

# 石斛属植物组织培养及遗传转化研究进展

张建勇, 刘涛, 袁佐清 (山东理工大学生命科学院, 山东淄博 255049)

**摘要** 石斛作为一种集药用和观赏于一体的珍稀植物, 近年来其组培快繁和基因工程研究取得了比较大的进展。综述了石斛属植物组织培养外植体、培养基、增殖与分化、遗传转化方法、靶材料、选择标记基因和报告基因等方面的研究进展, 为石斛的开发和利用提供科学依据。

**关键词** 石斛; 组织培养; 遗传转化

**中图分类号** Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)03-00656-02

## Research Progress in *Dendrobium* Tissue Culture and Genetic Transformation

ZHANG Jian-yong et al (School of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255049)

**Abstract** The tissue culture, rapid propagation and genetic engineering of *Dendrobium* plant have been advanced obviously in recent years. In the present paper the progress in its tissue culture including explants, media and cultured methods were outlined, the advance in its genetic transformation involving in transformation methods, target tissue, selection of genes and report genes were reviewed. The prospect and problem in the tissue culture and genetic engineering of the *Dendrobium* were also discussed.

**Key words** *Dendrobium*; Tissue culture; Genetic transformation

石斛又名石斛兰 (*D. orchids*), 属兰科石斛属 (*Dendrobium*), 是兰科中的第二大属, 全球共有大约 1 500 种<sup>[1]</sup>, 我国有 76 种<sup>[2]</sup>。中药上广泛使用的石斛 (*Herba Dendrobii*) 来自兰科石斛属植物的茎, 来源于野生资源, 国内国际需求量日益加大, 价格也越来越昂贵。由于石斛属植物被过度采挖利用, 加上生态环境的破坏、繁殖率低和生长缓慢等特点, 1987 年已被国家列为濒危绝灭的植物药材之一。国内外学者利用组织培养进行石斛的快速繁殖, 以提高繁殖系数, 解决资源紧缺的问题<sup>[3]</sup>。同时成熟的组织培养体系也是遗传转化的基础, 随着组织培养技术在石斛植物中的广泛应用, 石斛基因工程研究也取得了很大进展。

## 1 石斛属植物的组织培养

现代药理研究表明, 石斛具有抗癌、防癌、抗衰老、增强机体免疫力、扩张血管、抗血小板凝集、抗辐射等多种功效<sup>[4]</sup>, 因此药用石斛中的一些珍贵种类成为目前离体培养研究的重点<sup>[5-11]</sup>。而国外主要以观赏石斛为主, 着重于组织培养条件的优化<sup>[12]</sup>。

**1.1 外植体** 石斛离体培养外植体的取材来源较广, 有种子<sup>[5-6]</sup>、茎段<sup>[9]</sup>、茎尖<sup>[13]</sup>、腋芽<sup>[14]</sup>、根尖<sup>[15]</sup>、叶<sup>[16]</sup>及试管苗<sup>[7]</sup>等。在药用植物组织培养中, 外植体的选择十分关键, 不同的取材部位和取材时期, 培养的结果也不一样。张艳等<sup>[17]</sup>以金钗石斛取材部位、基本培养基、激素浓度配比 3 因素进行正交试验, 结果表明, 取材部位是最敏感的因素。卢文芸等<sup>[18]</sup>用环草石斛的茎段在 MS 培养基中培养, 研究了不同取材的位置对环草石斛出芽的影响, 结果表明, 茎尖部位明显要高于其他部位, 茎中部次之, 而茎基部几乎不能萌发; 茎段外植体苗比种子苗成株快, 茎粗, 苗壮, 易成活; 外植体苗分段增殖时基部茎段的增殖系数比上部茎段大, 生长速度快; 继代增殖苗段比野生植株增殖快。

**1.2 培养基** 选择合适的培养基是组织培养最关键的一步。MS<sup>[3]</sup>、N6<sup>[5]</sup>、B5<sup>[8]</sup>及 KC<sup>[19]</sup>等基本培养基, 均可用于石斛

属植物的离体组织培养, 但效果不同。MS 和 1/2MS 是离体培养最有效和最常用的基本培养基<sup>[3, 7, 11]</sup>, 1/2MS 培养基则适宜生根<sup>[9]</sup>。王国梅等<sup>[20]</sup>以野生金钗石斛茎段诱导长出的原球茎为材料, 比较了 MS、1/2 MS、B5、Miller 4 种不同基本培养基在 4 个不同培养周期中金钗石斛原球茎生长增殖的情况, 筛选出最佳增殖培养基 B5。不同的培养目的, 所对应的培养基也不同。张治国等<sup>[21]</sup>研究了 6 种不同基本培养基对铁皮石斛原球茎增殖的影响, 结果表明, 基本培养基对铁皮石斛原球茎增殖作用影响很大, 不同器官的适宜培养基不同, 1/2MS 适宜原球茎增殖; MS 适宜种子萌发、茎段和叶片培养; N6 适宜种子萌发、叶片培养; 改良 White、KC 适宜茎段培养。曾宋君等<sup>[22]</sup>发现 N6 培养基对石斛胚的萌发和生长最好, 而以茎尖作为培养材料, N6 培养基诱导愈伤组织能力明显不如 MS。朱艳等<sup>[23]</sup>以铁皮石斛茎段诱导丛生芽作为目的, 筛选出 1/2MS 诱导丛生芽的效果好, 生成的苗粗壮。

在石斛的组织培养中, 以蛋白胨和白糖代替蔗糖进行试验, 大大降低了快繁生产中的成本<sup>[22]</sup>。Mitra 等<sup>[24]</sup>利用可控制的 CO<sub>2</sub> 气体作为碳源, 根长与叶子的数量与含 2% 蔗糖培养基中的相等, 组培苗的干重和鲜重都高于含蔗糖培养基的组培苗, 但是 CO<sub>2</sub> 对发根影响不大。

**1.3 增殖与分化** 原球茎是石斛试管苗繁殖的关键, 其增殖与分化情况直接影响着试管苗培养的成功与否。目前多以原球茎诱导、增殖、分化苗形成与生长、试管苗移栽等培养条件的研究为主<sup>[11, 16]</sup>。添加植物激素 Kt 和 2,4-D 对促进霍山石斛试管苗生长和继代增殖的效果最佳<sup>[7]</sup>; NAA 对金钗石斛原球茎的增殖效果明显好于 IBA, 在不同激素 6-BA 和 NAA 配比组合正交试验中, 处理 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L 的配比为最佳激素组合<sup>[20]</sup>。NAA 和 6-BA 有利于鼓槌石斛组培幼苗的生长与分化<sup>[19]</sup>; 铁皮石斛原球茎诱导以 1/2 MS 为培养基, 添加 BA 和 NAA 为佳, 原球茎分化以 1/2MS 添加 BA 和 NAA 为佳<sup>[25]</sup>; 适宜浓度的 GeO<sub>2</sub> (5.00 mg/L) 能够显著增加铁皮石斛原球茎的鲜重<sup>[26]</sup>。培养基中加入天然提取物, 对组织器官的形成及生长也有影响。齿瓣石斛胚培养的最适培养基为改良 N6, 添加椰乳可以提高胚的萌发率, 并增加繁殖系数, 香蕉汁可以加速幼苗的生长及促进生根<sup>[5]</sup>; 铁皮石

**作者简介** 张建勇(1977-), 男, 山东商河人, 硕士, 讲师, 从事植物资源和遗传多样性研究。

**收稿日期** 2006-11-09

斛以添加椰乳对芽的增殖效果最好<sup>[8]</sup>。

## 2 石斛的遗传转化

**2.1 转化方法** 目前报道的石斛的遗传转化主要通过2种方式进行:基因枪转化法和农杆菌介导法。其中基因枪转化法应用较多,成功率也较后者高一些。Chang等<sup>[27]</sup>将兰花花叶病毒(CMV)外壳蛋白(CP)基因用微粒轰击石斛的原球茎的方法进行基因转移,在含有潮霉素的培养基上选择转化株,PCR、Southern、Northern以及Western杂交分析证实了转基因的存在;病毒侵染试验表明,转化株的症状明显低于非转化株。石斛基因工程研究缓慢,主要因为兰科植物对根瘤农杆菌或发根农杆菌不敏感,缺乏合适的表达载体。Yu等<sup>[28]</sup>首先将经薄层切片处理的类原球茎与农杆菌在无抗生素的培养基上共培养,卡拉霉素用于石斛兰转化子的筛选,选择培养6~8周后得到转基因植株。遗传转化主要以原球茎或愈伤组织作为靶材料。原球茎易诱导,转化后也易分化成苗,但原球茎遗传转化后易产生嵌合体,不利于鉴定筛选。Tee等<sup>[29]</sup>使用不同类型的愈伤组织及离体诱导的花序顶端组织作靶材料对石斛中的一个种 *Sonia17* 进行转化,GFP的表达率都较高,但后期培养中,以花序顶端组织为靶材料轰击的个体成活率低。

**2.2 选择标记基因及报告基因** 石斛遗传转化中常用的选择标记基因有潮霉素磷酸转移酶基因(hpt)<sup>[30]</sup>,选择培养中使用潮霉素(Hyg)作为选择剂。Men等<sup>[31]</sup>建立了稳定的农杆菌介导转化原球茎的方法,使用hpt基因作为标记基因转化金钗石斛,转化效率高达18%;Southern杂交和GUS组织化学分析也表明了基因的整合与表达。GUS具有良好的稳定性,灵敏度高,易于检测,是目前植物基因工程研究工作中使用最广泛的一种报告基因<sup>[30-32]</sup>。近年来,绿色荧光蛋白基因(GFP)作为一种新型的报告基因开始在植物基因转化及基因表达调控研究中得到应用,并显示出较其他报告基因更大的优越性:无需底物、酶、辅因子等物质;便于活体检测;检测时只需光照,对细胞无毒害作用<sup>[30]</sup>。

## 3 石斛研究展望

石斛组织培养研究大多集中在快速繁殖、扩大繁殖系数方面,已在多种石斛中成功培育出试管苗<sup>[5,7,9]</sup>。今后应加强石斛的基础性研究,如共生菌、光照、温度、湿度、栽培基质等对石斛生长发育的影响,掌握石斛生长发育的营养需求、物质合成与分解等新陈代谢规律,确定石斛类群生长的最佳生态环境,结合大田栽培,从根本上解决石斛资源短缺问题。要实现药用石斛植物资源的可持续开发,大规模产业化生产是离体培养的发展趋势。

药用石斛离体培养物的化学成分、作用与天然野生品相同,直接以组织培养物替代使用原药材或者生产活性成分也是解决石斛资源短缺的方法之一,但目前涉及该方面的研究还很少。石斛植物中含有多种生物碱、抗癌菲、类黄酮等物质,组织培养过程中次生代谢产物的研究对石斛尤为重要,以便通过生物技术获取这些药用成分。深入了解次生代谢产物的产生及积累动态,通过调控培养条件、添加前体化合物等方法提高活性成分的产量,以探讨组织培养物代替药材使用的可能性;或者建立有效的生物反应器,直接生产活性

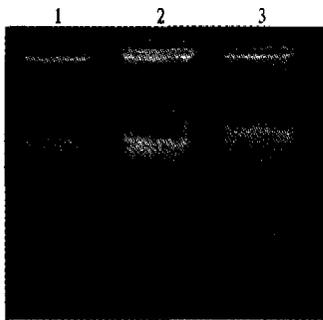
成分,能有效解决药用石斛资源短缺。

通过遗传转化,导入花色、花期、株型等目的基因,一方面可以提高和改善石斛兰的观赏价值,另一方面可以创造新品种,为石斛兰提供了丰富的育种资源。石斛组织培养和基因工程也存在很多问题,试管苗移栽成活率有待进一步提高;生长十分缓慢,周期长,规模小,成本高;石斛对农杆菌敏感性差,转化率低;基因枪转化嵌合体较多等等。总之,随着石斛组织培养技术的完善,基因工程改良石斛品种技术的成熟以及工业化生产技术的发展,这些问题将逐步得到解决,有望缓解当前石斛用量大、植物资源匮乏的紧张状况。

## 参考文献

- [1] LAVARACK B, HARRIS W, STOCKER G. *Dendrobium and its relatives* [M]. Portland: Timber Press, 2002: 14.
- [2] 吉占和. 中国石斛的初步研究[J]. 植物分类学报, 1980, 18(4): 427-449.
- [3] 傅玉兰, 张志平, 姚萍. 春石斛组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(3): 464-465.
- [4] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75.
- [5] 丁长春. 齿瓣石斛的胚培养技术及其快速繁殖研究[J]. 热带农业科技, 2004, 27(3): 10-11.
- [6] 陈之林, 曾宋君, 段俊. 独角石斛的离体繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 342.
- [7] 傅玉兰, 谷凤, 胡传明, 等. 霍山石斛组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(3): 522-523.
- [8] 周俊辉, 钟雪锋, 蔡丁稳. 铁皮石斛的组织培养与快速繁殖研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(1): 23-26.
- [9] 孙廷, 杨玉珍, 陶杰, 等. 金钗石斛的组织培养和快繁技术[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2005, 36(1): 47-50.
- [10] 卢文芸, 唐金刚, 乙引, 等. 五种药用石斛快速繁殖的研究[J]. 种子, 2005, 24(5): 23-25, 28.
- [11] 孔琼, 袁盛勇, 查应洪, 等. 梳唇石斛成熟胚的离体培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 644.
- [12] ROY JONOJIT, BANERJEE NIRMALYA. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* HK. F[J]. Scientia Horticulturae, 2003, 97: 333-340.
- [13] 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.
- [14] 付志惠, 李洪林, 杨波. 广东石斛的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(4): 491.
- [15] 詹志根, 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.
- [16] K P MARTIN, JOSEPH MADASSERY. Rapid in vitro propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants and protocorm-like bodies[J]. Scientia Horticulturae, 2006, 108: 95-99.
- [17] 张艳, 范俊安, 李泉森, 等. 金钗石斛培养初步研究[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(2): 189-190.
- [18] 卢文芸, 张宇斌, 唐金刚, 等. 环草石斛快速繁殖研究[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2004, 22(4): 15-18.
- [19] 徐红, 刘峻, 王峰涛, 等. 鼓槌石斛组织培养研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(6): 378-381.
- [20] 王国梅, 韦鹏霄, 岑秀芬. 基本培养基和激素组合对金钗石斛原球茎增殖的影响[J]. 广西农业科学, 2006, 37(1): 10-12.
- [21] 张治国, 刘琳, 王黎. 铁皮石斛原球茎增殖的培养条件研究[J]. 中草药, 1992, 23(8): 431-433.
- [22] 曾宋君, 程式君. 石斛的试管苗快速繁殖[J]. 中药材, 1996, 19(10): 490-491.
- [23] 朱艳, 秦民坚. 铁皮石斛茎段诱导丛生芽的研究[J]. 中国野生植物资源, 2004, 22(2): 56-57.
- [24] MITRA A, DEY S, SAWARKAR S K. Photoautotrophic in vitro multiplication of the orchid *Dendrobium* under CO<sub>2</sub> enrichment[J]. Biological Plantarum, 1998, 41(1): 145-148.
- [25] 蒋波, 杨存亮, 黄捷, 等. 铁皮石斛原球茎生长分化及生根壮苗研究[J]. 玉林师范学院学报, 2005, 26(3): 66-69.
- [26] 唐凤, 丁小余, 丁鸽, 等. 镉对铁皮石斛原球茎的生长及抗氧化酶的影响[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 2005, 28(4): 86-89.
- [27] CHANG CH, CHEN Y CH, HSU Y H, et al. Transgenic resistance to Cymbidium mosaic virus in *Dendrobium* expressing the viral capsid protein gene[J]. Transgenic Research, 2005, 14: 41-46.

pMC73A 在接合子中的拷贝数比较低的缘故<sup>[7]</sup>。



注:1.供体菌 NG13(pMC73A);  
2.受体菌 MZ;3.MZ 接合子。  
图1 接合子的质粒检测

**2.3 质粒 pMC73A 在接合子中的稳定性** 为确定质粒在相思根瘤菌 MZ 中的稳定性,将接合子在没有抗生素的 YMA 培养基上,单菌落传代 5 代以上。然后将大量菌落转至含有抗生素的平板上培养,没有发现有抗性丧失的菌落。

#### 2.4 接合子的结瘤试验

接合子能否和野生型 MZ 菌株一样结根瘤是试验成功

与否的关键。结瘤试验表明,没接菌液的对照植物发育细弱,叶色发黄,根上无根瘤。而接种有接合子菌液的相思苗木植株颜色深绿,高大,根上长有根瘤。但是接有催婉克氏菌液的植株所结根瘤的剖面为白色,为无效根瘤,而接有 MZ 和 MZ 接合子所结根瘤为暗红色,为有效根瘤。另外,接有 MZ 菌液的植株所结根瘤数为 11.2 个,而接有接合子菌液的马占相思植株所结的根瘤数为 21.2 个。这虽然不能确定接合子的固氮能力比受体菌 MZ 强,但至少表明接合子能和受体菌一样具有结瘤能力(表 2)。

表 2 接合子的结瘤情况

菌株	根瘤数量//个/株	植株鲜重//g/株
对照	0	0.378
NG13	5.6	0.416
MZ	11.2	0.463
接合子	21.2	0.467

### 3 讨论

EB 是一种荧光染料,它能结合在 DNA 分子上,在紫外光的激发下产生桔黄色荧光。紫外光下观察,肉眼可见的最低

浓度是含 DNA  $80 \times 10^{-6}$  mg 左右,相片上最后可见浓度含 DNA  $20 \times 10^{-6}$  mg 左右。赵书春等在对链霉菌 T8-4 进行质粒检测时,用常规的碱性溶菌法抽提质粒进行普通琼脂糖凝胶电泳,没有检测到质粒的存在。而利用高压脉冲电泳技术则观测到 2 个大的质粒<sup>[8]</sup>。笔者在对相思根瘤菌 MZ 进行质粒检测时,采用常规的质粒检测的菌体量,检测不到质粒,只有把菌体增加到一定的量,才能在琼脂糖胶上看到较清晰的质粒条带。而对接合子进行质粒检测时,尽管加大了菌体量和上样量,但质粒 pMC73A 条带还是比较模糊。为进一步证明接合子,可以通过 Southern 杂交,看能否得到阳性杂交带;也可以从接合子中提取总 DNA 去转化催婉克氏菌,然后从转化子中提取质粒进行酶切分析。

试验表明,催婉克氏菌 NG13 和相思根瘤菌 MZ 之间的接合转移频率并不是很高。接合转移是个十分复杂的过程,涉及区域广泛,调控复杂且各种质粒之间存在着许多不同。目前根瘤菌质粒的研究较集中在农牧方面的草本油料豆科植物,对木本豆科植物研究报道不多,而有关质粒在相思根瘤菌间的接合转移国内还未见报道。因此有关相思根瘤菌质粒的接合转移还有待于进一步研究探讨。

#### 参考文献

- [1] 廖苏华,梁建庆,李浩华,等.耐氮固氮型催婉克氏菌某些生理特性[J].微生物学杂志,1997,17(2):9-11.
- [2] 尚军红,康丽华,罗玉萍,等.相思根瘤菌培养基优化及固氮酶活性研究[J].生物技术,2005,15(1):72-74.
- [3] 邱晓颖,朱红慧,卢秋燕,等.质粒 pMC73A 在宿主细菌中的稳定性研究[J].高技术通讯,1998,8(6):1-4.
- [4] 吴红慧.大豆根瘤菌培养基的优化和剂型的比较研究[D].武汉:华中农业大学,2003:19-20.
- [5] 王常霖,赫茨.转座子 Tn-Mob 对菜豆根瘤菌共生基因的诱变、转移和初步定位[J].遗传学报,1988,15(1):23-25.
- [6] 李卓康,喻子牛,何绍江,等.农业微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,1996:93-95.
- [7] 李维泉,沈美娟,焦瑞身.质粒 RSR1010 从大肠杆菌到稀有放线菌头状链轮丝菌和星状诺卡氏菌的接合转移[J].微生物学报,1999,39(4):376-379.
- [8] 赵书春,周秀芬,邓子新.大线性质粒 pHZ1000、pHZ1001 在链霉菌种间的接合转移[J].微生物学报,2000,40(4):435-438.

(上接第 657 页)

- [28] YU H, YANG S H, GOH C J. Agrobacterium-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the class 1 knox gene *DOH1*[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20:301-30.
- [29] TEE C S, MARZIAH M, TAN C S, et al. Evaluation of different promoters driving the GFP reporter gene and selected target tissues for particle bombardment of *Dendrobium* Sonia 17[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21:452-458.
- [30] YU ZH H, CHEN M Y, NIE L, et al. Recovery of transgenic orchid plants with

hygromycin selection by particle bombardment to protocorms[J]. Plant Cell, 1999, 58:87-92.

- [31] MEN SH ZH, MING X T, LIU R W, et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 75:63-71.
- [32] TEE C S, MAZIAH M. Optimization of biolistic bombardment parameters for *Dendrobium* Sonia 17 calluses using GFP and GUS as the reporter system[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 80:77-89.

## 科技论文写作规范——结果

利用图、表及文字进行合乎逻辑的分析。务求精练通顺。不需在文字上重复图或表中所具有的数据,只需强调或阐述其重要发现及趋势。