

不同光照强度和培养时间下铁皮石斛类原球茎生物量、多糖和生物碱的动态变化

徐步青, 崔永一, 郭 岑, 夏国华*

浙江农林大学 林学基础省级实验教学示范中心, 浙江 临安 311300

摘要: 目的 探讨不同光照强度下铁皮石斛类原球茎 (PLBs) 生物量、主要药用成分多糖和生物碱的动态变化规律。方法 以 MS 为基本培养基, 采用光照强度单因素试验设计, 烘干法测定生物量, 苯酚-硫酸法测定多糖量, 酸性染料比色法测定生物碱量, 数据采用 SPSS 16.0 软件包分析。结果 铁皮石斛 PLBs 生物量在光照强度 $\geq 2\ 000$ lx 下培养 40~50 d 均较高, 生产上需要 PLBs 维持旺盛的分裂, 获得最高生物量的培养条件为光照强度 2 000 lx 条件下培养 40 d, 生物量达到 0.74 g; 多糖量以光照强度 2 000 lx 下培养 30 d 最高, 达到 16.88%; 生物碱量以光照强度 500 lx 下培养 30 d 最佳, 达到 0.028 0%。结论 不同的光照强度和培养时间对铁皮石斛 PLBs 的生长、多糖和生物碱的变化有显著影响, 适宜的光照强度和培养时间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: 铁皮石斛; 类原球茎; 光照强度; 生物量; 多糖; 生物碱; 动态变化

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0355-05

Dynamic variation of biomass and content of polysaccharide and alkaloid in protocorm like bodies from *Dendrobium officinale* at different light intensities and incubation time

XU Bu-qing, CUI Yong-yi, GUO Cen, XIA Guo-hua

Basic Experiment Teaching Center of Forestry, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

Abstract: **Objective** To explore the dynamic variation of biomass and content of polysaccharide and alkaloid in protocorm-like bodies (PLBs) from *Dendrobium officinale* at different light intensities and incubation time. **Methods** Taking MS as medium, with light intensity single-factor test design, the biomass was determined by drying method, polysaccharide by phenol-sulfuric acid method, alkaloid content by acid dye colorimetry, and the data used SPSS 16.0 software analysis. **Results** The results indicated that the biomass content of PLBs from *D. officinale* was higher under the light intensity $\geq 2\ 000$ lx for 40—50 d incubation. PLBs from *D. officinale* needed to maintain the most effective in strong production split under the light intensity of 2 000 lx for 40 d incubation and the maximum biomass was 0.74 g. In this condition, PLBs could keep the strong split, the maximum polysaccharide content was the highest 16.88% under light intensity 2 000 lx for 30 d incubation. Light intensity at 500 lx for 30 d incubation was beneficial to alkaloid content, the maximum was 0.028 0%. **Conclusion** Different light intensities and incubation time have significant influences on the growth of PLBs from *D. officinale*, and the accumulation of polysaccharide and alkaloids. Suitable light intensity and incubation time have very important practical significances to produce medical ingredients of PLBs from *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; protocorm-like bodies (PLBs); light intensity; biomass; polysaccharide; alkaloid; dynamic variation

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是我国传统名贵中药, 其主要药用成分是多糖和生物碱, 具有滋阴清热、益胃生津、润肺止咳等功效, 能够提高机体免疫力、降低血糖、抗肿瘤、与大豆异黄酮提取物协同抗氧化作用等。随着铁

皮石斛需求的增加, 野生石斛已被大量采挖, 致使我国的野生石斛资源遭到严重破坏, 野生石斛属植物资源已近枯竭, 研究认为铁皮石斛类原球茎 (protocorm-like bodies, PLBs) 与铁皮石斛的药效相近^[1-4], 因此, 本实验以铁皮石斛类原球茎为材

收稿日期: 2011-07-04

基金项目: 浙江省“新苗人才”计划 (2010R412004)

作者简介: 徐步青 (1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源研究与开发。E-mail: xubuqing0228@126.com

*通讯作者 夏国华 E-mail: zjfc_ghxia@126.com

料,考察不同光照强度、不同培养时间对铁皮石斛 PLBs 生物量和主要有效成分多糖、生物碱的积累的影响,探索最有利于 PLBs 生长和有效成分积累的光照强度及培养时间,为通过生物反应器培养实现石斛多糖和生物碱的产业化生产奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

所用材料经浙江农林大学楼炉焕教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 的类原球茎。

1.2 方法

以 MS 为基本培养基,附加 NAA 1.0 mg/L,蔗糖 30 g/L,椰乳 5%, pH 值 5.6,在 120~121 °C 高温高压灭菌锅内持续灭菌 20 min,培养温度 (25±2) °C。每个处理称量 30 瓶培养基,每瓶接入质量约 2.0 g 的铁皮石斛 PLBs 后称量,对接入净质量进行方差分析,要求接入 PLBs 净质量不存在显著差异。对接入的 PLBs 在不同光照条件下 [0 (黑暗)、500、1 000、2 000、3 000、4 000 lx],随培养不同时间 (10、20、30、40、50 d) 后检测 PLBs 干质量、多糖和生物碱,重复 3 次。

取出不同光照培养条件不同培养时间下的 PLBs,洗净培养基后在烘箱中 90 °C 烘 30 min,60 °C 烘干至恒定质量。多糖量测定采用苯酚-硫酸法^[5],标准曲线方程为 $Y=1.2803X+0.0099$, $r=0.9989$;生物碱量测定采用酸性染料比色法^[6],标准曲线方程为 $Y=0.8255X-0.05$, $r=0.9873$ 。

1.3 数据处理

SPSS 16.0 统计软件进行生物量、多糖和生物碱

的方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛 PLBs 生长情况和生物量动态变化

不同光照强度条件下,铁皮石斛 PLBs 生物量随着培养时间的延长而增加。培养 10 d,均进入快速生长期。弱光 (0~1 000 lx) 条件下,生物量快速增长长期维持的时间较短,培养 30~40 d 后,生物量增加没有显著差异。强光 (2 000~4 000 lx) 条件下,生物量增加显著较弱光快,快速增长长期维持的时间较长,培养 40~50 d 后,生物量基本维持在较高的水平,其中以光照强度 4 000 lx 下培养 50 d 生物量最大,达到 0.86 g。

PLBs 的分化随着培养时间的延长、光照强度的增加明显加剧。弱光条件下培养 40 d 开始有少量分化,其中 1 000 lx 光照条件下未见分化;强光条件下随着光照强度的增加,分化程度加剧,培养 50 d 分化率明显较 40 d 高,分化趋势与 40 d 培养一致。

生产上获得较高的 PLBs 生物量需要维持其良好的增殖能力,同时出于节约成本的考虑,在光照强度的选择上以光能消耗少为优,因此以光照强度 2 000 lx 下培养 40 d 对获得铁皮石斛 PLBs 干物质最为有利,达到 0.74 g。结果见表 1。

2.2 铁皮石斛 PLBs 中多糖量的动态变化

不同光照强度条件下,铁皮石斛 PLBs 中多糖量随培养时间的增加先升高后下降。光照强度在 0~2 000 lx,培养 30 d,多糖量均达最大值;其中,弱光 (0~1 000 lx) 条件下,10~20 d,多糖量增长较为缓慢;强光 (2 000~4 000 lx) 条件下,多糖则快速增长,以 4 000 lx 光照强度下的增长量最大,并在 20 d 达到最高峰,较其他光照处理提前。在 20~

表 1 不同光照强度和培养时间下铁皮石斛 PLBs 生物量的动态变化

Table 1 Dynamic variation of PLBs biomass from *D. officinale* at different light intensities and incubation time

光照强度 / lx	PLBs 生物量 / g				
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
0	0.27±0.0001cA	0.30±0.00052 cC	0.43±0.014 bC	0.50±0.00091 abC	0.58±0.0085 aB
500	0.20±0.000035 cB	0.38±0.00033 bBC	0.54±0.0083 aAB	0.58±0.0032 aC	0.67±0.049 aAB
1 000	0.21±0.00019 cB	0.35±0.00017 bC	0.56±0.00065 aAB	0.59±0.025 aBC	0.65±0.0011 aB
2 000	0.27±0.000039 dA	0.45±0.00079 cAB	0.53±0.00046 bB	0.74±0.020 aAB	0.77±0.049 aAB
3 000	0.28±0.00034 dA	0.52±0.00064 cA	0.55±0.0076 cAB	0.66±0.00029 bB	0.73±0.0063 aAB
4 000	0.28±0.000097 dA	0.41±0.00042 cB	0.61±0.00023 bA	0.75±0.011 aA	0.86±0.032 aA

小写字母表示以培养时间为变量的显著性差异,大写字母表示以光照强度为变量的显著性差异,字母相同为无显著差异,字母不同为显著差异 ($P<0.05$),下同

Lower-case letters mean the significant difference at different incubation time, capital letters mean the significant difference under different light intensities, same letters show no significant difference, while different letters show significant difference ($P<0.05$), respectively, same as below

30 d, 500 lx 和 2 000 lx 光照条件下的多糖增量明显高于其余处理, 其中 2 000 lx 光照下的增量几乎翻倍, 增长达 8.19%。培养 30 d 后, 除了 3 000 lx 处理下的多糖略有升高外, 其余处理均出现不同程度的下降。因此, 光照强度为 2 000 lx 的条件下培养 30 d 最有利于高品质铁皮石斛 PLBs 多糖的生产。结果见表 2。

2.3 铁皮石斛 PLBs 中生物碱量动态变化

铁皮石斛 PLBs 中生物碱量的变化与多糖变化类似, 在不同光照培养条件下, 生物碱量随培养时

间的延长先增加后降低。除暗培养外, 其余光照处理均在 30 d 达到生物碱量的最大值, 其中暗培养是在 20 d 即达最高值。在培养 10~20 d, 大部分处理的生物碱量增量较为缓慢, 培养 20~30 d, 是生物碱量的快速增长期, 但是 3 000 lx 光照条件下的生物碱积累量较其余处理低。30 d 后, 生物碱量总体呈下降趋势。因此, 光照强度为 2 000 lx 的条件下培养 30 d 最有利于高品质铁皮石斛 PLBs 生物碱的积累。结果见表 3。

表 2 不同光照强度和培养时间下铁皮石斛 PLBs 多糖量的动态变化

Table 2 Dynamic variation of polysaccharide content in PLBs from *D. officinale* at different light intensities and incubation time

光照强度 / lx	PLBs 多糖量 / %				
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
0	6.06 cC	8.05 bC	10.29 aC	7.99 bD	10.07 aB
500	6.90 dB	8.18 cC	14.58 aB	12.91 bAB	8.69 cC
1 000	8.24 cA	10.80 bB	13.81 aB	9.97 bC	10.42 bB
2 000	4.98 dD	8.69 bcC	16.88 aA	9.46 bC	9.84 bB
3 000	6.38 dC	10.74 cB	13.04 abB	13.87 aA	12.02 bA
4 000	6.96 dB	14.77 aA	14.39 aB	12.29 bB	10.80 cB

表 3 不同光照强度和培养时间下铁皮石斛 PLBs 生物碱量的动态变化

Table 3 Dynamic variation of alkaloid content in PLBs from *D. officinale* at different light intensities and incubation time

光照强度 / lx	PLBs 生物碱量 / %				
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
0	0.010 3 cB	0.017 6 aB	0.015 1 bD	0.009 8 dD	0.014 5 bB
500	0.012 7 dA	0.015 0 cC	0.028 0 aA	0.012 7 dC	0.020 0 bA
1 000	0.010 8 eAB	0.015 8 cBC	0.023 5 aB	0.019 7 bA	0.013 4 dB
2 000	0.008 0 dC	0.015 9 cBC	0.026 4 aAB	0.009 4 dD	0.019 0 bA
3 000	0.011 4 dAB	0.019 8 bA	0.020 5 aBC	0.014 5 cB	0.010 4 dC
4 000	0.011 2 cAB	0.011 6 cD	0.019 5 aC	0.013 2 bBC	0.004 0 dD

2.4 铁皮石斛 PLBs 中多糖和生物碱的产量

以铁皮石斛多糖和生物碱的产量 (多糖产量 = 生物量 × 多糖质量分数; 生物碱产量 = 生物量 × 生物碱质量分数) 为评价指标, 获得生物碱最佳的培养条件为 500 lx、30 d; 多糖达高峰值的适宜培养时间为 30 d 和光照强度是为 2 000 lx; 多糖总量在培养 30~50 d, 光强为 2 000~4 000 lx 时均较理想, 结果见表 4、5。

3 讨论

铁皮石斛具有极高的药用和保健价值, 其主要药用成分有多糖、生物碱、萜类化合物、氨基酸等, 具有增强机体免疫力及抗衰老、抗肿瘤、降血糖等

药理作用。临床应用上具有滋阴润肺、养胃生津、清热明目、补五脏虚劳的功效, 在恶性肿瘤的辅助治疗、慢性胃炎、糖尿病、慢性咽炎、久病体虚免疫功能低下、眼科保健等方面都被广泛应用。由于遭到过度采挖, 野生资源几近濒危。为了既保护铁皮石斛野生种质资源, 又有效利用和开发这一珍稀的名贵中药材, 可利用植物细胞培养技术获得铁皮石斛的有效成分。该技术在霍山石斛^[6]、半夏^[7]等多种药用植物中成功应用, 且获得了极好的社会效益, 已成为药物生产的重要途径之一。同时, 黄民权^[8]、高建平^[9]等研究表明铁皮石斛 PLBs 具有与原材料相似的作用, 且铁皮石斛 PLBs 还具有增

表 4 不同光照强度和培养时间下铁皮石斛 PLBs 多糖产量

Table 4 Polysaccharide yield in PLBs from *D. officinale* at different light intensities and incubation time

光照强度/lx	PLBs 多糖产量 / mg				
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
0	16.4 dB	24.2 cD	44.2 bD	40.0 bD	63.0 aC
500	13.8 eC	31.1 dC	81.6 aAB	74.9 bB	58.2 cD
1 000	17.3 eB	37.8 dB	78.7 aB	58.8 cC	67.7 bC
2 000	13.4 eC	39.1 dB	89.5 aA	70.0 cB	75.8 bB
3 000	17.9 dAB	55.8 cA	71.7 bC	91.5 aA	87.7 aA
4 000	19.5 cA	60.6 bA	87.8 aA	92.2 aA	92.9 aA

表 5 不同光照强度和培养时间下铁皮石斛 PLBs 生物碱产量

Table 5 Alkaloid yield in PLBs from *D. officinale* at different light intensities and incubation time

光照强度/lx	PLBs 生物碱产量 / μg				
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
0	27.9 eB	52.8 cC	64.9 bD	49.2 dD	84.1 aB
500	25.4 eB	57.2 dC	151.2 aA	73.6 cC	134.0 bA
1 000	22.6 eC	55.2 dC	132.0 aB	116.2 bA	87.1 cB
2 000	21.6 dC	71.6 cB	140.0 aAB	70.0 cC	146.3 bA
3 000	31.8 dA	103.0 bA	112.8 aC	95.7 bB	75.9 cC
4 000	31.2 dA	47.6 cD	119.0 aC	99.0 bB	34.4 dD

殖快、生长周期短等优点,因此可通过从组织培养的铁皮石斛 PLBs 中提取有效成分,来部分取代铁皮石斛植株作为药源。

影响铁皮石斛生长、多糖和生物碱积累的因素很多,本实验主要针对光照强度和培养时间展开研究。光照强度是影响植物生长的一个重要因素。在暗培养条件下,由于缺少光照,类原球茎出现黄化现象,不利于光合作用和生物量的增加,同时,消耗类原球茎内部的有机成分,从而导致干物质的增加缓慢;而过高的光照强度会对其产生光抑制,光合速率为负值,没有光合产物积累;因此,只有适宜的光照强度才有利于类原球茎生长,能够提高类原球茎的光合速率,从而提高类原球茎的光能利用率和同化物的积累^[10-11]。培养时间对类原球茎的生长和分化也有极大影响,研究发现培养 40 d, PLBs 有少量开始分化;50 d 时, PLBs 大量分化。分化情况的出现可能与培养基中外源激素的消耗,导致 PLBs 中内部激素平衡发生变化,直接或间接刺激了植物核酸代谢、诱导了相关基因表达,表现为翻译水平上的蛋白质大量合成和形态水平上的植物体生长加快。

不同产地、不同栽培基质、不同采收期、不同部位、不同种源等对石斛多糖和生物碱量都有影响,作为外部因素,以上因子最终还是通过光合速率来调控多糖、生物碱等有效成分的合成,因此,有必要开展光照强度对 PLBs 中多糖和生物碱量影响的研究。本实验研究结果表明,多糖和生物碱量的最高峰值都出现在 30 d,光照强度分别为 2 000 lx、500 lx,与干质量的最大值并不同步。30 d 之后随着生物量的继续增加,多糖和生物碱量开始下降,说明有效成分的积累与 PLBs 生长和分化之间存在着相互平衡的关系,以多糖和生物碱的消耗来进一步促进 PLBs 的生长和分化。这与以往对金钗石斛不同采收期生物碱和多糖质量分数的变化研究结果^[12-14]相似。

参考文献

- [1] 詹忠根,徐程,张铭.兰科植物原球茎(类原球茎)的形态建成[J].种子,2002,125(5):36-37.
- [2] 高建平,金若敏,吴耀平,等.铁皮石斛原球茎与原药材免疫调节作用的比较研究[J].中药材,2002,25(7):487-489.
- [3] 卢文芸,张宇斌,罗迎春,等.环草石斛愈伤组织和拟

- 原球茎中生物碱和多糖含量的研究 [J]. 种子, 2010, 29(3): 33-35.
- [4] 苑 鹤, 林二培, 朱 波, 等. 铁皮石斛人工栽培居群的遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 566-569.
- [5] 李满飞, 徐国钧, 平田义正, 等. 中药石斛类多糖的含量测定 [J]. 中草药, 1990, 21(10): 442.
- [6] 李亚芳, 张晓华, 孙国铭. 石斛中总生物碱和多糖的含量测定 [J]. 中国药事, 2002, 16(7): 42.
- [7] 李 蕤, 谭晓芳, 陈 群, 等. 霍山石斛细胞悬浮培养及条件优化 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 358-362.
- [8] 高建平, 金若敏, 吴耀平, 等. 铁皮石斛原球茎与原药材免疫调节作用的比较研究 [J]. 中药材, 2002, 25(7): 487-489.
- [9] 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.
- [10] 邢建永, 王康才, 汤兴利, 等. Ca^{2+} 对悬浮培养半夏类原球茎生长及次生代谢物累积的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 376-379.
- [11] 丑敏霞, 朱利泉, 张玉进, 等. 光照强度对石斛生长与代谢的影响 [J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 380-382.
- [12] 杨立昌, 项 君, 洪 鲲, 等. 金钗石斛生物碱和水溶性多糖的累积规律 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2864-2865.
- [13] 刘 宁, 孙志蓉, 廖晓康, 等. 不同采收期金钗石斛总生物碱及多糖质量分数的变化 [J]. 吉林大学学报: 理学版, 2010, 48(3): 511-515.
- [14] 武孔媛, 王文全, 金家兴, 等. 产地和采收时间对美花石斛药材中多糖的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1732-1725.

封面照片——狭叶慈姑



狭叶慈姑 *Sagittaria trifolia* L. (*S. trifolia* L. var. *angustifolia* (Sieb.) Kitag.), 别名野慈姑、三脚剪、水芋。被子植物门单子叶纲泽泻目泽泻科慈姑属, 为慈姑的变种, 多年生草本植物, 与慈姑相比, 野慈姑植株较矮, 叶片较小、薄, 分布于中国东北、华北、西北、华东、华南、西南等地。全草具有清热解毒, 凉血消肿之功效。高 50~100 cm, 根状茎横生, 较粗壮, 顶端膨大成球茎, 长 2~4 cm, 径约 1 cm, 土黄色。基生叶簇生, 叶形变化极大。多数为狭箭形, 通常顶裂片短于侧裂片, 顶端裂片长 4~9 cm, 宽 1~2 cm, 基部裂片长 4~18 cm, 宽 6~11 mm。顶裂片与侧裂片之间缢缩, 叶柄粗壮, 长 20~40 cm, 基部扩大成鞘状, 边缘膜质。7~10 月开花, 花梗直立, 高 20~70 cm, 粗壮, 总状花序或圆锥形花序, 花白色, 雌雄同株。10~11 月结果, 同时形成地下球茎。花序总状, 花茎长 30~70 cm, 花 3~5 朵轮生, 雌花在下, 萼片形花被片反卷, 花瓣长于萼, 白色, 心皮多, 聚合成球形; 雄花在上, 雄蕊多数。

(封面照片由通化师范学院 周 繇 教授提供)