

蒋天仪,卓宇,唐敏,等. 外源一氧化氮(NO)对铁皮石斛类原球茎生长及多糖积累的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):257-260.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.072

外源一氧化氮(NO)对铁皮石斛类原球茎生长及多糖积累的影响

蒋天仪¹, 卓宇², 唐敏¹, 王波³

(1. 成都农业科技职业学院, 四川成都 611130; 2. 四川凹凸环境营造有限责任公司, 四川成都 610000;

3. 四川工程职业技术学院, 四川德阳 618000)

摘要:通过添加不同浓度的一氧化氮(NO)供体硝普钠(SNP)处理铁皮石斛类原球茎,研究外源NO对铁皮石斛类原球茎生长发育、多糖合成的影响。结果表明:低浓度SNP有利于铁皮石斛类原球茎生长和多糖含量的提高,而高浓度的SNP则表现出抑制作用。综合看来,0.5 mmol/L SNP效果最佳,其中干质量比对照组高36.90%,叶绿素a含量提高了17.81%,叶绿素b含量提高了12.17%,总叶绿素含量提高了14.91%,多糖产量提高了51.22%;NO专一性猝灭剂cPITO抑制了SNP的这种促进作用,说明NO参与了铁皮石斛类原球茎生长和多糖合成的调控,从而影响其生长发育和次生代谢产物的合成。

关键词:铁皮石斛;类原球茎;一氧化氮;硝普钠;多糖;叶绿素a;叶绿素b;总叶绿素

中图分类号: S567.23*9.04

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2016)04-0257-03

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为兰科石斛属多年生附生草本植物,是我国传统名贵药材,具有增强免疫、抗氧化、抗肿瘤、抗疲劳、降血糖和养阴生津等多种生物活性^[1]。现代研究表明,多糖是铁皮石斛的主要化学成分^[2],其水溶性多糖含量高达22.7%^[3],石斛生理活性的强弱与其多糖含量密切相关。此外,铁皮石斛也具有一定的观赏价值,其花色艳丽,可作为一种小型盆栽观赏^[4]。但是由于铁皮石斛生长条件的特殊性和分布的局限性,又经过长期采挖,导致其自然资源濒临枯竭,国内市场供应紧缺。近年来,铁皮石斛的组织培养技术已经很成熟,组织培养从细胞到微苗、幼苗、壮苗,虽然缩短了自然生长周期,但是最短也要1~2年时间^[5],其优质种苗的来源和供应已经成为制约铁皮石斛生产发展的“瓶颈”。何铁光等研究证明,铁皮石斛类原球茎的多糖含量与野生品相近,且其药理作用相同,从而证明可以直接培养类原球茎来代替全植株提取药源^[6]。

NO作为气体信号分子,参与植物的多种生理代谢过程。樊洪泓等用外源NO供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)处理霍山石斛发现,NO可以提高光合系统的光能转换效率和潜在活性^[7]。随后金青等研究表明,外源NO促进了杂交石斛类原球茎中生物碱的合成与积累^[8]。周永斌等用不同浓度的SNP处理豌豆、黄瓜、玉米、刺槐种子及其砂培幼苗时发现,一定浓度的SNP对种子发芽势、发芽率及幼苗的根长、叶绿素含量和生物量有明显的促进作用^[9]。后来刘建新等也发现,适宜浓度的SNP可促进黑麦草种子的发芽率、幼苗干物质积累速率及叶绿素含量的提高^[10]。Modolo等以NO

处理大豆,发现外源NO可以提高大豆组织中黄酮、异黄酮类物质的含量^[11]。徐茂军也有类似研究报道,外源NO对紫杉醇的生物合成具有促进作用^[12]。以上研究表明,外源NO能够促进植物的生长,并对植物次生代谢产物的合成具有一定作用。

本试验通过外源NO对铁皮石斛类原球茎的处理,探讨对其生长发育及多糖积累的影响,并试图寻找适宜的外源NO浓度来增加铁皮石斛类原球茎的产量和药用成分含量。从而利用铁皮石斛类原球茎生产目的产物,缩短周期,降低成本,提高生产效率,满足市场需求,为提高铁皮石斛的药用工厂化生产可行性提供一定的实践和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用材料是从云南西双版纳药用植物研究所引进的铁皮石斛无菌苗。铁皮石斛类原球茎由无菌苗茎段诱导而来,经过30~40次继代培养,每30 d继代1次,具有稳定的形态特征和生长速率。培养条件:无菌培养室昼温/夜温为25℃/15℃,昼/夜光照时间为14 h/10 h,光照度2 000 lx。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基制备 以MS为基本培养基,附加30 g/L蔗糖,7 g/L琼脂,pH值5.8。在121℃高温高压灭菌锅内持续灭菌17 min。

1.2.2 材料处理 添加不同浓度的NO供体硝普钠和一定浓度的NO专一性猝灭剂cPITO(2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide)处理铁皮石斛类原球茎。试验设计见表1,共有4个不同浓度的SNP处理,对应加入一定浓度的cPITO来验证是否为外源NO起作用。以正常条件下培养的类型原球茎为对照(CK),共6个处理,每个处理3次重复。SNP、cPITO溶液经0.22 μm过滤膜

收稿日期:2015-03-03

作者简介:蒋天仪(1982—),女,四川成都人,硕士,讲师,主要从事园林植物与观赏园艺的研究。Tel: (028) 82735008; E-mail: 12845958@qq.com。

进行过滤灭菌加入到灭菌后的培养基中,事先准备好待用。每个处理 20 瓶,每瓶接入准确称量的 2.0 g 铁皮石斛类原球茎,在超净工作台进行接种。放入光周期 12 h/d、光照度 2 000 lx、培养温度(25±1)℃的培养架上培养。在处理最后 30 d 进行各项指标的测定。

表 1 试验设计

编号	处理设置
CK	0 mmol/LSNP
T ₁	0.25 mmol/LSNP
T ₂	0.5 mmol/LSNP
T ₃	1 mmol/LSNP
T ₄	2 mmol/LSNP
T ₅	0.5 mmol/L SNP + 1 mmol/L cPTIO

T₅ 为本试验的验证试验处理,试验最后得出的最适的外源 SNP 浓度为 0.5 mmol/L,对应加入 1 mmol/L cPTIO。

1.3 指标测定

1.3.1 生物量测定 取出各处理的铁皮石斛类原球茎,洗净培养基,用滤纸吸干水分后称取其鲜质量,然后在烘箱中于 105℃杀青 20 min,后于 60℃烘 48 h 至恒质量,称取其干质量。

1.3.2 叶绿素测定 参见李合生的丙酮浸提法^[13]测定叶绿素含量。取不同处理的铁皮石斛原球茎鲜样 0.1 g 放入 10 mL 离心管中,加入 5 mL 80% 丙酮溶液,在黑暗条件下浸提 48 h 直至完全变白,取上清液在 645、663 nm 下测定吸光度 $D_{645\text{ nm}}$ 、 $D_{663\text{ nm}}$ 。鲜质量含量 M 单位为 $\mu\text{g/g}$ 。用以下公式计算出溶液中叶绿素 a、b、a+b 的含量与鲜质量含量:

$$C_a = 12.7 \times D_{663\text{ nm}} - 2.69 \times D_{645\text{ nm}};$$
$$C_b = 22.9 \times D_{645\text{ nm}} - 4.86 \times D_{663\text{ nm}};$$
$$C_{a+b} = 8.02 \times D_{663\text{ nm}} + 20.20 \times D_{645\text{ nm}};$$
$$M = C \times V。$$

式中: C 为叶绿素浓度, $\mu\text{g/mL}$; V 为体积, mL 。

1.3.3 多糖的提取及含量测定

1.3.3.1 多糖的提取 采用叶余原的超声法^[14]提取多糖。将测过干质量的原球茎干品研磨过 40 目筛,称取干品粉末约 0.1 g,用滤纸包好,置于三角瓶中,依次用石油醚(60℃)、80%乙醇(80℃)在水浴锅中回流提取去除干扰杂质成分,而后取出样品置于 105℃烘箱中干燥(约 30 min)。将原球茎粉末洗进试管中,每管加入 10 mL 超纯水,放入 KQ-300GVDV 型三频恒温数控超声波清洗器中,用超声波水浴加热提取。超声功率恒定为 300 W,温度为 80℃,持续提取 4 h。

1.3.3.2 多糖含量的测定 多糖的测定采用苯酚硫酸法^[15],以葡萄糖为对照。(1)标准曲线的制备。准确称取 20 mg 标准葡萄糖于 500 mL 容量瓶中,加水定容,分别吸取 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL 溶液,各以蒸馏水补至 2.0 mL,然后加入 1.0 mL 5% 苯酚、5.0 mL 浓硫酸,摇匀冷却,室温放置 20 min 后于 490 nm 测吸光度;以 2.0 mL 水按同样显色操作为空白对照,横坐标为多糖质量(μg),纵坐标为吸光度,得标准曲线:

$$y = 142.94x + 1.1666, r = 0.996。$$

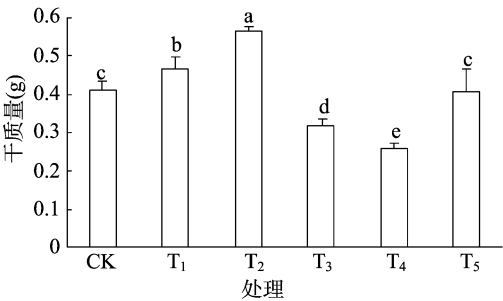
(2)样品含量测定。在 490 nm 下测吸光度,用标准曲线计算多糖干质量含量($\mu\text{g/g}$)。产量公式为:

$$\text{多糖产量}(\mu\text{g}) = \text{干质量}(\text{g}) \times \text{多糖含量}(\mu\text{g/g})。$$

2 结果与分析

2.1 外源 NO 对铁皮石斛类原球茎生长的影响

由图 1 可知,添加不同浓度的 SNP 对铁皮石斛类原球茎生长的影响不同,其干质量变化随着浓度的增加呈现出先上升后下降的趋势。T₃、T₄ 处理明显低于对照组;T₅ 处理与对照组接近;T₂ 处理效果最好,与各处理间差异显著,干质量含量比对照组高 36.90%。



不同处理间标有不同小写字母表示显著差异($P < 0.05$)。下图同图1 不同浓度 SNP 对铁皮石斛类原球茎干质量含量的影响

2.2 外源 NO 对铁皮石斛类原球茎叶绿素含量的影响

如表 2 所示,随着 SNP 浓度的升高,铁皮石斛类原球茎叶绿素含量呈现出先增加后降低的趋势。T₃、T₄ 处理均低于对照组;T₅ 处理和对照组差异不显著;T₂ 处理下各项指标明显高于其他处理,相比对照组叶绿素 a 含量提高了 17.81%,叶绿素 b 含量提高了 12.17%,总叶绿素含量提高了 14.91%。

表 2 不同浓度 SNP 对铁皮石斛类原球茎叶绿素鲜质量含量的影响

处理	含量 ($\mu\text{g/g}$)		
	叶绿素 a	叶绿素 b	叶绿素 a+b
CK	21.9±0.2c	18.9±0.8ab	40.9±1.0c
T ₁	23.1±0.1b	20.5±0.7a	43.6±0.6b
T ₂	25.8±0.5a	21.2±2.1a	47.0±2.1a
T ₃	20.8±0.8d	16.7±1.2b	37.5±1.9d
T ₄	19.1±0.1e	17.8±1.2b	37.0±1.3de
T ₅	22.2±0.8bc	18.1±1.1b	40.3±1.8cd

注:表中数据为“平均值±标准差”。同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 外源 NO 对铁皮石斛类原球茎多糖积累的影响

如图 2 所示,与对照组相比,随着 SNP 浓度的升高,铁皮石斛类原球茎多糖含量呈先升后降的趋势。T₃ 处理效果最佳,且多糖含量显著高于对照组,高出 14.49%;而 T₄ 处理抑制了多糖的产生,显著低于对照,仅为对照的 92.21%;T₅ 处理下的多糖含量与对照组差异不显著。

如图 3 所示,与对照组相比,T₁、T₂ 处理对铁皮石斛类原球茎多糖产量表现出促进作用,而 T₃、T₄ 处理则表现出抑制作用;T₅ 处理多糖产量接近对照组水平;T₂ 处理下多糖产量最高,比对照组高出 51.22%,且与各处理间差异显著。

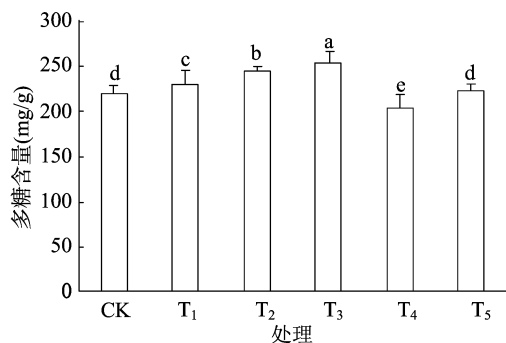


图2 不同浓度 SNP 对铁皮石斛类原球茎多糖含量的影响

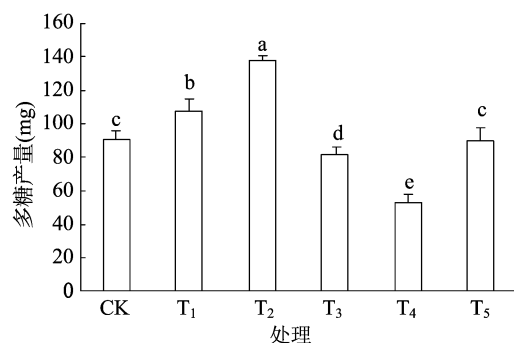


图3 不同浓度 SNP 对铁皮石斛类原球茎多糖产量的影响

3 结论与讨论

本试验研究了 4 种不同浓度的外源 NO 供体对铁皮石斛类原球茎的影响。试验结果表明,随着加入 SNP 浓度的增加,铁皮石斛类原球茎干质量、叶绿素、多糖产量均表现出先上升后下降的规律。说明低浓度的 SNP (0.1、0.5 mmol/L) 可以促进铁皮石斛类原球茎生长发育和多糖积累,但是高浓度的 SNP (1、2 mmol/L) 却有抑制作用。表现出的这种“低促高抑”效应可能是低浓度的 NO 可作为信号分子,对植物生长发育和次生代谢产物合成具有促进作用,而高浓度的 NO 本身对植物细胞有毒害作用。前人研究 SNP 对绿豆下胚轴插条生根的试验表明,生根数与 SNP 剂量在一定浓度下呈正相关,但是浓度过大时表现出毒害效应^[16];而后刘建新等研究也得到类似的结论^[10]。此外,樊洪泓研究外源 NO 对霍山石斛野生苗和试管苗的生理调节效应发现,SNP 在 10 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度区间内有利于其生长和代谢,但是当 SNP 浓度高于 75 $\mu\text{mol/L}$ 对霍山石斛试管苗产生明显的毒害作用^[17]。与本试验得出的结论相似,不过本试验中 T₂ 处理 (0.5 mmol/L) SNP 效果最好,能显著地增加铁皮石斛类原球茎的干质量、叶绿素和多糖含量及产量。这种最佳作用浓度不同可能是因为针对不同的材料对 NO 的吸收和耐受能力不同。SNP 的这种促进作用被 NO 专一性猝灭剂 cPITO 所抑制,表明的是由 SNP 分解产生的 NO 所产生的功效,这与徐茂军等的研究结果^[18]相似。

叶绿素是绿色植物中广泛存在的最主要色素,在光合作用中发挥着重要的生理功能,叶绿素含量的高低直接影响植株的光合强度,从而影响植株的生长^[19]。本试验表明,低浓度 SNP 提高了叶绿素含量,同时还提高了干质量、多糖产量。樊洪泓等研究也发现,适宜浓度的 SNP 浓度提高了霍山石斛

的叶绿素含量、可溶性蛋白含量、苯丙氨酸解氨酶活性,进一步促进了生物碱的合成^[17]。Leshem 等发现,外源 NO 处理可促进豌豆叶片的增大,有利于光合作用^[20]。邵瑞鑫等研究也发现,经过低浓度 SNP 处理可以明显改善小麦叶片的光合性能,从而促进地上部分干物质的积累^[21]。因此,可能是因为 NO 促进了铁皮石斛类原球茎叶绿素的合成,从而增强了其光合作用,有利于其生长,同时也促成了葡萄糖、果糖、蔗糖等多糖合成的前体物质的增加,进而促进了干物质的积累和多糖的合成。

之前的研究表明,NO 参与了植物次生代谢产物的合成调控。本试验也证明,适宜浓度的外源 NO 能够促进铁皮石斛类原球茎多糖产量的提高。张磊等在研究外源 NO 对人参愈伤组织次生代谢产物的影响时也发现,NO 可以促进多糖和皂苷的积累^[22],与本研究结果一致。金青等试验表明,外源 NO 作用杂交石斛类原球茎,刺激类原球茎内源激素水平变化,从而诱导次生生物碱的合成与积累^[23]。本试验中,NO 作为信号分子参与了铁皮石斛类原球茎多糖的代谢,但是由于多糖的代谢途径尚不明确,因此关于 NO 对其作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李玲,邓晓兰,赵兴兵,等. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 肿瘤药学,2011,1(2):90-94.
- [2] 华允芬. 铁皮石斛多糖成分研究[D]. 杭州:浙江大学,2005.
- [3] 李亚芳,张晓华,孙国明. 石斛中总生物碱和多糖的含量测定[J]. 中国药事,2002,16(7):426-428.
- [4] 唐娅梅,张臣良,苏兵,等. 铁皮石斛多倍化诱导与鉴定研究[J]. 北方园艺,2010(17):147-149.
- [5] 高正华,杨兵勋,陈立钻. 铁皮石斛的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2008,25(增刊2):692-695.
- [6] 何铁光,杨丽涛,李杨瑞,等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCPPIa-1 对氧自由基和脂质过氧化物的影响[J]. 天然产物研究与开发,2007,19(3):410-414.
- [7] 樊洪泓,李廷春,李正鹏,等. 强光胁迫下外源 NO 对霍山石斛叶绿素荧光和抗氧化系统的影响[J]. 园艺学报,2008,35(8):1215-1220.
- [8] 金青,蔡永萍,林毅,等. NO 对石斛类原球茎内源激素水平及生物碱积累的影响[J]. 核农学报,2010,24(6):1291-1296.
- [9] 周永斌,殷有,苏宝玲,等. 外源一氧化氮供体对几种植物种子的萌发和幼苗生长的影响[J]. 植物生理学报,2005,41(3):316-318.
- [10] 刘建新,王鑫,雷蕊霞. 外源一氧化氮供体 SNP 对黑麦草种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 生态学杂志,2007,26(3):393-398.
- [11] Modolo L V, Cunha F Q, Braga M R, et al. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor[J]. Plant Physiology,2002,130(3):1288-1297.
- [12] 徐茂军. NO 调控植物细胞次生产物合成及其信号转导机制研究[D]. 杭州:浙江大学,2005.
- [13] 李合生. 现代植物生理学学习实验指南[M]. 北京:高等教育出版社,2007.
- [14] 叶余原. 超声法提取铁皮石斛多糖工艺的研究[J]. 中药材,2009,32(4):617-620.

徐昕彤,陈宇,卫笑,等.基于AHP法的南京市节约型园林景观满意度评价[J].江苏农业科学,2016,44(4):260-264.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.073

基于 AHP 法的南京市节约型园林景观满意度评价

徐昕彤,陈宇,卫笑,翁以轩

(南京农业大学园艺学院,江苏南京 210095)

摘要:节约型园林是目前我国园林行业贯彻落实国家科学发展观和可持续发展战略的重要举措。针对目前江苏省南京市在园林绿化方面所进行的节约型创新理念的实践,选取南京市3处具有代表性的公园和广场,即青奥村广场、鼓楼广场、午朝门公园,从使用者的角度出发,通过发放问卷调查对园林景观的满意度进行分项测评,并采用AHP法和Delphi法构建满意度评价模型。通过定性与定量、主观与客观结合分析,对目前南京市节约型园林绿化建设中存在的问题提出改进意见。

关键词:节约型园林;满意度评价;AHP法

中图分类号: TU986 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0260-05

21世纪以来,我国城市化进程不断加快,园林建设事业取得了举世瞩目的成就,生态环境质量不断提高,人居环境得到持续优化。同时,由于我国人均资源短缺,使得可持续环境建设与由此造成的资源浪费产生了巨大的矛盾。因此,为遵循我国资源节约型、环境友好型社会建设的道路,节约型园林的理念应运而生。将这一理念成功运用到生态环境的建设中,将对缓解我国资源短缺的现状起到很大作用。江苏省南京市作为园林绿化的先锋城市,近几年来一直将节约型理念贯彻于园林建设中,尤其是为2014年青年奥林匹克运动会(简称青奥会)规划建设的一批公共绿地,一直受到人们的关注。本研究采用AHP法和Delphi法相结合的方法构建评价模型,对包括青奥村在内的3处公园广场景观进行综合评价,分析人们对景观的满意程度,并从横向和纵向角度分析对比,找出节约型园林建设存在的问题和不足,以期对未来的城市节约型园林建设提供参考和建议。

收稿日期:2015-03-24

基金项目:2014年江苏省高等学校大学生实践创新训练计划。

作者简介:徐昕彤(1993—),女,吉林吉林人,景观学专业。E-mail: 765729278@qq.com。

通信作者:陈宇,博士,副教授,主要从事景观园林规划设计,园林历史与理论研究。E-mail: qomoo@163.com。

1 材料与方法

1.1 研究地点

在实地走访了南京10处公园广场的基础上,选择3个年份、区域和景观都有很大差异的广场,分别是南京市午朝门公园、南京市青奥村广场和南京市鼓楼广场。午朝门公园位于南京市中山门内御道街北端,因园南有明故宫午门而得名,广场的景观主要以浓郁的绿化氛围为背景,中轴线上以高大的古树银杏树池四周配以青石木条,既保护了古树也为游人提供休憩设施,成为较为市民喜爱、历史悠久的遗址公园。南京市青奥村广场位于南京市建邺区河西新城滨江沿岸,毗邻青奥中心,广场秉承节约型园林的原则,坚持“以最少的用地、最少的用水、最少的财政拨款、选择对周围生态环境最少干扰的绿化模式”,是南京市新兴园林的代表。南京市鼓楼广场现为中山北路等5条主干道和鼓楼街、天津街2条支干道的交会处,是市内重要的交通枢纽^[1],广场内植物景观丰富,环境优美,深受周边市民喜爱。3处广场的修建分别在南京不同的时期、分处南京市不同区域,可以较为全面地代表南京市广场的景观水平。

1.2 研究内容

为了较为科学地反映使用者对广场景观的满意程度,从广场的使用功能角度出发将广场景观分为植物景观、道路交通、景观活动空间、服务设施及景观小品、生态效益5个大项。

[15] 丁宗博,姜宏.保健食品中水溶性多糖的测定[J].预防医学论坛,1999(4):353.

[16] 黄爱霞,余小平. 硝普钠(SNP)对绿豆下胚轴插条生根的影响[J]. 西北植物学报,2003,23(12):2196-2199.

[17] 樊洪泓. 霍山石斛的分子分类、NO生理调节作用研究及FPS基因的克隆[D]. 合肥:安徽农业大学,2008.

[18] 徐茂军,董菊芳,张刚. NO对金丝桃悬浮细胞生长及金丝桃素生物合成的促进作用研究[J]. 生物工程学报,2005,21(1):66-70.

[19] 张怀斌. 叶绿素的光学性质及其应用[D]. 济南:山东师范大学,2008.

[20] Lessem Y Y, Haramaty E. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage [J]. Journal of Plant Physiology, 1996, 148(3/4):258-263.

[21] 邵瑞鑫,上官周平. 外源NO调控小麦幼苗生长与生理的浓度效应[J]. 生态学报,2008,28(1):302-309.

[22] 张磊,杨世海. 外源NO对人参愈伤组织次生代谢产物的影响[J]. 人参研究,2010,22(1):5-9.

[23] 金青,蔡永萍,林毅,等. NO对石斛类原球茎内源激素水平及生物碱积累的影响[J]. 核农学报,2010,24(6):1291-1296.