

# 现代生物技术用于霍山石斛资源保护面临的问题与对策

陈乃东\*, 陈乃富

皖西学院生物与制药工程学院 皖西中药与天然药物工程技术研究中心, 安徽省省级 2011 协同创新——霍山石斛产业化开发协同创新中心, 六安 237012

**摘要:** 运用现代生物技术, 通过组培快繁快速获得试管苗野外驯化栽培进而实现资源快速扩增, 是珍稀濒危药用植物资源保护常用的方法之一。作为药用植物, 保持组培快繁植株与野生植株活性成分组成和含量相对稳定——即药材“品质”或“道地性”的稳定是关键因素。本文以霍山石斛为例, 对现代生物技术用于珍稀濒危药用植物资源保护中面临的问题进行探讨, 综合分析相关研究认为, 试管苗途径霍山石斛化学成分与野生资源存在不同, 试管苗时期内生真菌的缺失导致试管苗途径植株中内生真菌产生的成分和/或内生真菌与其宿主植物相互作用产生的成分缺失是重要原因, 提出通过内生真菌再植入试管苗, 使试管苗途径药用植物重新获得产生缺失组分的能力, 或通过种子直接诱导快速获得内生真菌组成稳定的实生苗等提高组培快繁植株道地性的策略。

**关键词:** 霍山石斛; 现代生物技术; 珍稀濒危药用植物; 资源保护

中图分类号: R931.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.041

## The Challenge and Bottleneck of the Application of Tissue-cultured Technology on the Conservation and Exploitation of *Dendrobium huoshanense*

CHEN Nai-dong\*, CHEN Nai-fu

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University; Anhui Biotechnology Research Center of Plant Cell Engineering; The Provincial 2011 Collaborative Innovation Center of Anhui-*Dendrobium Huoshanense* Industrialization Exploitation Collaborative Innovation Center, Lu'an 237012, China

**Abstract:** This paper analyzed the status, problem and countermeasure of the application of tissue-cultured technology on the conservation and exploration of medicinal plants used *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng as an example. Although the plant tissue culture technique is widely used in the conservation and utilization of rare and endangered medicinal plants, it still has bottlenecks such as how to make tissue culture stocks obtain the ability to produce similar bioactive components as their wild correspondences. The previous phytochemical investigation revealed that remarkable differences in both contents and composition of active components are existed between wild *D. huoshanense* and test-tube plantlet tamed stock. This caused the lower quality of test-tube plantlet tamed *D. huoshanense* and became a of the germplasm resource conservation and utilization of the endangered medicinal plant. The removing of the endophytic fungi in the sterile stage of test-tube seeding might cause the absence of the endophyte-originated metabolites in the plants. Reintroducing endophytes in to the tissue-cultured stocks and thus recovering the ability of producing the lacked chemicals, or obtaining seedlings induced from the seeds, might be a tactics.

**Key words:** *Dendrobium huoshanense*; modern biotechnology; rare and endangered medicinal plants; conservation of resource

近年来, 世界范围内“回归自然”的呼声日益增强, 人们对植物药的需求量与日剧增, 给自然环境和

资源造成了巨大的压力, 致使大面积植被被毁, 生态环境急剧恶化, 植物药资源快速萎缩。如甘草、光果甘草、羌活、单叶蔓荆、黄皮树、银柴胡、肉苁蓉、三叶半夏、新疆阿魏、紫草等 100 多种药材的资源量普遍下降, 影响 60 多个药材品种的医疗用药。霍山石斛、见血封喉、峨眉野连、八角莲、凹叶厚朴、杜仲、小

收稿日期: 2016-05-16 接受日期: 2016-08-09

基金项目: 国家自然科学基金(NSFC81274021, NSFC81573536); 安徽省自然科学基金面上项目(1608085MH221); 安徽省省级自然科学研究重点项目(KJ2016A886); 安徽高校省级科学研究重大项目(KJ2015ZD43)

\* 通讯作者 E-mail: 2004cnd@163.com

勾儿茶、野山参、黑节草等 30 多种药材因野生资源稀少,无法提供商品或只能提供少量商品,处于濒临灭绝的边缘<sup>[1]</sup>。

运用现代生物技术,通过组培快繁快速获得试管苗野外驯化栽培进而实现资源快速扩增,是珍稀濒危药用植物资源保护常用的方法之一。在部分濒危药用植物的道地产区,通过试管苗大规模野外驯化栽培,已逐渐替代野生资源成为药用植物的主要来源。作为药用植物,保持组培快繁植株与野生植株活性成分相对稳定——即药材“品质”或“道地性”的稳定是关键因素。本文拟以霍山石斛为例,从药效物质基础的相似性角度,对现代组培育种技术用于珍稀濒危药用植物资源保护中面临的问题及原因进行分析并提出解决方法,为中药资源保护和利用中品质调控提供参考依据。

## 1 霍山石斛资源现状

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng),俗称米斛,最早见载于清代赵学敏《本草纲目拾遗》,属兰科石斛属,含有多糖<sup>[2,4]</sup>、生物碱<sup>[5]</sup>和黄酮<sup>[6]</sup>等,具有增强免疫活性<sup>[7]</sup>、治疗预防心血管疾病、抗肿瘤、明目、提高人体 SOD 水平<sup>[8]</sup>、壮阳补肾、延缓衰老、保健益寿等功效<sup>[9]</sup>,是安徽道地药材之一。霍山石斛大多与苔藓、石韦等植物附生在一起,喜阴凉湿润,依靠裸露的须根从空气中吸收水分,光饱和点、光补偿点和净光合速率较低,气孔开闭和光合作用受湿度影响较大<sup>[10]</sup>,加之植株矮小,种子细小无胚乳,在自然状态下发芽率低<sup>[11]</sup>,自然分布区相当狭窄,仅限于大别山区的安徽霍山、金寨、岳西、潜山,湖北英山及河南南召等地,是石斛属唯一分布局限于长江以北的种<sup>[12]</sup>。多年来,药用霍山石斛来源主要是以采集野生为主,导致资源急剧减少,野生资源已濒临灭绝,市场价格达每公斤四十万元,且往往有价无市。在我国兰科石斛属 12 个极危级物种中就有霍山石斛<sup>[13]</sup>。1987 年,国务院将其列为野生药材二级保护品种。

运用现代生物技术,通过组织培养快速获得试管苗进而野外驯化栽培,已成为濒危植物霍山石斛资源保护的主要方法。

围绕霍山石斛试管苗快速培育体系的建立,国内外学者做了大量研究工作,概括起来可分为:种子无菌萌发途径<sup>[14]</sup>、外植体器官发生途径<sup>[15,16]</sup>和类原球茎体胚胎发生途径<sup>[17]</sup>三种途径。围绕外植体来

源与生理状态、培养基类型、激素、有机添加物<sup>[18]</sup>等对霍山石斛的快速繁殖做了大量研究工作,并已成功地培育出多种霍山石斛试管苗<sup>[19,20]</sup>。孙亭<sup>[21]</sup>、刘石泉等<sup>[22]</sup>对无菌苗种群进行的 RAPD 检测发现,霍山石斛种苗在不同发育阶段遗传相似系数较大,变异非常小,与野生植株相比,其遗传性状基本保持稳定;邱婧<sup>[23]</sup>等利用 DALP 等分子标记技术证明不同继代次数的霍山石斛试管苗在遗传上没有差异;本课题组采用无菌苗茎间诱导类原球茎途径建立了霍山石斛试管苗快速培育体系,并成功的实现了试管苗在野外大规模的栽培,ISSR-PCR 检测表明,试管苗移栽驯化植株与野生植株对比保持了遗传稳定性<sup>[24]</sup>。通过建立霍山石斛稳定的无性快繁体系快速获得试管苗进而野外驯化栽培,实现了霍山石斛资源的快速增加,有效的缓解了霍山石斛有价无市的资源状况。

## 2 霍山石斛资源保护存在的问题

药用植物种质资源保护最终目的是为了开发利用,因此,在进行药用植物种质资源保护时,在关注其遗传性状——“种”的稳定性的同时,还应关注其作为药物的药效物质基础——主要活性成分是否也保持组成和含量的相对稳定,即“品质”的稳定。濒危药用植物霍山石斛种质资源保护应同时保持遗传性状和药效物质基础的稳定。

次生代谢产物是中草药发挥疗效的物质基础,它们在植物体内的积累是个相对较长的过程。运用现代植物细胞工程技术建立药用植物悬浮细胞培养体系、毛状根培养体系等可高效产生某些活性成分的生物反应器被认为是一个解决珍稀药用植物资源不足的有效方法。然而,大量的研究报道表明:构建的可快速增生的生物反应器虽然具有与原植物细胞相同的遗传信息,却往往不能产生预期的活性物质或者目标活性成分过低而失去应用价值<sup>[5,25]</sup>。

近年来有关霍山石斛植物化学和药理活性的研究显示,采用组培快繁育种,可能存在相似的问题。

本题组在安徽省省级 2011 协同创新中心——霍山石斛产业化开发协同创新中心项目及国家自然科学基金面上项目《基于濒危药用植物霍山石斛资源保护和利用药材品质影响因素研究》、国家自然科学基金面上项目《协同生物转化及其对中药药效物质基础积累的影响——以霍山石斛为例》等项目支持下,对试管苗移栽驯化植株与野生植株活性成

分进行了对比研究,结果显示,试管苗移栽驯化植株与野生植株总生物碱含量不同:野生植株总生物碱含量( $0.29 \pm 0.11\%$ ) < 试管苗移栽驯化植株总生物碱含量( $0.43 \pm 0.15\%$ )<sup>[5]</sup>,野生植株可检出四种生物碱组分而组培植株中仅检测到2种生物碱组分<sup>[5]</sup>;野生植株总多糖含量(28.65%) < 试管苗移栽驯化植株总多糖含量(31.5%)<sup>[3,26]</sup>。不同种源的霍山石斛总多糖的单糖组成相同,但总多糖中单糖的比例存在明显差异<sup>[27]</sup>。基于单糖组成的霍山石斛组培植株与野生植株的相似度分析显示二者的相似度仅为73.1%<sup>[27]</sup>;基于霍山石斛原药材、甲醇总提物、水提物的红外光谱分析(FTIR)显示,野生霍山石斛与组培霍山石斛的相似度分别为93.74%(原药材粉末)、78.31%(甲醇提取物)和78.0%(水提物)<sup>[28,29]</sup>;采用HPLC-DAD-CL联用技术对霍山石斛总生物碱提取物体外抗氧化活性谱效关系研究显示,二者的体外抗氧化活性存在不同<sup>[30]</sup>。上述研究结果提示,野生植株,试管苗移栽驯化植株中主要活性物质种类及含量明显不同,从药效物质基础角度考虑,来源于试管苗移栽驯化植株与野生植株品质不同。

利用无菌苗茎间诱导类原球茎途径建立的霍山石斛试管苗快繁体系,平均每克类原球茎增殖30d后可再生近5000株幼苗,较好地解决了霍山石斛种子在自然条件下难以萌发的问题,但是试管苗移栽驯化植株的药效物质基础组成及含量发生改变,已成为当前制约濒危药用植物霍山石斛资源保护和利用的瓶颈和难题之一。

在对太子参等药用植物的组培育种研究中发现相似的问题,提示药材化学成分改变可能是采用“组培育种→野外驯化栽培”模式保护珍稀药用植物种质资源的共性问题,也是制约珍稀药用植物资源保护和利用的瓶颈和难题之一。

### 3 试管苗途径植株化学成分变化的可能机制

药用植物活性成分——主要是次生代谢产物,可能的来源是:(1)药用植物本身进行次生代谢产生的,即宿主植物基源的成分,是药用植物活性成分的主要来源;(2)药用植物的内生真菌在生命活动过程中产生的,即内生真菌基源的成分;(3)宿主植物受内生真菌侵入产生的自我保护性物质,或者内生真菌、宿主植物受彼此基源的代谢产物诱导产生

的,或受对方基源的有害代谢产物进入产生的用于解毒的结构修饰反应(生物转化),即真菌-宿主植物协同基源的成分;(4)真菌、宿主植物受外界环境因素刺激产生,即真菌-宿主植物-环境协同基源的成分(图1)。

内生真菌和环境因子对药用植物活性成分产生与积累发挥着重要的作用<sup>[31,32]</sup>。来自试管苗野外驯化栽培的植株,由于在无菌生长时期内生真菌的缺失,即使后期移至野生环境栽培,会由于内生真菌的缺失或不适时侵入,导致药用植物的某些真菌基源的或真菌-宿主植物协同基源的或真菌-宿主植物-环境协同基源的活性成分的减少甚至缺失,从而导致药材的品质发生改变。

霍山石斛试管苗野外驯化栽培植株药材质量下降可能是由于内生真菌的缺失或不适时侵入,使得其活性成分减少乃至缺失所致。

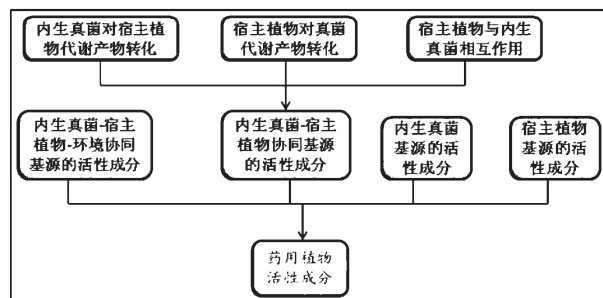


图1 药用植物活性成分积累的可能途径

Fig. 1 The possible accumulation pathway of the active metabolites in medicinal plants

## 4 解决方法

针对霍山石斛资源保护中存在的问题,可能的解决方法有:

4.1 通过内生真菌再植入试管苗,使试管苗途径药用植物重新获得产生缺失组分的能力。

对野生霍山石斛次生代谢产物进行系统分离,在活性测定的基础上确定其主要活性成分的组成,以之为标志性成分建立化学指纹图谱,进而构建涵盖多组分(基于生物碱、基于黄酮、基于多糖、基于其它活性组分指纹图谱的)霍山石斛综合质量评价标准。以此为依据,对霍山石斛主要活性成分的基源展开研究,探讨其主要活性成分的产生和积累与内生真菌的关系。在此基础上,通过对内生真菌再植入试管苗仿原生培养,研究内生真菌对霍山石斛活性成分积累的影响,通过内生真菌再植入试管苗,

使试管苗途径药用植物重新获得产生缺失组分的能力。试管苗再植入植株在霍山石斛道地产区仿原生态栽培,提高试管苗途径霍山石斛与野生霍山石斛药效物质基础的相似性。

#### 4.2 采用实生苗途径育种

采集霍山石斛成熟的种子,在适宜的培养基上诱导萌发,快速培育实生苗进而野外仿原生态栽培。该方法既可以解决霍山石斛种子在自然状态下难以萌发问题,又可以解决试管苗育种内生真菌缺失问题,是珍稀濒危药用植物资源保护中非常有意义的研究方向。

#### 参考文献

- 1 Yang SL(杨世林), *et al.* Counter measures to overcome the present inadequate means for the protection of near extinct species of Chinese medicinal plants. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(6): 3-5.
- 2 Hsieh YSY, *et al.* Structure and bioactivity of the polysaccharides in medicinal plant *Dendrobium huoshanense*. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 6054-6068.
- 3 Chen ND(陈乃东), *et al.* Accumulation of polysaccharides and ethanol-soluble extract in tissue-cultured and wild *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium henanense*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27: 2090-2094.
- 4 Si HY(司华阳), *et al.* Review on isolation and pharmacological activities of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28: 467-470.
- 5 Chen ND(陈乃东), *et al.* Comparative study on alkaloids of tissue-culture seedling and wild plant of *Dendrobium huoshanense*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2014, 37: 953-956.
- 6 Chang CC, *et al.* 6, 8-Di-C-glycosyl Flavonoids from *Dendrobium huoshanense*. *J Nat Prod*, 2010, 73: 229-232.
- 7 Jin RY(金蓉莺), *et al.* A determination of total alkaloids in eleven species of Shihu (*Dendrobium*). *J Nanjing Coll Pharm*(南京药学院学报), 1981, 16: 9-13.
- 8 Cai YP(蔡永萍), *et al.* Determination of some resistant-oxidase enzymes and activated substances of three dendrobium in Huoshan county. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1996, 31: 649-651.
- 9 Chen XM(陈晓梅), *et al.* Advance in the research of constituents and pharmacology of *Dendrobium*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物开发与研究), 2000, 13: 70-75.
- 10 Xu Y(徐云), *et al.* Photosynthetic characteristics of three species of *Dendrobium* in Huoshan county of Anhui province. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 1993, 4: 18-21.
- 11 Wang DQ(王德群), *et al.* 霍山石斛的名实混乱与原植物. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29: 1198-1199.
- 12 Wang DQ(王德群). Classification distribution and medicinal sorts of endemic plants in Anhui province. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24: 451-454.
- 13 Wang S(汪松), *et al.* 中国物种红色名录, 第一卷. Beijing: Higher Education Press, 2004.
- 14 Yang QG(杨其光), *et al.* Studies on *in vitro* culture of premature seeds of *Dendrobium huoshanense* Tang et Cheng. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1989, 14(3): 19-20.
- 15 Wu MG(吴明纲), *et al.* Tissue culture of the stems of *Dendrobium huoshanense* under effects of IBA/NAA. *J China Univ Sci Technol* (中国科学技术大学学报), 2001, 31: 624-628.
- 16 Shi W(石玮), *et al.* Effect of growth regulators on rooting of regenerated shoots from *Dendrobium huoshanense* protocorm-like bodies. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34: 955-957.
- 17 Luo JP(罗建平), *et al.* Suspension culture of protocorm-like bodies from the endangered medicinal plant *Dendrobium huoshanense*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28: 612-614.
- 18 Jin Q(金青), *et al.* Induction of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense* and effects of different culture methods on protocorm multiplication. *J Anhui Agric Univ* (安徽农业大学学报), 2008, 35: 258-261.
- 19 Tan Y(谭云), *et al.* Tissue culture of *Dendrobium huoshanense*. *Chin Bull Botany* (植物学通报), 2005, 22(1): 58-62.
- 20 Sun T(孙亭), *et al.* 霍山石斛离体培养研究. Xi'an: Northwest A&F University, 2004.
- 21 Liu SQ(刘石泉), *et al.* Hereditary stability among species of *Dendrobium huoshanense* by RAPD. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36: 427-431.
- 22 Zhou GY(周根余), *et al.* 霍山石斛遗传稳定性 RAPD 研究及位点特异性 PCR 鉴别. Shanghai: Shanghai Normal University, 2005.
- 23 Qiu Q(邱婧), *et al.* The study on the genetic stability of *Dendrobium huoshanense* repeatedly subcultured *in vitro* by using molecular markers. *Molecul Plant Breed* (分子植物育种), 2008, 6: 532-536.
- 24 Liu MZ(刘明珍), *et al.* Molecular authentication of *Dendrobium huoshanense* from its allied species. *J Biol* (生物化学杂志), 2009, 26(5): 34-36.