

DOI:10.11937/bfyy.201614039

细胞分裂素 6-BA 对三裂叶野葛毛状根生长和抗氧化酶活性的影响

何含杰¹, 黄小西¹, 张党权¹, 邓华凤²

(1. 中南林业科技大学 林业生物技术湖南省重点实验室/生物发育工程及新产品研发协同创新中心, 湖南 长沙 410018;

2. 杂交水稻国家重点实验室 湖南杂交水稻研究中心, 湖南 长沙 410125)

摘 要:以三裂叶野葛毛状根为试材,研究了不同浓度 6-BA 对三裂叶野葛毛状根生长、异黄酮化合物及可溶性蛋白质含量和抗氧化酶活性的影响。结果表明:6-BA 抑制三裂叶野葛毛状根的生长,降低其鲜样质量,且抑制作用与 6-BA 浓度成正比例关系,同时能提高毛状根培养物中异黄酮化合物的含量;但降低其毛状根培养物中可溶性蛋白质含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性水平,提高过氧化物酶(peroxidase, POD)活性水平,这表明 6-BA 可能通过调节三裂叶野葛毛状根的抗氧化酶活性进而调控其生长和异黄酮化合物的积累。

关键词:三裂叶野葛;毛状根;6-BA;异黄酮化合物;可溶性蛋白质;抗氧化酶

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0156-04

三裂叶野葛(*Pueraria phaseoloides*)属豆科葛属多年生藤本植物,其根中含有葛根素、大豆苷、大豆苷元等异黄酮化合物。已有报道表明,异黄酮化合物具有改善心脑血管循环、降低心肌耗氧量、抗肿瘤、抗氧化、增强免疫力等功能,广泛用于治疗高血压、冠心病、心绞痛和心率不齐等病症^[1-2]。此外,异黄酮化合物还具有类似雌性激素的功能^[3]。由于人类需求的增加及对野生资源无限制的采挖,三裂叶野葛的野生资源越来越匮乏。因此,利用具有自主、快速生长特性的毛状根来生产其有效成分,是解决三裂叶野葛资源匮乏的有效途径之一。毛状根在生长过程中受到多种因素的影响,如植物生长调节剂等^[4-5]。细胞分裂素 6-BA 是一类重要的植物生长调节剂,对毛状根的生长及药用成分的合成与积

累具有重要的调控作用,同时影响体内抗氧化酶活性水平^[6-7]。6-BA 对三裂叶野葛毛状根生长、异黄酮化合物积累及抗氧化酶活性的影响尚不清楚。因此,该试验以三裂叶野葛毛状根为试材,研究和探讨了不同浓度 6-BA 对其生长、异黄酮化合物含量和抗氧化酶活性的影响,以期三裂叶野葛毛状根的规模化生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为三裂叶野葛毛状根,由发根农杆菌 ATCC15834 诱导三裂叶野葛(*Pueraria phaseoloides*)叶片所产生,其诱导和培养方法参照施和平等^[8]方法。

1.2 试验方法

以未添加外源植物激素的 MS 固体培养基为对照组,以添加不同浓度 6-BA 的 MS 固体培养基(3%蔗糖、18 g·L⁻¹琼脂粉、pH 5.8~6.0)为处理组,其中 6-BA 的浓度分别为 0.1、0.5、1.0、3.0、5.0 mg·L⁻¹,121℃湿热灭菌后待用。毛状根被接种后,培养瓶置于培养架上,于(25±2)℃黑暗培养。

第一作者简介:何含杰(1979-),男,博士,讲师,研究方向为植物生理和植物分子生物学。E-mail:hejie224@163.com.

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(2015JJ3178);长沙市科技攻关资金专项资助项目(K1406011-21);中南林业科技大学青年基金资助项目(QJ2012006B)。

收稿日期:2016-02-29

Allium polyrhizum Turcz. ex Regel was better than cultivation leek, especially abundant vitamin C content, the average content of which achieved 482.5 mg·(100g)⁻¹ FW and the highest being 1 146.1 mg·(100g)⁻¹ FW. As a condiment, edible flowers were natural health foods, which contained rich nutrients. There were obvious differences in the main nutrition quality of different regions, which were significantly affected by climate conditions and soil environment. In the five regions, it was best to take the integrated nutritional quality in Ordos city.

Keywords: *Allium polyrhizum* Turcz. ex Regel; flowering period; nutrition ingredients

1.3 项目测定

1.3.1 三裂叶野葛毛状根的培养及其生长测定 选取4~5 cm长的三裂叶野葛毛状根根尖段(约0.5 g),接入上述含不同浓度6-BA的培养基上进行培养。在5~25 d培养期间,每隔5 d随机取材1次,每次3瓶。用蒸馏水洗涤去除残留的培养基,并用吸水纸吸干多余水分后,测定毛状根的鲜质量。

1.3.2 三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物含量测定 三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物含量测定参照施和平等^[8]方法。

1.3.3 三裂叶野葛毛状根可溶性蛋白质含量及抗氧化酶活性测定 三裂叶野葛毛状根可溶性蛋白质含量测定参考BRADFORD^[9]方法;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定参照BEAUCHAMP等^[10]方法;过氧化物酶(POD)活性测定参照施和平等^[11]方法。

1.4 数据分析

数据采用Excel软件进行作图和分析。

2 结果与分析

2.1 6-BA对三裂叶野葛毛状根生长的影响

由图1可知,对照(无外源激素MS培养基)培养的毛状根生长较快,在25 d培养期间毛状根鲜质量逐渐增加,培养至25 d时达到最大值,约为 $6.70 \text{ g} \cdot \text{瓶}^{-1} \text{ FW}$,是培养初期(5 d时)鲜样质量的13.40倍。与对照相比,不同浓度6-BA培养的毛状根生长较缓慢,且对毛状根的生长抑制速率与6-BA浓度成正比例关系。培养至25 d时,0.1、0.5、1.0、3.0、5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA培养的毛状根鲜质量分别为1.79、1.76、1.29、1.30、1.20 $\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1} \text{ FW}$,是培养初期的3.57%、3.52%、2.59%、2.59%、2.40%,是同期对照毛状根鲜样质量的26.65%、26.25%、19.30%、19.33%、17.90%,这表明植物生长调节剂6-BA抑制三裂叶野葛毛状根的生长,并降低其鲜样质量。

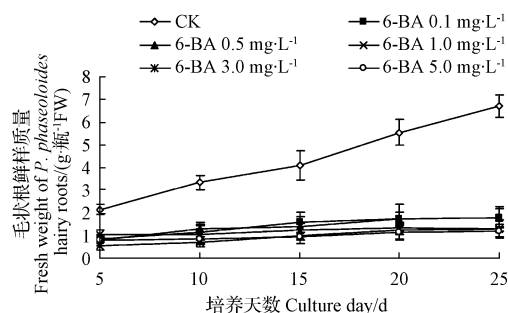


图1 6-BA浓度对三裂叶野葛毛状根生长的影响

Fig. 1 Effect of 6-BA concentration on the growth of *P. phaseoloides* hairy roots

2.2 6-BA对三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物含量的影响

由图2可以看出,对照三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物含量在培养至10 d为最大值;随后逐渐降低,培养至25 d时为最小值,约为 $28.87 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$,是培养5 d时的80.38%。与对照相比,培养至25 d时,0.1、0.5、1.0、3.0、5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA培养的三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物含量约为34.48、48.34、50.42、48.91、49.82 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$,是同期对照毛状根异黄酮化合物含量的1.19、1.67、1.75、1.69、1.73倍,且均高于培养初期毛状根异黄酮化合物含量。该结果表明,植物生长调节剂6-BA可以有效促进三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物的合成与积累。

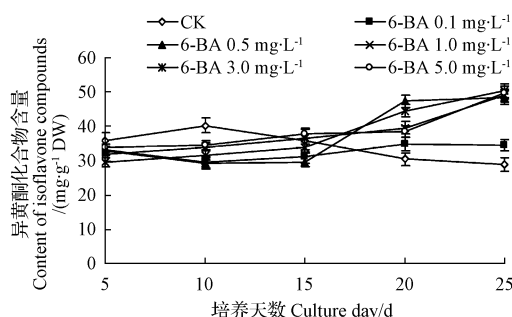


图2 6-BA浓度对三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物含量的影响

Fig. 2 Effect of 6-BA concentration on the content of isoflavone compound in *P. phaseoloides* hairy root cultures

2.3 6-BA对三裂叶野葛毛状根可溶性蛋白质含量的影响

由图3可知,在5~25 d培养期间,对照及6-BA培养的三裂叶野葛毛状根可溶性蛋白质含量均呈逐渐下降趋势。在培养至25 d时,对照毛状根可溶性蛋白质含量约为 $7.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$,与培养5 d相比,其可溶性蛋白质含量降低了28.60%。而0.1、0.5、1.0、3.0、5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA培养的毛状根可溶性蛋白质含量分别为6.87、6.85、5.50、5.53、5.47 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$,约为其培养5 d的76.85%、78.22%、72.12%、74.88%、83.83%,较同期对照中可溶性蛋白质含量降低了3.56%、3.92%、22.85%、22.41%、23.28%,且可溶性蛋白质含量降低的程度与6-BA浓度成正比例关系。表明植物生长调节剂6-BA可能通过降低三裂叶野葛毛状根的可溶性蛋白质含量而影响其生长和异黄酮合成。

2.4 6-BA对三裂叶野葛毛状根SOD活性的影响

由图4可知,对照三裂叶野葛毛状根的SOD活性随着培养时间的延长而逐渐降低,培养25 d时活性达到最小值,约 $14.62 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,较培养至5 d时降低了

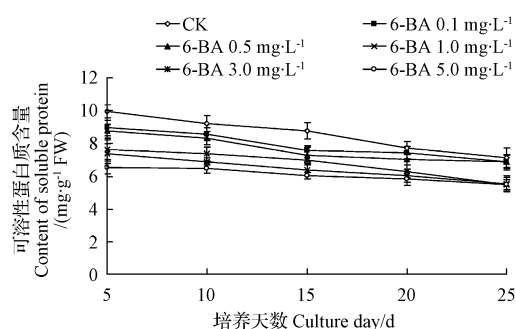


图3 6-BA 浓度对三裂叶野葛毛状根可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 3 Effect of 6-BA concentration on the content of soluble protein in *P. phaseoloides* hairy root cultures

76.13%。与对照相比,培养至25 d时,0.1、0.5、1.0、3.0、5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 培养的毛状根 SOD 活性分别为 15.19、24.69、14.77、19.27、20.41 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$,较培养至5 d 时 SOD 活性水平降低了 74.90%、57.66%、69.41%、65.40%、59.16%,但均高于同期对照的活性水平。表明 6-BA 可能通过降低三裂叶野葛毛状根 SOD 活性水平而影响毛状根的生长。

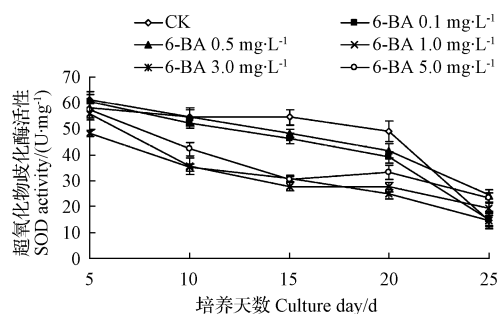


图4 6-BA 浓度对三裂叶野葛毛状根超氧化物歧化酶活性的影响

Fig. 4 Effect of 6-BA concentration on the activity of SOD in *P. phaseoloides* hairy root cultures

2.5 6-BA 对三裂叶野葛毛状根 POD 活性的影响

由图 5 可知,随着培养时间的延长,对照和低浓度 6-BA(0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养的三裂叶野葛毛状根 POD 活性呈先下降后上升的变化趋势,而 1.0、3.0、5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 培养的毛状根 POD 活性则逐渐升高。培养至 25 d 时,对照毛状根的 POD 活性达到最大值,约是培养 5 d 时的 1.36 倍。与对照相比,培养至 25 d 时,0.1、0.5、1.0、3.0、5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 培养的毛状根 POD 活性达到最大值,是培养 5 d 时活性水平的 1.79、2.01、3.08、2.3、2.14 倍,是同期对照活性水平的 1.73、2.05、2.61、2.36、2.51 倍,这说明 6-BA 可能通过不同程度地提高三裂叶野葛毛状根 POD 活性而对毛状根

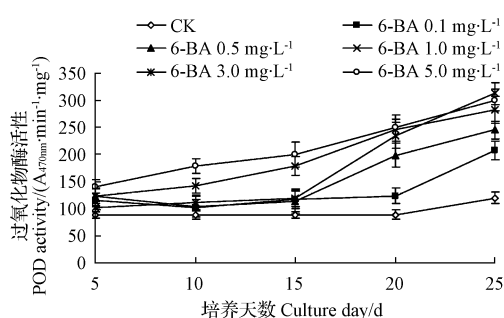


图5 6-BA 浓度对三裂叶野葛毛状根过氧化物酶活性的影响

Fig. 5 Effect of 6-BA concentration on the activity of POD in *P. phaseoloides* hairy root cultures

的生长和次生代谢物合成进行调控。

3 讨论

细胞分裂素是一类重要的植物生长调节剂,对毛状根的生长和有效成分积累具有重要的调控作用^[12-13]。已有研究表明,不同浓度 6-BA 可以改变黄瓜(*Cucumis sativus*)毛状根的粗线形态及侧根数量,且可以延缓其衰老进程^[6]。而适当浓度的 6-BA 可以有效促进丹参(*Salvia miltiorrhiza*)毛状根及人参(*Panax ginseng*)毛状根丹参酮 IIA 和人参皂苷的合成与积累^[4,14]。在黄芩(*Scutellaria baicalensis*)毛状根培养过程中观察到,6-BA 不仅抑制黄芩毛状根的生长,而且促进其毛状根黄芩苷的合成与积累^[15]。不同浓度的 6-BA 不仅抑制三裂叶野葛毛状根的生长,而且促进毛状根异黄酮化合物的合成与积累,这与齐香君等^[15]的研究结果相一致。

植物的生长受到抑制时,会开启体内的抗氧化酶御体系,进而清除细胞内活性氧等有害成分,降低细胞膜的氧化程度,对植物起到保护作用^[16]。已有报道证实,外源 6-BA 可以延缓棉花(*Gossypium* spp.)叶片中可溶性蛋白质含量的下降,并提高其细胞内 SOD 活性水平,延缓棉花幼苗衰老的进程^[17]。但也有研究表明,6-BA 可以延缓黄瓜毛状根可溶性蛋白质含量的降低,同时降低毛状根 SOD 和 POD 活性水平,进而调控黄瓜毛状根的生长^[6];而这与该试验的结果基本相似。与对照相比,6-BA 可以降低三裂叶野葛毛状根可溶性蛋白质含量和 SOD 活性水平;不同的是 6-BA 可提高毛状根培养物的 POD 活性水平,这种差异表明,6-BA 可能主要通过提高细胞内 POD 活性来缓解其对三裂叶野葛毛状根生长的抑制作用。

植物生长调节剂对植物生长的调控,最终体现于对靶基因在转录水平的调控。6-BA 抑制三裂叶野葛毛状根的生长,促进毛状根异黄酮化合物的合成与积累。然而,6-BA 是否影响三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物合成

酶基因的表达及如何调控异黄酮化合物代谢途径尚不清楚,有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 吴德邻,陈忠毅,黄向旭. 中国葛属(*Pueraria* DC.)的研究[J]. 热带亚热带植物学报,1994,2(3):12-21.
- [2] 何含杰,施和平,王震. 6-BA 和硝酸银对三裂叶野葛毛状根生长及异黄酮含量的影响[J]. 植物生理学报,2015,51(7):1055-1060.
- [3] BOUE A M, WIESE T E, NEHLS S, et al. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens[J]. J Agric Food Chem, 2003,51(8):2193-2199.
- [4] 房翠萍,王维婷,王志芬,等. 植物激素对丹参毛状根生长和丹参酮生物合成的影响[J]. 中药材,2011,34(5):661-664.
- [5] 何含杰,施和平. 6-苄氨基腺嘌呤和萘乙酸对三裂叶野葛毛状根生长和异黄酮含量的影响[J]. 生物工程学报,2014,30(10):1573-1585.
- [6] 施和平,齐莹,张悦,等. 黄瓜毛状根的诱导及细胞分裂素 6-BA 对其生长和形态的影响[J]. 生物工程学报,2006,22(3):514-520.
- [7] 孙晶,高珂,王玲,等. 不同培养基、外源激素和真菌诱导子对北柴胡毛状根生长及柴胡皂苷含量的影响[J]. 生物技术通讯,2015,26(4):546-550.
- [8] 施和平,权宏, SPIROS K. 三裂叶野葛毛状根的诱导及其固体培养与液体培养[J]. 生物工程学报,2003,19(3):307-311.
- [9] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976,72:248-252.
- [10] BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase; improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1971,44(1):276-287.
- [11] 施和平,曾宝强,王云灵,等. 镉及其与钙组合对褐脉少花龙葵毛状根生长、抗氧化酶活性和吸收镉的影响[J]. 生物工程学报,2010,26(2):147-158.
- [12] 于荣敏,马娜,严春艳,等. 外源激素对何首乌毛状根生长及蒽醌类成分生物合成的影响[J]. 生物工程学报,2006,22(4):619-623.
- [13] PUTALUN W, PRASAMSIWAMAI P, TANAKA H, et al. Solasodine glycoside production by hairy root cultures of *Physalis minima* Linn. [J]. Biotechnol Lett, 2004,26(7):545-548.
- [14] 周倩耘,丁家宜,刘峻,等. 植物激素对人参毛状根生长和皂甙含量的影响[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(1):26-28.
- [15] 齐香君,郭乐康. 外源激素对黄芩毛状根生长及黄芩苷合成的影响[J]. 陕西科技大学学报,2009,27(2):48-50.
- [16] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, et al. Reactive oxygen gene network of plants[J]. Trends Plant Sci, 2004,9(10):490-498.
- [17] 沈法富,喻树迅,范术丽,等. 棉花叶片衰老过程中激素和膜脂过氧化化的关系[J]. 植物生理与分子生物学报,2003,29(6):589-592.

Effect of 6-Benzylaminopurine on Growth and Antioxidase Activities in Hairy Root Cultures of *Pueraria phaseoloides*

HE Hanjie¹, HUANG Xiaoxi¹, ZHANG Dangquan¹, DENG Huafeng²

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Forestry Biotechnology, Central South University of Forestry and Technology/Cooperative Innovation Center of Engineering and New Products for Developmental Biology, Changsha, Hunan 410018; 2. Hunan Hybrid Rice Research Centre, State Key Laboratory of Hybrid Rice, Changsha, Hunan 410125)

Abstract: Using the hairy roots of *Pueraria phaseoloides* cultured in solid mediums as an experiment material, the effect of 6-Benzylaminopurine (6-BA) on growth, contents of isoflavone compounds and soluble protein and antioxidant activities was studied. The results showed that plant growth regulator 6-BA inhibited the growth of *P. phaseoloides* hairy roots, reduced the biomass of fresh weight of hairy roots compared with control, and the inhibition was in proportion to the concentration of 6-BA. Furthermore, 6-BA promoted synthesis and accumulation of isoflavone compounds in hairy root cultures. Compared with control, 6-BA decreased the contents of soluble protein and activities of superoxide dismutase in hairy root cultures, but enhanced the activities of peroxidase. These results indicated that plant growth regulator 6-BA regulated the growth and accumulation of isoflavone compounds through regulating antioxidant activities of *P. phaseoloides* hairy roots.

Keywords: *Pueraria phaseoloides*; hairy roots; 6-Benzylaminopurine; isoflavone compounds; soluble protein; antioxidant