

陈小强,李 奔,王景太,等. 水杨酸对四棱石斛试管苗生长及多糖合成的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(4):50-52.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.04.012

# 水杨酸对四棱石斛试管苗生长及多糖合成的影响

陈小强,李 奔,王景太,朱立媛,肖丽君,孙 宁,王东元,覃美运  
(天津农学院农学与资源环境学院,天津 300384)

**摘要:**利用植物组织培养技术,对含有不同浓度 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)配比的培养基进行筛选,在最适激素浓度的培养基基础上,施加不同浓度水杨酸培养四棱石斛试管苗,测定不同时期四棱石斛试管苗的多糖含量,从而确定适宜四棱石斛生长和多糖含量较高的水杨酸与激素浓度的最佳配比方案。结果表明,水杨酸浓度为 20 μmol/L 时多糖含量达到最大值。由结果可知,适宜四棱石斛试管苗生长并促进其多糖合成的培养基是 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L NAA + 6.5 g/L 琼脂 + 20 g/L 蔗糖 + 2 g/L 活性炭 + 20 μmol/L 水杨酸。

**关键词:**四棱石斛;水杨酸;多糖;试管苗;激素

**中图分类号:** S184;S567.901      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2018)04-0050-03

四棱石斛(*Dendrobium tetragonum*)属兰科石斛属,具有重要观赏价值和药用价值<sup>[1]</sup>。近几年来,随着药用石斛开发利用的不断深入和国内外需求量的逐年增加,我国野生四棱石斛资源遭到了严重破坏。在自然条件下四棱石斛能传粉结果,但结果率很低;能进行种子繁殖和营养繁殖,但繁殖速率低下,自然更新能力差。人工授粉可以大大提高多数石斛的结果率,但操作上费时费力;而植物组织培养技术可以在短时间内大批量地培育出所需要的植物新个体,还可以防止植物病毒的危害,极大地提高了农业生产效率,对于四棱石斛野生资源的保护和扩大栽培及其综合利用具有极其重要的意义。

四棱石斛是传统名贵中药材且为上品,经过国内外学者几十年来对石斛的药理研究,发现石斛中主要的药用成分是生物碱和多糖<sup>[2]</sup>。其中,多糖属于活性多糖的一种,是石斛的主要次生代谢产物,具有降血糖、抗肿瘤、免疫调节、抗氧化等多种功能<sup>[3]</sup>。

顾慧芬等的研究表明,铁皮石斛组培苗和野生品多糖类型和含量基本相同<sup>[4]</sup>。高建平等研究报道,铁皮石斛组织培养物原球茎具有促进模型鼠体内淋巴细胞转化的作用且其作用与原药材相似<sup>[5]</sup>。这些研究都表明,以组织培养物代替原植物作药用是可行的。

水杨酸(salicylic acid,简称 SA)是一种重要的能够激活植物过敏反应和系统获得性抗性的内源信号分子,能够促进与植物防卫反应有关的次级代谢产物的高水平合成<sup>[6]</sup>。有试验表明,水杨酸对离子吸收、膜的通透性以及一些重要代谢过程起调控作用,可以促进玉米胞内可溶性糖向多糖转化,增

加胞内多糖的含量<sup>[7]</sup>。王博等的试验结果表明,随着水杨酸浓度的增加,霍山石斛类原球茎生长受到一定程度的抑制,多糖的合成也表现出先增加后降低的现象,说明水杨酸促进多糖的合成有一个适合的作用浓度<sup>[8]</sup>。

本研究以四棱石斛试管苗为材料,通过植物组织培养技术研究不同浓度水杨酸在一定的激素[6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)]浓度水平调节下对四棱石斛类试管苗生长、多糖合成的影响,旨在获得适合四棱石斛生长且促进多糖合成的水杨酸与激素浓度的最佳配比方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

四棱石斛试管苗,由天津农学院植物细胞工程研究中心提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 不同种类及浓度的植物激素对四棱石斛试管苗生长的影响** 利用植物组织培养技术对四棱石斛试管苗进行扩繁,利用双因素法选择初步培养试管苗的培养基配方为 MS + 6-BA + NAA + 6.5 g/L 琼脂 + 20 g/L 蔗糖 + 2 g/L 活性炭。将 6-BA 和 NAA 的浓度分别设为 3 个梯度,另设 1 组空白对照(均不添加 6-BA、NAA),共 10 组,每组 5 次重复,选择最适合四棱石斛试管苗生长的培养基,四棱石斛试管苗增殖培养的激素配比见表 1。

表 1 四棱石斛试管苗增殖培养的激素配比

处理	NAA 浓度(mg/L)	6-BA 浓度(mg/L)
1	0.2	0.5
2	0.4	0.5
3	0.6	0.5
4	0.2	1.0
5	0.4	1.0
6	0.6	1.0
7	0.2	1.5
8	0.4	1.5
9	0.6	1.5
10	0	0

收稿日期:2016-07-13  
基金项目:天津市高等学校创新团队培养计划(编号:TD12-5017);  
天津农学院大学生创新创业训练计划(编号:201610061115、201610061124)。  
作者简介:陈小强(1976—),女,天津人,博士,副教授,主要从事植物细胞工程及遗传育种相关工作;Tel:(022)23789376,E-mail:chenxia9663@126.com。共同第一作者:李 奔(1995—),女,山西太原人,研究方向为种子科学与工程;E-mail:1206996153@qq.com。

1.2.2 不同浓度水杨酸对四棱石斛试管苗生长的影响 选择最适合四棱石斛试管苗生长的激素组合后,在此基础上采用单因素法向培养基中加入 3 个浓度梯度的水杨酸(10、20、30  $\mu\text{mol/L}$ )进行调节,另设 1 组空白对照(1.0  $\text{mg/L}$  6-BA + 0.4  $\text{mg/L}$  NAA),共 4 组配比,依次编号为 1、2、3、4,每组 5 次重复。根据四棱石斛试管苗生长的不同阶段所测的多糖含量筛选出促进多糖生成的培养基配方。

1.2.3 四棱石斛试管苗多糖的提取及测定 多糖的测定采用苯酚-硫酸法<sup>[9]</sup>。根据李满飞等的方法<sup>[10]</sup>进行改良,四棱石斛多糖的测定方案如下:精确称取四棱石斛样品 2 g,研磨,放入烧杯中,量取 20 mL 蒸馏水加入其中,煮 1 h,在离心机中于 3 000  $\text{r/min}$  离心 5 min,收集上清液待用;将滤渣放入烧杯,再加入 20 mL 蒸馏水,进行二级提取 1 h,之后离心收集上清液,并测量 2 次提取液的体积;吸取 0.1 mL 提取液于试管中,分别稀释 10、20、30 倍,取 1 mL 稀释液,加入 1 mL 5% 苯酚,摇匀,再精确加入 5 mL 浓硫酸,边摇边加入,冷却至室温。空白对照组为 1 mL 蒸馏水 + 1 mL 苯酚 + 5 mL 浓硫酸,用 754 型分光光度计在 490 nm 处测定其吸光度。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度配比下四棱石斛试管苗生长状况的研究

在不同激素调节下,四棱石斛生长状况见表 2。2、3、4、5、6、8 号培养基培养的试管苗生长明显大于 1 cm,适宜四棱石斛试管苗生长,其中,5 号培养基的生长状况最好,叶片繁茂茂盛,优于其他组,详见图 1、图 2。因此,可以确定最适合四棱石斛生长的激素浓度配比方案如下:MS + 1.0  $\text{mg/L}$  6-BA + 0.4  $\text{mg/L}$  NAA + 6.5  $\text{g/L}$  琼脂 + 20  $\text{g/L}$  蔗糖 + 2  $\text{g/L}$  活性炭。在接下来的水杨酸调节四棱石斛生长的试验中将应用此组激素浓度配比方案。

表 2 不同激素调节下四棱石斛试管苗的生长状况

培养基编号	培养 15 d	培养 30 d	培养 45 d	培养 60 d
1	+	+	+	++
2	+	++	+++	+++
3	+	++	++	+++
4	+	++	+++	+++
5	++	+++	+++	++++
6	+	++	+++	+++
7	+	++	++	++
8	+	++	+++	+++
9	+	+	++	++
10	+	+	++	+++

注:“+”代表长势一般;“++”代表长势良好;“+++”代表长势优;“++++”代表长势最好。表 3 同。

2.2 不同浓度水杨酸处理下四棱石斛生长状况的研究

培养 60 d 内不同浓度水杨酸处理下四棱石斛试管苗的生长状况见表 3。培养 15 d 时试管苗生长情况无明显变化,种苗矮小,叶色较浅,培养 30 d 时长势较为明显,种苗长高,培养 45 d 时试管苗长势更好,其中第 2 组优于其他组,培养 60 d 时第 2 组试管苗长势最好,叶色变为深绿色,生长状况茂密繁多。第 2 组在培养 60 d 时四棱石斛试管苗的长势见图 3。

2.3 水杨酸对四棱石斛试管苗多糖含量的影响

2.3.1 绘制标准曲线 采用标准葡萄糖,用苯酚-浓硫酸法测定其含量,如果测定数据不在测量范围内,可以进行稀释或



图1 四棱石斛试管苗培养 15 d 的生长势



图2 四棱石斛试管苗培养 60 d 的生长势

表 3 不同水杨酸配比下四棱石斛的生长状况

组别	培养 15 d	培养 30 d	培养 45 d	培养 60 d
1	+	+	+	++
2	+	++	+++	++++
3	+	+	++	+++
4	+	+	+	++



图3 四棱石斛试管苗在浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  水杨酸调节下培养 60 d 的生长势

者浓缩来调至测量范围,测定的标准曲线为  $y = 2.6087x - 0.0006$ ,  $r^2 = 0.9993$  ( $y$  表示吸光度; $x$  表示浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ),详见图 4。

2.3.2 多糖含量测定结果 多糖含量 = [上清液体积( $\text{mL}$ )  $\times$  稀释倍数  $\times$  多糖浓度( $\mu\text{g/mL}$ )] / 质量( $\text{mg}$ )  $\times 100\%$ 。上清液体积为 2 次水提分离的体积总和;稀释倍数分别为 10、20、30,目的是使数据达到测量范围。经过 60 d 的生长,测量结果以稀释 10 倍为准,稀释 20、30 倍的数据不在测量范围内,

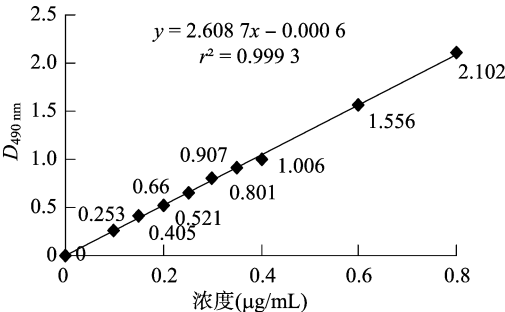


图4 多糖含量标准曲线

应舍弃。不同发育阶段、不同水杨酸浓度下四棱石斛试管苗多糖含量见表4。结果表明,经过60 d的培养处理,多糖含量达到最高值,水杨酸对四棱石斛多糖的合成具有促进作用,其中浓度为20 μmol/L的水杨酸促进作用最明显。因此可知,最适宜试管苗生长并促进多糖合成的培养基是MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA+6.5 g/L 琼脂+20 g/L 蔗糖+2 g/L 活性炭+20 μmol/L 水杨酸。

表4 不同水杨酸浓度下四棱石斛多糖含量

处理时间 (d)	多糖含量(%)			CK
	10 μmol/L 水杨酸	20 μmol/L 水杨酸	30 μmol/L 水杨酸	
15	0.7	0.8	0.6	0.4
30	0.9	1.2	0.8	0.5
45	1.2	1.8	1.0	0.8
60	1.7	2.1	1.5	1.1

3 讨论与结论

3.1 不同激素浓度对四棱石斛试管苗生长的影响

激素6-BA可以促进细胞分裂并且可以诱导芽的分化,而NAA则主要诱导植物细胞的分裂<sup>[11]</sup>。试管苗的分化和增殖不仅被单一激素的浓度所影响,还与激素种类、浓度配比有关,不同的NAA、6-BA浓度配比可以对石斛试管苗生长产生不同影响。过低浓度的NAA、6-BA并不能对植株的快繁产生明显影响,而较高浓度的激素也会对植株的生长产生抑制作用。蒋向辉等采用正交试验设计方法探讨不同激素与浓度组合对铁皮石斛愈伤诱导、芽分化与根诱导的影响,结果表明,合适的6-BA与NAA配比可诱导产生不定芽<sup>[12]</sup>。宋顺等研究了激素对铁皮石斛试管苗生长的影响,结果表明,当NAA:6-BA为1:5时,铁皮石斛分化率达80%<sup>[13]</sup>。本试验也证明了这点,只有在适宜的浓度范围内(1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA),四棱石斛试管苗的快速繁殖才会产生最好的效果。在本研究中,最适合四棱石斛生长的激素浓度配比的方案为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA+6.5 g/L 琼脂+20 g/L 蔗糖+2 g/L 活性炭。

3.2 不同浓度水杨酸对四棱石斛试管苗生长的影响

研究表明,水杨酸能够在多种植物的抗非生物胁迫和抗病方面起作用<sup>[6]</sup>,但是水杨酸在对四棱石斛的调节方面的研究尚未见报道。王静等以铁皮石斛为材料,通过外施不同浓度的水杨酸,检测其有关渗透调节物质、脯氨酸、叶绿素a、可溶性糖、叶绿素b和蛋白质含量,从而为选择适宜浓度的水杨酸、从生理角度提高铁皮石斛的产量提供理论依据<sup>[14]</sup>。本试验结果显示,水杨酸确实对四棱石斛试管苗的生长有促进作

用,同期对照下分化苗更多,生长更茂密,这一研究结果可为四棱石斛大批量生产提供理论依据。

3.3 不同浓度水杨酸对四棱石斛试管苗多糖含量的影响

多糖类成分是石斛中具有抗肿瘤作用和促进免疫的成分。近年来,对于石斛属次生代谢产物积累情况的研究,主要集中在通过改变培养条件去提高石斛次生代谢产物量。研究表明,诱导子浓度在一定范围内对石斛类胞内多糖的合成具有显著的促进作用<sup>[15]</sup>。水杨酸是一种特殊的生理生化信号,在石斛次生代谢过程中,能有选择性、专一和快速地诱导一些特定基因的翻译表达,从而调节细胞中代谢产物的合成<sup>[16]</sup>。也可能因为水杨酸还具有抗氧化的重要作用,充分为细胞提供良好的代谢环境,从而促进细胞多糖合成。王博等研究表明,水杨酸的浓度控制在50~150 μmol/L范围内对细胞的生长没有明显影响,但是可以明显促进多糖合成<sup>[8]</sup>。本试验研究不同浓度水杨酸对四棱石斛试管苗多糖含量的调节作用,发现水杨酸浓度在20 μmol/L时,多糖含量达到最高值,这为扩大药源和开发新药提供了更多的理论依据。

参考文献:

[1] 吉占和. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[2] 林 萍, 毕志明, 徐 红, 等. 石斛属植物药理活性研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(11): 附19-附22.

[3] 朱 华, 黄学琴, 杨海广, 等. 石斛属多糖的研究进展[J]. 医学导报, 2007, 26(12): 1476-1479.

[4] 顾慧芬, 忻晓君, 周文婷, 等. 铁皮石斛试管苗快速生长与栽培研究及多糖含量测定[J]. 中成药, 1999, 21(12): 658-659.

[5] 高建平, 金若敏, 吴耀平, 等. 铁皮石斛原球茎与原药材免疫调节作用的比较研究[J]. 中药材, 2002, 25(7): 487-489.

[6] Raskin I. Role of salicylic acid in plants[J]. Ann Rev Plant Physiol Mol Biol, 1992, 43: 439-463.

[7] Khodary S E A. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants[J]. Int J Agri Biol, 2004, 6(1): 5-8.

[8] 王 博, 潘利华, 罗建平, 等. 水杨酸对霍山石斛类原球茎细胞生长及多糖合成的影响[J]. 生物工程学报, 2009, 25(7): 1062-1068.

[9] Zhong J J, Wang D J. Improvement of cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of Panax notoginseng: Cu<sup>2+</sup> effect[J]. Journal of Biotechnology, 1996, 46(1): 69-72.

[10] 李满飞, 平田义正. 中药石斛类多糖的含量测定[J]. 中草药, 1990, 21(10): 10-12.

[11] 李 莹. 铁皮石斛组培及次生代谢物积累规律的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2012: 6.

[12] 蒋向辉, 余朝文, 王善粉, 等. 不同激素浓度对铁皮石斛高效快繁体系的影响[J]. 江苏农业科学, 2010(1): 76-78.

[13] 宋 顺, 许 奕, 王必尊, 等. 不同培养基成分对铁皮石斛组织培养的影响[J]. 中国农学通报, 2013, 29(13): 133-139.

[14] 王 静, 吴泽芳, 唐小利, 等. 水杨酸对铁皮石斛幼苗部分生理指标的影响[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(1): 75-76, 79.

[15] 洪萨丽. 诱导子对霍山石斛悬浮培养原球茎生长和生物碱的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009: 6-7.

[16] 孟雪娇, 邸 昆, 丁国华. 水杨酸在植物体内的生理作用研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(15): 207-214.