

水杨酸和茉莉酸甲酯对远志愈伤组织生长和相关酶活性及化学成分的影响

李 洁, 胡本祥*, 彭 亮*, 杨冰月, 罗 露, 曹福麟, 颜永刚, 张 岗

陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

摘 要: 目的 研究水杨酸(salicylic acid, SA)和茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)对远志愈伤组织生长和相关酶活性及化学成分的影响。方法 以远志继代愈伤组织为材料,加入 SA (0、4、8、12、16、20、24、28、32 mg/L)和 MeJA (0、100、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$)不同浓度下暗培养 30 d 后,测定远志愈伤组织生长量、丙二醛(MDA)含量、抗氧化酶活性、总酚、总黄酮含量及远志卟酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量。结果 MeJA 对远志愈伤组织的生长具有抑制作用,12 mg/L 水杨酸(SA)对远志愈伤组织的生长具有促进作用。SA 和 MeJA 对远志愈伤组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性及丙二醛(MDA)含量均具有促进作用,且随着 SA 和 MeJA 浓度的增大,SOD、CAT、POD 活性先上升后下降,MDA 含量持续上升。SA 质量浓度为 20 mg/L 时,CAT、SOD 活性达到最大值,分别为 248.45、4 451.06 U/mg,SA 质量浓度为 16 mg/L 时,POD 活性达到最大值,为 7.22 U/mg;SA 质量浓度为 32 mg/L 时,MDA 含量达到最大值,为 25.09 nmol/mg;MeJA 浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时,CAT、SOD、POD 活性达到最大值,分别为 273.30、1 451.06、15.27 U/mg;MeJA 浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,MDA 含量达到最大值,为 27.10 nmol/mg。SA 对远志愈伤组织中总黄酮的积累具有抑制作用,对总酚无显著影响;MeJA 对远志愈伤组织中总酚、总黄酮的积累具有促进作用,MeJA 浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时,总黄酮含量最高;MeJA 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,总酚含量最高。SA 和 MeJA 均对远志愈伤组织中远志卟酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖的积累具有促进作用,SA 浓度为 32 mg/L 时,远志卟酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量最高;MeJA 浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时远志卟酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量最高。结论 MeJA 对远志愈伤组织生长具有抑制作用,12 mg/L 的 SA 对其具有促进作用。SA 和 MeJA 对 SOD、POD、CAT 活性,MDA 含量及远志卟酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖的积累均具有促进作用。SA 对远志愈伤组织中总黄酮的积累具有抑制作用,对总酚无显著影响,MeJA 对远志愈伤组织中总酚、总黄酮的积累具有促进作用。

关键词: 远志; 水杨酸; 茉莉酸甲酯; 抗氧化活性; 总酚; 总黄酮; 远志卟酮 III; 3,6'-二芥子酰基蔗糖

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)12-2976-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.034

Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on growth, activity of related enzymes and chemical components in *Polygala tenuifolia* Willd.

LI Jie, HU Ben-xiang, PENG Liang, YANG Bing-yue, LUO Lu, CAO Fu-lin, YAN Yong-gang, ZHANG Gang
Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To study the effects of salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MeJA) on growth, activity of related enzymes and chemical components in *Polygala* callus. **Methods** The callus of *Polygala* was used as material. After 30 d of dark culture at different concentrations of SA (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 mg/L) and MeJA (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1 000 $\mu\text{mol/L}$), the growth of callus, anti-oxidant enzyme activity, the content of MDA, total phenolic, total flavonoid, polygalaxanthone III, and 3,6'-disinapoyl sucrose were determined. **Results** MeJA inhibited the growth of *Polygala* callus, and 12 mg/L SA promoted the growth of *Polygala* callus. SA and MeJA promoted the activity of SOD, CAT, POD, and MDA in the callus of *Polygala*. With the increase of SA and MeJA concentration, the activities of SOD, CAT and POD increased first and then decreased, and the content of MDA continued to rise. When the concentration of SA was 20 mg/L, the activities of CAT and SOD reached the maximum, which were 248.45 U/mg and 4451.06 U/mg, respectively. When the concentration of SA was 16 mg/L, the activity of POD reached the maximum, which was 7.22 U/mg. When the concentration of SA was 32 mg/L, the MDA content reached the maximum value of 25.09 nmol/mg. When the concentration

收稿日期: 2018-11-06

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-QIN-36: 202410001); 公益性行业(中医药)科研专项经费项(201507002-1-08)

作者简介: 李 洁, 女, 陕西中医药大学在读研究生, 研究方向为中药质量控制标准研究。E-mail: 1822780478@qq.com

*通信作者 胡本祥, 男, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药质量控制标准研究。E-mail: hbx800823@126.com

彭 亮, 男, 副教授, 主要从事中药资源与评价以及中药材质量控制标准研究。E-mail: ppengliang@126.com

of MeJA was 600 $\mu\text{mol/L}$, the activities of CAT, SOD, and POD reached the maximum, which were 273.30, 1451.06 and 15.27 U/mg, respectively. When the concentration of MeJA was 1000 $\mu\text{mol/L}$, the MDA content reached the maximum value of 27.10 nmol/mg. SA inhibited the accumulation of total flavonoids in *Polygala* callus, and had no significant effect on total phenols. MeJA promoted the accumulation of total phenols and total flavonoids in *Polygala* callus. When MeJA concentration was 600 $\mu\text{mol/L}$, the content of total flavonoids was the highest. When the concentration of MeJA was 400 $\mu\text{mol/L}$, the total phenolic content was the highest. Both SA and MeJA promoted the accumulation of polygalaxanthone III and 3,6'-disinapoyl sucrose in *Polygala* callus. When the concentration of SA was 32 mg/L, the concentration of polygalaxanthone III, 3,6'-disinapoyl sucrose was the highest. When the concentration of MeJA was 1 000 $\mu\text{mol/L}$, the content of polygalaxanthone III, 3,6'-disinapoyl sucrose was the highest. **Conclusion** MeJA had an inhibitory effect on the growth of *Polygala* callus, and 12 mg/L SA can promote this effect. SA and MeJA promoted the activity of SOD, POD, CAT, the content of MDA and the accumulation of polygalaxanthone III and 3,6'-disinapoyl sucrose in *Polygala* callus. SA inhibited the accumulation of total flavonoids in *Polygala* callus, and had no significant effect on total phenolics. MeJA promoted the accumulation of total phenolics and total flavonoids in *Polygala* callus.

Key words: *Polygala tenuifolia* Willd.; salicylic acid; methyl jasmonate; antioxidant activity; total phenols; total flavonoids; polygalaxanthone III; 3,6'-disinapoyl sucrose

远志来源于远志科 (Polygalaceae) 远志属 *Polygala* Linn. 植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *Polygala sibirica* L. 的干燥根。具有安神益智、祛痰消肿的功效, 临床主要用于心肾不交、失眠多梦等症^[1]。远志主要分布在中国西北、华北和东北地区, 陕西、山西为其栽培的主产区^[2]。远志作为我国的常用中药, 其市场需求量日益增大, 而近年来, 远志种植过程中存在种质资源不清、根腐病等问题, 使得远志栽培面积锐减, 主产区远志原材料品质下降^[3], 影响远志的可持续发展。植物组织培养技术能够以少量的材料, 在短时间内进行大量愈伤组织诱导且不受环境影响^[4], 目前已应用于多种植物的快速繁殖中, 如白及^[5]、黄精^[6]等。

在植物组织培养过程中加入不同种类诱导子来提高药用植物次生代谢产物或有效成分的含量已成功应用于雷公藤^[7]、黄芪^[8]等多种中药材中。水杨酸 (SA) 和茉莉酸甲酯 (MeJA) 作为非生物诱导子^[9], 在植物次生代谢过程中以特定的生化信号快速地、选择性地诱导特定基因表达, 调节植物细胞的次生代谢产物合成^[10-12], 其在黄芩^[13]、北沙参^[14]、三七^[15]等多种药用植物次生代谢产物的诱导中得以应用。本实验以远志继代愈伤组织为材料, 添加不同浓度 SA 和 MeJA 进行处理, 探讨 SA 和 MeJA 对远志愈伤组织生长、丙二醛 (MDA) 含量、抗氧化酶活性、总酚、总黄酮含量及远志呋酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量的影响, 为远志愈伤组织的优良品系培养及次生代谢产物的生产提供一定的参考数据。

1 材料与仪器

1.1 材料

MS 基本培养基 (北京康倍斯科技有限公司,

批号 B0017K0315008); 2,4-D、6-BA、NAA (上海蓝季生物有限公司, 批号分别为 B00009、B00004、B00008); SA (源叶生物科技有限公司, 批号 Z22J9Y64166); MeJA (Sigma-Aldrich 公司, 批号 392707); 对照品远志呋酮 III (批号 201504, 质量分数 $\geq 98\%$)、3,6'-二芥子酰基蔗糖 (批号 160506, 质量分数 $\geq 98\%$) 均购于中国食品药品检定研究院; 色谱级乙腈 (赛默飞世尔科技有限公司); 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 蛋白定量、总超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、MDA 试剂盒, 购于南京建成生物工程研究所。

远志种子采集于陕西省淳化县远志规范化栽培基地, 经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定为远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的种子。

1.2 仪器

生化培养箱 (上海跃进医疗器械有限公司); SW-CJ-1FD 洁净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); GR60DA 型立式自动压力蒸汽灭菌器 (厦门致微仪器有限公司); FA2104 型电子分析天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司); Waterse-2695 高效液相色谱仪; 色谱柱 Agilent 5 TC-C18 (2); 检测器 (Waters 2998 PDA Detector); KQ-200DE 型数控超声波清洗器; Waters-CERTIFIED 液相小瓶; 移液枪; 0.22 μm 微孔滤膜; 1 000 mL 过滤装置。

2 方法

2.1 远志愈伤组织培养

选取优质饱满、大小基本一致的远志种子, 轻轻揉搓掉其种子表层的细小绒毛, 无菌水浸泡 6 h, 将浸泡好的种子置于无菌操作台上用 10% H_2O_2 处

理 10 min, 无菌水洗后吸干其表面水分, 接种于不添加任何激素的 MS 固体培养基中, 于光照强度 2 000 lx, 光照条件 12 h/d 的 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中培养, 待无菌培养至苗高 7~8 cm 时, 选择生长旺盛的远志无菌苗, 于洁净操作台中将叶片切为 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 的方块接种于 MS+2,4-D 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.5 mg/L 激素配比的培养基中, 于温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 湿度保持在 60%~70% 的黑暗条件下诱导培养 20 d, 将获得的远志愈伤组织继代培养 2 次后, 作为本实验的实验材料。

2.2 SA 诱导处理远志愈伤组织

定量称取新鲜的远志愈伤组织, 接种至添加质量浓度为 0、4、8、12、16、20、24、28、32 mg/L SA 的培养基中 (培养基配方为 MS+2,4-D 3.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+琼脂 7 g/L+蔗糖 30 g/L), 25°C 暗培养 30 d, 每个质量浓度设置 3 个重复。

2.3 MeJA 诱导处理远志愈伤组织

定量称取新鲜的远志愈伤组织, 接种至添加浓度为 0、100、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 的培养基中 (培养基配方同“2.2”项), 25°C 暗培养 30 d, 每个摩尔浓度设置 3 个重复。

2.4 远志愈伤组织生长量的测定

将经 SA 和 MeJA 诱导培养 30 d 的远志愈伤组织从培养瓶中取出, 洗净后用滤纸吸去表面水分, 称其愈伤组织质量记为鲜质量, 于 40°C 烘箱中烘至恒定质量, 称其质量记为干质量。分别以 SA 和 MeJA 浓度为横坐标, 远志愈伤组织生长鲜质量和干质量为纵坐标, 绘制远志愈伤组织生长曲线。

2.5 抗氧化酶活性测定

SOD 活性测定采用羟胺法, POD 活性测定采用愈创木酚法, CAT 活性测定采用可见光法, MDA 含量测定采用 TBA 法, 具体操作方法参照试剂盒说明书。

2.6 总黄酮的测定

2.6.1 供试品溶液的制备 取愈伤组织于 40°C 烘箱中烘至恒定质量, 研细, 过 40 目筛, 精确称取 0.1 g 至具塞三角瓶中, 精密加入 75%乙醇 5 mL, 浸泡 30 min 后超声处理 45 min, 滤过。滤渣中精密加入 3 mL 75%乙醇超声 30 min, 滤过。合并 2 次滤液, 至 10 mL 量瓶中, 用 75%乙醇定容, 备用。

2.6.2 对照品溶液的制备 以芦丁为对照品。精密称取芦丁对照品 3.32 mg, 用 75%乙醇溶解并定容

至 10 mL 量瓶中, 得质量浓度为 0.332 mg/mL 的芦丁对照品溶液。

2.6.3 标准曲线的绘制 取上述芦丁对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置于 10 mL 的离心管中, 加 75%乙醇至 2.6 mL, 加 5%亚硝酸钠溶液 0.6 mL, 混匀, 放置 6 min, 加 10%硝酸铝溶液 0.6 mL, 混匀, 放置 6 min, 加 4%氢氧化钠溶液 2.1 mL, 摇匀, 放置 20 min, 在 420 nm 处测定吸光度 (A) 值, 以 A 值为纵坐标 (Y), 以芦丁质量浓度为横坐标 (X), 绘制芦丁标准曲线方程为 $Y=9.8415X+0.0061$, $r=0.9993$ 。

2.6.4 样品测定 取“2.6.1”项下所得的供试品溶液 2.6 mL 于 10 mL 离心管中, 按“2.6.3”项下芦丁对照品溶液测定方法测定供试品 A 值, 计算总黄酮含量。

2.7 总酚的测定

2.7.1 供试品溶液的制备 同“2.6.1”项下方法。

2.7.2 对照品溶液的制备 以没食子酸为对照品。精密称取没食子酸对照品 4.64 mg, 用 75%乙醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 得质量浓度为 0.928 mg/mL 的没食子酸对照品溶液。

2.7.3 标准曲线的绘制 取上述没食子酸对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用 75%乙醇定容。分别取不同浓度的没食子酸对照品溶液 0.2 mL, 于 10 mL 的离心管中, 分别加入 3.8 mL 纯净水、1 mL 的 1 mol/L 福林酚试剂, 静置 30 s, 再加 3 mL 的 5% NaCO_3 溶液, 混匀, 40°C 恒温水浴 1 h, 摇匀, 于 765 nm 处测定 A 值, 以 A 值为纵坐标 (Y), 以没食子酸质量浓度为横坐标 (X), 绘制没食子酸标准曲线方程为 $Y=129.27X-0.001$, $r=0.9998$ 。

2.7.4 样品测定 取“2.7.1”项下所得的供试品溶液 0.2 mL 于 10 mL 离心管中, 按“2.7.3”项下没食子酸对照品溶液测定方法测定供试品 A 值, 计算总酚含量。

2.8 远志呋酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量测定

2.8.1 供试品溶液的制备 取愈伤组织于 40°C 烘箱中烘至恒定质量, 研细, 过 40 目筛, 精密称取 0.100 g, 置于 4 mL 离心管中, 精密加入 70%甲醇 3 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 待冷却至室温后再次称定质量并补足减失的质量, 摇匀, 离心 10 min, 上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即为供试品溶液。

2.8.2 对照品溶液的制备 精密称取远志呋喃 III 对照品 2.0 mg、3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品 3.3 mg，加甲醇制成质量浓度分别为 0.2、0.33 mg/mL 的远志呋喃 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖混合对照品溶液。

2.8.3 色谱条件 乙腈-0.05%磷酸水溶液(20:80)为流动相，等度洗脱，体积流量 1.0 mL/min，检测波长 316 nm，柱温 30 ℃，运行时间 30 min，色谱图见图 1。

2.8.4 标准曲线的绘制 取“2.8.2”项下混合对照储备液，在“2.8.3”项色谱条件下，以进样量为 1、2、4、6、8、10 μL 进行测定，以峰面积(Y)对进样量(X)作标准曲线，计算回归方程，远志呋喃 III 为 $Y=846\,871\,808.2X-3\,020.978\,1$, $r=0.999\,6$; 3,6'-二芥子酰基蔗糖为 $Y=5\,700\,132\,902.0X-18\,210.608\,2$, $r=0.999\,3$ 。

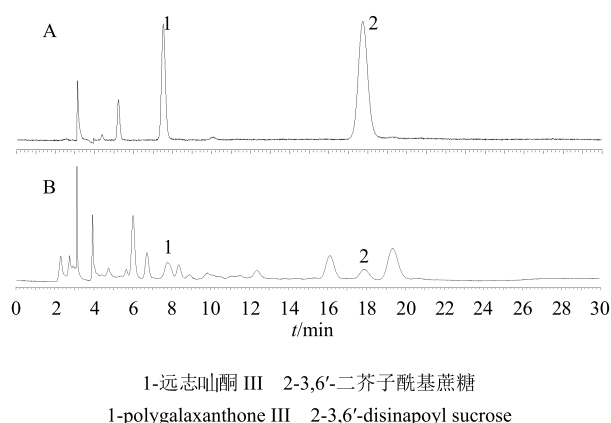


图 1 对照品 (A) 及样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substance (A) and sample (B)

2.9 数据处理与分析

采用 Microsoft excel 2013 软件对数据处理，SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析，Original 8.0 绘制相应的图表。

3 结果与分析

3.1 SA 和 MeJA 对远志愈伤组织生长的影响

不同浓度 SA 与 MeJA 对远志愈伤组织生长量的影响见表 1。由表 1 可知，远志愈伤组织接种于添加不同质量浓度 SA 或 MeJA 的培养基上培养 30 d 后，其生长量都有不同程度的增加。与对照组相比，当 SA 质量浓度为 12 mg/L 时远志愈伤组织鲜质量和干质量达到最大值，分别为 2.736 7、0.122 8 g，显著高于对照组的鲜质量和干质量，说明质量浓度为 SA 12 mg/L 对远志愈伤组织生长表现出促进作用。远志愈伤组织接种于添加不同质量浓度 MeJA 的培养基上培养 30 d 后，其鲜质量和干质量虽有增加，但均显著低于不加 MeJA 的对照组，说明 MeJA 对远志愈伤组织生长具有抑制作用。

3.2 SA 和 MeJA 对远志愈伤组织中抗氧化酶活性及 MDA 含量的影响

不同浓度 SA 和 MeJA 对远志愈伤组织中 SOD、POD、CAT 活性及 MDA 含量的影响见图 2，图中同一条线上不同字母分别表示差异显著 ($P<0.05$)。由图 2 可知，随着 SA 和 MeJA 浓度的增大，SOD、POD、CAT 活性整体上均呈先上升后下降的趋势，且均高于对照组。当 SA 质量浓度为 20 mg/L 时，CAT、SOD 活性达到最大值，分别为 248.45、4 451.06 U/mg，是对照组的 2.43、4.90 倍，当 SA 质量浓度为 16 mg/L 时，POD 活性达到最大值，为 7.22 U/mg，是对照组的 8.20 倍。

表 1 SA 和 MeJA 对远志愈伤组织生长量的影响

Table 1 Effect of different concentrations of SA and MeJA on growth of *Polygala callus*

SA/(mg·L ⁻¹)	鲜质量/g	干质量/g	MeJA/(μmol·L ⁻¹)	鲜质量/g	干质量/g
0	2.420 0±0.030 0 ^b	0.107 2±0.002 5 ^b	0	2.420 0±0.030 0 ^a	0.107 2±0.002 5 ^a
4	1.896 7±0.075 7 ^d	0.088 4±0.005 3 ^c	100	1.223 3±0.015 3 ^b	0.064 1±0.008 5 ^b
8	1.650 0±0.043 6 ^f	0.077 4±0.006 4 ^f	200	1.050 0±0.026 5 ^c	0.051 2±0.004 8 ^b
12	2.736 7±0.050 3 ^a	0.122 8±0.002 1 ^a	400	1.006 7±0.050 3 ^{cd}	0.051 1±0.008 3 ^b
16	1.960 0±0.052 9 ^d	0.085 4±0.007 9 ^d	600	1.023 3±0.023 1 ^{cd}	0.049 2±0.007 9 ^b
20	1.983 3±0.051 3 ^c	0.082 0±0.004 3 ^c	800	0.990 0±0.065 6 ^b	0.056 9±0.007 3 ^b
24	1.906 7±0.080 8 ^e	0.082 9±0.005 3 ^e	1 000	0.940 0±0.045 8 ^d	0.049 1±0.005 5 ^b
28	1.936 7±0.050 3 ^d	0.086 5±0.050 3 ^d	—	—	—
32	2.146 7±0.046 2 ^c	0.089 6±0.003 7 ^c	—	—	—

同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)

Different lowercase within the column indicate significant differences between treatments ($P<0.05$)

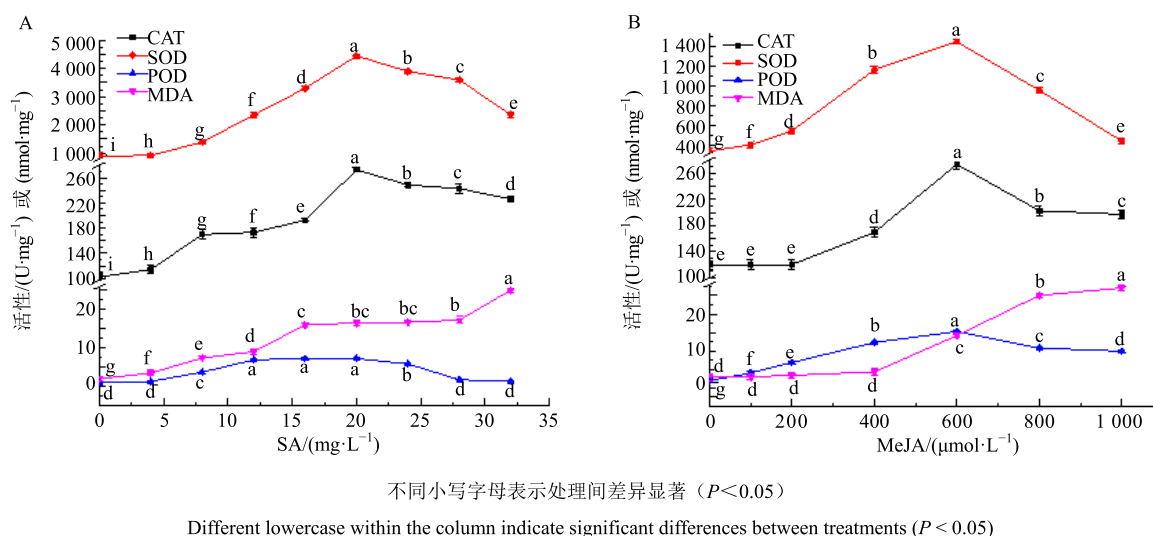


图 2 不同浓度 SA (A) 和 MeJA (B) 对远志愈伤组织 SOD、POD、CAT 活性及 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of SA (A) and MeJA (B) on activities of SOD, POD, and CAT and content of MDA in *Polygala callus*

当 MeJA 浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时, CAT、SOD、POD 活性达到最大值, 分别为 273.30、1 451.06、15.27 U/mg, 是对照组的 2.27、4.22、8.12 倍。随着 SA 和 MeJA 浓度的增大, MDA 含量均呈上升趋势, 当 SA 质量浓度为 32 mg/L 时, MDA 含量达到最大值, 为 25.09 nmol/mg, 是对照组的 13.21 倍。当 MeJA 浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, MDA 含量达到最大值, 为 27.10 nmol/mg, 是对照组的 9.41 倍。

3.3 SA 和 MeJA 对远志愈伤组织中总酚、总黄酮的影响

不同浓度 SA 和 MeJA 对远志愈伤组织中总酚、总黄酮的影响见表 2。由表 2 可知, 不同 SA

浓度下远志愈伤组织中总黄酮含量均低于不加 SA 的对照组; 总酚含量相较于对照组无显著性差异, 说明 SA 对远志愈伤组织中总黄酮的产生具有抑制作用, 对总酚的产生无显著影响。MeJA 不同浓度下远志愈伤组织中总酚、总黄酮含量随 MeJA 浓度增大呈先增加后下降的趋势, 在 MeJA 浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时, 总黄酮含量达到最大值, 为 26.025 1 mg/g, 是对照组的 1.77 倍; 在 MeJA 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 总酚含量达到最大值, 为 10.657 4 mg/g, 是对照组的 1.89 倍。MeJA 不同浓度下远志愈伤组织中总酚、总黄酮含量均显著高于不加 MeJA 的对照组, 说明 MeJA 能够有效刺激远志愈伤组织中总酚、总黄酮含量的积累。

表 2 不同浓度 SA 和 MeJA 对远志愈伤组织总酚、总黄酮的影响

Table 2 Effects of SA and MeJA concentrations on total flavonoids in total polyphenols of *Polygala callus*

SA/(mg·L ⁻¹)	总黄酮/(mg·g ⁻¹)	总酚/(mg·g ⁻¹)	MeJA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	总黄酮/(mg·g ⁻¹)	总酚/(mg·g ⁻¹)
0	14.670 5 $\pm$ 0.803 7 ^a	5.628 1 $\pm$ 0.003 1 ^a	0	14.670 5 $\pm$ 0.803 7 ^d	5.628 1 $\pm$ 0.003 1 ^c
4	12.552 1 $\pm$ 0.036 7 ^{ab}	5.404 9 $\pm$ 0.001 9 ^a	100	23.026 2 $\pm$ 0.019 3 ^b	7.128 9 $\pm$ 0.006 4 ^{bc}
8	12.717 3 $\pm$ 0.084 3 ^{ab}	5.027 9 $\pm$ 0.005 0 ^a	200	24.231 1 $\pm$ 0.119 4 ^{ab}	9.487 6 $\pm$ 0.001 8 ^{ab}
12	12.657 5 $\pm$ 0.020 4 ^{ab}	5.265 1 $\pm$ 0.006 2 ^a	400	25.527 1 $\pm$ 0.020 2 ^a	10.657 4 $\pm$ 0.001 8 ^a
16	11.437 6 $\pm$ 0.013 4 ^b	5.378 0 $\pm$ 0.005 4 ^a	600	26.025 1 $\pm$ 0.008 8 ^a	9.293 9 $\pm$ 0.007 1 ^{ab}
20	11.340 7 $\pm$ 0.019 2 ^b	4.990 9 $\pm$ 0.001 0 ^a	800	22.196 0 $\pm$ 0.063 0 ^b	9.431 7 $\pm$ 0.010 5 ^{ab}
24	14.381 1 $\pm$ 0.026 6 ^a	6.494 9 $\pm$ 0.006 9 ^a	1 000	20.247 3 $\pm$ 0.068 3 ^c	8.960 1 $\pm$ 0.008 3 ^{ab}
28	12.715 8 $\pm$ 0.061 1 ^{ab}	5.809 1 $\pm$ 0.003 4 ^a	—	—	—
32	13.922 7 $\pm$ 0.018 0 ^{ab}	6.886 0 $\pm$ 0.004 0 ^a	—	—	—

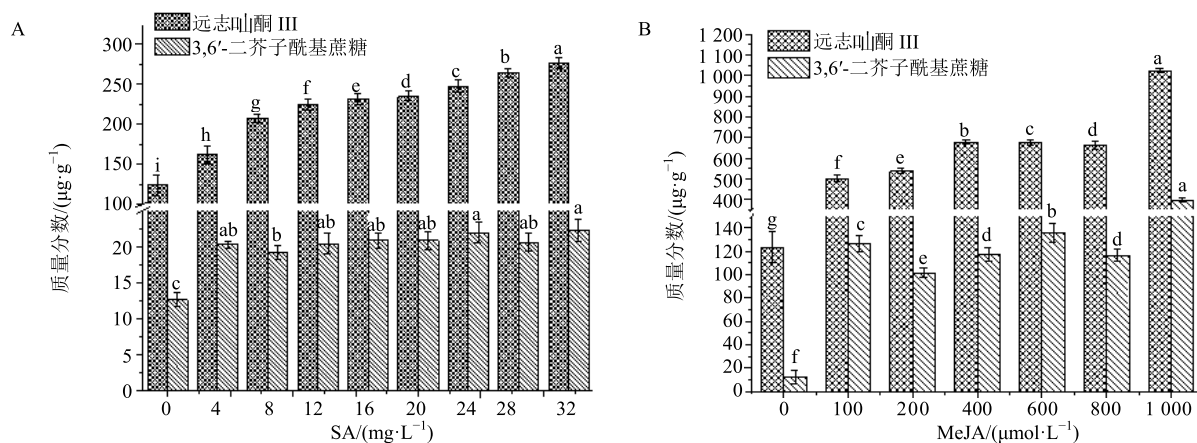
同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase within the column indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$)

3.4 SA 和 MeJA 对远志愈伤组织中远志呷酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量的影响

SA 和 MeJA 不同浓度对远志愈伤组织中远志呷酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量的影响见图 3。由图 3 可得,远志愈伤组织接种于添加不同浓度 SA 或 MeJA 的培养基上培养 30 d 后,远志愈伤组织中远志呷酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量均显著高于不

加 SA 或 MeJA 的对照组。当 SA 质量浓度为 32 mg/L 时,远志愈伤组织中远志呷酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量最高,分别为 275.78、22.28 $\mu\text{g/g}$,但 3,6'-二芥子酰基蔗糖含量与 SA 质量浓度为 24 mg/L 时不存在显著性差异。当 MeJA 浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时远志愈伤组织中远志呷酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量达到最大值,分别为 1 024.89、399.27 $\mu\text{g/g}$ 。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase within the column indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$)

图 3 不同浓度 SA (A) 和 MeJA (B) 对远志愈伤组织远志呷酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of SA (A) and MeJA (B) on content of polygalaxanthone III and 3,6'-disinapoyl sucrose of *Polygala callus*

4 讨论

利用植物愈伤细胞生产用于预防和治疗疾病的植物次生代谢产物发展极为迅速,近年来已研究 400 多种植物,并从培养细胞中分离得到 600 多种次生代谢产物^[16]。通过外源诱导子的添加改变植物的次生代谢途径,是提高植物次生代谢产物的有效方法之一^[14]。SA 和 MeJA 在植物发育过程和抵御不良环境中起着重要的内源激素作用^[17],并以信号分子形式参与植物次生代谢、激活相应防御基因、调控相关关键酶基因表达、影响酶活性,从而调控次生代谢产物的产生^[18]。本实验考察了不同浓度 SA 和 MeJA 对远志愈伤组织生长、相关酶活性及化学成分的影响。实验结果表明,MeJA 对远志愈伤组织的生长具有抑制作用,SA 12 mg/L 对远志愈伤组织的生长具有促进作用,说明一定浓度的 SA 和 MeJA 可能对活细胞具有毒性,从而抑制其生长。

SOD、POD 及 CAT 是植物体内广泛存在的抗氧化酶,SOD 可以将植物体内有毒的超氧阴离子转化为 H_2O_2 ,POD 和 CAT 可以及时清除细胞内过量

H_2O_2 ,从而抵御过氧化物的破坏^[2]。本实验结果表明,随着 SA 和 MeJA 浓度的增大,SOD、CAT、POD 活性均呈先上升后下降的趋势,与黄芩^[19]、栓皮栎^[20]等植物中研究一致,说明 SA 和 MeJA 对愈伤组织的生长能够产生胁迫作用,使愈伤细胞内的抗氧化酶系统协同调控,以减少超氧阴离子及过氧化物的过量积累,但过高的 SA 和 MeJA 浓度下,超氧阴离子及过氧化物的积累超过抗氧化酶系统的清除能力,从而对其产生伤害导致抗氧化酶活性降低。MDA 是膜质过氧化的产物,其含量高低反映膜质过氧化程度的大小^[21]。本实验中,随着 SA 和 MeJA 胁迫浓度的增大,MDA 含量逐渐增加,分析原因可能是, H_2O_2 含量增加导致愈伤细胞膜质过氧化程度逐渐加重,MDA 含量也持续上升。

不同浓度 SA 对远志愈伤组织中总黄酮的产生呈现出抑制作用,对远志愈伤组织中总酚的产生不存在显著影响。MeJA 对远志愈伤组织中总酚、总黄酮含量均有一定的促进作用,当 MeJA 浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时,总黄酮含量达到最大值,在 MeJA 浓度

为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 总酚含量达到最大值。MeJA 浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时与 MeJA 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 远志愈伤组织中总黄酮含量无显著性差异, 因此本实验认为以加入 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA, 可作为远志愈伤组织总酚、总黄酮含量积累的最佳浓度。

不同 SA 和 MeJA 浓度对远志愈伤组织中远志吡啶 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量均具有促进作用。在 SA 质量浓度为 32 mg/L 时, 远志愈伤组织中远志吡啶 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量最高, 在 MeJA 浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时远志愈伤组织中远志吡啶 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量达到最大值; 综合来看, MeJA 对远志愈伤组织中远志吡啶 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量积累的影响高于 SA, 尤以 MeJA 浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时效果最佳。

实验通过不同浓度 SA 和 MeJA 对远志继代愈伤组织生长、MDA 含量、抗氧化酶活性、总酚、总黄酮含量及远志吡啶 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量影响的研究, 为远志愈伤组织的优良品系培养及次生代谢产物的生产提供一定的参考数据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 彭亮, 杨冰月, 张岗, 等. 干旱胁迫对远志种子萌发及幼苗生长和生理特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2018, 38(4): 741-749.
- [3] 田洪岭, 许陶瑜, 郭淑红, 等. 山西产区远志药材资源现状与分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 26-30.
- [4] 路平. 浅议植物的组织培养 [J]. 农技服务, 2017, 34(5): 30.
- [5] 付颖聪, 李小清, 王红雷, 等. 白芨愈伤组织诱导研究 [J]. 西北民族大学学报: 自然科学版, 2016, 37(4): 16-19.
- [6] 裴莉昕, 纪宝玉, 陈随清, 等. 黄精不同外植体对愈伤组织诱导的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(8): 1995-1997.
- [7] 李琰, 赵磊, 崔蕾, 等. 诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响 [J]. 生物工程学报, 2015, 31(5): 734-743.
- [8] 杨静, 孙皓. 不同诱导子对黄芪悬浮培养细胞中黄芪多糖积累的影响 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(26): 8954-8956.
- [9] 王和勇, 罗恒, 孙敏. 诱导子在药用植物细胞培养中的应用 [J]. 中草药, 2004, 35(8): 123-127.
- [10] 晏琼, 胡宗定, 吴建勇. 生物和非生物诱导子对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 262-265.
- [11] Verpoorte R, Heijden R V D, Hoge J H C, *et al.* Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites [J]. *Cheminform*, 2010, 26(8): 2307-2310.
- [12] Zhao J, Zhu W H, Qiu H. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture [J]. *Enzym Microb Technol*, 2001, 28(7): 666-672.
- [13] 孟书亦, 马秀杰, 韩梅, 等. 水杨酸对黄芩愈伤组织抗氧化酶活性及黄芩苷含量的影响 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(10): 4179-4183.
- [14] 苗晓燕, 朱维红, 张筱梅, 等. 水杨酸、茉莉酸甲酯及超声波对北沙参愈伤组织生长及产香豆素的影响 [J]. 食品科学, 2016, 37(9): 181-185.
- [15] 朱宏涛, 李江, 李元, 等. 茉莉酸甲酯对三七组培苗中总皂苷含量的影响 [J]. 西部林业科学, 2014, 43(2): 72-78.
- [16] 于寒松, 于亚桐, 贾帅, 等. 利用悬浮细胞培养方法提高荞麦中总黄酮含量的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(22): 37-39.
- [17] Maleck K, Dietrich R A. Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies [J]. *Trends Plant Sci*, 1999, 4(6): 215-219.
- [18] Kunkel B N, Brooks D M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(4): 325-226.
- [19] 孟书亦. SA 和 MeJA 对黄芩愈伤组织黄酮类化合物含量及其合成酶的影响 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [20] 李志萍, 张文辉, 崔豫川. PEG 模拟干旱胁迫对栓皮栎种子萌发及生长生理的影响 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(10): 2043-2049.
- [21] Ammar M H, Anway F, EL-HARTY E H, *et al.* Physiological and yield responses of faba bean (*Vicia faba* L.) to drought stress in managed and open field environment [J]. *J Agronomy Crop Sci*, 2015, 204(4): 280-287.