

光强对悬浮培养下铁皮石斛原球茎生长的影响

杨小兵¹,王增利¹,史 昊²,张宗申^{1*},金朝霞¹

(1. 大连工业大学 辽宁省发酵工程重点实验室,辽宁 大连 116034;

2. 河南省财鑫集团,河南 郸城 477150)

摘要:以长势均一、色泽深绿的铁皮石斛原球茎为试验材料,分别在1 000 lx、2 000 lx和3 000 lx的光强下进行12 h/d的光照培养,每隔7 d测定其鲜质量、多糖含量、叶绿素含量及叶绿素a/b,研究光强对悬浮培养下铁皮石斛原球茎生长的影响。结果表明,2 000 lx光强完全满足液体条件下铁皮石斛原球茎生长的要求,鲜质量和多糖(23.4%)的积累最高,同时叶绿素含量也最大,光强较低时,其叶绿素a/b值也较低,这与自然生境下铁皮石斛的相关参数一致。表明提供一定光强和光周期,采取悬浮方式规模化培养铁皮石斛原球茎是可行的。

关键词:铁皮石斛;原球茎;光照;叶绿素

中图分类号:S567.23 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2014)01-0116-04

Effect of Light Intensity on Protocorm-like Bodies Growth of *Dendrobium candidum* under Condition of Suspension Culture

YANG Xiao-bing¹,WANG Zeng-li¹,SHI Hao²,ZHANG Zong-shen^{1*},JIN Zhao-xia¹

(1. Key Laboratory for Fermentation Engineering,Dalian Polytechnic University,Dalian 116034,China;

2. Henan Caixin Group,Dancheng 477150,China)

Abstract: The protocorm-like bodies(PLBs) in uniform growth and dark green color were sampled to investigate the effect of light intensity on the growth of PLBs under the condition of suspension culture,the light intensity was set as 1 000 lx,2 000 lx and 3 000 lx under 12 h light/12 h dark photoperiod condition,respectively;the shaking speed and temperature were 70 r/min and (24±1) °C;the fresh biomass,content of polysaccharides and chlorophyll,the ratio of chlorophyll a to chlorophyll b were examined every 7 days. The results showed that when the light intensity was 2 000 lx,the growth performance of PLBs was good under the condition of liquid culture,the fresh biomass,content of polysaccharide(23.4%) and total chlorophyll in PLBs were the maximum;when the light intensity was weaker,the ratio of chlorophyll a to chlorophyll b was lower,which was consistent with that of *Dendrobium candidum* seedlings under inhabitant environment. The above results suggested that it might be feasible to propagate PLBs of *Dendrobium candidum* by suspension culture with certain light intensity under certain photoperiod condition.

Key words: *Dendrobium candidum*; protocorm-like bodies; light intensity; chlorophyll

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)是兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)多年附生草本植物,其生境主要是云南、广西、安徽等地。铁皮石斛

是益胃生津的滋补良药,多糖为其主要的药用有效成分^[1]。在自然条件下,铁皮石斛种子的萌发率很低而且生长速度缓慢,加上近年来的掠夺性采挖,自

收稿日期:2013-06-12

基金项目:国家自然科学基金项目(31070164);人事部博士后科学基金项目(2013M541967)

作者简介:杨小兵(1986-),男,山西临汾人,在读硕士研究生,研究方向:药用植物细胞工程。E-mail:252213799@qq.com

*通讯作者:张宗申(1968-),男,河南周口人,教授,博士,主要从事药用植物细胞工程研究。E-mail:zhangzs@dlpu.edu.cn

然资源濒临枯竭。目前对其原球茎的悬浮培养研究日益广泛,一方面原球茎可以直接用来分化幼苗,也可以作为繁殖体制备人工种子,解决试管苗移栽成活率低的问题^[2];另一方面可以直接从悬浮培养的原球茎中提取有效的药用成分,代替其野生或栽培的原植株满足药材市场的需求^[3];另外,采取液体培养方式有利于工业化生产,节省大量人力物力。由于液体培养方式中光强因素对原球茎生长影响很大,因此,研究了不同光强对铁皮石斛原球茎生长的影响,以期对铁皮石斛原球茎的规模化培养提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

铁皮石斛成熟的蒴果。

1.2 培养方法

将铁皮石斛成熟的蒴果分别用 75% 的乙醇和 0.1% 的升汞进行表面消毒,用无菌水冲洗数次后,将蒴果切开把种子接种于 N_6 培养基(不加激素,琼脂 5 g/L,蔗糖 20 g/L,香蕉 100 g/L)上诱导出原球茎,然后将诱导出的原球茎在 N_6 培养基(土豆 100 g/L)上继代培养,然后选择长势均一、良好的原球茎分为 3 组,均接种在 $N_6 + 1.0 \text{ mg/L NAA} + 1.0 \text{ mg/L KT}$ 的液体培养基中^[4],蔗糖 20 g/L,接种量 40 g/L,温度 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$,转速 70 r/min,分别在 1 000、2 000、3 000 lx 的光强下进行液体培养,光周期 12 h/d,每隔 7 d 取样测定原球茎鲜质量、多糖含量和叶绿素含量等参数。

1.3 测定指标和方法

1.3.1 鲜质量 将收获的原球茎冲洗数次,用吸水纸吸干表面的水分之后称质量,计算每升培养基中原球茎的鲜质量。

1.3.2 多糖含量 用苯酚-浓硫酸法^[5]测定多糖含量。

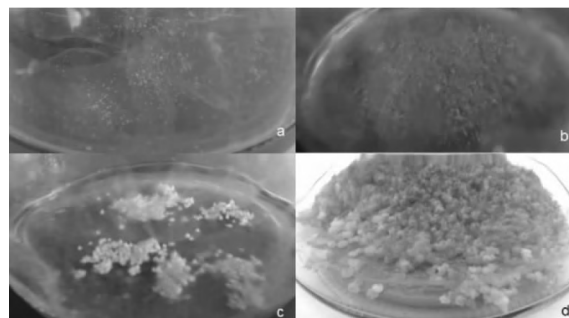
1.3.3 叶绿素含量 采用 1:1 的乙醇-丙醇混合液在黑暗中常温浸提 72 h 后用分光光度计测量其吸光度,按照 Arnon 法修正公式^[6]计算。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛种子的萌发与原球茎的培养

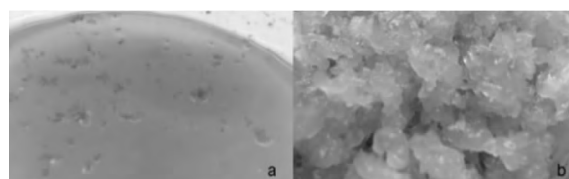
从图 1—3 可以看出,铁皮石斛的种子在培养基上培养 20 d 后原胚逐渐萌动膨大变绿,40 d 后可以在培养基的表面看见绿色的原球茎(呈小圆锥状),培养 70 d 后原球茎增殖明显,原球茎颜色鲜绿,长势良好。然后再进行继代培养,继代 2 次后原球茎长势均一,颜色鲜绿。在不同光照强度下经过 35 d

的悬浮培养后可以看到,在 2 000 lx 的光照强度下,原球茎生长良好,增殖明显;而在 1 000 lx 的光照强度下,可看到原球茎颜色变黄,产生褐化现象,不利于原球茎生长,而在光照过强时(3 000 lx)同样不利于原球茎的生长。



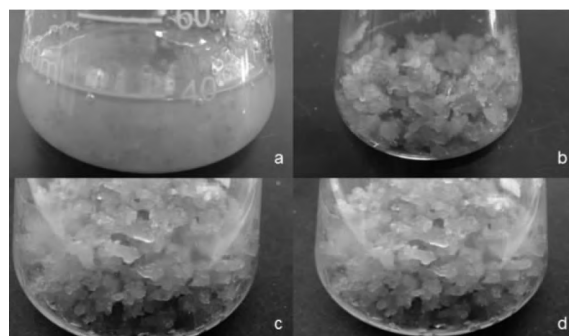
a. 初始培养; b—d 分别为培养 20、40、70 d 后种子萌发情况

图 1 铁皮石斛种子的萌发情况



a. 初始继代; b. 继代 2 次后原球茎生长情况

图 2 铁皮石斛原球茎的继代情况



a. 初始培养; b—d 分别为在光照强度 1 000、2 000、3 000 lx 下培养 35 d 后原球茎生长状况

图 3 铁皮石斛原球茎在不同光照强度下的生长情况

2.2 不同光照强度下铁皮石斛原球茎的鲜质量变化

从图 4 可以看出,不同光照强度对铁皮石斛原球茎增殖影响比较大,在光照为 1 000 lx 时,原球茎的鲜质量开始增加比较明显,但在培养后期,铁皮石斛原球茎出现黄化现象,不利于其光合作用,而且消耗其内部的有机成分,导致鲜质量增加比较缓慢;光强为 2 000 lx 时,原球茎在整个生长周期中都保持着很好的生长,鲜质量最高。当光强增加到 3 000 lx 时,强光照反而抑制了原球茎的生长,这可能是由于光照过强产生光抑制。在正常条件下,光合作用活性氧的产生和消除系统之间存在稳定的动态平衡,

在光照过强时,植物吸收的光能超过光合作用所能利用的能力,使得上述平衡被打破,光合作用受到抑制,另外呼吸作用也有可能增加,从而消耗植物体内的有机物。

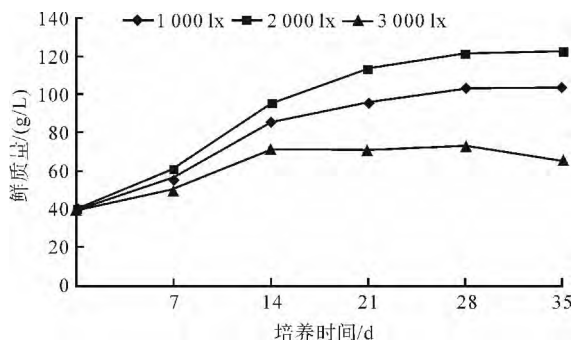


图4 不同光照强度下铁皮石斛原球茎的鲜质量变化

2.3 不同光照强度下铁皮石斛原球茎多糖含量的变化

从图5可以看出,光照强度影响原球茎中多糖的积累,不同光强下原球茎中的多糖含量均表现为先减少再增多最后又减少,这可能是由于原球茎刚刚转入新的培养基时分解多糖以供其生长,使多糖含量下降,随着培养时间的延长,原球茎适应培养基的环境快速生长,多糖得到积累,到培养后期,培养基的营养物质消耗殆尽,多糖又再一次被消耗以供原球茎生长,因此在培养后期表现为多糖含量下降。在3种光照强度下,1 000 lx光照最不利于原球茎中多糖的积累,这可能是弱光条件下植物的光合作用受到影响,光合作用产物减少导致的;光照过强同样会使原球茎中多糖含量下降,最适合原球茎多糖积累的光照条件为2 000 lx,多糖积累量最多可达23.4%。

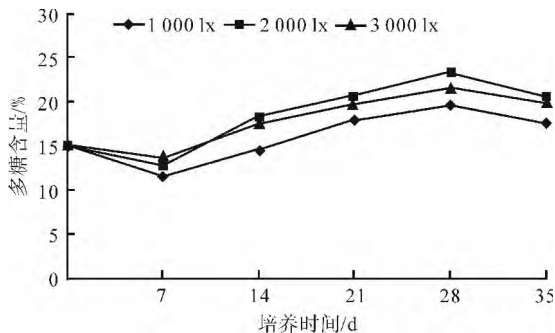


图5 不同光照强度下铁皮石斛原球茎的多糖含量变化

2.4 不同光照强度下铁皮石斛原球茎的叶绿素含量变化

从图6可以看出,当光照强度为2 000 lx时,原球茎叶绿素含量随着培养时间的延长而逐渐增加,而在3 000 lx下仅在培养前期叶绿素含量有短暂上

升,但后期呈明显下降趋势,当光照强度为1 000 lx时,原球茎叶绿素含量则处于较低的水平。

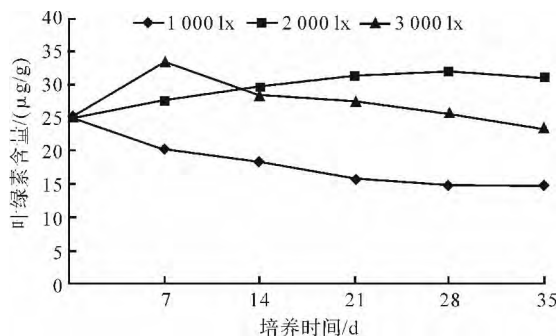


图6 不同光照强度下铁皮石斛原球茎的叶绿素含量变化

从图7可以看到,当光照强度为1 000 lx时,随着培养时间的延长,叶绿素a/b最终处于很低状态;而在2 000 lx和3 000 lx下,叶绿素a/b则逐步增大,其中3 000 lx光照下初期增幅明显,而后期增长速度均减缓,最后趋于稳定。

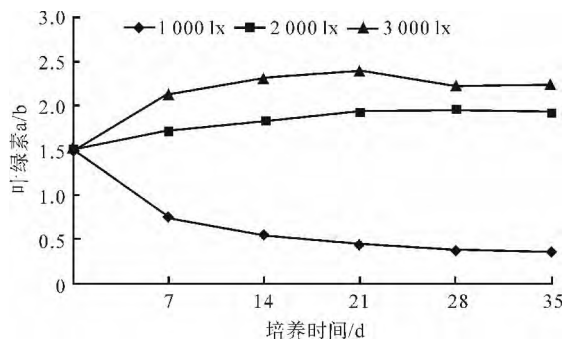


图7 不同光照强度下铁皮石斛原球茎的叶绿素a/b变化

3 结论与讨论

铁皮石斛是阴生植物。从3种不同光照强度下铁皮石斛原球茎的生长状况可知,光照强度2 000 lx最有利于原球茎的鲜质量和多糖含量增加,其长势良好,颜色鲜绿。叶绿素的合成受到多种因素的影响,而光照强度在诸多外部因素中起主导作用。植物体中叶绿素的合成与分解处于一个动态平衡,叶绿素酯在光照后,才能合成叶绿素,此过程要求的光照强度比较低,但是光照过弱也不利于叶绿素的合成(如1 000 lx),而光照过强(如3 000 lx)会发生光氧化不利于叶绿素的合成,只有叶绿素与蛋白结合成为结合态的叶绿素才能发挥作用^[7-9]。自由态的叶绿素会对细胞产生光氧化,造成细胞损伤,为了防止损伤,植物会快速降解自由态的叶绿素;而适当的光照(2 000 lx),由于多效调节,使集光色素蛋白在光合单位中的相对含量会增加,从而导致结合态的叶绿素增加,使叶绿素的含量增加^[10]。光照过弱时

叶绿素 a/b 值很低,此过程中对弱光的吸收能力加强是植物对外界环境变化的一种生理调节。叶绿素是植物进行光合作用必不可少的条件,而在饱和光照下,光合速率与叶绿素含量的多少无关。光照过强还会对植物细胞造成伤害,对于铁皮石斛原球茎而言,适当地减弱光照是有益于其生长发育的。

参考文献:

- [1] 艾娟. 温度对铁皮石斛生长及生理特性的影响[J]. 云南植物研究, 2010, 32(5): 420-426.
- [2] 魏小勇. 铁皮石斛原球茎悬浮培养研究[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(4): 7-11.
- [3] 韩晓红, 段春红, 阎贺静. 铁皮石斛原球茎液体悬浮培养研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(20): 10570-10572.
- [4] 王增利, 史昊, 张宗申. 铁皮石斛原球茎悬浮培养及其多糖积累的研究[J]. 河南农业科学, 2012, 41(2): 129-131.
- [5] 李亚芳, 张晓华, 孙国明. 石斛中总生物碱和多糖含量的测定[J]. 中国药事, 2002, 16(7): 426-428.
- [6] 鲍顺淑, 贺冬仙, 郭顺星. 铁皮石斛在人工光型密闭式植物工厂的适宜光照强度[J]. 中国农学通报, 2007, 23(3): 469-473.
- [7] 张其德. 植物自身因素对光合作用的影响[J]. 植物杂志, 1989(6): 30-31.
- [8] 薛云申. 光照强度对叶片叶绿素含量的影响[J]. 生物学教学, 2001, 26(10): 24.
- [9] 黄建华. 遮光对植物光合特性的影响[J]. 生物学教学, 2012, 37(1): 51-53.
- [10] 史典义. 植物叶绿素合成、分解代谢及信号调控[J]. 遗传, 2009, 31(7): 698-704.
- [11] 王茹华, 周宝利, 张启发, 等. 茄子/番茄嫁接植株的生理特性及其对黄萎病的抗性[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 330-332.
- [12] 刘娜, 周宝利, 李铁修, 等. 茄子/番茄嫁接植株根系分泌物对茄子黄萎病菌的化感作用[J]. 园艺学报, 2008, 35(9): 1297-1304.
- [13] 董灵迪, 石琳琪, 焦永刚, 等. 嫁接防治茄子黄萎病砧木筛选及效果研究[J]. 河北农业科学, 2010, 14(10): 46-47.
- [14] 王茹华, 周宝利, 张启发等. 茄子/番茄嫁接抗病增产效果初报[J]. 中国蔬菜, 2003, (4): 10-11.
- [15] 饶贵珍, 肖波. 不同砧木嫁接白皮黄瓜的综合效应研究[J]. 中国农学通报, 2003, 19(5): 150-153.
- [16] 尹贤贵, 罗庆熙, 王文强, 等. 番茄耐热性鉴定方法研究[J]. 西南农业学报, 2001, 14(2): 62-65.
- [17] 王志和, 于丽艳, 曹德航, 等. 短期高温处理对大白菜几个生理指标的影响[J]. 西北农业学报, 2005, 14(3): 82-85.
- [18] 孟令波, 秦智伟, 李淑敏. 高温胁迫对黄瓜幼苗根系生长的影响[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 694-698.
- [19] 何晓明, 林毓娥, 陈清华, 等. 高温对黄瓜幼苗生长脯氨酸含量及 SOD 活性的影响[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2002, 12(1): 30-33.
- [20] 王志和. 大白菜亲本耐热性筛选方法的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2005.
- [21] 高素燕, 吕敬刚, 刘文明. 辣椒高温胁迫和耐热机理的研究进展[J]. 天津农业科学, 2012, 18(1): 31-34.
- [22] 禄鑫. 高温胁迫对报春花叶片细胞膜透性的影响[J]. 天津农业科学, 2012, 18(2): 140-141.
- [23] 牛远, 梁建萍, 张建达, 等. 高温胁迫对华北落叶松幼苗抗氧化酶的影响[J]. 山西农业科学, 2008, 36(10): 47-49.
- [24] 王安乐, 陈朝辉, 赵德法. 玉米自交系材料耐高温特性鉴定筛选初报[J]. 山西农业科学, 2003, 31(4): 15-17.

(上接第 115 页)