

金钗石斛研究

Study on Dendrobium nobile



乙引 陈玲 张习敏 主编



电子工业出版社

PUBLISHING HOUSE OF ELECTRONICS INDUSTRY

<http://www.phei.com.cn>

金钗石斛研究

Study on *Dendrobium nobile*

乙 引 陈 玲 张习敏 主编
邓 辉 卢文芸 刘 泯 伍 庆 吴显燕 杨立昌
罗在柒 项 君 唐金刚 徐小蓉 高 巍 黄小燕 参编

電子工業出版社

Publishing House of Electronics Industry

北京 • BEIJING

内 容 简 介

《金钗石斛研究》一书是对贵州金钗石斛资源分布、种植调查研究较为深入的一部著作。本书概述了石斛属植物的研究进展；调查了野生金钗石斛的资源分布、利用情况及人工种植情况；总结了金钗石斛有性繁殖和无性繁殖两种繁殖方式的基本原理和方法；并研究了金钗石斛的有效成分、分布规律及其生物碱组分质量控制；探讨了金钗石斛幼苗生长发育以及与外界环境的适应情况。

本书可为高等院校和科研人员及产业开发人员在贵州金钗石斛分布、生长、种植、管理方面提供参考。

未经许可，不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有，侵权必究。

图书在版编目（CIP）数据

金钗石斛研究 / 乙引, 陈玲, 张习敏主编. —北京: 电子工业出版社, 2009.6

ISBN 978-7-121-08978-7

I. 金… II. ①乙… ②陈… ③张… III. 石斛—研究 IV. Q949.71

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 086170 号

责任编辑: 蔡 葵 王元生

印 刷: 北京东光印刷厂

装 订: 三河市万和装订厂

出版发行: 电子工业出版社

北京市海淀区万寿路 173 信箱 邮编 100036

开 本: 787×1092 1/16 印张: 8.5 字数: 217.6 千字

印 次: 2009 年 6 月第 1 次印刷

定 价: 22.00 元

凡所购买电子工业出版社图书有缺损问题, 请向购买书店调换。若书店售缺, 请与本社发行部联系, 联系及邮购电话: (010) 88254888。

质量投诉请发邮件至 zltz@phei.com.cn, 盗版侵权举报请发邮件至 dbqq@phei.com.cn。

服务热线: (010) 88258888。

本书研究内容得到：国家科技攻关计划资助项目（项目编号：20C4BA721A33）；贵州省教育厅科研基金重点项目（项目编号：黔教育科[2007] 018 号）；贵州省科技基金（项目编号：黔科合 J 字[2005]2022 号）的支持。

序

石斛是重要的常用中药,《神农本草经》将其列为上品。《本草纲目》言:“俗方最以补虚,主治伤中,除痹下气,补五脏虚劳羸瘦,强阴益精;厚肠胃,补内绝不足,皮肤邪热瘕气,治男子腰脚软弱,健阳,补肾益力,壮筋骨,暖水脏,轻身延年等。”

数十年来,不少学者对石斛的化学成分、药理作用及临床应用等进行了研究。1932年,铃木秀干在中药金钗石斛中首次获得石斛碱。1964年,犬伏康夫等证明了石斛碱为倍半萜类生物碱并确定了结构。20世纪70年代以来,欧洲学者相继于石斛属植物中发现了一些新的生物碱和20多个新的有很高价值的药用成分。对19种石斛植物的研究表明,化学成分类型有较大差异,其中只有5种石斛属植物含石斛碱类生物碱,而金钗石斛是唯一含有石斛碱的中药石斛。

金钗石斛是我国传统的名贵中药材,属兰科多年生常绿草本植物,目前由于资源濒危,被列为国家二类保护植物并列入《国家重点保护野生植物名录》,具有很高的经济价值。贵州省由于得天独厚的自然生态环境孕育出了闻名遐迩的地道中药材——金钗石斛。贵州有悠久的金钗石斛种植历史,是重要的原生地,在国内外享有盛誉。贵州省政府高度重视金钗石斛产业的发展,将其列为解决“三农”问题的发展目标之一。

贵州是兰科植物的丰富分布地区之一,保护这些植物的基因,通过无性繁殖的方法扩大资源并加以利用,这是植物资源保护与发展的战略。金钗石斛的专题研究是很好的一个开端,将会为珍贵的石斛资源的保护提供科学依据。《金钗石斛研究》一书,是乙引教授及其研究生团队多年研究工作的总结,本书从黔产金钗石斛的种质资源、快速繁殖、栽培生理、有效成分及其积累规律、质量标准等方面进行了研究,研究内容丰富,是目前为止关于金钗石斛研究较为系统的专著。本书的出版,将会给石斛研究提供很好的借鉴,给金钗石斛的产业化提供科学依据,对贵州省中药现代化有促进作用,具有重要的社会、生态和经济意义。因此,在该书即将出版之际,我很高兴为之作序,并表示祝贺。

陈刚

2009.4.28.

前 言

石斛 (*Dendrobium*) 是中医最为常用的名贵中草药之一, 具有滋阴润肺、清音明目、轻身延年等功效。目前, 国内有数十种以石斛为原料或配伍的中成药产品, 如石斛夜光丸、石斛片、金嗓子喉片、脉络宁口服液、脉络宁注射液、养阴口香液、石斛酒 (《千金要方》)、石斛散 (《圣济总录》)、“枫斗”等, 民间也有用石斛来治疗疾病的处方。

金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindle) 是石斛中的上品, 既是一种名贵中药材, 同时也是一种珍稀植物。由于金钗石斛自然繁殖缓慢, 传统繁殖力低, 对生境要求苛刻, 再加上近年来人类活动对金钗石斛生境的破坏加剧以及不合理的采挖, 导致金钗石斛蕴藏量逐年大幅减少, 濒于灭绝。自 1993 年起, 金钗石斛先后被列入 42 种国家重点保护的野生动植物药材品种、贵州省重点保护珍贵树种名录以及国际性的《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录 II。

2002 年国家颁布的《中药现代化发展纲要》要求继承和发扬中医药学的传统和优势, 利用现代科学技术手段, 加强对药用动植物的基础理论研究和应用研究, 以促进药用植物资源可持续利用和中医药产业可持续发展; 加强中药材规范化种植和中药饮片炮制规范研究, 按照《中药材生产质量管理规范》(GAP) 要求, 建立中药材和中药饮片的质量标准及有害物质限量标准, 建立相应的标准操作规程 (SOP); 加强常用中药化学对照品研究, 建立国家中药标准物质库。《中药材生产质量管理规范》、《中药材种植标准操作规程》、《中药试验标准管理规范》等文件表明: 药材的品种标准化和质量控制标准化已成为 21 世纪中药材研究的焦点, 优质品种的选育已成为中药产业成败的关键, 现代质控体系的建立是中药产品迈向国际社会的必由之路。近年来, 随着中药现代化的开展, 药用石斛 GAP 种植在贵州省赤水 (金钗石斛) 与兴义 (环草石斛) 均已建立。其中, 赤水产金钗石斛被国家质量监督检验检疫总局公告 2006 年第 39 号文件通过, 成为贵州省第 1 个获得原产地域产品保护的中药材产品, 为贵州金钗石斛资源的恢复、保护、利用和可持续发展带来了契机。

贵州是我国传统的四大中药材产地之一。长期以来, 黔产石斛就与杜仲、天麻和吴茱萸并称为贵州四大中药材, 远销海内外。贵州省对于药用石斛资源的研究相对较晚, 缺少系统性, 与先进地区存在较大差距。针对这一情况, 我们从 2002 年开始从事黔产金钗石斛的研究, 内容涉及金钗石斛种质资源、组织培养与快速繁殖、生理生态、有效成分分析以及化学指纹图谱和 DNA 指纹图谱等各个方面。经过 6 年的辛勤工作, 取得了一些原创性成果。我们希望这些成果能为国内外学者提供一些贵州金钗石斛的研究现状的资料, 同时有助于贵州金钗石斛资源的合理开发利用, 促进贵州省中药现代化的发展。

贵州师范大学生物技术与工程学院 (现改名为生命科学学院)、贵阳中医学院药学系等单位在实验材料、研究条件、资料查阅和技术操作等方面给予了大力支持。洪化鹏、刘三民、伍庆老师以及罗在桀、唐金刚、卢文芸、吴显芝、邓辉、黄小燕、项君等研究生参与了相关工作, 此外, 杨立昌、张习敏、王岚、邹晶、高巍、马琛、王明勇、郝丽丽、申刚、陈

玲、徐小蓉、何培琦、黄家岭、张豪、李军和程思思等老师和同学在本书的整理、排版和校对等方面给予了帮助。这些工作相当繁杂，需要很大的耐心和无私付出，占用了他们很多宝贵时间。没有他们的努力和付出，本书也不会这么快就顺利出版。在此表示衷心感谢！

由于我们的研究工作尚处于起步阶段，一些最新成果也由于时间仓促而未能及时汇入书中，因此，存在很多不足之处，恳请专家和读者提出宝贵意见。

编 者

2009年1月28日

目 录

第 1 章 石斛属植物研究概述	1
第 2 章 黔产金钗石斛种质资源状况	8
2.1 野生金钗石斛种质资源调查	9
2.1.1 野生金钗石斛资源调查研究方法	9
2.1.2 野生金钗石斛生境特点	11
2.1.3 野生金钗石斛种质资源分布	12
2.2 野生金钗石斛保护和可持续利用评价	15
2.2.1 野生金钗石斛濒危原因	15
2.2.2 野生金钗石斛资源保护措施	16
2.2.3 野生金钗石斛可持续利用对策	17
2.3 金钗石斛资源利用现状	17
2.4 金钗石斛人工种植情况	18
2.4.1 金钗石斛传统种植概述	18
2.4.2 金钗石斛规模化种植发展状况	19
2.4.3 金钗石斛规范化种植基地建设	20
第 3 章 黔产金钗石斛的快速繁殖	25
3.1 金钗石斛的固体培养	25
3.1.1 金钗石斛种子的消毒	25
3.1.2 金钗石斛种子萌发和幼苗的形成	26
3.1.3 金钗石斛外植体的试验选择	26
3.1.4 金钗石斛原球茎和幼苗的生长条件	28
3.1.5 金钗石斛生物量	32
3.1.6 植物生长调节剂的作用	32
3.1.7 金钗石斛快速繁殖体系	35
3.2 金钗石斛试管苗的炼苗和移栽	36
3.2.1 栽培基质	36
3.2.2 金钗石斛组织培养物的栽培	38
3.2.3 炼苗前预处理	38
3.2.4 试管苗的移栽时间	39

3.2.5	试管苗、温室栽培苗和荫棚栽培苗的比较	39
3.2.6	杀虫剂氯氰菊酯	40
3.2.7	试管苗的异地移栽	41
3.3	金钗石斛的其他快速繁殖方式	41
3.3.1	分株繁殖	41
3.3.2	扦插繁殖	42
3.3.3	壅土埋条繁殖	42
3.3.4	高芽繁殖	42
3.4	小结	42
第 4 章	黔产金钗石斛有效成分及其累积规律	44
4.1	有效成分分析	44
4.1.1	精油成分	44
4.1.2	石斛碱成分	47
4.2	次生代谢物的积累规律	51
4.2.1	不同生境金钗石斛有效成分的变化	51
4.2.2	不同发育阶段金钗石斛有效成分的积累	52
4.2.3	不同部位金钗石斛的有效成分含量	53
4.2.4	施肥影响金钗石斛生物碱积累	53
4.2.5	植物生长调节剂影响金钗石斛生物碱积累	54
4.3	金钗石斛药材质量的综合评价	54
4.4	小结	56
第 5 章	黔产金钗石斛的质量标准	57
5.1	金钗石斛样品考察	57
5.2	金钗石斛生物碱组分 GC 指纹图谱研究	58
5.2.1	金钗石斛生物碱组分提取方法的优化	58
5.2.2	色谱柱的选择	62
5.2.3	方法学考察	63
5.2.4	金钗石斛生物碱部分指纹图谱的建立	67
5.3	金钗石斛生物碱组分的 HPLC 指纹图谱研究	70
5.3.1	供试品制备	70
5.3.2	参照物制备	70
5.3.3	提取方法考察	70
5.3.4	色谱条件的考察	71
5.3.5	检测方法考察	73

5.3.6	HPLC 色谱指纹图谱的建立	75
5.4	药用石斛 ISSR 分子标记指纹图谱研究	78
5.4.1	金钗石斛基因组 DNA 的纯化	79
5.4.2	ISSR-PCR 反应体系和反应参数	80
5.4.3	引物筛选	82
5.4.4	引物的基因分型能力评价	83
5.5	小结	84
第 6 章	黔产金钗石斛的栽培生理	86
6.1	金钗石斛幼苗的生长	86
6.1.1	无机肥与幼苗生长	86
6.1.2	植物生长调节剂与幼苗生长	86
6.1.3	金钗石斛生物量的积累	87
6.2	金钗石斛生长过程的质量评价	87
6.2.1	金钗石斛的生长评价	87
6.2.2	金钗石斛的药用成分评价	88
6.3	内生真菌的促生作用	89
6.3.1	有益内生真菌的筛选	89
6.3.2	内生真菌对金钗石斛生理代谢的影响	91
6.3.3	内生真菌诱导子对金钗石斛生理代谢的影响	94
6.4	金钗石斛对于干旱胁迫的响应	98
6.4.1	金钗石斛植株生长对于干旱胁迫的响应	98
6.4.2	金钗石斛含水量对于干旱胁迫的响应	99
6.4.3	金钗石斛可溶性蛋白质含量对于干旱胁迫的响应	99
6.4.4	金钗石斛渗透调节对于干旱胁迫的响应	100
6.4.5	金钗石斛细胞质膜透性对于干旱胁迫的响应	101
6.5	外源 Ca^{2+} 对于干旱胁迫下金钗石斛幼苗生长的影响	102
6.6	金钗石斛组培苗的光合特性	103
6.6.1	叶绿素含量	103
6.6.2	希尔反应	104
6.7	小结	104
缩写词		107
附录 A	图版	109
附录 B	参考文献	117

第 1 章 石斛属植物研究概述

石斛属(*Dendrobium Sw.*)为兰科(*Orchidaceae*)最大的属之一,全球约有 1 500 种,主要分布于亚洲热带和亚热带地区至太平洋岛屿,西起斯里兰卡,东至太平洋塔希提岛,北至印度的西北部及尼泊尔、锡金、不丹和喜马拉雅山一带,经缅甸向东北到我国南方并远至朝鲜南部沿海岛屿和日本的九州、四国以及琉球群岛,南达大洋州南边的塔斯马尼亚岛(吉占和,1980)。我国石斛属植物有 76 种 2 变种,产于秦岭诸省区,主要分布在云南、广西、贵州、广东和台湾(陈心启等,1998;吉占和,1999)。从纬度而言,大多数种类都集中在北纬 $15^{\circ}30' \sim 25^{\circ}12'$ 之间,向北种类逐渐减少,最北界不超过 $34^{\circ}24'$ 。从垂直高度看,海拔 100m~3 000m 范围都有分布(吉占和,1980)。

石斛属植物为多年生草本植物,在生长发育良好的条件下才能形成花芽,于次年开花,花期为 10~15 天。由于借助昆虫异花传粉,开花虽然多,但一般授粉不良,结果甚少(卢炯林,1991)。每个蒴果可含 100 万粒种子,种子细如粉尘,每粒重 0.3~0.4 毫克,种胚处于球形胚阶段并存在后熟现象。由于种子无胚乳,在自然条件下常常需要特殊真菌的帮助才能萌发,繁殖率极低,且不易发育成植株,群体的增殖主要依靠其自身的分蘖繁殖(卢炯林,1991;张明,2000)。除个别为陆生(我国不产)外,其余均为附生植物,生境较为独特,对小气候环境要求极为严格,喜生于热带和亚热带高温、高湿丛林的树上或林下岩石上,要求相对湿度 85~95%、折射光光照强度为 600~800lux 的环境条件(赵天榜等,1994;吉占和,1980);常群居分布,上有林木遮荫,下有溪沟水源,冬春季节稍耐干旱,但严重缺水时常叶片落尽,以裸茎度过不良环境,到温暖季节重新萌发枝叶;常与地衣、苔鲜植物以及其他一些生境要求相似的植物混生,依赖于伴生植物供应水分和养分(彭锐等,2001)。

石斛属植物主要有两方面的应用价值。一方面是观赏:大约有四分之一的石斛属植物可供观赏,石斛与蝴蝶兰、万代兰、卡特兰并列为观赏价值最高的四大观赏兰类(卢思聪,1994)。另一方面是药用:从古至今,石斛一直被认为是中草药的上品。石斛作为一种名贵中药在《神农本草经》中就有记载,是我国栽培历史最悠久的兰科植物之一。在《本草纲目》中,李时珍认为石斛是“本经上品,甘、淡,微咸。主治伤中,除痹下气,补五脏虚劳羸瘦,强阴益精。”《中华人民共和国药典》(2000 版)对药用石斛原植物的描述如下:本品

为兰科植物环草石斛 (*Dendrobium loddigesii* Rolfe.)、马鞭石斛 (*Dendrobium fimbriatum* Hook. Var. *oculatum* Hook.)、黄草石斛 (*Dendrobium chrysanthum* Wall.)、铁皮石斛 (*Dendrobium candidum* Wall.ex Lindl.) 或金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 的新鲜或干燥茎。药用石斛具有益胃生津，滋阴清热等功效。用于阴伤津亏，口干烦渴，食少干呕，病后虚弱，目暗不明等症 (中华人民共和国药典，2000)。现代研究发现石斛具有抗癌、抗肿瘤、抗血小板凝集、提高人体的免疫力、防止衰老等一系列功效，在临床及中药复方中被广泛应用 (徐红等，2001)，如复方中药“石斛夜光丸”、“清睛粉”等对治疗白内障、青光眼、视神经炎等均有较好疗效；“复方脉络宁注射液”有清热养阴、活血化瘀等功效，临床用于治疗闭塞性周围血管炎；复方“清咽宁”冲剂治疗慢性咽炎，疗效显著；加减“益胃汤”对肋痛厌食、腹胀和泄泻均有显著疗效 (王康正等，1997)。

作为经济价值极高的观赏植物和传统名贵中药，目前国内外市场对石斛的需求量越来越大。但是由于石斛对生长环境要求苛刻，生长缓慢，自然繁殖率极低，再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，过度采挖野生石斛，人工栽培成活率低，产量低等原因，致使石斛资源严重匮乏，产量骤减，其中不少种类已处于濒危状态 (曾宋君等，1996)。近年来，为解决需求增加与资源枯竭日益尖锐的矛盾，国内外对药用石斛的研究进入了一个高潮，涉及的研究范围广泛，主要集中在药用石斛原植物的鉴定、有效成分及药理作用、组织培养和细胞培养等几个方面。

在我国的中药古籍中，作为中药石斛的原植物种类相当复杂，如李时珍在《本草纲目》中将入药的石斛分为石斛和木斛，《证类本草》中还有温州石斛和春州石斛的附图，各书中都记载了不同种类的石斛在药效上均有明显的差异。近年来，国内外学者曾对石斛类药材开展了大量的生药鉴定研究 (沙文兰，1980；Carlswald，1997；冯德强，1999)。目前在我国药材市场上药用商品石斛的原植物共有 45 种之多 (李满飞等，1986，1991；马国祥等，1996)，而且不同来源的石斛在化学成分种类、含量及药理活性等方面均存在一些差异 (王艳等，1995)，这使得药用石斛原植物的鉴定显得格外重要。但遗憾的是，迄今为止，对商品石斛及其原植物鉴定还没有规范标准。

在石斛属植物化学成分的研究方面，自日本人铃木秀干等于 1932 年首次从金钗石斛中获得石斛碱 (Dendrobine) 以来 (王宪楷等，1986)，国内外学者已经对石斛属 37 种植物进行了化学成分及其药理活性的研究 (林萍，2003)，总的情况是石斛属植物所含的化学成分种类繁多，但是其活性成分主要为生物碱和多糖两大类。生物碱是药用石斛重要的活性物质，具有降血压，治虚热，止痛退热等功效 (金蓉莺，1981)。到目前为止，从石斛属植物中共分得 32 种

生物碱，其中倍半萜类生物碱 19 种、四氢吡咯类生物碱 3 种、苯酚四氢吡咯类生物碱 3 种、吡啶联啉类生物碱 5 种、咪唑类生物碱 2 种（张光浓，2003）。金蓉鸾等（1981）对 11 种石斛的总生物碱进行了测定，发现凡性状鉴别时具有苦味的，生物碱含量较高，其中金钗石斛总生物碱含量达 0.41%~0.64%，远比其他种类石斛高。石斛多糖具有增强 T 细胞及巨噬细胞免疫活性的作用，是一种免疫增强剂（王康正等，1997）。对于中药石斛的质量，传统的标准为：“质重，嚼之粘牙，味甘，无渣者为优”，表明多糖含量在石斛品质中的重要性。一些研究表明，石斛生理活性的强弱与其多糖含量呈正相关（林萍，2003）。李满飞等（1990）对 25 种石斛属植物的 36 个样品进行了多糖含量测定，发现凡达到传统优品的样品种类，其多糖含量均高于 30%，而广西产一级枫斗的多糖含量高达 45.98%。石斛的糖类成分不仅对动物和人体有生理活性，而且它是组织培养研究中经常使用的一种重要调节剂，如铁皮石斛多糖能促进滇紫草合成紫草素，铁皮石斛寡糖素有利于西洋参细胞的生长和皂甙含量的提高（王康正等，1997）。除了生物碱和多糖以外，研究还发现中药石斛中其他的有效成分，如 Stilbenoids 类、菲类和联苄类物质具有抗癌活性（陈晓梅等，2000），从环草石斛的甲醇提取物中分离鉴定的化合物石斛酚（Moscatilin）二醋酸盐具有抗血小板凝集作用（Chen，1994）。现代药理研究表明，中药石斛煎剂对豚鼠离体肠管和活动有兴奋作用，能促进胃液分泌，对人的胃酸分泌有明显的促进作用，能改善甲亢型小鼠的虚弱症状。这些药理作用与中药石斛的功效是相符合的，但至今还未能从石斛属植物中发现具有这些作用的化学成分（陈晓梅，2000）。目前，对石斛属植物化学成分及药理作用的研究偏重于低极性、小分子的物质，对极性高、大分子物质的研究较少。随着对已知化合物的药理活性和药用价值的进一步深入研究，探索活性成分的作用机理和构效关系、以活性成分为先导化合物的结构修饰和改造，特别是酶学等生物技术在化学合成方面的应用以及指纹图谱的研究等都将具有良好的前景。

在石斛属的组织培养方面，自 Kundson 在 1930 年用 *Laelia cattleya* 的杂种种子经过无菌培养使其萌芽长成植株以来，兰花组织培养技术发展迅速（何静波，1982）。Morel 在 1960 年通过兰花茎尖培养获得了原胚体并分化成植株，从而实现了兰花栽培的工厂化和商品化（何静波，1982）。自石斛属茎尖组织培养无病毒植株的无性繁殖技术创立以来，石斛属组织培养技术逐步走向成熟，成为解决石斛属资源短缺、缓解药材市场供需矛盾的重要手段。我国石斛组织培养研究起步较晚，直到 20 世纪 70 年代末，胡忠等（1979）才首次用黑节草（*Dendrobium candidum* Wall.ex Lindl.）种子通过组织培养获得原胚体并分化形成小苗，但小苗的栽培一直没有得到满意的结果。此后，相继有人报道利用铁皮石斛、束花石斛、兜唇石斛等的茎尖、叶尖或种胚获得了再生植株（王康正，

1998)。近年来,已摸索出了一些石斛种类的组织培养最佳条件,包括光照、温度、pH 值以及外植体的选择、激素的组合等,并利用组培技术研究石斛种子萌发过程中的生理生化变化,在石斛的离体开花、人工种子、转基因石斛等方面都先后取得了成功。目前,很多研究以种子做外植体进行无菌播种产生原球茎(Protocorm),进而分化发育成完整植株。石斛种子尽管在自然界的萌发和成苗率极低(一般只有 1~5%),但在培养基中萌发较容易,有很高的萌发率,并且只要培养条件适宜,多数都能在无茵条件下成苗(李铭宗,1999)。此外,除以种子进行组培快繁外,通过茎段、茎尖、芽、节、叶片、幼根等适宜外植体也可以诱导形成拟原球茎(Protocorm-like bodies, PLBs)或丛生芽进行离体培养获得再生植株。到目前为止,尚未见以花及花药为外植体的组织培养的报道(张明,2000)。以往的研究表明,基本培养基并不是制约石斛离体培养的最重要因素,植物组培中常用的许多培养基均可用于石斛组织培养,其中 MS 培养基被广泛地用于石斛种子、茎段、叶片等的培养。使用不同的培养基,效果也不同。譬如,张治国(1992)研究了 6 种基本培养基(1/2MS、MS、N₆、B₅、KC、VW)对铁皮石斛原球茎增殖的影响。结果表明,不同的基本培养基对原球茎增殖影响十分明显,其中以 1/2MS 培养基最适宜原球茎的增殖。此外,在不同培养阶段,选择不同的培养基对培养效果也有较大的影响(张艳等,2000)。植物生长调节物质虽然用量极小,但在石斛组织培养中却起着重要和明显的调节作用。生长素的主要作用在于诱导愈伤组织的形成、胚状体的产生以及试管苗的生根,更重要的是配合一定比例的细胞分裂素诱导腋芽及不定芽的发生,常用的生长素有 2,4-D、NAA、IAA 和 IBA 等;细胞分裂素有促进细胞分裂和分化、延迟组织衰老、增强蛋白质合成、抑制顶端优势、促进侧芽生长及显著地改变其他激素作用的特点,常用的细胞分裂素有 KT、6-BA、ZT 和 2ip 等(曹孜义等,1999)。研究发现,不同材料作为外植体各有利弊,以继代苗段增殖长势快,但原植株需要量大,生产基数小;茎段作为外植体,成株快,但也需要大量原植株,也存在生产基数小的缺陷;种子无菌播种繁殖系数虽然高,但增殖生长周期长,培养的试管苗茎细,苗弱,需反复壮苗,脱瓶移栽成活率极低(杨联河,1998)。目前,有关石斛试管苗移栽的文献报道较多,但普遍存在移栽成活率低的问题(王康正,1998),茎段外植体苗移栽成活率多为 60~76.7%(陈薇,2002;朱艳,2004),而种子苗的成活率往往更低。因此,如何提高试管苗移栽的成活率就成为当前石斛组培快繁研究的热点问题。

石斛属植物组织中存在大量内生菌,它们能够影响宿主植物生理生化代谢,促进植物的生长发育,从植物组织中分离和筛选出促进植株生长的菌株是解决问题的关键。已报道的内生真菌绝大部分属于半知菌亚门和担子菌亚门,还有少数属于子囊菌亚门(郭顺星等,1990)。1994 年吴静萍和郑师章从密花

石斛根部直接分离到一株真菌，经鉴定为镰刀属（*Fusarium*）菌株。2000年，郭顺星等从我国云南、四川等地采集的野生石斛品种上分离到内生菌根真菌，经鉴定分属于柱孢霉属（*Cylindrocarpon*）、瘤菌根菌属（*Epulorhiza*）、蚀丝霉属（*Myceliophthora*）、头孢霉属（*Cephalosporium*）、角菌根菌属（*Ceratorhiza*）、筒梗孢霉属（*Chromosporium*）、丝核菌属（*Rhizoctonia*）、粘帚霉属（*Gloiocladium*）、念珠菌根菌属（*Moniliopsis*）、盘多毛孢属（*Pestalotina*）以及石斛小菇（*Mycena dendrobii*）和兰小菇（*Mycena orchidiocla*）（Guo 等，2000；郭顺星等，1999）。将 25 种内生真菌分别与铁皮石斛种子、铁皮石斛及金钗石斛无菌苗共培养测定其生物活性，其中 5 种真菌对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（郭顺星等，2000）。高微微等（2002）采用植物无菌原球茎及试管苗与真菌进行双重培养，观测原球茎增殖及苗的生长情况，发现开唇兰小菇、石斛小菇、兰小菇等 3 种小菇属内生真菌能提高铁皮石斛生长量 3~5 倍，同时对铁皮石斛原球茎增殖也有明显促进作用。宋经元等（2004）研究瘤菌根菌属（*Epulorhiza*）真菌 AR-18 对铁皮石斛和金钗石斛生长的影响，结果表明在离体培养条件下选择合适的基质和控制真菌的适度生长是建立稳定的共生平衡系统、促进金钗石斛生长的重要条件。吴静萍等（1994，2000）、陈晓梅等（2000）、张集慧等（1999）从物质角度探讨内生真菌促进其生长发育的机制，为阐明内生真菌促进兰科药用植物生长发育的作用机制提供证据（见表 1.1）。此后，国内外学者不断深入研究，尤其是在种子萌发和幼苗生长阶段，发现菌根真菌与石斛属植物生长发育密切相关。内生真菌能促进兰科植物种子的萌发，并参与幼苗的生长。石斛属植物种子胚中所储存的养分在胚最初的几次细胞分裂中就已消耗殆尽，无法继续提供种子萌发所必需的养分。从种子能量耗尽到幼叶开始光合作用的这段时期内，它们只有依靠真菌维持营养供给生存下去。目前，有关兰科植物与内生真菌的关系还有许多问题尚未搞清。相关工作有的涉及真菌诱导子对石斛生理代谢的刺激作用（潘超美等，2004），有的则侧重于共生体系中植株生长及其多糖和总生物碱累积相关性（陈晓梅等，2005）。此外，分子生物学方面的工作也刚刚开始（Chen 等，2005）。

表 1.1 几种石斛宿主植物及其内生真菌代谢产物

宿 主 植 物	真 菌 种 属	代 谢 产 物
密花石斛（ <i>Dendrobium densiflorum</i> ）	镰孢菌属（ <i>Fusarium</i> ）	赤霉素
铁皮石斛（ <i>Dendrobium candidum</i> ）	石斛小菇（ <i>Mycena dendrobii</i> Fan et Guo）	(1) 6,9-epoxy-ergosta-7, 22-dien-3-ol; (2) β -谷甾醇（ β -sitosterol）
密花石斛（ <i>Dendrobium densiflorum</i> ）	镰孢菌属（ <i>Fusarium</i> ）	B 族维生素的 B2、B6 和 Bc（叶酸）

为解决中药材对野生和栽培的依赖,利用药用植物组织及细胞生产有用次生代谢产物也是行之有效的方法。自从两位美国学者 Routien 和 Nickell 在 1956 年提出植物细胞大规模培养作为工业化生产植物次生代谢产物的一条途径以来,该研究领域已经取得了相当大的进展。到目前为止,研究的植物种类已达 250 种以上,从细胞培养物中获得的次生代谢产物超过 500 种,其中,10 余种植物的大规模细胞培养相继进入了工业化生产或进入了中试阶段(张泓,1994)。这些事实充分说明,一个植物的活细胞在离体培养条件下不仅具有形成完整再生植株的能力,而且也具有合成与原植物同样的次生代谢产物的能力(唐建军,2002)。在植物中,次生代谢往往是某些特化的细胞或组织特有的生理现象(吴晓玲,2002)。在离体培养条件下,在一定程度上形态分化的外植体细胞又脱分化,使原有的形态结构发生很大变化。随着其形态特征发生改变,细胞的生理生化特性也发生相应的变化,从而可能使培养细胞合成某种次生代谢产物的合成能力提高、下降或丧失(张泓,1994)。研究表明,液体培养方式可以加速细胞的生长和提高次生代谢产物的积累(胡之壁,1998)。在生长迅速、高度分散的细胞悬浮培养系统中,细胞所处的环境既无极性也无梯度,可以迅速获得较大的生物量;与之相反,在慢速生长,已经分化或部分分化的组织或细胞团却能积累较多的次生代谢产物(任志华,2003)。三十多年来植物细胞大量培养的研究结果证明,大多数植物的培养细胞,在生长周期的后期才开始大量合成次生代谢产物。这可能是由于当细胞处于迅速分裂和生长阶段时,需要合成大量的核酸、蛋白质和糖类等物质,此时初级代谢占绝对优势。而次生代谢与细胞的生长和分裂无直接关系,往往与代谢废物的排泄、抗性物质或特殊分泌物的形成有关,所以常发生在细胞停止分裂和缓慢生长的时期(张泓,1994)。纵观前人的研究结果,细胞的生长与次生代谢产物积累之间的相关性有如下 3 种模式:①次生代谢产物的积累在细胞生长的静止期;②次生代谢产物的积累高峰在细胞生长的指数生长期;③次生代谢产物的积累动态和细胞生长动态呈平行关系,只是产物的形成略落后于细胞的生长(张泓等,1994)。这种次生代谢与细胞生长之间的复杂性表明,在离体培养的情况下,与次生代谢有关的基因表达并不完全与整体植株中的情况相一致。同时,也给大规模的细胞培养生产带来许多困难。Hoelsstra 等(1988)指出,从生物技术的观点出发,悬浮培养体系仍然是大规模生产次生代谢产物最有效的方法。因此,可通过改变理化培养条件、筛选高产细胞株或施加诱导子,使脱分化细胞与次生代谢有关的遗传基因得以表达(张泓等,1994)。愈伤组织源自于自然生长的植物受损伤时在愈合伤口处长出的一团瘤状突起,瘤状突起内的细胞相对于植物体成熟细胞已发生脱分化的变化;在植物组织培养领域,愈伤组织是指从外植体的内部或切口表面形成的一团没有分化的组织,这种组织具有再分化的能力;松散的愈伤组织

是进行悬浮培养最适合的材料, 稍经机械振荡, 即可使组织分散成单细胞或少数几个细胞组成的小细胞团, 在培养中能够较快增殖; 而坚实愈伤组织细胞间被果胶质紧紧地贴着, 因而往往不能形成良好的悬浮培养系统, 诱导形成的愈伤组织如果在原培养基上继续培养, 细胞将不可避免地发生分化, 产生新的结构 (薛庆善, 2001)。因此, 研究以愈伤组织颗粒为代表的细胞团生长、细胞分化规律, 已成为进一步提高次生代谢物产量的有效途径之一 (于树宏, 1998)。

近年来, 人们对石斛属植物的组织培养物替代原药材使用或者生产活性成分进行了一定的探索。何静波等 (1982) 通过液体旋转培养, 使由种子产生的原胚体连续增殖, 试图以培养的原胚体的有用成分代替黑节草制成的商品“西枫斗”; 魏小勇 (2004) 首次报道了铁皮石斛原球茎悬浮培养系的建立, 为铁皮石斛大规模培养开创了新途径; 罗建平等 (2003) 考察了霍山石斛原球茎在液体培养中增殖、水溶性多糖与总生物碱的特征; 黄民权等 (1998) 对铁皮石斛愈伤组织培养物和原植物之间多糖含量、多糖的单糖化学组成以及在药理方面对一些免疫指标的影响做了比较, 发现两者在这几方面都存在着明显的相似性, 从而证明了将组织培养物代替原植物做药用的可行性。这些研究结果为药用石斛有效成分的产业化开发所需原料的来源开辟了新途径, 充分展现了用石斛愈伤组织、原球茎等组培物代替其原植物直接作为药用的诱人前景。但是, 目前涉及到石斛组织培养次生代谢产物方面的研究还很少 (徐红等, 2001), 并且研究对象主要是铁皮石斛和霍山石斛, 在液体悬浮培养方面也主要是针对原球茎的液体悬浮培养体系, 涉及愈伤组织诱导的报道不多 (曾宋君, 1996; 周月坤, 1989; 王光远, 1995; 张艳, 2001), 而有关愈伤组织悬浮培养系建立等方面的研究至今未见报道。

综上所述, 我们可以看到对药用石斛进行离体快速繁殖, 是目前解决生产中种苗来源问题的主要方法, 已在多种石斛中成功地培育出试管苗, 而且在培养条件、培养基的选择、激素的使用等一系列技术问题都得到了进一步的优化。在种子的试管萌发、由外植体获得再生植株、拟原球茎 (PLBs) 及丛生芽的诱导和增殖、试管苗的壮苗生根方法等诸方面均有大量的报道。然而, 目前仍然存在着外植体苗繁殖系数低, 种子苗纤弱, 试管苗移栽成活率低等问题 (王康正, 1998)。从试管苗到大田栽培的中间环节成为制约石斛大面积人工栽培的主要障碍。此外, 在进行组织培养研究时, 直接以组织培养物替代原药材使用或者生产活性成分也是解决石斛资源短缺的重要方法, 然而目前涉及这方面的研究还很少 (徐红等, 2001)。内生真菌的多样性及其产物的多样性对植物生长发育具有重要调节作用, 研究结果有望将内生真菌应用到石斛属植物的繁殖中去, 解决菌剂技术应用用于现实生产的关键问题。