

张 杰,许凤国. 高产和高生物活性的铁皮石斛液体培养体系研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(6):43-47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.06.010

高产和高生物活性的铁皮石斛液体培养体系研究

张 杰¹, 许凤国²

(1. 苏州天成新农生物科技有限公司, 江苏苏州 215000; 2. 中国药科大学, 江苏南京 210009)

摘要:通过对野生铁皮石斛的定向诱导和逐步驯化,筛选适合液体悬浮生长的铁皮石斛原球茎,并对其 ITS(内转录间隔区)和 *RbcL* 进行分子鉴定。在此基础上,建立了适合铁皮石斛原球茎快速生长的液体培养体系,对蛋白、多糖、醇浸出物、金属含量等成分进行检测分析。结果发现,以 1/2MS + 2.0 mg/L KT(激动素) + 0.5 mg/L NAA(萘乙酸) + 2.5% 蔗糖 + 0.6% 甘露糖 + 30 g/L 马铃薯提取物为铁皮石斛原球茎液体培养基,经 5 周液体培养,采收原球茎(318.3 ± 22.5) g/L(鲜质量),平均生长率为(9.7 ± 0.59) g/(L · d)(鲜质量),单个最大鲜质量为 23.7 g,多糖含量为(19.09 ± 1.05)%,醇浸出物含量为(37.82 ± 3.50)%,蛋白质含量为 42.51%,其中精氨酸含量高达 19.23 mg/g,铅、镉、砷、汞、铜等金属含量远低于最高限定标准。结果表明,采用该液体培养体系,可培育生产出高产和高生物活性的铁皮石斛。

关键词:铁皮石斛;原球茎;液体培养;ITS; *RbcL*

中图分类号: S567.23 + 9.04 + 3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2019)06-0043-05

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)是一种珍稀中草药,具有生津养胃、抗衰老、抗疲劳、降血糖、保肝护肝、抗肿瘤和增强免疫力等作用^[1-4]。在自然环境条件下,野生铁皮石斛对生存环境要求苛刻,种子萌发需要共生菌等作用^[5],加上毫无节制过度采集,野生铁皮石斛已被列为濒危物种^[6]。目前广泛采用传统方式种植铁皮石斛中草药,但这种种植培育方式不仅需占用大量土地,培育周期长达 3 年,农药残留和重金属污染普遍严重,不同种石斛混合种植时,易造成异花传粉和杂交变种,而且种植使用大量无机化肥,易造成环境污染和品质下降等问题。为解决铁皮石斛这种传统珍稀中草药种植所面临的问题,培育品质纯正、无污染、高生物产量和高生物活性的铁皮石斛,本研究利用植物组织培养技术,建立了一种新型液体培养体系,培育生产高质量和高生物活性铁皮石斛珍稀中草药,可直接转化到铁皮石斛中试进行大规模商业化培育生产。

1 材料与方法

1.1 铁皮石斛的定向诱导和液体培养体系

1.1.1 铁皮石斛愈伤组织诱导 试验于 2015 年在江苏省苏州市进行。以浙江雁荡山野生铁皮石斛茎段为外植体,消毒处理,在 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 2% 蔗糖的固体琼脂培养基上进行愈伤组织细胞诱导,培养温度为 25 ℃,采用全光谱 LED(发光二极管)灯,光—暗周期 12 h—

12 h,光照度 1 800 lx。

1.1.2 铁皮石斛原球茎的诱导和液体悬浮驯化 以铁皮石斛愈伤组织细胞为材料,在 1/2MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L 2,4-D + 2% 蔗糖的固体琼脂培养基上定向诱导原球茎的产生。在 1/2MS + 2.0 mg/L KT + 2% 蔗糖 + 500 mg/L 活性炭的固体琼脂培养基上,可实现原球茎的快速生长增殖。将铁皮石斛原球茎转接到 1/2MS + 2% 蔗糖液体培养基中,逐步悬浮驯化,筛选适合液体悬浮生长的铁皮石斛原球茎新品系。培养环境条件均为 25 ℃,采用全光谱 LED 灯,光—暗周期 12 h—12 h,光照度 1 800 lx。

1.1.3 铁皮石斛液体培养体系 将适合液体悬浮生长的铁皮石斛原球茎新品系培育在 1/2MS + 2.0 mg/L KT + 0.5 mg/L NAA + 2.5% 蔗糖 + 0.6% 甘露糖 + 30 g/L 马铃薯提取物的液体培养基中,将盛有液体培养基的三角瓶灭菌,于 100 r/min 悬浮液体培养,室温 25 ℃,光质 5:1 LED 红蓝光,光照度 2 500 lx,光—暗周期 12 h—12 h,液体培养 5 周。

1.2 铁皮石斛分子鉴定和系统进化分析

用无菌水冲洗铁皮石斛原球茎表面培养液,用无菌吸水纸吸去表面浮水,采用 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法提取铁皮石斛基因组 DNA。采用引物 P_{IT}(5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAA-3')/P_{IT4}(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[7]进行 ITS(内转录间隔区)序列扩增,采用引物 1F(5'-ATGTCACCAACAACAGAAAC-3')/1360R(5'-CTTCACAAGCAGCAGCTAGTTC-3')^[8]进行 *rbcL* 序列扩增。将 PCR 产物切胶纯化回收,将纯化后的产物导入 pEASY-T3(TransGen Biotech),送至苏州金唯智生物科技有限公司测序。

采用 NCBI BLAST 在线软件对铁皮石斛 ITS 和 *rbcL* 序列进行比对分析,并从 NCBI 下载相关 ITS 和 *rbcL* 序列用于构建系统树。用 MEGA 7.0 构建邻接系统树,采用 Clusta IW 序列比对,系统树自检 1 000 次。

收稿日期:2017-11-02

基金项目:教育部新世纪优秀人才计划(编号:NCET-13-1036)。

作者简介:张 杰(1974—),女,河北衡水人,博士,高级工程师,从事基于生物制药技术的中草药培育工作。E-mail:759041108@qq.com。

通信作者:许凤国,博士,教授,博士生导师,从事药物分析和药理毒理等方面的研究。E-mail:1020122237@cpu.edu.cn。

1.3 铁皮石斛营养成分检测和分析

1.3.1 多糖含量测定 铁皮石斛原球茎干品和铁皮枫斗粉碎过 100 目筛, 100 °C 热水回流, 浸提 2 h, 离心过滤, 取上清。上清液直接采用二硝基水杨酸 (DNS) 法^[9]测定总糖 ($C_{\text{总糖}}$)、还原糖 ($C_{\text{还原糖}}$) 和多糖含量 ($C_{\text{多糖}}$)。

$$C_{\text{多糖}} = C_{\text{总糖}} - C_{\text{还原糖}} \quad (1)$$

以葡萄糖为标准品, 制作测定标准曲线, 为 $y = 1.981x - 0.0925$, $r^2 = 0.992$ 。

1.3.2 醇浸出物含量测定 根据 2015 年版《中国药典》醇溶性浸出物测定方法^[10], 采用热浸法测定铁皮石斛原球茎干品和铁皮枫斗的醇浸出物含量。

1.3.3 氨基酸营养成分测定 根据国家食品氨基酸测定方法^[11], 采用 OPA/FMOC (邻苯二醛/9-苄甲基氯甲酸甲酯) 全自动柱前分析 - AminoQuant 氨基酸分析法测定铁皮石斛原球茎氨基酸成分组成。

1.3.4 金属元素含量测定 根据 2010 年版《中国药典》元素检测分析方法^[12], 采用安捷伦电感耦合等离子体质谱仪

(Agilent 7500ce ICP-MS) 对铁皮石斛原球茎进行元素含量的检测分析。

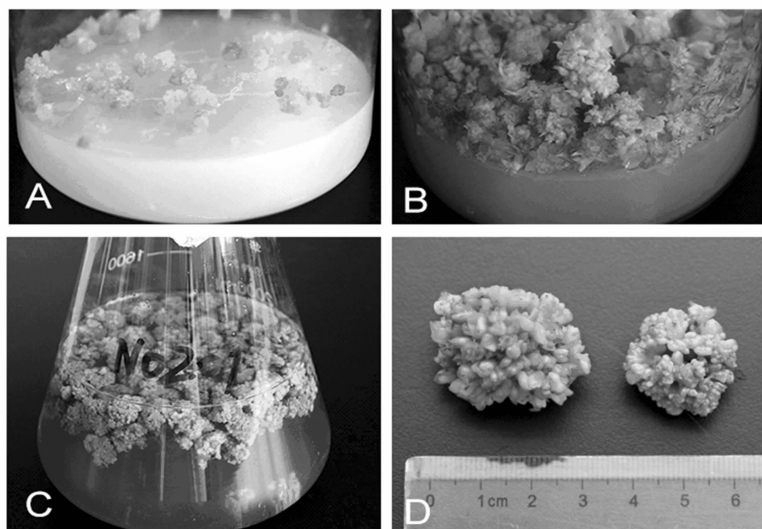
1.4 数据统计和分析

采用 Origin 8.0 对试验数据进行统计和分析。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛的定向诱导和悬浮驯化

以野生铁皮石斛茎段为材料, 在 $MS + 2.0 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 2\%$ 蔗糖的琼脂固体培养基中, 经 45 d 诱导培养, 产生黄绿色颗粒状愈伤组织 (图 1-A)。将愈伤组织转接到含有 $0.5 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 1.0 \text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 2\%$ 蔗糖的 1/2MS 固体培养基上, 经 40 d 诱导, 会形成 6~8 mm 铁皮石斛原球茎 (PLB)。为实现原球茎在固体培养基上的快速生长, 则可采用在 1/2MS 固体培养基中添加 $2.0 \text{ mg/L KT} + 2\%$ 蔗糖 + 500 mg/L 活性炭 (图 2-B) 的方法进行快速增殖培养。



A—愈伤组织; B—原球茎; C—液体培养体系; D—液体培养原球茎
图1 不同培养条件下铁皮石斛的不同组织形态

在铁皮石斛液体培育生长中, 种源的选择是影响铁皮石斛培育的重要因素。首先在固体培养基中, 选择状态好的铁皮石斛原球茎, 将其转接到 1/2MS + 2% 蔗糖液体培养基中, 不断驯化筛选, 直至筛选到适合液体悬浮生长的铁皮石斛原球茎品系。

2.2 铁皮石斛 ITS 和 *rbcl* 分子克隆及系统进化分析

不同中药物种的用药方式和药理作用均有很大不同, 仅依赖植物形态学差异, 很难实现中草药类别的鉴定区分^[13-14]。随着分子生物学的发展, 可利用由不同核酸序列组成的 DNA 数据库在不同分类水平上将其区分开^[15]。在药用植物分类鉴定中, 最常采用的是 DNA 条码, 这些 DNA 数据库是由母系遗传的叶绿体基因序列 (包括 *matK*、*rbcl*、*psbA-trnH* 和 *atpF-atpH* 间隔区) 和核糖体 RNA 内部转录间隔区的组成^[17]。

采用引物 PF1/PR4 进行 ITS 序列扩增, 得到 748 bp PCR 产物 (图 2), 用 NCBI BLAST 进行比对分析, 发现该序列产物是由 18S 核糖体 RNA 部分序列、ITS1、5.8S 核糖体 RNA、ITS2

全部序列、26S 核糖体 RNA 部分序列组成的。采用引物 1F/1360R 进行 *rbcl* 序列扩增, 得到 1 381 bp 的 *rbcl* 部分基因序列 (图 2)。

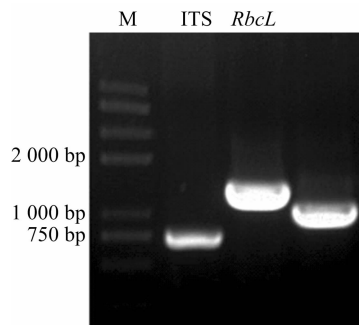
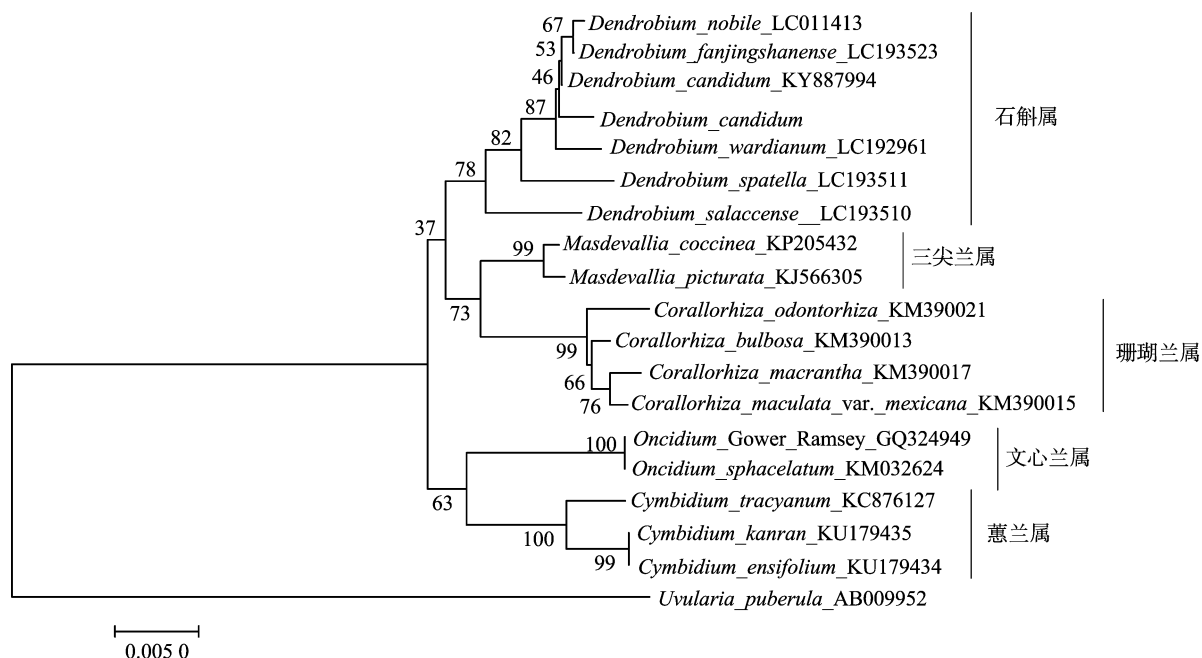


图2 ITS 和 *RbcL* 凝胶电泳结果

rbcl 系统进化分析显示, 系统树将不同兰科植物分成 5 支独立分支, 这些独立分支分别属于石斛属、三尖兰属、珊瑚兰属、文心兰属和蕙兰属 5 个兰科植物属; 同时, 笔者诱导和

筛选出的原球茎属于石斛属(图3)。由于 *rbcL* 在药用植物中仅有适度变异率^[17],所以在兰科植物中,*rbcL* 系统树仅能区分兰科属间的分类关系(图3)。ITS 具有高的变异率,最常用于植物系统进化研究。ITS 系统进化不仅可区分鉴定药用植物的种间关系,而且可用于药用植物种下关系的鉴定区分^[15,18]。根据不同石斛 ITS 构建的 N-J(邻接)系统进化树

可见,ITS 不仅可将石斛属不同物种区分开,而且还将不同铁皮石斛种聚类成一独立分支(图4)。经 *rbcL* 和 ITS 分子鉴定,本研究诱导筛选出的悬浮生长原球茎属于铁皮石斛种(图4)。因此,可将具有适度变异率的 *rbcL* 和高频变异率的 ITS 互补交替用于石斛物种的分子鉴定,可在分子水平上对铁皮石斛进行质量检测 and 品质管控。



N-J 系统树自检 1 000 次, 黑斜体部分为目标检测的铁皮石斛。下图同

图3 根据兰科不同植物 *rbcL* 构建的 N-J 系统树

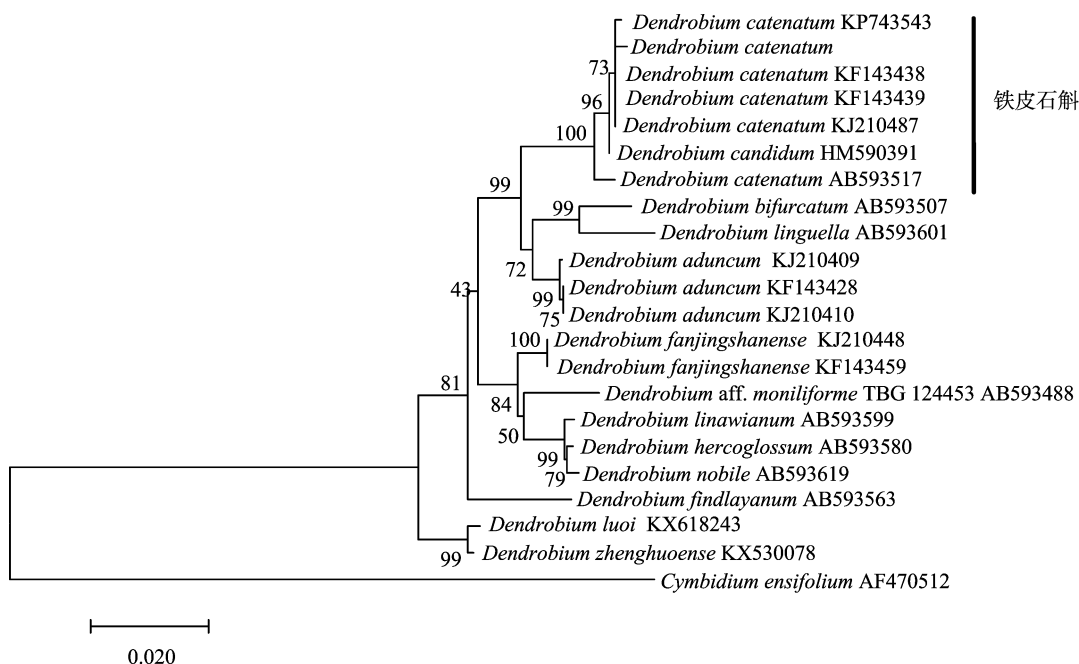


图4 根据不同石斛属 ITS 构建的 N-J 系统树

2.3 液体培养体系下铁皮石斛生物产量检测分析

经 *rbcL* 和 ITS 分子鉴定,证实本研究诱导筛选的悬浮生长新品系确实是铁皮石斛种。将原球茎新品系培养于优化建立的 $1/2MS + 2.0 \text{ mg/L KT} + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 2.5\%$ 蔗糖 +

0.6% 甘露糖 + 30 g/L 马铃薯提取物的液体培养体系下,采用 $5:1$ 红蓝光光质摇床液体培养。在 2 L 三角瓶中接种 $(45.4 \pm 5.6) \text{ g/L}$ 原球茎,经 5 周液体培养,发现铁皮石斛原球茎生长状态良好,呈嫩绿色(图 1-C,表 1),可采收铁皮石

斛原球茎(318.3 ± 22.5) g/L (鲜质量)和(32.1 ± 2.5) g/L (干质量),平均鲜质量生长率为(9.7 ± 0.59) g/(L · d) (表 1)。同时,发现铁皮石斛原球茎大小均在(2.0 ± 0.5) cm,单个最大可生长至 3.2 cm,鲜质量为 23.7g (图 1-D)。

表 1 在液体培养体系下铁皮石斛的生物产量

鲜接种量 (g/L)	鲜采收量 (g/L)	干采收量 (g/L)	鲜生长速率 [g/(L · d)]
45.4 ± 5.6	318.3 ± 22.5	32.1 ± 2.5	9.7 ± 0.59

注:试验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示($n=3$)。

2.4 液体培养体系下铁皮石斛营养成分检测分析

铁皮石斛含有许多药用活性物质成分,如多糖、萜类、黄酮类和生物碱等^[2,19-20],其中多糖是铁皮石斛最为重要的一类生物活性物质^[2,20],现代药理研究表明,铁皮石斛多糖具有抗氧化、保肝、降血脂、增强免疫力和抗肿瘤等功能^[2-3]。其

中,石斛多糖含量标准也是评价铁皮石斛质量差异的重要参数指标。通过对液体培养铁皮石斛原球茎和传统种植铁皮枫斗多糖检测分析,发现采用该液体培养体系培育生产的铁皮石斛原球茎多糖含量为(19.09 ± 1.05)%,铁皮枫斗多糖含量为(14.35 ± 0.21)% (表 2),铁皮石斛原球茎多糖含量是铁皮枫斗的 1.33 倍(单因素方差分析, $P<0.01$),总糖含量是铁皮枫斗的 1.7 倍(单因素方差分析, $P<0.01$)。

在铁皮石斛中,有许多生物活性物质如生物碱和黄酮类等都具有醇溶性,根据 2015 年《中国药典》对铁皮石斛醇浸出物含量的测定方法,对铁皮石斛原球茎和铁皮枫斗醇浸出物测定结果发现,采用该液体培养体系培育生产的铁皮石斛原球茎醇浸出物是(37.82 ± 3.50)%,铁皮枫斗醇浸出物是(5.77 ± 0.14)% (表 2),二者相差 5.55 倍(单因素方差分析, $P<0.01$)。

表 2 铁皮石斛多糖和醇浸出物含量比对分析

检测对象	还原糖含量(%)	多糖含量(%)	总糖含量(%)	醇浸出物含量(%)
铁皮石斛原球	12.68 ± 0.19	19.09 ± 1.05	31.78 ± 0.95	37.82 ± 3.50
铁皮枫斗	4.63 ± 0.79 [#]	14.35 ± 0.21 [#]	18.99 ± 1.01 [#]	5.77 ± 0.14 [*]

注:#代表糖类经单因素方差分析(One - Way ANOVA)差异极显著($P<0.01$);*代表醇浸出物经单因素方差分析差异极显著($P<0.01$)。

此外,对采用该液体培养体系培育生产的铁皮石斛原球茎氨基酸进行检测分析,发现铁皮石斛原球茎蛋白含量占细胞干质量的 42.51%。共检测出 17 种基本氨基酸,精氨酸含量高达 19.23 mg/g,是其他铁皮石斛精氨酸含量的 3.34 倍^[21];在铁皮石斛原球茎蛋白中,必需氨基酸占 57.25%,鲜味氨基酸占 82.33%,药用氨基酸占 82.90% (表 3),必需氨基酸和药用氨基酸含量远高于其他培育方式培养的铁皮石斛^[21]。

表 3 在液体培养体系下铁皮石斛原球茎氨基酸的营养组成和含量分析

氨基酸 类型	含量 (mg/100 g)	组成比例 (%)	氨基酸 类型	含量 (mg/100 g)	组成比例 (%)
Asp ^{bdf}	127.20	2.30	Met ^{af}	35.89	0.84
Glu ^{bdf}	879.31	20.68	Phe ^{acf}	36.39	0.86
Ser ^{bce}	140.79	3.31	Ile ^a	9.74	0.23
His ^a	133.33	3.14	Leu ^{af}	74.11	1.74
Gly ^{bdef}	276.71	6.51	Pro ^{cf}	27.10	0.64
Thr ^{ae}	76.71	1.80	Σa	2 434.31	57.25
Arg ^{afdl}	1 921.89	45.20	Σb	1 787.53	42.04
Ala ^{bde}	295.92	6.96	Σc	107.58	2.53
Tyr ^{bef}	44.09	1.03	Σd	3 501.03	82.33
Lys ^{af}	102.01	2.40	Σe	790.13	18.58
Cys ^b	26.51	0.62	Σf	3 524.7	82.90
Val ^a	44.24	1.04	T	4 251.94	100

注:Asp 为天冬氨酸,Glu 为谷氨酸,Ser 为丝氨酸,His 为组氨酸,Gly 为甘氨酸,Thr 为苏氨酸,Arg 为精氨酸,Ala 为丙氨酸,Tyr 为酪氨酸,Lys 为赖氨酸,Cys 为半胱氨酸,Val 为缬氨酸,Met 为甲硫氨酸,Phe 为苯丙氨酸,Ile 为异亮氨酸,Leu 为亮氨酸,Pro 为脯氨酸。酸解后,天冬酰胺转化为天冬氨酸,谷氨酰胺转化为谷氨酸,色氨酸酸解被破坏。上标 a 表示必需氨基酸,b 表示非必需氨基酸,c 表示芳香族氨基酸,d 表示鲜味氨基酸,e 表示甜味氨基酸,f 表示药用氨基酸;T 表示总氨基酸,Σa 表示必需氨基酸总量,Σb 表示非必需氨基酸总量,Σc 表示芳香族氨基酸总量,Σd 表示鲜味氨基酸总量,Σe 表示甜味氨基酸总量,Σf 表示药用氨基酸总量。

另外,对采用该液体培养体系培育生产的铁皮石斛原球茎元素检测分析发现,金属元素含量排序为钾 > 钙 > 镁 > 钠 > 锰 > 铁 > 锌 > 铝 > 铜 > 铬 > 铅 > 镉 > 汞,其中钾含量最高,为 14 953 mg/kg (表 4)。对铁皮石斛原球茎中的铅、镉、砷、汞和铜 5 种重金属含量比对分析^[17,21-22],发现采用该液体培养体系培育生产的铁皮石斛原球茎重金属含量远低于《药用植物及制剂外贸绿色行业标准》(WM/T 2—2004)、浙江省《无公害铁皮石斛地方标准》(DB33/T 635.4—2007)最高限量标准和 FAO/WHO(联合国粮食及农业组织/世界卫生组织)推荐的最高参考剂量^[17]。

表 4 在液体培养体系下铁皮石斛原球茎的元素组成和含量分析

元素种类	含量 (mg/kg)	元素种类	含量 (mg/kg)
硒	0.012	铜	1.38
砷	0.050	钠	626.7
钾	14 953	铝	1.85
镁	1 186	铬	1.15
钙	1 257	铅	0.166
锰	125	镉	0.021
铁	116	汞	0.000 5
锌	78.2		

3 讨论与结论

近几年,随着人们生活水平的提高和生活节奏的加快,人们更加重视养生保健问题^[23-24]。由于铁皮石斛具有高医药生物活性,很多铁皮石斛医药保健品和药用原材料都很难满足市场需求,铁皮石斛中草药产业正处于蓬勃发展时期。

铁皮石斛原球茎被认为是铁皮石斛药物活性最强的部位,中国传统医书《名医别录》和《中药大辞典》等中均有记载,认为铁皮石斛原球茎是“极嫩之尖”,被誉为“无上妙品”。何铁光等从铁皮石斛原球茎中分离出 1 种新型多糖

DCCP1a-1, 该多糖具有明显的肿瘤抑制效果, 同时还具有提高胸腺和脾指数的能力^[25]。Park 等通过对铁皮石斛原球茎、铁皮石斛多重茎段、铁皮石斛地上部分和地下部分的生物活性成分检测分析, 发现铁皮石斛原球茎中的黄酮类和酚类等生物活性含量最高^[4]。

笔者采用建立优化的 1/2MS + 2.0 mg/L KT + 0.5 mg/L NAA + 2.5% 蔗糖 + 0.6% 甘露糖 + 30g/L 马铃薯提取液体培养体系, 培育生产的铁皮石斛原球茎不仅生物产量高, 而且药物营养成分丰富, 不存在农残和重金属污染, 解决了铁皮石斛传统人工种植面临的诸如占用大量耕地、培育周期长、农残重金属污染、异花传粉品质下降和批次成分不稳定等问题。在 2 L 三角瓶中, 经 5 周液体培养, 可采收铁皮石斛原球茎 (318.3 ± 22.5) g/L (鲜质量), 平均生长率高达 (9.7 ± 0.59) g/(L · d), 最大单个鲜质量为 23.7g; 如果将该反应体系扩大至 10 倍, 则可实现 1 m² 洁净间生产能力相当于 333.33 m² 耕地面积的年产量。此外, 对该液体培育的铁皮石斛原球茎药物营养成分和元素检测分析发现, 石斛多糖含量为 (19.09 ± 1.05)%, 醇浸出物含量为 (37.82 ± 3.50)%, 远高于传统种植的铁皮枫斗含量。其中采用该液体培养体系培育生产的铁皮石斛原球茎蛋白含量为 42.51%, 精氨酸含量高达 19.23 mg/g, 铅、镉、砷、汞和铜等金属含量远低于最高限定标准。整个液体培育过程均采用无性繁殖的植物组织培养技术, 种源稳定, 不易退化, 可将该液体培养体系直接放大应用到大型生物反应器中, 大规模商业化培育生产高生物活性的铁皮石斛产品。

参考文献:

- [1] He T B, Huang Y P, Yang L, et al. Structural characterization and immunomodulating activity of polysaccharide from *Dendrobium officinale* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 83: 34–41.
- [2] Tang H X, Zhao T W, Sheng Y J, et al. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: a review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and industrialization [J]. Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine, 2017: 1–19.
- [3] Luo Q U, Tang Z H, Zhang X F, et al. Chemical properties and antioxidant activity of a water – soluble polysaccharide from *Dendrobium officinale* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 219–227.
- [4] Park C M, Kwon J C, Han N K, et al. Comparative study of protocorm – like body and multiple shoots from *Dendrobium candidum* on biological activities [J]. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea, 2014, 40(1): 29–36.
- [5] Ng T B, Liu J, Wong J H, et al. Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(5): 1795–1803.
- [6] Takamiya T, Wongsawad P, Tajima N, et al. Identification of dendrobium species used for herbal medicines based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2011, 34(5): 779–782.
- [7] Cheng K, Lo S F, Lee C Y, et al. The rDNA sequence analysis of three dendrobium species [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2004, 12(4): 367–369.
- [8] Goldman D H, Freudenstein J V, Kores P J, et al. Phylogenetics of Arethuseae (Orchidaceae) based on plastid *matK* and *rbcL* sequences [J]. Systematic Botany, 2001, 26(3): 670–695.
- [9] 余志坚, 陈传红, 赵晋宇. DNS 法检测食用菌多糖含量条件优化研究 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 259–260.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 282–283.
- [11] 国家标准化委员会. 食品中氨基酸的测定: GB/T 5009.124—2003 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 附录 67–69.
- [13] Adams P B. Systematics of Dendrobiinae (Orchidaceae), with special reference to Australian taxa [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2011, 166(2): 105–126.
- [14] Xu S Z, Li D Z, Li J W, et al. Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from mainland Asia [J]. PLoS One, 2015, 10(1): 0115168.
- [15] Li M, Cao H, But P P, et al. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes [J]. Journal of Systematics and Evolution, 2011, 49(3): 271–283.
- [16] Feng S G, Jiang Y, Wang S, et al. Molecular identification of *Dendrobium* species (Orchidaceae) based on the DNA barcode ITS2 region and its application for phylogenetic study [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(9): 21975–21988.
- [17] 倪张林, 喻 晴, 何玲吉, 等. 大棚种植铁皮石斛的重金属含量与健康风险评估 [J]. 浙江农业科学, 2016, 57(6): 844–846.
- [18] Li M, Jiang R W, Hon P M, et al. Authentication of the anti – tumor herb baihuasheshecao with Bioactivemarker compounds and molecular sequences [J]. Food Chemistry, 2010, 119(3): 1239–1245.
- [19] 陈晓梅, 王春兰, 杨峻山, 等. 铁皮石斛化学成分及其分析的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(19): 1634–1640.
- [20] Ye Z, Dai J R, Zhang C G, et al. Chemical differentiation of *Dendrobium officinale* and *Dendrobium devonianum* by using HPLC fingerprints, HPLC – ESI – MS, and HPTLC analyses [J]. Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine, 2017: 1–9.
- [21] 罗绪强, 周金星, 张桂玲, 等. 黔产铁皮石斛不同部位多糖、氨基酸及必需元素含量 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 150–153.
- [22] 诸 燕, 苑 鹤, 李国栋, 等. 铁皮石斛中 11 种金属元素含量的研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 356–360.
- [23] 唐姣玉, 谢宇洁, 刘兆辉, 等. 大蒜素对热应激湘黄鸡生产性能及营养物质代谢的影响 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 638–641.
- [24] 江 彬, 毕银丽, 申慧慧, 等. 氮营养与 AM 真菌协同对玉米生长及土壤肥力的影响 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 327–332.
- [25] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCCP1a-1 的理化性质及抗肿瘤活性 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(4): 578–583.