

# 四种添加物对铁皮石斛原球茎生长及多糖含量的影响

包英华<sup>1,2</sup>, 潘超美<sup>1\*</sup>, 白音<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 韶关学院英东生命科学学院, 广东 韶关 512005)

**摘要:** 为探讨铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)培养基中添加物的作用, 在 1/2MS 培养基中加入椰肉、甘蔗渣、香蕉皮和麦麸等 4 种添加物, 研究不同浓度添加物和培养时间对原球茎生长和多糖含量的影响。结果表明, 4 种添加物对铁皮石斛原球茎的增殖、分化和多糖含量均有一定影响, 其中添加 15.0 g L<sup>-1</sup> 甘蔗渣, 培养 60 d 能明显促进铁皮石斛原球茎的增殖与分化(146.1%); 而添加 20.0 g L<sup>-1</sup> 甘蔗渣, 培养 40 d 能显著提高铁皮石斛原球茎多糖含量(50.4%)。这说明甘蔗渣是培养铁皮石斛原球茎的适宜添加物, 既能促进铁皮石斛原球茎的生长发育, 还能降低生产成本。

**关键词:** 铁皮石斛; 添加物; 原球茎; 多糖

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.03.007

## Effect of Four Additives on Growth and Polysaccharide Content of *Dendrobium officinale* Protocorm-like Bodies

BAO Ying-hua<sup>1,2</sup>, PAN Chao-mei<sup>1\*</sup>, BAI Yin<sup>2</sup>

(1. College of Chinese Material Medical, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Yingdong College of Life Sciences, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

**Abstract:** In order to understand the function of additive in medium of *Dendrobium officinale*, four additives, including coconut meat, sugarcane bagasse, banana peel and wheat bran, were supplied in 1/2MS medium, respectively. The effects of additives with different concentrates and culture time on growth and polysaccharide content of *D. officinale* PLBs were studied. The results showed that the PLBs proliferation, differentiation and the polysaccharide content were influenced by four additives. The proliferation rate of PBLs reached up to 146.1% supplemented with 15.0 g L<sup>-1</sup> sugarcane bagasse and cultured for 60 d. The polysaccharide content of PLBs was increased for 50.4% supplemented with 20.0 g L<sup>-1</sup> sugarcane bagasse and cultured for 40 days. So it was suggested that sugarcane bagasse was suitable additive for *in vitro* *D. officinale* PLBs owing to promote the growth of *D. officinale* PLBs and reduce cost of production.

**Key words:** *Dendrobium officinale*; Additive; PLB; Polysaccharide

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为兰科(Orchidaceae)石斛属多年生附生草本植物, 是我国常用名贵中药材, 国家二级重点保护植物。

铁皮石斛含有多糖、生物碱和二苯乙烯类等多种活性成分<sup>[1-2]</sup>, 现代药理研究表明, 铁皮石斛的多糖成分具有抑制炎症、增强免疫活性、抗衰老甚至降

收稿日期: 2014-01-14 接受日期: 2014-02-04

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B060400004)资助

作者简介: 包英华, 女, 在读博士生, 副教授。E-mail: byhm@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: pancm@gzhtcm.edu.cn

血压等作用<sup>[3-5]</sup>。中国药典(2010版)以多糖含量为评价铁皮石斛质量的指标<sup>[6]</sup>。在自然条件下,铁皮石斛的种子萌发率很低、生长周期长以及长期过度采挖等原因,导致野生铁皮石斛资源急剧减少,已难以满足日益增长的国内外市场需求。近年来,秦岭淮河以南的各省区大力发展铁皮石斛种苗培育和人工种植规模,甚至有些地区已形成支柱产业。然而,铁皮石斛组培苗的生长周期长和投入成本大等已严重制约该产业的健康快速发展,其产品价格一直居高不下<sup>[7-8]</sup>。因此,降低铁皮石斛组培苗生产成本和提高组培苗生产效率是当前研究的主要方向。目前,在铁皮石斛组培苗培育方面,主要集中在培养基种类和激素配比对铁皮石斛组培苗生长的影响上,而添加物种类及其配比对铁皮石斛原球茎增殖、分化以及多糖含量的影响报道较少<sup>[9-12]</sup>。本文采用椰肉、甘蔗渣、香蕉皮和麦麸4种材料作为铁皮石斛原球茎培育的添加物,比较这些添加物对铁皮石斛原球茎生长状况及多糖含量的影响,为铁皮石斛组培苗的工厂化生产操作规程(SOP)的建立提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)果实采自韶关学院石斛资源圃。椰肉、甘蔗渣、香蕉皮和麦麸均从市场上购买。

### 1.2 原球茎培育

铁皮石斛果实先用70%酒精浸泡1 min,无菌水冲洗2次,再用0.1%升汞表面消毒8~12 min,无菌水冲洗3次。在无菌条件下,取出种子散播到1/2MS固体培养基上进行培养。培养60 d后挑选长势均一、生长状态好、无分化、色泽鲜绿的原球茎,转接于分别添加不同浓度(0、10、15、20、25 g L<sup>-1</sup>)的椰肉、甘蔗渣、香蕉皮和麦麸的1/2MS培养基上,各添加物先分别烘干(50℃)、粉碎后再加入培养基内,培养周期为80 d。

### 1.3 分析测定

每隔20 d取样1次,共取4次,每次取样的铁皮石斛原球茎培养物除去培养基,并以瓶为单位(3瓶为一组)观察原球茎生长和分化情况,称量并

计算其增殖率(%)=(培养后重量-接种量)/接种量×100%。按照中国药典(2010版)的方法测定铁皮石斛原球茎培养物的多糖含量<sup>[7]</sup>。用SPSS 20.0软件对数据进行多重比较检验。

## 2 结果和分析

### 2.1 添加物对原球茎生长的影响

铁皮石斛原球茎转接于无添加物的1/2MS培养基20 d后,原球茎顶端有叶原基突起,呈黄绿色,增殖多但分化较少,培养60 d后原球茎仍呈黄绿色,出现较多的分化,增殖多。添加10 g L<sup>-1</sup>或25 g L<sup>-1</sup>椰肉,铁皮石斛原球茎的色泽变化不大,但增殖减少和分化程度下降,而添加15 g L<sup>-1</sup>、20 g L<sup>-1</sup>椰肉,其原球茎生长情况变好。添加甘蔗渣时,铁皮石斛原球茎长势很好,色泽深绿,增殖和分化显著增多,特别是浓度为15 g L<sup>-1</sup>时,铁皮石斛原球茎生长状况最好。添加香蕉皮时,原球茎色泽更为深绿,增殖多,但分化较少。麦麸对原球茎的生长也有一定程度的促进作用,但与其他添加物相比长势比较差。因此,添加物甘蔗渣对铁皮石斛原球茎生长起很好的促进作用,以浓度为15 g L<sup>-1</sup>,培养60 d时的效果最佳(图1)。

### 2.2 添加物对原球茎增殖率的影响

与无添加物的1/2MS培养基相比,4种添加物对铁皮石斛原球茎的增殖均产生一定影响,且差异显著。椰肉、麦麸添加物培养20 d时,铁皮石斛原球茎的增殖效果明显,但培养时间延长椰肉并无明显的增殖作用,甚至还出现一定程度的停止生长的情况。甘蔗渣添加物在培养的前40 d对铁皮石斛原球茎的增殖作用较弱,但培养60~80 d出现明显的增殖加快趋势,尤其是浓度为15 g L<sup>-1</sup>时的增殖率最高(237.59%)。香蕉皮浓度为10 g L<sup>-1</sup>培养20 d对原球茎增殖的促进作用较为明显,但培养时间延长其增殖率降低。这说明在铁皮石斛原球茎培养中可优先选择甘蔗渣作为添加物,其浓度控制在15 g L<sup>-1</sup>为宜(表1)。

### 2.3 添加物对原球茎多糖含量的影响

无添加物的1/2MS培养基中的铁皮石斛原球茎多糖含量比较稳定,约为15%。添加椰肉、香蕉皮和麦麸时,铁皮石斛原球茎的多糖含量变化较



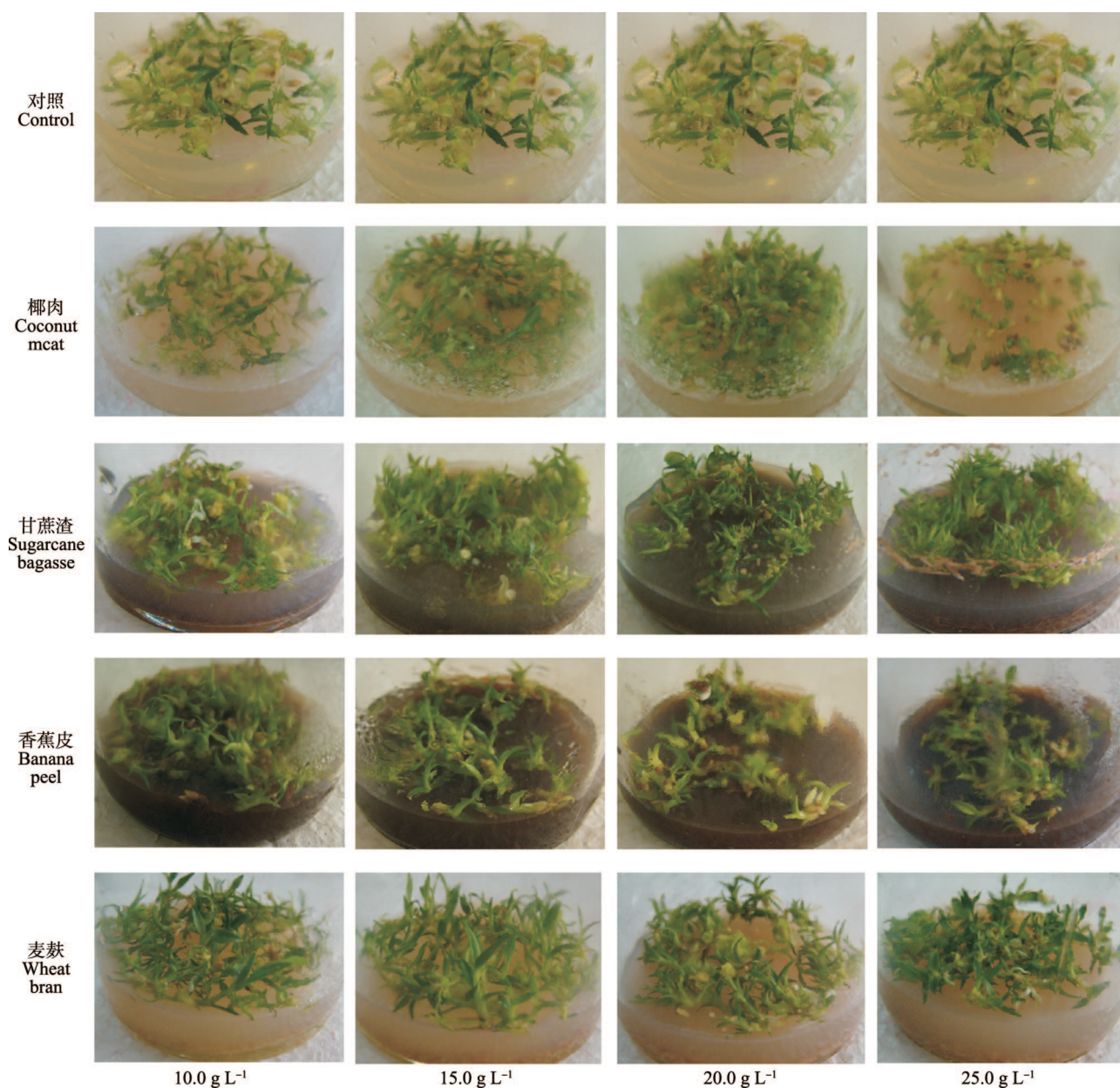


图 1 4 种添加物对铁皮石斛原球茎生长的影响(培养 60 d)

Fig. 1 Effects of four additives on growth of *Dendrobium officinale* PLBs cultured for 60 days

大,有时出现明显降低。结果表明,4种添加物促进铁皮石斛原球茎多糖含量的最佳条件分别为  $10\text{ g L}^{-1}$  椰肉培养 20 d、 $20\text{ g L}^{-1}$  甘蔗渣培养 40 d、 $10\text{ g L}^{-1}$  香蕉皮培养 15 d、 $25\text{ g L}^{-1}$  麦麸培养 60 d。其中,添加  $20\text{ g L}^{-1}$  甘蔗渣能够显著提高铁皮石斛原球茎的多糖含量,多糖含量达 24.54% (表 3)。

### 3 讨论

影响原球茎增殖与分化的因素有很多,主要有

培养方式(固体、液体静置和液体悬浮)、无机盐、外源生长调节剂、有机附加物、真菌诱导子及其他物理因素等<sup>[9-15]</sup>。有机添加物是离体培养时材料的微量营养成分和生理活性物质的主要来源,是原球茎增殖分化的关键性因素。添加物浓度的偏高或偏低均不利于细胞的分裂生长,甚至抑制其增殖<sup>[16]</sup>。

在铁皮石斛原球茎培养过程中,通常添加椰子汁、马铃薯汁、香蕉汁和苹果汁等添加物,这些添加物通常价格较高,而且难以保存,在铁皮石斛组培苗的工厂化生产中很难大量使用<sup>[8-9,16-17]</sup>。椰肉、

表 1 4 种添加物对铁皮石斛原球茎增殖率(%)的影响

Table 1 Effects of four additives on proliferation rate (%) of PLBs of *Dendrobium officinale*

编号 No.	添加物 Additives (g L <sup>-1</sup> )	时间 Days				
		20	40	60	80	
1	对照 Control	75.00 ± 1.59	133.30 ± 2.28	91.94 ± 1.28	72.46 ± 2.91	
2	椰肉	10	119.23 ± 5.92A**	67.21 ± 4.71C**	106.98 ± 1.78A**	78.85 ± 1.59Bc**
3	Coconut meat	15	103.64 ± 3.78B**	122.81 ± 2.18A**	75.32 ± 2.50C**	83.53 ± 2.27Bb**
4		20	115.96 ± 2.15A**	90.85 ± 2.01B**	47.11 ± 2.83D**	67.21 ± 2.36Cd*
5		25	85.48 ± 3.48C*	90.77 ± 3.14B**	94.60 ± 1.80B	99.08 ± 1.85Aa**
6	甘蔗渣	10	63.53 ± 1.18Cd**	81.45 ± 1.83A**	154.40 ± 2.54Cc**	104.42 ± 3.14Aa**
7	Sugarcane bagasse	15	116.32 ± 1.73Aa**	185.75 ± 1.34C**	237.59 ± 2.62Aa**	74.36 ± 3.43Cd
8		20	67.21 ± 2.36Cc**	135.60 ± 2.58C**	171.68 ± 1.69Bb**	90.75 ± 3.34Bb**
9		25	99.08 ± 1.85Bb**	151.44 ± 2.60B**	121.35 ± 1.36Dd**	84.54 ± 1.70Bc**
10	香蕉皮	10	166.42 ± 2.83Aa**	60.21 ± 2.80D**	79.40 ± 2.65C**	82.49 ± 3.82A**
11	Banana peel	15	88.36 ± 3.14Bb**	68.98 ± 2.24C**	212.30 ± 1.72A**	82.19 ± 3.19A**
12		20	80.59 ± 4.67BCc	116.36 ± 2.38A**	77.89 ± 1.79C**	56.07 ± 3.12C**
13		25	76.61 ± 2.68Cc	92.42 ± 2.31B**	85.06 ± 2.22B**	68.20 ± 4.25B
14	麦麸	10	85.76 ± 1.74C**	85.63 ± 1.97B**	95.60 ± 3.58Aa**	48.09 ± 2.99BCc**
15	Wheat bran	15	117.13 ± 0.78A**	70.16 ± 2.86C**	83.94 ± 2.48Cc**	53.29 ± 3.84Bb**
16		20	100.45 ± 4.11B**	119.30 ± 1.65A**	88.19 ± 2.36BCb	43.97 ± 1.94Cc**
17		25	102.99 ± 2.80B**	92.26 ± 7.45B**	60.38 ± 0.60Dd**	73.07 ± 1.74Aa

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; 数据后不同大、小写字母分别表示同一添加物组间差异极显著( $P < 0.01$ )和显著( $P < 0.05$ )。

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; Data followed different capital and small letters with the same additives indicate significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

表 3 四种添加物对铁皮石斛原球茎多糖含量(%)的影响

Table 3 Effects of four additives on the polysaccharide content (%) of *Dendrobium officinale* PLBs

编号 No.	添加物 Additives (g L <sup>-1</sup> )	时间 Days				
		20	40	60	80	
1	对照 Control	12.61 ± 0.83	16.32 ± 0.50	15.89 ± 0.33	13.60 ± 0.35	
2	椰肉	10	15.31 ± 0.29A**	10.16 ± 0.23B**	10.38 ± 0.24A**	6.55 ± 0.12C**
3	Coconut meat	15	7.90 ± 0.19D**	8.06 ± 0.19D**	5.76 ± 0.09D**	9.77 ± 0.65B**
4		20	10.84 ± 0.31C**	13.48 ± 0.28A**	6.99 ± 0.06C**	5.38 ± 0.02D**
5		25	13.20 ± 0.14B	9.38 ± 0.09C**	9.58 ± 0.10B**	10.88 ± 0.19A**
6	甘蔗渣	10	9.86 ± 0.07Cd**	20.09 ± 0.75B**	19.46 ± 0.69Aab*	11.02 ± 0.93B**
7	Sugarcane	15	11.28 ± 0.15BCc	19.66 ± 0.26B**	18.41 ± 0.27Ab*	10.81 ± 0.27B**
8	bagasse	20	12.51 ± 1.20Bb	24.54 ± 0.91A**	19.71 ± 0.41Aa*	13.75 ± 1.47A
9		25	17.39 ± 0.37Aa**	15.75 ± 1.66C	15.06 ± 0.96B	10.44 ± 0.64B**
10	香蕉皮	10	12.53 ± 0.15B	6.72 ± 0.48ABb**	6.67 ± 0.17C**	8.28 ± 0.28Cd**
11	Banana peel	15	11.42 ± 1.11B	8.34 ± 1.21Aa**	18.35 ± 0.53A**	11.80 ± 0.18Aa**
12		20	15.08 ± 0.23A**	6.15 ± 0.85Bb**	7.24 ± 0.11C**	8.78 ± 0.21Cc**
13		25	16.23 ± 0.27A**	8.82 ± 0.61Aa**	12.59 ± 0.33B**	11.13 ± 0.21Bb**

续表(Continued)

编号 No.	添加物 Additives (g L <sup>-1</sup> )	时间 Days				
		20	40	60	80	
14	麦麸	10	12.88 ± 0.40Bb	11.50 ± 0.32B**	6.96 ± 0.29Cc**	4.34 ± 0.32C**
15	Wheat bran	15	11.82 ± 0.33Bc	13.95 ± 0.26A**	9.00 ± 0.21Bb**	7.93 ± 0.09B**
16		20	10.14 ± 0.26Cd**	8.38 ± 0.39C**	6.42 ± 0.15Cd**	9.40 ± 0.10A**
17		25	16.23 ± 0.33Aa**	13.53 ± 0.67A**	16.37 ± 0.32Aa	7.80 ± 0.13B**

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; 数据后不同大、小写字母分别表示同一添加物组间差异极显著( $P < 0.01$ )和显著( $P < 0.05$ )。\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; Data followed different capital and small letters with the same additives indicate significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

甘蔗渣、香蕉皮和麦麸等添加物均属农副产品,具有价格低廉、产量大、产地集中和质量可控等特点。这些添加物均富含纤维素、蛋白质、脂肪、碳水化合物、生长调节剂和多种矿物质成分,能够促进离体培养植物材料的生长发育和代谢产物的积累<sup>[18-19]</sup>。

研究结果表明,4种添加物均不同程度地影响铁皮石斛原球茎的生长,15.0 g L<sup>-1</sup>的甘蔗渣对提高铁皮石斛原球茎生长的效果最佳,原球茎的长势较好,色泽深绿,增殖好,分化多。添加物椰肉、香蕉皮和麦麸对铁皮石斛原球茎多糖含量的积累有一定的抑制作用,这与已有的报道有差异<sup>[20]</sup>,具体原因尚需进一步研究。在4种添加物中,甘蔗渣能够明显促进铁皮石斛原球茎的多糖积累,最理想的甘蔗渣浓度为20 g L<sup>-1</sup>,培养时间为40 d。

总之,在培养基中添加甘蔗渣,不仅能明显促进铁皮石斛原球茎的生长发育,而且还能够降低生产成本。

## 参考文献

- Li L, Deng X L, Zhao X B, et al. Advances in studies on chemical constituents in *Dendrobium candidum* and their pharmacological effects [J]. *Anti-tumor Pharm*, 2011, 1(2): 90-94.  
李玲, 邓晓兰, 赵兴兵, 等. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展 [J]. *肿瘤药学*, 2011, 1(2): 90-94.
- Nie S P, Cai H L. Research progress in bioactive components and functions of *Dendrobium officinale* [J]. *Food Sci*, 2012, 33(23): 356-361.  
聂少平, 蔡海兰. 铁皮石斛活性成分及其功能研究进展 [J]. *食品科学*, 2012, 33(23): 356-361.
- Cai H L, Huang X J, Nie S P, et al. Effects of polysaccharides from *Dendrobium officinale* on the production of TNF- $\alpha$  by RAW 2647 cells [J]. *Chin Pharm Bull*, 2012, 28(11): 1553-1556.  
蔡海兰, 黄晓君, 聂少平, 等. 铁皮石斛多糖对RAW2647细胞分泌TNF- $\alpha$ 的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(11): 1553-1556.
- Song M F, Li G, Chen X, et al. Primary study of *Dendrobium* polysaccharides improving immunity activity on mouse [J]. *Chin Pharm J*, 2013, 48(6): 428-431.  
宋美芳, 李光, 陈曦, 等. 两种石斛多糖提高小鼠免疫活性的初步研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(6): 428-431.
- Wu R Z, Yang B X, Li Y P, et al. Experimental study on effect of polysaccharides of *Dendrobium candidum* on SHR-sp rats anti-hypotensive [J]. *Chin J Trad Med Sci Techn*, 2011, 18(3): 204-205,210.  
吴人照, 杨兵勋, 李亚平, 等. 铁皮石斛多糖对SHR-sp大鼠抗高血压中风作用的实验研究 [J]. *中国中医药科技*, 2011, 18(3): 204-205,210.
- State of Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China [M]. Beijing: China Medicine Science and Technology Press, 2010: 265-266.  
国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 265-266.
- Luo J M. Preliminary study on the *Dendrobium* industry and market developments [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 2013, 38(4): 472-474.  
罗金明. 铁皮石斛产业及市场发展初探 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(4): 472-474.
- Zhao X B, Cai G X, Wu W J. Advances in industrial research and development of rare *Dendrobium candidum* in Hunan Province [J]. *Hunan J Trad Chin Med*, 2012, 28(1): 91-92.  
赵兴兵, 蔡光先, 吴维佳. 我省珍稀濒危药材铁皮石斛产业化研究开发现状 [J]. *湖南中医杂志*, 2012, 28(1): 91-92.
- Song S, Xu Y, Wang B Z, et al. Different media on the tissue culture of *Dendrobium officinale* [J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2013, 29(13): 133-139.  
宋顺, 许奕, 王必尊, 等. 不同培养基成分对铁皮石斛组织培养的影响 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(13): 133-139.
- Zheng H J, Zhang M L, Zou C J, et al. Tissue culture technical of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo [J]. *Agri Eng*, 2012, 2(11): 49-51.  
郑慧俊, 张明丽, 邹春晶, 等. 铁皮石斛组织培养繁殖技术研究 [J]. *农业工程*, 2012, 2(11): 49-51.

- [11] Zhang G F, Guan J M, Huang S, et al. Study on PLB induction and proliferation of *Dendrobium officinale* [J]. *J Chin Med Mat*, 2011, 34(8): 1172–1177.  
张桂芳, 关杰敏, 黄松, 等. 铁皮石斛原球茎的诱导与增殖影响因素研究 [J]. *中药材*, 2011, 34(8): 1172–1177.
- [13] Meng Z X, Wang C L, Chen X M, et al. Research and application of *Dendrobium officinale* protocorm/protocorm-like bodies [J]. *Chin Pharm J*, 2013, 48(19): 1620–1624.  
孟志霞, 王春兰, 陈晓梅, 等. 铁皮石斛原球茎/类原球茎的研究与应用 [J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(19): 1620–1624.
- [14] Wei M, Yang C Y, Wei S H. Enhancement of the differentiation of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* to shoots by ultrasound treatment [J]. *J Plan Physiol*, 2012, 169(8): 770–774.
- [15] Lin Y, Li J, Li B, et al. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro* [J]. *Plant Cell*, 2011, 105(3): 329–335.
- [16] Pan R C. *Plant Tissue Culture* [M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 2003: 1–22.  
潘瑞炽. *植物组织培养* [M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2003: 1–22.
- [17] Tang L, Li J, Long H, et al. Advance on the effect of ecological factors on growth and development in *Dendrobium candidum* [J]. *J Chin Med Mat*, 2014, 37(1): 155–158.  
唐丽, 李菁, 龙华, 等. 生态因子对铁皮石斛生长发育影响的研究进展 [J]. *中药材*, 2014, 37(1): 155–158.
- [18] Li Y, Wang P, Chen S T, et al. Mineral elements of tender coconut meat in four coconut cultivars [J]. *Chin J Trop Crop*, 2012, 33(1): 46–49.  
李艳, 王萍, 陈思婷, 等. 4个品种椰子嫩果椰肉主要矿质元素含量分析 [J]. *热带作物学报*, 2012, 33(1): 46–49.
- [19] Wang Y P, Li J H, Liu Y H, et al. Advances in comprehensive utilization of cane bagasse [J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2010, 26(16): 370–375.  
王允圃, 李积华, 刘玉环, 等. 甘蔗渣综合利用技术的最新进展 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(16): 370–375.
- [20] Zhang Y B, Yi Y, Chen X, et al. Studies on efficient induction, proliferation and polysaccharide accumulation in *Dendrobium candidum* protocorms [J]. *Jilin Agri*, 2012(8): 46–47.  
张宇斌, 乙引, 陈训, 等. 铁皮石斛原胚体高效诱导、增殖及多糖含量累积的研究 [J]. *吉林农业*, 2012(8): 46–47.