

不同培养条件对环草石斛愈伤组织中次生代谢产物的影响

卢文芸¹, 张宇斌², 罗迎春¹, 何可群¹, 李洪庆³, 乙引^{2*} (1. 贵州民族学院化学与环境科学学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550001; 3. 贵州大学生物工程中心, 贵州贵阳 550025)

摘要 [目的]探索环草石斛生长与其主要的次生代谢产物——石斛碱和石斛多糖积累之间的关系。[方法]用苯酚-浓硫酸法和溴甲酚绿酸性染料比色法测定了不同培养条件对环草石斛愈伤组织中的多糖和总生物碱含量的影响。[结果]环草石斛悬浮培养的愈伤组织生长曲线呈“S”型。在光照条件下,环草石斛悬浮培养的愈伤组织中总生物碱和多糖含量的积累与其生长基本同步,光照有利于悬浮培养愈伤组织的生长和多糖的积累;在暗培养条件下,愈伤组织生长缓慢,多糖的积累不与其生长同步,但暗培养却可以提高愈伤组织中总生物碱的含量。[结论]环草石斛生长与其主要的次生代谢产物——总生物碱和石斛多糖积累之间有着密切的关系,不同培养条件对环草石斛中次生代谢产物具有一定的影响。

关键词 光照;通气量;环草石斛愈伤组织;总生物碱;多糖

中图分类号 S682.31 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16365-04

Influences of Different Culture Conditions on the Secondary Metabolites in *Dendrobium loddigesii* Calli

LU Wen-yun et al (College of Chemistry and Environmental Science, Guizhou University for Nationalities, Guiyang, Guizhou 550025)

Abstract [Objective]The research aimed to explore the relationship between the growth of *Dendrobium loddigesii* and its main secondary metabolites-the dendrobine and the accumulation of dendrobium polysaccharides. [Method]The phenol-concentrated sulphuric acid colorimetry and bromocresol green acid dye colorimetry were used to determine the effects of different culture conditions on polysaccharides and total alkaloids in the callus of *D. loddigesii*. [Result]The growth curve of callus of *D. loddigesii* in suspension culture was “S” type. Under the culturing condition of light, the accumulation of polysaccharides and total alkaloids in the callus of *D. loddigesii* in suspension culture was basically synchronized with its growth. The light was beneficial for the growth of callus in suspension culture and the accumulation of polysaccharides. But under the condition of dark, the callus grew slowly and the accumulation of polysaccharides was not synchronized with its growth. But the dark culture could enhance the accumulation of total alkaloids greatly. [Conclusion]There were a close relationship between the growth of *D. loddigesii* and its main secondary metabolites - the dendrobine and the accumulation of dendrobium polysaccharides and the different culture conditions had some influences on the secondary metabolite of *D. loddigesii*.

Key words Illumination; Ventilation; *Dendrobium loddigesii* callus; Total alkaloids; Polysaccharides

环草石斛(*Dendrobium loddigesii* Rolfe.)为兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium* Sw.)多年生草本植物,自古就被认为是一种优质的药用石斛品种,是药用石斛重要的原植物之一,有养阴益胃、生津止渴、清热等功效^[1]。现代科学研究表明,石斛主要成分为多糖和生物碱,其药理作用与二者有着密切关联^[2-5]。环草石斛与其他石斛一样,同样存在着生长缓慢、自然繁殖率低、资源短缺等问题^[6]。为解决环草石斛对野生和栽培的依赖,利用植物组织及细胞培养生产有用的次生代谢产物是行之有效的办法^[7]。但是,目前涉及不同培养条件对环草石斛愈伤组织生长和次生代谢物积累之间的研究文献少见报道。因此,有必要在前人研究的基础上^[6,8-12],继续探索环草石斛生长与其主要的次生代谢产物——石斛碱和石斛多糖积累之间的关系,探索不同培养条件对环草石斛中次生代谢物的影响。笔者用苯酚-浓硫酸法和溴甲酚绿酸性染料比色法测定了不同培养条件对环草石斛愈伤组织中的多糖和总生物碱含量^[13-15]的影响,为从环草石斛愈伤组织中直接提取原药成分的研究提供了参考。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料。环草石斛的愈伤组织由贵州师范大学生命科学学院组培室提供,已继代培养1年;试验材料的鲜样先用蒸馏水洗净,在滤纸上吸干水分,105℃杀青15min,再于80℃恒温烘箱中烘至恒重,用研钵研碎,过60目筛,分别

用样品袋装好并贴上标签,置于干燥器中保存。

1.1.2 仪器与试剂。SW-CJ-2FD型医用净化工作台;WSZ-100-A型振荡器;高压蒸汽灭菌锅;7550型分光光度计。

pH值4.5缓冲溶液:0.2mol/L邻苯二甲酸氢钾(pH值4.0),用0.2mol/L氢氧化钠调pH值至4.5。0.04%溴甲酚绿溶液:称取溴甲酚绿40.0mg,加100ml pH值4.5缓冲溶液溶解,滤过即得。0.01mol/L氢氧化钠无水乙醇溶液。石斛碱标准工作液(10μg/ml):精密称取石斛碱1.00mg,置100ml容量瓶中,加氯仿至刻度,摇匀。苯酚试液:称取10g苯酚,溶于150g重蒸水即得,置棕色瓶内,放冰箱中备用。葡萄糖标准工作液(100μg/ml):精密称取105℃干燥至恒重的标准葡萄糖100mg,置100ml容量瓶中,加水适量使其溶解,稀释至刻度,摇匀。精密吸取10ml置100ml容量瓶中,用水稀释至刻度即得。每10μl含葡萄糖1μg。浓氨水、浓硫酸、氯仿、无水乙醇等均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 总生物碱的测定。用碱性氯仿提取生物碱,用溴甲酚绿酸性染料比色法^[13]测定其含量。

1.2.2 多糖含量的测定。用80%乙醇提取分离干扰组分后,再用水提取多糖,以浓硫酸-苯酚比色法^[15]测定其含量。

2 结果与分析

2.1 光照和通气量对环草石斛愈伤组织中总生物碱积累的影响由图1、2可知,摇床的转速对环草石斛愈伤组织中总生物碱的含量影响很大,不管是光培养还是暗培养,在转速为100r/min时,愈伤组织中总生物碱的含量表现为最高。而在转速为120r/min下培养的环草石斛愈伤组织到40d左右,其总生物碱含量已开始下降。这可能是由于愈伤组织开

基金项目 贵州省教育厅自然科学类科研项目(黔教科2007052)。
作者简介 卢文芸(1969-),女,彝族,贵州毕节人,副教授,从事植物生理生化研究。*通讯作者,E-mail: yiyin@gz139.com.cn。
收稿日期 2009-07-22

始出现褐化后,在液体培养基中产生一些不利于愈伤组织生长的物质,这些物质可能会导致愈伤组织的分解代谢加强,减少了总生物碱合成前体物的供给,从而影响总生物碱的合成。在曲线上就表现出愈伤组织生长量和总生物碱含量呈下降的趋势。同等条件下光培养和暗培养的愈伤组织中总生物碱的含量与其生长呈正相关,除在 120 r/min 下培养的环境草石斛愈伤组织外,其他从开始培养到第 50 天左右,总生物碱含量一直平稳增长,第 50 天达到积累高峰,然后缓慢下降。值得注意的是,在黑暗培养下,愈伤组织中总生物碱的积累量比光培养下的高,大约是接种时的 2.3~3.9 倍,其最大值约是光培养下的 2 倍,但是由于暗培养下生长量比光培养的低很多,所以它的生物碱总量还是比光培养下的少。可知,适宜的转速有利于环草石斛愈伤组织中总生物碱的积累;黑暗比光照有利于环草石斛愈伤组织中总生物碱的积累,愈伤组织中总生物碱的含量积累并非随光强的增加而增加。从环草石斛愈伤组织生长及其总生物碱含量变化的曲线可以看出:愈伤组织悬浮培养的最适转接时间为第 50 天左右。与固体培养基相比,在整个液体培养过程中未见拟原球茎出现。

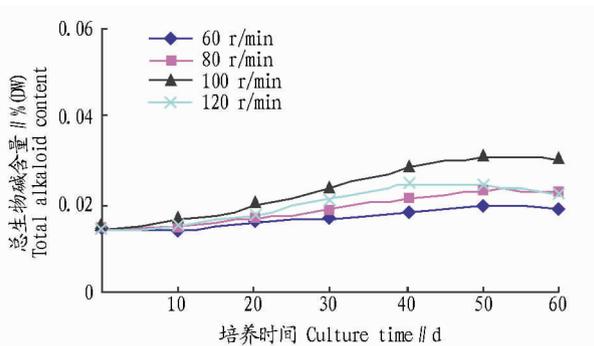


图 1 光对不同转速下环草石斛愈伤组织中总生物碱积累的影响

Fig.1 Effect of illumination on the accumulation of total alkaloids of callus from *D. loddigesii* at different rotation speed

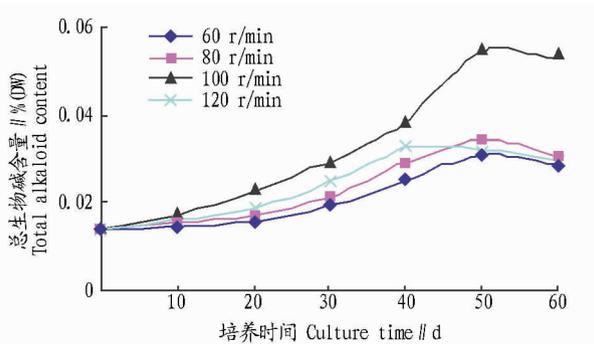


图 2 黑暗对不同转速下环草石斛愈伤组织中总生物碱积累的影响

Fig.2 Effect of darkness on the accumulation of total alkaloids of callus from *D. loddigesii* at different rotation speed

2.2 光照和通气量对悬浮培养液中总生物碱积累的影响 由图 3、4 可知,随着培养时间的延长,悬浮培养液中总生物碱的含量呈“S”性变化,与愈伤组织细胞团中总生物碱的积累规律是一致的。与图 1 和图 2 进行比较,发现绝大部分生物碱在细胞团中积累,推测悬浮培养液中的生物碱是由细胞中分泌到溶液中的,也有可能是破碎细胞释放出来的。关于悬浮液中的生物碱的来源,需要进一步试验证实。另外,从环

草石斛愈伤组织悬浮培养液中总生物碱含量变化的曲线可以看出:悬浮培养中总生物碱的含量在第 50 天左右为最高(120 r/min 下环草石斛愈伤组织培养液除外)。

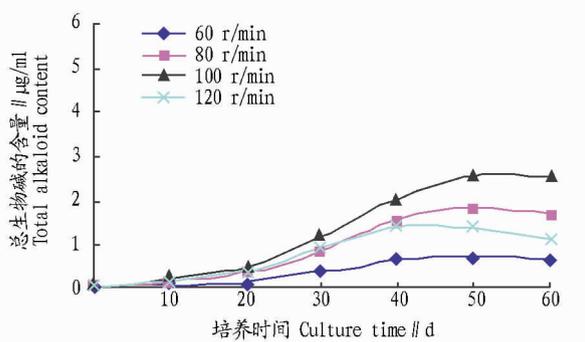


图 3 光对不同转速下环草石斛愈伤组织悬浮培养液中总生物碱积累的影响

Fig.3 Effect of illumination on the accumulation of total alkaloids in the suspension culture liquid of callus from *D. loddigesii* at different rotation speed

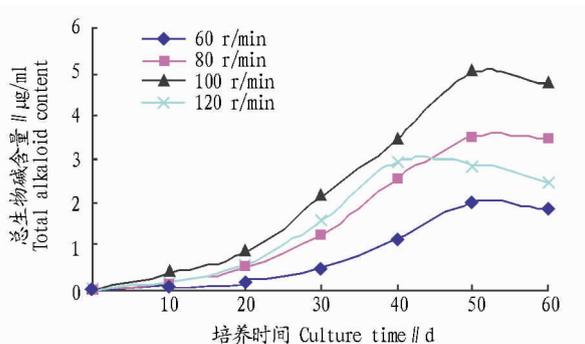


图 4 黑暗对不同转速下环草石斛愈伤组织悬浮培养液中总生物碱积累的影响

Fig.4 Effect of darkness on the accumulation of total alkaloids in the suspension culture liquid of callus from *D. loddigesii* at different rotation speed

由表 1 可知,悬浮培养液中总生物碱总量比愈伤组织中总生物碱总量低很多;转速为 100 r/min 时悬浮培养液中总生物碱占其愈伤组织中总生物碱的百分含量最高,转速为 120 r/min 时最低。尽管培养液中的含量低,但是因其体积大,所以总生物碱的总量应该还是可观的。因此,不能轻易否定环草石斛愈伤组织悬浮培养液的价值,尤其是在大规模工业化生产时,更要考虑综合开发和利用。

2.3 光照和通气量对环草石斛愈伤组织中多糖积累的影响

由图 5、6 可知,光照下环草石斛愈伤组织的愈伤组织中多糖含量与其生长基本同步,培养前 10 d,多糖含量稍有下降,从第 10 天以后,多糖含量迅速增加,在第 50 天时达到最大值,随后多糖含量又逐渐下降;而在黑暗条件下,随着培养时间的增加,多糖含量在不断下降,愈伤组织多糖的积累与其生长呈负相关。这可能与光照下愈伤组织能进行光合作用有关。总之,光对愈伤组织中总生物碱和多糖积累的影响是不同的。另外,在试验中发现,随着光强的增加,环草石斛愈伤组织中多糖的含量逐渐升高,在多糖积累高峰期,收获后的多糖含量大约是接种时的 1.7~3.4 倍。

表 1 黑暗条件下愈伤组织中总生物碱积累总量与培养液中总生物碱积累总量的比较

Table 1 Comparison of the total alkaloid content in the callus and the culture solution of the callus from *D. loddigesii* in dark

转速//r/min Rotation speed	愈伤组织中 Callus		悬浮培养液中 Suspension culture liquid		悬浮培养液中总生物碱总量占愈伤组织中总生物碱总量的比例//% Proportion of total alkaloid content in the suspension culture liquid in that in the callus
	含量//% Content	总量//μg Total amount	含量//μg/ml Content	总量//μg Total amount	
60	0.031 0	3 008	2.01	75	2.49
80	0.034 5	3 588	3.53	151	4.22
100	0.054 5	3 956	5.01	252	6.37
120	0.032 6	3 395	2.96	77	2.27

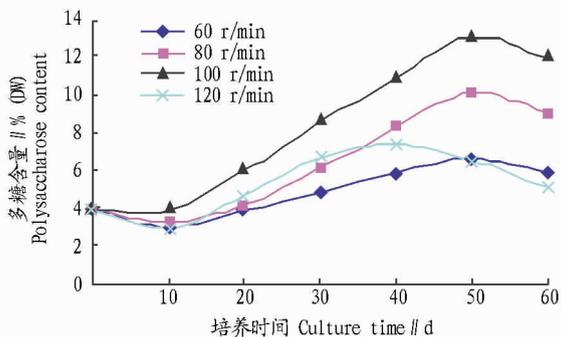


图 5 光对不同转速下环草石斛愈伤组织中多糖积累的影响

Fig.5 Effect of illumination on the accumulation of polysaccharose of callus from *D. loddigesii* at different rotation speed

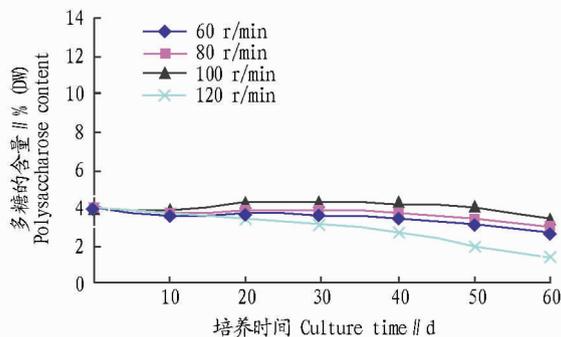


图 6 黑暗对不同转速下环草石斛愈伤组织中多糖积累的影响

Fig.6 Effect of darkness on the accumulation of polysaccharose of callus from *D. loddigesii* at different rotation speed

2.4 悬浮培养的愈伤组织生长和总生物碱、多糖积累的关系

对于高等植物细胞大量培养生产有用代谢产物来说,光照条件是一个很重要的物理因子。据 Butcher 报道^[16],光影响着植物体内酶的活性和次生代谢产物的积累,光照处理得当,可收到显著的效果。

以环草石斛愈伤组织在 MS1 + 2,4-D 0.1 mg/L + 3% 蔗糖, pH 值 5.8 ~ 6.2, 摇床转速 100 r/min, 培养温度 (25 ± 2) °C, 光周期 12 h/12 h, 光照强度 (0,500 ~ 1 000) lx 等条件下悬浮培养 50 d 的统计情况来比较愈伤组织的生长量、总生物碱和多糖积累的关系。试验结果表明,光培养比暗培养更有利于环草石斛愈伤组织的生长和多糖的积累;但是,暗培

养却比光培养更有利于提高环草石斛愈伤组织中总生物碱的含量。由表 2 可知,培养 50 d 后,愈伤组织收获量的干重在光培养下大约是接种时的 4.03 倍,在暗培养下大约是接种时的 1.15 倍;收获后的愈伤组织中总生物碱含量在光培养下大约是接种时的 2.17 倍,在暗培养下大约是接种时的 3.89 倍;收获后的愈伤组织中总生物碱总量在光培养下大约是接种时的 8.84 倍,在暗培养下大约是接种时的 4.52 倍;收获后的愈伤组织中多糖含量在光培养下大约是接种时的 3.34 倍,在暗培养下其含量比接种时还低;收获后的愈伤组织中多糖总量在光培养下大约是接种时的 13.45 倍,在暗培养下大约仅是接种时的 1.15 倍。

表 2 光培养和暗培养条件下环草石斛愈伤组织的生长和生物碱、多糖积累情况

Table 2 The accumulation of total alkaloids and polysaccharose of callus of *D. loddigesii* under the culture conditions of light and dark

培养条件 Culture conditions	接种量 g (DW) Inoculation amount	增长率//% Growth rate	收获量 g (DW) Harvested amount	总生物碱含量//% Content of total alkaloids		总生物碱总量//mg (DW) Total amount of total alkaloids		多糖含量//% Polysaccharose content		多糖总量//mg (DW) Total amount of polysaccharose	
				接种时 At the inoculation time	收获后 After harvesting	接种时 At the inoculation time	收获后 After harvesting	接种时 At the inoculation time	收获后 After harvesting	接种时 At the inoculation time	收获后 After harvesting
光培养 Light culture	0.18	403.0	0.725 4	0.014 0	0.030 4	0.002 5	0.022 1	3.92	13.08	0.705 6	9.488 2
暗培养 Dark culture	0.18	114.9	0.206 8	0.014 0	0.054 5	0.002 5	0.011 3	3.92	3.91	0.705 6	0.808 6

由图 7、8 可知,在光培养下,环草石斛愈伤组织中总生物碱和多糖的积累与其生长基本同步;随着环草石斛愈伤组织鲜重增殖率的增加,总生物碱和多糖积累也逐渐升高,在鲜重增殖率达到最高时,总生物碱和多糖的积累也达到最高,之后,随着鲜重增殖率的下降,总生物碱和多糖的积累减缓或下降。由图 9、10 可知,在暗培养下,愈伤组织生长缓慢,多糖的积累与其生长呈负相关,但黑暗培养却提高了愈伤组织中总生物碱的含量;随着环草石斛愈伤组织鲜重增殖率的增加,总生物碱的积累也逐渐升高,在鲜重增殖率达到

最高时,总生物碱的积累也达到最高,之后,随着鲜重增殖率的下降,总生物碱的积累逐渐下降。造成这种结果的原因可能是光照促进了植物的糖代谢,减少了生物碱合成前体物的供给,从而影响生物碱的合成。

3 结论与讨论

(1) 研究结果表明,环草石斛生长与其主要的次生代谢产物——总生物碱和石斛多糖积累之间有着密切的关系,不同培养条件对环草石斛中次生代谢产物具有一定的影响。环草石斛悬浮培养的愈伤组织生长曲线呈“S”型^[10];在光照

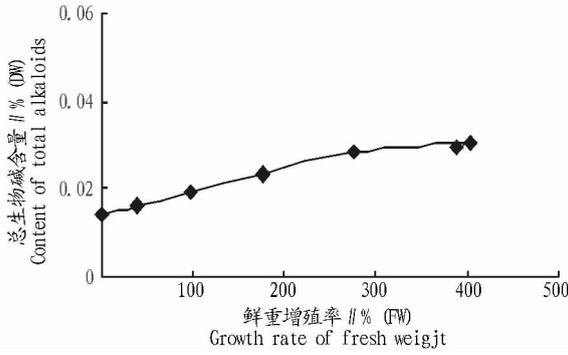


图7 光照下悬浮培养的环草石斛愈伤组织生长和总生物碱积累的关系

Fig. 7 Relationship between the callus growth and the accumulation of total alkaloids of suspension cultured callus from *D. loddigesii* in light

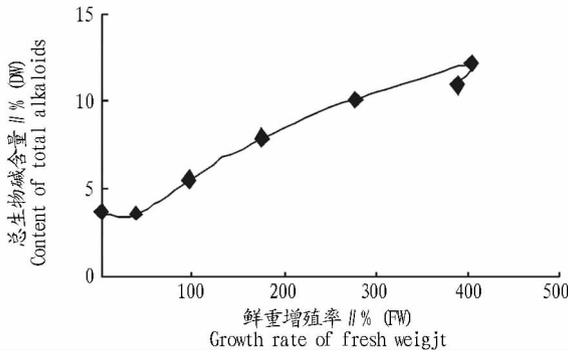


图8 光下悬浮培养的环草石斛愈伤组织生长和多糖积累的关系

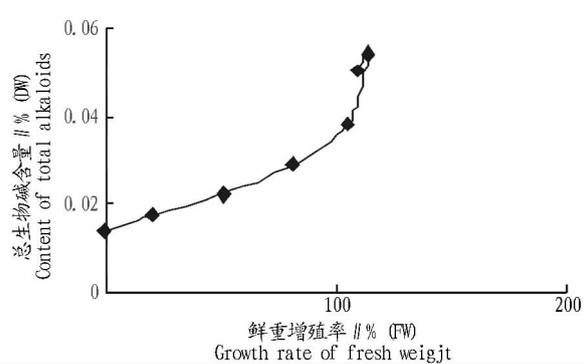


图9 黑暗下悬浮培养的环草石斛愈伤组织生长和总生物碱积累的关系

Fig. 9 Relationship between the callus growth and the accumulation of total alkaloids of suspension cultured callus from *D. loddigesii* in dark

条件下,环草石斛悬浮培养的愈伤组织中总生物碱和多糖含量的积累与其生长基本同步,光照有利于悬浮培养愈伤组织的生长和多糖的积累;在暗培养条件下,愈伤组织生长缓慢,多糖的积累不与其生长同步,但暗培养却可以提高愈伤组织中总生物碱的含量。愈伤组织具备了直接提取原药成分的可能性。

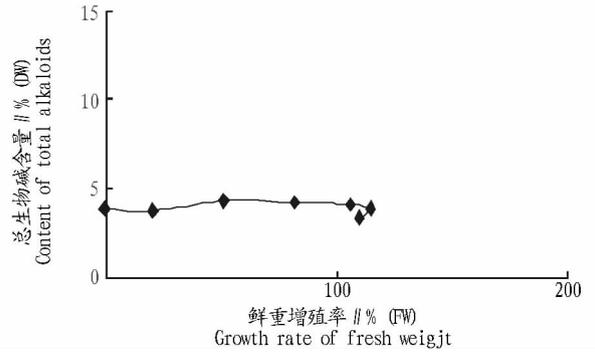


图10 黑暗下悬浮培养的环草石斛愈伤组织生长和多糖积累的关系

Fig. 10 Relationship between the callus growth and the accumulation of polysaccharose of suspension cultured callus from *D. loddigesii* in dark

(2)由于实验室培养的愈伤组织具有生物合成的全能性,又不受地理、气候等条件的限制,污染小,方便实行工业化生产,可节省土地,降低成本,缩短生产周期。因此,把愈伤组织作为生物反应器是工厂化生产环草石斛次生代谢产物的有效途径。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:62-63.
- [2] 黄民权,蔡体育. 铁皮石斛多糖对小白鼠白细胞数和淋巴细胞移动抑制因子的影响[J]. 天然产物研究与开发,1996,8(3):39-41.
- [3] 罗慧玲,黄民权. 石斛多糖增强豚带血和肿瘤病人外周血 LAK 细胞体外杀伤作用的研究[J]. 癌症,2000,19(12):1124-1126.
- [4] 陈晓梅,郭顺星. 石斛属植物的化学成分与药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(1):70.
- [5] 魏小勇. 石斛属植物生物碱研究进展[J]. 中国药事,2005,19(7):445-447.
- [6] 卢文芸,张宇斌,唐金刚,等. 环草石斛快速繁殖研究[J]. 贵州师范大学学报:自然科学版,2004,22(4):15-18.
- [7] 朱西儒,雷光富. 药用植物细胞培养代谢全能性及产物检测技术的研究进展[J]. 广西科学院学报,1998,14(2):1-6.
- [8] 乙引,张宇斌. 粉花石斛的组织培养和植株再生[J]. 植物生理通讯,2004,40(1):64.
- [9] 卢文芸,唐金刚,乙引,等. 五种药用石斛快速繁殖的研究[J]. 种子,2005,24(5):23-28.
- [10] 卢文芸,张宇斌,乙引,等. 药用环草石斛愈伤组织的悬浮培养[J]. 中草药,2005,36(S1):5-8.
- [11] 卢文芸,张宇斌,乙引,等. 环草石斛野生植株与组培苗总生物碱和多糖含量的比较[J]. 安徽农业科学,2006,34(8):1606-1607.
- [12] 唐金刚,卢文芸,乙引,等. 药用金钗石斛快速繁殖的研究[J]. 贵州科学,2007,25(1):59-62.
- [13] 金蓉蓉,孙继军,张远名. 11种石斛的总生物碱的测定[J]. 南京药学院学报,1981(1):9-13.
- [14] 吴刚,季祥彪,康冀川,等. 石斛中多糖和生物碱的含量测定[J]. 山地农业生物学报,2008,27(3):274-278.
- [15] 李满飞,徐国钧,平田义正,等. 中药石斛类多糖的含量测定[J]. 中草药,1990,21(10):10-12.
- [16] BUTHER D N. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture[M]. Berlin, New York:Springer-Verlag, 1997:668.
- [17] 莫昭展,蒋波,何小燕,等. 流苏石斛茎段组织培养的初步研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(33):10704-10706.
- [18] 潘虹虹,孙丹,廉美兰,等. 几种外部因子对春石斛组培生根的影响[J]. 安徽农业科学,2008,36(9):12591-12592,12594.
- [19] 白美发,黄敏. 铁皮石斛组培技术研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(36):15802-15803.
- [20] 张建勇,刘涛,袁佐清. 石斛属植物组织培养及遗传转化研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(3):656-657,670.