

组培过程中金钗石斛光合特性与 生物量积累之间的关系

罗在柴¹ 周大刚², 姚 智² 乙 引²

(1 贵州省林业科学研究院 贵阳 550005; 2 贵州师范大学生物技术与工程学院贵阳 550001)

摘 要: 本文对组织培养过程中金钗石斛叶绿素、叶片叶绿体希尔反应活力和生物量积累进行了测定, 结果为金钗石斛叶绿素平均含量高达 $0.45\mu\text{g/g}$, 叶绿素 a/b 值为 2.85, 希尔反应活力平均为 $600\mu\text{mol Fe}^{+2}/(\text{mg} \cdot \text{Chl} \cdot \text{h})$, 光合速率约等于 $100\mu\text{mol}/\text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 8 天和 16 天干物质积累分别增长了 1.055 和 1.246 倍, 结果表明其光合作用特征和物质积累适应强度较高光照条件。

关键词: 金钗石斛; 希尔反应活力; 光合作用; 叶绿素; 生物量

中图分类号: S718.43

文献标识码: B

The Photosynthesis characteristics and the Biomass Accumulation in the Tissue Culture of *Dendrobium nobile* Lindl.

Luo Zaiqi¹ Zhou Dagang² Yao zhi² Yi Yin²

(1. Guizhou Academy of Forestry, Guiyang 550005; 2. Biotechnology and engineering College of Guizhou Normal University, Guiyang 550001)

Abstract: The chlorophyll content of the leaf, the Hill reaction activity of the chloroplast, and the biomass accumulation of *Dendrobium nobile* Lindl. during the tissue culture process were tested and measured. The result showed that average content of the leaf chlorophyll is up to $0.45\mu\text{g/g}$, the value of chlorophyll a/b is 2.85, the average value of the Hill reaction activity is $600\mu\text{mol Fe}^{+2}/(\text{mg} \cdot \text{Chl} \cdot \text{h})$, and the rate of photosynthesis is about $100\mu\text{mol}/\text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. In 8 days and 16 days, the biomass increased 1.055 times and 1.246 times respectively. It is finally concluded that *dendrobium nobile* is adaptable to higher light condition.

Key words: *Dendrobium nobile* Lindl.; Hill reaction activity; Photosynthesis; chlorophyll; Biomass

兰科石斛属植物金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 是我国常用珍贵中药,《神农本草经》记载为上品,具有显著的养阴益精功效。现代药理研究认为石斛具有增强人体免疫,疏通血管,抗癌,抗

衰老及治疗白内障等作用^[1]。由于石斛市场需求量不断增大,人们长期对野生石斛过度采集,而且金钗石斛生长繁殖极为缓慢,石斛的野生资源日趋稀少,部分种属现已濒于绝灭^[2]。为满足金钗石斛的

市场供需关系,目前正在探索人工组织培养模式,模拟石斛原生地的环境进行种植。为了高效快捷生产高质量的石斛资源,我们开展了金钗石斛光合特性与生物量积累之间相关性研究。

1 材料和方法

1.1 材料

金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 由贵州师范大学生物技术与工程学院组织培养实验室培养组织培养幼苗,实验时准确称取 1g 接种到组织培养瓶中,置于培养温度 25℃,光照强度 3000Lx,光照周期为 12h 的培养室中进行培养。

1.2 方法

1.2.1 叶绿素含量测定

方法参照李合生主编《植物生理生化实验原理和技术》^[4]。称取各时间段材料 0.30g 鲜叶片于研钵中,加 80% (v/v) 的丙酮以及少量 CaCO₃ 和石英砂,快速研磨成匀浆,过滤,定容至 25ml,得叶绿素提取液,倒入比色皿中,用分光光度计在波长 645nm、663 nm 处测得光密度值 OD₆₄₅、OD₆₆₃。根据 Arnon 公式算出叶绿素 a 与叶绿素 b 的含量及叶绿素 a/b 值 (每次作 3 个重复)。

1.2.2 希尔反应活力的分光光度法测定

方法参照叶济宇、钱月琴 (见薛应龙编,植物生理学实验手册)^[5]。

1.2.2.1 Fe (CN)₆⁴⁻ 标准曲线制作

称 8.48mg 亚铁氰化钾,溶于 50ml 重蒸馏水,即此溶液浓度为 0.4 μM/ml。配制浓度为 0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 等不同浓度的亚铁氰化钾溶液 1.4ml。分别吸取上述不同配置亚铁氰化钾和 H₂O,注入不同编号的玻璃试管中,每管再加柠檬酸三钠溶液 0.2ml,三氯化铁 0.1ml,摇匀,最后每管加入邻菲罗啉盐酸盐 0.2ml,再次混匀,在室温下暗处放置 10min,在波长为 520 nm 处比色测定光密度值。以得到的光密度值作为纵坐标,亚铁氰化钾浓度作为横坐标,作标准曲线。

1.2.2.2 希尔反应活力测定

称取各时间段材料叶片 0.30g,加入 2ml Tris-蔗糖提取液,快速研磨 1min,500g 离心场离心 1min,取上清液 3000g 离心场中离心 2min,除去上清液;再加入 1ml Tris-蔗糖提取液,制成 0.10~0.20mg 叶绿体每毫升的叶绿体悬浮液,取

0.10ml,加入 2.9ml 丙酮,用精密分光光度计于 652nm 波长处测出吸光度值,根据公式计算叶绿体悬浮液浓度。另取 0.1ml 叶绿体悬浮液于试管中,依次加入反应液 MgCl₂、NaCl 和 K₃Fe (CN)₆ 溶液各 0.1ml,一批作对照置于暗处,另一批在强光下照光,1min 后立即向所有试管加入 0.2ml 三氯乙酸终止反应,摇匀,最后每管加入柠檬酸三钠溶液 0.2ml,三氯化铁 0.1ml,邻菲罗啉盐酸盐 0.2ml,再次混匀,在室温下暗处放置 10min,在波长为 520 nm 处比色测定光密度值。利用光照与暗对照吸光度值的差,查阅标准曲线,算出相当于亚铁氰化钾 (K₄Fe (CN)₆ · 3H₂O) 的含量 (μM),最后根据公式计算希尔反应活力 (每次作 3 个重复)。

1.2.2.3 不同光照强度希尔反应活性

通过测定 500 Lx、1000 Lx、2000 Lx、3000 Lx、4000Lx 灯光照强度下石斛希尔反应活性 (每次作 3 个重复)。

1.3 生物量测定^[5]

用分析电子顶托天平 (精确度 0.0001) 测定不同时间段石斛植株 (根、茎、叶) 鲜重约 1g,105℃ 杀青 10min,80℃ 烘至恒重,记录并计算出植株含水量和干物质量 (每次作 3 个重复)。

2 结果

2.1 叶绿素含量

组织培养过程中金钗石斛叶绿素含量处在 0.4~0.7 μg/g 之间,如图 1 所示:开始有一个降低趋势,2 天时出现最低值,随后开始增高,4 天时出现了最高值,以后逐渐降低,8 天后维持正常水平为 0.45 μg/g。叶绿素 a 与叶绿素 b 比值结果如图 2 所示,金钗石斛的叶绿素 a/b 分布范围在 2.1 到 3.1 之间,平均值为 2.85。

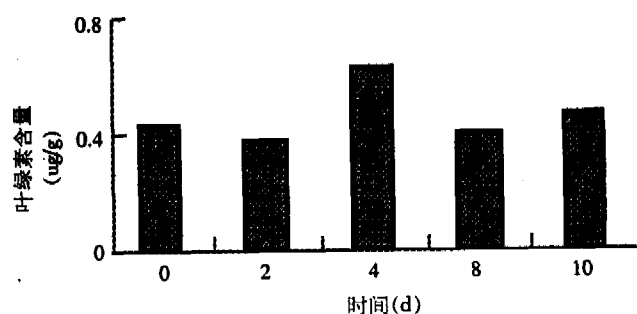


图 1 组织培养过程中金钗石斛叶绿素含量

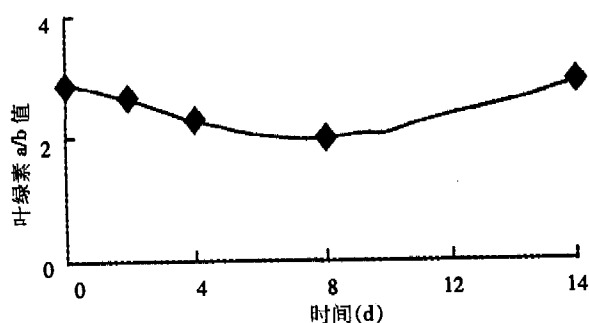


图2 组织培养过程中金钗石斛叶绿素含量 a/b 值

2.2 金钗石斛的光合速率

2.2.1 亚铁氰化钾标准曲线

由图 3 亚铁氰化钾标准曲线计算得到 $tga = 1.75$ 。

2.2.2 金钗石斛希尔反应活力

金钗石斛希尔反应活力如图 3 所示，数值处于 $580 \sim 700 \mu\text{mol Fe}^{+2} / (\text{mg} \cdot \text{Chl} \cdot \text{h})$ ，由实验得金钗石斛叶片中的叶绿体中叶绿素含量为 1.20 mg/g ，它的鲜叶重与叶面积比约为 200 g/m^2 。释放 1 mol O_2 就要同化 1 mol CO_2 ，所以，其光合速率也约等于 $100 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ 。

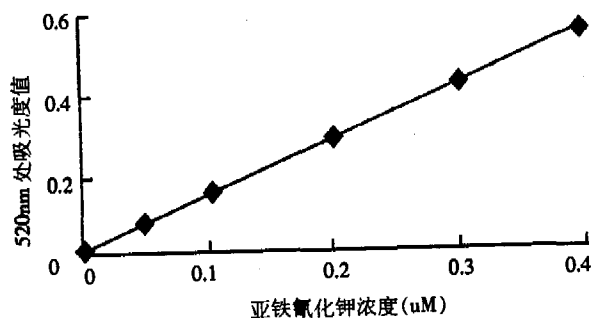


图3 亚铁氰化钾标准曲线

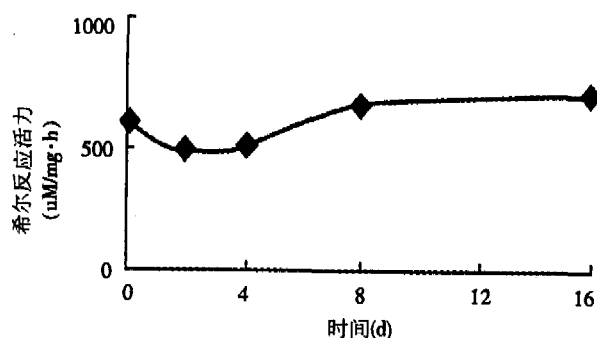


图4 组织培养过程中石斛希尔反应活力

2.2.3 不同光照强度下金钗石斛希尔反应活力

图 5 显示了不同光照强度下金钗石斛希尔反应活力的变化情况。在 500 Lx 的光照强度下反应活力为 $260 \mu\text{mol Fe}^{+2} / (\text{mg} \cdot \text{Chl} \cdot \text{h})$ ， 1000 Lx 时上升为 $330 \mu\text{mol Fe}^{+2} / (\text{mg} \cdot \text{Chl} \cdot \text{h})$ ； 2000 Lx 时为 $400 \mu\text{mol Fe}^{+2} / (\text{mg} \cdot \text{Chl} \cdot \text{h})$ ， 3000 Lx 达到最大值 $520 \mu\text{mol Fe}^{+2} / (\text{mg} \cdot \text{Chl} \cdot \text{h})$ ， $3000 \sim 4000 \text{ Lx}$ 保持不变（如图 5）。总的趋势是金钗石斛叶绿体的希尔反应活力随着光强的增加逐渐上升， 3000 lx 时达到光饱和点。

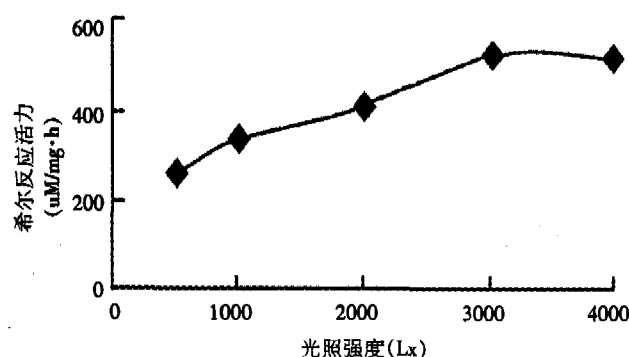


图5 不同光照强度金钗石斛希尔反应活力

2.4 金钗石斛生物量

金钗石斛在实验室组织培养条件下生长迅速。如图 6 所示，8 天时鲜重增长 0.1019 g ，增长率达到 10% ，16 天时增长 0.284 g ，增长率达到 28.4% 。干物质含量初期逐渐减少，8 天时达最低，表明此时植株生长处于旺盛时期，8 天后干物质含量增加（见图 7）。干物质积累也由 0.0872 增长到 0.09201 和 0.1087 ，分别增长了 1.055 和 1.246 倍，结果表明，植物组织培养是快速生产金钗石斛原材料的有效途径。

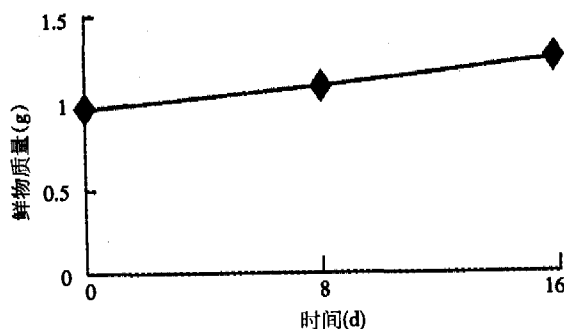


图6 组织培养过程中金钗石斛鲜物质量

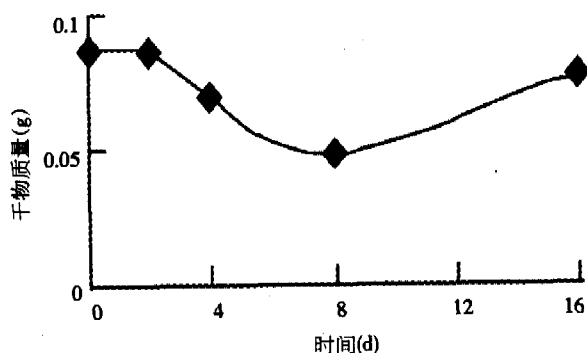


图7 组织培养过程中金钗石斛干物质含量

糖时也增加。铵态氮吸收也受光影响,但铵态氮和硝态氮吸收的比率变动不大。另外,金钗石斛具备了阳地植物表现在叶的形态特征,即叶倾向于旱生形态,叶片一般比较小,叶片上常有较厚的角质层覆盖,表皮细胞较小,细胞壁较厚,排列紧密,胞间隙小,气孔较小而密集^[8]。因此,我们对金钗石斛光合作用特征和生物量积累进行离体实验和整体研究方法结合,推之为阳地植物,所以在实际生产工作中,应注意石斛种植环境的光照强度,使其充分进行光合生产。

参考文献:

1. 夏鸿西,朱利泉,别之龙,等. 石斛属植物化学成分研究进展 [J]. 实用药, 1999, 13 (3): 11~13
2. 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中国药用植物栽培学 [M]. 北京: 农业出版社, 1991. 12
3. Benzing, D H, et al. The genesis of orchid diversity emphasis on floral biology leads to misconceptions. Lindleyana. 1986. 1: 73~89
4. 李合生主编. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 高等教育出版社, 2000. 7
5. 叶济宇, 钱月琴. 希尔反应活力的分光光度法测定, (见薛应龙编. 植物生理学实验手册 [M]). 上海科学技术出版社, 1985
6. 沈允钢, 施教耐, 许大全. 动态光合作用 [M]. 北京: 科学出版社, 1998, 59
7. 潘瑞炽, 董愚得编. 植物生理学 [M]. 高等教育出版社, 1997, 107
8. 陆时万, 徐祥生, 沈敏健编著. 植物学 (第二版) [M]. 高等教育出版社, 1998, 167~168
9. 殷宏章, 沈允钢, 施教耐. 探讨运转的光合作用 [J]. 植物生理学报, 1979 (5): 295~317
10. Lim LY, Hew yc, Wong SC and Hew CS. Effects of light intensity, sugar and CO₂ concentrations on growth and uptake of dendrobium plantlets. Journal of Horticultural Science. 1992, 67 (5): 601~611

3 讨论

本文主要研究不同光照强度下金钗石斛的希尔反应活力,同时对金钗石斛叶片的叶绿素含量进行了测定,探讨一定条件下光照强度对金钗石斛生长的生理作用。研究结果为:(1)金钗石斛仅在 3000 lx 左右光合作用速率才能达到最大值。(2)金钗石斛叶片的叶绿素含量较高,约 0.45 μg/g,并且叶绿素 a/b 值平均值 2.85,接近一般阳地植物的叶绿素 a/b 值 3:1^[6]。(3)金钗石斛有较高的含水量,为 92% 左右,干物质积累相对较少,仅为 8%。根据金钗石斛的光合作用和叶绿素含量 a/b 值特征可以推断金钗石斛光合特性较强,适应于强光照地区生活,其特征更接近阳地植物,因为这类植物光补偿点较高,阳地植物在阳光直射的环境下生长良好,如一般农作物、草原和沙漠以及先叶开花的植物都属阳地植物^[7]。Lim 等^[10]研究了光强、糖和 CO₂ 浓度对石斛小植株吸收矿质和生长的影响。光强、糖和 CO₂ 浓度对生长在琼脂培养基上石斛小植株硝态氮和铵态氮吸收、生长、光合作用活性的影响等。优先吸收铵态氮超过硝态氮,硝态氮吸收相对较低,并随光强的增加而增加,或培养基中添加