

# 天然有机物对铁皮石斛原球茎生长及有效成分的影响

肖小君<sup>1,2</sup>, 胡章薇<sup>1</sup>, 岳雨辰<sup>1</sup>, 何正兴<sup>1</sup>, 涂永燕<sup>1</sup>, 王 辉<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>内江师范学院生命科学学院; <sup>2</sup>四川省高等学校特色农业资源研究与利用重点实验室, 内江 641100

**摘要:**为铁皮石斛原料药的生产提供一种新方法。以 MS 为基本培养基, 探讨天然有机附加物与培养时间对铁皮石斛原球茎 (PLBs) 生长及主要药用成分石斛多糖和总生物碱的影响。研究表明: 在添加不同浓度土豆汁的培养基中, 以 250 g/L 效果最好, 其干物率和多糖含量均在 30 天时达最大值, 分别为 8.944% 和 17.921%, 增殖率在培养 50 天时最高, 为 1028.94%, 而总生物碱含量在 40 天时积累最多, 达 0.03161%。增殖率、多糖和总生物碱含量均显著高于添加激素的对照组。添加番茄汁的培养基中各指标变化与土豆汁的类似, 但原球茎长势差, 颜色泛黄, 增殖能力较添加土豆汁的差。综上, MS + 250 g/L 土豆汁 + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂条有利于铁皮石斛 PLBs 生长和有效成分的积累, 可考虑作为石斛多糖和石斛碱的生产来源, 对铁皮石斛主要药用成分的生产具有重要的实践意义。

**关键词:**天然有机物; 铁皮石斛; 原球茎; 多糖; 总生物碱

中图分类号: R282.2; Q943.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.11.012

## Effects of Nature Organics on Growth and Active Ingredients of Protocorm-like Bodies from *Dendrobium officinale*

XIAO Xiao-jun<sup>1,2</sup>, HU Zhang-wei<sup>1</sup>, YUE Yu-chen<sup>1</sup>, HE Zheng-xing<sup>1</sup>, TU Yong-yan<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science, Neijiang Normal University; <sup>2</sup>Key Laboratory of Colleges and Universities in Sichuan for Research and Utilization of Distinctive Agricultural Undertakings, Neijiang, 641100, China

**Abstract:** The aim of this paper was to provide a new way of the production of BPCs in *Dendrobium officinale*. Taking MS as minimal medium, adding nature organics, the effects on the growth of protocorm-like bodies (PLBs) from *Dendrobium officinale* and the major medicinal components including polysaccharide and total alkaloid were discussed in different incubation time. The results showed that the best concentration of potato juice was 250 g/L, the dry-weight percentage and polysaccharide contents both reached a maximum on the 30 days, which were 8.944% and 17.921% respectively, the highest proliferation rate was 1028.94% on the 50 days, while the total alkaloid contents were accumulated on the 40 days, the maximum was 0.03161%. The proliferation rate, polysaccharide and total alkaloid contents were significantly higher than the contrast with adding hormones. The variation of all indexes with adding tomato juice to the medium was similar to the potato juice, but the growth of PLBs was weak and the colour was yellow, the proliferative ability was poorer than adding potato juice. Taken together, the medium of MS + 250 g/L potato juice + 30 g/L sucrose + 7 g/L agar was beneficial for the growth of PLBs from *Dendrobium officinale* and accumulating active ingredients, which could be considered as a polysaccharide and alkaloid production source, and it had very important practical significances to produce major medical ingredients of PLBs from *Dendrobium officinale*.

**Key words:** nature organics; *Dendrobium officinale*; protocorm-like bodies; polysaccharide; total alkaloid

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 是我国传统名贵中药材, 具有润肺止咳, 滋阴清热、益胃生津、增强免疫力等功效<sup>[1]</sup>。目前铁皮石斛的

野生资源趋于枯竭, 利用组织培养技术进行人工标准化、规模化栽培已日趋成熟<sup>[2]</sup>。但铁皮石斛经过组织培养、炼苗、移栽以及三至五年的栽培后方能作为商品, 生长周期长, 后期栽培投入的设备及人工成本较高<sup>[3]</sup>。铁皮石斛 PLBs 具有生长周期短, 繁殖率高等特点, 目前对铁皮石斛原球茎的研究集中在高效再生体系的建立<sup>[4]</sup>, 改变培养条件<sup>[5]</sup>或添加外源激素以提高增殖率, 积累多糖和生物碱含量<sup>[6]</sup>等

收稿日期: 2018-02-08 接受日期: 2018-09-27

基金项目: 四川省科技厅项目 (2015JY0242); 四川省教育厅自然科学研究项目 (16ZB0304); 四川省教育厅科研创新团队 (14TD0025); 内江师范学院校级科研项目 (T16022)

\* 通信作者 E-mail: whscnj@126.com

方面。前人研究表明,原球茎的药理作用与干燥茎段相似<sup>[7]</sup>,可为石斛多糖的生产提供新的材料来源,因此工业化生产铁皮石斛 PLBs 及其有效成分有着巨大的市场前景<sup>[8]</sup>。本试验以铁皮石斛 T4 的原球茎为试材,在培养基中添加不同浓度的土豆汁和番茄汁两种天然有机物,分别测定 30、40、50 天铁皮石斛 PLBs 的干物率、增殖率、多糖和总生物碱的含量,以期利用铁皮石斛 PLBs 作为药用材料生产多糖和生物碱等主要药用成分提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

铁皮石斛 T4 无性系:其野生种群采自于云南,由内江师范学院生命科学学院组培室生产及驯化栽培,取其蒴果,常规表面消毒后接种于 MS + 土豆汁 150 g/L 的培养基中,原球茎继代增殖培养后第 6 代作为试材。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养基配方及接种方法

以市面购买的新鲜土豆和番茄作为天然有机物附加物,切块,煮沸,纱布过滤,取汁液,设置土豆汁浓度梯度为 100、150、200、250、300 g/L,番茄汁浓度梯度为 50、200、350、500、650 g/L,分别添加到 MS + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂条的培养基中,培养条件为:温度为 23 ~ 25 °C,光照时间为 14 h/d,光照强度为 2000 Lx, pH 为 5.8 ~ 6.0。以 MS + 0.5 mg/L KT + 0.05 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂条作为对照组。

取直径大小约 1.0 cm 长势一致的原球茎,接种于各培养基后,每瓶接种 10 块,每处理接种 30 瓶,分别于接种后第 30、40、50 天进行以下各指标测定。

#### 1.2.2 干物率的测定

称取 30 g 铁皮石斛 PLBs 新鲜样品 (M) 于 105 °C 杀青 30 min, 50 °C 烘干至恒质量,准确称取铁皮石斛样品干质量 (m)。

$$\text{干物率} = m/M \times 100\%$$

#### 1.2.3 增殖率的测定

接种前称取培养瓶的重量 ( $m_1$ ),接种后再次称重 ( $m_2$ ),可计算出原球茎的初重  $M_1$ ,于培养室中培养 30、40、50 天后小心取出原球茎,称取原球茎重量 ( $M_2$ )。

$$\text{增殖率} = (M_2 - M_1) / M_1 \times 100\%$$

#### 1.2.4 主要药用成分含量的测定

多糖含量的测定采用苯酚硫酸比色法<sup>[9]</sup>;总生物碱含量测定参考李亚芳等<sup>[10]</sup>的方法。

### 1.3 数据处理

采用 Excel 2003 对收集的数据进行处理,用 SPSS 17.0 进行方差分析,用 Duncan 新复极差法检验差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度天然有机物对铁皮石斛 PLBs 干物率的影响

添加不同浓度的天然有机物和培养时间对铁皮石斛 PLBs 干物率存在显著影响 (表 1)。

从整体上看,添加土豆汁的培养基中干物率较对照显著减少,且随培养时间的增加逐渐降低,以培养 30 天时含量最高,其中土豆汁含量为 250 g/L 培养 30 天时干物率为 8.944%,较对照减少 25.24%。

而添加番茄汁的培养基中干物率随培养时间的增加呈先上升后下降的趋势,且在培养 40 ~ 50 天时干物率较对照显著增加,其中培养 40 天番茄汁含量为 50 g/L 和 650 g/L 时,干物率分别为 14.024% 和 12.127%,分别较对照增加 81.21% 和 56.70%,可能是由于这两个过低和过高的浓度使原球茎生长受到限制,原球茎未大量增殖导致的结果。

表 1 不同浓度有机物对铁皮石斛 PLBs 干物率的影响

Table 1 Effects of different concentrations organics on the dry-weight percentages of PLBs from *D. officinale*

有机物种类 Type of organics	浓度 Concentration (g/L)	干物率 The dry-weight percentage (%)		
		30 d	40 d	50 d
土豆汁 Potato juice	CK	11.963 ± 0.14a	7.739 ± 0.471b	6.461 ± 0.274a
	100	8.563 ± 0.427bc	6.874 ± 0.356cd	5.866 ± 0.397b
	150	8.527 ± 0.381bc	7.512 ± 0.393bc	6.182 ± 0.328ab
	200	7.710 ± 0.400c	7.630 ± 0.318b	4.794 ± 0.229c

续表 1 (Continued Tab. 1)

有机物种类 Type of organics	浓度 Concentration (g/L)	干物率 Dry-weight percentage (%)		
		30 d	40 d	50 d
番茄汁 Tomato juice	250	8.944 ± 0.333b	8.704 ± 0.375a	6.155 ± 0.142ab
	300	8.885 ± 0.430b	6.708 ± 0.486d	3.347 ± 0.324d
	CK	11.963 ± 0.14a	7.739 ± 0.471e	6.461 ± 0.274e
	50	13.888 ± 0.298a	14.024 ± 0.260a	9.696 ± 0.415b
	200	10.807 ± 0.492c	11.071 ± 0.355c	7.945 ± 0.201d
	350	10.390 ± 0.410c	11.326 ± 0.434c	8.777 ± 0.220e
	500	10.363 ± 0.438c	10.543 ± 0.403d	8.542 ± 0.639cd
	650	11.600 ± 0.356b	12.127 ± 0.342b	10.497 ± 0.222a

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

Note: Different letters in the same column meant significant difference among treatments at 0.05 level, the same as following.

## 2.2 不同浓度天然有机物对铁皮石斛 PLBs 增殖率的影响

整体上看,随培养时间延长,添加土豆汁和番茄汁的培养基中铁皮石斛 PLBs 增殖率均逐渐增加(表 2),各处理组在 50 天时均达到最大值,且土豆汁较番茄汁促进铁皮石斛 PLBs 增殖的效果更好,表现为原球茎饱满,颜色浓绿,长势旺盛。添加不同浓度土豆汁的培养基中原球茎增殖率均显著高于对

照,其中以培养 50 天时浓度为 250 g/L 的效果最好,达 1028.94%,超过对照 79.06%,说明土豆汁中的天然营养成分和生理活性物质有利于细胞增殖。而添加番茄汁的培养基中原球茎增殖率均显著低于对照,其原因可能是番茄中的某些元素抑制了铁皮石斛 PLBs 的生长,原球茎纤小,颜色泛黄,部分出现芽化现象。

表 2 不同浓度有机物对铁皮石斛 PLBs 增殖率的影响

Table 2 Effects of different concentrations organics on the proliferation rates of PLBs from *D. officinale*

有机物种类 Type of organics	浓度 Concentration (g/L)	增殖率 Proliferation rate (%)		
		30 d	40 d	50 d
土豆汁 Potato juice	CK	245.37 ± 1.97b	584.19 ± 4.24b	574.64 ± 3.61b
	100	564.65 ± 6.41a	803.71 ± 2.94a	780.92 ± 4.32ab
	150	587.78 ± 4.04a	585.85 ± 2.87b	828.04 ± 2.06ab
	200	448.38 ± 5.58ab	780.52 ± 1.04a	978.02 ± 2.09a
	250	348.88 ± 1.46ab	813.21 ± 8.08a	1028.94 ± 7.99a
	300	407.61 ± 6.88ab	694.48 ± 6.26ab	992.16 ± 3.61a
番茄汁 Tomato juice	CK	245.37 ± 1.97a	584.19 ± 4.24a	574.64 ± 3.61a
	50	75.07 ± 0.40c	131.80 ± 4.70d	209.41 ± 1.41c
	200	122.49 ± 3.29b	147.96 ± 2.21cd	497.74 ± 3.37ab
	350	138.33 ± 3.69b	224.36 ± 1.37bc	597.72 ± 5.39a
	500	147.28 ± 4.31b	275.71 ± 2.17b	462.12 ± 4.27ab
	650	114.19 ± 4.79b	164.93 ± 3.82bcd	195.33 ± 1.59c

## 2.3 不同浓度天然有机物对铁皮石斛 PLBs 多糖积累的影响

多糖是铁皮石斛的主要成分,与其药理活性有

着密切的联系,其含量的高低是判断铁皮石斛质量的主要依据<sup>[11]</sup>。从表 3 可知:随培养时间增加,各处理下原球茎多糖含量总体上呈下降趋势,在 30 天

时达到最大值,且土豆汁较番茄汁培养基中多糖含量更高。其中以添加土豆汁 250 g/L 培养 30 天时多糖含量最高,达 17.921%,较对照增加 29.38%。

而添加番茄汁的培养基中,浓度为 50 g/L 培养 30 天时原球茎多糖含量最高,达到了 15.618%,显著高于对照及其他处理组。

表 3 不同浓度有机物对铁皮石斛 PLBs 多糖含量的影响

Table 3 Effects of different concentrations organics on the polysaccharide contents of PLBs from *D. officinale*

有机物种类 Type of organics	浓度 Concentration (g/L)	多糖含量 Polysaccharide content (%)		
		30 d	40 d	50 d
土豆汁 Potato juice	CK	13.851 ± 0.45c	9.082 ± 0.65c	8.681 ± 0.11a
	100	15.856 ± 0.29b	10.389 ± 0.59b	6.630 ± 0.19c
	150	12.766 ± 0.49d	6.616 ± 0.18d	8.116 ± 0.72a
	200	15.797 ± 0.40b	5.977 ± 0.35d	7.878 ± 0.89b
	250	17.921 ± 0.50a	12.543 ± 0.69a	8.978 ± 0.14a
番茄汁 Tomato juice	300	14.460 ± 0.49c	10.315 ± 0.50b	6.318 ± 0.64c
	CK	13.851 ± 0.45b	9.082 ± 0.65b	8.681 ± 0.11a
	50	15.618 ± 0.43a	6.898 ± 0.11d	5.754 ± 0.41b
	200	13.613 ± 0.44bc	9.795 ± 0.30a	6.200 ± 0.20b
	350	14.296 ± 0.76b	5.605 ± 0.22e	6.348 ± 0.19b
	500	13.078 ± 0.45cd	9.512 ± 0.56ab	6.318 ± 0.18b
	650	12.766 ± 0.70d	8.161 ± 0.16c	6.467 ± 0.49b

## 2.4 不同浓度天然有机物对铁皮石斛 PLBs 总生物碱积累的影响

生物碱为石斛的主要有效成分之一,具有降血压、抗肿瘤、镇静镇痛及抗菌抗疟等多种生理活性<sup>[12]</sup>。在添加不同浓度的天然有机物培养基中,铁皮石斛 PLBs 总生物碱含量随培养时间的增加先升

高后下降(表 4),培养 40 天时总生物碱含量较其他两个时期更高。其中 40 天时土豆汁浓度为 250 g/L 的培养基中原球茎含量最高,总生物碱含量为 0.03161%,超出对照组 30.94%。而番茄汁的浓度为 350 g/L 时总生物碱含量最高达 0.02945%,比对照高 22.00%。

表 4 不同浓度有机物对铁皮石斛 PLBs 总生物碱含量的影响

Table 4 Effects of different concentrations organics on the total alkaloid contents of PLBs from *D. officinale*

有机物种类 Type of organics	浓度 Concentration (g/L)	总生物碱含量 Total alkaloid content (%)		
		30 d	40 d	50 d
土豆汁 Potato juice	CK	0.02072 ± 0.00025e	0.02414 ± 0.00013e	0.02465 ± 0.00018c
	100	0.02729 ± 0.00018b	0.03022 ± 0.00010d	0.02840 ± 0.00013ab
	150	0.02993 ± 0.00022a	0.03080 ± 0.00006b	0.02987 ± 0.00012a
	200	0.02725 ± 0.00029b	0.03029 ± 0.00002cd	0.02674 ± 0.00034b
	250	0.02593 ± 0.00044c	0.03161 ± 0.00012a	0.02421 ± 0.00047c
番茄汁 Tomato juice	300	0.02320 ± 0.00029d	0.03048 ± 0.00025e	0.02939 ± 0.00029a
	CK	0.02072 ± 0.00025c	0.02414 ± 0.00013d	0.02465 ± 0.00018c
	50	0.01976 ± 0.00014e	0.02869 ± 0.00013b	0.02355 ± 0.00020d
	200	0.02025 ± 0.00004d	0.02863 ± 0.00013b	0.02486 ± 0.00003b
	350	0.02239 ± 0.00011a	0.02945 ± 0.00014a	0.02210 ± 0.00005e
	500	0.02185 ± 0.00005b	0.02668 ± 0.00010c	0.02510 ± 0.00036b
	650	0.02053 ± 0.00012cd	0.02668 ± 0.00010c	0.02578 ± 0.00021a

### 3 结论

为避免高浓度外源激素的使用导致原球茎在增殖中发生变异,前人在洋兰类组织培养中对天然有机物的选择与应用方面做了大量的研究<sup>[13]</sup>。本实验结果表明:不同浓度的天然有机物和培养时间对铁皮石斛 PLBs 干物率、增殖率、多糖和总生物碱含量存在显著影响,其中土豆汁浓度为 250 g/L 时,铁皮石斛 PLBs 的增殖率、多糖和总生物碱含量均显著高于添加外源激素的对照组,总体效果优于添加番茄汁的培养。

组织培养中常用的天然有机添加物如椰乳、番茄汁、苹果汁、香蕉汁和马铃薯提取物等,其有效成分为氨基酸、酶、蛋白质等<sup>[14]</sup>,对石斛试管苗生长<sup>[15]</sup>、花芽诱导<sup>[16]</sup>、原球茎增殖<sup>[17]</sup>有明显的促进作用。本研究结果表明:随着铁皮石斛 PLBs 培养时间的延长,干物率逐渐减少,而增殖率逐渐增加,研究发现各浓度土豆汁培养基中 PLBs 增殖率均显著高于对照,且 PLBs 长势旺盛,说明土豆汁可以代替外源激素进行铁皮石斛 PLBs 的增殖培养。而番茄汁的效果较对照更差,PLBs 长势弱,颜色泛黄,不适用于铁皮石斛 PLBs 的生长。

铁皮石斛 PLBs 是否可以作为药源进行开发利用,主要取决于其有效成分的含量和药理作用。本实验结果表明:适宜浓度的天然有机物与培养时间有利于 PLBs 多糖与总生物碱的积累。其中多糖含量以 250 g/L 土豆汁培养 30 天时最高,达 17.921%,这与徐步青等<sup>[5]</sup>的研究结果相似,与张本厚等<sup>[8]</sup>的研究结果 PLBs 多糖含量为 11.53% 相比更高。而总生物碱含量以 250 g/L 土豆汁培养 40 天效果最明显,为 0.031 61%,在传统栽培的石斛药材含量 0.019% ~ 0.043%<sup>[18]</sup> 范围之间,就总生物碱这一有效成分来说,利用本研究方法可作为石斛碱的生产来源。本实验结果中多糖含量低于《中华人民共和国药典》的规定<sup>[19]</sup>和人工栽培的铁皮石斛药材<sup>[20]</sup>,但因其繁殖率高、生长周期短、生产成本低等优点,仍可以进行选择性的开发利用与进一步的研究。

本研究无添加任何化学激素,生态环保,且方法简单,生产成本较低,另外还可以考虑作为石斛多糖和石斛碱的生产来源,从中提取有效药用成分,具有很好的开发应用前景。

### 参考文献

- 1 Liu XF, Zhu J, Ge SY, et al. Orally administered *Dendrobium officinale* and its polysaccharides enhance immune functions in BALB/c mice [J]. *Nat Prod Comm*, 2011, 6: 867-870.
- 2 Si JP(斯金平), Wang Q(王琦), Liu ZJ(刘仲健), et al. Breakthrough in key science and technologies in *Dendrobium catenatum* industry [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 42: 2223-2227.
- 3 Wang Q(王琦), Liu JJ(刘京晶), Si JP(斯金平), et al. Effects of sampling time on polysaccharides of *Dendrobium catenatum* under temperature-controlled condition [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 42: 3891-3894.
- 4 Ren HH(任海虹), Wang JX(王景雪), Nie J(聂菁). Protocorm proliferation and regeneration of *Dendrobium officinale* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2017, 48: 4057-4061.
- 5 Xu BQ(徐步青), Cui YY(崔永一), Guo C(郭岑), et al. Dynamic variation of biomass and content of polysaccharide and alkaloid in protocorm like bodies from *Dendrobium officinale* at different light intensities and incubation time [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2012, 43: 355-359.
- 6 Li QZ(李巧自), Gao SP(高素萍), Zhang KY(张科燕), et al. Effects of exogenous nitric oxide on growth and polysaccharide accumulation of protocorm-like bodies from *Dendrobium officinale* [J]. *Acta Agric Zhejiangensis*(浙江农业学报), 2016, 28: 595-600.
- 7 Gao JP(高建平), Jin RM(金若敏), Wu YP(吴耀平), et al. Comparative study of tissue cultured dendrobium protocorm with natural *Dendrobium candidum* on immunological function [J]. *Chin Med Mat*(中药材), 2002, 25: 487-489.
- 8 Zhang BH(张本厚), Hu YH(胡燕花), Jin LL(金磊磊), et al. Contents compare of medicine and nutrition of tissue culture plantlet of *Dendrobium officinale* [J]. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), 2015, 43: 324-327.
- 9 Li CX(李彩霞), Zhu JP(竹剑平). Comparison study of polysaccharides content in medicinal dendrobium herb of different collection period [J]. *J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2010, 6: 1138-1139.
- 10 Li YF(李亚芳), Zhang XH(张晓华), Sun GM(孙国明). Determination of alkaloids and polysaccharide in herba dendrobii [J]. *Chin Pharm Aff*(中国药事), 2002, 16: 426-428.
- 11 Nie SP(聂少平), Cai HL(蔡海兰). Research progress in bioactive components and functions of *Dendrobium officinale* [J]. *Food Sci*(食品科学), 2012, 33: 356-361.
- 12 Yuan L(原琳), Li J(李娇), Rong YH(荣永海), et al. Study on combined extraction of alkaloids and polysaccharides from *Dendrobium officinale* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27: 179-184.