

稀土元素对霍山石斛试管苗生长的影响

刘石泉, 钟桐生, 赵新民, 徐玲, 邓中日

(湖南城市学院 化学与环境工程系, 湖南 益阳 413000)

摘要:目的:研究稀土元素镧(La)、钐(Sm)、铈(Ye)对霍山石斛试管苗生长的影响。方法:运用植物组织培养技术在基本培养基中添加不同种类、不同浓度的稀土元素,60d后统计其对霍山石斛试管苗各项生长指标。结果:1/2MS + 10%香蕉培养基中添加10mg/L Sm、10mg/L Ye对其试管苗有矮化作用和促使密集的分蘖和生根;添加10mg/L La促进植株增高、鲜重增加、叶绿素含量提高、芽分化加快、根数目增多;而添加100mg/L La对其试管苗生长起明显抑制作用。结论:稀土元素对霍山石斛试管苗的生长有显著的影响。

关键词:稀土元素;霍山石斛;试管苗生长;组织培养

中图分类号:Q945.3 文献标识码:A 文章编号:1004-311X(2008)03-0072-03

Effect of Rare - earth Elements on *Dendrobium huoshanense*

C.Z. Tang et S.J. Cheng

LIU Shi - quan, ZHONG Tong - sheng, ZHAO Xin - min, XU Ling, DENG Zhong - ri

(Department of Chemistry and Environment Engineering, Hunan City University, Hunan Yiyang, 413000, China)

Abstract: Objective: Effect of rare - earth elements La, Sm, Ye on *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Cheng (abbreviated to *D. huoshanense*) were studied. **Method:** The growth of the tube plants was analyzed by tissue culture technology adding different type of rare - earth elements and different concentration of La into culture medium after 60 days. **Result:** 1/2MS + 10% banana medium with 10mg/L Sm, 10mg/L Ye was suitable for the dwarfing and proliferation of cluster buds and roots; with the 10mg/L La was the optimum concentration on which the highness, the fresh weight, the chlorophyll contents, the sprouts number and the roots number of the tube plants were increased obviously, while the plants growth were inhibited remarkably with the high concentration of La (100mg/L). **Conclusion:** The remarkable change can be observed on the growth of the *D. huoshanense* by adding rare - earth elements.

Key words: rare - earth elements; *D. huoshanense*; the growth of the tube plants; tissue culture

霍山石斛(*D. huoshanense*)又名米斛,原产于安徽省霍山县,是石斛之极品,有“中华仙草之最”^[1]的美誉。但其对生态环境要求比较严格,自然繁殖频率低(<5%),加上长期的过量采集,资源已经枯竭,物种濒临灭绝。植物组织培养方法是寻求解决霍山石斛种源枯竭、保护这一珍贵中药品种的有效途径,许多学者对霍山石斛的离体繁殖进行了研究;目前主要集中在石斛原球茎的萌发、增殖、分化、壮苗等方面,采用的方法是运用植物生长调节剂、附加香蕉提取物、水解酪蛋白、肌醇、甘氨酸等有机物来调节霍山石斛的生长发育^[2-4]。文献检索表明,用稀土元素来调节霍山石斛的生长发育尚属空白,在石斛属中仅见周伟^[5]等研究了稀土微肥对铁皮石斛试管苗的影响,但近年来大量的研究表明,稀土元素具有一定的生理活性,它对植物生根、发芽、种子萌发、叶绿素的增加和光合作用等都有影响^[6-9],施用适当浓度稀土元素能够促进植物对养分的吸收、转化和利用,对改善品质、提高产量有利。因此,本研究首次将不同浓度的镧(La)、钐(Sm)、铈(Ye)分别添加到霍山石斛试管苗的培养基中,观察其对霍山石斛试管苗生长和分化的影响,为镧(La)、钐(Sm)、铈(Ye)在霍山石斛等组织培养中的合理应用提供实验依据。我们初步设计了几种稀土元素对霍山石斛试管苗生长的影响实验,实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

霍山石斛蒴果采自霍山县长冲药材场,用常规消毒方法消毒后,将其接种在1/2MS + 10%香蕉培养基^[3,4]上获得试管苗。选择来自同一蒴果、长势相近、株高为1cm左右试管苗作为供试材料。

1.1.2 试剂

常规1/2MS培养基药品和常规消毒剂为国产分析纯,香蕉为市售海南蕉,稀土元素为益阳市金源稀土提供。

1.1.3 仪器

高压蒸汽灭菌器,数显pH计,超净工作台,植物组织培养架,722s型分光光度计等。

1.1.4 培养基及培养条件

基本培养基为1/2MS + 10%香蕉、琼脂0.5%、pH5.4。研究用培养基为基本培养基添加不同种类、不同浓度的稀土元素(详见1.2)。培养温度(25 ± 2)℃,光强60μmol/m²/s,光照时间12h/d。

1.2 方法

1.2.1 不同种类稀土元素对霍山石斛试管苗生长的影响

将试管苗分别同时接种于添加10mg/L La、Sm、Ye的1/2MS + 10%香蕉的培养基上,以未添加稀土元素的1/2MS + 10%香蕉为对照,每一处理同时接种15棵于同一培养基上。重复3次,60d后观察实验结果并对数据进行统计分析。

1.2.2 不同浓度La对霍山石斛试管苗生长的影响

将试管苗分别接种于添加5、10、50、100mg/L不同浓度La的1/2MS + 10%香蕉培养基上,以未添加稀土元素La为对照,每一处理同时接种15棵于同一培养基上。重复3次,60d后观察实验结果并对数据进行统计分析。

1.2.3 叶绿素含量的测定

叶绿素含量测定参照朱广廉^[10]等采用丙酮提取比色法,结果以μmol/g表示。

2 结果与分析

2.1 不同种类的稀土元素对霍山石斛试管苗生长的影响

添加不同种类同浓度的稀土元素La、Sm、Ye(10mg/L),60d后生长情况见图1、表1。实验结果表明,三种稀土元素对霍山石斛试管苗的生长都有促进作用,但它们之间又存在着显著差异。添加La元素的处理,其增重量为对照增重量的4.65倍;添加Sm、Ye元素的较差,但也稍高于对照。同时株高、分蘖、根系等也产生了较为明显的影响,从统计来看稀土元素La能较为显著的促进株高的增加,而Sm、Ye则对其试管苗有矮化作用,使试管苗丛生;在促进生根和分蘖方面,三者生根的数目和分蘖数目均比对照要明显,但Sm、Ye对其作用更显著,几乎达到密集的程度;同时,实验中我们注意到添加了稀土元素La、Sm、Ye的试管苗叶片颜色均有不同程度的加深,为此,我们对试管苗叶绿素含量进行了测定。结果表明,试管苗的叶绿素含量明显高于对照,叶绿素含量要高于对照46.04% ~ 58.87%。添加元素La叶绿素a、b的增加程度基本相同,但添

收稿日期:2008-01-17;修回日期:2008-02-26

基金项目:湖南省高等学校科学研究项目资助(“霍山石斛开放培养微生态系统的建立”,06C218)

作者简介:刘石泉(1969-),男,湖南益阳人,硕士,副教授,研究方向:植物遗传,发表论文20余篇,E-mail:lsq205@tom.com。

加元素 Sm、Ye 后叶绿素 a 的含量增加显著而叶绿素 b 的增加量却甚微,故而我们认为添加元素 Sm、Ye 对叶绿素合成的调控并不平衡,加上 Sm、Ye 则对其试管苗有矮化作用和促使密集的分蘖和生根,使试管苗丛生,周伟^[5]等研究稀土微肥对铁皮石斛试管苗壮苗的影响的正交试验也表明化合态的稀土微肥镧(La)对促进铁皮石斛试管苗增质量效果显著,因此我们后面的实验因而只选取了元素 La 对其试管苗的影响做进一步研究。

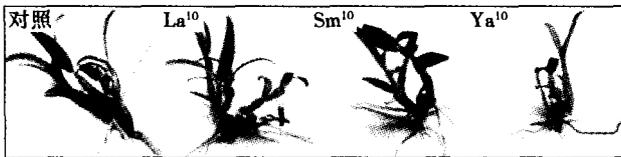


图1 La、Sm、Ye 霍山石斛试管苗的影响(上标代表相应浓度 10mg/L)

2.2 稀土元素镧的浓度对霍山石斛试管苗生长的影响

在 1/2MS + 10% 香蕉培养基上添加不同浓度的稀土元素镧(La),比较它们对霍山石斛试管苗生长的影响见图 2、表 2。实验结果表明,La 元素对霍山石斛试管苗生长有显著的影响但随着浓度增加。超过 10mg/L 对试管苗的生长产生开始产生不良影响。

结果表明:在霍山石斛试管苗增重方面,镧(La)浓度达到 10mg/L 时,试管苗的增重为最高,是对照实验增重的 2.82 倍,当浓度达到 50mg/L 时,试管苗正常增长开始受到抑制,当浓度达到 100mg/L 时,试管苗正常增长受到强烈的抑制,增重仅为对照实验增重的 0.86 倍;La 浓度对霍山石斛试管苗的株高、分蘖数、根的生长也有影响,10mg/L 浓度的 La 可促进株高增加、分化的芽数增多,根的发生增多,但随着 La 浓度的株高增加、分化芽数和根数受到抑制,发黄部位也由叶的基部逐渐扩大,达到 100mg/L 浓度时,试管苗叶片开始严重发黄,甚至扩展至全叶,且株高、分化芽数和根数都显著比对照要低得多;同



图2 不同浓度 La 对霍山石斛试管苗的影响(上标代表对应浓度 mg/L)

表2 镧(La)浓度对霍山石斛试管苗生长的影响(60d)

	实验批次	0mg/L	5mg/L	10mg/L	50mg/L	100mg/L
试管苗增重(g)	1	0.4609	0.8225	1.2283	0.8113	0.3178
	2	0.3748	0.8786	1.2816	0.8429	0.3665
	3	0.4517	0.9073	1.1224	0.7683	0.4254
	平均	0.4291	0.8695	1.2108	0.8075	0.3699
株高(cm)	1	2.58	2.86	2.94	2.35	2.08
	2	2.64	2.81	3.12	2.13	2.24
	3	2.49	2.79	2.88	2.37	2.19
	平均	2.57	2.82	2.98	2.28	2.17
分蘖数(个/株)	1	2.14	2.15	2.36	2.13	1.97
	2	2.23	2.13	2.28	2.04	1.86
	3	2.09	2.22	2.27	2.07	1.896
	平均	2.15	2.17	2.31	2.08	1.91
根数(条/株)	1	3.56	3.78	4.35	3.34	1.86
	2	3.47	3.69	4.68	3.28	1.95
	3	3.61	3.57	4.52	3.17	1.83
	平均	3.55	3.68	4.52	3.26	1.88
黄化现象		叶基偶见	叶基极少见	无	叶基较多面大	叶基、全叶常见面大
叶绿素 a(μmol/g)		11.72	20.10	18.31	16.56	11.62
叶绿素 b(μmol/g)		11.37	11.57	17.41	14.23	7.26
叶绿素总量 T(μmol/g)		23.09	31.67	35.72	30.79	18.88

3 讨论

稀土元素对霍山石斛的壮苗及其品质影响,国内外尚未

时,对试管苗进行了叶绿素含量的测定,结果表明稀土元素镧(La)对石斛试管苗叶绿素的含量有明显的影。在镧(La)浓度为 0 ~ 50mg/L 时,叶绿素含量比对照增加 37.16% ~ 54.70%,但当浓度达到 100 mg/L 时,叶绿素含量比对照降低,可见高浓度的稀土元素 La 抑制石斛试管苗叶中叶绿素的形成。因此,就石斛试管苗生长而言,La 的适宜浓度范围应是 0 ~ 50mg/L,以 10mg/L 为最佳。

表1 不同种类的稀土元素对霍山石斛试管苗生长的影响(60d)

	实验批次	对照	La(10mg/L)	Sm(10mg/L)	Ye(10mg/L)
试管苗增重(g)	1	0.2609	1.0283	0.3794	0.3591
	2	0.2248	1.2816	0.4086	0.4483
	3	0.2517	1.1224	0.3372	0.3830
	平均	0.2458	1.1441	0.3751	0.3968
株高(cm)	1	2.45	3.10	2.21	1.96
	2	2.68	2.89	1.98	1.93
	3	2.63	2.96	2.30	2.25
	平均	2.59	2.98	2.16	2.05
分蘖数(个/株)	1	2.22	2.44	2.62	2.39
	2	2.08	2.44	2.59	2.43
	3	2.14	2.54	2.63	2.51
	平均	2.14	2.47	2.63	2.44
根数(条/株)	1	3.52	4.28	5.82	4.56
	2	3.41	4.35	5.64	4.39
	3	3.38	4.29	5.76	4.87
	平均	3.44	4.31	5.74	4.61
叶绿素 a(μmol/g)		11.72	18.31	22.54	21.02
叶绿素 b(μmol/g)		11.37	17.41	14.10	13.72
叶绿素总量 T(μmol/g)		23.09	35.72	36.64	34.74

见相关报道。研究表明,稀土元素具有一定的生理调控特性,并对植物的生长发育和品质改善有一定的促进作用^[6-9]。本实验分别在香蕉培养基中添加了三种不同种类但相同浓度的稀土元素 La、Sm、Ye,结果表明添加了稀土元素的试管苗增重、叶绿素含量、分蘖数以及根数情况来看都要比对照好。稀土元素 La 的不同浓度实验表明,其浓度为 10mg/L 时,对石斛试管苗鲜重与叶绿素含量的增加,芽分化,根数的增多和植株的增高都有促进作用,但当稀土 La 浓度达到 100mg/L 时,则出现较明显的抑制作用,表明在适宜浓度下可促进苗生长与分化,对幼苗生长是有利的,浓度过高则会抑制幼苗生长,甚至死亡。这一结果与周伟^[5]等研究稀土微肥对铁皮石斛试管苗壮苗的影响、李红双^[11]等研究 La 对中国樱桃试管苗再生与生长的作用结果基本相一致,至于 La 对其试管苗生长与分化的影响机制问题^[8,9],还未有进一步研究的报道。目前主要认为适量的稀土元素能增加植物体内源激素含量,促进叶绿体膜上 $Mg^{2+} - ATP_{ase}$ 活性,各种酶的活动增强,呼吸强度提高,有效清除组织内 H_2O_2 ,从而促进试管苗的生物量增加,而过量的稀土元素与 Mg^{2+} 发生竞争呼吸,甚至取代 Mg^{2+} ,降低 $Mg^{2+} - ATP_{ase}$ 活性,与 ATP 形成络合物,从而抑制己糖激酶的催化反应而使糖酵解受阻,导致试管苗呼吸强度减弱,影响试管苗的生物量增加。同时,高浓度稀土溶液能促使植物气孔关闭,抑制蒸腾作用,从而降低植物的代谢活动。另外,高浓度稀土溶液会打

破酶防御系统,清除过多的 H_2O_2 ,使过氧化氢酶的活性降低,导致质膜透性增大,电解质外渗,从而降低和破坏植株的抗逆能力,进而影响了试管苗的分化和植株的生长^[8,9]。我们的实验也证明低浓度的 La、Sm、Ye(10mg/L)确实对霍山石斛的植株增高、鲜重增加、叶绿素含量提高、芽分化加快、根数目增多等许多生长指标产生了明显的影响,进一步的 La 浓度梯度实验说明高浓度 La(10mg/L)能抑制生长。从试管苗生长变化的情况来看,笔者认为除了上述原因外,稀土元素对叶绿素的合成或叶绿体的发育影响也是其重要原因之一,因为在我们的实验中发现几乎所有经过稀土元素处理的霍山石斛试管苗其叶色都发生了改变,叶绿素的测定实验证明叶绿素 a 和叶绿素 b 确实都发生了变化。潘登奎^[12]等、海燕康^[13]等研究中也均发现稀土元素对光合色素的合成、植株的变绿等有着较为显著的影响。显然稀土元素对植物作用机理还有待于进一步深入研究。

霍山石斛是一种濒临灭绝的名贵中药材,尽管采用组织培养的手段繁殖试管苗已获成功^[2-4],但对霍山石斛试管苗生长中的稀土元素营养要求尚未有报道。我们用不同稀土元素进行了试验,这一结果对霍山石斛的壮苗以及大田栽培都具有一定的实际意义。

参考文献:

[1]包雪声,顺庆生,周根余,等.中华仙草之最——霍山石斛[M].上

海:上海科学技术文献出版社,2003:1-65.

[2]石玮,罗建平,黄秀彦.生长调节物质对霍山石斛试管苗生根的影响[J].中草药,2003,34(10):954-957.

[3]李小军,刘石泉,潘维陵,等.香蕉提取物对霍山石斛试管苗壮苗的影响[J].江苏大学学报:自然科学版,2004,25(6):469-472.

[4]李小军,刘石泉,周根余,等.香蕉提取物对霍山石斛原球茎增殖的影响[J].上海师范大学学报,2004,33(4):31-34.

[5]周伟,沈亚芳,刘材材,等.稀土微肥对铁皮石斛试管苗壮苗的影响[J].中草药,2006,37(11):1719-1723.

[6]汪燕鸣,王飞,王跃.稀土元素农业应用的研究进展[J].化工时刊,2007,21(2):47-49.

[7]许宝泉,吴水英.稀土金属对植物生长影响的研究进展[J].广西轻工业,2006,95(5):62-87.

[8]何跃君,薛立.稀土元素对植物的生物效应及其作用机理[J].应用生态学报,2005,16(10):1983-1989.

[9]李永裕,潘腾飞,邱栋梁.稀土元素对植物生物学作用机制的研究进展[J].中国农学通报,2005,21(12):217-221.

[10]朱广廉,钟海文,张爱琴.植物生理学实验[M].北京:北京大学出版社,1990,242-245.

[11]李红双,王其会,汪军.稀土元素对中国樱桃试管苗生长的影响[J].分析科学学报,2002,18(1):54-56.

[12]潘登奎,张金桐,丁启盛. La^{3+} , Ce^{3+} 对叶绿体光和磷酸化影响研究[J].中国稀土学报,2003,(3):56-59.

[13]海燕康,明辉,郭景战,等.环境、稀土和基因型对小麦花培绿苗分化的影响[J].河南农业科学,2006,7:27-29.

鸡腿菇液体深层发酵工艺条件的研究

张红梅^{1,2},吕长武^{1,2},陈恒雷^{1,2},吕杰^{1,2},曾宪贤^{1,2*}

(1.新疆大学离子束生物工程中心,新疆乌鲁木齐 830008;2.新疆大学物理科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:目的:研究碳源、氮源、接种量、初始 pH 值、温度等对鸡腿菇深层发酵的生物量和多糖产量的影响。方法:通过摇瓶培养确定了该菌株的发酵优化条件,在此条件下,获得了较高的多糖产量。结论:结果表明葡萄糖、酵母浸粉有利于鸡腿菇菌体生长和胞外多糖的形成,在初始 pH 值 6、接种量 10%、温度 26℃、250ml 摇瓶装液量 100ml 的条件下,鸡腿菇深层发酵结果最佳,在此基础上进行摇瓶发酵曲线测定,确定了鸡腿菇适宜发酵周期为 144h,胞外多糖最高可达 1.98g/L。

关键词:鸡腿菇;深层发酵;胞外多糖

中图分类号:TQ920.1 文献标识码:A 文章编号:1004-311X(2008)03-0074-03

Studies on Submerged Fermentation of *Coprinus comatus*

ZHANG Hong-mei^{1,2}, LV Chang-wu^{1,2}, CHENG Heng-lei^{1,2}, LV Jie^{1,2}, ZENG Xian-xian^{1,2*}

(1. Ion Beam Bio-Engineering Center, Xinjiang University, Urumqi 830008, China; 2. School of Physics Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Objective: The effects of carbon source, nitrogen source, inoculation, initial pH, temperature etc on the submerged fermentation of *Coprinus comatus* were studied. Method: The optimal fermentative conditions was obtained with shake bottle culture, and under this optimal conditions, higher extracellular polysaccharide yield was obtained. Result: The result showed that glucose, Leaven powder were favorable to the mycelium growing and extracellular polysaccharide formation. The optimum conditions of fermentations were as follows: initial pH 6, temperature 26℃, the cultivations were performed in 250ml shake flask containing 100ml medium, and was inoculated to a concentration of 10%. Under these conditions, the time course of growth in shake flask was determined. The results showed that the maximum extracellular polysaccharide yield was 1.98g/L, when the mycelium had been cultured about 144 hours in shake flask.

Key words: *Coprinus comatus*; submerged fermentation; extracellular polysaccharide

鸡腿菇 (*Coprinus comatus*) 学名毛头鬼伞,民间又称“刺蘑菇”,日本称之为细裂一夜茸,隶属于伞菌目、鬼伞科、鬼伞属。其肉质细嫩、鲜美可口,且含有 20 种基本氨基酸,其中人体所必需的 8 种氨基酸全部具备;其性平味甘滑,有益脾胃、清神宁智、助消化、增食欲及治疗痔疮等功效。近年来发现鸡腿菇有治疗糖尿病的有效成分,能降低血糖,经常食用对治疗糖尿病有显著疗效^[1,2]。目前国内外对鸡腿菇的研究也主要集中在袋栽栽培技术和保鲜技术上,而在液体深层培养方面的研究除了杜宇^[3]、胡滨^[4]、余杰^[5]等人有过报道外其他相对较少。本文探讨了碳源、氮源、接种量、初始 pH、温度等对深层发酵鸡腿菇的生物量和多糖产量的影响,对鸡腿菇的深层发酵条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

鸡腿菇 (*Coprinus comatus*) 由新疆离子束生物工程中心筛选保藏。

1.1.2 试剂与培养基

1.1.2.1 斜面 PDA: 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 2%, 培养温度 25℃, pH 值自然。

1.1.2.2 平板 PDA 加富: 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 蛋白胨 0.5%, 琼脂 2%, 培养温度 25℃, pH 值自然。

1.1.2.3 摇瓶发酵基础培养基: 玉米粉 3%, 蔗糖 2%, 酵母浸粉 0.5%, 麸皮 4%, KH_2PO_4 0.25%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%。

所用试剂均为国产分析纯,酵母膏、琼脂为国产生物级试剂。

1.1.3 仪器及设备

SW-CJ-F 型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;

收稿日期:2008-01-20;修回日期:2008-03-06

基金项目:国家发改委高技术产业化示范项目资助([2004]2077)

作者简介:张红梅(1981-),女,在读硕士生, E-mail: zhanghongmei162

@sohu.com; * 通讯作者: E-mail: xian@xj.cninfo.net。