

可控环境下光照时间对铁皮石斛组培苗生长发育的影响

鲍顺淑¹, 贺冬仙¹, 郭顺星²

(1. 中国农业大学农业部设施农业生物环境工程重点开放实验室, 北京 100083;
2. 中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要:在人工光型密闭式植物工厂的可控环境条件下,光照时间会影响铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)组培苗的生长发育。将鲜重约为 300 mg 的铁皮石斛单腋芽作为外植体在温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $65 \pm 5\%$ 、光照强度 $68 \pm 9 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光期的 CO_2 浓度 $800 \pm 50 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的环境条件下,设置光照时间为 $6 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $9 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $15 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $18 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 5 组试验区进行培育。该可控环境下培育 92 d 后,光照时间为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 的试验区的铁皮石斛组培苗的净光合速率和叶绿素含量较高,干重和腋芽数增加较多,表现出良好的生长与繁殖能力。因此,人工光型密闭式植物工厂内铁皮石斛组培苗的适宜光照周期为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

关键词:叶绿素含量;可控环境;光合速率;多糖含量

中图分类号:S336

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2007)06-0090-05

Suitable Photoperiod of *Dendrobium Officinale* in vitro under Controlled Environment

BAO Shun-shu, HE Dong-xian¹, GUO Shun-xing²

(1. Key Lab of Agricultural Bio-environment Engineering of Ministry of Agriculture, China Agricultural University, Beijing 100083;
2. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: The effect of photoperiod on growth and development of *Dendrobium officinale* in vitro was studied under controlled environment in a closed plant factory with artificial lighting. Single explant each with 300 mg fresh mass of *D. officinale* were planted in five treatments with photoperiods of 6, 9, 12, 15, and 18 h · d⁻¹ under controlled environment at air temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$, relative humidity of $65 \pm 5\%$, lighting intensity of $68 \pm 9 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, and CO_2 concentration of $800 \pm 50 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ in photoperiod. The net photosynthetic rate, chlorophyll content, dry mass, and buds in treatment of photoperiod of $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ were higher than that in other treatments, and resulted in greater growth and reproduction for *D. officinale* production in vitro after the explants were cultured 92 days. Therefore, the photoperiod of $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ for *D. officinale* production in vitro is suitable in the closed plant factory with artificial lighting.

Key words: chlorophyll content; controlled environment; photosynthetic rate; polysaccharide content

铁皮石斛为多年生草本植物,是益胃生津的滋补良药,具有很高的药用价值^[1],多糖含量为其主要的药用有效成分。由于铁皮石斛对生长环境要求特殊^[2~4],自然环境下生长繁殖缓慢,加上近年来的掠夺性采挖,野生资源已濒临灭绝。现有的组培育苗、温室或大棚进行后期培育的人工栽培方式由于生产周期长、产量低等原因无法满足市场需求。因此,改变现有的栽培模式以缩短生产周期和增加产量对铁皮石斛的人工栽培具有

重要的意义。

近年来,很多学者对铁皮石斛的人工栽培和组织培养进行了大量研究^[5~9],但对其生长环境的研究较少。目前仅有笔者在组培阶段的适宜光照强度有所探索^[10],其他栽培环境的适宜条件还不甚明了。人工光型密闭式植物工厂能够对与植物生长发育密切相关的温度、湿度、光照、 CO_2 浓度等物理环境因子进行精密控制^[11~13],从而使植物的生长与品质改善成为可能。为此,本文在人

收稿日期:2007-08-28;修回日期:2007-11-14

基金项目:农业部设施农业生物环境工程学科建设基金(XK100190441)资助。

作者简介:鲍顺淑,博士,主要从事生物环境工程研究。E-mail: bao_tracy@gmail.com。通讯作者:贺冬仙,副教授,主要从事生物环境工程研究。E-mail: he_dongxian@hotmail.com

工光型密闭式植物工厂的可控环境下,探讨光照时间对铁皮石斛组培苗生长发育的影响,以确定组培阶段的适宜光照时间,为铁皮石斛人工栽培的环境控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

外植体选用高约 2 cm、鲜重约 300 mg 的铁皮石斛单腋芽,培养容器选用容积为 380 mL 的聚碳酸酯方型盒,其顶部留 2 个直径为 10 mm 的圆孔并覆盖高分子透气膜(ϕ 0.5 μm , Millipore, Japan)。培养基选用 MS,添加 6-BA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA 0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,蔗糖 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 调节在 5.8~5.9 之间。每个培养容器内分装 90 mL 培养基,分别移植两棵外植体。

1.2 组培环境和试验区设置

人工光型密闭式植物工厂内的环境条件控制在温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $65 \pm 5\%$ 、光照强度 $68 \pm 9 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光期的 CO_2 浓度 $800 \pm 50 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ [10],人工光源选用了 36W 三基色荧光灯(YZ36RL,北京松下照明光源有限公司,中国)。根据光照时间的不同设置 6 $\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、9 $\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、12 $\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、15 $\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、18 $\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 5 组试验区(表 1)。每个试验区放置 12 个移栽了外植体的培养容器,并重复试验 3 次。为避免外植体移植后过量的水分蒸发,移植第一天进行暗期处理。

表 1 光照时间试验区的设置

Table 1 The arrangement of treatments in photoperiod.

试验区 Treatments	PP6	PP9	PP12	PP15	PP18
光照时间 Photoperiod ($\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$)	6	9	12	15	18

1.3 参数测量

外植体在人工光型密闭式植物工厂中培育 92 d 后,测量各试验区组培苗的鲜重、干重、株高、腋芽数、叶绿素含量、多糖含量和净光合速率等指标。

1.3.1 千重 用天平(BP221S, Sartorius Inc., Germany)测量植株鲜重后,于 80°C 烘箱中烘 72

h 后称重。

1.3.2 叶绿素含量 采用 1:1 的乙醇-丙酮混合液在黑暗中常温浸提 72 h,用分光光度计(UV-3150, Shimadzu Co., Japan)测量其吸光度值,按照 Arnon 法修正公式计算。

1.3.3 多糖含量 使用葡萄糖标准液制作标准曲线,采用苯酚-硫酸法测定。

1.3.4 光合速率 使用便携式光合仪(LI-6400, LI-COR Inc., USA)配合自制叶室进行测量,具体的测量方法如下:

①叶室的制作及安装:用树脂制成直径 11 cm、高 14 cm、体积为 1330 cm^3 的圆柱型叶室,壁上开三个孔利用 6400-09 土壤叶室安装板(9864-174)与便携式光合仪连接,同时在侧边开一个小孔用于连接匹配阀处的回气管。

②测量:开机时,测量软件使用仪器默认的标准叶室配置,匹配时关闭叶室内的混合风扇,待匹配完成后,打开混合风扇进行测量。光合测量时的环境条件为:温度 25°C , CO_2 浓度为 $550 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$,气流速度为 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 。将装有组培苗的培养容器置于自制叶室内,密闭自制叶室后对整株组培苗的光合速率进行测量(图 1)。

③单位换算:本文用单位时间内单位干重所吸收的 CO_2 质量来表达组培苗的光合速率,单位为 $\text{mg} \cdot \text{dg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} = 1.58 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, d 表示组培苗的干重)。单位换算时,光合速率的测量值 A 先与标准叶室进行面积返算,得值 B,单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;然后值 B 乘以 1.58 得值 C,单位为 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$;由于试验中没有对整株苗的叶面积进行测量,值 C 再除以每株苗的干重得值 D,单位变为 $\text{mg} \cdot \text{dg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

$$\text{即: } P_n = \frac{A \times SI}{1.58 \times S2 \times Dw}$$

P_n 为光合速率计算值,单位为 $\text{mg} \cdot \text{dg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; A 为光合速率测量值,单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; SI 为标准叶室面积,单位为 cm^2 ; $S2$ 为自制叶室面积,单位为 cm^2 ; Dw 为植株干重,单位为 g。

2 结果与分析

2.1 生长发育

在不同光照时间下培育 92 d 后,各试验区铁

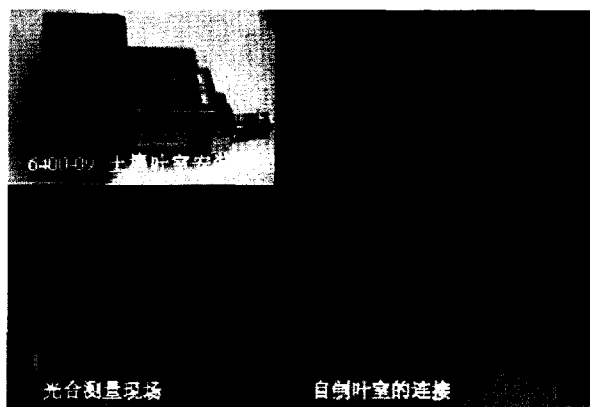


图1 利用自制叶室测量光合速率的过程

Fig. 1 The measuring process of the photosynthetic rate using consumer leaf chamber.

皮石斛组培苗的植株形态表现出明显的差异(图2)。试验区 PP6 中组培苗叶色浓绿、叶片厚实肥大,但分蘖少,植株生长量小;试验区 PP12 中组培苗的叶片深绿,其干重和腋芽数显著增加;试验区 PP9 中组培苗的叶色、鲜重、腋芽数等各项指

标介于试验区 PP6 和 PP12 之间;试验区 PP15 和 PP18 腋芽数较多,组培苗的茎和叶呈现明显的紫色,叶片明显小于前三个试验区,其生长发育明显受到抑制。总体来看,铁皮石斛组培苗的鲜重随着光照时间的增加显著增加,超过 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 后,光照时间的延长对鲜重的增加没有显著性影响。试验区 PP6 和 PP9 中组培苗的干重差异不明显,试验区 PP12、PP15 和 PP18 组培苗的干重差异也不明显,但显著高于试验区 PP6 和 PP9(表2)。试验区 PP9 和 PP12 组培苗的节间长度、株高和茎粗等综合指标表现较好,表明在这两个光照时间培养的铁皮石斛组培苗品质较好。以上结果表明,光照时间对铁皮石斛组培苗的植株形态、分蘖能力和干物质积累有较大的影响。光照时间少于 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$,组培苗生长缓慢;光照时间超过 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$,组培苗表现出与强光抑制相似的效应^[14],其生长发育受到明显的抑制。当光照时间为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 时,铁皮石斛组培苗的鲜重、干重、腋芽数、株高和茎粗等综合指标表现出较好的生长状态和生产潜力。

表2 不同光照时间处理下铁皮石斛组培苗的生长发育

Table 2 Growth and development of *D. officinale* in vitro under different photoperiod.

试验区 Treatments	鲜重(mg) Fresh mass	干重(mg) Dry mass	腋芽数(个) Buds	株高(mm) Stem length	茎粗(mm) Stem diameter
PP6	$1\ 060 \pm 46\text{c}$	$100 \pm 36\text{b}$	$4.1 \pm 1.4\text{b}$	$33 \pm 4\text{ab}$	$3.8 \pm 0.7\text{a}$
PP9	$1\ 090 \pm 37\text{b}$	$130 \pm 35\text{b}$	$4.2 \pm 1.8\text{b}$	$36 \pm 9\text{a}$	$3.2 \pm 1.0\text{b}$
PP12	$1\ 440 \pm 72\text{a}$	$170 \pm 66\text{a}$	$5.8 \pm 2.8\text{a}$	$36 \pm 1\text{a}$	$3.6 \pm 0.8\text{ab}$
PP15	$1\ 360 \pm 49\text{ab}$	$180 \pm 50\text{a}$	$4.8 \pm 1.8\text{ab}$	$34 \pm 9\text{ab}$	$3.3 \pm 1.0\text{ab}$
PP18	$1\ 430 \pm 47\text{a}$	$180 \pm 45\text{a}$	$5.5 \pm 1.5\text{a}$	$31 \pm 6\text{b}$	$3.8 \pm 1.1\text{a}$

注:同列中的不同小写字母代表平均值的显著性差异($p \leq 0.01$)。

Note: Means with different lowercase letters in each column are significantly different at $p \leq 0.01$ by Duncan's Multiple Range Test.

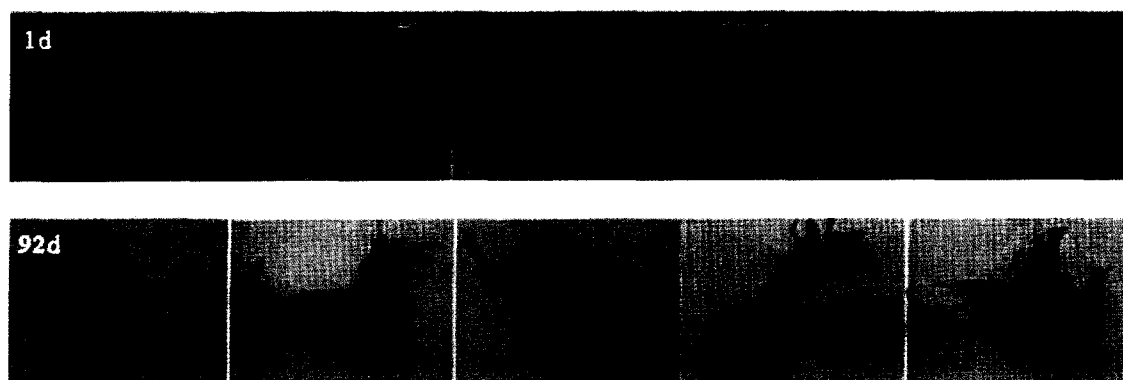


图2 铁皮石斛组培苗在不同光照时间下的第1 d和第92 d的生长发育

Fig. 2 The growth and development of *D. officinale* in vitro under different photoperiod on day 1 and day 92.

2.2 光合速率

铁皮石斛组培苗的光合速率随着光照时间的延长先升后降,光照时间为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 时达到最高 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{dg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,光照时间为 $9 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 时次之,二者间无显著性差异(图3)。随着光照时间的延长,组培苗的光合速率显著降低,表现出明显的光抑制现象。光照时间为 $18 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 时,组培苗的光合速率最低为 $1.3 \text{ mg} \cdot \text{dg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。光合作用不仅需要足够的能量,还需要一定的光合中间产物浓度才能正常进行。光照时间超过 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 时的光合中间产物在叶绿体内的积累达到一定浓度后,影响了叶绿素合成,从而抑制了铁皮石斛组培苗的光合作用。因此,光照时间超过 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 后,铁皮石斛的光合速率显著降低。该结果表明,光照时间的长短对铁皮石斛组培苗的光合特性影响较大,光照时间太长或太短都不适宜其生长和发育。

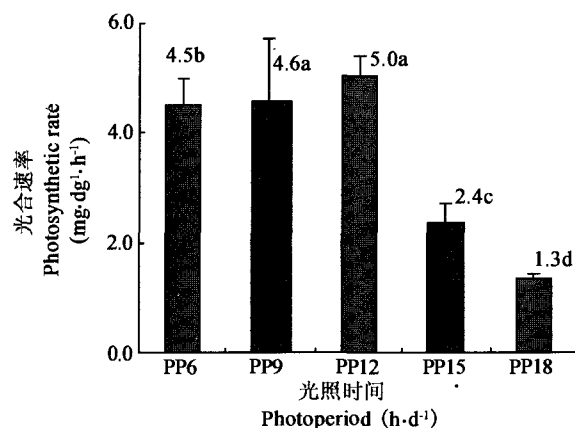


图3 光照时间对铁皮石斛组培苗的光合速率的影响

Fig. 3 Effect of photoperiod on net photosynthetic rate of *D. officinale* in vitro.

2.3 叶绿素含量

各试验区的铁皮石斛组培苗的叶绿素 a、b 及叶绿素总含量有显著性差异,随着光照时间的延长先升后降,在光照为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 时达到最高,分别为 $2.17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $0.72 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $2.89 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (表3)。光照时间超过 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 后,随着光照时间的延长,叶绿素 a、b 及叶绿素总含量显著地降低;光照时间超过 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 后,叶绿体内光合中间产物浓度超过一定的水平,叶绿素合成受阻,从而引起叶绿素含量的显著降低。叶绿素含量直接影响了铁皮石斛组培苗的光合特性,各试验区之间的叶绿素含量的差异是造成其光合速率的强弱的原因,最终导致了其干物质积累和形态的差异。

2.4 多糖含量

不同光照时间处理下铁皮石斛组培苗的多糖含量没有显著性差异,多糖含量按照光照时间由短到长依次为 2.7%、3.7%、3.0%、2.4% 和 3.7%;试验区 PP18 组培苗多糖成分含量最高,为 3.7%;PP15 组培苗的多糖成分含量最低,为 2.4% (图4)。结果表明,光照时间的长短对铁皮石斛组培苗多糖成分的累积影响不大。多糖作为铁皮石斛的主要药用有效成分,该次生代谢产物与其生理活动和环境条件有一定的关系,多糖含量的增加有利于提高其药用价值与经济价值。自然环境下生长多年的铁皮石斛由于其特殊的环境刺激,其多糖含量在 25% 以上。因此,人工光型密闭式植物工厂中利用有效的环境控制进行铁皮石斛组培苗生产足以保证其品质的稳定。另外,铁皮石斛组培苗的低多糖含量也充分说明了现有一些利用铁皮石斛组培苗提取多糖的方法仍有待改进。

表3 光照时间对铁皮石斛组培苗叶绿素含量的影响

Table 3 Effect of photoperiod on chlorophyll content of *D. officinale* in vitro.

实验区 Treatments	叶绿素含量 Chlorophyll content (mg · g ⁻¹ FW)		
	叶绿素 a Chl a	叶绿素 b Chl b	叶绿素总含量 Total of Chl
PP6	1.16 ± 0.01c	0.37 ± 0.01c	1.53 ± 0.01c
PP9	1.69 ± 0.17b	0.49 ± 0.06b	2.18 ± 0.23 b
PP12	2.17 ± 0.09a	0.72 ± 0.01a	2.89 ± 0.10 a
PP15	1.60 ± 0.03b	0.49 ± 0.01c	2.09 ± 0.04 b
PP18	0.84 ± 0.22d	0.24 ± 0.09d	1.07 ± 0.30 d

注:同列中的不同小写字母代表平均值的显著性差异($p \leq 0.01$)。

Note: Means with different lowercase letters in each column are significantly different at $p \leq 0.01$ by Duncan's Multiple Range Test.

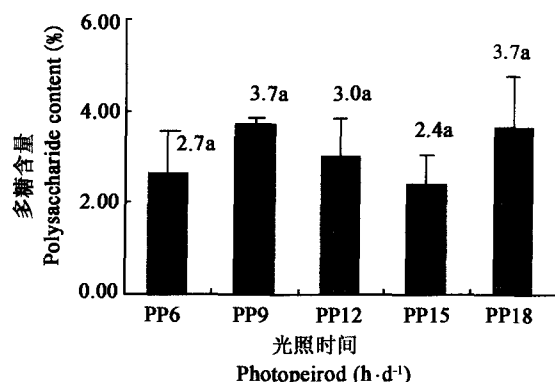


图4 不同光照时间下铁皮石斛组培苗的多糖含量

Fig. 4 Polysaccharide contents of *D. officinale* in vitro under different photoperiod.

3 结论

在人工光型密闭式植物工厂的可控环境下,铁皮石斛组培苗在不同光照时间条件的生长发育有显著差异,以 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 最为适宜。

参 考 文 献

- [1] 包雪声, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛彩色图谱[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001.
- [2] 丑敏霞, 朱利泉, 张玉进, 等. 光照强度对石斛生长与代谢的影响[J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 380-383.
- [3] 丑敏霞, 朱利泉, 张玉进, 等. 不同光照强度和温度对金线石斛生长的影响[J]. 植物生态学报, 2001, 25(3): 325-330.
- [4] 吕献康, 徐春华, 舒小英. 3种石斛的光合特性研究[J]. 中草药, 2004, 35(11): 1296-1298.
- [5] 袁正仿, 张卫明, 丁小余. 铁皮石斛的组织培养研究[J]. 中国医学生物技术应用杂志, 2002, 3: 58-60.
- [6] 周俊辉, 钟雪峰, 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.
- [7] 常钰. 药用植物铁皮石斛的大规模培养和化学、药理学研究[D]. 上海中医药大学, 博士学位论文, 2001, 50-55.
- [8] 付开聪, 冯德强, 张绍云. 铁皮石斛集约化高产栽培技术研究[J]. 中草药, 2003, 34(2): 177-179.
- [9] 冷佳奕. 激素、培养方式与条件对铁皮石斛类原球茎有效成分影响的研究[D]. 华南师范大学, 博士学位论文, 2002, 9-17.
- [10] 鲍顺淑, 贺冬仙, 郭顺星. 铁皮石斛在人工光型密闭式植物工厂的适宜光照强度[J]. 中国农学通报, 2007, 23(3): 469-473.
- [11] 曲英华, 张立力, 张光怡, 等. 植物组织培养新技术: 光独立培养法[J]. 农业工程学报, 2001, 17(6): 90-92.
- [12] He D X, Tong C, Yang Q, et al. A closed plantlet production system for applying photoautotrophic micropropagation [A]. Beijing, 2004 CIGR International Conference. 2004, 50-182D.
- [13] 朱本海. 人工光型密闭式植物工厂的洁净与环境控制[D]. 中国农业大学, 硕士学位论文, 2006, 1-3.
- [14] Kozai T, He D X, Chun C. Commercialized closed systems with artificial lighting for high quality plant production at low cost [A]. Beijing, 2004 CIGR International Conference. 2004, 50-006A.

CNKI 中国知识资源总库

《中国农业科技导报》综合引证年度报告(2007)

类目名称: 农业科学\综合(NK1.1)

总被引频次	影响因子	5年影响因子	即年指标	他引总引比	被引期刊数	被引半衰期	2006载文量	基金论文比	Web即年下载率	<i>h</i> 指数(CN)
463	0.662	0.664	0.051	0.95	246	3.9	98	0.60	47.8	14

上表所列本期刊的各项计量指标是根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006年6500余种统计刊源析出的290余万条中国期刊引文数据及CNKI“中国期刊网”中心网站2006年1~12月全文下载记录(2.1亿余篇次)的大样本数据统计分析得到的年度报告数据。

所有期刊的综合引证数据已载入科学出版社正式出版的《中国学术期刊综合引证报告》2007版(总第6卷)。