

超声处理对霍山石斛类原球茎悬浮培养细胞生理代谢的影响

魏明^{1,*}, 杨超英¹, 姜绍通²

¹安徽工程大学生物与化学工程学院, 安徽芜湖241000; ²合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥230009

摘要: 为了了解超声处理对霍山石斛类原球茎产生的生理效应, 研究了超声波功率和超声时间对霍山石斛类原球茎悬浮培养细胞生长以及多糖和蛋白质合成的影响; 分析了培养基中碳、氮利用、细胞内活性氧水平以及蔗糖转化酶、硝酸还原酶、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的变化。结果表明, 适当功率和时间的超声处理(300 W, 3 min)能显著促进霍山石斛类原球茎的增殖, 最大细胞干重为34.6 g·L⁻¹; 明显促进培养基中碳和氮的利用; 显著提高胞内可溶性多糖、可溶性蛋白质和H₂O₂的含量; 细胞内蔗糖转化酶、硝酸还原酶以及SOD、CAT和POD的活性明显升高。适当的超声波处理能促进霍山石斛类原球茎的生长发育和提高细胞的生理活性。

关键词: 霍山石斛; 类原球茎; 超声波; 生理活性

Effect of Ultrasonic on the Physiological Metabolism of Cells in Suspension Cultures of Protocorm-Like Bodies of *Dendrobium huoshanense*

WEI Ming^{1,*}, YANG Chao-Ying¹, JIANG Shao-Tong²

¹College of Biology and Chemistry, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China; ²School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

Abstract: In order to find out the physiological effects of ultrasonic on the cells in suspension cultures of protocorm-like bodies (PLBs) of *Dendrobium huoshanense*. The effects of ultrasonic power and time on PLB proliferation and synthesis of polysaccharides and proteins were investigated. The nutrient utilization in the medium, reactive oxygen species (ROS), the activities of invertase, nitrate reductase, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) in the cells of PLB were analyzed. The results indicated that the optimum ultrasonic power and time (300 W, 3 min) could significantly enhance the cell growth and were beneficial to the utilization of carbon and nitrogen. The cell dry weight reached 34.6 g (DW)·L⁻¹. The contents of soluble polysaccharides, proteins and H₂O₂ in cells were increased greatly. Invertase, nitrate reductase, SOD, CAT and POD activities were found to increase significantly in the cultured cells treated with ultrasonic. The suitable ultrasonic treatment was beneficial to the cell growth and the physiological activity of PLBs in suspension cultures of PLBs of *D. huoshanense*.

Key words: *Dendrobium huoshanense*; protocorm-like bodies; ultrasonic; physiological activity

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)属于兰科石斛属, 是名贵中草药, 产于安徽霍山及临近地区, 具有滋阴、清热、生津、润肺、止咳、清音明目等功效(陈晓梅和郭顺星2004)。由于霍山石斛自然繁殖能力很低, 在自然条件下生长缓慢、生长周期长, 加上人工大量采集, 其自然资源已濒临灭绝。目前, 霍山石斛的离体繁殖主要通过外植体诱导类原球茎(proto-corm-like bodies, PLBs)再生试管苗。类原球茎是霍山石斛离体繁殖过程的中间形态, 可由植株的不同部位诱导产生, 具有和植株同样的物质代谢和形态发育潜能(高建平2002)。类原球茎本身

可以增殖, 以类原球茎作为繁殖体制备人工种子用于工厂化育苗, 可以提高人工繁殖霍山石斛的效率, 也可以利用类原球茎培养生产次生代谢产物, 所以霍山石斛类原球茎的快速增殖和分化是实现霍山石斛类原球茎大规模培养和离体快速繁殖的基础。

霍山石斛类原球茎生长快慢与其生理活性有

收稿 2011-05-10 修定 2011-05-26

资助 教育部科学技术研究重点项目(03098)。

* 通讯作者(E-mail: wmrainbow@yahoo.com.cn; Tel: 0553-2876254)。

关(魏明等2008)。超声波是一种交变应力,具有重要的生理效应,在不破坏细胞的前提下,适当的强度和辐照时间可以提高细胞的新陈代谢效率,加速植物细胞分裂和生长(Liu等2003)。研究发现,超声可以提高细胞内相关酶活性,提高次生代谢物的合成(Lin等2001)。通过研究超声波对霍山石斛类原球茎悬浮培养细胞生长、多糖和蛋白质合成的影响,分析细胞内活性氧水平、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等酶活性变化,探讨霍山石斛类原球茎超声处理的生理效应,为霍山石斛类原球茎快速增殖和分化奠定基础。

材料与方法

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)类原球茎由本校生物与化学工程学院诱导并保存,在无激素固体MS培养基中继代培养,继代周期为30 d,生长培养基为改良的MS培养基,其中微量元素、有机元素减半,大量元素为 KNO_3 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 1.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,蔗糖浓度为30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

依据文献(魏明等2008),取生长30 d的类原球茎接种于装有40 mL液体培养基(pH为5.8)的100 mL三角瓶中,接种量为100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;超声波装置为超声波清洗仪,超声波频率为28 kHz;超声功率选择0、200、300、400、500 W,超声时间选择0、1、3、5、8 min,每隔6 d超声1次,总共超声3次,置于摇床上(120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),25 $\text{C}\pm 2\text{C}$ 下悬浮培养,光照周期为14 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$,日光灯照射,光照强度为40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

每隔6 d随机取样1次,测定类原球茎的生长量,类原球茎中多糖、蛋白质和 H_2O_2 含量,以及蔗糖转化酶、硝酸还原酶、SOD、CAT、POD活性;培养液用来测定残糖和硝酸根离子。以不处理的类原球茎作为对照,每隔6 d取样分析。

用滤纸吸干类原球茎表面的水分后称重为鲜重(FW),把类原球茎置于60 C 烘箱中烘至衡重为干重(DW)。类原球茎生物量[$\text{g}\cdot\text{DW}\cdot\text{L}^{-1}$]=收获类原球茎的总干重/接种时培养基体积。培养基中的残糖用苯酚-硫酸法测定(Zhong和Wang 1996);硝

酸根离子用水杨酸-浓硫酸法测定(Liu和Zhong 1996)。细胞内多糖提取:取1 g类原球茎先用蒸馏水洗2次,然后研碎用蒸馏水在50~60 C 水浴上提取3次,收集水提液,加95%乙醇至乙醇浓度为80%,过夜沉淀,最后收集沉淀。沉淀溶于蒸馏水中用Savage法脱蛋白,并用苯酚-硫酸法测定(Zhong和Wang 1996),可溶性蛋白质用考马斯亮蓝G-250法测定。用 H_2O_2 试剂盒测定 H_2O_2 生成量。

酶液提取:准确称取类原球茎1 g (FW),加入10 mL预冷的酶提取缓冲液[20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hepes-NaOH缓冲液, pH 7.2, 含0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 巯基乙醇、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT、2% (V/V) PVP],冰浴研磨匀浆,于12 000 \times g离心20 min,取上清液作为待测酶液,所有操作均在4 C 进行。

蔗糖转化酶活性按Vu等(1995)方法测定,取待测酶液1.5 mL,加入20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液(蔗糖溶于0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液, pH 4.7) 0.2 mL,30 C 下保温10 min后,立即转入沸水浴3 min终止反应;然后加入1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂,沸水浴5 min,在540 nm处测定吸光值的变化,空白对照不加蔗糖。酶活力单位定义:1 μg (还原糖) $\cdot\text{g}^{-1}$ (FW) $\cdot\text{min}^{-1}$ 为一个酶活力单位[$\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]。

硝酸还原酶活性按Chen等(2004)方法测定:取酶粗提液0.1 mL,加入0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液(pH 7.5、含0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KNO_3) 1.8 mL混合并于28 C 下保温10 min,加入0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NADH 0.1 mL,在28 C 反应15 min后,加入1 mL 1% (W/V)氨基苯磺酰胺和1 mL 0.02% (W/V)萘基乙烯二胺水溶液终止反应。反应混合液在5 000 \times g离心5 min,除去悬浮物,540 nm处测定吸光值。对照不加NADH,而加0.1 mL重蒸水。此反应为测定生成的亚硝酸盐的量,酶活力单位定义:1 μmol (NO_2^-) $\cdot\text{g}^{-1}$ (FW) $\cdot\text{min}^{-1}$ 为一个酶活力单位[$\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]。

SOD的活性采用SOD试剂盒测定,单位 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。CAT活性采用CAT试剂盒测定,单位 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。过氧化物酶(POD)活性以愈创木酚法测定:取粗酶液0.1 mL,加入pH 6.8磷酸盐缓冲液0.9 mL,底物为0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 愈创木酚1.0 mL, H_2O_2 (2%) 1.0 mL,反应总体积为3 mL,在470 nm下测定吸光值的变化。酶活力定义为:以每分钟每克鲜重吸光度的变化0.01为一个酶活单位[$\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]。

所有实验重复2次, 每个水平3个重复, 实验结果以平均值附标准差表示。

实验结果

1 超声功率对霍山石斛类原球茎增殖的影响

图1表示不同功率处理2 min, 霍山石斛类原球茎增殖情况。适当的超声波处理可以促进类原球茎的增殖, 当功率为300 W时, 培养30 d生物量达最大的 $33.5 \text{ g (DW)} \cdot \text{L}^{-1}$, 超声波功率过大对细胞具有损伤作用, 从而降低生物量。

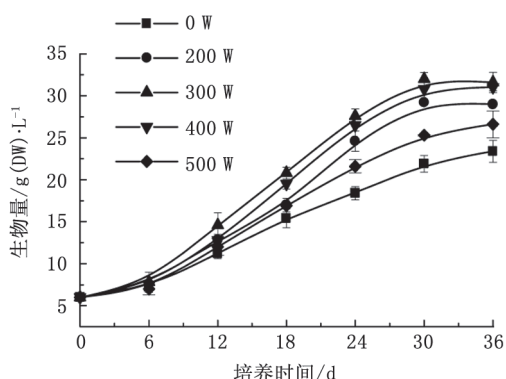


图1 超声波功率对悬浮培养的霍山石斛类原球茎增殖的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic power on the cell proliferation in suspension cultures of PLBs of *D. huoshanense*

2 超声时间对霍山石斛类原球茎增殖的影响

图2表示超声功率为300 W时, 处理不同时间, 霍山石斛类原球茎的增殖情况。在一定功率下, 超声适当时间可以促进类原球茎的增殖, 当处理时间为3 min时, 培养30 d生物量达最大的 $34.6 \text{ g (DW)} \cdot \text{L}^{-1}$, 处理时间过长生物量有所降低, 可能长

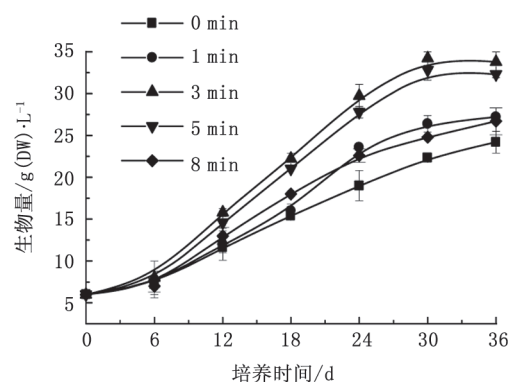


图2 超声时间对悬浮培养的霍山石斛类原球茎增殖的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic time on the cell proliferation in suspension cultures of PLBs of *D. huoshanense*

时间的超声处理对细胞具有损伤作用。

3 超声处理对培养基中碳和氮利用的影响

培养基中主要营养成分是碳源和氮源, 图3-A、B分别表示了在最适超声条件下(超声功率为300 W, 超声时间为3 min), 霍山石斛类原球茎培养过程中, 培养基中碳源和氮源的消耗情况。

植物细胞培养中, 碳源和氮源的作用是为细胞生长提供物质和能量, 碳氮的吸收和利用影响细胞的生长。由图3-A、B可以看出, 超声处理对碳、氮源的吸收和利用影响显著($P < 0.05$)。功率在300 W处理3 min, 类原球茎增殖速度较快, 碳氮的利用率也高, 培养30 d时, 培养基中的碳氮几乎被耗尽, 而对照组的培养基中仍含有一定量的碳氮。

4 超声处理对细胞内可溶性多糖和蛋白质含量的影响

从图4可以看出, 超声处理对细胞内可溶性糖和蛋白质含量变化影响显著($P < 0.05$), 细胞内多糖

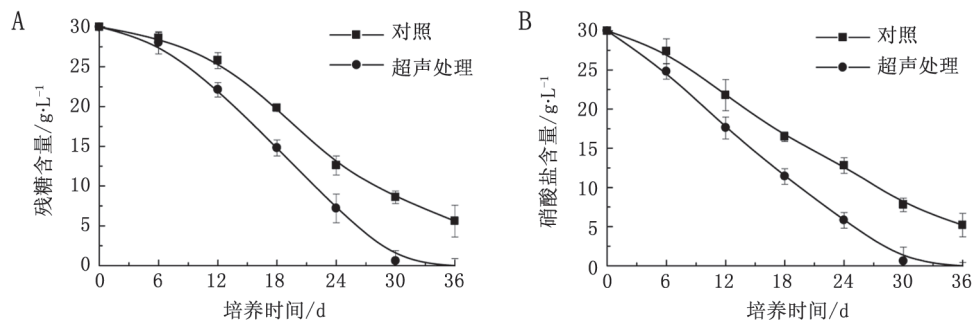


图3 超声处理对悬浮培养霍山石斛PLBs时培养基中碳(A)和氮(B)利用的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic on the utilization of sugars (A) and nitrate (B) in medium in suspension cultures of PLBs of *D. huoshanense*

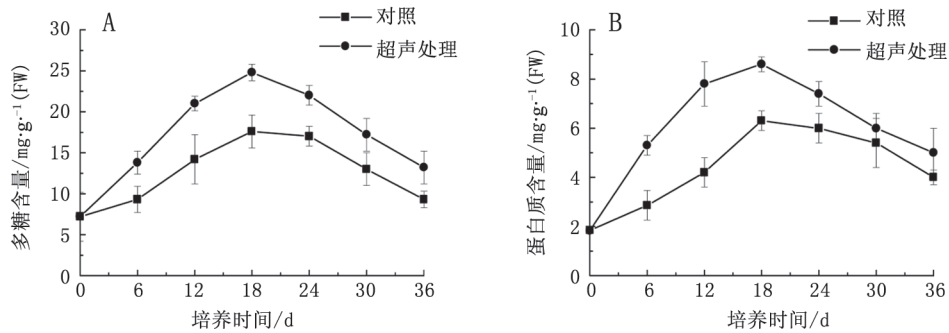


图4 超声处理对悬浮培养霍山石斛PLBs细胞内多糖(A)和蛋白质(B)含量的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic on the contents of intracellular polysaccharides (A) and proteins (B) in suspension cultures of PLBs of *D. huoshanense*

和蛋白质含量均高于对照组。细胞内多糖和蛋白质含量与细胞的生理活性有一定的关系(Zhang等1996), 细胞生长快, 细胞内多糖和蛋白质合成加快。超声处理可以提高细胞的生理活性, 促进细胞生长和代谢产物的合成。

5 超声处理对蔗糖转化酶和硝酸还原酶活性的影响

图5表示了蔗糖转化酶和硝酸还原酶的活性变化。超声处理后的霍山石斛类原球茎的蔗糖转化酶和硝酸还原酶的活性显著提高。蔗糖转化酶的主要作用是分解培养基中的蔗糖, 蔗糖在被细胞利用之前首先要被降解为葡萄糖和果糖等还原糖。高的蔗糖转化酶活性是细胞生长的特征之一, 提高蔗糖转化酶的活性可以促进细胞对碳源的吸收和利用(Vu等1995), 从而促进细胞生长。硝酸钾作为培养基中的唯一氮源, 首先在硝酸还原酶的作用下将硝态氮还原为氨态氮, 才能被细胞利用,

硝酸还原酶的活性影响 NO_3^- 的同化吸收(Chen等2004)。

6 超声处理对细胞内活性氧水平的影响

活性氧在植物体内具有重要功能, 其作为信号分子可以诱导不同基因的表达和酶活性的发挥(Gill和Tuteja 2010)。细胞内 H_2O_2 由 O_2^- 转化而来, 是衡量细胞内活性氧水平的主要指标之一。由图6可知, 超声处理明显提高细胞内 H_2O_2 的含量, 说明超声处理后的霍山石斛类原球茎的代谢水平有显著提高, 细胞有氧呼吸旺盛。

7 超声处理对细胞内SOD、CAT和POD活性的影响

SOD、CAT和POD是活性氧清除系统的重要抗氧化酶。由图7可知, 与对照相比, 超声处理显著提高细胞内SOD、CAT和POD的活性($P < 0.05$)。正常情况下, 植物体内活性氧代谢处于动态平衡之中, 活性氧含量过多或过少均不利于细

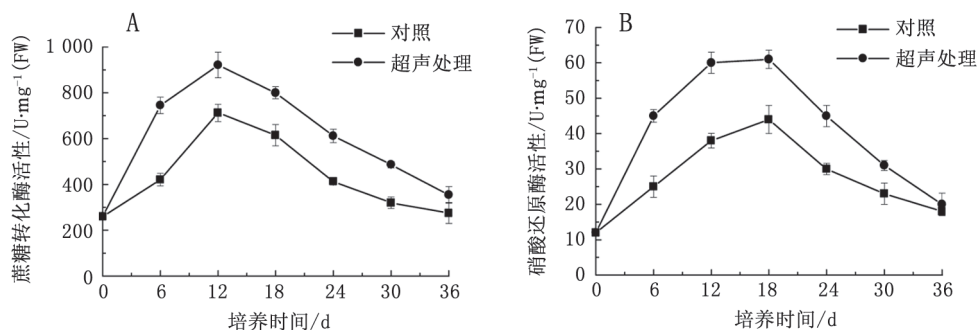


图5 超声处理对悬浮培养霍山石斛PLBs细胞内蔗糖转化酶(A)和硝酸还原酶(B)活性的影响

Fig.5 Effects of ultrasonic on the activities of invertase (A) and nitrate reductase (B) in suspension cultures of PLBs of *D. huoshanense*

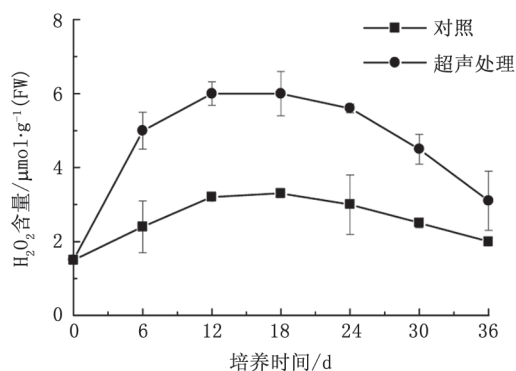


图6 超声处理对悬浮培养霍山石斛PLBs细胞内H₂O₂含量的影响

Fig.6 Effects of ultrasonic on the content of intracellular H₂O₂ in suspension cultures of PLBs of *D. huoshanense*

胞生长, 超声处理提高了细胞的代谢水平, 相应细胞内活性氧水平升高, 而与之对应的活性氧清除系统的酶活性也随之升高。

讨 论

霍山石斛类原球茎转接到新鲜培养基中, 细胞生长快慢与其生理活性有关(魏明等2008)。碳和氮是植物细胞生长的主要营养成分, 它们的吸收和利用直接影响细胞生长。超声处理增强了细胞膜的通透性, 促进了细胞对物质的吸收; 蔗糖酶和硝酸还原酶活性明显提高, 提高了蔗糖和硝酸盐的利用效率(Vu等1995; Chen等2004)。糖和蛋白质是植物生长发育的物质和能量基础, 适当的超声处理类原球茎可以加快细胞内多糖和蛋白质的合成, 从而为类原球茎的增殖提供了物质基础。

超声处理促进了细胞生长, 提高了细胞的生理活性, 细胞代谢旺盛, 有氧呼吸产生了大量的超氧阴离子自由基, 进而产生H₂O₂等活性氧, 加剧了氧化胁迫。活性氧在细胞内参与重要的生理生化反应(Gill和Tuteja 2010), 然而高浓度的活性氧和自由基导致膜脂发生过氧化, 破坏细胞膜的完整性, 对细胞具有毒害作用, 抑制细胞生长, 甚至引起细胞褐变而死亡(Jubany-Marí等2010)。植物体内有活性氧和自由基清除系统SOD、CAT和POD等酶, 这些酶协同作用, 使活性氧产生和清除处于平衡状态。与对照相比, 适当超声处理后的霍山石斛类原球茎细胞内SOD、CAT和POD的活性增

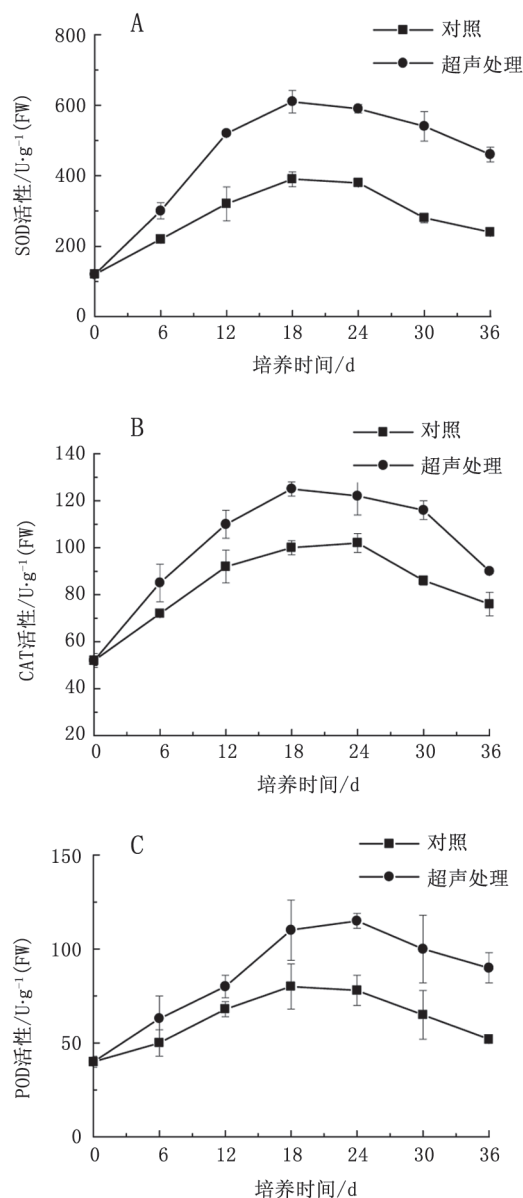


图7 超声处理对悬浮培养霍山石斛PLBs细胞内SOD (A)、CAT (B)和POD (C)活性的影响

Fig.7 Effects of ultrasonic on the activities of SOD (A), CAT (B) and POD (C) in suspension cultures of PLBs of *D. huoshanense*

强, 提高了类原球茎的生理活性, 促进了类原球茎的增殖。另外, 实验结果显示, 经超声处理的类原球茎有部分发芽现象, 而对照组的类原球茎没有发芽现象。暗示超声处理可以促进石斛类原球茎的分化, 这为超声波在霍山石斛离体繁殖中的应用提供了依据。

参考文献

- 陈晓梅, 郭顺星(2001). 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展. 天然产物研究与开发, 13 (1): 70~74
- 高建平, 金若敏, 吴耀平, 张海贵, 章丹平, 常钰, 胡之璧(2002). 铁皮石斛原球茎与原药材免疫调节作用的比较研究. 中药材, 25 (7): 487~489
- 魏明, 杨超英, 姜绍通, 罗建平(2008). 继代周期对霍山石斛类原球茎悬浮培养动力学的影响. 中国农学通报, 24 (9): 43~47
- Chen BM, Wang ZH, Li SX, Wang GX, Song HX, Wang XN (2004). Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Sci*, 167 (3): 635~643
- Gill SS, Tuteja N (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 48 (12): 909~930
- Jubany-Marí T, Munné-Bosch S, Alegre L (2010). Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiol Biochem*, 48 (5): 351~358
- Lin LD, Wu JY, Ho KP, Qi SY (2001). Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) in *Panax ginseng* cell cultures. *Ultrasound Med Biol*, 27 (8): 1147~1152
- Liu S, Zhong JJ (1996). Effect of potassium ion on cell growth and production ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax ginseng*. *J Biotechnol*, 52 (2): 121~126
- Liu YY, Yoshikoshi A, Wang BC, Sakanishi A (2003). Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nipponbare callus cells. *Colloids Surf B: Biointerf*, 27 (4): 287~293
- Vu JCV, Niedz RP, Yelenosky G (1995). Activities of sucrose metabolism enzymes in glycerol-grown suspension cultures of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Environ Exp Bot*, 35 (4): 455~459
- Zhang YH, Zhong JJ, Yu JT (1996). Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. *J Biotechnol*, 51 (1): 49~56
- Zhong JJ, Wang DJ (1996). Improvement of cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Cu⁺ effect. *J Biotechnol*, 46 (1): 69~72