

低温对膜荚黄芪不定根总黄酮积累的影响

付爽, 汪洋, 吕爽, 刘佳, 全雪丽, 吴松权

(延边大学农学院, 吉林 延吉 133002)

摘要:以2种不同海拔高度(安图和长白山)的膜荚黄芪种质为试材,采用低温和低温光照对其进行处理,以常温为对照,研究低温对其不定根总黄酮积累的影响。结果表明:安图膜荚黄芪在低温处理时总黄酮积累需要光照,第8天时达到最高值($2.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),是其同时期对照组的1.30倍,而且这种总黄酮的积累也使其抗氧化活性显著增加;常温下长白山膜荚黄芪总黄酮含量显著高于安图膜荚黄芪,但是其含量不受低温和光照的影响。这说明不同种质的膜荚黄芪具有不同的总黄酮生物合成规律。

关键词:膜荚黄芪;不定根;低温;总黄酮;抗氧化活性

中图分类号:S 567.7⁺9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2017)22-0154-04

黄芪(*Astragalus membranaceus*)属豆科黄芪属多年生开花草本植物,广泛分布在东北和西北地区^[1]。黄芪的干燥根作为中国传统药材已有上千年的历史,可以滋补身体、利尿、抗菌、抗病毒、抗炎,且又具有促进机体代谢、保护肾脏肝脏、防止骨骼钙质流失等功能^[2]。黄酮类是黄芪的有效成分之一,具有免疫调节^[3]、抗氧化^[4]、抗肿瘤^[5-6]和抗细胞凋亡的作用^[7]。近年来,市场上黄芪类制品供不应求,长时间的无节制采挖导致野生黄芪资源锐减^[8],只能依靠人工引种栽培来满足市场需求^[9]。但在长时间的引种过程中,黄芪种子逐步退化,根部发生形变,导致有效药用成分下降^[8];来自野生和半野生的黄芪种子成熟度不同,致使黄芪田间品质参差不齐^[10];二期栽培黄芪的连作使自身受到毒害作用,加剧了病虫害对黄芪植株的影响^[11],使黄芪产量下降。不定根培养是解决这些问题的有效途径之一,其具有不占

用耕地、缩短生长周期、遗传背景一致、生长环境可人为控制等优点^[12]。目前,已有利用黄芪不定根来生物合成黄芪总黄酮的报道^[13]。

黄芪喜冷凉气候^[10],低温使黄芪幼苗的总黄酮含量有所增加^[1],不过至今尚鲜见有关低温对膜荚黄芪不定根总黄酮影响的相关报道。该研究以安图和长白山膜荚黄芪种质为材料诱导不定根,研究了低温和附加光照2种处理对不定根生物量、总黄酮和抗氧化活性的影响,以期揭示膜荚黄芪总黄酮生物合成的积累机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的膜荚黄芪种子来源于吉林省安图县(简称安图,海拔550 m)和吉林省长白山(简称长白山,海拔1 200 m)。芦丁对照品(北京澳博星公司);二苯代苦味酰基自由基(DPPH)(吉林省萌创生物科技有限公司)。

供试仪器:CR22G III高速离心机(日本日立公司);RE-2000B旋转蒸发仪(上海豫康公司);DLSB-5/20低温冷却循环泵(上海豫康公司);SHB-III A循环水式多用真空泵(上海豫康公司);OSB-2100恒温水浴锅(上海爱朗公司)。UV-

第一作者简介:付爽(1991-),女,硕士研究生,研究方向为特种植物资源与生物技术。E-mail:2234839658@qq.com.

责任作者:吴松权(1972-),男,博士,副教授,研究方向为植物种质。E-mail:arswsq@ybu.edu.cn.

收稿日期:2017-04-17

8500 紫外-可见分光光度计(上海菁华公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 黄芪不定根的培养

参照 WU 等^[13]方法培养不定根,将黄芪种子在 75% 乙醇中浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次,之后用 2% 的次氯酸钠消毒 25 min,再用无菌水冲洗 3~5 次。将已经灭菌的种子接种在 MS 培养基(含蔗糖 30 g·L⁻¹,琼脂粉 7~8 g·L⁻¹,pH 5.8)中,环境温度 25℃,湿度 70%,每天光照 15 h。4~5 d 时,侧根长出,切取侧根 1.5 cm,接入到 B5 固体培养基(蔗糖 30 g·L⁻¹,倍力凝 7~8 g·L⁻¹,IBA 2.0 mg·L⁻¹,pH 5.8)中,暗培养 20 d 左右,转接在 B5 液体培养基中继代培养。

1.2.2 低温处理

选取 25℃ 培养 30 d 的新鲜黄芪不定根,分别进行 5℃ 低温和 5℃ 低温附加光照处理,处理时间为 1、4、8、12 d,以 25℃ 为对照(CK)。一部分样品立即用液氮冷冻并保存在-80℃ 超低温冰箱中,用于总黄酮提取,剩余部分放在 50℃ 烘干箱中烘至恒重,2 d 后测定干质量。所有样品均设置 3 次重复。

1.2.3 样品溶液制备

采用乙醇回流法提取黄芪总黄酮^[14-15]。将 0.5 g 黄芪不定根放入研钵中加入液氮研磨成粉末,放入圆底烧瓶中,并加入 20 mL 75% 的乙醇溶液,在 80℃ 恒温水浴锅中回流 150 min 后,取出静置冷却的滤液,将滤液 10 000 r·min⁻¹,离心 10 min,取上清液,利用旋转蒸发仪获得黄芪总黄酮提取物,随后加入 10 mL 三重蒸馏水溶解提取物,于容量瓶中备用。

1.2.4 总黄酮含量的测定

参照秦嘉泽等^[16]方法,以芦丁为对照品,UV 法测定总黄酮含量。取样液 0.4 mL 于容量瓶中,加入 0.3 mL 5% 硝酸钠溶液,摇匀静置 10 min,再加入 0.3 mL 10% 硝酸铝溶液,摇匀静置 10 min,最后再加入 4 mL 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液,静置 20 min 后在紫外可见分光光度计 510 nm 波长处测定吸光值,所有样品均设置 3 次重复。按照标准曲线方程计算出总黄酮含量。

1.2.5 抗氧化活性的测定

采用 DPPH 法^[17]测定总黄酮的抗氧化活性,

准确称取 DPPH (1,1-二苯-2-苦基肼自由基) 0.157 6 g 于容量瓶,加入无水乙醇定容至 200 mL,配制成 0.2 mmol·L⁻¹ 的溶液,4℃ 避光保存。精准抽取 0.2 mL 测试液于容量瓶中,加入 0.4 mL DPPH(0.2 mmol·L⁻¹) 溶液,混匀后在室温下反应 30 min,于 517 nm 波长下测定吸光度,每个样品均设置 3 次重复。DPPH 自由基清除率 $N(\%) = (A - B + C) / A$,式中,A 代表乙醇与 DPPH 的吸光值,B 代表样液与 DPPH 的吸光值,C 代表样液与乙醇的吸光值。

1.3 数据分析

试验数据应用 SPSS 19.0 软件中单因素方差分析和 T 检验分析,采用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 低温处理条件下的生物量

由表 1、2 可知,2 种黄芪不定根的生物量在低温处理的不同时期均无显著变化。值得注意的是:在处理第 12 天时 2 种不定根开始出现褐化现象,这与秦嘉泽等^[16]的研究结果一致。

表 1 低温对安图黄芪不定根生物量的影响 g

处理	处理时期/d			
	1	4	8	12
CK	0.49a	0.52a	0.53a	0.54a
低温	0.52a	0.51a	0.52a	0.52a
低温光照	0.50a	0.52a	0.53a	0.53a

注:同列数字后相同字母表示差异不显著($P>0.05$),下同。

表 2 低温对长白山黄芪不定根生物量的影响 g

处理	处理时期/d			
	1	4	8	12
CK	0.96a	1.02a	1.03a	1.04a
低温	0.98a	0.98a	0.94a	0.97a
低温光照	0.98a	0.99a	1.00a	1.00a

2.2 总黄酮含量分析

由图 1 可知,对照处理第 1、4、8 天时总黄酮含量无明显变化;而低温附加光照处理,总黄酮含量在第 4 天时显著上升,并于第 8 天时达到峰值(2.37 mg·g⁻¹),第 4 天和第 8 天含量分别是其同时期对照组的 1.38 倍和 1.30 倍,可能的原因

是光能够作为一种刺激信号使总黄酮含量显著上升^[1],随着处理时间的增加,由于培养基养分的减少和继代天数过长,第12天时总黄酮含量显著降低。对照组中,第12天时总黄酮含量高于第1、4天,这与其在第12天时出现褐化现象息息相关,因为褐化严重的植物组织内含有较多的酚类物质,包括黄酮、单宁和木质素等^[18]。

由图2可知,长白山黄芪不定根无论是被单独低温处理还是低温附加光照处理,总黄酮含量均无显著变化。不过25℃时长白山黄芪中总黄酮含量显著高于安图黄芪。分析其原因可能是由于二者海拔高度的不同所致,导致了长白山膜荚黄芪不定根对低温具有更强的适应能力。

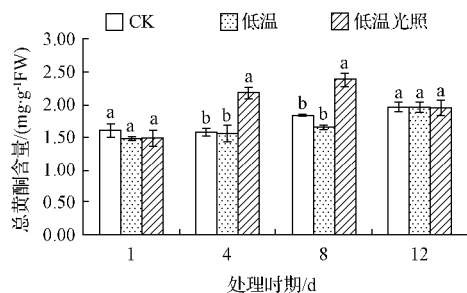


图1 低温对安图黄芪不定根总黄酮含量的影响

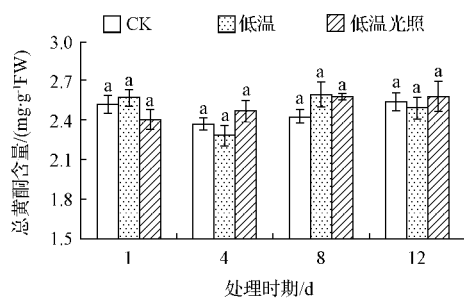


图2 低温对长白山黄芪不定根总黄酮含量的影响

2.3 抗氧化活性分析

黄芪总黄酮不仅有药效功能,还是一种天然的抗氧化剂,具有多种生物学功能^[19]。已有报道枸杞的抗氧化活性与其总黄酮含量呈正相关^[20]。如图3所示,低温光照处理安图不定根,第4、8天时的抗氧化活性显著高于对照组,表明所增加的总黄酮具有生物学活性。

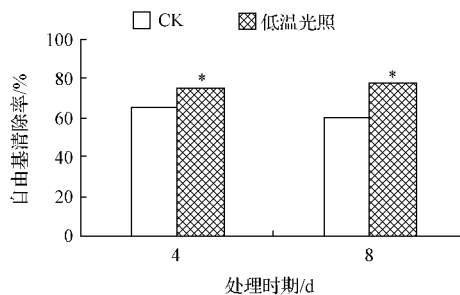


图3 低温对安图黄芪不定根总黄酮抗氧化活性的影响

3 结论与讨论

黄芪作为补气之常用中药,在我国主要分布在北方地区。长白山膜荚黄芪驰名中外,是当地地道药材之一,SRAP分子标记分析证明长白山野生黄芪种质之间存在着丰富的遗传变异,聚类分析结果将安图和长白山的野生黄芪分为不同类别^[21]。总黄酮是黄芪抗氧化和清除自由基的主要成分,具有抗肿瘤、抗突变和抗损伤等多种药理作用^[5]。

低温是影响黄芪植物分布的主要环境因子之一^[10],不定根培养是获取总黄酮的有效手段之一^[16]。该研究结果表明低温(5℃)处理培养30 d的安图和长白山膜荚黄芪不定根,不影响其生物量,但是增加了安图黄芪总黄酮的含量,虽然这种总黄酮的积累需要光(图1),而且总黄酮含量积累与抗氧化活性密切相关(图3);但是低温或低温光照都不影响长白山黄芪总黄酮的含量(图2),而且在常温下(25℃)长白山黄芪总黄酮含量显著高于安图黄芪(图1和图2)。这表明长白山黄芪不同种质之间,不仅存在着DNA水平上的差异^[21],还存在着次生代谢产物(总黄酮)含量的差异,而且不同种质之间响应低温的次生代谢产物生物合成机制也不尽相同。

总之,长白山膜荚黄芪不定根总黄酮的含量高于安图膜荚黄芪不定根,其总黄酮积累不受低温的影响;只有在低温结合光照时才能诱导安图膜荚黄芪不定根总黄酮的积累。

参考文献

- [1] PAN H W Y, ZHANG Y, ZHOU T, et al. Phenylalanine ammonia lyase functions as a switch directly controlling the accumulation of calycosin and calycosin-7-O-beta-D-glucoside in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(11): 3027-3037.
- [2] 李晓杰, 范圣此. 黄芪研究与开发利用综述[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(11): 6449-6450.
- [3] 颜培宇, 于晓红, 张德山, 等. 黄芪总黄酮对免疫功能低下小鼠 T 细胞极化的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(2): 163-164.
- [4] 汪德清, 沈文梅, 田亚平, 等. 黄芪的三种提取成分对氧自由基作用的影响[J]. 中国药理学通报, 1994(2): 129-132.
- [5] 张冬青. 黄芪总黄酮及其活性成分对肿瘤细胞的抑制作用与机理研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2010.
- [6] 汪德清, 李煜, 田亚平, 等. 黄芪总黄酮对 BEL-7402 细胞的体外抑制作用[J]. 解放军医学院学报, 2005, 26(5): 321-323.
- [7] 匡洪宇, 康英英, 马丽丽, 等. 黄芪总黄酮对高糖培养下牛视网膜血管周细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(3): 250-252.
- [8] 吴座功. 蒙古黄芪组织培养技术的研究及 N^+ 注入对其生化指标的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2008.
- [9] 秦雪梅, 李震宇, 孙海峰, 等. 我国黄芪药材资源现状与分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3234-3238.
- [10] 刘增辉, 曹晓虹. 栽培黄芪的研究综述[J]. 甘肃农业科技, 2014(6): 54-56.
- [11] 赵培强. 黄芪(*Astragalus membranaceus*)连作障碍的研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2009.
- [12] 尹双双, 高文远, 王娟, 等. 药用植物不定根培养的影响因素[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3691-3694.
- [13] WU S Q, LIAN M L, GAO R, et al. Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2011, 47(6): 719-724.
- [14] 肖卫华, 韩鲁佳. 黄芪黄酮乙醇回流提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2008(1): 233-235.
- [15] 杨申明, 王波, 陈靖, 等. 乙醇回流法提取甜菜树总黄酮及其抗氧化性评价[J]. 保鲜与加工, 2016(4): 61-66.
- [16] 秦嘉泽, 全雪丽, 田海丽, 等. 长白山野生膜荚黄芪不定根总黄酮积累规律研究(I)[J]. 北方园艺, 2014(16): 158-160.
- [17] 韦献雅, 殷丽琴, 钟成, 等. DPPH 法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 317.
- [18] 冯代弟, 王燕, 陈剑平. 等植物组培褐化发生机制的研究进展[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(6): 1108-1116.
- [19] 区海燕. 黄芪总黄酮的提取分离及其指纹图谱和生物活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2008.
- [20] 牛东玲, 马婷婷, 张自萍. 宁夏枸杞叶中总黄酮含量与抗氧化活性关系[J]. 宁夏大学学报(自然版), 2012, 33(1): 55-57.
- [21] 王萌, 王景然, 李德阳, 等. 长白山野生膜荚黄芪种质资源的 SRAP 分析[J]. 北方园艺, 2016(21): 94-97.

Effects of Low Temperature on Accumulation of Total Flavonoids in Adventitious Roots of *Astragalus membranaceus*

FU Shuang, WANG Yang, LYU Shuang, LIU Jia, QUAN Xueli, WU Songquan
(Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract: Two types of adventitious roots of *Astragalus membranaceus* from different altitudes (Antu and Changbai Mountain) were taken as materials to study the effect of the low temperature and low temperature plus light on accumulation of total flavonoids. The results showed that the total flavonoids of adventitious roots of *A. membranaceus* from Antu increased under low temperature which need light, and reached the maximum at the eighth day ($2.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), which was 1.30-folds compared to the control, and the antioxidant activity increased significantly with the increase of total flavonoids; the total flavonoids of adventitious roots of *A. membranaceus* from Changbai Mountain was significantly higher than that in Antu, whereas total flavonoids of it were not affected by low temperature and low temperature plus light. It suggested that there were different mechanism of flavonoid biosynthesis in different germplasms of *A. membranaceus*.

Keywords: *Astragalus membranaceus*; adventitious roots; low temperature; total flavonoids; antioxidant activity