

# The Feasibility of Using Clonal Ploidy Breeding in the Development of *Dendrobium officinale* Industrialization

Juan Su, Jingjing Chao, Junfeng Tao, Xiao Wang, Kunhua Li, Qingqing Shen, Tianzhi Ma, Jian Yue\*

Yunnan Shanlihong Biological Technology Company Limited, Kunming Yunnan

Email: [ynshanlihong@163.com](mailto:ynshanlihong@163.com)

Received: Jun. 4<sup>th</sup>, 2018; accepted: Jun. 21<sup>st</sup>, 2018; published: Jun. 28<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

*Dendrobium officinale* is a perennial herbaceous plant, which has great medicinal value, such as nourishing the stomach, enhancing immunity, anti-aging, anti-tumor and lowering blood glucose, and also has great commercial value. Polyploid breeding is one of the most common methods for crop breeding. The advantage is that polyploid plants have more viability in relatively unstable environment and can adapt to harsher environment. Polyploid breeding method can be used to obtain *Dendrobium officinale*, which provides a theoretical basis for its industrial production. This paper summarized the simple biological characteristics of *Dendrobium officinale*, the progress in research on polyploidy induction technology and the main methods of polyploid identification, at the same time it indicated the feasibility of polyploidy induction technology of *Dendrobium officinale* and the problems in industrial production.

## Keywords

*Dendrobium officinale*, Polyploidy Induction, Medicinal Plants

# 无性系倍性育种在铁皮石斛产业化发展中的可行性

苏娟, 钞晶晶, 陶俊锋, 王晓, 李昆华, 沈庆庆, 马田芝, 岳健\*

云南山里红生物科技有限公司, 云南 昆明

Email: [ynshanlihong@163.com](mailto:ynshanlihong@163.com)

收稿日期: 2018年6月4日; 录用日期: 2018年6月21日; 发布日期: 2018年6月28日

\*通讯作者。

文章引用: 苏娟, 钞晶晶, 陶俊锋, 王晓, 李昆华, 沈庆庆, 马田芝, 岳健. 无性系倍性育种在铁皮石斛产业化发展中的可行性[J]. 生物过程, 2018, 8(2): 48-53. DOI: [10.12677/bp.2018.82006](https://doi.org/10.12677/bp.2018.82006)

## 摘要

铁皮石斛属多年生草本植物,具有养胃生津、增强免疫力、抗衰老、抗肿瘤和降血糖等巨大的药用价值,同时也具有较大的商业价值。多倍体育种作为近代作物育种常用方法之一,其优点在于多倍体植物在相对不稳定的环境中具有更为强大的生存能力,能够适应更为恶劣的环境。采用多倍体育种方法可以快速获得多倍体铁皮石斛,并为产业化生产提供了理论依据。本文概述了铁皮石斛基本生物学特征、多倍体育种技术的研究进展及多倍体植株的鉴定方法,指出了多倍体育种技术在铁皮石斛中的应用的可行性以及产业化生产中可能出现的问题。

## 关键词

铁皮石斛, 多倍体诱导, 药用植物

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*),为兰科石斛属多年生附生草本植物。在我国,主要分布于秦岭、淮河以南地区,主要有浙江、安徽、云南、贵州、四川等地。它是我国传统的名贵中草药,被列为“中华九大仙草之首”,具有降低血压、扩张血管、免疫调节、抗肿瘤等功效[1]。铁皮石斛的种子细小、无胚乳,在自然条件下必须与某些真菌共生才能萌发,因此繁殖能力极低。多年以来,商品石斛主要依靠野生药用石斛资源,随着药用石斛开发利用的不断深入和国内外需求量的逐年增加,野生药用石斛资源遭到了严重破坏,有些地区甚至面临枯竭[2]。目前,铁皮石斛产品的工业原料主要通过大棚种植,人工栽培出来的。人工栽培品种混杂,品种选育与质量控制滞后等是铁皮石斛产业面临的主要问题[3]。因此有必要进行品种选育和提纯复壮工作。而多倍体植物具有产量高,抗性强,次生代谢物含量提升等优良特征。本文综述了多倍体育种技术的研究现状,分析了多倍体育种技术在药用植物铁皮石斛产业化培育中可能存在的问题,以期为以后铁皮石斛的资源利用奠定一定的理论依据,有利于铁皮石斛产业的可持续发展。

## 2. 铁皮石斛生物学特征及其药用价值

### 2.1. 铁皮石斛生物学特征

铁皮石斛的茎丛生,圆柱形,直立,绿色或铁灰色,有明显的节和纵槽纹,基部稍窄;高几厘米至几十厘米不等,多节,节间略膨大,节部稍缢缩,黑褐色并具明显光泽。叶少数,互生于茎上部,无柄,叶片长圆状披针型;叶鞘膜质,紧抱节间,灰白色;叶面与叶鞘均具淡紫色斑点。总状花序生于具叶或无叶茎的上部节上,花2~5朵,淡黄绿色或淡黄色。果实为蒴果,长卵状,蒴果种棱为3棱,色暗绿至青绿色,布有棕褐色斑点;种子小而多,种皮是一层透明的薄壁细胞,有加厚的环纹,种皮含大量空气;种内胚发育不全或不成熟,无胚乳。根附生于岩石上,为无分枝的气生根,扁圆,白色,绿色或灰白色、灰袍色,粗1 mm左右,长度与株高一般[4][5][6]。

铁皮石斛多生长于海拔900~1500 m之间、年平均气温12~18℃、相对湿度60%~75%、透光度60%

左右、生长季节温度 20~28℃、冬季气温 9~12℃、无霜多雾、年降雨量 500~1000 mm 的常绿阔叶林中。铁皮石斛自然结实率很低[7]，何平荣等[5]认为平均自然结实率为 0.31%，其中以开花当天萼片还没有完全展开时的人工授粉结实率最高。铁皮石斛以异花授粉为主，其自花授粉成功率极低、仅 30%左右，而异花授粉成功率达 100% [7]。铁皮石斛野生种子的成活率很低。

铁皮石斛的假鳞茎基部具分蘖能力，自然条件下分蘖很慢，一般 1 年只分蘖 1 茎，每年分蘖茎生长量也增加，因此一般可以根据茎数和茎的高矮判断其株从“年龄” [5]。一年生新茎下萌生须根，春季和夏季是生长高峰，秋季进入休眠状态时叶不脱落，属于常绿生活型；二年生茎主要是积累营养和孕花，一般不再生长，第 2 个生长季节结束后，茎上的叶逐渐脱落；三年生茎开花结果，开花茎落叶后则不再萌生新叶，呈赤裸状；四年生茎丧失分蘖能力；五年生和六年生的茎相继枯萎死亡[5]。何平荣等[5]根据铁皮石斛的花芽发育状况、花蕾发育阶段和花被片开展程度，将其单花花期划分为 5 个阶段，即萌芽期、现蕾期、初花期、盛花期和枯萎期；在湖南省新宁县崀山国家地质公园，每年 5 月中旬铁皮石斛萌发少数单花小花苞、多数仍是花序包，6 月上旬花苞开始绽放，自 6 月中旬初为盛花期。6 月底花量大幅减少，7 月初花期结束。金银兵[7]认为，铁皮石斛在 6 月初至 7 月上旬都有植株开花，但其开花期主要集中在 6 月下旬，从花芽萌发至开花所需要的时间为 35 d 左右。

## 2.2. 铁皮石斛药用价值

石斛，味甘，微寒。传统中医认为，甘味入脾，能滋补强壮。补肝悦脾，能提高机体免疫力，增强体质[8]。清代黄宫绣《本草求真》记载石斛：“入脾肾，甘淡微苦、咸平，故能入脾，除虚热”；清代汪昂《本草备要》：“甘淡入脾，而除虚热”；《神农本草经》、《本草纲目》等都记载石斛有“补五脏虚劳羸弱”之功效[9]。现代药理学研究表明，铁皮石斛对非特异性及特异性免疫均有增强作用。铁皮石斛与其原球茎均能升高环磷酰胺所致免疫低下小鼠外周血白细胞数，增强巨噬细胞吞噬功能，促进淋巴细胞转化，提高机体非特异性免疫和细胞免疫功能[10]。“益胃”是铁皮石斛的一个主要功效。早在《神农本草经》就有“久服厚肠胃”的记载。《名医别录》、《本草衍义》、《本草纲目》、《本草再新》等中医药古籍也有“平胃气”，“治胃中虚热”等类似记载，称谓“肠胃药”。以铁皮石斛为主要原料制成的铁皮枫斗晶能明显促进大鼠胃液分泌，增加胃酸与胃蛋白酶排出量，并能增强小鼠小肠推进，软化大便[11]。临床观察显示，铁皮枫斗颗粒和胶囊能有效改善慢性萎缩性胃炎气阴两虚证[12]。铁皮石斛具有明显的滋阴功效，其对应的药理作用系统而又广泛，除上述药理作用外，另外，铁皮石斛以及铁皮枫斗颗粒在预防辐射性损伤方面[13] [14]及止咳化痰[15]等方面显示出良好作用。

## 3. 药用植物多倍体育种的诱导方法

多倍体是植物最重要的进化方式之一[16]，形成途径主要有自然发生和人工诱导。人工诱导是通过各种手段使植物细胞染色加倍。而自然发生，则需要一些特殊条件的刺激(如雷电、温度巨变、辐射等)，需要经历漫长的选择和适应，且选择群体较小，选出的数量也极为有限。通过自然发生产生多倍体植物的发生频率极低，通过人工诱导提高了多倍体的发生频率，更加方便的获得更多及倍性更高的植物体，使植物育种研究拥有了更加广阔的前景。

人工诱导多倍体植物的方法主要有物理方法诱导、化学方法诱导和生物学方法诱导。

### 3.1. 物理方法诱导

温度激变、机械创伤、电离辐射、离心力、热冲击以及射线处理等物理因素都可诱导产生多倍体。利用此方法诱导出多倍体植物的都有相关报道，中粒咖啡(*Coffea canephora*)花粉母细胞减数分裂时用骤变低温处理，获得大量二倍体花粉粒[17]；经射线照射杜仲(*Eucommia ulmoides*)种子、珍珠粟(*Pennisetum*

*glaucum*)、水稻(*Oryza latifolia*)均有多倍体产生[18] [19]。但物理方法诱导由于诱导效率低, 嵌合率高, 且不稳定, 因而在实际操作中未能普及。

### 3.2. 化学方法诱导

化学方法诱导是人工多倍体诱导最常采用的诱导方式。化学方法诱导是采用化学药剂进行多倍体诱导的, 常用的化学诱变剂有秋水仙素、富民隆、生物碱、除草剂等。利用化学药剂对植物的种子、幼苗、愈伤进行处理, 均可获得多倍体植物。其主要作用机理是抑制细胞分裂时纺锤体的形成, 使复制后的染色体不能拉向两极, 细胞不能继续分裂形成两个子细胞, 从而导致染色体加倍形成多倍体细胞, 进而发育成多倍体植株[20]。利用化学方法诱导, 成功获得了园艺植物如香蕉(*Musa nana*) [21]、西瓜(*Citrullus lanatus*) [22]、白菜(*Brassica chinensis var. oleifera*) [23]、甜瓜(*Cucumis melo*) [24]等的多倍体植株。

采用化学药剂诱导多倍体时, 一般有浸泡法和混培法。前者是把所要诱导的植物材料浸泡在一定浓度的化学药剂中进行处理, 处理时间一般较短; 后者是在培养基中加入无菌的一定浓度的化学药剂, 把所要诱导的植物材料接入培养基中, 宜进行长时间的处理。根据植物材料的不同, 诱导方法的效果也不尽相同。另外, 还要配合适当的处理时间和浓度, 保证使植物材料的诱变效果达到最好。不同植物材料, 相同材料的不同部位对药剂的敏感程度有较大差异。根据目前报道, 植物材料不同、处理部位不同, 则有不同的处理组合, 并没有形成统一的标准。

### 3.3. 生物学方法诱导

生物学方法诱导植物多倍体常用的方法有: 体细胞杂交法、花粉粒检出法、摘心、嫁接法、切伤、胚乳培养法。运用生物学方法诱导产生出多倍体植株, 在农业生产上已有成功报道。

## 4. 多倍体鉴定方法的研究

植物组织经过多倍化诱导处理后, 其中染色体成功加倍进而发育为多倍体植株, 未能成功加倍或加倍后产生回复突变等, 则呈现二倍体或嵌合体。因此, 在诱导多倍体过程中, 及时准确的鉴定出多倍植株就显得尤为重要。运用合适的方法鉴定不仅可以缩短培养周期, 还提高多倍体育种的工作效率。多倍体植株由于染色体加倍, 其外部形态特征和内部特征都发生了明显的变化。根据这些变化就可区别二倍体与多倍体。目前常用的多倍体鉴定方法有以下三种。

### 4.1. 形态学鉴定

染色体数量的变化往往导致植物的外部形态发生很大的变化。多倍体植物由于染色体加倍, 其外部形态表现与二倍体相比有明显的差别, 主要表现为器官的“巨大性”, 抗逆性和产量, 有效成分的增加。王俐等用秋水仙素处理库拉索芦荟(*Aloe barbadensis*)得到的多倍体, 叶片变厚, 叶色变深, 叶片变大[25]; 陈发棣等诱导的菊花(*Dendranthema nankingense*)四倍体与二倍体相比, 主茎增粗, 叶片加厚、加宽[26]; 郑思乡等诱导出的四倍体三色堇(*Viola tricolor*)叶色浓绿、叶片肥厚、花大、花瓣厚、香味浓、气孔和花粉粒巨大[27]。

多倍体植株最本质的特征就是染色体数目加倍。因此, 采用染色体制片法观察染色体是最直接, 也最准确的鉴定方法之一[28] [29]。彭静等用根尖染色体制片法, 成功鉴定出四倍体贡蕉[30]; Nair 等结合根尖染色体制片法和气孔密度鉴定很好的坚定了辣椒(*Capsicum annuum*)再生植株的倍性[31]。发展至今, 染色体制片技术已相当成熟, 该方法已被广泛采用。尽管染色体记数法检测倍性很准确, 但很费时。在进行染色体制片观察时, 即使茎尖或根尖的染色体已经加倍, 仍不能排除获得的植株是嵌合体的可能性, 还需要与其它鉴定方法结合使用。

## 4.2. 流式细胞仪鉴定

流式细胞仪是集电子技术、计算机技术、激光技术、流体理论于一体的倍性分析仪器,可迅速测定细胞核内 DNA 含量和细胞核大小,是大范围实验中鉴定植株倍性的快速有效的方法[32]。同时细胞核内 DNA 的含量不受外部因素,如光密度、植物组织水含量等的影响。流式细胞仪的工作原理是用染色剂对细胞进行染色后测定样品荧光密度,荧光密度与 DNA 含量成正比,因此, DNA 含量柱形图可以直接反映出不同倍性水平的细胞数。流式细胞仪的出现,为植物染色体倍性方面的研究提供了一条便捷的途径,鉴定快速方便,且准确性较高[33]。但是,设备昂贵,要求维护人员具有较高的专业水平。

## 4.3. 细胞学鉴定

多倍体植株与二倍体相比,气孔变大,花粉粒萌发孔沟数目增多,花粉粒大小不整齐,败育花粉粒较多,小孢母细胞增大,小孢母细胞在减数分裂中有异常行为,梢端组织发生层细胞及核较大。因此,可根据气孔大小、叶绿体数目及花粉粒大小、形状等特征来鉴定植株倍性,但是容易受到环境等因素的影响,并不十分准确。

## 5. 展望

铁皮石斛作为一种传统的名贵中草药,价格昂贵,保健功效显著,逐渐受到人们的喜爱,市场需求量日益增加。多倍体植物普遍具产量高,品质好,有效成分含量高,抗逆性强等特点。因此,培育多倍体铁皮石斛有望得到产量高、抗逆性强、有效成分含量高的优质铁皮石斛资源,这不仅具有较高的经济价值和广阔的市场前景,还有可能对铁皮石斛产业的发展产生重大影响。

## 基金项目

无性系铁皮石斛倍性育种的技术研究(编号:官科计字 2017No2)。

## 参考文献

- [1] 张纪立,何锦丽. 石斛药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(5): 469-470.
- [2] 石斛资讯网. 野生石斛应受到国家级的保护[EB/OL]. <http://www.Shi-hu.com/zixun/20140928276.html>, 2014-09-28.
- [3] 吴韵琴,斯金平. 铁皮石斛产业现状及可持续发展的探讨[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 2033-2037.
- [4] 包雪声,顺庆生,陈立钻. 中国药用石斛彩色图谱[M]. 上海:上海医科大学出版社,复旦大学出版社, 2001: 1-49.
- [5] 何平荣,宋希强,罗毅波,等. 丹霞地貌生境中铁皮石斛的繁殖生物学研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(2): 124-127.
- [6] 倪勤武,陈连庆. 浙江富阳野生黑节草形态特征研究[J]. 浙江中医学院学报, 2004, 28(3): 59-60.
- [7] 金银兵. 铁皮石斛的生物学特性与开花授粉技术研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(11): 5280-5282.
- [8] 赵嘉,吕圭源,陈素红. 石斛“性味归经”的相关药理学研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(6): 388-390.
- [9] 蔡光先,李娟,李顺祥,等. 铁皮石斛古代与现代的应用概况[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31(5): 77-81.
- [10] 高建平,金若敏,吴耀平,等. 铁皮石斛原球茎与原药材免疫调节作用的比较研究[J]. 中药材, 2002, 25(7): 487-489.
- [11] 王立明,徐建华,陈立钻,等. 铁皮枫斗晶对实验性胃阴虚证的药效学研究[J]. 中成药, 2002, 24(10): 803-805.
- [12] 吴人照,陈军贤,夏亮,等. 铁皮枫斗颗粒(胶囊)治疗慢性萎缩性胃炎气阴两虚证临床研究[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(10): 28-29.
- [13] 王崇道,强亦忠,崔凤梅. 铁皮枫斗晶对小鼠辐射损伤的防护作用[J]. 辐射防护, 2004, 24(6): 403-405.

- [14] 秦秋荣, 刘庆军, 张国庆. 铁皮枫斗颗粒对放射损伤小鼠存活情况及肺病理组织学改变的影响[J]. 中国血液流变学杂志, 2008, 18(3): 322.
- [15] 李慧林, 耿宝琴, 雍定国. 铁皮枫斗晶对呼吸道功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(5): 32-33.
- [16] 王超, 张宗申, 王建波. 植物多倍体起源与分子进化研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2000, 18(4): 339-343.
- [17] 余凤英, 凌绪柏, 刘伟青, 等. 中粒咖啡小孢子染色体加倍方法的研究[J]. 热带作物学报, 1990, 11(1): 45-54.
- [18] 毕春侠, 张存旭, 郭军, 等. 杜仲多倍体的诱导[J]. 河北林果研究, 1999, 14(2): 148-150.
- [19] 吴先军. 同源三倍体水稻 SAR\_3 及其杂交后代的研究[D]: [博士学位论文]. 成都: 四川农业大学水稻研究所, 1998.
- [20] 周广芳. 秋水仙素在诱导果树多倍体中的应用[J]. 落叶果树, 1991, 29(3): 50.
- [21] 张静静, 崔永一. 铁皮石斛多倍体的诱导及其鉴定[D]: [硕士学位论文]. 浙江: 浙江农业大学, 2013.
- [22] 龚宗俊. 西瓜多倍体育种的新进展[J]. 中国西瓜甜瓜, 1993(3): 22-23.
- [23] 刘惠吉, 王华, 肖守华, 等. 四倍体白菜热优 2 号的选育[J]. 南京农业大学学报, 1992, 15(4): 39-44.
- [24] 马国斌, 王鸣, 郑学勤. 甜瓜组织培养再生植株中的四倍体变异[J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 128-130.
- [25] 王俐, 郑思乡, 李志林, 等. 库拉索芦荟的多倍体诱导及其变异初报[J]. 云南植物研究, 2001, 23(4): 493-496.
- [26] 陈发棣, 蒋甲福, 房伟民. 秋水仙素诱导菊花脑多倍体的研究[J]. 上海农业学报, 2002, 18(1): 46-50.
- [27] 郑思乡, 等. 离体培养条件下三色堇多倍体诱导研究[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(4): 397-400.
- [28] 李懋学, 张赞平. 作物染色体及研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [29] 李步勋, 陶抵辉, 阮万辉. 西瓜离体组织细胞染色体加倍技术的研究和应用[J]. 陕西农业科学, 1999(3): 21-23.
- [30] 彭静, 等. 不同浓度秋水仙素对贡蕉的多倍体诱导[J]. 分子植物育种, 2010, 8(4): 752-757.
- [31] Nair, R.R. and Ravindran, P.N. (1992) Induced Polyploid in Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of Spices and Aromatic Crops*, **1**, 151-153.
- [32] Ozaki, Y., Narikiyo, K., *et al.* (1998) Application of Flow Cytometry for Rapid Determination of Ploidy Levels in Asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, **43**, 83-88.
- [33] 李斌, 束怀瑞, 石荫坪, 等. 流式细胞光度术用于草莓倍性鉴定的研究[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(4): 45-48.

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5566, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [bp@hanspub.org](mailto:bp@hanspub.org)