

不同栽培基质对霍山米斛总多糖含量的影响

姚 亮^{1,2}, 俞 年 军^{1,2}, 彭 代 银^{1,2}, 陈 卫 东², 汪 新 宇^{1,2}, 何 祥 林³

(1. 安徽中医药大学 安徽省中医药科学院, 安徽 合肥 230012; 2. 中药资源保护与开发研究所 药物代谢研究所, 安徽 合肥 230012; 3. 安徽霍山长冲中药材开发有限公司, 安徽 霍山 237266)

摘 要:以霍山米斛为试材,于采摘期采摘不同栽培基质培养的霍山米斛,采用苯酚-硫酸显色法测定总多糖含量,探究不同栽培基质对霍山米斛总多糖含量的影响。结果表明:不同栽培基质霍山米斛总多糖含量为 S1 (松树锯末+石子,低矮大棚)>S3 (松树皮+石子,低矮大棚)>S4 (椰子壳+石子,低矮大棚)>S2 (石子,低矮大棚)>S5 (石子,仿野生)。统计学分析表明,不同基质栽培的霍山米斛总多糖含量的差异存在统计学意义,聚类分析数据显示,5 种栽培基质的霍山米斛可以分为 4 类:S1 单独一类、S3 单独一类、S4 单独一类、S2 和 S5 一类。试验旨在为霍山米斛的最佳栽培基质选择和初步判定栽培基质的种类提供依据,以期充分地开发霍山米斛资源。

关键词:霍山米斛;栽培基质;总多糖

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)03-0155-05

霍山米斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)属兰科植物属的多年生草本植物,俗称米斛,是安徽省珍稀、道地中药材,产于大别山区霍山县等地^[1]。石斛是兰科多年生草本植物,与三量重的人参、百年的首乌、花甲之茯苓、天山雪莲、苁

蓉、深山灵芝、海底珍珠、冬虫夏草并称为“中华九大仙草”^[2],因其具有益精强阴,生津止渴,补虚羸,除胃中虚火等多种功效以及其生长环境的特殊性,名列“中华九大仙草”之首。野生霍山米斛主要生长在临溪的悬崖峭壁上,据清乾隆年间《霍山县志》记载“因采购者重,本山已搜剔已空”^[2]。目前,中药材市场上的霍山米斛多为安徽霍山地区人工栽培品,随着霍山米斛栽培规模的扩大,相关学者对霍山米斛的研究也越来越多。在霍山米斛主要成分中,普遍以总多糖含量的高低来评价霍山米斛品质的优劣,该试验在前期研究^[3]的基础上采用苯酚-硫酸法来测定霍山米斛的总多糖含量,从多糖角度来确定霍山米斛中不同栽培基质霍山米斛中总多糖的特点,从而为霍山米斛科学种植及鉴定提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

安徽省六安市霍山县太平畈乡有典型的北亚热带

第一作者简介:姚亮(1990-),男,硕士研究生,研究方向为霍山米斛的质量评价。E-mail:766816651@qq.com.

责任作者:俞年军(1965-),男,硕士,教授,现主要从事安徽道地药材的品质提升等研究工作。E-mail:ynj2005727@sohu.com.

基金项目:国家中医药标准化资助项目(ZYYS-2014[12]);安徽省科技厅 2015 年公益性技术应用研究联动计划资助项目(15011d04006);安徽省教育厅安徽高校科研创新平台团队资助项目(皖教秘科[2015]49 号);安徽省教育厅、安徽省财政厅关于下达 2013 年高等教育振兴计划部分资助项目(皖教科[2013]2 号);安徽中医药大学 2016 年度校级探索性科研资助项目(2016ts064)。

收稿日期:2016-09-23

Abstract: Two *Grifola frondosa* strains Gf-3 and BJ were used as test materials in mediums with different carbon-to-nitrogen ratios (C/N). A growth line recording method was used to calculate the mycelium growth rates of the two strains inoculated in the above mediums. The results indicated that the mycelium growth rates of the two *Grifola frondosa* strains were strongly affected by the mediums C/N value, their mycelium grow faster as the C/N value increased in mediums.

Keywords: edible mushroom; cultivation; developmental physiology

带大别山温凉气候特征。受季风影响,冬季干凉,夏季温热,四季分明,冷热适中,湿润多雨,年降雨量 1 300 mm 左右,相对湿度为 80%~85%。气候温和,全年无霜期 217~220 d。阳光充足,年日照时数达 1 881 h,极易于散射光的形成,非常有利于霍山米斛多糖、氨基酸等有效成分的积累^[4]。

1.2 试验材料

供试霍山米斛于 2015 年 11 月 18 日在安徽省霍山县太平畈乡王家店霍山米斛种植基地采摘,经安徽中医药大学药学院生药系俞年军教授鉴定为 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng。具体信息见表 1。

表 1

样品来源

Table 1

Sources of samples

编号 Number	品种 Variety	基质 Cultivation soil	生长环境 Environment	北纬 N	东经 E	海拔 Altitude/m	地点 Location
S1	霍山米斛	松树锯末+石子	低矮大棚	31°05'12.28	115°57'47.01	377	六安市太平畈乡王家村
S2	霍山米斛	石子	低矮大棚	31°05'12.24	115°57'49.75	370	六安市太平畈乡王家村
S3	霍山米斛	松树皮+石子	低矮大棚	31°04'12.55	115°57'46.80	370	六安市太平畈乡王家村
S4	霍山米斛	椰子壳+石子	低矮大棚	31°04'54.50	115°57'52.22	371	六安市太平畈乡王家村
S5	霍山米斛	石子	仿野生	31°04'18.21	115°58'10.58	409	六安市太平畈乡马家村

1.3 试验方法

1.3.1 样品的处理及不同栽培基质的比较 将霍山米斛茎上的栽培基质除去,用纯水将其洗涤干净,将茎放置烘箱内 90 °C 干燥 48 h,取出研磨,过三号筛所得的粉末,即为试验样品,分装标记留用。霍山米斛基质中的石子由体积为 27~125 cm³ 的片麻岩组成,松树皮和椰子壳体积为 4~8 cm³,锯末是松木的木屑。霍山米斛种植在托盘(42 cm×42 cm×5 cm)中,编号 S1、S3、S4 对应的栽培基质是先在托盘的底部放上均匀的 4 份石子,再在上面分别放上 1 份的松树锯末、松树皮、椰子壳构成,S2 和 S5 对应的栽培基质是把托盘里面全部放上均匀的石子构成。S1~S4 放在低矮大棚中,S5 放在松树林下的仿野生环境中,最后在不同基质的每个托盘中种上 25 株霍山米斛。栽培基质组成不同构成了栽培基质不同的特点:S1 易于储水、透气性最好,S2 不利于储水、比较透气,S3 储水较好、透气良好,S4 储水和透气均良好,S5 自然环境不保温不保湿。

1.3.2 对照品和样品溶液的配制 1)对照品溶液的制备:取无水葡萄糖精密称定,加水制成每 1 mL 含 90 μg 无水葡萄糖的溶液。2)供试品溶液的制备:取霍山米斛粉末(过三号筛)约 0.10 g,精密称定,加水 80 mL,加热回流 2 h,放冷,转移至 100 mL 量瓶中,用少量水分次洗涤容器,洗液并入同一量瓶中,加水

至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 2 mL,置 15 mL 离心管中,精密加入无水乙醇 10 mL,摇匀,冷藏 1 h,取出,4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,弃去上清液(必要时滤过),沉淀加 80%乙醇洗涤 2 次,每次 8 mL,4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃去上清液,沉淀加热水溶解,转移至 25 mL 量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀,即得。

无水葡萄糖(分析级)、苯酚(分析级)、硫酸(分析级)批号分别为:20150807、20150603、20141221。其它试剂均为分析级,试验用水均为 Milli-Q 超纯水机制备。

紫外分光光度计(UV-1600,上海美谱达仪器有限公司);LC-4016 型低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);AB135-S 型十万分之一天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);BCD-225CHC 冰箱(合肥美菱股份有限公司);KQ-300B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);双层铁皮电炉(上海日电电炉厂);Milli-Q Gradient A10 超纯水系统(密理博(上海)贸易有限公司)。

至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 2 mL,置 15 mL 离心管中,精密加入无水乙醇 10 mL,摇匀,冷藏 1 h,取出,4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,弃去上清液(必要时滤过),沉淀加 80%乙醇洗涤 2 次,每次 8 mL,4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃去上清液,沉淀加热水溶解,转移至 25 mL 量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀,即得。

1.4 项目测定

1.4.1 霍山米斛多糖的提取 取霍山米斛粉末(过三号筛)100 mg,精密称定,加纯水 80 mL,在 100 °C 下加热回流 2 h,提取 2 次。将提取液浓缩,放冷,转移至 100 mL 量瓶中,用少量水分次洗涤容器,洗液并入同一量瓶中,加水至刻度,摇匀,精密量取续滤液 2 mL,置 15 mL 离心管中,精密加入无水乙醇 10 mL,摇匀,冰浴冷藏 1 h,取出,4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,弃去上清液(必要时滤过),沉淀加 80%乙醇洗涤 2 次,每次 8 mL,4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃去上清液,沉淀加热水溶解,转移至 25 mL 量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀,即得。

1.4.2 霍山米斛总多糖含量测定 精密量取供试品溶液 1.0 mL,置 10 mL 具塞试管中,精密加入 5% 苯酚溶液(临用配制)1.0 mL,摇匀,再精密加硫酸 5 mL,摇匀,置沸水浴中加热 20 min,取出,置冰浴中冷却 5 min,以相应试剂为空白,以紫外-可见分光光

度法(2015 药典通则 0401)在 488 nm 的波长处测定吸光度,从标准曲线上计算出供试品溶液中无水葡萄糖的量,计算即得多糖含量。

1.4.3 霍山米斛多糖提取率测定方法学考察

1)检测波长选择:分别对未显色霍山米斛总多糖溶液、未显色标准葡萄糖溶液、经苯酚-硫酸法显色后的标准葡萄糖溶液、经苯酚-硫酸法显色后的霍山米斛总多糖溶液、空白溶液,在 200~800 nm 范围内扫描测定吸收光谱,参照药典最终确定最佳吸收波长为 488 nm。2)标准曲线的制备:精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置 10 mL 具塞试管中,各加水补至 1.0 mL,精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL(临用配制),摇匀,再精密加硫酸 5 mL,摇匀,置沸水浴中加热 20 min,取出,置冰浴中冷却 5 min,以相应试剂为空白,以紫外-可见分光光度法(2015 药典通则 0401)^[5],在 488 nm 的波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。测得无水葡萄糖的线性回归方程为 $A=0.008\ 81C+0.112\ 52(R^2=0.999\ 04)$,表明其线性关系良好,符合

方法学要求。3)精密度试验:在标准曲线确定的范围内,精密吸取葡萄糖对照品溶液 6 份,各 1 mL,按照 1.4.2 中的操作测定吸光度,计算 RSD 为 2.41%,表明精密度良好,符合方法学的要求。4)稳定性试验:在标准曲线确定的范围内,精密吸取 1.4.2 中制备的供试品 1 mL,分别于 0、10、20、30、40、50、60 min 按照 1.4.1 中的操作测定吸光度,计算其 RSD 为 0.88%,表明稳定性良好,符合方法学的要求。5)重复性试验:精密称取霍山米斛样品 6 份,约 0.12 g,按 1.4.1 中制备的供试品并操作测定含量,计算 RSD 为 0.80%,小于 4%,表明重复性良好,符合方法学要求。6)回收率试验:取已知含量的霍山米斛粉末 100 mg,精密称定,共 6 份,按 1.4.1 中制备的供试品,精密移取 1 mL,再加入葡萄糖对照品溶液,含量为 25 μ g,浓缩定容到 1 mL,按照 1.4.2 中操作测定吸光度,计算加样回收率的范围为 88.87%~98.01%,平均加样回收率为 93.32%,符合方法学要求(表 2)。

表 2 加样回收率的试验结果

Table 2 Results of recovery standard addition ($n=6$)

样品含量 Content of sample/ μ g	加入量 Amount added/ μ g	测得量 Amount measured/ μ g	回收率 Recovery percent/%	平均回收率 Mean recovery percent/%
25.29	25.00	49.29	98.01	93.32
25.13	25.00	47.62	94.98	
25.46	25.00	44.84	88.87	
25.63	25.00	48.35	95.49	
24.82	25.00	44.56	89.44	
25.06	25.00	46.62	93.12	

1.5 数据分析

试验数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。

2 结果与分析

对 S1、S2、S3、S4、S5 基质栽培的霍山米斛进行随机取样,每种基质取 6 个样本,分别编号 1~6,精密称取对应编号的霍山米斛,按照上述提取和测定方法处理,计算霍山米斛的总多糖含量,由表 3 可以看出,同一种栽培基质的霍山米斛总多糖的含量之间差异较小,RSD 均小于 3%。不同栽培基质霍山米斛总多糖的含量之间差异较大,总多糖含量最高的是 S1 对应的栽培基质中的霍山米斛,含量高达 31.36%,含量最低的是 S5 对应的栽培基质中的霍山米斛,含量仅为 22.63%。其它栽培基质所种的霍山米斛含量均在二者之间。

为了更加直观地观察不同栽培基质中霍山米斛总多糖含量的差异性,采用单因素方差分析法(One

way analysis of variance, ANOVA)对数据进行统计学分析,应用 SPSS 21.0 软件处理所得的结果见图 1。

表 3 和图 1 表明,在 5 种不同基质栽培的霍山米斛中总多糖含量存在着显著性差异($P<0.05$),说明栽培基质对霍山米斛的总多糖含量有显著性影响。试验结果还表明,某些栽培基质两两之间也存在着差异,为了进一步探讨不同栽培基质之间的相似性和差异性,该试验进一步对数据进行聚类分析(Cluster analysis, CA),通过分析比较树状图(图 2)发现,有些不同栽培基质的霍山米斛中的总多糖含量之间的差别非常明显的,所以以霍山米斛总多糖含量为考察标准,结合树状图的结果将不同基质栽培的霍山米斛分为 4 类:S1 单独一类,总多糖含量是 31.36%;S3 单独一类,总多糖含量是 28.33%;S4 单独一类,总多糖含量是 25.66%;S2 和 S5 一类,总多糖含量均小于 24%。

表3 不同栽培基质的霍山米斛总多糖含量

编号 Number	霍山米斛质量 Weight of <i>D. huoshanense</i> /mg	总多糖含量 Content of total polysaccharide/mg	平均值 Mean/mg	RSD /%
S1-1	100.26	31.14	31.45	1.20
S1-2	100.26	31.99		
S1-3	100.26	31.87		
S1-4	100.26	31.28		
S1-5	100.26	31.14		
S1-6	100.26	31.28		
S2-1	100.50	23.60	23.83	0.81
S2-2	100.50	24.16		
S2-3	100.50	23.88		
S2-4	100.50	23.74		
S2-5	100.50	23.88		
S2-6	100.50	23.74		
S3-1	100.22	28.41	28.39	0.66
S3-2	100.22	28.13		
S3-3	100.22	28.41		
S3-4	100.22	28.27		
S3-5	100.22	28.41		
S3-6	100.22	28.69		
S4-1	100.10	25.76	25.69	0.57
S4-2	100.10	25.48		
S4-3	100.10	25.62		
S4-4	100.10	25.90		
S4-5	100.10	25.62		
S4-6	100.10	25.76		
S5-1	100.12	22.64	22.66	0.74
S5-2	100.12	22.49		
S5-3	100.12	22.78		
S5-4	100.12	22.92		
S5-5	100.12	22.64		
S5-6	100.12	22.49		

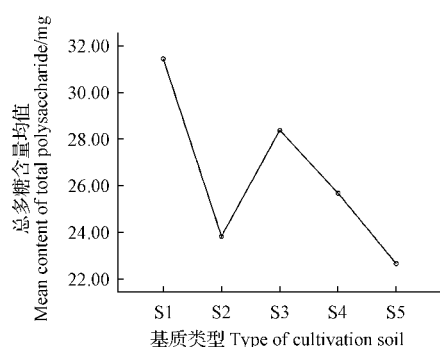


图1 不同基质栽培霍山米斛的总多糖含量均值的关系

Fig. 1 Relationship between the average content of total polysaccharides of *Dendrobium huoshanense* in different cultivation soil

3 结论与讨论

试验结果表明,就总多糖含量而言,在不同栽培基质中,S1栽培的霍山米斛的总多糖含量最多,S5

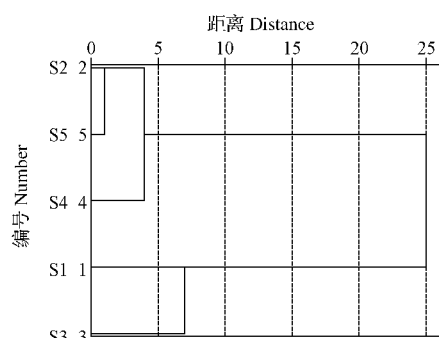


图2 不同基质栽培霍山米斛的总多糖含量的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of the total polysaccharide content of *Dendrobium huoshanense* in different cultivation soil

栽培的霍山米斛多糖含量最少,其它栽培基质培育的霍山米斛的多糖含量介于上述2种栽培基质之间,依次是S3、S4、S2。通过对以上不同栽培基质的霍山米斛总多糖含量的分析发现,不同栽培基质栽培的霍山米斛的总多糖含量的差异具有统计学意义,可以通过总多糖含量间接的鉴定栽培基质,为霍山米斛科学化的栽培提供依据。

该试验中霍山米斛均是3年生的植株,由于取的是整个植株,包含了1、2、3年生长的霍山米斛,所以总体总多糖含量与报道相比会偏低。通过研究不同栽培基质和霍山米斛总多糖含量的关系发现,霍山米斛最适宜条件为松木锯末,主要原因是松木锯末具有良好的透气性、储水且营养丰富,与兰科植物的培育习性相符^[6],所以此栽培基质中霍山米斛有较高的多糖含量。仿野生石子生长条件比较恶劣,缺乏营养物质,因此多糖含量不是太高,但是含量不高不代表药效差,霍山米斛的药效与总多糖的关系有待进一步探索。

通过对以上不同栽培基质的霍山米斛总多糖含量的分析发现,不同栽培基质栽培的霍山米斛的总多糖含量的差异具有统计学意义,可以通过总多糖含量间接的初步鉴定栽培基质。有利于规范化霍山米斛市场的混乱,增加当地种植户的收入,促进霍山米斛事业的发展。

通过走访霍山地区的专业米斛种植人员了解到,基质是霍山米斛高效优质栽培的关键。经查阅相关文献^[7],发现兰科植物的生物特性要求基质疏松透气、排水良好且保水保肥、不易发霉、无病毒害虫潜藏为最佳。目前常用的栽培基质有:石块、松树皮、杂木锯末、石子、椰子壳、红砖,霍山地区大多数

种植基地目前还采用单一的栽培基质,并不能充分地考虑到各种栽培基质的优缺点,因而导致产量不均和主要药用成分含量不均。为了解决这一问题,可以从分层基质的角度进行分析,综合考虑各种栽培基质的特点,合理搭配,取长补短,从栽培基质的保水性、透气性、保肥性能和基质的潜在虫害综合考虑栽培基质的选择,并以各种混合基质栽培的霍山石斛的成活率、生长状态和品质优劣来验证不同栽培基质的培育能力。近期,钱文林等^[8]通过测定栽培基质的电导率、pH、总孔隙度、气体孔隙度和持水量等理化指标,来考察每种栽培基质对于石斛等兰科植物的适合度。后期的研究可以从栽培基质的理化指标和霍山石斛的成活率、生长状态和品质优劣进行相关性分析,来确定更加具有培育效率的栽培基质。因此,在选择霍山石斛种植的基质时,首先应该了解栽培基质的物理特性,并根据基质的理化特

性进行合理的搭配使用,只有这样才能有效提高霍山石斛的种植成活率,以充分地开发霍山石斛资源。

参考文献

- [1] 包雪声,顺庆生,陈立钻,等. 中国药用石斛[M]. 上海:复旦大学出版社,2001.
- [2] 肖强,杨丛,张峥,等. 不同仿生态栽培方式对铁皮石斛多糖积累影响[J]. 中国农学通报,2015,31(10):142-147.
- [3] 姚亮,彭代银,俞年军,等. 正交试验优化霍山石斛总多糖提取工艺[J]. 安徽中医药大学学报,2016,35(4):83-87.
- [4] 魏刚,顺庆生,李名海,等. 中华仙草-霍山石斛[M]. 成都:四川科学技术出版社,2015.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [6] 安彦峰,张雅琼,周路明,等. 铁皮石斛栽培基质的研究进展[J]. 中国药房,2014,25(27):2581-2583.
- [7] 张毅. 铁皮石斛的仿生栽培[D]. 南昌:南昌大学,2014.
- [8] 钱文林,张建霞,吴坤林,等. 霍山石斛种苗繁殖与栽培研究[J]. 热带亚热带植物学报,2013,21(3):240-246.

Effect of Different Cultivation Soil on Content of *Dendrobium huoshanense* Total Polysaccharide

YAO Liang^{1,2}, YU Nianjun^{1,2}, PENG Daiyin^{1,2}, CHEN Weidong², WANG Xinyu^{1,2}, HE Xianglin³

(1. Anhui Academy of Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Institute of Drug Metabolism, Hefei, Anhui 230012; 3. Huoshan Changchong Chinese Medicine Development Co. Ltd., Huoshan, Anhui 237266)

Abstract: Taking *Dendrobium huoshanense* as test material, *Dendrobium huoshanense* were picked in harvest period which were cultivated in different cultivation soil and the content of total polysaccharide of which were determined by phenol-sulfuric acid method, to explore the effects of different cultivation soil on total polysaccharide content of *Dendrobium huoshanense*. The results showed that the content of total polysaccharide in different cultivation soil were: S1 (sawdust + gravel, greenhouses) > S3 (pine bark + gravel, greenhouses) > S4 (coconut shell + gravel, greenhouses) > S2 (gravel, greenhouses) > S5 (gravel, bionic wild cultivation). There were significant differences among the total polysaccharide content *Dendrobium huoshanense* which cultivated in different cultivation soil as the results of statistical analysis. The cluster analysis data showed that *Dendrobium huoshanense* which cultivated in different cultivation substrate could be divided into four categories; S1 alone class; S3 a separate class; S4 a separate class; S2 and S5 a class. This study provided the reference for selecting the best type of cultivation soil of *Dendrobium huoshanense* and preliminary determining the type cultivation soil, in order to develop *Dendrobium huoshanense* resources adequately.

Keywords: *Dendrobium huoshanense*; cultivation soil; total polysaccharide