

培养过程中添加蔗糖对铁皮石斛 生理生化特性的影响

岑忠用¹, 苏江¹, 何铁光²

(1. 河池学院 化学与生命科学系, 广西 宜州 546300; 2. 广西农业科学院, 广西 南宁 530007)

摘要: 以铁皮石斛类原球茎为材料, 研究了在培养过程中添加不同质量浓度的蔗糖对铁皮石斛原球茎干物质质量、多糖积累动态变化过程及原球茎在改变渗透压的条件下抗氧化酶变化的影响, 以期找出在培养过程中添加的最适蔗糖质量浓度, 以提高原球茎的多糖产量。结果表明: 在培养第 20 天添加 5 g/L 蔗糖对原球茎多糖积累最为有利, 其干质量及多糖含量、多糖产量最高, 分别为 16.02 g/L、300 mg/g、4805.85 mg/L。同时, 在培养第 20 天添加 5 g/L 蔗糖对铁皮石斛原球茎抗性的提高最为有利。

关键词: 铁皮石斛; 蔗糖; 生理生化特性

中图分类号: S682.31 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)04-0129-05

Effects of Different Sucrose Concentration Feed on Physiological and Biochemical of *Dendrobium candidum* during the Culture Process

CEN Zhong-yong¹, SU Jiang¹, HE Tie-guang²

(1. Department of Chemistry and Life Science, Hechi University, Yizhou 546300, China;

2. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: The effects of different sucrose concentration feed on the dry weight, the accumulation of polysaccharides and the activity of antioxidant enzyme with different osmotic pressure during the culture process were studied in this experiment of which protocorm-like bodies of *D. candidum* was used as material. The purpose of the experiment is to find the most appropriate concentration of sucrose in the process of culture in order to increase polysaccharide production of protocorm-like bodies of *D. candidum*. The results showed that intermittent feed 5 g/L sucrose after 20 days culturing was benefited to the accumulation of polysaccharides of protocorm-like bodies of *D. candidum*. The dry weight, contents of polysaccharides and production of polysaccharides reached to it's maximum with 16.02 g/L, 300 mg/g, 4805.85 mg/L respectively. Meanwhile intermittent feed 5 g/L sucrose after 20 days culturing was benefited to increase the resistance of protocorm-like bodies of *D. candidum*.

Key words: *Dendrobium candidum*; Sucrose; Physiological and biochemical characteristics

收稿日期: 2010-10-15

基金项目: 广西教育厅科研项目(200809MS091); 广西高校重点建设实验室桂西北特色资源研究与开发实验室资助项目(桂教科研[2009]4号)

作者简介: 岑忠用(1977-), 男, 广西田东人, 讲师, 硕士, 主要从事作物高产栽培与植物生理研究。

E-mail: zhongyong20@163.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*), 属于兰科石斛属, 其主要药效成分为多糖, 具有较强的抗肿瘤、增强免疫功能活性、清胃热、助消化等功能^[1-3], 铁皮石斛作为传统的中药材, 其价值已被世人所公认和推崇。但是, 由于长期不合理的开发利用, 其资源量大为减少, 现已被国家列为 3 级保护野生药材植物。

目前国内许多学者通过植物组织培养技术已繁殖出铁皮石斛的再生植株。铁皮石斛试管苗的繁殖一般要经过类原球茎(proto-corm-like bodies)阶段, 而原球茎实质上是正在生长分化的体细胞胚胎, 具有植株同样的物质代谢和形态发育的潜能, 用原球茎代替全植株已经成为当前解决药源匮乏的有效途径之一。在组织培养的培养基中, 蔗糖不仅为细胞生长提供能量, 同时也为细胞的组成及合成次生代谢物提供碳骨架, 而且在渗透压调节方面也起着重要作用^[3]。本研究在前期研究的基础上^[4-5], 通过在原球茎悬浮培养过程中添加不同质量浓度的蔗糖, 探讨不同渗透压条件对铁皮石斛原球茎抗氧化酶活性以及原球茎生长和多糖积累的影响, 为利用悬浮培养生产多糖产量高的铁皮石斛原球茎提供理论基础和试验基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

在无激素的 1/2MS 固体培养基上继代培养 5 次, 每 50d 继代 1 次, 从继代培养物中挑选长势均一、生长状态好、无分化、色泽鲜绿的原球茎作为试验材料。

1.2 试验设计

将原球茎按 40 g/L 接种量接种至每瓶装有 50 mL 的 1/2MS+30 g/L 蔗糖+0.1 mg/L NAA 的液体培养基上, 悬浮培养 20d, 在第 20 天时通过注射器添加以下 5 个不同质量浓度的蔗糖 20mL: (1) 0g/L 蔗糖(对照); (2)5g/L 蔗糖; (3)10g/L 蔗糖; (4)15g/L 蔗糖; (5)20g/L 蔗糖。然后继续培养到 70d, 3 次重复, 每重复 6 瓶, 每 10d 测定原球茎的干质量及多糖含量, 并测定原球茎活力、过氧化物酶活性、超氧化物歧化酶活性、过氧化氢酶活性、丙二醛含量。

1.3 测定的指标及方法

1.3.1 原球茎干质量、多糖含量和多糖产量 干质量测定方法参照文献[4]。用吸水纸吸干培养一定时间后的原球茎表面上的水, 称得鲜质量, 105℃烘 20~30 min, 60~80℃烘至恒定质量, 称得原球茎干

质量, 以 1 L 培养液所得的干质量计。多糖含量和多糖产量参照李满飞等^[6]的方法进行, 采用苯酚—浓硫酸方法进行测定。

1.3.2 原球茎活力测定 参照刘华的测定方法, 采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法^[7]进行。

1.3.3 过氧化物酶(POD)活性测定 参照杨丽涛等方法^[8]进行。酶液的提取: 称取原球茎 2.000 g, 加入 5mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8), 冰浴研磨, 于 10000 r/min 离心 15 min, 上清液为粗酶提取液(该提取液可用于过氧化氢酶(CAT)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定)。

1.3.4 SOD 活性测定 参照李合生主编的《植物生理生化实验技术》中的氮蓝四唑法^[9]进行。

1.3.5 CAT 活性测定 参照杨丽涛等方法^[8]进行。

2 结果与分析

2.1 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖后铁皮石斛原球茎生长动态变化

从图 1 可以看出, 在培养 20d 后加入 5 g/L 蔗糖处理的原球茎干质量在整个培养周期都是最大的, 添加蔗糖之后原球茎生长迅速加快, 在 60d 时达到最大值, 为 16.02 g/L。其他处理在添加蔗糖之后也经历了生长的高峰期, 但是增长速度慢于添加 5 g/L 蔗糖的处理。由此可以推断, 添加一定量的蔗糖有利于原球茎生长, 但是不同剂量的蔗糖效果不一样, 以添加 5 g/L 蔗糖的处理最适合原球茎的生长。

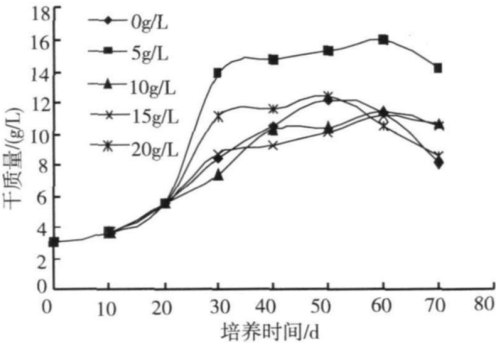


图 1 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖铁皮石斛原球茎干质量的变化

2.2 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖后铁皮石斛原球茎多糖含量的变化

从图 2 可以看出, 中途不添加蔗糖的处理多糖含量在 50d 以后明显低于其他 4 个处理, 说明中途添加蔗糖有利于多糖的合成, 但添加 5 g/L、10 g/L、

15 g/L、20 g/L 蔗糖的 4 个处理的多糖含量并无明显差别, 其中以 60 d 时添加 5 g/L 蔗糖处理多糖含量最高, 为 300 mg/g。

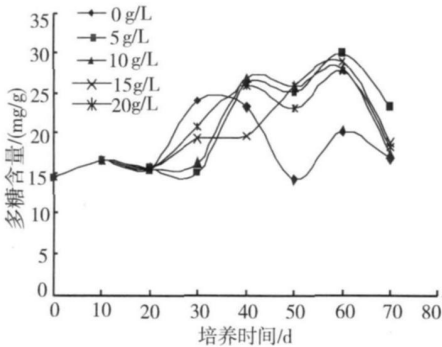


图 2 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖铁皮石斛原球茎多糖含量的变化

图 3 是添加不同质量蔗糖浓度处理的多糖产量变化曲线, 从多糖产量能达到的最大值来看, 在 60 d 时, 除对照外, 其他处理都达到了最大值, 5 g/L 蔗糖处理为 4805.85 mg/L, 各个处理的最大值不一样, 其大小顺序为: 5 g/L 蔗糖> 10 g/L 蔗糖> 15 g/L 蔗糖> 20 g/L 蔗糖> 0 g/L 蔗糖中途补料, 由此可以推断, 加入适量的蔗糖可以提高多糖的产量, 但是添加不同质量浓度的蔗糖对多糖的合成又有差别。

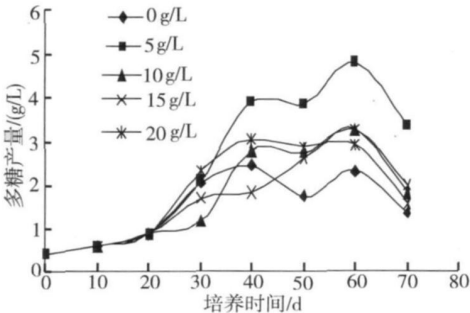


图 3 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖铁皮石斛原球茎多糖产量的变化

2.3 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖后铁皮石斛原球茎相对活力的变化

从图 4 可知, 在未添加蔗糖之前, 0~10 d 内原球茎由于转入新的培养环境活力稍有下降, 经历一段时间的适应期后活力有所上升, 在 20 d 的时候又由于蔗糖的加入, 破坏了原来的生长环境, 活力又经历一个降低阶段, 30 d 以后, 各处理的活力呈现不同的变化趋势, 其中以添加 5 g/L 蔗糖的处理活力最强, 其次为添加 10 g/L 蔗糖处理, 其他 3 个处理的活力基本一致。在培养后期的 60~70 d, 随着原球茎进入衰老期, 各处理的原球茎活力也有所下降。

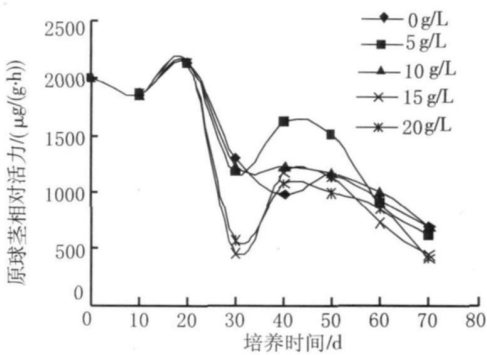


图 4 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖铁皮石斛原球茎相对活力的变化

2.4 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖后铁皮石斛原球茎 SOD 活性的变化

SOD 是植物体内普遍存在的一种保护性酶, 当植物处在不良环境下时, 体内的 SOD 活性便发生变化。从表 1 可以看出, 30 d 以前, 各处理的 SOD 活性相差不大。30 d 以后, 各处理的 SOD 活性差异大, 其中添加 15 g/L 蔗糖处理和添加 20 g/L 蔗糖处理在第 50 天时出现一次高峰, 添加 5 g/L 蔗糖、10 g/L 蔗糖和 0 g/L 蔗糖的处理在第 60 天出现一次高峰。添加 5 g/L 和 10 g/L 蔗糖处理的 SOD 活性高峰期与它们的多糖含量高峰期出现在同一时间。

表 1 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖后铁皮石斛原球茎的 SOD 活性 U/g

培养时间/d	蔗糖质量浓度/(g/L)				
	0	5	10	15	20
0	60.12	60.12	60.12	60.12	60.12
10	62.51	62.51	62.51	62.51	62.51
20	41.38	41.38	41.38	41.38	41.38
30	53.04	55.29	54.83	50.68	55.58
40	30.17	20.39	49.33	60.89	31.98
50	43.88	37.25	61.75	75.34	59.97
60	65.10	78.67	74.25	70.07	35.63
70	47.45	49.76	55.19	30.56	26.69
平均	50.46	50.67	57.42	56.44	46.73

2.5 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖后铁皮石斛原球茎 POD 活性的变化

从表 2 可以看出, 除了对照的 POD 活性在 60 d 的时候出现一个高峰, 其他处理在 50 d 时几乎都达到了高峰。

2.6 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖后铁皮石斛原球茎 CAT 活性的变化

CAT 的作用基本同 POD, 它可以催化细胞内过氧化氢分解成水, 对细胞中活性氧的消除有重要的作用。但 CAT 变化较 POD 复杂, 由表 3 可知,

在培养的 70 d 里,各处理的变化规律基本上呈波浪形变化趋势,只是各处理出现的高峰和低峰的时间不同。

表 2 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖后原球茎的 POD 酶活性 $\triangle OD_{470}/(g \cdot min)$					
培养时间/d	蔗糖质量浓度/(g/L)				
	0	5	10	15	20
0	48.56	48.56	48.56	48.56	48.56
10	54.17	54.17	54.17	54.17	54.17
20	209.40	209.40	209.40	209.40	209.40
30	155.85	219.57	390.70	205.51	707.80
40	176.53	221.64	160.02	123.72	103.49
50	161.40	1501.01	788.14	1107.68	495.86
60	298.49	806.38	452.84	421.54	365.23
70	153.50	440.63	354.07	342.21	256.85
平均	157.24	437.67	307.24	314.10	280.17

表 3 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖后原球茎的 CAT 活性 $\triangle OD_{240}/(g \cdot min)$					
培养时间/d	蔗糖质量浓度/(g/L)				
	0	5	10	15	20
0	5.78	5.78	5.78	5.78	5.78
10	33.02	33.02	33.02	33.02	33.02
20	17.18	17.18	17.18	17.18	17.18
30	124.57	177.50	236.14	111.91	144.92
40	158.28	125.75	45.63	107.60	126.64
50	60.19	72.35	136.91	17.99	71.96
60	22.07	227.03	124.47	123.59	181.37
70	201.20	267.58	234.39	125.10	190.56
平均	77.79	115.78	104.19	67.77	96.43

渗透压胁迫属于一种水分逆境胁迫,植物的抗逆性是由多方面的抗性相互作用的综合性状,若根据单一指标评定品种的抗逆性,难免带有片面性。因此,本试验参照高吉寅等的抗旱性分级评价法^[10]和胡荣海等的抗寒性分级评价法^[11],对 5 个处理的抗氧化生理生化指标进行综合打分,各处理的总分如表 4。5g/L 蔗糖处理的综合打分最高,其次为 10 g/L 蔗糖处理,分值最少为对照,这与多糖产量的排列顺序一致,可以推断,这 3 个抗氧化性酶活性综合评价在某种程度上可以间接地反映多糖产量。

表 4 培养过程中添加不同质量浓度蔗糖后原球茎的 抗氧化特性综合评分比较				
蔗糖质量浓度/ (g/L)	SOD	POD	CAT	总分
0	2	1	2	5
5	3	5	5	13
10	5	3	4	12
15	4	4	1	9
20	1	2	3	6

3 结论与讨论

蔗糖是常用的碳源,一般认为,其被植物组织细

胞壁内的蔗糖酶分解为葡萄糖和果糖后,再被细胞吸收利用,不同的初始蔗糖质量浓度可以影响生物量和代谢水平,以及细胞的形态和发生,进而影响次生代谢产物的生物合成。梅兴国^[12]研究红豆杉生产紫杉醇时在中途补加蔗糖,发现可以提高紫杉醇的含量。本试验结果表明,中途添加蔗糖处理的原球茎多糖含量均比对照的高,说明高质量浓度的蔗糖有利于铁皮石斛类原球茎多糖的合成,在 4 个处理中,又以中途添加 5 g/L 蔗糖处理的多糖含量和产量最高。通常认为,高糖的渗透效应导致了渗透胁迫,这种胁迫能诱导植物的次生代谢。渗透压胁迫属于水分胁迫,植物在逆境条件下,细胞体内的自由基代谢的平衡被破坏而有利于自由基的产生,过剩的自由基造成的毒害之一是引发或加剧膜脂氧化作用,SOD、POD 均为植物内源自由基清除剂,属保护性酶系统^[13],在逆境中活性增强或维持较高的水平,才能清除活性氧自由基,使之保持较低的水平,维持细胞膜的稳定性和完整性。SOD 能歧化活性氧 O₂⁻ 为 O₂ 和 H₂O₂,CAT 能分解 H₂O₂ 为 O₂ 和 H₂O,活性氧在促进膜质过氧化的过程中可以产生一些称之为第二信使的信号物质,如脱落酸、茉莉酸甲酯等,它们对目的产物的积累有促进作用,从而有利于多糖的合成^[14]。POD 酶是广泛存在于植物体内且功能较多的酶类,可参与吲哚乙酸水平调节、乙烯的形成、细胞的形成、膜透性的调节、脂肪酸氧化以及抗病、抗感染、抗旱及抗寒等多种生理功能。在水分胁迫等逆境中可消除活性氧对细胞膜的伤害,减少膜脂过氧化,稳定膜系统^[15]。本试验结果表明,经不同质量浓度蔗糖渗透压胁迫后铁皮石斛原球茎的 SOD 活性、POD 活性、CAT 活性变化也不一样。从整个培养阶段来看,添加 5g/L 蔗糖处理的 POD 活性、CAT 活性为最大。综合 3 个抗氧化性酶活性并分别对各处理打分,添加 5 g/L 蔗糖处理的分值最高,为 13 分,其次是添加 10g/L 蔗糖的处理,对照处理分值最低,仅为 5 分。此外,本试验发现分值高低与多糖产量的排列顺序一致,即分值越高,多糖产量也越高。

综上所述,在本试验的 5 个处理中,认为中途添加 5 g/L 蔗糖处理最有利于铁皮石斛原球茎多糖的合成及抗性的提高。但是,目前关于高质量浓度的碳源在诱导次生代谢产物的合成后是否还起着维持次生代谢的作用尚不清楚,有关高质量浓度碳源对次生代谢产物诱导的机制和信号转导途径的研究也较少,这些问题都有待进一步研究。

参考文献:

[1] Chen C C, Wu L G, Ko F N, *et al.* Antiplatelet aggregation principles of *Dendrobium loddigesii* [J]. J Nat Prod, 1994, 57(9): 1271-1274.

[2] 付开聪, 连守臣, 冯德强, 等. 黑节草资源的应用与开发 [J]. 中草药, 1999, 30(9): 708-711.

[3] 梅兴国. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2003: 72-73.

[4] 苏江, 罗兴录, 何铁光, 等. 铁皮石斛原球茎固体培养和液体悬浮培养动力学研究 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(4): 161-165.

[5] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 蔗糖对铁皮石斛原球茎生长与多糖积累的影响 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3817-3819.

[6] 李满飞, 徐国钧, 平田义正. 中药石斛类多糖的含量测定 [J]. 中草药, 1990, 21(10): 10-12.

[7] 刘华, 梅兴国. TTC 法测定红豆杉细胞活力 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 537-539.

[8] 杨丽涛, 李杨瑞, 莫家让, 等. 喷施“多效好”对甘蔗叶片几个生理生化特性的效应研究初报 [J]. 广西农学院学报, 1990, 9(1): 79-83.

[9] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 167-169.

[10] 高吉寅, 胡荣海, 路漳, 等. 水稻等品种苗期抗旱生理指标的探讨 [J]. 中国农业科学, 1984(4): 41-46.

[11] 胡荣海, 陶淑芝. 玉米苗期抗冷鉴定方法及指标 [J]. 农业科技通讯, 1981(3): 14.

[12] 梅兴国. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2003: 129.

[13] 陈少欲. 膜质过氧化对植物细胞的伤害 [J]. 植物生理学通讯, 1997, 27(2): 84-90.

[14] 张刚, 李里特, 丹阳. 果蔬成熟衰老中的活性氧代谢 [J]. 食品科学, 2004(S1): 225-230.

[15] 文建成, 陈学宽, 符菊芬, 等. 质膜透性与丙二醛含量的变化评价甘蔗品种抗旱性初探 [J]. 甘蔗, 1998, 5(3): 1-5.

(上接第 128 页)是快繁技术一个关键环节^[9-15]。移栽前要对试管苗进行通风炼苗, 先将生根试管苗拿出培养室, 去掉封口膜, 使嫩苗逐渐与外界接触, 提高适应能力, 常温下炼苗 3 d 后, 向瓶中加入少量温水, 以软化培养基。移栽时用镊子轻轻取出试管苗, 将根部培养基冲洗干净。温室炼苗 7 d, 移栽基质为纯砂 : 草炭土 = 1 : 1, 移栽成活率高达 92.78%。

参考文献:

[1] 刘孟军, 陈虎彪, 刘俊芳, 等. 中国野生果树 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 227-228.

[2] 许洋, 王笑山. 树莓和黑莓栽培技术研究 [J]. 林业科技通讯, 2000(11): 12.

[3] 卢军, 张相波, 王路勇, 等. 树莓栽培技术 [J]. 现代农业科技, 2009(3): 42.

[4] 于有国, 靳士义, 曹相国. 树莓的生物学特性及栽培技术 [J]. 现代农业科技, 2009(19): 118.

[5] 朴日子, 曹后男, 陈艳秋, 等. 无刺红树莓组织培养快速繁殖技术研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(4): 411-414.

[6] 王岳英. 树莓组织培养最佳外植体材料试验 [J]. 山西林业科技, 2009, 38(2): 12-13.

[7] 毕海林, 徐中志, 和加卫, 等. 红宝玉树莓组织培养和快速繁殖技术研究 [J]. 现代农业科技, 2007(4): 5-6.

[8] 张林水, 李志民, 李波, 等. 树莓组培快繁技术体系研究 [J]. 山西农业科学, 2006, 34(1): 32-34.

[9] 黄象男, 臧新, 吕晓辉, 等. 蝴蝶兰组培快繁技术研究 [J]. 河南农业科学, 2008(1): 91-93, 109.

[10] 刘辉, 邵德田. 石刁柏全雄株的组培快繁技术 [J]. 河南农业科学, 2007(6): 113-114.

[11] 孙云玲, 姚洪源, 田华林, 等. 马蓝组培快繁技术研究 [J]. 现代农业科技, 2010(9): 102-103.

[12] 张耀华. 盾叶薯蓣快繁的研究 [J]. 山西农业科学, 2008(12): 58-59.

[13] 陈延惠, 刘丽, 李洪涛, 等. 突尼斯软子石榴组织培养快繁体系的建立 [J]. 河南农业大学学报, 2010, 44(2): 160-162, 166.

[14] 张寒霜, 赵俊丽, 李伟明, 等. 大蒜茎尖脱毒培养及快繁技术研究 [J]. 华北农学报, 2006, 21(B11): 117-119.

[15] 徐伟忠, 朱丽霞, 苏朝安. CO₂ 与氧气在植物非试管快繁技术中的运用 [J]. 华北农学报, 2005, 20(F12): 113-118.