

Ca²⁺对悬浮培养半夏类原球茎生长及次生代谢物累积的影响

邢建永, 王康才*, 汤兴利, 刘海琴

南京农业大学中药材研究所, 江苏 南京 210095

摘要:目的 研究 Ca²⁺对半夏类原球茎生长、高温胁迫及次生代谢产物量的影响。方法 以半夏叶柄为外植体, 固体培养基培养获得类原球茎, 悬浮培养, 采用不同质量浓度 Ca²⁺处理, 测定类原球茎生长速率、抗逆性指标, 以及生物碱、鸟苷、有机酸的量。结果 在 (25±2) °C 条件下培养, 随 Ca²⁺质量浓度增加, 半夏类原球茎生长呈慢-快-慢变化趋势, 质量浓度为 440 mg/L 时, 生长速率达到最大值; 不同处理半夏类原球茎中生物碱、鸟苷、有机酸量差异显著, Ca²⁺质量浓度为 440 mg/L 时, 生物碱量最高 (0.158%), Ca²⁺质量浓度为 660 mg/L 时, 鸟苷、有机酸累积量最高 (分别为 0.017 3%、0.608%)。在 (35±2) °C 条件下, 质量浓度为 0~660 mg/L, 随 Ca²⁺质量浓度升高, SOD、POD 活性逐渐增强, Ca²⁺质量浓度为 660 mg/L 时, 活性最高, 但 Ca²⁺质量浓度为 880 mg/L 时, SOD、POD 活性均降低; 不同质量浓度 Ca²⁺处理 MDA 量变化不显著。结论 一定质量浓度的 Ca²⁺能促进半夏类原球茎生长, 增强抗逆性, 提高有用次生代谢产物的量。

关键词: 半夏; 悬浮培养; 抗氧化酶; 鸟苷; 总生物碱; 总有机酸

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)02-0376-04

Effect of Ca²⁺ on growth in protocorm-like bodies of *Pinellia ternata* and accumulation of secondary metabolites during suspension culture

XING Jian-yong, WANG Kang-cai, TANG Xing-li, LIU Hai-qin

College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; suspension culture; antioxidant enzymes; guanosine; total alkaloids; total free organic acid

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎, 是一种重要的传统药材, 主要含有生物碱、游离有机酸、甾醇、蛋白、氨基酸、挥发油、无机元素等多种成分^[1]。现代药理研究表明, 半夏中的生物碱具有镇痛、抗心律失常、抗血栓、抗肿瘤和提高记忆的功效^[2]; 游离有机酸具有止咳、祛痰、体外抑制肿瘤细胞的作用^[3]; 鸟苷参与 DNA 代谢过程, 具有抗肿瘤、抗病毒、基因治疗等多种生物活性。目前关于半夏愈伤组织和丛生芽诱导与增殖的研究报道较多^[4], 但关于半夏类原球茎悬浮培养和次生代谢产物形成的培养条件的研究较少。在生产中, 半夏遇高温胁迫, 引起倒苗, 在组织培养过程中, 半夏再生组织是否也有此生理现象, 未见报道。钙作为植物生长不可缺少的矿质元素, 对药用植物的生长和次生代谢物的积累具有很大影响^[5], 钙作为偶联胞外信号与胞内生理生化的第二信使, 能提高植物的抗逆性。为此,

本研究实验研究悬浮培养过程中, Ca²⁺对半夏类原球茎生长、总生物碱、鸟苷和总游离有机酸的量及相关抗性指标的影响, 以期半夏快繁及田间生产提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

半夏栽培于南京农业大学实验大棚内, 经南京农业大学中药材研究所王康才教授鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.。将半夏幼嫩叶柄在 MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L + Suc 3.0%+Agar 0.6%的固体培养基上诱导出类原球茎, 继代培养 3~4 代, 获得生长均一、颜色质地一致的一类原球茎, 作为供试样品。

1.2 仪器与试剂

安捷伦高效液相色谱仪 (LC1120), PHS—3C 型酸度计 (上海康仪仪器有限公司), RE—52A 型旋转蒸发器。KQ—250B 型超声仪 (昆山市超声仪器

收稿日期: 2010-04-14

基金项目: 江苏省科技厅农业高技术研究 (Q200754)

作者简介: 邢建永 (1985—), 男, 河北衡水人, 在读硕士研究生, 研究方向为药用植物栽培与生理。E-mail: 2008104135@njau.edu.cn

*通讯作者 王康才 E-mail: wangkc@njau.edu.cn

有限公司), Centrifuge5810R 型离心机(Eppendorf)。

邻苯二甲酸氢钾、碳酸钠、氯仿、浓氨水、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 5.4), 乙腈为色谱纯, 水为双蒸水。

对照品: 琥珀酸 (国药集团化学试剂公司, 质量分数 >99.5%); 鸟嘌呤核苷 (Sigma, 质量分数 >99%); 盐酸麻黄碱 (批号 0714-9903) 由中国生物制品检定所提供。

1.3 方法

1.3.1 半夏类原球茎悬浮培养条件与处理 采用 MS+6-BA 1.0 mg/L+2, 4-D 0.5 mg/L+Suc 3.0% 液体培养基, pH 5.8, 装于 50 mL 三角瓶中。采用 0、220、440、660、880 mg/L Ca²⁺ 培养液处理。每瓶接种 0.5 g 原球茎, 在摇床转速 100 r/min, (25±2)°C, 1 500~2 000 lx, 12 h/d 光照条件下, 培养 30 d 后, 取样测定类原球茎生长速率、总生物碱、鸟苷、总游离有机酸量。每个处理重复 3 次。

1.3.2 不同质量浓度 Ca²⁺ 培养半夏类原球茎高温胁迫试验 处理温度为 (35±2)°C, 其他培养条件同上。悬浮培养 30 d 后, 参照文献方法^[6], 测定类原球茎鲜品 SOD、POD、MDA 及脯氨酸量。

1.3.3 半夏类原球茎生长速率测定 悬浮培养 30 d 后, 取出类原球茎, 称其质量, 计算类原球茎的生长速率 (GR): $GR = (W - W_0) / (W_0 \times D)$ ^[7]。式中 W 为收获的小块茎鲜质量, W_0 为接种的类原球茎鲜质量, D 为培养时间。

1.3.4 半夏类原球茎化学成分指标测定 半夏类原球茎悬浮培养 30 d 后, 105 °C 杀青 10 min, 60 °C 烘干至质量无变化, 打粉过 60 目筛, 测定总生物碱、鸟苷、总游离有机酸量。

(1) 总生物碱量测定: 参照于超等^[8]的可见紫外分光光度法。以盐酸麻黄碱质量浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 进行线性回归, 方程为 $Y = 0.0577X - 0.0057$, $r = 0.9998$ 。表明盐酸麻黄碱溶液在 2.60~13.00 μg/mL 呈良好的线性关系。

(2) 鸟苷的测定: 采用超声提取法。水提取 3 次, 每次 10 mL, 提取 30 min, 3 500 r/min 离心 15 min, 合并上清液, 浓缩后定容到 10 mL 量瓶待测。采用 RP-HPLC 法测定, 安捷伦高效液相色谱仪 (LC1120), 色谱条件: C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (3:97), 检测波长为 254 nm。色谱图见图 1。

(3) 有机酸测定: 参考 2010 年版《中国药典》^[9]

半夏总游离有机酸测定方法。

2 结果与分析

2.1 Ca²⁺ 对半夏类原球茎生长速率的影响

由表 1 可看出, 半夏类原球茎悬浮培养生长速率随 Ca²⁺ 质量浓度的升高呈先升后降趋势, Ca²⁺ 质量浓度过高或过低均不利于半夏类原球茎的生长。Ca²⁺ 质量浓度为 440 mg/L 时, 半夏类原球茎收获鲜质量最大, 生长速率达到最大值。

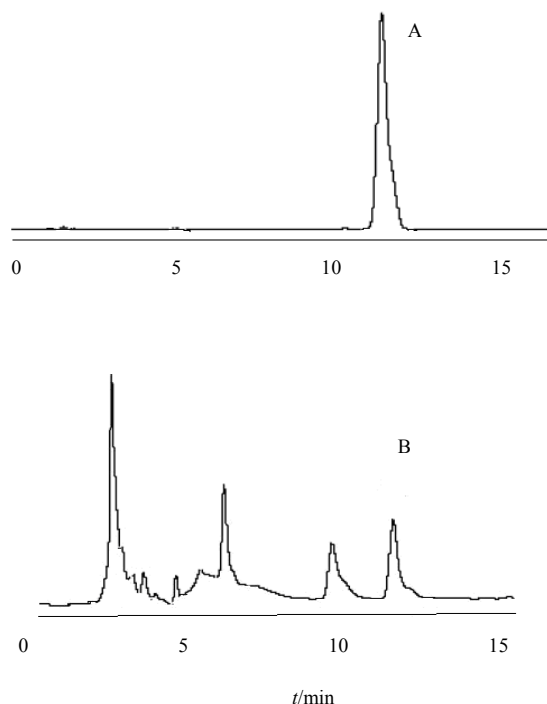


图 1 鸟苷对照品 (A) 与样品 (B) 的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of guanosine reference substance (A) and sample (B)

表 1 不同质量浓度 Ca²⁺ 处理对半夏类原球茎生长速率的影响 (n=3)

Table 1 Effect of different Ca²⁺ concentrations on growth rate of PLBs (n=3)

Ca ²⁺ / (mg·L ⁻¹)	接种鲜质量/g	收获鲜质量/g	生长速率/ (g·d ⁻¹)
0	0.50	6.757±0.425 c	0.417±0.028 c
220	0.50	7.220±0.427 c	0.448±0.028 c
440	0.49	13.267±0.493 a	0.869±0.034 a
660	0.49	10.167±0.370 b	0.658±0.025 b
880	0.51	7.110±0.133 c	0.431±0.008 c

不同小写字母表示差异显著 (P<0.05), 下同

Figures followed by different low case letters in each column are significantly different (P<0.05), same as follow

2.2 不同质量浓度 Ca^{2+} 处理与高温胁迫相关生理指标的关系

由表 2 可看出, Ca^{2+} 对半夏类原球茎 SOD、POD 酶活性影响显著。 Ca^{2+} 质量浓度为 660 mg/L 的处理, SOD、POD 酶活性最大, 分别为 82.375 U/g、57.311 $\Delta A_{470}/(\text{g}\cdot\text{min}^{-1})$, Ca^{2+} 质量浓度为 0 mg/L 时, POD 活性最低, 在 0~660 mg/L 时, POD 活性随 Ca^{2+} 质量浓度升高而增大; 当质量浓度超过 660 mg/L 时, POD 活性降低。 Ca^{2+} 为 220~880 mg/L 的处理 MDA 量均低于 Ca^{2+} 质量浓度为 0 mg/L 的处理, Ca^{2+} 质量浓度为 440~880 mg/L 时, 脯氨酸量显著高于低质量浓度的处理, 说明一定质量浓度的 Ca^{2+} 能提高半夏抗逆性。

表 2 Ca^{2+} 对半夏类原球茎 SOD、POD、MDA 及脯氨酸的影响 ($n=3$)

Table 2 Effects of different Ca^{2+} concentrations on SOD, POD, MDA, and proline of PLBs ($n=3$)

Ca^{2+} 质量浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	SOD 活性/($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	POD 活性/($\Delta A_{470}/(\text{g}\cdot\text{min}^{-1})$)	MDA/($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	脯氨酸/%
0	30.575±0.043 c	11.144±0.387 d	4.807±0.223 a	0.001 26±0.000 85 b
220	29.195±0.055 d	20.233±0.971 c	3.396±0.654 a	0.001 60±0.000 83 b
440	75.632±0.638 b	32.389±0.868 b	3.968±0.098 a	0.002 94±0.000 41 a
660	82.375±0.072 a	57.311±5.274 a	3.821±0.431 a	0.003 15±0.000 24 a
880	17.686±0.066 e	37.200±2.137 b	3.718±0.425 a	0.002 81±0.000 64 a

表 3 Ca^{2+} 对半夏类原球茎中鸟苷、有机酸及生物碱量的影响 ($n=3$)

Table 3 Effects of different Ca^{2+} concentrations on guanosine, total free organic acid, and alkaloids of PLBs ($n=3$)

$\text{Ca}^{2+}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	总生物碱/%	鸟苷/%	总有机酸/%
0	0.123±0.000 4 c	0.015 3±0.000 6 ab	0.528±0.001 c
220	0.116±0.001 7 c	0.015 9±0.000 5 ab	0.555±0.003 b
440	0.158±0.002 7 a	0.013 8±0.001 9 b	0.471±0.001 d
660	0.132±0.003 1 b	0.017 3±0.000 9 a	0.608±0.002 a
880	0.122±0.000 1 c	0.014 4±0.000 5 b	0.391±0.007 e

表明, 在一定质量浓度范围内, Ca^{2+} 能够促进半夏类原球茎生物量的累积。过低或过高的 Ca^{2+} 均不利于半夏类原球茎的生长。与范美华等^[10]的实验结果相似。缺钙时, 可能影响半夏类原球茎细胞纺锤体和细胞壁的形成, 抑制细胞分裂, 其生物量的累积受到影响; Ca^{2+} 质量浓度过高时, 对半夏类原球茎形成盐胁迫, 同样不利于细胞的生长。

3.2 Ca^{2+} 处理与高温胁迫相关生理指标的关系

高温胁迫时, 植物体内会产生大量自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 等, 通过 Haber-Weiss 反应和 Fenton 反应等途径最终诱发膜脂过氧化反应, 破坏细胞膜系统的结构, 影响细胞的正常代谢, 使植物细胞受害, 最终导致植物体受害。在长期进化过程中, 植物细胞内

2.3 不同质量浓度 Ca^{2+} 处理对半夏类原球茎次生代谢产物的影响

不同质量浓度 Ca^{2+} 处理, 对半夏类原球茎中鸟苷、有机酸及生物碱量的影响效果显著。当 Ca^{2+} 质量浓度为 440 mg/L 时, 总生物碱量高, 达到 0.158%。 Ca^{2+} 质量浓度过高或过低, 均不利于总生物碱的积累。不同质量浓度 Ca^{2+} 处理, 对半夏类原球茎鸟苷、有机酸的积累也有显著影响, Ca^{2+} 质量浓度为 660 mg/L 时, 鸟苷、有机酸累积量最高, 分别为 0.017 3%、0.608% (表 3)。

3 讨论

3.1 Ca^{2+} 与半夏类原球茎生物量累积的关系

钙是生物体不可或缺的重要元素, 本研究结果

形成防御活性氧、自由基毒害的保护机制^[11], SOD、CAT 和 POD 等是活性氧清除酶系统的重要保护酶。脯氨酸是膜保护物质, 有利于植物在高温胁迫下维持细胞的结构与功能。MDA 是植物在逆境条件下发生膜脂过氧化作用的产物之一, 作为膜质过氧化指标, 其大小表示细胞膜过氧化程度和植物对逆境条件反应的强弱。研究表明, 外源钙能减轻环境胁迫, 如干旱、高温、低温等对细胞膜的伤害, 提高植物的抗性^[12-13]。Gong 等^[14]用 Ca^{2+} 处理玉米种子, 可提高玉米的抗热性, 认为是 Ca^{2+} 通过钙信使系统增强了 SOD 活性, 增强玉米幼苗的抗热性。De 等^[15]认为逆境下钙信使系统提高脯氨酸合成酶的活性, 促进脯氨酸合成。本研究结果表明, 在一

定质量浓度范围内, Ca^{2+} 能够提高半夏类原球茎 SOD、POD 的活性以及脯氨酸量并可以降低 MDA 量, 表明 Ca^{2+} 能够提高半夏类原球茎的抗氧化性, 提高其抗逆性。根据本研究结果, 半夏类原球茎悬浮培养液中 Ca^{2+} 质量浓度为 440~660 mg/L 时, 效果较理想。本研究同时也提示, 在大田生产中, 施用 Ca^{2+} 处理, 对解决半夏高温胁迫倒苗问题可能有益。

3.3 Ca^{2+} 对半夏类原球茎次生代谢的影响

本研究结果表明, 钙盐对总生物碱的合成具有显著影响, 过高或过低都不利于总生物碱的合成, 这与 Ca^{2+} 对水母雪莲悬浮培养细胞黄酮积累的结果相似^[16]。可能是钙对细胞代谢的调节机制, 影响了合成生物碱的某些关键酶的活性, 从而影响总生物碱的合成。

植物体中的有机酸是一类重要的金属螯合物, 可与 Ca^{2+} 结合为不溶性的钙盐(如草酸钙、柠檬酸钙), 如半夏药材中草酸钙以针晶形式存在。在高质量浓度 Ca^{2+} 处理条件下, 半夏类原球茎总游离有机酸量相对较低, 可能与类原球茎体内草酸钙的累积有关。 Ca^{2+} 对半夏鸟苷的合成有一定影响, 可能与 Ca^{2+} 影响了鸟苷合成过程中某些酶的活性有关, 其具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 吴皓, 张科卫, 李伟, 等. 半夏的化学成分研究 [J]. 中草药, 2003, 34(7): 593-594.
[2] 王志强. 天南星化学成分与药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 144-149.
[3] 张科卫, 吴皓, 沈绣红. 半夏中总游离有机酸的作用研究 [J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2001, 17(3): 159-161.

[4] 杨磊, 罗庆云, 王康才, 等. 锌对半夏叶片碳氮代谢及产量的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 278-280.
[5] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
[6] 韩建萍, 梁宗锁, 王敬民. 矿质元素与根类中草药根系生长发育及有效成分积累的关系 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(1): 78-82.
[7] 刘永红, 梁宗锁, 杨东风, 等. 半夏小块茎悬浮培养及其生物碱类化合物的测定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(11): 169-173.
[8] 于超, 张明, 王宇, 等. 栽培、野生及不同产地半夏总生物碱测定 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 583-584.
[9] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[10] 范美华, 周吉源. 不同培养条件对半夏悬浮细胞生长及总生物碱形成的影响 [J]. 云南植物研究, 2004, 26(6): 656-660.
[11] 段咏新, 李松泉, 傅家瑞, 等. 钙对延长杂交水稻叶片衰老的作用机理 [J]. 杂交水稻, 1997, 12(6): 23-25.
[12] 卢少云, 黎用朝, 郭振飞, 等. 钙提高水稻幼苗抗旱性研究 [J]. 中国水稻科学, 1999, 13(3): 161-164.
[13] 张宗胜, 王建波. 外源钙离子和 EGTA 处理对辣椒叶片热激反应的影响 [J]. 武汉大学学报, 2000, 6(2): 253-256.
[14] Gong M, Li Z G. Calmodulin-binding protein from *Zea mays* germs [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(5): 1335-1339.
[15] De B, Bhattacharjes S, Mukherjee A K. Short term heat shock and cold shock induced proline accumulation relation to calcium involvement in *Lycopersicon esculentum* cultured cells and seedlings [J]. *India J Plant Physiol*, 1996, 14(1): 32-35.
[16] 赵德修, 李茂寅. 培养基及其组成对水母雪莲悬浮细胞生长及黄酮形成的影响 [J]. 生物工程学报, 2000, 16(1): 99-102.