

· 综述 ·

生物技术在药用石斛研究中的应用

杨显志,邵华*,周成,张玲琪,魏蓉城
(云南大学生命科学与化学学院,云南昆明 650091)

摘要: 石斛具有极大的药用价值,在临床上及中药复方中被广泛应用。但是石斛药源一直处于紧张状态,是亟待解决的问题。综述了组织培养、遗传转化、菌根技术等生物技术在药用石斛研究中的应用,指出了存在的主要问题及今后的研究前景。

关键词: 药用石斛;组织培养;遗传转化;菌根技术;人工种子

中图分类号: R282.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2002)02-0173-03

Application of biotechnology in studies of medicinal plants *Dendrobium Sw.*

YANG Xian-zhi, SHAO Hua, ZHOU Cheng, ZHANG Ling-qi, WEI Rong-cheng

(College of Life Science and Chemistry, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China)

Key words medicinal plants *Dendrobium Sw.*; tissue culture; genetic transformation; mycorrhizal technology; artificial seeds

石斛是常用名贵中药材,为兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium Sw.*)多种植物的新鲜或干燥茎的统称。我国76种石斛属植物中有30多种作药用^[1],著名的有金钗石斛 *D. nobile* Lindl.、铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Mig.、霍山石斛 *D. huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng等。在《神农本草经》中,石斛被列为上品,具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、明目强身等功效。现代药理研究表明,石斛还具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力、扩张血管及抗血小板凝集等作用^[2],因此石斛在临床上及中药复方中被广泛应用。但石斛属植物自然繁殖力极低,生长缓慢,加之人们掠夺性采挖,致使野生资源已经严重枯竭。石斛的栽培也一直存在着存活率低、产量低、进入盛产期年限长的问题,因此,石斛药源一直处于紧张状态,亟待解决。应用生物工程和现代农业技术来解决才是长远之计。本文就石斛的组织培养、遗传转化、菌根技术、人工种子等技术的研究作一综述。

1 组织培养

由于石斛自然繁殖力极低,用组织培养方法快速大量繁殖试管苗,是解决种苗的有效途径。张明等^[3]综述过石斛的组织培养研究,其中以种子进行组培的研究较多。

1.1 原球茎(proto-corm)的增殖与分化:原球茎的增殖分化是石斛试管苗繁殖的关键,因此研究原球茎增殖分化的适宜培养条件非常重要。曾宋君等^[4]研究表明,石斛原球茎的增殖与种子种龄有关,种龄在45d以下,萌发率极低,萌发时间长,随着种龄增长,其胚细胞愈多,萌发率越高。原球茎增殖分化的最适培养基为改良 N₆+ 0.2 mg/L NAA+ 2%蔗

糖。种子萌发成苗后需及时将小苗转移到合适的培养基中进行生根、壮苗培养。刘骅等^[5]报道铁皮石斛试管苗壮苗阶段的适宜培养基为: B₅(或 1/2MS)+ 10%香蕉水提物+ 2 mg/L NAA+ 2%蔗糖。曾宋君等^[4]报道的生根壮苗培养基为改良 N₆+ 10%香蕉汁+ 2%蔗糖,苗长得更粗壮。

1.2 其他外植体的离体培养:石斛组培除用种子外,也可用根、茎、节、叶等外植体进行。周月坤等^[6]在 MS+ 0.5 mg/L 6-BA+ (0.5~2.0) mg/L 2,4-D培养基上,由叶基部诱导产生愈伤组织,进而分化出拟原球茎(proto-corm like bodies, PLBs)获得完整植株,并指出 2,4-D对诱导愈伤组织形成和分化有重要作用,NAA的加入对分化 PLBs有一定的促进作用。Mujib等^[7]报道 *D. 'madame pompador'* 的茎尖接于附加 0.2 mg/L 2,4-D和 0.2 mg/L BAP培养基上可诱导出愈伤组织。而添加 NAA和 BAP则易产生 PLBs,在添加了10%椰汁和活性炭的无激素 VW培养基上可使 PLBs快速增殖,GA-3对 PLBs的增殖有一定影响。生根培养基以添加 1 mg/L NAA为佳。Nayak等^[8]报道 *D. aphyllum* 和 *D. moschatum* 的茎段在 MS+ 6-BA(或 TDZ)上能快速增殖并形成茎,将其转接到含 6-BA和 NAA的培养基上可继续生长。在 MS+ IBA上可诱导生根,外植体经驯化后最终可以移栽到大田。另外,TDZ浓度超过最适浓度(2.2~4.5 μmol/L)会抑制茎再生。茎段作水平放置可以获得再生植株,而垂直放置的处理则无任何茎芽发生,这说明外植体的取向对茎上芽的形成至关重要。杨联河等^[9]报道曲茎石斛 *D. flexicaule* 茎段培养和苗增殖的培养基以 B₅+ 0.5 mg/L 6-

收稿日期: 2001-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39860005)

作者简介: 杨显志(1968-),男,四川省安岳县人,现为云南大学生物系微生物学专业硕士生,师从张玲琪教授,主要从事植物真菌及其次生

活性代谢产物方面的研究。

* 通讯联系人 E-mail yim40@public.km.yn.cn Tel 0871-5033369 Fax: 0871-5171975

BA+ 1 mg/L NAA+ 20 g/L蔗糖最好。试管苗生根培养基为: MS+ 2 mg/L 6-BA+ 0.2 mg/L NAA+ 0.1 mg/L IBA + 30 mg/L蔗糖。Yasugi等^[10]将石斛的假鳞茎分为上部(含第2个节)和下部(含第4个节),在 MS+ 3%葡萄糖+ 0.1 mg/L NAA+ 0.1 mg/L 6-BA培养基上, pH 5.8, 23℃, 日光灯照射的条件下, 上部和下部假鳞茎段都能产生大量丛生苗。单个假鳞茎段在含有 1 mg/L NAA和 1 mg/L 6-BA的培养基上获得再生植株的最大数量为 37.3, 表明假鳞茎段培养是获得多丛苗和再生植株的有效途径。

1.3 离体开花: 铁皮石斛在栽培条件下, 由种子萌发到开花通常需 3~4年。王光远等^[11,12]以铁皮石斛种子诱导形成的愈伤组织, 在光照下置于 MS+ 0.3 mg/L NAA培养基上繁殖, 可形成原球茎。将原球茎转入 MS+ 2 mg/L 6-BA+ 0.5 mg/L NAA培养基中, 3~6个月开花。花芽形成频率为 31.6%~45.8%。如果原球茎先在 0.5 mg/L ABA培养基上预培养 15 d, 再转入含 2 mg/L 6-BA的 MS培养基培养, 花芽形成频率明显提高, 可达 84.4%, 而且每株植株花的数目增加。但是, 在仅有 ABA的 MS培养基上培养的原球茎, 其再生的植株未见花芽形成。该研究极大地缩短了石斛开花所需时间, 在育种上有着重要的生物学意义。

2 遗传转化

Kuehnle等^[13]用带有植物表现的 Nos-NPTII 基因和番木瓜病毒 (PRV)膜蛋白 (CP)基因的质粒 pGA482GG/cpPRV4 包被的微粒轰击石斛原球茎进行基因转移实验。通过 4次杂交得到的近 280个原球茎被粒子轰击, 转化与否表现在组织是否变绿。培养基为 1/2 MS+ 2%蔗糖+ (50~100) mg/L硫酸卡那霉素。PCR分析表明, 由 2次杂交得到了 13株具有卡那霉素耐受性植株带有 Nos-NPTII 基因, 而只有 1株带有 PRV CP基因。这些结论表明用粒子轰击的方法可以实现单子叶植物石斛的转基因。

Chia等^[14]用带有 35S-luc嵌合基因质粒包被的钨颗粒 (1.3 μm) 轰击石斛 PLBs, 3周后向转化组织中加入 1 mmol/L荧光素, 转化细胞可通过低光视频显微镜及其辅助图像处理设备检测生物性发光来辨别。检测出的转化组织允许其繁殖, 然后进行第 2轮筛选。经过 3轮生长和筛选后, 表达荧光素酶的转化组织用来产生石斛再生植株。

此外, 还可利用根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法获得转基因植物, 其关键是毒性基因的诱导表达, 而在单子叶植物中常常缺少这种诱导物质。近来 Nan等^[15]在石斛组织培养中发现 PLBs发育早期有大量的松柏醇产生, 它可诱导毒性基因的表达。如果将在暗处培养的 PLBs转入光照条件下培养, 其含量呈 6倍增加。PLBs松柏醇的产量是叶的 11倍, 这使通过农杆菌介导法获得转基因植物, 即将克隆的花色基因、主成分表达基因等通过农杆菌介导法转入石斛 PLBs成为可能。

3 菌根技术

分离和筛选促进石斛生长发育的适宜菌根真菌, 是菌根技术应用与石斛生产的关键问题之一。郭顺星等^[16]对野生

铁皮石斛和金钗石斛根中的菌根真菌进行了分离, 共得分菌根真菌 25种, 主要属于担子菌和半知菌。生物活性测定结果表明, 其中 5种真菌可促进铁皮石斛种子萌发, 7种真菌可与铁皮石斛和金钗石斛幼苗形成共生关系, 但仅有 3种真菌对幼苗有促生作用。

自野生细叶石斛 *D. hancockii* Rolfe和见血清 *Liparis nervosa* 种子萌发的原球茎中分离的微囊菌属 (*Microascus*) 和毛壳菌属 (*Chaetomium*) 以及从天麻原球茎中分离的紫萁小菇 *Mycena osmundicola* 对细叶石斛、罗河石斛 *D. lohohense* Tang et Wang 和铁皮石斛种子的萌发有显著促进作用。菌丝伴播种子的方法, 还有利于萌发形成的原球茎继续发育。用这些真菌培养物的醇或水提取液培养细叶石斛的种子时, 发芽率达 40%~70%。超微结构观察发现, 真菌自石斛种子的胚柄处侵入种胚细胞后, 在胚细胞中稀疏分布, 受到侵入真菌刺激, 胚细胞的质膜内陷, 产生许多囊状体包围消化入侵的菌丝, 菌丝逐渐被分解作为种子萌发的营养物质^[17]。今后应加强对石斛菌根真菌的分离和筛选及其对石斛促生机理的研究。

4 人工种子

植物人工种子作为一项新兴的生物工程技术, 在植物培养材料的快速繁殖、保藏、运输等方面, 展示了广阔的应用前景。郭顺星等^[18]已成功地以原球茎为材料, 3%海藻酸钠和 2% CaCl₂ 为人工种皮, 改良 1/2 MS+ 3%蔗糖为胚乳制成铁皮石斛人工种子, 其存活率、发芽率高, 发芽率可达 80%以上, 成苗好。但仍有许多问题需深入研究, 直接用于栽培的人工种子也尚无研究。

5 无土栽培

石斛组培试管苗在室内培养获得了一定成功, 但由于入土困难, 仍无生产栽培的实际意义。石斛是一种附生植物, 因而进行无土栽培具有重要意义。李泉森等^[19]发现采用冷杉或杂木等粗糙锯末为基质适宜金钗石斛气生长, 施以由 N, P, K及多种微量元素组成的营养液, 用适当浓度的激素处理, 保持基质湿润, 石斛生长良好, 产量增加 82.1%~177.8%。在无土栽培条件下, 水分和营养较充足, 这时强光照有利于石斛的生长和高产, 这与自然条件下生长的石斛喜半阴半阳的生态环境有所不同。

6 结语

石斛的组培工作主要集中在快速繁殖, 扩大繁殖系数方面, 已能成功地培育出试管苗, 然而对试管苗移栽方面的研究工作做得还很少。从试管苗到大田栽培的中间环节应是目前的主攻方向。加强石斛菌根技术的研究, 研制菌根菌剂, 结合大田栽培, 从根本上解决石斛试管苗移栽问题。遗传转化既可提高石斛品质, 又可创造新品种, 应继续加强遗传转化方面的研究, 其中以发根农杆菌 *A. rhizogens* Ri 质粒介导的石斛毛状根培养对生产次生代谢产物极为重要。

对石斛组培过程中次生代谢产物的研究也极重要, 然而这一研究在国内外都较少。Nan等^[15]报道在石斛 PLBs组培过程中产生大量的松柏醇。黄民权等^[20]发现铁皮石斛愈伤

组织培养物中多糖及其生物活性与原植物存在着明显相似性。而石斛植物中尚有多种生物碱、抗癌菲、类黄酮等物质,这些物质在组培物中的情况有待深入研究,为通过组培来获取这些药用成分提供依据。石斛花药培养、原生质体培养等目前国内外均尚未见报道。石斛药用成分的化学合成是目前研究的弱点,应当加强对以活性成分为先导化合物的结构修饰和改造,而酶学等生物技术在化学合成方面的应用将具有良好的前景。

参考文献:

- [1] 李满飞,徐国钧,徐珺珊,等.商品石斛的调查及鉴定(II)[J].中草药,1991,22(4):173-180.
- [2] 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.
- [3] 张明,夏鸿西,朱利泉,等.石斛组织培养研究进展[J].中国中药杂志,2000,25(6):323-326.
- [4] 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.
- [5] 刘骅,张治国.铁皮石斛试管苗壮苗培养基的研究[J].中国中药杂志,1998,23(11):654-656.
- [6] 周月坤,王伏雄.兜唇石斛幼叶再生植株的研究[J].植物学集刊,1989,12(4):123-126.
- [7] Mujib A, Jana B K. Clonal propagation of *Dendrobium madame* pompadour through apical meristem culture[J]. Adv Plant Sci, 1994, 7(2): 340-346.
- [8] Nayak N R, Rath S P, Satyanarayan P. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *D. moschatum* (Buch-Hain) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation[J]. Si Hortie, 1997, 71(3-4): 243-250.
- [9] 杨联河,王倩嵘,何俊彦,等.曲茎石斛组织培养研究[J].中国中药杂志,1998,23(11):658-659.
- [10] Yasugi S, Shinto H. Formation of multiple shoots and regenerated plantlets by culture of pseudobulb segment in nobile type *Dendrobium* [J]. Shokubutsu Soshiki Baiyo, 1994, 11(2): 153-156.
- [11] 王光远,刘培,许智宏,等.石斛离体培养中ABA对诱导花芽形成的影响[J].植物学报,1995,37(5):374-378.
- [12] 王光远,许智宏,蔡德发,等.铁皮石斛的离体开花[J].中国科学(C辑),1997,27(3):229-234.
- [13] Kuehnle A R, Sugii N. Transformation of *Dendrobium orchid* using particle bombardment of protocorms[J]. Plant Cell Rep, 1992, 11(9): 484-488.
- [14] Chia T F, Chan Y S, Chua N H. The firefly luciferase gene as a non-invasive reporter for dendrobium transformation[J]. Plant J, 1994, 6(3): 441-446.
- [15] Nan G L, Tang C S, Kuehnle A R, et al. *Dendrobium orchids* contain an inducer of *Agrobacterium virulence* genes[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1997, 51(6): 391-399.
- [16] 郭顺星,曹文芬,高微微.铁皮石斛及金钗石斛菌根真菌的分离及其生物活性测定[J].中国中药杂志,2000,25(6):338-341.
- [17] 王康正,范磊,高文远,等.药用石斛栽培的研究概况[J].中国中药杂志,1998,23(6):340-343.
- [18] 郭顺星,曹文芬,张集慧,等.铁皮石斛人工种子制作流程及发芽研究[J].中草药,1996,27(2):105-107.
- [19] 李泉森,张明,金仕勇.石斛无土栽培基质的初步研究[J].中国中药杂志,2000,25(1):23-24.
- [20] 黄民权,卢应京.石斛愈伤组织培养物的药用前景探讨[J].中药材,1998,21(11):543-545.

黄药子的研究进展

林厚文,张罡*,赵宏斌**,张纯,刘皋林
(第二军医大学长征医院药学部,上海 200003)

摘要:综述了有关黄药子在化学成分、药理作用、临床应用等方面的研究进展。

关键词:黄药子;diosbulbin;化学成分;药理作用;临床应用

中图分类号:R282.71;R285 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2002)02-0175-03

Advances in studies on *Dioscorea bulbifera*

LIN Hou-wen, ZHANG Gang, ZHAO Hong-bin, ZHANG Chun, LIU Gao-lin
(Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Key words *Dioscorea bulbifera* L.; diosbulbin; chemical constituents; pharmacological effect; clinical application

黄药子为薯蓣科植物黄独 *Dioscorea bulbifera* L.的块茎,又名黄药脂、黄药根、黄独、黄药等。目前临床上用于治疗

收稿日期:2001-06-15

作者简介:林厚文(1967-),男,1998年毕业于沈阳药科大学,获得博士学位,现任职于第二军医大学长征医院药学部海洋药物研究室,主要从事抗肿瘤天然活性成分的研究。Tel:(021)25070971-6016

* 第二军医大学药学院 97级实习生 ** 中国药科大学生物制药学院 97级实习生