

研究报告 Original Papers

硝普钠、植酸和水杨酸对悬浮培养的霍山石斛原球茎生长和生理活性的影响

黄蓓, 洪萨丽, 金青, 张士鸿, 蔡永萍*, 林毅

安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036

摘要: 在建立霍山石斛的液体悬浮培养技术的基础上, 添加诱导子硝普钠(SNP)、植酸(PA)和水杨酸(SA)。3种诱导子均可促进霍山石斛原球茎中生物碱的积累, 0.1 mmol·L⁻¹ SNP、7.5 g·L⁻¹ PA和100 μmol·L⁻¹ SA处理的原球茎, 其生物碱含量分别为不作处理的2.02倍、1.84倍和1.62倍。促进霍山石斛生物碱积累的适宜诱导子为SNP, 其适宜浓度为0.1 mmol·L⁻¹。高浓度的3种诱导子均导致培养液酸化, 原球茎的相对电导率上升, 其生物量和生物碱含量明显下降。

关键词: 霍山石斛; 原球茎; 悬浮培养; 生物碱; 诱导子

Effects of SNP, PA and SA on Cell Growth and Physiological Activities of Suspension-Cultured Protocorn-Like Bodies of *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng

HUANG Bei, HONG Sa-Li, JIN Qing, ZHANG Shi-Hong, CAI Yong-Ping*, LIN Yi

School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: It was studied the influence of sodium nitroprusside (SNP), phytic acid (PA) and salicylic acid (SA) on cell growth and the alkaloid accumulation of suspension-cultured protocorn-like bodies (PLBs) of *Dendrobium huoshanense*. The results showed that all the three elicitors could enhance the accumulation of alkaloid. When treated with 0.1 mmol·L⁻¹ SNP, 7.5 g·L⁻¹ PA, and 100 μmol·L⁻¹ SA, respectively, the alkaloids accumulation elevated to 2.02-, 1.84-, and 1.62-fold compared with control. The appropriate elicitor was SNP, whose optimum concentration was 0.1 mmol·L⁻¹. High concentration of three elicitors could cause the medium acidification and increase the relative conductivity of PLBs, resulted in reduced biomass and alkaloids quantity.

Key words: *Dendrobium huoshanense*; protocorm-like bodies; suspension culture; alkaloids; elicitor

霍山石斛富含生物碱和多糖等生物活性成分, 对人体抗衰老、提高免疫力有功效(吕素芳等2006)。我国霍山石斛野生种质资源十分匮乏, 随着组织培养技术的发展, 有人以其试管苗大量繁殖出霍山石斛(吴志刚等2005)。还有研究表明, 液体悬浮培养条件下, 原球茎中生物碱含量与试管苗和栽培苗相当(罗建平等2003), 因此, 探讨原球茎悬浮培养技术可能是解决霍山石斛资源短缺的有效途径之一。植物细胞培养中, 诱导子的添加是增强代谢产物合成的有力手段(Wang等2004)。它能快速、专一和有选择的诱导某些特定基因的表达, 通过改变次生代谢途径中催化酶活性来达到提高次生代谢产物产量的目的(肖春桥等2004)。我们课题组在建立霍山石斛液体悬浮培养体系后(金青等2008), 在悬浮培养体系中加入诱导子硝普钠(sodium nitroprusside,

SNP)、植酸(phytic acid, PA)和水杨酸(salicylic acid, SA), 比较分析其对霍山石斛悬浮培养原球茎的生长和生物碱积累以及对生物碱合成过程中的过氧化物酶(peroxidase, POD)和苯丙氨酸解氨酶(L-phenylalanin ammonia lyase, PAL)活性的影响, 以期采用植物细胞悬浮培养技术提高霍山石斛的生物碱含量提供技术参考。

材料与方法

实验材料为霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)原球茎, 由本校生命科学

收稿 2009-11-30 修定 2010-03-05

资助 安徽省教育厅重点项目(2006KJ054A)和安徽省教育厅十五人才基金。

* 通讯作者(E-mail: swkx12@ahau.edu.cn; Tel: 0551-5786232)。

学院诱导。培养基为 1/2MS(大量元素减半)+0.25 mg·L⁻¹ NAA+0.30 mg·L⁻¹ 6-BA+40 g·L⁻¹ 蔗糖, pH 为 5.8。诱导期间在转速为 120 r·min⁻¹ 和温度为 (25±2) °C 的恒温摇床进行培养, 使用漫射光, 光照强度为 2 μmol·m⁻²·s⁻¹, 相对湿度为(60±10)%。

霍山石斛原球茎的诱导处理时, 取生长疏松、淡黄色的原球茎接种于分别含有 SNP 浓度为 0(对照)、0.025、0.05、0.1、0.2 和 0.5 mmol·L⁻¹, PA 浓度为 0(对照)、1、2.5、5、7.5 和 10 g·L⁻¹, SA 浓度为 0(对照)、10、50、100 和 200 μmol·L⁻¹ 的液体培养基中悬浮培养, 每个处理重复 3 次。悬浮培养生长 40 d 后, 测定原球茎生长量、生物碱含量、相对电导率和培养液中 pH, 以及原球茎的 POD 和 PAL 活性。在确定适宜诱导子剂量后, 用适宜剂量的诱导子处理的原球茎培养 1 次生长周期, 共培养 44 d (马绍鏊 2008), 以不作处理的原球

茎为对照, 每 4 d 随机取样 1 次, 检测原球茎生长量和生物碱积累的变化, 重复 3 次。

测定原球茎生长量时, 将培养的原球茎取出抽滤, 称鲜重, 然后将原球茎置于 80 °C 烘干至恒重 (韩忠明等 2006), 称干重。每组实验重复 3 次。

用碱性氯仿提取生物碱后, 再通过溴甲酚绿酸性染料比色法 (李亚芳等 2002; 徐宁 2000), 以 TU-1800SPC 紫外可见分光光度计测定波长 620 nm 处的吸光度。采用愈创木酚法测定 POD 活性 (王学奎 2006), PAL 活性测定参照王学奎 (2006) 书中方法。粗酶液中相对蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法测定 (王学奎 2006)。培养液的 pH 值采用 Sartorius 标准型 pH 计 PB-20 测定, 每组处理重复 3 次。采用 DDS-11A 型电导率仪, 参照张宪政等 (1994) 书中方法测定原球茎的相对电导率。

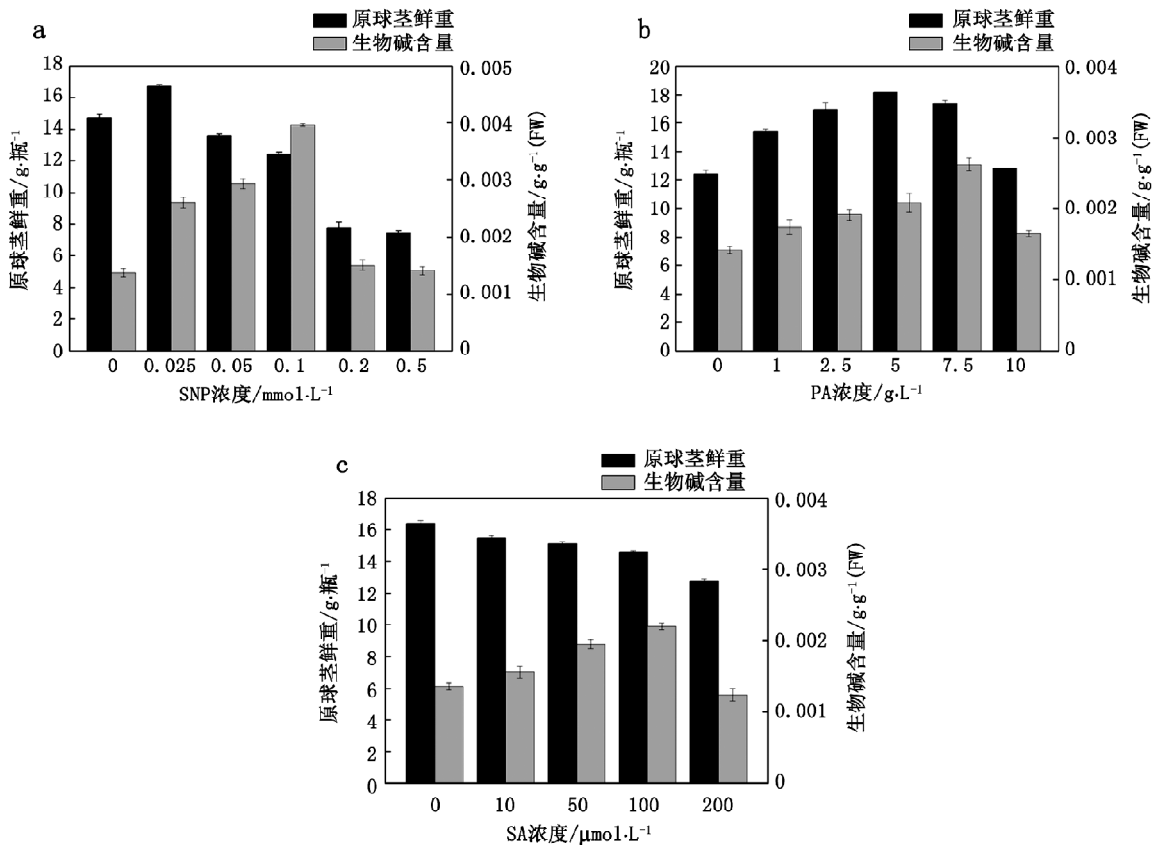


图1 SNP、PA 和 SA 对霍山石斛原球茎生长量和生物碱含量的影响

Fig.1 Effects of SNP, PA and SA on the biomass and the alkaloid contents of *Dendrobium huoshanense* PLBs

结果与讨论

1 不同浓度 SNP、PA 和 SA 对霍山石斛原球茎生长量和生物碱含量的影响

如图1所示, (1)经 SNP 和 PA 处理的霍山石斛原球茎生长量随着处理浓度的增加都出现先上升后下降趋势。原球茎生长量分别在 SNP 浓度为 $0.025 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 PA 浓度为 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大, 而 SA 处理的原球茎生长量则一直下降。 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP、 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PA 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 处理的原球茎生长量大幅度下降, 生长明显受到抑制。(2) PA 和 SA 处理的霍山石斛原球茎的生长量和生物碱变化趋势较缓慢。 SNP、PA 和 SA 处理的生物碱含量分别在处理浓度为 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP、 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PA 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 时含量达到最大。由此可见, 不同浓度 SNP、PA 和 SA 处理的原球茎, 其生长量和生物碱的积累并不是同步的, 生长量的积累先于生物碱的积累, 生物碱积累的同时原球茎生长受抑制。

2 不同浓度 SNP、PA 和 SA 对霍山石斛原球茎培养液中 pH 和原球茎相对电导率的影响

如表1所示, $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 处理的培养液 pH 降到 4.57, 已不适合原球茎生长, 而此时原球茎生长量大幅度下降, 生长明显受抑制, 再增加 SNP 浓度, 生长量和生物碱的变化不明显。这与徐茂军等(2005)的结果类似。PA 对培养液 pH 的影响不是很明显。随着 SA 浓度的增加, pH 值呈下降趋势, $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 的培养液出现酸化, pH 为 5.77 时的培养液已不适宜培养原球茎。随着 3 种诱导子处理浓度的增加, 原球茎的相对电导率呈逐渐上升趋势。 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP、 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PA 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 中的相对电导率有明显上升。可见, 高浓度 SNP、PA 和 SA 会导致原球茎细胞膜受伤害, 细胞生长受抑制, 同时原球茎的生物量和生物碱含量均下降, 培养液酸化, 培养液已不适合霍山石斛原球茎的液体悬浮培养。

3 不同浓度 SNP、PA 和 SA 对霍山石斛原球茎中几种酶活性的影响

由表2可知, 3 种诱导子浓度增加后, 原球茎的 PAL 活性都先上升后下降, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP、 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PA 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 下的 PAL 活性达到最大值。随 SNP 和 SA 浓度的增加, 原球茎的 POD

表1 SNP、PA 和 SA 对霍山石斛原球茎培养液中 pH 和原球茎的相对电导率的影响

Table 1 Effects of SNP, PA and SA on the medium pH and electrical conductivity of *Dendrobium huoshanense* PLBs

处理浓度	培养液 pH	原球茎相对电导率/%
SNP/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0	16.7 ± 0.700^d
	0.025	18.2 ± 0.400^{cd}
	0.050	19.6 ± 1.800^c
	0.100	21.2 ± 1.600^b
	0.200	29.9 ± 1.600^a
	0.500	30.4 ± 0.700^a
PA/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0	16.2 ± 1.880^d
	1.0	16.8 ± 1.300^c
	2.5	16.1 ± 0.800^d
	5.0	16.4 ± 0.600^d
	7.5	17.3 ± 0.650^b
	10.0	20.6 ± 0.100^a
SA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0	16.7 ± 0.350^c
	10	18.6 ± 0.850^d
	50	19.4 ± 0.700^c
	100	20.4 ± 0.500^b
	200	21.7 ± 0.300^a

表中数值为平均值 \pm 标准误, 同一物质不同浓度处理的同列数据旁不同字母表示 $P \leq 0.05$ 水平差异显著。表2同。

表2 SNP、PA 和 SA 对霍山石斛原球茎 POD 和 PAL 活性的影响

Table 2 Effects of SNP, PA and SA on POD and PAL activity in *Dendrobium huoshanense* PLBs

处理浓度	POD 活性/ $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)	PAL 活性/ $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)
SNP/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0	5.59 ± 0.069^f
	0.025	7.82 ± 0.077^c
	0.050	9.35 ± 0.098^b
	0.100	11.80 ± 0.013^a
	0.200	6.29 ± 0.304^d
	0.500	5.97 ± 0.055^e
PA/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0	7.22 ± 0.329^f
	1.0	8.54 ± 0.213^d
	2.5	9.84 ± 0.574^c
	5.0	10.27 ± 0.654^b
	7.5	12.11 ± 0.407^a
	10.0	7.66 ± 0.256^e
SA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0	3.84 ± 0.856^e
	10	4.76 ± 0.210^d
	50	9.72 ± 0.217^b
	100	12.59 ± 0.137^a
	200	7.53 ± 0.873^c

活性先升后降,也是分别在 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP和 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA时达到最大。但原球茎的POD活性随着PA浓度的增加而逐渐下降。这表明,诱导子可以诱发霍山石斛原球茎中PAL的活化,即可提高苯丙烷代谢途径中相关酶的活性,因而生物碱含量提高。而添加PA则明显抑制原球茎中POD的活性,因而醌类物质减少,最终是细胞衰老延缓,而原球茎中生物碱的积累增加。

4 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP处理不同时间对霍山石斛原球茎生长和生物碱积累的影响

3种诱导子均能促进霍山石斛原球茎生物碱的积累,其中SNP的促进效应最好, $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的SNP为适宜的诱导子。为此,我们专门探讨了SNP对霍山石斛原球茎生长和生物碱积累的影响。由图2可见,在培养初期,不作SNP处理的原球茎生长量与 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP处理的差异不明显,但在培养后期,不作SNP处理的生长量开始高于 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP处理的,在40 d左右前者达到最大值,而后者在32 d左右就达最大值,然后生长量开始下降。不作SNP处理的生物碱含量在培养周期内的变化不明显,但 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP处理的生物碱含量则高于不作SNP处理的,在36 d左右时为最大(图3)。

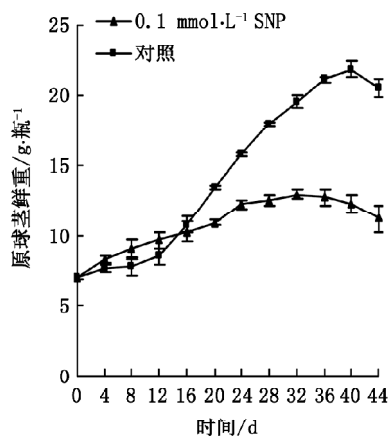


图2 SNP对霍山石斛原球茎生长的影响
Fig.2 Effects of SNP on the cell growth of *Dendrobium huoshanense* PLBs

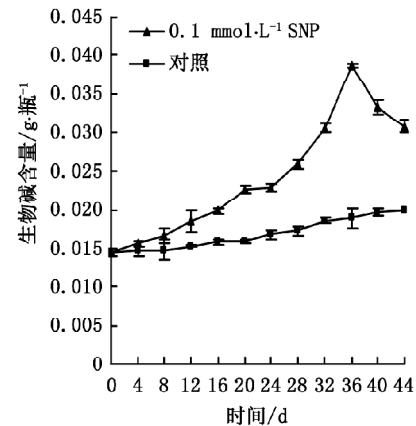


图3 SNP对霍山石斛原球茎生物碱积累的影响
Fig.3 Effects of SNP on accumulation of alkaloids of *Dendrobium huoshanense* PLBs

参考文献

- 韩忠明, 韩梅, 吴劲松, 杨利名(2006). 不同生境下刺五加种群构件生物量结构与生长规律. 应用生态学报, 17 (7): 1164~1168
- 金青, 马绍懿, 洪萨丽, 蔡永萍, 林毅(2008). 霍山石斛原球茎的诱导及培养方式对原球茎增殖的影响. 安徽农业大学学报, 35 (2): 258~261
- 李亚芳, 张晓华, 孙国明(2002). 石斛中总生物碱和多糖的含量测定. 中国药事, 16 (7): 426~428
- 罗建平, 查学强, 姜绍通(2003). 药用霍山石斛原球茎的液体悬浮培养. 中国中药杂志, 28 (7): 611
- 吕素芳, 郭广君, 蔡永萍(2006). 霍山石斛生理生化性质的研究进展. 中草药, 37 (5): 790~793
- 马绍懿(2008). 霍山石斛原球茎液体培养体系优化及生物碱积累规律的研究[硕士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学
- 王学奎(2006). 植物生理生化实验原理和技术(第2版). 北京: 高等教育出版社, 167~224
- 吴志刚, 刘贤旺, 张寿文(2005). 石斛属植物组织培养研究进展. 中药研究与信息, 7 (11): 23~25
- 肖春桥, 高洪, 池汝安(2004). 诱导子促进植物次生代谢产物生产的研究进展. 天然产物研究与开发, 16 (5): 473~476
- 徐茂军, 董菊芳, 张刚(2005). NO对金线桃悬浮细胞生长及金线桃素生物合成的促进作用研究. 生物工程学报, 21 (1): 66~70
- 徐宁(2000). 石斛中总生物碱的含量测定方法研究. 基层中药杂志, 15 (3): 24
- 张宪政, 陈凤玉, 王荣富(1994). 植物生理学实验技术. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 99
- Wang YD, Yuan YJ, Wu JC (2004). Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var *mairei*. Biochem Eng J, 19 (3): 259~265