

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2021.30306

王健, 甄彩云, 魏练平, 常艳, 蔡永萍, 金青. 铁皮石斛茎多糖、木质素积累规律及木质素单体类型鉴定[J]. 植物科学学报, 2021, 39(3): 306-315

Wang J, Zhen CY, Wei LP, Chang Y, Cai YP, Jin Q. Accumulation regularity of polysaccharides and lignin and identification of lignin monomer types in stems of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. *Plant Science Journal*, 2021, 39(3): 306-315

铁皮石斛茎多糖、木质素积累规律及木质素单体类型鉴定

王 健, 甄彩云, 魏练平, 常 艳, 蔡永萍, 金 青*

(安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘 要: 以不同年份铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)的茎为材料, 对其进行多糖、单糖以及木质素含量的测定以及多元线性回归分析, 同时对铁皮石斛的茎进行番红-固绿和 Mäule 染色, 并利用 FTIR、¹H-NMR 技术对铁皮石斛茎中木质素单体的类型进行鉴定。结果显示, 铁皮石斛茎木质素的积累与葡萄糖含量呈显著正相关, 与多糖含量、甘露糖含量及甘露糖和葡萄糖的比值呈显著负相关, 说明木质素的沉积对多糖的积累有一定影响。铁皮石斛茎维管束的木质部和鞘均含有木质素。随着年份的增加, 铁皮石斛茎的维管束鞘厚壁细胞厚度增加, 维管束鞘的发达程度增大。Mäule 染色及 FTIR 和 ¹H-NMR 分析结果显示, 铁皮石斛的茎主要含有愈创木基型(G 型)和紫丁香基型(S 型)木质素, 同时含有微量的对羟基苯基型(H 型)木质素。G 型木质素主要分布在维管束的木质部, S 型木质素主要分布在维管束鞘厚壁细胞中。铁皮石斛茎 S/G 比值随年份增加呈上升趋势。

关键词: 铁皮石斛; 多糖; 木质素; 木质素单体类型

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2021)03-0306-10

Accumulation regularity of polysaccharides and lignin and identification of lignin monomer types in stems of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

Wang Jian, Zhen Cai-Yun, Wei Lian-Ping, Chang Yan, Cai Yong-Ping, Jin Qing*

(College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The stems of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo in different years were used as study materials. The contents of polysaccharides, monosaccharides, and lignin were determined, and the relationships among them were analyzed by multiple linear regression analysis. The *D. officinale* stems were stained using saffron, fast green, and Mäule staining, and the lignin monomer types were determined by Fourier transform infrared (FTIR) and proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy. As a result, lignin accumulation was significantly positively correlated with glucose content, and significantly negatively correlated with polysaccharide and mannose content and the mannose to glucose ratio. These results suggested that the accumulation of polysaccharides was influenced by the deposition of lignin. The xylem and sheath of the vascular bundles in the *D. officinale* stems contained lignin.

收稿日期: 2020-11-03, 修回日期: 2021-01-12。

基金项目: 安徽省高校自然科学研究项目(KJ2020A0114); 安徽省高校协同创新计划(GXXT-2019-043); 安徽省重大科技项目(17030701031); 省级大学生创新创业项目(201910364255)。

This work was supported by grants from the Universities Natural Science Research Project of Anhui (KJ2016A224), University Synergy Innovation Program of Anhui (GXXT-2019-043), Major Science and Technology Project in Anhui (17030701031), and Provincial University Student Innovation and Entrepreneurship Training Programs (201910364255).

作者简介: 王健(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物次生代谢(E-mail: 1491284283@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: 2028712665@qq.com)。

With the increase in years, the thickness of the vascular thick-walled cells in the *D. officinale* stems increased, and the degree of development of the vascular bundle sheaths increased. Mäule staining and FTIR and ^1H -NMR spectrometry showed that the stems of *D. officinale* mainly contained guaiacyl lignins (G lignins) and syringyl lignins (S lignins), as well as trace hydroxyl-phenyl lignins (H lignins). G lignins were mainly distributed in the xylem, while S lignins were mainly distributed in the thick-walled cells. The S/G ratio in the *D. officinale* stems showed an upward trend with increasing years.

Key words: *Dendrobium officinale*; Polysaccharides; Lignin; Lignin monomer types

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 属于兰科石斛属多年生草本植物, 具有较高的药用价值。石斛茎中含有多糖、生物碱、黄酮类等多种有效成分, 石斛多糖具有较强的抗肿瘤和增强免疫力等功能^[1, 2], 2010 年《中国药典》将铁皮石斛单列出来。石斛茎中的黏性物质主要是水溶性多糖, 属于活性多糖。He 等^[3]通过对铁皮石斛茎的 PAS 染色发现茎的薄壁细胞中储存着大量颗粒状的多糖。铁皮石斛单糖组分有多种, 其中甘露糖含量最高, 其次为葡萄糖^[4]。

石斛的主要食用部位是茎, 多鲜食或加工成石斛枫斗等。目前鲜食的消费市场正在逐步扩大^[5]。于增金等^[6]研究发现麻竹 (*Dendrocalamus latiflorus* Munro) 竹笋中的木质素含量过多会降低竹笋的口感及食用率, 说明木质素的积累对其品质有一定影响。鲜食石斛茎时发现, 不同品种或不同年份石斛茎鲜食的口感及残渣差异较大。传统上以“质重、粘牙、口甜、无渣”作为优质石斛的标准^[7]。“质重粘牙”主要与多糖含量有关, “渣”则与茎中的木质素、纤维素等成分有关。木质素一般与纤维素、半纤维素等相互交织在一起^[8]。研究发现铁皮石斛多糖与纤维素呈负相关关系^[9]。而石斛多糖与木质素关系的研究极少。木质素不仅影响石斛的口感, 更不易消化。

一般草本植物中木质素较木本植物的含量少^[10]。草本植物茎木质部发达程度低, 茎中分布着很多维管束。木质素主要积累于维管束中, 使细胞壁变得坚硬^[11]。石斛茎杆的硬度会影响其加工品枫斗的品质。硬度与茎维管束鞘厚壁细胞发达程度存在着明显的关系。丁小余等^[12]根据铁皮石斛形态结构的居群差异及铁皮枫斗加工的情况将铁皮石斛划分为 F(软脚)、H(硬脚)两种类型, 其中 F 型茎基本组织含有多糖, 粘液丰富, 维管束鞘厚壁

细胞不发达, 茎杆柔软可被加工成枫斗, 而 H 型茎维管束鞘厚壁细胞发达, 粘性差, 茎杆较硬, 不易被加工成枫斗。

木质素主要由 3 种单体醇(松柏醇、芥子醇、对香豆醇)通过各种化学键聚合形成复杂的酚类化合物, 分别对应 3 种类型木质素: 愈创木基木质素 (Guaiacyl lignin, G-木质素)、紫丁香基木质素 (Syringyl lignin, S-木质素) 和对-羟基苯基木质素 (Hydroxy-phenyl lignin, H-木质素)^[13]。Mäule 染色可观察植物中不同类型的木质素的分布情况^[14], 其组成及比例可采用色谱法, 如气相色谱 (GC)、液相色谱 (HPLC) 等或光谱法如红外光谱 (FTIR)、核磁共振 (NMR) 等进行检测^[15]。

细胞木质化是植物代谢和发育的生理学过程^[16]。目前关于石斛多糖与木质素关系的研究鲜有报道。本研究以不同年份铁皮石斛的茎为材料, 分析茎多糖和木质素积累的相关性, 比较不同年份铁皮石斛茎的多糖和单糖含量、木质素含量及成分的差异, 研究铁皮石斛茎的多糖与木质素的积累规律, 旨在为深入研究石斛茎成分的积累机制提供理论基础, 并为生产上确定茎的鲜食采收期和石斛枫斗的加工提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

植物材料铁皮石斛来自安徽省六安市金寨大别山林艺植物有限公司。分别取不同年生铁皮石斛新鲜的茎, 105℃杀青后 60℃烘干、粉碎, 过 60 目筛。

1.2 糖含量测定

取上述粉末样品, 参考中华人民共和国药典^[17]的方法测定单糖含量的; 采用苯酚硫酸法测定多糖含量; 采用 HPLC 法测定甘露糖和葡萄糖的含量。

1.3 茎木质素含量测定

木质素含量的测定采用溴乙酐法^[18]测定。取上述粉末样品 15 mg，加入 1 mL 25%的乙酰溴和 40 μ L 高氯酸溶液，混匀，80℃水浴 40 min。冷却，加入 400 μ L 2 mol/L NaOH 和 70 μ L 0.5 mol/L 盐酸羟胺，震荡混匀。取上清 20 μ L，加入冰醋酸 2.98 mL，测定 280 nm 处的吸光值。

1.4 茎番红-固绿染色

铁皮石斛新鲜的茎采用固定液固定。经过脱水、浸蜡、包埋后再进行番红-固绿染色。在显微镜下观察，随机选取维管束外围 1~2 层维管束鞘厚壁细胞，测量细胞壁厚度。

1.5 茎木质素的 Mäule 染色

不同年份茎的石蜡切片采用 1% KMnO₄ 溶液染色 5 min，然后用水漂洗 2 次，转入 15% HCl 浸泡 3 min 后，滴 1 滴浓氨水封片观察。

1.6 茎木质素的提取及 FTIR 检测

参考张浩楠等^[19]的方法提取铁皮石斛不同年份茎木质素。取 1 g 不同年份的烘干样品，加入 10 mL 对甲酚浸润 5 min。加入 20 mL 72%浓硫酸，搅拌 5 min，磁力搅拌器搅拌 1 h，于 3500 g 离心 10 min。吸取上层有机相加入无水乙醚中，搅拌 1 h。静置，弃上层液体，加 100 mL 丙酮溶液，搅拌 1 h，3500 g 离心 10 min。收集上清液，旋蒸至 10 mL 左右。利用木质素不溶于乙醚的特点，滴加到无水乙醚中，混匀离心，沉淀即为木质

素对甲酚(LPS)。

将上述提取的木质素样品与溴化钾(1 mg : 200 mg)混匀，研磨充分，压片，进行 FTIR 检测。

1.7 茎木质素的¹H-NMR 检测

取上述制备的 LPS 样品(5 mg)溶于 0.5 mL 吡啶与乙酸酐(1 : 1)的混合试剂，氮气保护，反应 72 h，加入无水乙醚使其沉淀析出，离心，留沉淀。反复洗涤，得到乙酰化的沉淀，溶于 CDCl₃ 中，进行¹H-NMR 检测。

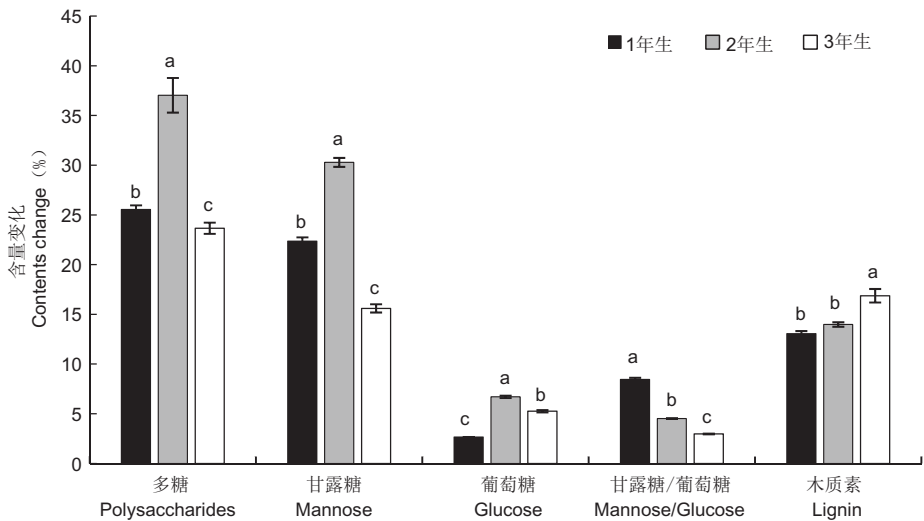
1.8 数据分析

采用 Excel 2019 和 SPSS18 软件进行数据分析，采用 OriginPro 8.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 茎木质素含量与多糖、单糖含量的相关性

本研究发现，铁皮石斛中的多糖、甘露糖和葡萄糖含量均随着年份的增高呈现先上升后下降的趋势(图 1)。其中 2 年生茎含量最高，多糖含量达到 37.03%，甘露糖含量达到 30.28%，葡萄糖含量达到 6.70%；3 年生糖含量急剧下降(多糖 23.66%，甘露糖 15.60%，葡萄糖 5.26%)，甘露糖与葡萄糖的比值随年份的增加呈下降趋势。铁皮石斛的木质素含量随着年份的增加而升高，但 2 年生与 1 年生相比木质素含量变化差异并不显著，1 年生为 13.05%，2 年生为 13.98%，3 年生木质素含量显著增高，达到 16.87%。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。
Value of different case letters indicate significant differences ($P < 0.05$). Same below.

图 1 铁皮石斛不同年份茎多糖、甘露糖、葡萄糖和木质素含量的变化

Fig. 1 Changes in polysaccharide, mannose, glucose, and lignin content in *Dendrobium officinale* stems in different years

本研究对铁皮石斛不同年份茎多糖、甘露糖、葡萄糖及木质素含量之间进行多元线性回归分析(表 1), 结果表明铁皮石斛多糖与甘露糖呈极显著正相关($P_I = 0.001 < 0.01$), 同时与葡萄糖呈显著正相关($P_{II} = 0.035 < 0.05$)。说明多糖的积累与甘露糖、葡萄糖显著相关。而分析木质素与多糖及单糖相关性时发现, 木质素的积累与葡萄糖呈极显著正相关($P_{VI} = 0.004 < 0.01$), 而与多糖呈显著负相关($P_{III} = 0.049 < 0.05$); 与甘露糖呈极显著负相关($P_V = 0.001 < 0.01$); 且与甘露糖和葡萄糖的比值呈极显著负相关($P_{IV} = 0.003 < 0.01$)。

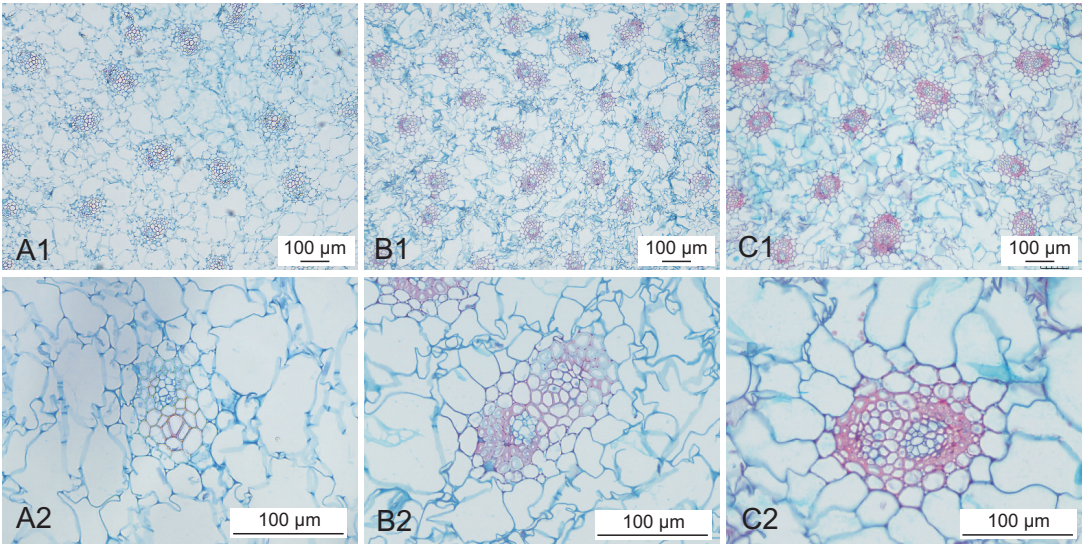
铁皮石斛多糖的积累是由单糖聚合而成, 多糖的合成与甘露糖、葡萄糖等密切相关。上述结果表明铁皮石斛木质素的沉积对多糖的积累有一定影响。

2.2 茎番红-固绿染色结果

番红-固绿染色结果发现, 铁皮石斛维管束中含有木质部和韧皮部, 束状排列于茎、叶等组织。番红能将维管束植物木质化、木栓化和角质化的组织染成红色。固绿能将薄壁细胞、纤维素细胞组织染成绿色。通过番红固绿染色, 可以观察到石斛茎中木质化的细胞壁呈红色, 薄壁细胞呈绿色(图 2)。

表 1 铁皮石斛不同年份茎多糖、甘露糖、葡萄糖及木质素含量多元线性回归分析
Table 1 Multiple linear regression analysis of polysaccharide, mannose, glucose, and lignin content in *Dendrobium officinale* stems in different years

| 多元线性回归分析 Multiple linear regression analysis | 回归方程 Regression equation | t 检验 t-test | 显著性 P |
|--|--|------------------------------------|-----------------------------------|
| 多糖 Polysaccharides(Y_I) | $Y_I = 4.994 + 0.772X_I + 1.270X_{II}$ | $t_I = 5.936$ | $P_I = 0.001$ |
| 甘露糖 Mannose(X_I) | | $t_{II} = 2.723$ | $P_{II} = 0.035$ |
| 葡萄糖 Glucose(X_{II}) | | | |
| 木质素 Lignin(Y_{II}) | $Y_{II} = 21.533 - 0.122X_{III} - 0.638X_{IV}$ | $t_{III} = -2.466$ | $P_{III} = 0.049$ |
| 多糖 Polysaccharides(X_{III}) | | $t_{IV} = -4.875$ | $P_{IV} = 0.003$ |
| 甘露糖/葡萄糖 Mannose to glucose ratio(X_{IV}) | | | |
| 木质素 Lignin(Y_{III})、 甘露糖 Mannose(X_V)、 葡萄糖 Glucose(X_{VI}) | $Y_{III} = 17.088 - 0.27X_V + 0.756X_{VI}$ | $t_V = -5.682$ $t_{VI} = 4.443$ | $P_V = 0.001$ $P_{VI} = 0.004$ |



A₁ ~ C₁: 1~3 年生茎 (100 ×); A₂ ~ C₂: 1~3 年生茎 (400 ×)。下同。
A₁ - C₁: one, two, and three years of stems (100 ×); A₂ - C₂: one, two, and three years of stems (400 ×). Same below.

图 2 铁皮石斛不同年份茎的番红-固绿染色图
Fig. 2 Saffron and fast green staining of *Dendrobium officinale* stems in different years

铁皮石斛茎分别在 100、400 倍下的横切面图显示(图 2)，维管束镶嵌分布在石斛茎中，维管束周围包围着单层至多层的维管束鞘。维管束鞘和木质部都含有木质素，茎中的维管束鞘和木质部被染成红色，韧皮部被染成绿色。随着铁皮石斛茎年份的增长，维管束鞘和木质部的颜色加深。不同年份茎的维管束鞘厚壁细胞的发育程度不同，细胞壁厚度也不一样。

测量不同年份茎维管束鞘厚壁细胞的细胞壁厚度，铁皮石斛的细胞壁厚度随着年份的增长逐渐增加(图 3)，与木质素含量变化趋势一致。说明维管束鞘的厚壁细胞发达程度以及木质素的积累均随着年份的增长而增加。

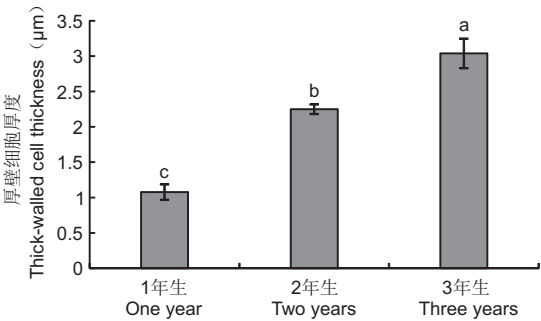


图 3 铁皮石斛不同年份茎维管束鞘厚壁细胞厚度变化
Fig. 3 Thickness of vascular bundle sheath thick-walled cells in *Dendrobium officinale* stems in different years

2.3 茎木质素 Mäule 染色结果

Mäule 染色可以显示出不同类型木质素的分布

情况。木质素紫丁香环(S)经过 Mäule 染色呈红色或红紫色，愈创木基(G)对 Mäule 染色不产生正反应，反应后呈黄色或黄褐色。铁皮石斛茎木质部主要被染成黄色(图 4)，说明主要含有 G 型木质素，维管束鞘厚壁细胞主要被染成红色，也含有黄色，说明厚壁细胞主要含有 G 和 S 型木质素。1 年生的茎中主要呈黄色，含有少量的红色，随着年份的增加，红色逐渐加深，说明厚壁细胞中 S 型木质素逐渐积累。

2.4 茎木质素红外光谱分析

为了检测石斛中木质素单体类型，本研究对不同年份的铁皮石斛进行红外光谱分析。不同的吸收峰对应着木质素单体不同的官能团(图 5)。各官能团的分析结果显示(表 2)，3417 cm^{-1} 附近表示羟基 O-H 伸缩振动；1508 cm^{-1} 附近表示木质素芳香核振动；1327 cm^{-1} 附近表示紫丁香基 CH_2 弯曲振动；1253 cm^{-1} 附近表示愈创木基环加 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动^[20]。不同官能团吸收峰强度不一样，木质素在 1508 cm^{-1} 附近的吸收峰相对比较稳定，故以 1508 cm^{-1} 为基准，对其它官能团吸收峰强度进行计算。

红外光谱检测出铁皮石斛木质素单体类型，分别为 G 型木质素(1259 cm^{-1} 附近)和 S 型木质素(1324 cm^{-1} 附近)，但是并未检测出 H 型木质素(对羟基结构单元特征峰通常出现在 1166 cm^{-1} 附近)^[21]。A1324 / A1259 表示紫丁香基与愈创木基

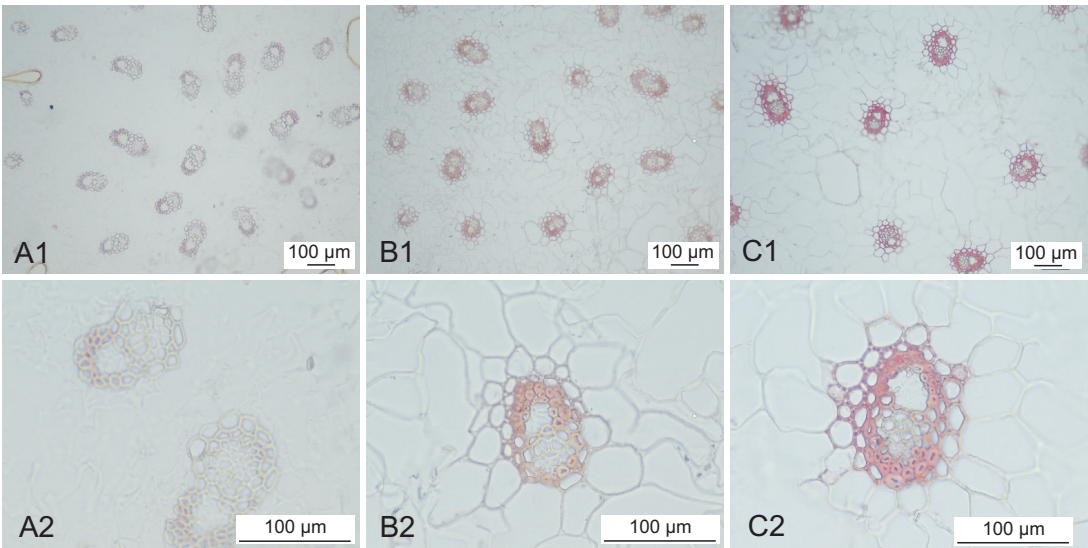


图 4 铁皮石斛不同年份茎的 Mäule 染色图
Fig. 4 Mäule staining of *Dendrobium officinale* stems in different years

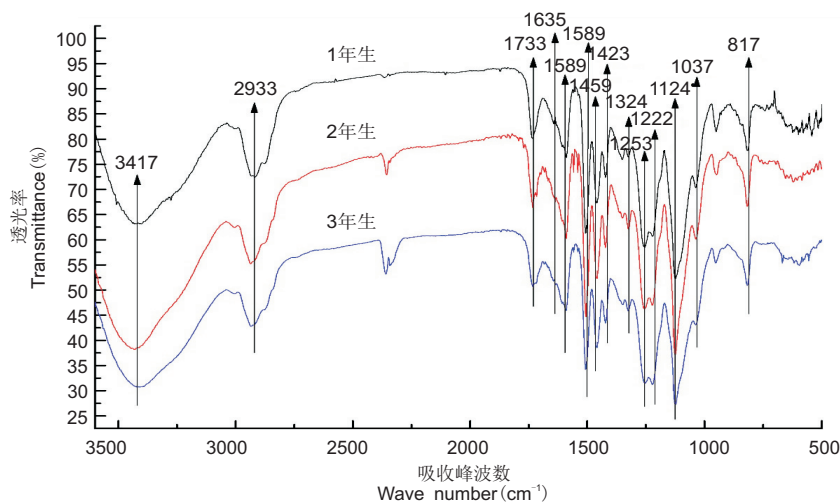


图 5 铁皮石斛不同年份茎的红外光谱

Fig. 5 Infrared spectra of *Dendrobium officinale* stems in different years

表 2 铁皮石斛不同年份茎木质素的红外光谱分析

Table 2 Infrared spectroscopic analysis of lignin in *Dendrobium officinale* stems in different years

| 吸收峰波数 Wave number (cm ⁻¹) | | | 吸收峰归属 Peak assignment |
|--|-------------------|---------------------|---|
| 1 年生 One year | 2 年生 Two years | 3 年生 Three years | |
| 3401 | 3423 | 3419 | 羟基 O-H 伸缩振动 |
| 2933 | 2933 | 2935 | 甲基、亚甲基基团中的 C-H 伸缩振动 |
| 1735 | 1733 | 1731 | 非共轭的酮、羰基和酯中的 C=O 伸缩振动 |
| 1631 | 1635 | 1635 | 羰基共轭芳香基酮 C=O 伸缩振动 |
| 1589 | 1589 | 1589 | 芳香核伸缩振动加上 C=O 伸缩振动 |
| 1506 | 1506 | 1508 | 芳香核振动 |
| 1459 | 1457 | 1459 | 甲基或亚甲基 C-H 变形振动 |
| 1423 | 1423 | 1423 | 苯环骨架结合 C-H 在平面伸缩振动 |
| 1324 | 1324 | 1324 | 紫丁香基 CH ₂ 弯曲振动;愈创木基和紫丁香基的缩合 |
| 1259 | 1253 | 1253 | 愈创木基环加 C = O 伸缩振动 |
| 1222 | 1222 | 1222 | C-C 加 C-O 加 C = O 伸缩振动;缩合 G > 醚化 G |
| 1124 | 1126 | 1124 | 紫丁香核 C-H 面内弯曲 |
| 1037 | 1037 | 1037 | 芳香族 C-H 在平面上的变形振动加仲醇中的 C-O 变形加 C = O 振动 |
| 817 | 817 | 817 | 对甲酚导入苯环上邻位氢原子变角振动 |

的比值，即 S/G 值。铁皮石斛木质素愈创木基占愈创木基和紫丁香基的百分含量 (G%) 随着年份的增加呈下降趋势；紫丁香基占愈创木基和紫丁香基的百分含量 (S%) 随着年份的增加呈上升趋势；S/G 的比值随着年份的增加呈上升趋势 (表 3)，与上述木质素含量变化趋势一致。

2.5 茎木质素¹H-NMR 波谱分析

为进一步验证及鉴定铁皮石斛茎木质素键型，采用¹H-NMR 波谱对石斛木质素单体类型进行分析。铁皮石斛 1 ~ 3 年生茎木质素¹H-NMR 波谱图 (图 6) 中不同的化学位移代表不同的质子类型 (表 4)。化学位移在 7.1 × 10⁻⁶ ~ 6.8 × 10⁻⁶ 处表示愈

表 3 铁皮石斛茎不同类型木质素含量变化

Table 3 Content variation of different types of lignin in *Dendrobium officinale* stems

| 年份 Year | G% | S% | S/G |
|------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 年生 | 63.29 ± 0.391a | 36.71 ± 0.391c | 0.580 ± 0.010c |
| 2 年生 | 61.26 ± 0.927b | 38.74 ± 0.927b | 0.633 ± 0.025b |
| 3 年生 | 59.53 ± 0.432c | 40.47 ± 0.432a | 0.680 ± 0.012a |

注：G%，愈创木基占愈创木基和紫丁香基的百分含量；S%，紫丁香基占愈创木基和紫丁香基的百分含量；S/G，紫丁香基与愈创木基的比值。

Note: G%, percentage of guaiacyl groups in guaiacyl and syringyl groups; S%, percentage of syringyl groups in guaiacyl and syringyl groups; S/G, ratio of syringyl to guaiacyl groups.

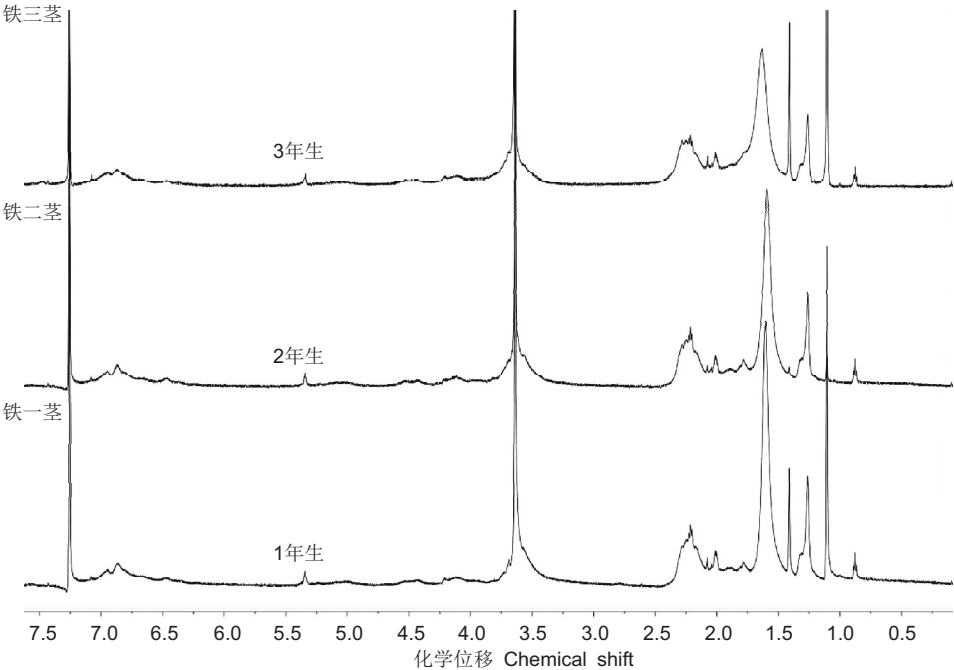


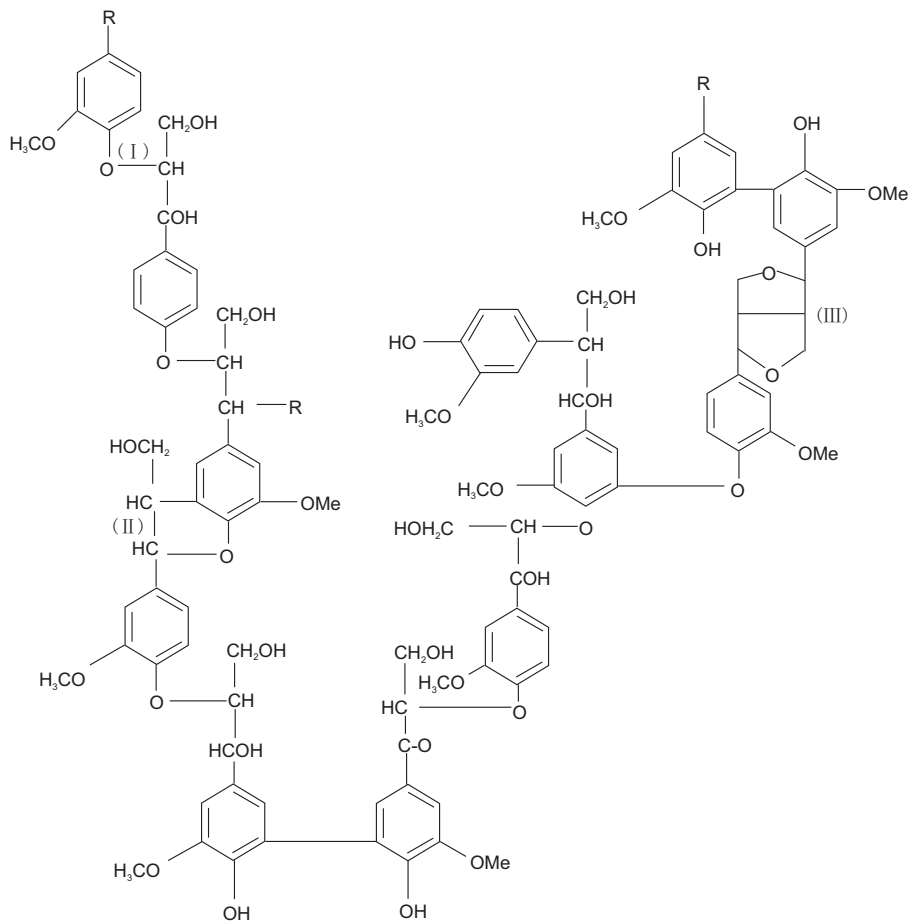
图 6 铁皮石斛不同年份茎木质素的¹H-NMR 波谱图
Fig. 6 ¹H-NMR spectra of lignin in *Dendrobium officinale* stems in different years

表 4 铁皮石斛不同年份茎木质素的¹H-NMR 波谱分析
Table 4 Analysis of lignin ¹H-NRM spectra in *Dendrobium officinale* stems in different years

| 化学位移范围 Chemical shift region range ($\times 10^{-6}$) | 化学位移 Chemical shift region($\times 10^{-6}$) | | | 质子类型 Type of protons |
|--|---|-------------------|---------------------|---|
| | 1 年生 One year | 2 年生 Two years | 3 年生 Three years | |
| 7.42~7.52 | 7.43 | 7.43 | 7.43 | 对羟基芳香环上质子 |
| 7.26 | 7.26 | 7.26 | 7.26 | 溶剂 CDCl ₃ |
| 7.1~6.8 | 6.86 | 6.85 | 6.86 | 愈创木基芳香环上质子 |
| 6.8~6.3 | 6.47 | 6.47 | 6.45 | 紫丁香基芳香环上质子 |
| 5.75~5.24 | 5.35 | 5.35 | 5.34 | β -5 结构的 H α |
| 5.2~4.9 | 4.97 | 5.00 | 5.04 | 碳水化合物中的质子 |
| 4.9~4.4 | 4.43 | 4.41 | 4.47 | β -O-4 结构上的 H γ 和 H δ |
| 4.4~4.1 | 4.09 | 4.10 | 4.13 | β - β 结构上的 H α |
| 4.1~2.8 | 3.64 | 3.64 | 3.64 | 甲氧基上的质子 |
| 2.7~2.2 | 2.20 | 2.22 | 2.22 | 芳香族醋酸酯上的质子 |
| 2.2~1.7 | 2.01 | 1.99 | 2.01 | 脂肪族醋酸酯上的质子 |
| 1.7~1.2 | 1.26 | 1.26 | 1.26 | 碳水化合物中的质子 |

创木基芳香环上质子； $6.8 \times 10^{-6} \sim 6.3 \times 10^{-6}$ 处表示紫丁香基芳香环上质子； $7.42 \times 10^{-6} \sim 7.52 \times 10^{-6}$ 处对羟基芳香环上质子^[20]。观察铁皮石斛¹H-NMR波谱图发现，不仅在化学位移 6.87×10^{-6} 、 6.47×10^{-6} 处分别出现愈创木基、紫丁香基芳香结构特征峰，同时在化学位移 7.43×10^{-6} 处出现了微弱的对羟基苯环结构特征峰，说明铁皮石斛主要含有 G 型和 S 型木质素，同时含有微量的

H 型木质素。
¹H-NMR 波谱检测出铁皮石斛茎木质素结构单元中 3 种化学键型，分别为 β -O-4 结构($4.9 \times 10^{-6} \sim 4.4 \times 10^{-6}$)、 β -5 结构($5.75 \times 10^{-6} \sim 5.24 \times 10^{-6}$)和 β - β 结构($4.4 \times 10^{-6} \sim 4.1 \times 10^{-6}$)。木质素是由苯丙烷单元，通过不同键型连接的复杂高聚物^[22]，铁皮石斛茎木质素化学键型分别对应着木质素部分化学结构图中的(I)、(II)、(III)(图 7)。



I、II、III 分别代表不同键型的连接方式。I：β-O-4；II：β-5；III：β-β。
Serial numbers of I, II, and III represent different bond connection types, respectively.

图 7 木质素的部分化学结构
Fig. 7 Segment of chemical structure of lignin

3 讨论

3.1 铁皮石斛茎多糖与木质素积累的相关性

杨爱珍等^[23]的研究发现桃 (*Prunus persica* L.) 果实发育分为糖积累和木质素沉积两个阶段, 糖积累后通过莽草酸途径合成酚类物质, 进一步形成木质素。本研究中, 多元线性回归分析结果显示木质素的积累对多糖的合成有一定影响。茎的木质素含量及染色结果显示, 1 ~ 2 年生茎木质素沉积较少, 3 年生木质素沉积显著增加。一年生多糖含量达到 20% 以上, 此时石斛光合作用产生的糖类物质已经参与木质素的沉积, 但是并不显著。2 年生多糖含量显著升高, 1 ~ 2 年生石斛生长旺盛, 多糖含量一般在第 2 年的 3 ~ 5 月达到高峰期, 为石斛生长发育 (开花、结果等) 提供大量营养物质^[24]。同时木质素的沉积也需要消耗大量的前体

物质^[25]。后期石斛生长发育变缓, 营养物质消耗减少, 这与石斛 3 年生茎多糖含量明显降低, 木质素沉积现象更加明显表现一致。因此, 生产上建议以采收 2 年生石斛茎鲜食及加工枫斗较适宜有一定的依据^[26]。

3.2 铁皮石斛茎木质素分布及单体类型鉴定

维管束鞘在单子叶植物茎中很发达, 其厚壁细胞发达程度与植物发育程度有一定关联, Zhao 等^[27]的研究发现随着芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 植株的发育, 花茎的维管束厚壁组织细胞壁加厚。研究表明铁皮石斛茎中的木质素主要积累在维管束的木质部和维管束鞘厚壁细胞中, 且厚壁细胞厚度及木质素含量均随着年份增加而增加。

不同植物中木质素单体类型及含量不同, 单子叶植物 (草本植物) 木质素包括 G 型、S 型和 H 型木质素^[28]。本研究发现铁皮石斛茎中主要含有 G

型和 S 型木质素以及微量的 H 型木质素。

厚壁细胞属于木质化细胞, 主要包括纤维细胞和石细胞。铁皮石斛中的厚壁细胞属于纤维细胞。在被子植物中, G 型木质素含量较多, 而纤维细胞 S 型含量较多^[29]。木质化始于 G 型木质素的沉积, 特别是在木质部细胞的次生细胞壁^[30, 31]。本研究发现铁皮石斛茎中 G 型木质素主要分布在木质部, S 型木质素主要分布在维管束鞘厚壁细胞, 且红外检测的结果表明铁皮石斛茎木质素 S/G 的比例随年份增加呈上升趋势。推测铁皮石斛木质化开始于 G 型木质素的沉积, 而随着年龄的增长, 木质化程度越高, 木质素积累越多, S 木质素逐渐沉积, S/G 的比例上升, 关于石斛茎木质素的沉积规律有待更深入的研究。

参考文献:

- [1] 奚航献, 刘晨, 刘京晶, 张新风, 斯金平, 张磊. 铁皮石斛化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51 (11): 3097–3109.
Xi HX, Liu C, Liu JJ, Zhang XF, Si JP, Zhang L. Chemical components and pharmacological action for *Dendrobium officinale* and its prediction analysis on Q-marker [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51 (11): 3097–3109.
- [2] 杨豪男, 张帮磊, 张宁, 沈晓静, 盛军, 等. 铁皮石斛的化学组成及其活性研究概述 [J]. 广东化工, 2020, 47 (11): 87–88.
Yang HN, Zhang BL, Zhang N, Shen XJ, Sheng J, *et al.* Study on chemical structure and biological activity of *Dendrobium candidum* [J]. *Guangdong Chemical*, 2020, 47 (11): 87–88.
- [3] He CM, Wu KL, Zhang JX, Liu XC, Zeng SJ, *et al.* Cytochemical localization of polysaccharides in *Dendrobium officinale* and the involvement of DoCSLA6 in the synthesis of mannan polysaccharides [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 173.
- [4] 张明泽, 何春梅, 王浩斌, 俞振明, 司灿, 等. 兰科药用植物活性多糖研究进展 [J]. 热带亚热带植物学报, 2019, 27 (5): 147–158.
Zhang MZ, He CM, Wang HB, Yu ZM, Si C, *et al.* Advances in active polysaccharides in medicinal plants of Orchidaceae [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2019, 27 (5): 147–158.
- [5] 李虹阳. 铁皮石斛种质资源评价及低温处理对鲜条品质的影响 [D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
- [6] 于增金, 殷彪, 赵婷, 徐文达, 荣俊冬, 等. 不同地类对麻竹竹笋品质的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47 (1): 76–81.
- Yu ZJ, Yin B, Zhao T, Xu WD, Rong JD, *et al.* Effect of different land types on the quality of *Dendrocalamus latiflorus* shoots [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2020, 47 (1): 76–81.
- [7] Coleman HD, Park JY, Nair R, Chapple C, Mansfield SD. RNAi-mediated suppression of p-coumaroyl-CoA 3'-hydroxylase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (11): 4501–4506.
- [8] Escamilla-Treviño LL, Shen H, Uppalapati SR, Ray T, Tang YH, *et al.* Switchgrass (*Panicum virgatum*) possesses a divergent family of cinnamoyl CoA reductases with distinct biochemical properties [J]. *New Phytol*, 2010, 185 (1): 143–155.
- [9] 何虎翼, 谭冠宁, 何新民, 杨鑫, 唐洲萍, 李丽淑. 不同铁皮石斛品种石斛多糖与纤维素关系及聚类分析 [J]. 作物杂志, 2017 (2): 29–33.
He HY, Tan GN, He XM, Yang X, Tang ZP, Li LS. The relationship and cluster analysis on polysaccharides and cellulose of different varieties of *Dendrobium officinale* [J]. *Crops*, 2017 (2): 29–33.
- [10] 杜娟, 安东, 夏田, 黄艳华, 李洪超, 张蕴薇. 近红外光谱技术检测植物木质素纤维素研究进展 [J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33 (12): 3207–3211.
Du J, An D, Xia T, Huang YH, Li HC, Zhang WW. The research progress in determining lignocellulosic content by near infrared reflectance spectroscopy technology [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2013, 33 (12): 3207–3211.
- [11] Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 263–289.
- [12] 丁小余, 徐珞珊, 王峥涛, 施国新, 徐红. 铁皮石斛居群差异的研究 (I)——植物体形态结构的差异 [J]. 中草药, 2001, 32 (9): 63–66.
Ding XY, Xu LS, Wang ZT, Shi GX, Xu H. Studies on population difference of *Dendrobium officinale* (I): differences in morphological structure [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2001, 32 (9): 63–66.
- [13] Weng J, Li X, Bonawitz ND, Chapple C. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19 (2): 166–172.
- [14] 张金青, 陈奋奇, 汪芳珍, 方强恩, 师尚礼. 紫花苜蓿茎秆组织中木质素的分布与沉积模式 [J]. 草业科学, 2018, 35 (2): 363–370.
Zhang JQ, Chen FQ, Wang FZ, Fang QE, Shi SL. The distribution and deposition pattern of lignin in alfalfa stem tissue [J]. *Pratacultural Science*, 2018, 35 (2): 363–370.
- [15] 于海霞, 庄晓伟, 潘圻, 王进, 张建, 张文福. 木质素单体结

- 构分析方法及在木材研究中的应用[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(2): 265–270.
- Yu HX, Zhuang XW, Pan X, Wang J, Zhang J, Zhang WF. Lignin monomer composition analysis method and its application in wood[J]. *Journal of Northwest Forestry College*, 2017, 32(2): 265–270.
- [16] 林继山. 拟南芥糖基转移酶基因 *UGT72B1* 调节细胞壁木质化的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 282–283.
- [18] 孙青. 高氮条件下 microRNA528 调控玉米倒伏的机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [19] 张浩楠, 赵瑾, 徐栋梁, 任浩. 二维核磁谱对木质素酚与磨木木质素结构的对照解析[J]. 纤维素科学与技术, 2018, 26(4): 13–22.
- Zhang HN, Zhao J, Xu DL, Ren H. Structural features comparison of milled wood lignin and lignocresol by 2D-NMR spectra[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2018, 26(4): 13–22.
- [20] 秦特夫, 黄洛华, 李改云. 慈竹、毛竹木质素的化学官能团和化学键特征研究[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(3): 161–165.
- Qin TF, Huang LH, Li GY. Functional groups and chemical bonds of lignin of neosinocalamus affinis and phyllostachys pubescens[J]. *Journal of Beijing forestry university*, 2010, 32(3): 161–165.
- [21] 杨增玲, 梅佳琪, 曹聪, 纪冠亚, 韩鲁佳. 基于红外光谱的不同农作物秸秆磨木木质素差异表征[J]. 农业工程学报, 2018, 34(19): 219–224.
- Yang ZL, Mei JQ, Cao C, Ji GY, Han LJ. Traits of milled wood lignin isolated from different crop straw based on FTIR[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2018, 34(19): 219–224.
- [22] 陶用珍, 管映亭. 木质素的化学结构及其应用[J]. 纤维素科学与技术, 2003(1): 42–55.
- Tao YZ, Guan YT. Study of chemical composition of cignin and its application[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2003(1): 42–55.
- [23] 杨爱珍, 张志毅, 曹爱娟, 孟海岭, 王有年. 桃果实内果皮发育过程中糖积累与木质素沉积的变化[J]. 园艺学报, 2009, 36(8): 1113–1119.
- Yang AZ, Zhang ZY, Cao AJ, Meng HL, Wang YN. Studies of changes in sugar accumulation and lignin deposition during peach fruit endocarp development[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36(8): 1113–1119.
- [24] 李宏杨, 谭啸, 刘扬, 杨志娟, 刘国民, 陈冠铭. 铁皮石斛多糖含量变化研究[J]. 中国热带农业, 2017(2): 59–61.
- [25] 金小丽, 苑鹤, 斯金平, 张至诚, 俞巧仙, 汪玲娟. 开花对铁皮石斛多糖质量分数及单糖组成的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(16): 2176–2178.
- Jin XL, Yuan H, Si JP, Zhang ZC, Yu QX, Wang LJ. Effect of flowering on the quality fraction of polysaccharides and monosaccharide composition from *Dendrobium officinale*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, 36(16): 2176–2178.
- [26] 吴经耀, 冯瑛. 不同采收期铁皮石斛主要成分含量测定及比较[J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(10): 39–42.
- Wu JY, Feng Y. The determination and comparison of main components of *Dendrobium officinale* in different harvesting[J]. *Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy*, 2019, 28(10): 39–42.
- [27] Zhao DQ, Han CX, Tao J, Wang J, Hao ZJ, et al. Effects of innorescence stem structure and cell wall components on the mechanical strength of innorescence stem in herbaceous peony[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(4): 4993–5009.
- [28] 夏星. 芍药花茎木质素特征观察与转录组分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- [29] Bonawitz ND, Chapple C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype[J]. *Annu Rev Genet*, 2010, 44(1): 337–363.
- [30] Berthet S, Demont-Caulet N, Pollet B, Bidzinski P, Cézard L. Disruption of *LACCASE4* and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(3): 1124–1137.
- [31] Schuetz M, Benske A, Smith RA, Watanabe Y, Tobimatsu Y. Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem[J]. *Plant Physiol*, 2014, 166(2): 798–807.

(责任编辑: 周 媛)