

铁皮石斛种胚原球茎液体悬浮培养研究

魏小勇(广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 建立铁皮石斛原球茎液体悬浮培养体系,为大规模生产石斛奠定基础。方法 对铁皮石斛原球茎悬浮培养条件进行比较选择,并测定生长增殖量。结果 液体悬浮培养的原球茎分散性好,整齐均一。悬浮培养的最适培养基为 1/4MS + 40mg/L VC, pH5.6, 摇床转速为 50r/min, 15d 继代一次, 黑暗培养。培养基中添加 0.5mg/L ABA 预培养 30d, 原球茎的质量更高、同步性更好。结论 获得了快速增殖原球茎的液体悬浮培养的最佳条件,为铁皮石斛开发利用创造条件。

关键词:液体悬浮培养;铁皮石斛;原球茎

中图分类号:S567 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2005)06-0471-03

Studies on suspension culture of PLBs derived from seed embryo in *Dendrobium officinale*

WEI Xiao-yong(School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To set up a system for suspension culture of *Dendrobium officinale* used for the explant of artificial seed. **METHODS** The PLBs were cultured in different medium, condition and factors. The indication of growth and multiplication of the PLBs were studied, and contrast to the number, fresh weight and dry weight of the PLBs. **RESULTS** The PLBs of suspension cultures were finely divided, well-distributed and in relatively regular. The best suspension culture medium of PLBs was 1/4MS + 40mg/L VC, pH5.6, the table shift 50r/min, the medium was changed each 15 days and cultured in dark conditions. The quality and identity of the PLBs which were in advance cultured in the medium in which were added whih 0.5mg/L ABA for 30 days would be improved. **CONCLUSION** The best basic medium and the best arrangement in pairs between inoculum and medium volume are obtained, which opens an alternative road to large-scale culture this herb.

KEY WORDS: suspension culture; *Dendrobium officinale*; protocorm-like bodies(PLBs)

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为传统名贵中药,具有滋阴养胃、清热生津、润肺止咳之功效^[1-3]。但它对环境的要求十分严格,自然条件下,种子萌发率极低,生长极缓慢;另一方面人们过度采挖,环境的恶化,铁皮石斛资源日趋枯竭^[4-7]。为保护利用这一珍稀中药材,增加产量,不少学者进行了铁皮石斛组织培养快速繁殖研究,并取得了一定的进展。我们对铁皮石斛人工种子进行了研究,深入研究了铁皮石斛人工种子的制作流程、人工胚乳的筛选、有菌萌发等,研制了一种新的包埋基质来制作人工种子,已获得成功^[8-11]。但要制作高质量的人工种子,必须获得大量高质量的同步的分散均一的繁殖体,为此,我们研究适于制作人工种子繁殖体的铁皮石斛原球茎(PLBs)液体悬浮系。

1 材料与方法

1.1 PLBs 的诱导

云南野生铁皮石斛成熟蒴果。蒴果用软刷蘸肥皂液轻轻刷洗,然后用流水冲洗干净,分别用 75% 乙醇、0.1% 的升

汞溶液表面消毒后,取种胚接种在含 0.5mg/L NAA 的 MS 的固体培养基中常规培养获得 PLBs。

1.2 PLBs 悬浮培养条件的比较选择

选活力强、均匀一致的鲜黄色原球茎称重,置于装有培养基(pH5.6)的 4.5cm 培养皿中,每皿接种 50 个原球茎,培养温度 $\theta = (25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 黑暗中培养,每 10d 换液一次,60d 后,倾去培养液,称鲜重和干重,同时统计原球茎的数量,并测量其长度。每种处理重复三皿,计算其平均值,进行比较。

2 结果与分析

2.1 培养方式对 PLB 增殖的影响比较试验

考察固体静置、液体静置、液体悬浮(50r/min)三种培养方式 PLBs 增殖情况,培养基为 1/4MS。结果见表 1。仅从鲜重来看,液体静置培养方式增加最快,但悬浮培养的 PLBs 的数量最多,悬浮培养形成的 PLBs 较易脱落,PLBs 大小适中、均匀、分散性好,适合于作为人工种子的繁殖体。前两种培养方式分散性、整齐度差,3~10 个 PLBs 聚结在一起,不适合

基金项目:广东省中医药局资助项目(No. 402003, 303005)

作者简介:魏小勇(1969—),男,主要从事中药生物工程研究。E-mail: jidewowxy@163.com

用作人工种子繁殖体。且固体培养、液体静置培养的 PLBs 容易分化成苗,这与 Sagana 等人观察结果相似。说明悬浮培养更适合铁皮石斛 PLBs 分散及数量的增加。

表 1 培养方式对铁皮石斛 PLBs 增殖的影响

Tab 1 The effect of different culturing methods on the growth of suspension PLBs

培养方式	PLBs 平均鲜重(mg)	PLBs 平均数量(个)
液体悬浮培养(振荡)	0.935	265
液体静止培养	1.565	230
固体静置培养	1.175	245

2.2 培养基对悬浮培养的 PLBs 产生的影响

将 PLBs 接种于表 2 中的 6 种培养基中,每皿加培养基 6mL,置于 50r/min 的恒温摇床上。结果不同的培养基对悬浮培养铁皮石斛 PLBs 的增殖影响较大,无论是 PLBs 的鲜重还是数量,均以 1/4MS 培养基最佳。见表 2。

表 2 不同的培养基对悬浮培养的 PLBs 的增殖影响

Tab 2 The effect of different medium on the growth of suspension PLBs

培养基	PLBs 平均鲜重(mg)	PLBs 平均数量(个)
1/4MS	0.935	201.5
MS	0.80	158
N6	0.77	141
1/2MS	0.76	141.7
KC	0.715	115
B5	0.68	100

2.3 脱落酸(ABA)预处理悬浮培养的 PLBs 的质量及整齐度的影响

将大小相同、均匀一致原球茎分别置于添加不同浓度的 ABA(ABA 过滤灭菌单独加入)液体培养基中,预培养 30d 后,用筛网过滤,将 PLBs 按大小分为三级。测定每个 PLB 的鲜重、干重及长度,计算平均值。结果见表 3,当培养基中没有 ABA 时,原球茎细小、均一程度低;培养基中加入 ABA,PLBs 的体积增大、健壮、均匀、干物质的积累明显增多。当 ABA 的浓度为 0.5mg/L 时,PLBs 的鲜重、平均长度、均匀度等指标达到最佳。说明 ABA 有利于干物质的积累,PLBs 的质量大大提高,适于作为人工种子繁殖体,其成活率、成苗率和抗逆能力都将增强。

表 3 ABA 对悬浮培养的铁皮石斛 PLBs 质量、同步化的影响

Tab 3 The effect of ABA on the quality and cordance of PLBs cultured in suspension medium

ABA 浓度 (mg/L)	含水率 (%)	平均鲜重 (mg)	平均长度 (mm)	平均干重 (mg)	I 级 PLBs(%)	II 级 PLBs(%)	III 级 PLBs(%)
0.25	93.02	4.96	3.16	0.42	45.30	43.90	10.90
0.5	92.96	6.48	3.43	0.46	80.30	16.50	3.20
1.0	92.83	5.04	3.20	0.40	50.30	46.40	3.30
0.0	93.55	3.24	2.50	0.21	13.00	67.00	20.00

注: I 级、II 级、III 级 PLBs 的长度范围分别为: 3.6 ~ 4.0mm, 3.1 ~ 3.5mm, <3.0mm

Note: The PLBs size of the group I、II、III are respectively 3.6 ~ 4.0mm, 3.1 ~ 3.5mm, <3.0mm

2.4 铁皮石斛原球茎悬浮培养防褐变研究

2.4.1 悬浮培养的 PLBs 多酚氧化酶(PPO)活性的测定

将生长旺盛的铁皮石斛 PLBs 从固体培养基中转入 1/4MS 的液体培养中,振荡培养(50r/min),每 10d 更换一次培养液,按白宝璋^[12]的方法每月测定 PLBs 多酚氧化酶的活性,以固体培养为对照。探求 PLBs 褐变与 PPO 的关系。

多酚氧化酶的测定结果见表 4,从表中可以看出,在同一时期内,液体培养与固体对照培养的(PPO)的活性差别不大,特别是第三个月时,两者的 PPO 活性几乎一致,另外悬浮培养 3 个月后才褐化的 PLBs 的 PPO 活性与没有变褐的固体、液振荡培养的相近,PPO 活性并没有显著差异,因此铁皮石斛在液体振荡培养条件下的褐变不是由于激活 PPO 的缘故,可能是其他非酶因素引起的多聚褐色化合物的形成引起的。

表 4 两种培养方式铁皮石斛 PLBs 的 PPO 活性比较

Tab 4 The contrast of PPO vigour of PLB cultured in 2 kinds of medium

培养方式	时间(d)	PPO (10 ⁻³ mg VC/g·m)
悬浮培养	30	7.00
	60	6.00
	90	8.25
固体培养	30	10.30
	60	6.80
	90	8.25
已褐化的 PLBs		8.66

2.4.2 摇床转速对褐变的影响

将 PLBs 分别置于 100,80,50,30r/min 的恒温摇床上悬浮培养 3 个月。结果 90d 后,在 80r/min 和 100r/min 摇床上培养的 PLBs 开始褐化;而在后两种摇床上培养的 PLBs 仍呈黄绿色,活力强,没有发现褐化现象。这是因为低速振动有利于营养物质变得均匀,PLBs 生长良好;而在高速摇床上,PLBs 易于碎裂,释出氧化酶,易致褐化;在 50r/min 时,PLBs 未褐化、增殖最快、分散最好。

2.4.3 维生素 C(VC)对褐变的控制

在 1/4MS 培养基里分别加入 40,400,4000mg/L 的 VC(VC 单独过滤灭菌单独加入)振荡培养。结果,不加 VC 的对照培养的 PLBs,90d 后完全褐化;当 VC 的浓度为 40mg/L 时,PLBs 未褐化,呈鲜黄色或黄白色,同步性好、整齐度高;而当 VC 的浓度为 400,4000mg/L 时,PLBs 虽然都没有褐化,但同步性差、整齐度低,而且均有不同程度的分化,因此 40mg/L 的 VC 能较好地抑制褐化。

2.4.4 活性炭(activated charcoal,AC)对防褐化的影响

以 1/4MS 为基本培养基,分别添 0.5%,1%,1.5%,2% 的 AC。结果在 60d 前,各种情形下培养的 PLBs 大小都一样,只是添加 AC 的培养基里的原球茎表面黏附 AC 而呈黑色,但洗脱 AC 后,PLBs 颜色鲜黄色,与正常的一致。90d 后,AC 处理的 PLBs 都未褐化,说明 AC 吸附有毒代谢产物对防铁皮石斛 PLBs 褐化有一定的作用。但添加 2%,1.5% 的 AC,PLBs 很小呈颗粒状,颜色发白;添加 1% 活性炭,原球茎颗粒亦较小,颜色浓绿,PLBs 丛生在一起,不易分开;添加

0.5% AC 培养的 PLBs 颜色也变绿,但颜色比 1% AC 的要淡、原球茎也呈轻微丛生,且生长较慢。其原因可能是活性炭在吸收球茎释放的代谢物等有害物质的同时,将培养基中的一些生长调节剂等有益物质也吸收了,抑制了原球茎的分裂,增殖缓慢。

2.4.5 悬浮培养继代时间的比较选择

分别以 1,3,5,7,14,21,30d 继代,其余培养条件同上,每 10d 观察 PLBs 的生长状况。以不换培养液作对照。比较继代时间对 PLBs 增殖的影响。

结果表明,继代时间短(<14d)能有效地防止铁皮石斛 PLBs 的褐化。说明短期频繁继代可防止褐色物质的积累,继代时间太长(≥21d),一方面有害物质积累,另一方面营养物质消耗,水分散失,生长缓慢,容易褐化。但继代时间太短(<8d),PLB 增殖缓慢,这可能是因为刚继代的原球茎对环境有适应过程,因而最初几天原球茎生长率低,随后生长率上升,另一方面继代时间太短也费时费力,因此,我们以 10~15d 继代一次。

另外,PLBs 的质量对防褐化也是一个关键因素,PLBs 质量高、活力强代谢旺盛,可有效减轻褐化。

因此,铁皮石斛原球茎悬浮培养的适宜培养条件为:首先在添加 0.5mg/L ABA 的 1/4MS 培养基里预培养 30d,然后转入 1/4MS + 40mg/LVc 培养基, pH5.6,摇床转速为 50r/min,每 15d 继代一次,黑暗培养。

3 讨论

本研究比较了悬浮培养、液体静置、固体培养三种培养方式,结果悬浮培养虽不是鲜重增长最快的一种培养方式,但原球茎分散性、同步性明显优于后两者,且原球茎数量增殖最快,适合于人工种子繁殖体的来源。在悬浮液培养液中添加 ABA 预培养,原球茎干物质的积累明显增多,其抗逆性强^[13],便于原球茎低温贮藏,适合制作人工种子。至于 ABA 促成干物质增多的机理还不清楚,还有待进一步探索。

褐变是兰科组织培养中常见的问题,关于褐变的机制,目前大多认为是由于植物组织中 PPO 被激活所致。本实验表明,铁皮石斛悬浮培养的原球茎 PPO 的活性在褐变前及褐变后都没有大的变化,而且在同一时期内,悬浮培养的原球茎与已褐化的及固体培养原球茎的 PPO 的原球茎活性几乎相近,因此铁皮石斛液体悬浮培养的褐变不是由于 PPO 引起的,而可能是非酶褐变引起的。从李满飞等^[15,16]、黄民权^[17]、马雪梅等^[18]、王康正^[3]对铁皮石斛的成分分析来看,铁皮石斛水溶性多糖的含量高达 22.7%,它们都为 O-乙酰葡萄糖甘露聚糖,其末端都含有游离羰基(C=O),具有还原性;另一方面吴庆生等研究表明铁皮石斛内含有丰富的游离氨基酸^[19];而 Hew 等^[20]研究表明 *Dendrobium multie White* 在培养过程中,培养基中的蔗糖首先要通过胞外酶分解成葡萄糖和果糖才能被吸收,这样在振荡过程中特别是高速振荡时,水的活化能增加,促使还原性糖与氨基酸或胺化合物发生缩合反应,因此我们降低振荡速率可以缓解褐化作用。加入较高浓度 Vc 能有效地抑制铁皮石斛原球茎褐变,这与胡

小松等^[21]结果一致,但其机制尚不清楚。可能是 VC 作为还原剂抑制糖胺缩合反应。

我们建立铁皮石斛悬浮系,具有重要的意义:一方面解决了铁皮石斛人工种子繁殖体的问题;另一方面为采用生物反应器大规模培养铁皮石斛原球茎提供了依据。这样就有可能直接从悬浮培养的原球茎中提取药用成分,满足药材市场需求,提高生产效率,为铁皮石斛工业化和商业化生产提供了牢固的技术基础。

参考文献

[1] 叶秀麟. 黑节草未成熟种子的形态发育及其在离体培养时的表现[J]. 园艺学报,1988,10(3):285.

[2] 魏小勇,张铭,黄华荣. 铁皮石斛药用研究进展[J]. 中草药,2000,31(增刊):189.

[3] 王康正,高远文. 石斛属药用植物研究进展[J]. 中草药,1997,28(10):633.

[4] 胡忠,吉星和. 黑节草种苗的大量培养[J]. 植物杂志,1979,3:1.

[5] 何静波,李勇. 黑节草原胚体的繁殖[J]. 云南植物研究,1982,4(2):211.

[6] 张治国,刘骅,王黎. 铁皮石斛原球茎增殖的培养条件研究[J]. 中草药,1992,23(8):431.

[7] 郭顺星,曹文琴,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.

[8] 张铭,魏小勇,黄华荣. 铁皮石斛人工种子固形包埋系统的研究[J]. 园艺学报,2001,23(4):20.

[9] 张铭,魏小勇. 植物人工种子研究进展[J]. 植物学通报,2000,17(5):407.

[10] 张铭,朱峰,魏小勇,等. 铁皮石斛种胚萌发和原球茎质量控制[J]. 浙江大学学报(理学版),2001,27(1):92.

[11] 朱峰. 铁皮石斛人工种子研究. 杭州大学硕士学位论文[C]. 1997,1.

[12] 白宝璋. 植物生理学测试技术[M]. 北京:中国科学技术出版社,1993. 147.

[13] 王光远,蔡海南,刘培,等. 石斛离体培养中 ABA 对诱导花芽形成的影响[J]. 植物学,1995,37(5):374.

[14] Griesbach R J, Zimmerman R H. Tissue Culture as a Plant Production System for Horticulture Crops[J]. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1986, 147(4):343.

[15] Kishi F, Suminami Y, Kato H. Analysis of medium components used for orchid tissue culture[J]. Lindlegana, 1997, 12(3):158.

[16] 李满飞,徐国均,徐路珊. 中药石斛类多糖的含量测定[J]. 中草药,1990,21(10):10.

[17] 黄民权,黄步汉,蔡体育,等. 铁皮石斛多糖的提取、分离和分析. 中草药,1994, 25(3):128.

[18] 马雪梅,章萍,于苏平,等. 云南石仙桃及石斛总生物碱和多糖含量的分析[J]. 中草药,1997,28(9):561.

[19] 吴庆生,叮亚平,杨道麒,等. 安徽霍山三种石斛中游离氨基酸分析[J]. 安徽农业科学,1995,23(3):268.

[20] Hew C S, Clifford P E. Analysis of medium components used for orchid tissues[J]. Botanical Gazette, 1988,149(2):153.

[21] 胡小松,李积宏,刘文英,等. 马铃薯丝加工中的褐变因素及其控制[J]. 食品科学,1994,5:35.

收稿日期:2004-06-02