



窦全丽,杨秋婷,张仁波,等.吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中生理生化指标变化[J].黑龙江农业科学,2022(5):91-96.

吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中生理生化指标变化

窦全丽¹,杨秋婷²,张仁波¹,周远平¹,唐小迪¹

(1. 遵义师范学院 生物与农业科技学院,贵州 遵义 563000; 2. 澜沧县第三民族中学,云南 普洱 665000)

摘要:为提高吊石苣苔叶片组织培养效率,以同一生长期的吊石苣苔叶片为外植体进行组织培养,测定培养材料中的总蛋白质、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和丙二醛(MDA)等指标,分析吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中的生理生化指标变化情况。结果表明:随着叶片的发育,SOD和POD活性总体呈先升后降再升的变化趋势,均在14 d达到峰值。MDA含量在培养14~21 d总体上升,到培养28 d由于POD和SOD含量的升高,清除细胞内的活性氧,使MDA含量降低。总蛋白质含量前14 d无明显变化,培养21 d含量达到峰值,之后再降低,整体呈先升后降的趋势。可溶性糖含量培养后呈先升后降再升的趋势,培养28 d达到峰值。

关键词:吊石苣苔;叶片;愈伤组织诱导;生理生化指标

吊石苣苔(*Lysionotus pauiiflorus* Maxim.)为苦苣苔科(Gesneriaceae)吊石苣苔属的常绿小灌木,又叫石豇豆、石吊兰。其花形特别、花淡紫色,开花时美丽且雅致;叶轮生常绿,成型后,株形紧凑而清爽^[1]。由于吊石苣苔具有耐阴、不怕晒、四季常绿、花色淡雅、花型耐看等特点,是一种具有开发潜力的野生观赏植物^[2]。吊石苣苔也是贵州、云南等少数民族地区常用的中药材,研究表明,其具有抑菌、抗炎、抗病毒、止咳、祛痰、平喘等药用功能^[3],是一种极具开发价值的野生植物资源。贵州省以吊石苣苔为主要原料的药品开发已较为成熟,目前已有多种以该植物为主要原料的中成药生产,如贵州汉方药业、神奇制药等生产的石吊兰片、贵阳德昌祥药业的复方岩连片、贵州飞云岭药业的益肺止咳胶囊、贵州光正制药的岩果止咳液、贵州民族药业的马兰感寒胶囊、贵州科辉制药生产的咳康含片等。目前,已有吊石苣苔化学成分^[3]、扦插繁殖^[4]与引种栽培^[5]等方面的研究,尚鲜见吊石苣苔组培材料发育过程生理生化指标变化的相关研究报道。为此,本研究在前期探索组织培养育苗技术的基础上,通过测定吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中不同培养时间的可

溶性糖、总蛋白、丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性,初步探讨愈伤组织诱导过程中各生理生化指标与愈伤组织生长发育的关系,为吊石苣苔的组培育苗技术改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 从野外移栽回实验室的吊石苣苔植株,选取生长健康、无病、无虫斑的叶片作为外植体材料。2019年6月采集叶片,经过常规消毒处理后,分别接入愈伤组织诱导培养基(MS+30 g·L⁻¹蔗糖+6 g·L⁻¹琼脂+1.0 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹NAA)中进行培养。培养条件为温度(23±1)℃,光照12 h·d⁻¹,光照强度3 000 lx。

1.1.2 仪器 超净工作台(VS-840K-U,苏州尚田洁净技术有限公司)、智能人工气候箱(LHP-500H,上海德洋意邦仪器有限公司)、电子天平(精度1/10 000,JA303,上海浦春计量仪器有限公司)、高速冷冻离心机(TGL-16aR,上海安亭科学仪器厂)、721紫外分光光度计(UV-750C,上海欣茂仪器有限公司)、96孔板、EP管、多功能酶标仪(Infinite F200 Pro,瑞士帝肯)、移液枪(艾本德)等。

1.2 方法

1.2.1 取材及预处理 每隔7 d取样一次,共取4次。随机称取0.1 g样品(3次重复),装入离心

收稿日期:2022-01-03

基金项目:遵义市科技局项目(遵市科合计[2018]11号);遵义师范学院博士基金(遵师BS[2018]17号)。

第一作者:窦全丽(1979—),女,硕士,教授,从事野生植物资源保护与利用研究。E-mail:douquanli@163.com。

管中,按照不同指标测定方法的要求加入适量 pH7.0 的磷酸缓冲溶液,冰浴研磨,再加入相应的试剂,用高速冷冻离心机离心,酶液在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮存备用。

1.2.2 测定项目及方法 使用南京建成塞浩科技有限公司的试剂盒,参照说明书的测定方法测定可溶性糖、总蛋白、MDA 的含量、SOD 活性、POD 活性,3 次重复。

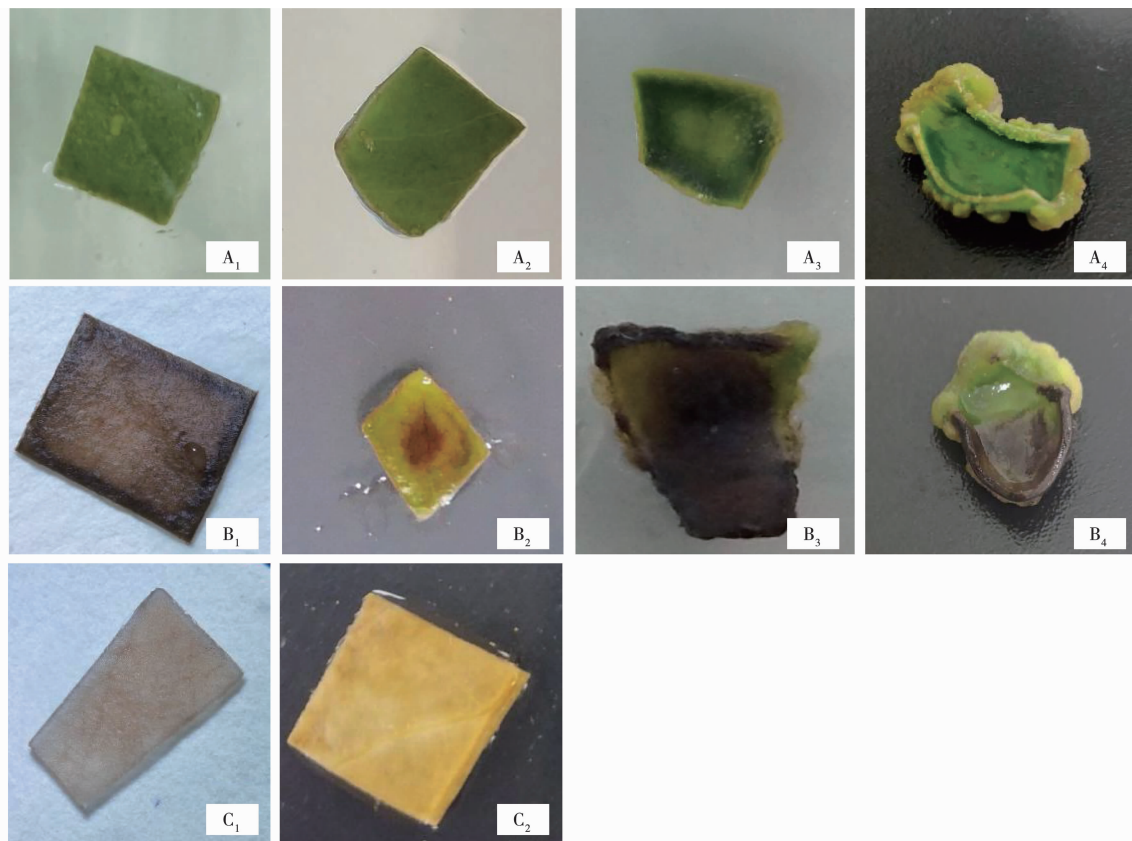
1.2.3 数据分析 试验所得数据用 Excel 2019 和 SPSS 22.0 进行统计分析,用 Origin 软件制图。

2 结果与分析

2.1 叶片愈伤组织形态特征

由图 1 可知,吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中出现了发育正常、褐化和玻璃化 3 种生长情况。叶片培养 7 d 后,发育正常的叶片颜色翠绿,生长状态良好,外形上与培养前相比,略有膨大

(图 1A₁);发生褐化的叶片组织失绿变为棕黄色(图 1B₁);发生玻璃化的叶片明显膨大,边缘开始增厚,边缘出现增生细胞(图 1C₁)。叶片培养 14 d 后,正常材料叶片明显膨大,边缘开始增厚,边缘出现增生细胞(图 1A₂);褐化叶片也明显膨大,边缘开始出现增生细胞,但叶片失绿,叶片中心出现棕黄色斑块(图 1B₂);玻璃化叶片,与培养 7 d 的玻璃化材料相比较厚(图 1C₂)。培养 21 d 后,正常叶片可看到明显愈伤组织,这阶段愈伤组织生长旺盛(图 1A₃);褐化叶片,也有明显的愈伤组织,但叶片表面出现大面积褐化情况(图 1B₃)。培养 28 d 后,发育正常的叶片,愈伤组织显著增加(图 1A₄);褐化叶片的一部分愈伤组织正在生长,一部分叶片发生褐化,呈棕黑色(图 1B₄)。培养 21 和 28 d 均未取到玻璃化材料,可能该叶片愈伤组织诱导过程中前期更易出现玻璃化。



A₁~A₄. 发育正常 7, 14, 21 和 28 d 的叶片; B₁~B₄. 褐化 7, 14, 21 和 28 d 的叶片; C₁~C₂. 玻璃化 7 和 14 d 的叶片。

图 1 诱导过程中不同时期叶片愈伤组织培养材料的形态特征

2.2 组培正常发育材料的生理指标变化

2.2.1 POD 活性 由图 2 可知,愈伤组织诱导过程中,POD 活性总体呈先上升后下降再上升的

变化趋势。材料的 POD 活性从开始培养至培养 7 d 缓慢上升,7~14 d 急剧升高,培养 14 d 到达峰值($802.888\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$),这可能是因为此期培养材

料边缘开始出现增生细胞,细胞内活性氧增加;培养 21 d POD 活性又大幅下降,此时材料已出现明显愈伤组织。培养 21~28 d 又上升,此时期愈伤组织生长旺盛。

2.2.2 总蛋白质含量 从开始培养至培养 14 d,材料中总蛋白质含量没有显著变化($P>0.05$)。培养 14~21 d 材料总蛋白质含量迅速升高并达到峰值($454.185\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)(图 2)。说明在此阶段培养材料中蛋白质不断合成并逐渐积累。培养 28 d 总蛋白质含量下降,可能是因为培养基内营养成分消耗使得营养供应不足,此时应及时进行继代培养。

2.2.3 SOD 活性 培养前的吊石苣苔叶片 SOD 活性较高,培养 7 d 活性有所下降($P<0.05$),随后呈先升后降再升的趋势,即在培养 7~14 d 逐渐升高并在培养 14 d 达到高峰($1\,275.468\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$),这说明此期培养材料细胞内活性氧增加。培养 14~21 d SOD 活性急速下降,并在培养 21 d 活性达到最低($278.784\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$),这阶段是出现明显愈伤组织的阶段,SOD 活性下降,此时外植体愈伤组织大量生长,叶片膨胀比较明显。培养 21~28 d SOD 活性又略有升高,但培养 28 d 材料的 SOD 活性仍显著低于培养 14 d($P<0.05$)(图 2)。

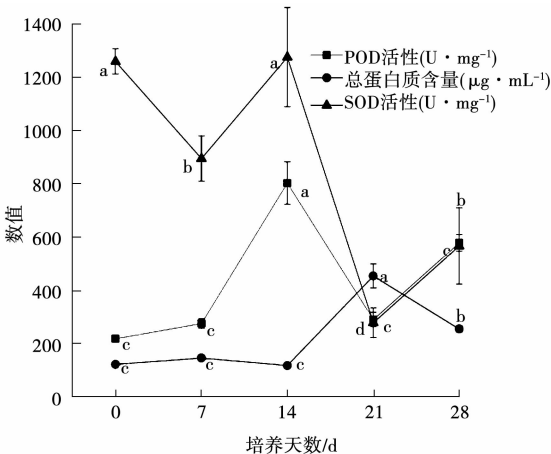


图 2 正常发育材料的 POD、SOD 活性和总蛋白质含量变化

注:不同小写字母代表 0.05 水平差异显著。下同。

2.2.4 MDA 含量 由图 3 可知,培养 0~7 d 材料中 MDA 含量显著下降,这可能是因为取样叶片相对较老。随着愈伤组织诱导时间的增加,细胞中 MDA 含量逐渐上升,并在培养 21 d 达到峰值($81.515\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$),然后又下降,但培养 28 d 材料的 MDA 含量仍显著高于培养前。

2.2.5 可溶性糖含量 在整个叶片愈伤诱导过程中材料可溶性糖含量变化较平缓。培养 7 d 叶片可溶性糖含量显著低于培养前材料,培养 7~14 d 可溶性糖含量又显著升高,然后缓慢下降,培养 21 d 后再逐渐上升,至培养 28 d 时达到峰值($13.313\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。

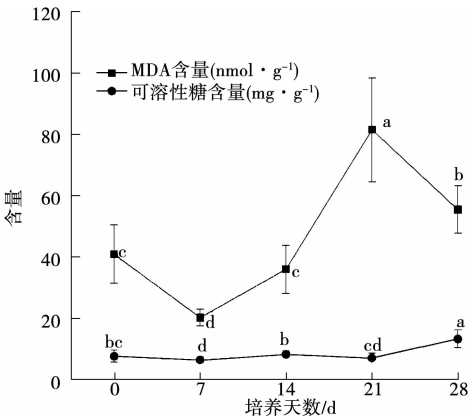


图 3 正常发育材料的 MDA 和可溶性糖含量变化

2.3 相同培养时间内不同状态培养材料的生理生化指标值比较

2.3.1 培养 7 d 由表 1 可知,POD 活性表现为正常材料>褐化材料>玻璃化材料,且 3 种材料间差异显著。总蛋白质含量表现为正常材料>褐化材料>玻璃化材料,SOD 活性表现为褐化材料>正常材料>玻璃化材料,但相互间均无显著差异。MDA 含量表现为褐化材料>玻璃化材料>正常材料,褐化材料显著高于玻璃化和正常材料,而正常材料与玻璃化材料无显著差异。可溶性糖含量表现为玻璃化材料>褐化材料>正常材料,3 种材料间差异显著。说明在培养初期,褐化和玻璃化使得材料中可溶性糖含量增加,且玻璃化材料增加更明显。

2.3.2 培养 14 d POD 活性与培养 7 d 表现相同,正常材料>褐化材料>玻璃化材料,3 种材料间差异显著。总蛋白质含量表现为正常材料>玻璃化材料>褐化材料,正常材料含量显著高于褐化和玻璃化材料。SOD 活性表现为正常材料>玻璃化材料>褐化材料,3 种材料间差异显著。MDA 含量表现为褐化材料>正常材料>玻璃化材料,褐化材料显著高于正常材料和玻璃化材料,但正常材料与玻璃化材料无显著差异。可溶性糖

含量则表现为正常材料显著高于褐化和玻璃化材料,褐化和玻璃化材料之间无显著差异。

2.3.3 培养 21 d 褐化材料的 POD、SOD 活性和可溶性糖含量均显著高于正常材料。褐化材料的 MDA 含量也高于正常材料,但无显著差异。正常材料的总蛋白质含量显著高于褐化材料。

表 1 叶片愈伤组织诱导过程中不同生长状态材料的生理生化指标值

培养时 间/d	材料	POD 活性/ (U·mg ⁻¹)	总蛋白质含量/ (μg·mL ⁻¹)	SOD 活性/ (U·mg ⁻¹)	MDA 含量/ (nmol·g ⁻¹)	可溶性糖含量(湿重)/ (mg·g ⁻¹)
7	正常	276.140 a	146.664 a	895.139 a	20.303 b	6.505 c
	褐化	242.961 b	139.563 a	940.307 a	29.697 a	9.909 b
	玻璃化	67.561 c	137.202 a	879.628 a	22.424 b	12.114 a
14	正常	802.888 a	152.972 a	1275.468 a	31.818 b	8.313 a
	褐化	483.309 b	126.162 b	815.361 c	39.091 a	7.180 b
	玻璃化	188.562 c	132.471 b	964.953 b	26.364 b	6.588 b
21	正常	290.749 b	454.185 a	278.784 b	39.697 a	7.123 b
	褐化	424.632 a	224.924 b	460.123 a	43.333 a	14.339 a
28	正常	578.359 a	255.479 a	566.806 a	32.424 b	13.313 a
	褐化	448.098 b	230.641 b	717.546 a	40.303 a	13.148 a

注:同列数据后不同小写字母表示相同培养时间内不同材料间生理生化指标的差异达显著水平($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中 POD 和 SOD 活性的变化

POD 和 SOD 均为植物体内的抗氧化酶,它们的协同作用能够防御和减缓活性氧及其他过氧化自由基过量累积对细胞系统的伤害,从而增强植物的抵抗能力^[6]。吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中 POD 活性总体上是先升后降再升的变化趋势,其变化与雷公藤嫩叶^[6]、怀山药茎段^[7]、甜瓜子叶和下胚轴^[8]等材料愈伤组织诱导过程中 POD 活性变化相似。培养 0~7 d,吊石苣苔材料 POD 活性无显著变化,SOD 活性出现显著降低,此时期材料处于接种初期,可能尚未适应培养环境,代谢不活跃,这与野葛块根愈伤组织培养初期特点相似^[9]。在培养 7~14 d 期间,材料中 POD 和 SOD 活性均显著升高,并在 14 d 达到峰值,此时材料出现明显膨大,边缘出现明显增生细胞,合成代谢变得旺盛,可能产生了较多的活性氧,从而刺激了 POD 的生成^[10]。培养 14~21 d 叶片愈伤

2.3.4 培养 28 d 正常材料的 POD 活性和总蛋白质含量均显著高于褐化材料。正常材料的可溶性糖含量也高于褐化材料,但无显著差异。褐化材料的 MDA 含量显著高于正常材料,SOD 活性也高于正常材料,但无显著差异。

组织进入旺盛生长阶段,此时细胞内各生理代谢过程顺利进行,POD 和 SOD 活性呈下降趋势。培养 21~28 d,POD 和 SOD 活性又上升,这可能由于愈伤组织大量生长,导致两种酶活性增加。

3.2 吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中总蛋白质含量的变化

植株总蛋白质含量可以反映植株生理活性的强弱,是植物体内重要的结构和功能物质,大多数理论认为叶片衰老时伴随蛋白质含量的下降^[11]。本试验中材料培养前的总蛋白质含量偏低,可能与试验时吊石苣苔叶片较老有关。培养前期,材料总蛋白质含量一直维持较低水平,培养 14 d 时含量甚至也略有降低,这可能是由于材料中膜脂过氧化程度加剧,MDA 含量增加,导致蛋白质合成受阻^[12]。培养 14~21 d,材料总蛋白质含量显著升高,此时愈伤组织细胞生长活跃,愈伤组织大量增加,蛋白质不断合成并累积。与怀山药^[7]、甜瓜^[8]、野葛^[9]、黄独^[10]等培养材料相似,在吊石苣苔叶愈伤组织诱导末期,蛋白质含量下降,可能是培养 14~21 d 累积的 MDA 抑制了蛋白质的合

成,也可能是培养基内营养成分消耗使得营养供应不足,影响了蛋白质合成;同时,此期愈伤细胞的快速增长造成了细胞内或培养基中有害成分的累积,合成与代谢能力均开始下降,为适应这一改变,材料就会降解多余的蛋白质,使细胞内蛋白质含量再次下降^[9]。

3.3 吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中 MDA 含量的变化

MDA 是衡量膜脂过氧化作用的一个重要指标^[11],其含量反映了植物器官衰老以及受到逆境伤害的程度^[13]。本试验中,培养前吊石苣苔叶片 MDA 含量较高,这可能是因为取样叶片相对较老的原因。吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中,材料中 MDA 含量呈先降后升又降的趋势。愈伤组织诱导 7~21 d,材料中 MDA 含量显著升高,可能是由于此期间发育加速并产生了大量活性氧,POD 和 SOD 活性下降,愈伤组织消除活性氧和自由基等毒害物的能力降低^[14],使细胞的膜脂过氧化,造成 MDA 含量上升。随着发育到后期,细胞中 POD 与 SOD 酶活力增加,其在降低细胞中的活性氧的同时也减轻膜脂过氧化物的发生,从而使得叶片内 MDA 含量降低。

3.4 吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中可溶性糖含量的变化

可溶性糖是光合作用的主要产物,是其他物质转化的前提^[15],吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中,可溶性糖含量变化有显著差异。培养 0~7 d,材料中可溶性糖含量降低,可能是由于此时外植体尚处于对培养环境的适应期,以消耗自身糖分为主要碳源。培养 7~14 d 材料中可溶性糖含量逐渐升高,此时细胞已适应培养环境,吸收培养基里的糖分,为下一步愈伤组织诱导储存能量。14~28 d,可溶性糖含量稍微下降再上升,并在 28 d 达到峰值,显著高于培养前材料中可溶性糖含量。这与前人研究中愈伤组织诱导初期可溶性糖含量升高、在中期达到高峰、末期又降至与培养前含量相近的变化特点有差异^[9-10],这可能是材料本身差异所致,同时也说明在培养基中添加 30 g·L⁻¹蔗糖完全可以满足吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程的碳源需求。

3.5 吊石苣苔叶片愈伤组织诱导过程中正常、褐化和玻璃化组织差异

不同取材时期,褐化材料的生理生化特性与正常发育材料相比表现出忽高忽低的现象,一方面可能与材料本身发育阶段有关,另一方面也可能与不同阶段所取材料有关,比如有的阶段取材时褐化程度比较高,有的阶段取材时褐化程度低一些,因此,在今后的试验中应尽量选择褐化程度较一致的材料。组培褐化和玻璃化的问题是组织培养中的一大难题,一些研究认为褐化的机制是多酚氧化酶与酚类物质在有氧的条件下被氧化为醌类物质,并抑制了很多酶的活性,从而影响了愈伤组织的正常生长,甚至导致其死亡^[16]。本研究发现,吊石苣苔叶片愈伤组织诱导早期材料有明显玻璃化现象,经过试验探索发现,培养基容器内水分含量过高时易引起玻璃化,可通过增加培养基的琼脂含量以及减少培养箱的温差变化降低外植体玻璃化的发生;褐化则可能出现在吊石苣苔叶片离体培养的各个阶段,有的褐化材料仍可分化出芽,有的同一块材料中部分褐化,未褐化部分的愈伤组织或芽仍可继续生长,可通过切除褐化部分并转接的方式提高材料成活率。在今后的研究中,还需从外植体选择、外植体预处理方式、光照、温度、激素配比、添加抗氧化剂等环节进一步探索降低培养材料褐化率的途径。

4 结论

本研究表明,吊石苣苔叶片接种 0~7 d 尚处于适应阶段,代谢不活跃,各生理生化指标变化不明显,有的指标甚至显著降低。培养 7~14 d,材料在机械损伤和培养条件的双重作用下,代谢变得旺盛,POD 和 SOD 活性迅速升高。培养 14~21 d,愈伤组织进入旺盛生长阶段,细胞内各生理代谢过程顺利进行,蛋白质不断合成并累积,POD 和 SOD 活性呈下降趋势;同时,由于细胞的加速生长产生了大量活性氧,使细胞的膜脂过氧化,造成 MDA 含量上升。培养 21~28 d,愈伤组织大量生长,POD 和 SOD 活性增强,MDA 含量下降,由于愈伤组织大量吸收培养基糖,材料中可溶性糖含量显著升高,但愈伤细胞的快速增长造

成了细胞内或培养基中有害成分的累积,细胞合成与代谢能力均开始下降,材料降解多余的蛋白质,使细胞内蛋白质含量再次下降。

参考文献:

- [1] 刘伟.云南文山吊石苣苔属植物引种驯化初步研究[J].文山师范高等专科学校学报,2009,22(3):114-116.
- [2] 刘伟,曹晓慧.野生与组培吊石苣苔叶绿素含量及其日变化比较[J].北方园艺,2011(20):79-81.
- [3] 冯卫生,李倩,郑晓珂.吊石苣苔的化学成分研究[J].中国药学杂志,2007,42(5):337-338.
- [4] 刘伟,曹晓慧.吊石苣苔扦插繁殖研究[J].北方园艺,2010(2):116-118.
- [5] 刘伟.吊石苣苔的引种与栽培[J].安徽农学通报,2008,14(23):108,130.
- [6] 孙睿,朱留刚,封磊,等.雷公藤愈伤组织的生长特征及内酯醇的积累[J].森林与环境学报,2016,36(3):306-311.
- [7] 陈明霞,郭君丽,李明军,等.怀山药脱分化过程中的生理生化变化的研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),2003,31(1):85-87.
- [8] 辛建华,苑育文,张永华.甜瓜愈伤组织诱导过程中的生理生化变化[J].北方园艺,2007(7):171-172.
- [9] 洪森荣,尹明华,邵兴华.野葛块根愈伤组织形成过程中生理生化指标的变化[J].湖南农业科学,2007(6):64-67.
- [10] 徐卫红,尹明华,洪森荣.黄独愈伤组织诱导及其生理生化指标的测定[J].湖南农业科学,2009(6):53-56.
- [11] 杨淑慎,高俊凤,李学俊.高等植物叶片的衰老[J].西北植物学报,2001,21(6):223-229.
- [12] 雒晓芳,董开忠,牛锋,等.当归愈伤组织褐化前后生理生化的研究[J].中国酿造,2009(5):57-58.
- [13] 喻方圆,徐锡增.植物逆境生理研究进展[J].世界林业研究,2003,16(5):6-11.
- [14] 沈雁,王业桐,曹红星,等.油棕的组织培养及其生理生化研究[J].江西农业学报,2012,24(2):41-42,47.
- [15] 王忠.植物生理学[M].2版.北京:中国农业出版社,2009:512-513.
- [16] 陈凯.植物组织培养中褐变的产生机理及抑制措施[J].安徽农业科学,2004,32(5):1034-1036.

Change of Physiological and Biochemical Indexes During Callus Induction of *Lysionotus pauiflorus* Leaves

DOU Quan-li¹, YANG Qiu-ting², ZHANG Ren-bo¹, ZHOU Yuan-ping¹, TANG Xiao-di¹

(1. Department of Biology and Agricultural Science and Technology, Zunyi Normal College, Zunyi 563000, China; 2. Lancang County Third Nationality Middle School, Puer 665000, China)

Abstract: In order to improve the efficiency of leaf tissue culture of *Lysionotus pauiflorus*, the leaves of *Lysionotus pauiflorus* at the same growth status were used as explants for tissue culture. Physiological and biochemical indexes, such as total protein, superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and malondialdehyde (MDA) were determined, and the changes of physiological and biochemical indexes were analyzed in the callus induction process. The results showed that the activities of SOD and POD increased first, then decreased and then increased, and reached the peak at 14 d of culture. After callus induction, MDA content generally increased during 14-21 d of culture. At 28 d of culture, MDA content decreased by scavenging reactive oxygen in cells due to the increase of POD and SOD activities. There was no significant difference in total protein content during 1-14 d while the content gradually increased to the peak and then decreased at 21 d of culture. The soluble sugar content increased first, then decreased and then increased after culture, and reached the peak at 28 d of culture.

Keywords: *Lysionotus pauiflorus*; leaf; callus induction; physiological and biochemical indexes

欢迎关注本刊微信公众号

