, 使通风透气良好, 并且适时适量使用植物生长调节剂如多效唑、缩节胺、矮壮素等化控方法抑制植株生长。

3 采用手捏的方法防治。看准“疯长”植株, 从苗枝顶部往下数, 在第3叶以下节间处用两手指轻捏, 使其放“响”出水, 使之输导组织暂时损伤不能向上输送养分而停长“蹲苗”, 待到3-5d后捏过的伤口愈合成为一个“疙瘩”后再恢复正常生长。此时, 周围没有被“捏”的弱苗、小苗、弱枝及小枝都在生长, 大部分赶上了被“蹲”成壮苗的原“疯长”苗, 使得秧苗生长成一致的高产、优质壮苗。