

不同氮源对铁皮石斛原球茎液体悬浮培养的影响

练华山^{1,2}, 杨贵先^{2,3}, 李焕秀²

(1. 成都农业科技职业学院, 四川 成都 610000; 2. 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014;

3. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以铁皮石斛为试材,以 1/2MS 培养基为基本培养基,添加不同种类的附加氮源 20 mmol/L,研究了不同氮源对铁皮石斛原球茎悬浮培养增殖、多糖含量及蛋白质含量的影响。结果表明:最有利于铁皮石斛原球茎悬浮培养增殖的是甘氨酸,硝态氮次之,谷氨酸最差,甚至出现了负增长;在多糖积累方面,硝酸钙对铁皮石斛原球茎多糖积累最为明显,赖氨酸等不利于铁皮石斛原球茎的多糖积累;硝酸钾、硫酸铵有利于铁皮石斛原球茎蛋白质的积累,尿素等其它氮源则不利于铁皮石斛原球茎蛋白质的积累。综合分析发现,硝酸钙最利于铁皮石斛原球茎悬浮培养生长。

关键词:铁皮石斛;氮源;增殖;多糖;蛋白质

中图分类号:R 931.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)07-0152-04

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.)属兰科石斛属多年生附生草本植物。生于海拔 1 600 m 以上的山地半阴湿的岩石上,喜温暖湿润气候和半阴半阳的环境,不耐寒^[1]。据《中国药典》记载,铁皮石斛具有“益胃生津,滋阴清热”的功效,是我国重要的药用作物之一。由于铁皮石斛生长环境特殊,加上多年的乱采滥挖和自身种子繁殖极为困难^[2],目前我国野生铁皮石斛

资源日趋枯竭^[3-7],已被列为国家二级保护植物。为保护这一珍贵中药品种,许多学者对铁皮石斛组织培养技术进行了研究^[8-12]。在铁皮石斛组织培养的研究中,以铁皮石斛原球茎为材料研究试管苗分化及壮苗培养有较多报道^[13-14]。但铁皮石斛在组培快繁中存在着组培苗生产成本高、移栽苗成活率低、标准化生产程度低等技术瓶颈。作为兰科植物,铁皮石斛在组织培养过程中可产生大量原球茎,有研究表明,铁皮石斛在固体培养条件下,可以形成原球茎但是增殖率不高,而液体悬浮培养能显著提高原球茎的增殖率^[15-16]。而且原球茎可以分化为幼苗,发育为成熟的植株,液体悬浮培养大量

第一作者简介:练华山(1979-),男,农业推广硕士,讲师,农艺师,现主要从事蔬菜与花木等的教学与科研推广工作。E-mail: lhs8748@aliyun.com.

收稿日期:2013-11-22

Study on Ultrasonic Extraction of Water-soluble Flavonoids and Polysaccharides From *Gnaphalium affine*

YANG Gui-zhen, CHEN Wei-zhen, XIAN Cai-xia, HUANG Cui-rong

(Chemistry Science and Technology School, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048)

Abstract: Taking *Gnaphalium affine* as material, through single factor test and orthogonal experiment, the optimum conditions of ultrasonic extraction of the water-soluble flavonoids and polysaccharides in wild *Gnaphalium affine* D. Don were studied. The results showed that the optimal technology for flavonoid were: extraction time was 50 min, extraction temperature was 80°C, extraction power was 160 W, solid-liquid ratio was 1 : 50 g/mL; the aptimal extraction technology for polysaccharides were: extraction time was 50 min, extraction temperature was 75°C, extraction power 160 W, solid-liquid ratio 1 : 60 g/mL. The method consumes less, fast and accurac, extraction yield of water-soluble flavonoids and polysaccharide separately was 4.36% and 3.09% from *Gnaphalium affine* D. Don. The method of standard recovery rate of flavonoids between 96.96%, and relative standard deviation RSD < 3%; the standard recovery rate of reducing sugar and total reducing sugar were 98.08% and 101.8% respectively.

Key words: *Gnaphalium affine* D. Don; ultrasonic extraction; flavonoids; polysaccharides

增殖的原球茎也可以作为人工种子解决试管苗移栽成活率不高的问题^[17],而且可以直接从悬浮培养的原球茎中提取有效的药用成分,满足药材市场的需求,解决药用铁皮石斛对野生和栽培的依赖问题^[18]。该试验在前人研究的^[19-25]基础上对原球茎液体培养的氮源进行了筛选,并对不同处理下原球茎的增殖率、蛋白质含量和多糖含量进行了检测分析,以期获得最佳的液体培养氮源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试铁皮石斛继代培养的原球茎由四川农业大学园艺学院蔬菜室提供。

1.2 试验方法

试验采用 1/2 MS(大量元素减半)^[24]+30 g/L 蔗糖^[22]+0.2 mg/L 6-BA^[21]+0.1 mg/L NAA^[21]+附加氮源(N元素浓度为 20 mmol/L),pH 5.8。参考蔬菜课题组关于铁皮石斛组织培养其它研究,在铁皮石斛增殖培养过程中,采用 MS 和 1/2MS 培养基均能取得较好的增殖效果,该试验选择了 1/2MS 培养基为基础培养基。参考苏钦等^[23]的研究,经折算培养基中的附加 N 源量在 20 mmol/L 左右,故该试验的 N 元素浓度为 50 mmol/L(表 1)。培养条件:原球茎的增殖培养在 25℃,110 r/min 的恒温摇床进行^[25]。

1.3 项目测定

培养 30 d 后统计增殖率,测定多糖含量和蛋白质含量。增殖率(%)=(培养后的重量-培养前的接种重量)/培养前的接种重量×100%;多糖含量测定采用硫酸苯酚法^[26];蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[27]。

表 1 附加氮源种类及添加量

Table 1 Nitrogen source type and amount of additional

处理 Treatment	氮源种类 Nitrogen source type	添加量 Addition/mg	体积 Volume /mL
1(CK)	—	—	200
2	甘氨酸 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	300	200
3	谷氨酸 $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	588	200
4	赖氨酸 $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	292	200
5	尿素 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	120	200
6	硝酸钙 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	472	200
7	硝酸钠 NaNO_3	340	200
8	硝酸钾 KNO_3	404	200
9	亚硝酸钠 NaNO_2	276	200
10	氯化铵 NH_4Cl	214	200
11	硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	264	200
12	硝酸铵 NH_4NO_3	160	200

2 结果与分析

2.1 不同氮源对铁皮石斛原球茎液体悬浮培养的影响

由图 1 可以看出,培养 1 周后处理 9(亚硝酸钠)全部黄化死亡,培养 1 个月后甘氨酸、尿素、硝酸钙和氯化铵为附加氮源的各处理生长良好,绿色或浅绿色、组织块较致密、无分化;CK、硝酸钾、硫酸铵及硝酸铵为附加氮源的各处理生长良好,黄绿色、组织块较致密、无分化;以赖氨酸为附加氮源处理则褐化严重,而以谷氨酸为附加氮源的处理全部褐化。结果表明,不同氮源对原球茎分化和组织致密程度没有影响,但对原球茎生长和颜色有明显影响。

2.2 不同氮源对铁皮石斛原球茎悬浮培养增殖的影响

由表 2 可知,相对于 CK,谷氨酸、赖氨酸、氯化铵不利于铁皮石斛的增殖,其它 7 种氮源对铁皮石斛的增殖都有促进作用;甘氨酸氮源增殖率显著高于其它任何处理,且极显著于其它氮源;由表 2 还可以看出,赖氨酸和谷氨酸不利于铁皮石斛原球茎的增殖生长,并对其正常

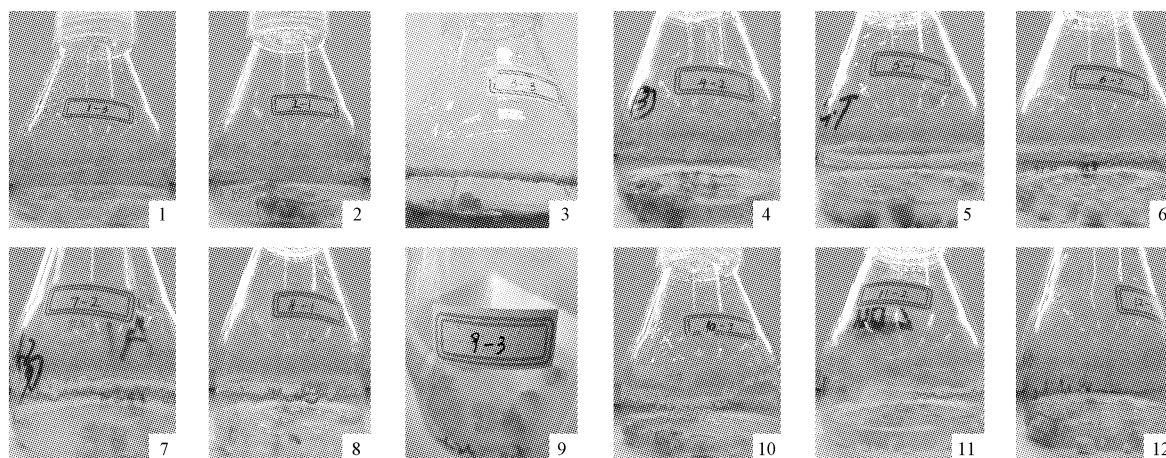


图 1 不同氮源对铁皮石斛原球茎液体悬浮培养的影响

注:氮源种类分别为 1-CK;2-甘氨酸;3-谷氨酸;4-赖氨酸;5-尿素;6-硝酸钙;7-硝酸钠;8-硝酸钾;9-亚硝酸钠;10-氯化铵;11-硫酸铵;12-硝酸铵。

Fig. 1 Effect of different nitrogen sources on *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl suspension cultures

Note: 1-CK; 2-Glycine; 3-Glutamate; 4-Lysine; 5-Urea; 6-Calcium nitrate; 7-Sodium nitrate; 8-Potassium nitrate; 9-Sodium nitrite; 10-Ammonium chloride; 11-Ammonium sulfate; 12-Ammonium nitrate.

表 2 不同氮源处理铁皮石斛原球茎增殖率、多糖和蛋白质含量的 LSD 法多重比较

Table 2 The diagnoses of different nitrogen source on

Dendrobium candidum suspension culture proliferation rate polysaccharides and protein content by LSD multiple compartment

处理 Treatment	平均增殖率 Average culture proliferation rate/%	多糖含量 Polysaccharides content /g·g ⁻¹	蛋白质含量 Protein content /mg·g ⁻¹
1(CK)	62.05 dD	0.20 dC	2.40 bcBC
2	81.72 aA	0.08 eD	2.33 bcBC
3	-9.94 gG	0.05 eD	1.07 defCDE
4	-2.99 fF	0.02 fD	1.79 cdeBCDE
5	32.11 eE	0.05 eD	0.55 Fe
6	67.82 cBCD	0.38 aA	1.76 cdeBCDE
7	69.66 bcBC	0.34 abA	1.97 cdBCD
8	72.77 bB	0.35 abA	3.87 aA
10	-4.48 fFG	0.08 eD	0.90 eFDE
11	68.14 cBCD	0.27 cB	3.10 abAB
12	66.47 cdCD	0.33 bAB	1.83 cdeBCDE

注:表中数据为各项平均值,不同小写字母表示在 5% 水平差异显著,相同字母表示差异不显著;不同大写字母表示在 1% 水平差异极显著,相同字母表示差异不极显著。

Note: Data represent mean of all replicates. Different lowercase showed the significant difference at 5% level, the same letter showed the difference is not significant; different capital showed the significant difference at 1% level.

生长和生理代谢有阻碍作用;硝态氮极显著高于 CK,且硝酸钾显著优于硝酸钙、硝酸钠。

宋经元等^[28]研究发现,当有铵态氮和硝态氮存在时,铁皮石斛原球茎悬浮培养所需硝态氮的浓度大于铵态氮的浓度,这与该试验中硝态氮优于铵态氮相似。其它几种除尿素外的氮源相对于 CK,其增殖率都显著高于 CK,对铁皮石斛的增殖有利。其中,甘氨酸处理下的原球茎增殖率极显著高于 CK,是原球茎增殖的最优氮源,这说明铁皮石斛原球茎在液体培养条件下可以利用甘氨酸作营养元素,促进生长,这与高洪波等^[29]研究甘氨酸促进生菜鲜重增加的结论相似。这可能是由于氨基酸作为直接氮源可节约无机氮源被吸收、还原及氨基酸合成所用的能量。研究中发现硝酸铵对原球茎增殖的有益影响既低于单纯的硝态氮也没有单一的铵态氮增殖率高,这可能是由于硝态氮、铵态氮之间存在互作效应,这与宋经元等^[28]硝态氮和铵态氮之间无互作矛盾,有待进一步研究。

2.3 不同氮源对铁皮石斛原球茎悬浮培养多糖含量的影响

由表 2 可知,相对于 CK,谷氨酸、赖氨酸、氯化铵、尿素、甘氨酸不利于铁皮石斛多糖的积累,其它 5 种氮源对铁皮石斛多糖的积累有促进作用;硝态氮源多糖积累显著优于 CK 及其它氮源种类,其中硝酸钙最有利于铁皮石斛原球茎多糖的积累,其次为硝酸钾。

从试验结果上看,甘氨酸、尿素、硝酸钙、氯化铵等几组在培养过程中,原球茎的颜色一直处于较绿的状态,适合原球茎的生长,但多糖含量较低。魏小勇^[20]认为铁皮石斛原球茎的增殖需要合适的无机盐浓度,并非越高越好,而多糖的累积却需要较低的无机盐浓度。同

时试验中发现,以 30~60 mmol/L 的氮源较适合铁皮石斛原球茎生长和多糖积累,高浓度氮(120 mmol/L)不适合获得高产量的原球茎多糖。该试验采用的是 20 mmol/L 的附加氮源,加上培养基本身的氮源,总氮源为 50 mmol/L,适合铁皮石斛原球茎生长和多糖积累。而甘氨酸在原球茎增殖中表现最好,在这里却极显著低于 CK,可能是由于甘氨酸的浓度过高。荆留萍等^[30]的研究表明当甘氨酸的浓度高于 1.5 mg/mL 时对蛹虫草多糖合成有抑制作用,而低于这个浓度时却又具有促进作用。通过分析认为甘氨酸对铁皮石斛原球茎悬浮培养也有相似的影响,有待进一步研究证明,以确定相应参数。

相比于 CK,硫酸铵中的氮源以铵态氮为主时,其原球茎多糖积累量也相对较少,这与宋经元等^[28]的试验结果相吻合。该研究中发现,硝态氮优于铵态氮,但当硝酸铵作为氮源时原球茎多糖含量显著高于硫酸铵,这可能与硝态氮和铵态氮的比例有关。

2.4 不同氮源对铁皮石斛原球茎悬浮培养蛋白质含量的影响

由表 2 可知,相对于 CK,硝酸钾、硫酸铵皆有利于铁皮石斛原球茎蛋白质的累积,其它 9 种氮源对铁皮石斛原球茎蛋白质含量的增加无促进作用;而氯化铵、尿素、谷氨酸极显著低于 CK。硝酸钾、硫酸铵、甘氨酸等有利于蛋白质的合成积累,且相应处理也有利于铁皮石斛原球茎的增殖,这是因为细胞内蛋白质的含量与细胞生理活性有一定关系,细胞生长快,胞内可溶性蛋白质含量越高。但蛋白质含量大会严重影响石斛多糖的纯度及其活性的研究,故应选取在保证产量和多糖成分的情况下蛋白质含量尽可能少的氮源。

3 讨论与结论

该研究中,谷氨酸、赖氨酸、氯化铵和尿素在 3 个指标中的表现都远低于 CK。其中同为铵态氮的氯化铵和硫酸铵对原球茎悬浮培养的影响截然不同,这可能跟蛋白质合成有关,因为氯化铵组蛋白质含量极低,不利于原球茎对氯化铵的吸收利用。该研究中氯化铵抑制原球茎的生长和多糖积累,而硫酸铵却利于原球茎的生长和多糖合成,这可能是氯离子的毒害作用。氯能抑制硝酸还原酶的活性,而提高过氧化物酶的活性,使氮代谢受阻,过氧化物酶使植物内激素分解,细胞停止生长,另外 Flowers^[31]认为,高氯离子可抑制脱氢酶的活性,使植物代谢紊乱。谷氨酸和赖氨酸处理都在培养 30 d 后全部褐化,这与李宗菊等^[32]的研究结果相似,其原因可能是当谷氨酸或赖氨酸浓度过高时,易导致多酚类物质积累,引起褐化,从而抑制了原球茎的生长,扰乱组织的正常生命活动,使代谢紊乱,因此原球茎褐化。

综上所述,甘氨酸为氮源最有利于铁皮石斛原球茎悬浮培养的增殖,其它氨基酸类氮源则不利于增殖,综合考虑硝态氮更利于原球茎的增殖培养,其中又以硝酸钾最为适合。而且硝态氮为氮源悬浮培养铁皮石斛原

球茎最有利于其多糖的积累,以硝酸钙、硝酸钾最为明显。在蛋白质的累积中硝酸钾有促进作用,而硝酸钙不利于铁皮石斛原球茎蛋白质的累积,而多糖为铁皮石斛的主要有效成分,其蛋白质为干扰物质,故硝酸钙更适于铁皮石斛原球茎悬浮培养。

参考文献

- [1] 冉懋熊.名贵中药材绿色栽培技术[M].北京:科学技术文献出版社,2002.
- [2] 吴志刚,刘贤旺,张寿文.石斛属植物组织培养研究进展[J].中药研究与信息,2005(1):23-25.
- [3] 胡忠,吉星和.黑节草种苗的大量培养[J].植物杂志,1979(3):1.
- [4] 何静波,李勇.黑节草原胚体的繁殖[J].云南植物研究,1982,4(2):211.
- [5] 张治国,刘骅,王黎.铁皮石斛原球茎增殖的培养条件研究[J].中草药,1992,23(8):431.
- [6] 郭顺星,曹文岑,张集慧.铁皮石斛人工种子制作流程及发芽研究[J].中草药,1996,27(2):105.
- [7] 徐红,李晓波,王铮涛,等.海南、广东省石斛属植物资源与种质保护研究[J].中国野生植物资源,1999(5):24-27.
- [8] 秦廷豪.铁皮石斛的组织培养与快速繁殖[J].热带农业科学,2008,28(1):25-29.
- [9] 李进进.铁皮石斛茎段离体初代培养研究[J].作物杂志,2010(1):79-80.
- [10] 何涛,淳泽,汪天杰,等.铁皮石斛腋芽的快速繁殖[J].中国野生植物资源,2010,29(1):58-61.
- [11] 蒋向辉,余朝文,王善粉.不同激素浓度对铁皮石斛高效快繁体系的影响[J].江苏农业科学,2009(6):76-78.
- [12] 汤亚飞,蔡时可,郑锦荣.铁皮石斛组织培养与快速繁殖(简报)[J].亚热带植物科学,2010,39(2):74-75.
- [13] Xu H, Lu J, Wang Z T, et al. The scavenging of reactive oxygen species by crude drugs and cultured tissues of five species of *Dendrobium* Sw[J]. J Plant Resour Environ, 2011, 10(2):35-37.
- [14] Gao J, Jin R, Wu Y, et al. Comparative study of tissue cultured *Dendrobium protocorm* on immunological function [J]. J Chin Med Mater, 2002, 25(7):487-489.
- [15] 洪森荣,肖波,江静. KT 和 NAA 对铁皮石斛带芽茎段生长发育的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1):55-56.
- [16] 陈希,黄丹丹.铁皮石斛的组织培养与快速繁殖研究进展[J].海峡药学,2011,23(8):16-23.
- [17] 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.
- [18] 宋经元,郭顺星,肖培根.铁皮石斛原球茎液体悬浮培养的研究[J].中草药,2004,35(9):1042-1046.
- [19] Hahlbrock K, Scheel D, Logemann E, et al. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(10):4150-4157.
- [20] 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.
- [21] 韩晓红,段春红,阎贺静,等.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.
- [22] 林丛发,钟爱青,林云斌,等.铁皮石斛类原球茎增殖和分化的研究[J].江西农业学报,2007,19(1):84-86.
- [23] 苏钦,张晓南.液体悬浮培养促进铁皮石斛原球茎高效诱导、增殖的研究[J].中国野生植物资源,2009,28(4):54-56.
- [24] 韦晓新,苏江,何铁光.因素对铁皮石斛原球茎生长和多糖积累的影响[J].广西农业科学,2008(9):601-606.
- [25] 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,2007,19(1):84-86,91.
- [26] 贾薇,唐庆九.硫酸苯酚法测定云芝多糖含量的效果[J].河南农业科学,1999(8):24-25.
- [27] 杨正坤,王秀丽等.考马斯亮蓝染色法测定大豆茎叶中蛋白质含量[J].湖北农业科学,2012(10):4610-4613.
- [28] 宋经元,郭顺星,肖培根.氮源和真菌诱导子对铁皮石斛原球茎悬浮培养的影响[J].云南植物研究,2008,30(1):105-109.
- [29] 高洪波,李敬蕊,章铁军,等.甘氨酸和谷氨酸与钼配施对生菜品质的影响[J].西北植物学报,2010,30(5):968-973.
- [30] 荆留萍,杜双田,金凌云,等.8种物质对蛹虫草液体发酵中虫草素及多糖含量的影响[J].西北农林科技大学学报,2010,38(11):156-160.
- [31] Flowers T J. Salt tolerance in *Suaeda maritima* (L.) Dum; the effect of sodium chloride on growth, respiration, and soluble enzymes in a comparative study with *Pisum sativum* L.[J]. J Exp Bot, 1972, 23:310-321.
- [32] 李宗菊,桂明英.谷氨酸在无糖组织培养中的应用[J].西南农业学报,1999,12(3):45-49.

Effect of Different Nitrogen Sources on *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl Suspension Cultures

LIAN Hua-shan^{1,2}, YANG Gui-xian^{2,3}, LI Huan-xiu²

(1. Chengdu Vocational College of Agricultural Science and Technology, Chengdu, Sichuan 610000; 2. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014; 3. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Taking *Dendrobium candidum* as material, with 1/2 MS as the basic medium, 20 mmol/L different types of additional nitrogen sources were used, the effect of different nitrogen sources on *Dendrobium candidum* suspension culture proliferation, polysaccharides content and protein content were studied. The results showed that most conducive *Dendrobium candidum* suspension culture proliferation was glycine, followed by nitrate, and the worst was glutamate. In the accumulation of polysaccharide, the most obvious of polysaccharides accumulate was $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. On the contrary, lysine was not conducive to polysaccharides accumulation for *Dendrobium candidum*. KNO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were conducive *Dendrobium candidum* accumulation of protein, urea and other nitrogen were not conducive to the accumulation of the protein for *Dendrobium candidum*. Comprehensive analysis found that $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ was the most conducive for *Dendrobium candidum* suspension culture.

Key words: *Dendrobium candidum*; nitrogen; proliferation; polysaccharides; protein