

不同光照条件对槲蕨组织培养 外植体褐化的影响

刘闻川, 俞慧娜, 戎华磊, 刘 鹏

(浙江师范大学植物学实验室, 浙江 金华 321004)

摘 要:采用组织培养方法,探讨了黑暗、1 000 lx、2 000 lx 和 3 000 lx 等 4 种不同光照条件对槲蕨外植体褐变程度的影响。结果表明:随着光照时间的延长,槲蕨外植体的 PPO、POD 和总酚含量均表现为先增加后减少的趋势;在相同培养时间下,随着光照强度的增加,槲蕨外植体的 PPO 和 POD 活性也同时增加,其中光照强度 1 000 lx 处理的 PPO 和 POD 的活性均低于其他光照强度处理;光照对槲蕨外植体的总酚含量在相同培养时间下影响并不直接,但 1 000 lx 处理下的槲蕨外植体的总酚含量积累较少,说明 1 000 lx 是槲蕨的组织培养较为适宜的光照条件。

关键词:槲蕨; 光照; 外植体; 褐化

中图分类号:S682.35

文献标识码:A

文章编号:1004-874X(2008)08-0022-04

Effect of different illumination on browning of *Drynaria fortunei*

LIU Wen-chuan, Yu Hui-na, RON Hua-lei, LIU peng

(Key Laboratory of Botany, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China)

Abstract: With the method of tissue culture, studies on the change law of explant browning at the different treatment of light (dark, 1 000 lx, 2 000 lx and 3 000 lx). The result showed that the PPO, POD and total phenols content increased first and decreased later during the light time. At the same culture time, with the increase of light intensity, the activity of PPO and POD increasing, and the value of POD of 1 000 lx treatment were smaller than other light. The total phenols content did not display directly to luminance. However, like PPO and POD, the content of 1 000 lx treatment also showed smallest. Therefore, the appropriate condition in the tissue culture of *Drynaria fortunei* was the light of 1 000 lx.

Key words: *Drynaria fortunei*; illuminance; explant; browning;

槲蕨 [*Drynaria fortunei* (Kunze) J.Sm] 为槲蕨科槲蕨属植物,其根茎是中药骨碎补的主要来源,具有补肾强骨、续伤止痛等功效,常用于治疗肾虚腰痛、耳鸣耳聋、牙齿松动、跌扑闪挫、筋骨折伤及外治斑秃、白癜风^[1]等疾病。槲蕨主要分布在长江以南各省,附生于低山丘陵的岩石或树干上。槲蕨在浙江省主要分布于鄞县、东阳、淳安以南的东部、中部、西部和南部^[2-3]。近年来,随着人们保健意识的增强,对骨碎补药材的需求量日益增大,而槲蕨占骨碎补商品药材的 70% 以上^[4]。目前,国内外对槲蕨的研究主要集中在化学成分、药理以及生药鉴定等方面。如周铜水等^[4-7]研究了槲蕨根茎总

黄酮和柚皮甙的含量测定及生药鉴定;刘振丽等^[8]研究了骨碎补挥发油成分的分析;沈秋仙^[9]研究了槲蕨根茎黄酮类物质提取;赵湘洪^[10]研究了骨碎补对关节炎的治疗作用;王维信等^[11]研究了骨碎补的双氢黄酮对心血管的作用;董福慧等^[12]研究了骨碎补对骨愈合过程中相关因素表达的影响;国外学者研究了槲蕨对骨细胞活动的影响^[13-14]。但是,对槲蕨生物学和栽培繁殖学特性上的研究较少,目前只有吴艳芳等^[15]研究了光照强度、温度、激素、pH 值对槲蕨配子体发育的影响。因此,加强对槲蕨的繁殖生物学特性的研究具有十分重要的意义。

组织培养是扩大生产和保存物种的一种有效途径,但在植物组织培养中经常会遇到外植体褐变现象。引起外植体褐变的酶有多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)等,但最主要的是 PPO。PPO 是催化褐变反应的关键酶,能催化酚类物质到联苯酚的羟基化以及羟基酚到醌的脱氢反应。醌在植物体内自身聚合,或与细胞内的蛋白质反应,产生黑

收稿日期:2008-04-15

基金项目:国家科技攻关项目(2004BA525B06); 国家自然科学基金项目(30540056); 浙江省自然科学基金项目(303461, 304185); 浙江省新苗人才计划项目(2007G60G2030063)

作者简介:刘闻川(1988-),男,在读本科生

通讯作者:刘鹏(1965-),男,博士,教授,E-mail: sky79@zjnu.cn

u.cn

色或褐色的沉积物,被认为是植物体酶促褐变的主要原因^[6]。POD 则是植物防御中的第一道防线。许传俊等^[7]在研究蝴蝶兰外植体褐变发生与总酚含量 PPO、POD 和 PAL 的关系时发现,褐变发生前期 PPO 和 POD 的活性皆升高,褐变发生后 2 种酶的活力下降。而张盛林等^[8]研究发现外植体褐变程度与 PPO 活性呈正相关,褐变产物不仅使外植体、细胞、培养基变褐,而且对许多酶有抑制作用,从而影响培养材料的生长与分化,严重时甚至导致其死亡。晏本菊等^[9]研究了苍溪梨、金花梨外植体的 PPO 活性、总酚含量和组培褐变率变化规律及其关系,结果表明,PPO 活性、总酚含量与组培褐变率均存在一定关系,组培褐变率的高低取决于 PPO 活性和总酚含量。为寻求槲蕨组织培养的较适宜光照条件,我们开展了不同光照强度对槲蕨外植体褐变的影响研究,现将初步研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试用的槲蕨幼嫩走茎采自浙江师范大学叠翠园旁的马尾松干。将槲蕨幼嫩走茎去除表皮,切成长约 1 cm 的小段作为外植体。外植体用 75% 酒精消毒 15~30 s,再放入 1% 升汞中消毒 2 min,然后用无菌水冲洗干净,备用。

1.2 试验方法

将经消毒的槲蕨外植体接种于 MS 培养基中,分别置于黑暗和光照强度 1 000、2 000、3 000 lx 下培养,培养温度白天(12 h)为 25℃、晚上(12 h)为 20℃。每个处理 3 次重复,每个重复 3 瓶,每个三角瓶接种 4~5 段外植体。试验于接种前(0 d,CK)和培养后 1、3、6、7、9 d 测定外植体的 POD、PPO 活性和总酚含量。

1.3 测定方法

1.3.1 PPO 活性 PPO 活性参考毕玉蓉等^[20]的方法进行测定:称取外植体样品 0.1 g,加入 pH 7.8 的磷酸缓冲液冰浴中研磨,然后于 4℃ 低温下离心(6 000 r/min)20 min。取上清液 0.2 mL,加入 pH 6.0 的磷酸缓冲液和 0.1 mol/L 儿茶酚溶液,37℃ 下保温 10 min 后,倒入比色皿中,于波长 410 nm 处读取吸光值(每分钟记录 1 次,共记录 6 次)。以每分钟吸光度变化值表示酶活性的大小,酶活性单位为 $\Delta A_{410} / \text{min} \cdot \text{g}$ 。

1.3.2 POD 活性 称取外植体样品 0.1 g,加入磷酸缓冲液和 1% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)混合液 2 mL 于冰浴中研磨,然后于 4℃ 低温下离心(6 000 r/min)20 min。取上清液 0.2 mL,与比色皿中的反应混合液(磷酸缓冲液+过氧化氢+愈创木酚)混合后,置于波长 470

nm 处读取吸光值(每分钟记录 1 次,共记录 6 次)。以每分钟吸光度变化值表示酶活性的大小,酶活性单位为 $\Delta A_{470} / \text{min} \cdot \text{g}$ 。

1.3.3 总酚含量 称取外植体样品 0.1 g,用 50% 乙醇-HCl(pH3.0)提取后,置于波长 280 nm 处读取吸光值,最后以没食子酸作标准曲线,计算总酚含量(mg/g)。

2 结果与分析

2.1 不同光照处理对槲蕨外植体 PPO 活性的影响

PPO 是植物体中普遍存在的一种末端氧化酶,是催化褐变反应的关键酶,其可以催化酚类物质形成醌类物质,醌类物质再经非酶促聚合,形成红棕色物质,逐渐扩散到培养基中,对外植体产生毒害。从图 1 可以看出,槲蕨外植体在黑暗条件下培养 1 d 后 PPO 活性达到最大值,且与对照(接种前)差异显著;之后随着黑暗培养时间的延长,槲蕨外植体的 PPO 活性减小,但变化不大,与对照相比差异不显著。从图 1 还可以看出,槲蕨外植体在光照强度 1 000、2 000、3 000 lx 条件下培养,培养前期的 PPO 活性也随着光照时间的延长而增加,其中光照强度 1 000、3 000 lx 处理的 PPO 活性在培养后 3 d 达到最大值,2 000 lx 处理在 6 d 后达到最大值;之后随着光照时间的延长,PPO 活性下降,但与对照差异不明显。从同一培养时间下不同光照处理的槲蕨外植体 PPO 活性调查结果(图 1)可以发现,除培养后 3 d 在黑暗条件下的 PPO 活性最小外,其他培养时间均在 1 000 lx 光照条件下的 PPO 活性最小。

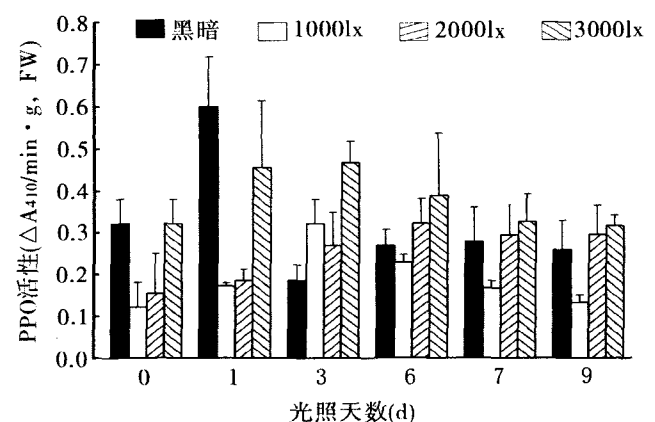


图 1 不同光照处理对槲蕨外植体 PPO 活性的影响

2.2 不同光照处理对槲蕨外植体 POD 活性的影响

有关研究表明,PPO 和 POD 共同氧化酚而形成醌,醌转变成缩合型鞣质,最后形成褐色的聚合物。从图 2 可以看出,槲蕨外植体在黑暗条件下培养,前期的

POD 活性增加,并在培养后 3 d 达到最大值,之后随着黑暗处理时间的延长,POD 活性有所减小,但与对照差异不显著。从图 2 还可以看出,槲蕨外植体在光照条件下培养,前期的 POD 活性仍然增大,其中 1 000、2 000 lx 光照处理在培养后 3 d 达到最大值,3 000 lx 光照处理在培养后 4 d 达到最大值,之后随着光照时间的延长,POD 活性减小。从同一培养时间不同光照处理的槲蕨外植体 POD 活性调查结果(图 2)可以发现,除培养后 1 d 在 3 000 lx 光照条件下的 POD 活性最小外,其他培养时间均在 1 000 lx 光照条件下的 POD 活性最小。

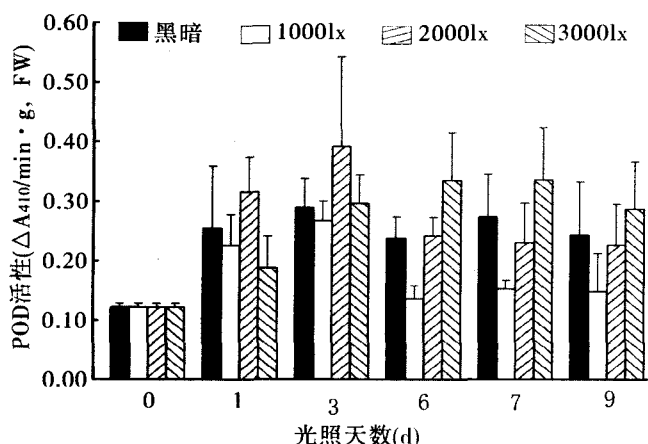


图2 不同光照处理对槲蕨外植体 POD 活性的影响

2.3 不同光照处理对槲蕨外植体总酚含量的影响

对槲蕨外植体总酚含量的测定结果(图 3)表明:在黑暗条件下,外植体总酚含量随着培养时间的延长而增加,并在培养 7 d 后达到最大值且与对照差异显著,但在培养后 9 d 时总酚含量又有所减小;在光照条件下,槲蕨外植体的总酚含量均有所增加,其中 1 000、2 000 lx 处理在培养后 7 d 达到最大值,3 000

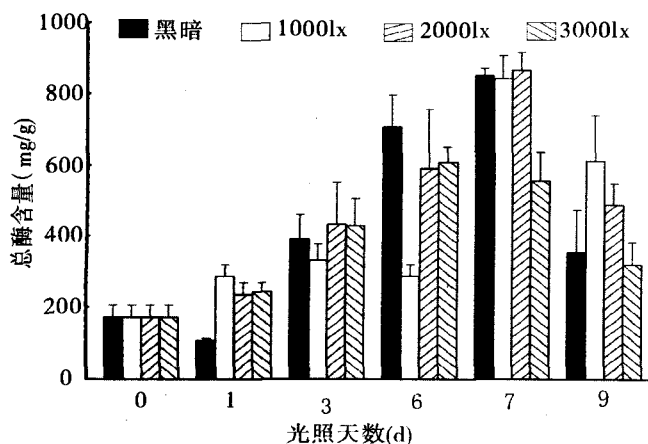


图3 不同光照处理对槲蕨外植体总酚含量的影响

lx 处理在培养后 6 d 达到最大值,之后随着槲蕨外植体各处理光照时间的延长,总酚含量又有所减少。从同一培养时间不同光照处理的槲蕨外植体总酚含量调查结果来看,各光照处理的总酚含量变化规律不太明显,其中培养后 1 d 在黑暗条件下酚类含量最少,培养后 3 d 和 6 d 在 1 000 lx 光照条件下酚类含量最少,培养后 7 d 和 9 d 在 3 000 lx 光照条件下酚类含量最少。

3 结论与讨论

在组织培养过程中,外植体褐变的直接原因是酚类物质与 PPO 的区域化分布被打破,以致 PPO 能催化酚类物质氧化引起褐变;如果酚类物质与 PPO 的区域化分布没有被打破,即使 PPO 活性再高,酚类物质含量再多,也不会发生褐变反应。许传俊等^[2]研究证实,在外植体褐变中,酚类产生鞣质,鞣质对细胞有毒害作用,同时细胞结构被破坏,代谢发生紊乱,导致培养失败。因此,在组织培养中影响褐变的主要因素是酚类含量和相关酶活性。

本研究结果显示,在同一天培养时间内,随着光照强度的增加,槲蕨外植体的 PPO 活性也同时增加,其中以 1 000 lx 光照处理的外植体 PPO 活性最小,2 000 lx 光照处理次之,而 3 000 lx 光照处理的 PPO 活性最大,说明部分酚类氧化酶活性是受光的诱导,这些酶在光照条件下生长的外植体内比较活跃。但比较不同光照处理对槲蕨外植体总酚含量的影响发现,其变化规律并不明显,就酚类含量变化的差异来看,黑暗处理及 2 000、3 000 lx 光照处理在培养后 3 d 就出现显著性变化,而 1 000 lx 光照处理则在培养 7 d 后酚类含量才出现显著性变化,其含量由 285.9 mg/g 增加至 842.4 mg/g。从槲蕨外植体在 1 000 lx 光照条件下酚类氧化酶系的活力较低且酚类含量在培养后 1~6 d 内变化不明显的情况可以推断,槲蕨外植体的酚类合成与氧化同样受到光的诱导;而槲蕨外植体在黑暗条件下培养后 1 d 时总酚含量减少,说明一段时间的黑暗处理可能是减缓酚类合成的因素之一。但是,连续长时间的黑暗处理会降低外植体的生理活力,而弱光 1 000 lx 与黑暗交替处理能够抑制 PPO 活性及控制酚类产生鞣质,从而控制褐变的发生,却不会降低外植体的生理活力。因此,本研究认为,1 000 lx 是槲蕨组织培养中较适宜的光照条件。

在槲蕨组织培养过程中,接种后外植体的 PPO 和 POD 活性都有所增加,但褐变发生后 PPO 和 POD 活性下降,说明这 2 种酶均参与褐变的开始;随着褐变发生,

外植体的总酚含量增加,说明褐变过程是酚类积累的过程,总酚含量在褐变前期与酶活性呈相同的趋势,但在培养后 9 d 有一定程度的下降,表明除 PPO 和 POD 外,可能还有其他因素影响总酚含量。在植物组织培养中,褐变与外植体材料的总酚含量关系密切。本试验结果表明,槲蕨外植体在褐变发生过程中酚类物质并没有随着褐变程度的加重而氧化减少,而在培养后 1~7 d 内总酚含量为逐渐增加的过程,与酚类氧化酶系活性的增强呈现相同的趋势,说明这段时间并不只是存在酚类氧化成醌参与褐变的过程,也同样存在着酚类合成的过程。有研究证实,抑制酚类的合成可以抑制褐变的发生^[22],抑制 PAL 活性时褐变发生也会被抑制^[22-23]。本研究仅对氧化酚类的酶活性进行了测定,而酚类合成酶(如 PAL 等)活性的变化则仍需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 209.
- [2] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学技术出版社, 1999: 179-188.
- [3] 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志(第一卷)[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993: 328.
- [4] 周铜水, 周荣汉. 骨碎补类生药商品调查和性状鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(12): 710-712.
- [5] 周铜水, 李瑞洲, 林东武, 等. 槲蕨根茎总黄酮和柚皮甙的含量测定[J]. 植物资源与环境, 1997, 6(1): 54-55.
- [6] 周铜水, 刘晓东, 周荣芳. 骨碎补对大鼠实验性骨损伤愈合的影响[J]. 中草药, 1994, 25(5): 249-250.
- [7] 周铜水, 周荣汉. 骨碎补类生药显微鉴定研究 I. 根茎横切面组织构造[J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(5): 263-268.
- [8] 刘振丽, 张玲, 张秋海, 等. 骨碎补挥发油成分分析[J]. 中国药材, 1998, 21(3): 135-136.
- [9] 沈秋仙. 槲蕨根茎黄酮类物质提取条件的优化[J]. 丽水学院学报, 2005, 27(5): 64-66.
- [10] 赵湘洪. 骨碎补对实验性骨性关节炎的治疗作用[J]. 中药通报, 1987, 12(10): 617.
- [11] 王维信, 王敖格. 骨碎补双氢黄酮苷对心血管系统的作用[J]. 药学通报, 1984, 1(2): 55.
- [12] 董福慧, 郑军, 程伟. 骨碎补对骨愈合过程中相关因素表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(7): 518-521.
- [13] Sun J S, Lin C Y, Dong G C, et al. The effect of Gu-Sui-Bu(*Drynaria fortunei* J.Sm) on bone cell activities[J]. Biomaterials, 2002, 23(16): 3377-3385.
- [14] Sun J S, Dong G C, Lin C Y, et al. The effect of Gu-Sui-Bu (*Drynaria fortunei* J.Sm) immobilized modified calcium hydrogen phosphate on bone cell activities [J]. Biomaterials, 2003, 24(5): 873-882.
- [15] 吴艳芳, 尤敏, 王新胜, 等. 槲蕨配子体发育影响因素的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(5): 461-463.
- [16] Peter W T, Ian B D. Polyphenol oxidase in potato[J]. Plant Physiol, 1995: 525-531.
- [17] 许传俊, 李玲. 蝴蝶兰外植体褐变发生与总酚含量、PPO、POD 和 PAL 的关系[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 671-674.
- [18] 张盛林, 郑莲姬, 钟耕. 花魔芋和白魔芋褐变机理及褐变抑制研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(2): 207-211.
- [19] 晏本菊, 李焕秀. 梨外植体褐变与多酚氧化酶及酚类物质的关系[J]. 四川农业大学学报, 1998, 16(3): 310-313.
- [20] 毕玉蓉, 梁厚果. 烟草愈伤组织多酚氧化酶研究[J]. 实验生物学报, 1988, 21(3): 257-263.
- [21] 许传俊, 李玲, 李红, 等. 蝴蝶兰褐变外植体的显微结构观察以及褐变成分的初步分析[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1111-1113.
- [22] Hisaminato H, Murata M, Hommas S. Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65: 1016-1021.
- [23] Peiser G, López G G, Cantwell M, et al. Phenylalanine ammonia-lyase inhibitors control browning of cut lettuce[J]. Postharvest Biology and Technology, 1988, 13: 171-177.

西双版纳植物园成为国内数字化植物园建设的先行者

经过近 5 年的不断探索和发展,中国科学院西双版纳植物园从软件、硬件及技术平台的利用上对其数字植物园建设进行了重新部署和科学设计,数据质量得到明显提升,自动化程度显著提高,形成了较为完善的数字植物园系统,成为国内数字化植物园建设的先行者。已建成的数字植物园系统主要由“植物信息网络实时记录系统(植物信息数据库)”、“植物信息户外采集系统”、“植物园地理信息系统平台”等几个部分组成。目前已完成大部分园区的植物定位工作,定位精度由原来误差的 3~5 m 提高到 0.1 m 以内。并且实现对园区内收集的植物数据采集的自动化,分别建立了基于桌面和移动设备及网络环境的植物园地理信息系统,为园区植物管

理、科普旅游和广大公众提供了方便的数字化信息共享平台。

数字化植物园是世界一流植物园的重要标志。它是植物园的一种虚拟表现形式,使人们能够探究和管理植物园的大量信息。是以互联网为基础,以空间数据为依托,以虚拟现实技术为特征,具有三维界面和多分辨率浏览器的面向公众的开放系统。可使植物园的信息实现数字化管理,并为公众提供身临其境的交互或访问平台。通过该系统可查询园内各区面积、植物物种数等基本信息,以及详细的各个区的景观,作为数字植物园的一部分,构建了网上虚拟植物园,任何人只要点击网址便可在线游览各个园区的全景图。