

声波刺激对铁皮石斛组培苗多糖含量的影响

李 标^{1,2},王伯初^{1,2},梁亦龙²,唐 坤^{1,2},舒坤贤²,刘万钱¹

(1. 重庆大学生物工程学院,教育部生物力学和组织工程重点实验室,重庆 400044; 2. 重庆邮电大学生物信息学院,重庆 400065)

摘要 目的:测定特定的声波刺激对铁皮石斛组培苗多糖含量的影响程度。方法:以苯酚-硫酸比色法测定多糖的含量。结果:连续刺激 24 天后多糖含量明显高于对照组。结论:特定的声波刺激可以明显地促进铁皮石斛多糖的合成,对石斛多糖代谢途径有显著的影响。

关键词 铁皮石斛;声波刺激;组培苗;多糖

中图分类号:R282.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-4454(2006)07-0645-03

植物在自然界生长不可避免地要受到各种外界环境包括机械应力的刺激,环境应力包括自然或人为施加于植物体的应力。声波作为一种人为的应力源已被广泛地应用于植物生物力学的研究^[1]。

兰科铁皮石斛 *Dendrobium candidum* 是一种传统的名贵中药材,以新鲜或干燥茎入药,加工后称为“铁皮枫斗”,有益胃生津、壮筋补虚、滋阴清热的功能^[2]。其主要化学成分是多糖,还含有微量的生物碱、氨基酸、酚类、挥发油等^[3]。由于生长在高温、高湿的环境,外界环境应力对铁皮石斛的代谢有重要的影响。

本试验以特定的声波作为应力源,以苯酚-硫酸比色法测定铁皮石斛试管苗的多糖含量变化,为进一步研究环境应力对植物代谢途径的作用机制提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料及处理 将铁皮石斛的组培苗分株转入到 MS + IBA 培养基,刺激仪为重庆大学生物工程学院研制的声波促进植物生长装置(专利号:ZL01256711.6)。苗培养 6 天后,以声强 100 dB、频率 1000Hz 的声波对刺激组每天一次,每次一小时,连续刺激 24 天,每隔 6 天取样干燥。对照组的材料放在无刺激影响的环境培养。试验原理与方法参见文献^[4]。

1.2 仪器与试剂 UV755BV 紫外分光光度计(上海精科),葡萄糖,苯酚试剂为苯酚 200 g,加入铝片 0.2 g 和碳酸氢钠 0.1 g,蒸馏,收集 182℃ 馏分,称取 10 g,加水 150 mL 溶解,置棕色瓶内放冰箱备用。其它试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 多糖的提取精制 取铁皮石斛干燥的粗粉

100 g,多糖提取精制采用参考文献^[5]。

2.2 标准曲线 精密称取 105℃ 干燥至恒重的葡萄糖标准品 100 mg,置 100 ml 容量瓶,用蒸馏水定容,再精密吸取 10 ml 于 100 ml 容量瓶,用蒸馏水定容。精密吸取标准品溶液 0.1、0.2 ~ 0.7 ml,分别置于容量瓶,加蒸馏水使成 2.0 ml,各加苯酚试剂 1.0 ml,摇匀,迅速加入硫酸 5.0 ml 摇匀,放置 5 min,置沸水浴中加热 15 min,取出,冷水迅速冷却至室温。另以 2.0 ml 蒸馏水同法操作,作为空白对照。按分光光度法在 490 nm 波长处测定吸收度。回归曲线: $A = -0.00157 + 0.01274C$ ($r = 0.9991$),可见葡萄糖在 4.993 ~ 34.950 μg 范围内呈线性关系。

2.3 回收率实验 取已知含量的铁皮石斛粗粉 5 份,精密加入石斛多糖 25 mg,按样品测定方法测定,计算回收率最高达 106.2%,平均 102.6%,RSD = 2.19%。

2.4 换算因素的测定 精密称取 60℃ 干燥至恒重的铁皮石斛多糖 10 mg,置于 100 ml 容量瓶,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。精密吸取多糖的贮备液 0.3 ml,按标准曲线的制备项下操作,测定吸收度。另精密吸取葡萄糖标准溶液 0.3 ml(含葡萄糖 30 μg),同法操作,求出石斛多糖溶液中的葡萄糖浓度,按下式计算换算因素 f 。

$$f = \frac{\text{多糖溶液浓度}(\mu\text{g/ml})}{\text{多糖溶液的葡萄糖浓度}(\mu\text{g/ml}) \times \text{稀释因素}}$$

2.5 样品含量的测定 精密称取 60℃ 恒重的石斛粗粉 0.150 g,置圆底烧瓶,用石油醚(60 ~ 90℃)脱脂,加入 80% 乙醇 100 ml,回流提取 1 h,乘热过滤。药渣用 8 ml 80% 热乙醇洗涤 3 次,再用 85 ml 蒸馏水回流提取 1 h,乘热过滤,用热水洗涤药渣和烧瓶,冷后在 250 ml 容量瓶中以水定容。铁皮石斛多糖供试液 0.3 ml,按标准曲线项下操作,测定吸收度。

基金项目:重庆市科委自然科学基金(CSTC 2005 BB1094)

同时精密吸取葡萄糖标准溶液 0.3 ml, 同法操作, 按下式计算样中多糖的含量。

$$\text{多糖含量}(\%) = \frac{C_s \cdot D \cdot f \cdot V}{W} \times 100\%$$

C_s ($\mu\text{g/ml}$): 供试液中葡萄糖的浓度; D : 供试液的稀释因素; V (ml): 供试液的体积; W (μg): 供试液的重量

测定结果: 吸收度为 0.152, 样品平均葡萄糖浓度为 11.796 $\mu\text{g/ml}$, 葡萄糖标准品液浓度为 14.950 $\mu\text{g/ml}$, 计算 f 值为 1.274。

2.6 铁皮石斛多糖含量测定结果 多糖广泛存在于自然界, 是多种石斛主要的药用成份, 具有多种生物活性, 是理想的免疫增强剂。本试验采用硫酸-苯酚比色法测定多糖的含量, 结果表明, 刺激 24 天后多糖含量明显高于对照组 (表 1), 组培苗多糖含量随时间的增加而提高。说明多糖的含量与铁皮石斛生长的环境和时间有关。声波刺激后多糖含量变化快, 先迅速地提高, 然后趋于平缓, 而对照组多糖含量变化较平缓, 12 天后才有较大变化, 显示声波刺激可以促进多糖的合成, 对多糖代谢途径有显著的影响 (图 1)。

表 1 声波刺激下铁皮石斛多糖的含量

刺激时间(d)	0	6	12	18	24	RSD (%)
对照组多糖含量 (%)	19.52	19.64	20.23	21.26	22.15	4.35
刺激组多糖含量 (%)	19.52	21.27	23.05	23.97	24.36	4.61

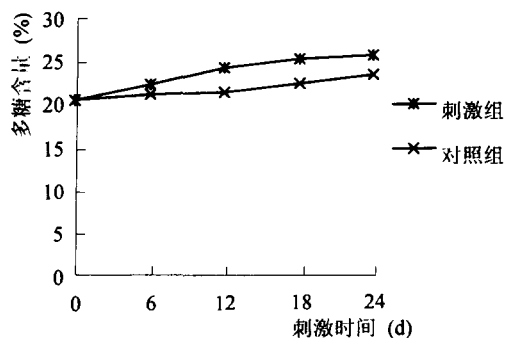


图 1 声波刺激对铁皮石斛多糖含量的影响

3 讨论

3.1 测定方法的考察 硫酸水解过程是准确测定多糖的主要影响因素。本实验水浴 15 分钟水解已完全, 超过 20 分钟, 吸收度明显下降。可能由于反应时间延长, 生成的糠醛衍生物继续分解或发生聚合而影响与苯酚的缩合显色。此外, 多糖提取采用水提 1 小时一次完成, 第二次水提液中几乎不能检出多糖, 可认为水提 1 小时提取完全。

3.2 铁皮石斛生长的特点 铁皮石斛生活环境有三个突出特点: 高热、高湿和散射光。散射光的能量小, 光合物少, 生长极为缓慢。植物生长的物质基础来自光合作用合成的碳水化合物, 植物的光合能力

与其生长速度有着密切的联系。苏文华等^[6]研究发现铁皮石斛是兼性 CAM 植物, 光合途径可在 CAM 与 C_3 途径间转变。其光合途径由 C_3 向 CAM 途径的转化与 PEP 羧化酶和 NADP-苹果酸酶的活性有关^[7], 环境因子变化或生长发育等因素诱发其转变^[8,9]。

3.3 声波刺激对铁皮石斛生长代谢的影响 由于光合作用碳代谢的途径随环境条件变化在景天酸代谢途径与 C_3 途径间转换, 铁皮石斛的光合速率不高, 日光合积累有限。特殊的光合特性可能是铁皮石斛生长缓慢的原因之一。在晴天的白天 (除 11:00-15:00 外) 和夜间, 铁皮石斛都吸收 CO_2 , 上午 9:00 为一天中 CO_2 吸收速率的最高值^[6]。本实验中每天上午 9:00 开始刺激, 结果可使植物的根系发达, 生长较快^[10], 苗粗壮, 多糖含量明显提高。由于实验的石斛苗发育程度基本相同, 因此可能是声波刺激改变了铁皮石斛在景天酸代谢途径与 C_3 途径间的转换, 增强了 CO_2 的吸收, 提高了光合速率。声波刺激后 CO_2 吸收的增强, 表明有可能改变了石斛叶片的气孔限制值, 增强了气孔的导度, 从而促进 CO_2 的吸收。此外, 由于刺激组的苗根系发达, 加快了植物营养的吸收, 促进植物的糖代谢途径, 从而提高了铁皮石斛多糖的含量。

参 考 文 献

- [1] Wang BC, Zhang J, Li B, et al. Study of mRNA expression of *Arabidopsis thaliana* under stimulation using modified differential display RT-PCR with silver staining. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 40(1):321-326.
- [2] 包雪声, 顺庆生, 叶愈青. 石斛类药材枫斗的历史及现状. *中药材*, 1999, 22(10):540-542.
- [3] 邵华, 张玲琪, 李俊梅. 铁皮石斛研究进展. *中草药*, 2004, 35(1):109-202.
- [4] Liu YY, Wang BC, Long XF, et al. Effects of sound field on the growth of *Chrysanthemum* callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 24:321-326.
- [5] 李亚芳, 张晓华, 孙国明. 石斛中总生物碱和多糖的含量测定. *中国药事*, 2002, 16(7):426-428.
- [6] 苏文华, 张光飞. 铁皮石斛叶片光合作用的碳代谢途径. *植物生态学报*, 2003, 27(5):631-637.
- [7] 王晨, 尉亚辉, 吴丽园. NADP-苹果酸酶活性变化及其在 CAM 运行中的调节. *西北植物学报*, 1997, 17(2):200-204.
- [8] Markovska YK, Dimitrov DS. The effect of leaf age on gas exchange and malate accumulation in C_3 -CAM plant *Marubium frivaldszkanum* (Lamiaceae). *Photosynthetica*,

2001,39:191-195.

- [9] Mazen MA. Changes in Properties of phosphoenpyruvate carboxylase with induction of crassulacean acid metabolism (CAM) in the C₄ plant *Portulaca oleracea*. *Photosynthetica*, 2001,38:385-391.

- [10] Jia Y, Wang BC, Wang XJ. Effect of sound wave on the metabolism of *chrysanthemum* roots. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003,29:115-118.

(2005-11-19 收稿)

2006-04-15 修回)

Effect of Polysaccharides Content of Tissue Culturing Seedlings on *Dendrobium candidum* under Sound Wave Stimulation

LI Biao^{1,2}, WANG Bo-chu^{1,2}, LIANG Yi-long², TANG kun^{1,2}, SHU Kun-xian², LIU Wan-qian¹

(1. Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering under the State Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. College of Bioinformation, Chongqing University of Posts & Telecommunications, Chongqing 400065, China)

Abstract Objective: To detect the polysaccharides content of tissue culturing seedlings on *Dendrobium candidum* under special sound wave stimulation. Methods: The content of polysaccharides was detected by phenol-vitriol colorimetry method. Results: The polysaccharides content of the groups stimulated continuously for 24d was higher obviously than the content of the control groups. Conclusion: The stimulation of the special sound wave promoted markedly the synthesis of polysaccharides in *D. candidum*. It may affect obviously the metabolic pathway of polysaccharides in *D. candidum*.

Key words *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl; Sound wave stimulation; Tissue culturing seedlings; Polysaccharides

不同种源黄芩的过氧化物同工酶研究

于晶,陈君*,徐荣,杨世林,程惠珍

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所,北京 100094)

摘要 目的:利用过氧化物同工酶技术探讨黄芩不同种源之间的亲缘关系。方法:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术对不同种源黄芩过氧化物同工酶进行研究,并用 spss 分析软件对谱带进行聚类分析。结果:黄芩不同种源的过氧化物同工酶谱带存在不同程度差异,其中酶带⑤为黄芩在过氧化物同工酶谱上的特征酶带。黄芩不同种源被聚为三种类型,其相似系数多数在 0.818~1.000 之间。结论:利用过氧化物同工酶谱带聚类分析,可为不同种源黄芩的划分提供参考。

关键词 黄芩;种源;过氧化物同工酶;聚类分析

中图分类号:R282.2 文献标识码:A 文章编号:1001-4454(2006)07-0647-03

唇形科黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 为多年生草本,以根入药,具有清热解毒、止血、安胎等功能。分布于我国东北、西北各省区,四川、云南也有。近年来开始家种,河北、山东、山西等地多有栽培^[1]。

同工酶是研究植物多样性的有力工具,过氧化物酶则是广泛存在植物体的一种重要的同工酶,能反映植物生长发育的特点、体内代谢状况以及对外界环境的适应性。近些年来已广泛应用于鱼腥草^[2]、灵芝^[3]、天麻^[4]、月季^[5]、欧李^[6]及葡萄^[7]等植物的研究,有关于不同种源黄芩的过氧化物同工

酶研究未见报道。本文采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术探讨不同种源黄芩叶片过氧化物酶同工酶的酶谱特征及各种源之间的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料 2000 年和 2001 年分别在山东蒙阴、山东莒县、陕西蒲城等地收集黄芩种子,同时又在灵山、百花山、大连采集了野生黄芩种根一并种于药植所实验地,均由本所资源中心林寿全研究员鉴定。为了比较不同种源黄芩之间的差异,2002 年 6 月 7 日扦插 32 份不同种源的黄芩,9 月 16 日从扦插的不同种源植株(每份取 20 株)取中上部的叶

基金项目:国家自然科学基金项目(39930220);北京市科委资助项目(9550214400)

* 通讯作者:陈君, Tel: (010)62899731, 62820904。