

促进铁皮石斛原球茎中多糖和生物碱积累研究

王洪秋, 朴炫春, 蒋晓龙, 刘冠甫, 廉美兰

(延边大学农学院, 吉林 延吉 133002)

摘要:以铁皮石斛原球茎为试材,为优化原球茎培养和提高有效物质的积累,研究了培养液中不同 pH 对原球茎生物量及有效物质含量的影响。同时,在培养初期向培养液中分别添加不同浓度的诱导子(壳聚糖、普鲁兰多糖)以及 2 种诱导子的混合液,以未加入诱导子的培养基作为对照,对原球茎生物量及有效物质含量进行了测定。结果表明:当培养液 pH 为 5.8 时,原球茎生长最好,且多糖($4.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)和生物碱($3.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)生产量达到最高。 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 壳聚糖和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 普鲁兰多糖单独处理,有利于原球茎中多糖和生物碱的积累。但当壳聚糖浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,普鲁兰多糖浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合处理后,发现原球茎中多糖和生物碱的积累量明显提高,多糖含量达到 $322.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$,生产量达到 $6.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,而生物碱含量达到 $242.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$,生产量达到 $5.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,通过调节培养条件可有效地促进铁皮石斛原球茎中多糖和生物碱积累,为铁皮石斛产品生产提供了一种新的材料。

关键词:悬浮培养;酸碱度;诱导子;壳聚糖;普鲁兰多糖

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)15-0117-07

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Lindl.)属兰科石斛属植物,作为我国传统名贵药材,因其极高的药用价值而广受消费者青睐,但其产品原材料来源方面存在一些问题。目前,铁皮石斛野生资源接近濒危,工业原材料主要依靠人工栽培。人工栽培主要以组培苗为种苗,但组培苗往往存在移栽成活率低的问题。同时,移栽苗对栽培环境和管理技术要求较高,在田间生长过程中个体差异较大,要求较长的生长周期^[1]。因此,利用悬浮培养^[2-3]和生物反应器培养^[4-6]方法培养铁皮

石斛原球茎,可为铁皮石斛产品生产提供新的原材料。

铁皮石斛组织培养繁殖体的原球茎(Protocorm-like-bodies, PLBs)因具有易分散、增殖效率高、生长周期短,可实现规模化生产等特点,引起各领域研究者的广泛兴趣^[7]。与其它植物细胞或器官培养一样,通过调节培养基成分、酸碱度(pH)和培养环境等因素及诱导子的刺激可提高原球茎中有效物质的含量,其中,诱导子的使用是一种最为有效的方法。

依据来源可将诱导子分为生物诱导子和非生物诱导子 2 种。生物诱导子是指植物体为抵御微生物感染,在防御过程中产生的物质。非生物诱导子是通过引发植物细胞形成抗毒素信号的物质,但同时又不是植物细胞中的天然成分^[8]。壳聚糖和普鲁兰多糖均属于生物诱导子。其中壳聚糖是由自然界广泛存在的几丁质脱乙酰化得到的一种 β -1,4-氨基葡萄糖聚合物,被用作激活植物细胞中次生代谢途径的诱导子,已成为提高细胞

第一作者简介:王洪秋(1991-),女,硕士研究生,研究方向为生物反应器培养与有效物质生产。E-mail:2464172915@qq.com.

责任作者:廉美兰(1963-),女,博士,教授,博士生导师,现主要从事植物组织培养和生物反应器等研究工作。E-mail:mllian@ybu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160079)。

收稿日期:2017-02-16

中目标产物产量的常用方法之一^[9-10]。而普鲁兰多糖是一种微生物多糖,是由出芽短梗霉发酵所产生的类似葡聚糖、黄原胶的胞外水溶性粘质多糖,不是一种常用诱导子,但在一些植物细胞(或器官)培养中对生物活性物质合成效果也很显著^[11]。

在铁皮石斛原球茎培养中,用诱导子处理提高有效物质合成的研究并不多见,目前,只有用真菌诱导子促进多糖合成的报道^[2,11],但尚鲜见使用其它种类诱导子的研究。该研究为了促进悬浮培养铁皮石斛原球茎中生物量及有效物质的积累,探究了培养液中 pH 及添加诱导子(壳聚糖、普鲁兰多糖)浓度对原球茎中多糖和生物碱含量的影响,旨在为今后工厂化生产铁皮石斛原球茎提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以铁皮石斛种子(浙江温州)为外植体,对其消毒后,播种于 1/2 MS+30 g·L⁻¹蔗糖+8 g·L⁻¹琼脂(pH 5.8)的固体培养基中。培养 30 d 后,将形成的原球茎接种在含有 25 mL 原球茎增殖培养基的培养皿($\Phi \times h = 90 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$)中。增殖培养基为 1/2 MS+2 mg·L⁻¹6-苄氨基嘌呤(BA)+0.5 mg·L⁻¹萘乙酸(NAA)+0.165 g·L⁻¹KH₂PO₄+3 g·L⁻¹蛋白胨+30 g·L⁻¹蔗糖+5 g·L⁻¹倍力凝,pH 5.8。将继代培养获得的原球茎切成 0.5 cm×0.5 cm 小块后作为试验材料,培养条件设定为温度 25℃,光照强度 1 600 lx,每天光照 16 h。

1.2 试验方法

1.2.1 培养液 pH 对原球茎的影响

称取鲜物质量为 3 g 铁皮石斛原球茎接种于含有 25 mL 液体培养基(1/2 MS+2 mg·L⁻¹BA+0.5 mg·L⁻¹NAA+0.165 g·L⁻¹KH₂PO₄+3 g·L⁻¹蛋白胨+30 g·L⁻¹蔗糖)中,pH 调节为 4.8、5.8、6.8、7.8。在转速为 121 r·min⁻¹振荡器上培养,培养条件设定为温度 25℃,光照强度 1 600 lx,每天光照 16 h。30 d 后调查铁皮石斛原球茎的鲜物质量、干物质量以及测定多糖和生物碱的含量,并计算其生产量。多糖生

产量(g·L⁻¹)=[原球茎干物质量(g·L⁻¹)×多糖含量(mg·g⁻¹DW)]/1 000,生物碱生产量(mg·L⁻¹)=[原球茎干物质量(g·L⁻¹)×生物碱含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$)]/1 000。

1.2.2 壳聚糖浓度对原球茎的影响

将筛选出的适宜浓度的壳聚糖应用于原球茎培养,培养液中分别添加浓度为 10、20、30、40、50 mg·L⁻¹壳聚糖,以未加入壳聚糖的处理为对照组,pH 5.8,培养方法同 1.2.1。30 d 后调查铁皮石斛原球茎的鲜物质量、干物质量以及测定多糖、生物碱含量并计算其生产量。

1.2.3 普鲁兰多糖浓度对原球茎的影响

将筛选出的适宜浓度的普鲁兰多糖应用于原球茎培养中,普鲁兰多糖浓度设定为 100、200、300、400、500 mg·L⁻¹,以未加入普鲁兰多糖作为对照组,pH 5.8,培养方法同 1.2.1。30 d 后调查铁皮石斛原球茎的鲜物质量、干物质量以及测定多糖、生物碱含量并计算其生产量。

1.2.4 比较壳聚糖和普鲁兰多糖对原球茎的影响

筛选出 2 种诱导子单独使用,以及壳聚糖(C)和普鲁兰多糖(P),1/2 壳聚糖和 1/2 普鲁兰多糖混合使用时的最佳浓度,探明诱导子处理方法对原球茎生长及生物活性物质积累的影响,以未加入诱导子的为对照组,pH 5.8,培养方法同 1.2.1。30 d 后调查铁皮石斛原球茎的鲜物质量、干物质量并测定多糖、生物碱含量并计算其生产量。

1.3 项目测定

1.3.1 生物量的测定

将原球茎从培养瓶中取出,自来水冲洗 2~3 次后,用滤纸吸干表面水分,称鲜物质量。然后放入 45℃干燥箱烘干,48 h 后称干物质量。

1.3.2 多糖质量分数的测定

精密称取干燥至恒重的葡萄糖 100 mg,溶解后定容至 100 mL。分别稀释成浓度为 0.010、0.025、0.050、0.075、0.100、0.150 mg·mL⁻¹葡萄糖溶液,加入 1 mL 5%的苯酚溶液后立即加入浓硫酸 5 mL,室温下静置 30 min,以蒸馏水作空白对照,采用苯酚-浓硫酸法^[12],在 490 nm 处测定其吸光值,制作标准曲线。

精密称取铁皮石斛干燥粉末 10 g,用 90%乙

醇溶液浸泡 2 次,每次 6 h,挥干滤渣后,加入 100 mL 蒸馏水,50 ℃水浴加热 30 min 后过滤,重复 2 次后合并滤液,用旋转蒸发仪(R206D,上海申生科技有限公司,中国)浓缩至 10 mL。用 Sevage 试剂除蛋白后,离心收集上清液,加入 95%乙醇溶液,静置 12 h 后抽滤。用无水乙醇、丙酮、乙醚对滤渣依次冲洗 2 次,40 ℃烘干至恒重,即得铁皮石斛多糖。称取多糖样品 1 mg,溶解后定容至 100 mL,计算出换算因素 f 。 $f = W/(C \times D)$,其中 W 表示总多糖质量(mg), C 表示多糖溶液中葡萄糖浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), D 表示多糖的稀释倍数。

精密称取 0.1 g 铁皮石斛干燥粉末,用 90%乙醇溶液浸泡 2 次,每次 6 h,挥干滤渣后,加入蒸馏水 20 mL,30 min 条件下水浴加热 3 次后合并滤液,定容至 100 mL,即得待测样品溶液。精密吸取 1 mL 按标准曲线项操作,测定出各待测液中葡萄糖浓度。多糖含量 = $(C \times D \times f \times V)/W$ 。 C 为多糖中葡萄糖浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), D 为多糖稀释倍数, f 为换算因素, V 为供试溶液体积(mL), W 为多糖质量(mg)。

1.3.3 生物碱质量分数的测定

精密称取 1 mg 石斛碱,氯仿溶解后定容至 100 mL,量取 0.1、2、3、4、5 mL 分别置于分液漏斗中后,用氯仿补充至 10 mL,加入 5 mL 的 pH 4.5 缓冲液和 2 mL 0.04%溴甲酚绿溶液,剧烈摇动 3 min,静止放置 30 min 后,过滤后取下层 5 mL 的过滤液,加入 1 mL 0.01 mol · L⁻¹氢氧化钠无水乙醇溶液,充分混合。以 10 mL 氯仿的萃取溶液作为空白对照,采用改良的酸性染料比色法^[13],在 620 nm 处测定吸光值,绘制标准曲线。

精密称量铁皮石斛 0.5 g 原球茎干燥粉末,加入约 5 mL 浓氨水,密封放置 30 min 后,加入 10 mL 氯仿。水浴回流提取 2 h,冷却后称质量,用氯仿补足失去质量,过滤后取 2 mL 滤液加入 8 mL 氯仿,定容至 10 mL,作为待测液。按照标准曲线制作办法,测定吸光值并计算生物碱含量及其生产量。

1.4 数据分析

所有试验处理均设置 3 次重复,利用 SPSS 11.5 软件对试验数据进行方差分析,采用邓肯氏新复极差法进行比较,显著水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 培养液 pH 对铁皮石斛原球茎生长和生物活性物质积累的影响

酸碱度适宜的培养液对铁皮石斛原球茎的生长和代谢产物的积累有促进作用。从表 1 可知,当 pH 为 5.8 时,铁皮石斛原球茎的鲜物质质量和干物质质量最高,分别为 190.4 g · L⁻¹和 20.4 g · L⁻¹。pH 对多糖和生物碱积累的影响有所不同,多糖的含量随 pH 增加而增加。而生物碱的含量则随 pH 增加而减少,在 pH 为 4.8 时生物碱含量最大,为 180.7 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DW,而 pH 7.8 时多糖含量最大,为 274.1 mg · g⁻¹ DW。然而,多糖(4.93 g · L⁻¹)和生物碱(3.15 mg · L⁻¹)生产量在 pH 为 5.8 时最多。因此,培养基 pH 为 5.8 较为适合铁皮石斛原球茎生长和生物活性物质的积累。

表 1 培养液 pH 对悬浮培养铁皮石斛原球茎生长和生物活性物质积累的影响

Table 1 Effect of medium pH on PLB biomass and bioactive compound accumulation of *Dendrobium candidum* during suspension culture

pH	生物量 Biomass		多糖 Polysaccharide		生物碱 Alkaloid	
	鲜物质质量	干物质质量	含量	生产量	含量	生产量
	Fresh weight /(g · L ⁻¹)	Dry weight /(g · L ⁻¹)	Content /(mg · g ⁻¹ DW)	Productivity /(g · L ⁻¹)	Content /(μg · g ⁻¹ DW)	Productivity /(mg · L ⁻¹)
4.8	120.1 ± 1.39 c	10.9 ± 0.49 c	161.3 ± 0.90 d	1.76 ± 0.02 d	180.7 ± 0.53 a	1.97 ± 0.04 b
5.8	190.4 ± 0.90 a	20.4 ± 0.32 a	241.6 ± 1.37 c	4.93 ± 0.16 a	154.6 ± 1.65 b	3.15 ± 0.07 a
6.8	161.5 ± 0.50 b	14.3 ± 0.23 b	258.8 ± 3.64 b	3.70 ± 0.06 b	142.2 ± 0.92 c	2.03 ± 0.04 b
7.8	92.4 ± 0.92 d	7.3 ± 0.23 d	274.1 ± 3.00 a	2.00 ± 0.09 c	139.8 ± 0.60 c	1.02 ± 0.02 c

注:数值为平均值±标准偏差(n=3),不同小写字母表示 $P < 0.05$ 的显著性差异,下同。

Note: Data are the mean ± standard deviation (n=3), different lowercase letters mean the significant difference at $P < 0.05$, the same below.

2.2 壳聚糖浓度对铁皮石斛原球茎生长和生物活性物质积累的影响

利用壳聚糖作为诱导子,在铁皮石斛原球茎培养过程中对壳聚糖的浓度进行筛选,研究壳聚糖对铁皮石斛原球茎生物量及生物活性物质积累的影响。结果表明,在培养初期分别加入浓度为10、20、30、40、50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的壳聚糖,对铁皮石斛原球茎的鲜物质量和干物质量无明显影响(表2),但对促进原球茎生物活性物质的积累有一定作用效果,如表2所示,多糖含量随着壳聚糖浓度的升高逐渐增大,当壳聚糖浓度为30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

时,多糖含量达到最大为250.7 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ DW。随后,原球茎内多糖含量呈现下降趋势。而多糖生产量同样在壳聚糖浓度为30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大值(5.24 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。原球茎内生物碱的含量和生产量与多糖存在着相同的变化趋势,生物碱的含量和生产量均在30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 壳聚糖处理的原球茎中达到最大值,分别为207.3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DW和4.33 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由此可知,30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的壳聚糖较为有利于铁皮石斛原球茎内多糖和生物碱的积累,且不影响原球茎生长。

表2 壳聚糖浓度对悬浮培养铁皮石斛原球茎生长和生物活性物质积累的影响
Table 2 Effect of chitosan concentration on PLB biomass and bioactive compound accumulation of *D. candidum* during suspension culture

壳聚糖 Chitosan /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	生物量 Biomass		多糖 Polysaccharide		生物碱 Alkaloid	
	鲜物质量	干物质量	含量	生产量	含量	生产量
	Fresh weight /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Dry weight /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Content /($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ DW)	Productivity /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Content /($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DW)	Productivity /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
0	190.1 \pm 0.69 ab	20.4 \pm 0.17 a	224.3 \pm 1.96 c	4.58 \pm 0.05 cd	179.0 \pm 2.42 d	3.65 \pm 0.08 cd
10	190.2 \pm 0.52 ab	21.2 \pm 0.17 a	225.1 \pm 2.77 c	4.77 \pm 0.10 bc	184.9 \pm 1.73 c	3.92 \pm 0.05 b
20	192.1 \pm 1.67 ab	21.0 \pm 0.87 a	233.4 \pm 5.83 bc	4.90 \pm 0.06 b	191.6 \pm 0.92 b	4.02 \pm 0.08 b
30	194.4 \pm 2.14 a	20.9 \pm 0.81 a	250.7 \pm 6.12 a	5.24 \pm 0.02 a	207.3 \pm 1.85 a	4.33 \pm 0.05 a
40	194.1 \pm 0.58 a	21.6 \pm 0.64 a	240.6 \pm 5.48 ab	5.20 \pm 0.07 a	162.5 \pm 1.50 e	3.51 \pm 0.12 d
50	188.0 \pm 1.21 b	20.4 \pm 0.31 a	220.9 \pm 0.58 c	4.50 \pm 0.09 d	105.8 \pm 1.50 f	2.16 \pm 0.03 e

2.3 普鲁兰多糖浓度对铁皮石斛原球茎生长和生物活性物质积累的影响

利用普鲁兰多糖作为诱导子,研究其在铁皮石斛原球茎培养过程中对生物量及生物活性物质含量的影响。如表3所示,培养初期添加不同浓度的普鲁兰多糖,30 d后测定原球茎鲜物质量和干物质量,均在普鲁兰多糖浓度为100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大值,为201.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和21.6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,而其它处理则对原球茎鲜物质量和干物质量无明显影响。但对原球茎内生物活性物质含量有明显的促进作用,多糖含量在普鲁兰多糖浓度为100~500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内均得到显著提高,并呈先上升后下降的趋势。在普鲁兰多糖浓度为200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,多糖含量和生产量均达到最大值,分别为287.3 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ DW和5.98 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而生物碱含量与生产量均有相同的变化趋势,且在200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 普鲁兰多糖处理中达到最大值,

分别为245.3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DW和5.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,加入200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的普鲁兰多糖可显著提高铁皮石斛原球茎内多糖、生物碱的生产量。

2.4 诱导子加入方法对铁皮石斛原球茎生长和生物活性物质积累的影响

通过上述试验已筛选出2种诱导子的最佳浓度,研究诱导子的处理方法对铁皮石斛原球茎生物量及生物活性物质积累的影响,筛选出提高原球茎中生物活性物质含量的最佳诱导子种类。研究结果表明,在诱导子的处理方法中,单独添加壳聚糖和普鲁兰多糖对原球茎的生物量没有明显影响。但各处理对原球茎中生物活性物质的积累均有提高的影响。其中,原球茎中多糖的含量和生产量均在15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 壳聚糖+100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 普鲁兰多糖处理中达到最高,分别为322.8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ DW和6.75 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时,生物碱的含量和生产量也达到最大值,分别为242.7 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DW

和 $5.07\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 均高于其它处理。而在 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 壳聚糖 + $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 普鲁兰多糖处理中, 多糖的含量均高于壳聚糖和普鲁兰多糖单一处理, 但低于 $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 壳聚糖 +

$100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 普鲁兰多糖处理。因此, $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 壳聚糖 + $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 普鲁兰多糖更有利于铁皮石斛原球茎生物活性物质的积累。

表 3 普鲁兰多糖浓度对悬浮培养铁皮石斛原球茎生长和生物活性物质积累的影响
Table 3 Effect of pullulan concentration on PLB biomass and bioactive compound accumulation of

D. candidum during suspension culture

普鲁兰多糖 Pullulan /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	生物量 Biomass		多糖 Polysaccharide		生物碱 Alkaloid	
	鲜物质量 Fresh weight	干物质量 Dry weight	含量 Content	生产量 Productivity	含量 Content	生产量 Productivity
	/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$)	/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$)	/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
0	$198.1\pm1.67\text{ a}$	$20.0\pm0.58\text{ a}$	$208.1\pm1.10\text{ d}$	$4.16\pm0.14\text{ c}$	$183.2\pm2.66\text{ c}$	$3.66\pm0.19\text{ c}$
100	$201.0\pm1.04\text{ a}$	$21.6\pm0.87\text{ a}$	$259.3\pm6.35\text{ bc}$	$5.60\pm0.36\text{ ab}$	$207.1\pm1.96\text{ b}$	$4.47\pm0.22\text{ b}$
200	$199.6\pm1.50\text{ a}$	$20.8\pm0.75\text{ a}$	$287.3\pm6.58\text{ a}$	$5.98\pm0.35\text{ a}$	$245.3\pm3.23\text{ a}$	$5.10\pm0.25\text{ a}$
300	$198.2\pm2.25\text{ a}$	$20.1\pm0.35\text{ a}$	$283.8\pm4.10\text{ a}$	$5.68\pm0.18\text{ ab}$	$178.9\pm1.10\text{ c}$	$3.58\pm0.08\text{ c}$
400	$199.1\pm1.62\text{ a}$	$20.4\pm0.35\text{ a}$	$268.1\pm3.29\text{ b}$	$5.47\pm0.16\text{ ab}$	$138.5\pm1.21\text{ d}$	$2.83\pm0.07\text{ d}$
500	$186.2\pm1.67\text{ b}$	$20.3\pm0.40\text{ a}$	$250.0\pm4.68\text{ c}$	$5.00\pm0.20\text{ b}$	$137.2\pm1.91\text{ d}$	$2.74\pm0.09\text{ d}$

表 4 诱导子加入方法对悬浮培养铁皮石斛原球茎生长和生物活性物质积累的影响
Table 4 Effect of pullulan concentration on PLB biomass and bioactive compound accumulation of

D. candidum during suspension culture

处理方法 Treatment	生物量 Biomass		多糖 Polysaccharide		生物碱 Alkaloid	
	鲜物质量 Fresh weight	干物质量 Dry weight	含量 Content	生产量 Productivity	含量 Content	生产量 Productivity
	/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$)	/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$)	/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
CK	$193.2\pm2.52\text{ a}$	$20.8\pm0.17\text{ a}$	$226.5\pm2.48\text{ e}$	$4.71\pm0.01\text{ c}$	$176.4\pm2.37\text{ e}$	$3.67\pm0.02\text{ d}$
C	$193.0\pm1.27\text{ a}$	$20.8\pm0.17\text{ a}$	$253.8\pm3.29\text{ d}$	$5.28\pm0.11\text{ b}$	$198.4\pm1.73\text{ c}$	$4.13\pm0.07\text{ c}$
P	$195.4\pm1.73\text{ a}$	$20.6\pm0.52\text{ a}$	$268.2\pm1.33\text{ c}$	$5.52\pm0.17\text{ b}$	$216.4\pm2.08\text{ b}$	$4.46\pm0.16\text{ b}$
1/2C+1/2P	$191.4\pm1.61\text{ a}$	$20.9\pm0.35\text{ a}$	$322.8\pm3.29\text{ a}$	$6.75\pm0.16\text{ a}$	$242.7\pm1.21\text{ a}$	$5.07\pm0.07\text{ a}$
C+P	$180.0\pm1.67\text{ b}$	$18.1\pm0.29\text{ b}$	$294.4\pm3.35\text{ b}$	$5.33\pm0.15\text{ b}$	$190.0\pm1.33\text{ d}$	$3.44\pm0.08\text{ d}$

注:CK, 未加诱导子;C, 壳聚糖 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;P, 普鲁兰多糖 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;1/2 C+1/2 P, 壳聚糖 $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 普鲁兰多糖 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;C+P, 壳聚糖 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 普鲁兰多糖 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Note:CK, No elicitors;C, Chitosan $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;P, Pullulan polysaccharide $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;1/2 C+1/2 P, Chitosan $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + pullulan polysaccharide $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;C+P, Chitosan $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + pullulan polysaccharide $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

在植物组织培养中,培养基 pH 作为一种重要的因素来促进植物体生长和代谢物的积累。对不同种植物及其次生代谢产物的类型和积累量来讲,常常随着 pH 的变化而变化。ANDREAZZA 等^[14]研究表明,在毛果芸香细胞培养中,当 pH 为 8.8 或 9.8 时能产生较高含量的毛果芸香碱。LUTHFI 等^[15]研究发现,东革阿里细胞在酸性条件(pH 为 4.75 或 5.25)下,生物碱含量较高,

而在 pH 为 5.75 环境下细胞生物量较高。说明在植物体中,培养基 pH 能影响养分吸收,酶和激素的活性^[16]。因此,测定培养基中 pH,以便于对植物次生代谢产物的生产。与其它参数一样,考虑生物量和次生代谢产物的含量,从而设定适宜的 pH。

壳聚糖不但具有多糖类分子的特性,还可以提高植物的抗病性、促进农作物增加产量等,但关于利用壳聚糖作为诱导子提高生物活性物质的研究则很少。SAVITHA 等^[10]研究了不同种类诱

诱导子对甜菜毛状根悬浮培养过程中甜菜红碱生产的影响,其中壳聚糖也可在一定程度上促进甜菜红碱的生产,200 mg · L⁻¹或 500 mg · L⁻¹壳聚糖在处理第 10 天对其生产影响显著,但二者之间无显著差异;董妍玲等^[17]通过测定喜树悬浮培养细胞的干质量、喜树碱产量、丙二醛和过氧化氢含量,探讨了壳聚糖诱导子对喜树悬浮培养细胞喜树碱积累的影响,在喜树悬浮培养第 20 天加入 80 mg · L⁻¹的壳聚糖,诱导子处理 36 h 使喜树碱的总产量达到最大值,从而说明壳聚糖诱导子可显著促进喜树碱的生物合成。该试验研究表明,在悬浮培养初期,加入 30 mg · L⁻¹有利于原球茎内生物活性物质的积累,和董妍玲等^[17]研究结果所适宜的浓度不同,可能与培养物以及添加时期不同有关。SAVITHA 等^[10]研究发现 200 mg · L⁻¹普鲁兰多糖最有利于甜菜红碱的生产,达到 202 mg · L⁻¹是未处理的 2.29 倍,这与该试验中适宜有效物质积累的普鲁兰多糖浓度相同。

此外,还有联合诱导子的相关研究。晏琼等^[18]将生物诱导子(酵母提取物)与非生物诱导子(金属离子等)组合在一起,不同诱导子组合对不同丹参酮的诱导表现出选择性,将毛状根作为材料生产丹参酮的能力得到有效提高;叶龙飞等^[19]研究得出联合诱导子(MeJA 和 SA、黑曲霉和黄曲霉等)对生物碱类、萜类、酮类等产物的诱导作用则较单一诱导子强,联合诱导子处理药用植物悬浮细胞为工业化生产天然产物提供有效途径。该试验将同种类诱导子进行不同浓度混合,发现 15 mg · L⁻¹壳聚糖+100 mg · L⁻¹普鲁兰多糖作用效果超过单一种类诱导子,而 30 mg · L⁻¹壳聚糖+200 mg · L⁻¹普鲁兰多糖作用效果一般,因此,不同种类和浓度诱导子混合对生物活性物质积累的影响有待于进一步研究。目前,对于联合诱导子间复杂的组合关系及其调控机制尚不清楚,诱导子通过何种方式促进生物活性物质的快速积累等问题需要做出进一步研究。

参考文献

[1] 徐步青,李振中,张俊,等.不同培养条件对铁皮石斛类原球茎生物反应器培养的影响[J].中草药,2014,45(5):709-713.

- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] CUI H Y, MURTHY H N, MOH S H, et al. Production of biomass and bioactive compounds in protocorm cultures of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. using balloon type bubble bioreactors[J]. Industrial Crops and Products, 2014, 53: 28-33.
- [5] YANG F, WEI N N, GAO R, et al. Effect of several medium factors on polysaccharide and alkaloid accumulation in protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* during bioreactor culture[J]. Acta Physiologiae plantarum, 2015, 37: 94-106.
- [6] 魏楠楠,姚睿,李阳,等.几种因素对反应器铁皮石斛原球茎生长及有效物质的影响[J].北方园艺,2014(14):156-159.
- [7] 孟志霞,王春兰,陈晓梅,等.铁皮石斛原球茎/类原球茎的研究与应用[J].中国中药杂志,2013,48(19):1620-1624.
- [8] 王红,叶和春,李国风.诱导子的作用方式及其在植物组织培养中的应用[J].植物学通报,1999,16(1):11-18.
- [9] JIN J H, SHIN J H, KIM J H, et al. Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone colorants in madder (*Rubia akane* Nakai) cell culture[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999(4):300-304.
- [10] SAVITHA B C, THIMMARAJU R, BHAGYALAKSHMI N, et al. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor[J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 50-60.
- [11] 杨慧,陈晓梅,郭顺星.真菌诱导子对铁皮石斛原球茎多糖含量的影响[J].世界科学技术(中医药现代化),2009,11(5):719-722.
- [12] 李亚芳,张晓华,孙国明.石斛中总生物碱和多糖的含量测定[J].中国药事,2002,16(7):426-428.
- [13] 徐宁.石斛中总生物碱的含量测定方法研究[J].基层中药杂志,2001,15(3):24.
- [14] ANDREAZZA N L, ABREU I N, SAWAYA A C H F, et al. Production of imidazole alkaloids in cell cultures of *jaborandi* as affected by the medium pH[J]. Biotechnol Letters, 2009, 31: 607-614.
- [15] LUTHFI A M S, BOEY P L, CHAN L K. Effect of cell source and pH of culture medium on the production of canthin-6-one alkaloids from the cell cultures of Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack)[J]. Plant Biotechnology Journal, 2004(6):125-130.
- [16] BHATIA P, ASHWATH N. Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of tomato[J]. Biotechnology, 2005, 4(1):7-10.
- [17] 董妍玲,潘学武,赵小虎,等.壳聚糖诱导子促进喜树培养细胞喜树碱积累的研究[J].安徽农业科学,2010,38(29):16151-16153.

[18] 晏琼,胡宗定,吴建勇. 生物与非生物诱导子协同作用对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3):188-191.

[19] 叶龙飞,王金海,张景红. 联合诱导子提高药用植物代谢产物含量的研究进展[J]. 广东化工, 2014, 41(10):207-208.

Enhancement of Polysaccharide and Alkaloid Accumulation in Protocorm-like-bodies of *Dendrobium candidum*

WANG Hongqiu, PIAO Xuanchun, JIANG Xiaolong, LIU Guanfu, LIAN Meilan
(Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract: *Dendrobium candidum* Lindl. protocorm-like-bodies (PLBs) was used as experiment material, for optimizing the protocorm-like-bodies culture and enhancing the accumulation of effective compounds, the effect of different medium pH on the biomass and effective compound accumulation of PLBs were studied. At the same time, different concentrations of elicitor (chitosan, pullulan polysaccharide) and two kinds of elicitors mixture were added to the culture medium at the early stages of cultivation, the culture without the addition of the elicitor was used as control, and then the biomass and effective compound accumulation of PLBs were determined. The results showed that the growth of PLBs were the best when the pH of the medium was 5.8, and the production of polysaccharide ($4.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) and alkaloid ($3.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) reached the highest level. The separate treatment of $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ chitosan and $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pullulan which were beneficial to the accumulation of polysaccharide and alkaloid in PLBs. However, when the chitosan concentration was adjusted to $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the concentration of pullulan was adjusted to $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the accumulation of polysaccharide and alkaloid in PLBs were significantly increased, and the polysaccharide content reached $322.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$, the production reached $6.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, while the alkaloid content reached $242.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$, the production reached $5.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Therefore, polysaccharide and alkaloid accumulation in *D. candidum* PLBs could be effectively promoted by control the culture conditions and which could be used as a new material resource in production of *Dendrobium candidum* production.

Keywords: suspension culture; pH; elicitor; chitosan; pullulan

铁皮石斛药用价值及药理作用

信息广角

1 药用价值

铁皮石斛味甘,性微寒,生津养胃,滋阴清热,润肺益肾,明目强腰。

2 药理作用

2.1 生津和降血糖作用

铁皮石斛具有生津作用,主要表现为促进腺体分泌和脏器运动,对可降低链脲霉素诱发糖尿

血糖值。

2.2 增强机体免疫力

铁皮石斛颗粒(TPSH)可促进荷瘤动物巨噬细胞的吞噬功能,增强 T 淋巴细胞的增殖和分化及 NK 细胞的活性,并能明显提高荷瘤动物的血清溶血素值,提示 TPSH 无论是对非特异性免疫功能,或是特异性细胞免疫以及体液免疫功能,均有一定的提高作用。

(摘自:百度百科)