

邓素芳, 杨有泉, 陈敏. 模拟空间环境对朱砂根愈伤组织岩白菜素合成的影响 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (7): 670-674.
DENG S-F, YANG Y-Q, CHEN M, et al. Clinostat and UV Treatments for Bergenin Synthesis in Callus of *Ardisia crenata* Sims. [J].
Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, 30 (7): 670-674.

模拟空间环境对朱砂根愈伤组织岩白菜素合成的影响

邓素芳^{1,2}, 杨有泉^{1,2}, 陈敏^{1,2*}

(1. 福建省农业科学院农业生态研究所, 福建 福州 350013;
2. 农业部福州农业环境科学观测实验站, 福建 福州 350013)

摘要: 利用自行研制的旋转装置和紫外灯管辐射培养朱砂根的愈伤组织, 研究模拟空间环境对愈伤组织岩白菜素合成的影响, 以期找到有利于岩白菜素合成和积累的环境因子。研究表明: 经旋转处理的朱砂根愈伤组织岩白菜素含量明显提高, 且峰值出现的时间比对照提前, 峰值是对照的 1.85 倍; 波长为 308 nm 的紫外线辐射对愈伤组织培养前期的岩白菜素积累有利。本研究明确了 2 种模拟空间环境对朱砂根愈伤组织岩白菜素合成有不同的促进作用, 但对愈伤组织的生长都有抑制作用, 将为朱砂根愈伤组织岩白菜素的进一步利用奠定基础。

关键词: 模拟微重力; 紫外辐射; 朱砂根; 岩白菜素

中图分类号: Q 89; R 282

文献标识码: A

Clinostat and UV Treatments for Bergenin Synthesis in Callus of *Ardisia crenata* Sims.

DENG Su-fang^{1,2}, YANG You-quan^{1,2}, CHEN Min^{1,2*}

(1. *Agricultural Ecology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China*; 2. *Fuzhou Scientific Observing and Experimental Station of Agro-Environment, MOA, Fuzhou, Fujian 350013, China*)

Abstract: A lab-designed clinostat and a UV lamp were applied to enhance the synthesis and accumulation of bergenin in the culture of *Ardisia crenata* Sims. calli. The simulated microgravity significantly increased the bergenin content with a peak amount 1.85 times of that of control. It also hastened the bergenin formation shortening the time to reach its peak in the calli. The exposure of calli to UV at 308 nm during the early stage of the culture benefited the bergenin accumulation. Both treatments appeared to induce varied effects in promoting the bergenin synthesis and accumulation. However, at the same time, they also retarded the callus growth.

Key words: simulated microgravity; UV; *Ardisia crenata* Sims.; bergenin

近年来, 随着航天事业的飞速发展, 空间环境对植物生长发育的影响备受关注^[1-2], 利用空间环境或地面模拟空间环境开展植物诱变育种和品种改良也成为植物育种的新方向^[3-4]。微重力和高辐射是空间环境的两个重要特点^[5-6]。许多研究表明, 微重力和高紫外辐射会影响植物次生物质代谢, 如空间生长的人参、甜菊细胞中糖苷含量都增加了^[7], 经回转器水平回转处理的人参细胞人参皂苷

含量提高 10% 左右^[8], 而增强紫外线辐射能诱导叶片酚类和类黄酮等次生代谢物的产生和积累^[9-10], 大麻中四氢大麻醇的增加和紫外线剂量呈线性关系^[11]等。可见, 开展空间环境对植物特别是药用植物次生代谢产物积累的影响研究, 不仅在植物生理学领域具有十分重要的理论意义, 应用于农业生产实践和生物技术领域还具有一定的经济意义。

收稿日期: 2015-03-02 初稿; 2015-05-10 修改稿

作者简介: 邓素芳 (1982-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事空间生物学和受控生态研究 (E-mail: d.sufang@163.com)

* 通讯作者: 陈敏 (1957-), 男, 研究员, 主要从事空间生命保障体系和受控生态研究 (E-mail: chenmin863@163.com)

基金项目: 福建省农业科学院青年人才创新基金 (2014CX-18); 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2014R1017-4); 福建省种业创新与产业化工程项目 (2014S1477-2); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (STIT-I-0305)

朱砂根 *Ardisia crenata* Sims., 又名富贵籽、黄金万两等, 属紫金牛科紫金牛属常绿小灌木, 是福建地区的道地药材, 在龙岩一带广泛种植, 因其富含岩白菜素而具有止咳平喘、抗炎抑菌、抗生育、抗病毒、抗肿瘤和驱虫、杀虫等作用。2004年以来, 笔者通过反复试验, 已建立了朱砂根愈伤组织的高效生长体系, 繁殖系数每30 d 15倍以上, 为利用朱砂根愈伤组织生产岩白菜素产业化应用奠定基础。然而, 愈伤组织中岩白菜素含量低^[12-13]的瓶颈一直制约着朱砂根愈伤组织的产业化利用。因此, 如果促进愈伤组织的岩白菜素合成, 提高愈伤组织的岩白菜素含量, 那么利用细胞工程培养朱砂根愈伤组织, 工厂化生产岩白菜素将指日可待。鉴于此, 本研究利用模拟微重力和高照度紫外辐射培养朱砂根愈伤组织, 研究模拟空间环境对愈伤组织岩白菜素合成的影响, 了解这些模拟空间环境对朱砂根愈伤组织岩白菜素合成的影响效果, 期望能够从这些环境因素中获得有利于岩白菜素合成的刺激剂, 扩展岩白菜素的理论研究, 为实现岩白菜素细胞培养工厂化生产提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以朱砂根无菌幼苗的胚根诱导的白色冰砂状愈伤组织^[14]。

1.2 愈伤组织的培养

1.2.1 旋转培养 无菌条件下, 在自行研制的回转装置^[15]中以转速 $2 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (按 *Silver* 理论, 水平回转在角速度 $0.209 \text{ 弧度} \cdot \text{s}^{-1}$, 即相当于转速 $2 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下, 作用于植物的总重力为零^[8,16]) 进行旋转培养, 以此模拟微重力环境或效应。由于刚接种的愈伤组织与培养基接触不紧, 因此旋转培养是待接种后2 d进行。每3 d取1次样, 按不同旋转半径 (3.75 cm 和 8.75 cm) 分别取样, 每个处理每次取3个重复, 称重, 放入 60°C 温箱中烘至恒重, 待测。

1.2.2 紫外培养 UVA (320~400 nm) 和 UVB (280~320 nm) 会影响植物次生物质的合成^[9-11,17], 故试验选用2个波长 (308、340 nm) 紫外灯管进行紫外辐射, 辐射照度在 $1\ 000 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 左右, 每天辐射2 h。每3 d取1次样, 每个处理每次取3个重复, 称重, 放入 80°C 温箱中烘至恒重, 待测。

1.2.3 培养条件 所有培养均使用 MS + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D + $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + 4%蔗糖 +

6%椰汁培养基, ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), 遮自然光培养, 并同时取正常暗培养的愈伤组织为对照。

1.3 岩白菜素的提取与测定

1.3.1 样品的制备 取样品置于 60°C 恒温箱中干燥至恒重, 用研钵研成粉末, 准确称取 0.2 g 样品, 置具塞锥形瓶中, 准确加入甲醇 20 mL, 称定重量, 超声处理 40 min, 冷却, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液备用, 即得。

1.3.2 岩白菜素含量测定 用 HPLC 法测定岩白菜素含量。测定条件: Agilent 1200 高效液相色谱仪 (包括 G1311A 四元泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315D 二极管阵列检测器, Agilent Chemstation 化学工作站); MS105DU 十万分之一电子天平 (梅特勒-托利多公司); AR2130 千分之一电子天平 (奥豪斯仪器有限公司制造); KQ-500DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Millipore 超纯水机 (法国 Millipore 公司); Polysil C18 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 流动相: 甲醇:水 (25:75); 检测波长: 275 nm; 柱温: 30°C ; 进样量: $20 \mu\text{L}$ 。标准液浓度 $2.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (标准品购自中国食品药品检定研究院, 批号 111532-201203)。

1.4 数据分析

所得数据利用 EXCEL、SPSS13.0 进行统计和灰色关联分析。

2 结果与分析

2.1 模拟微重力效应对朱砂根愈伤组织生长量的影响

从图1可以看出, 愈伤组织经过30 d的旋转培养, 虽然培养过程中生长量有些波动, 但总的趋势是增加的, 增加的量比正常培养低。其中旋转半径大的处理, 愈伤组织生长波动大, 总的生长量也大于旋转半径小的处理。

2.2 模拟微重力效应对朱砂根愈伤组织岩白菜素合成的影响

试验结果(图2)表明:经旋转处理的朱砂根愈伤组织岩白菜素含量明显高于对照;岩白菜素含量在旋转培养23 d时达到含量最高值, 比正常培养的峰值提早4 d, 且是对照培养的1.85倍;旋转半径小的培养材料岩白菜素含量略高于旋转半径大的。同生长量变化一样, 旋转半径大的处理, 愈伤组织岩白菜素的含量波动较旋转半径小的处理大, 但培养过程中波动的趋势正好与生长量的波动趋势相反。

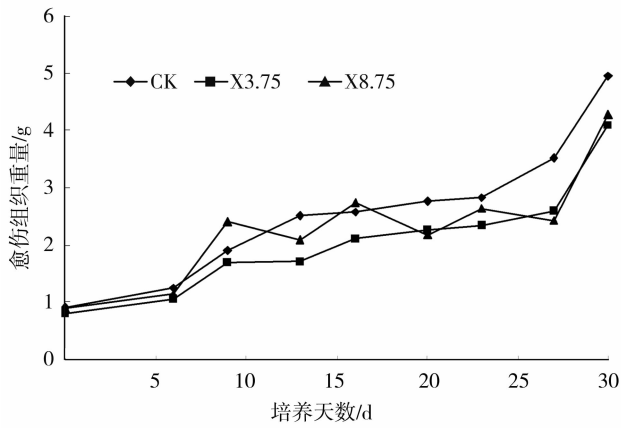


图 1 不同旋转半径下朱砂根愈伤组织生长量变化

Fig. 1 Growth of *A. crenata* Sims. calli on clinostat of varied rotational radii

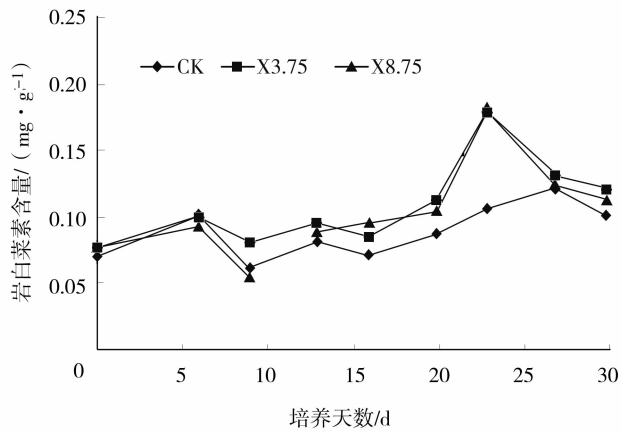


图 2 不同旋转半径下朱砂根愈伤组织岩白菜素含量变化

Fig. 2 Bergenin content in calli grown on clinostat of varied rotational radii

2.3 紫外线辐射对朱砂根愈伤组织生长量的影响

紫外线每天辐射 2 h, 愈伤组织培养前期, 生长量较对照高, 后期不如对照。就 2 种波长紫外线而言, UV340 辐射下的愈伤组织生长量比 UV308 的大 (图 3)。

2.4 紫外线辐射对朱砂根愈伤组织岩白菜素合成的影响

试验结果 (图 4) 表明: UV308 在愈伤组织培养前期有起到促进朱砂根愈伤组织岩白菜素合成的效果; 就 2 种波长紫外线而言, UV340 辐射下的愈伤组织岩白菜素含量与生长量的变化趋势正好相反, UV308 短期 (10 d 内) 辐射后的愈伤组织岩白菜素含量比 UV340 的高。

因此, 可以考虑利用 308 nm 紫外线在愈伤组织培养前期进行短期辐射。

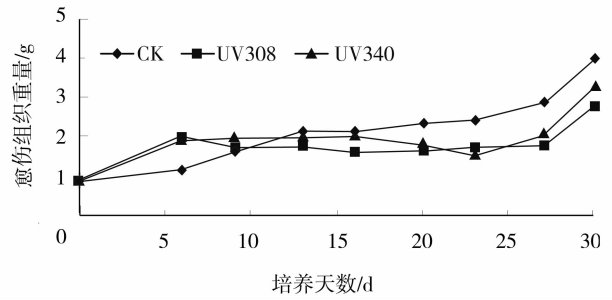


图 3 不同波长紫外辐射下朱砂根愈伤组织生长量变化

Fig. 3 Growth of *A. crenata* calli under UV of varied wavelengths

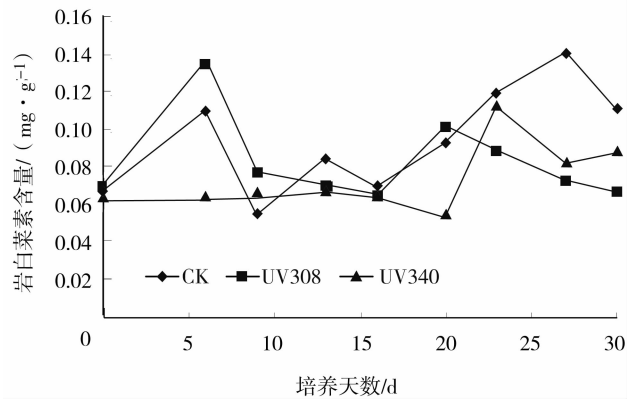


图 4 不同波长紫外辐射下朱砂根愈伤组织岩白菜素含量变化

Fig. 4 Bergenin content in calli grown under UV of varied wavelengths

2.5 差异显著性分析

从表 1 可以看出, 旋转半径为 3.75 cm 的旋转处理和 UV340 辐射处理对朱砂根愈伤组织岩白菜素的合成都有显著影响, 但二者影响效果不同, 前者有促进作用, 后者是抑制作用。但同时, 旋转半径为 3.75 cm 的旋转处理和 UV308 辐射处理对朱砂根愈伤组织的生长都起到了显著抑制的效果。因此, 对于岩白菜素的总产量而言, 旋转半径 3.75 cm 和 UV308 的处理没有显著差异性, UV340 反而起到了显著降低的作用。

2.6 灰色关联分析法分析生长量、生长天数、处理与岩白菜素含量的关系

通过均值化对原始数据进行无量纲化处理, 计算得到各因素与岩白菜素的关联系数平均值。结果 (表 2) 表明, 愈伤组织的生长量与岩白菜素含量的关联性最大。

表 1 各处理岩白菜素含量、生长量、产量的差异显著性分析
Table 1 Statistical analysis on content, production and yield of bergenin under treatments

	处理				
	CK	X3.75	X8.75	UV308	UV340
愈伤组织生长量 /g	2.1771±0.4616	1.8367±0.3533*	2.0774±0.4102	1.8300±0.1866	2.0480±0.2321
岩白菜素含量/(mg·g ⁻¹)	0.0960±0.0008	0.1240±0.0021*	0.1170±0.0025	0.0842±0.0006	0.0748±0.0003*
岩白菜产量/mg	0.0201±0.0000	0.0250±0.0002	0.0261±0.0002	0.0148±0.0000	0.0140±0.0000*

注：* 表示同行数值间差异显著 ($P < 0.05$)。

表 2 生长量、生长天数、处理与岩白菜素含量的灰色关联系数

Table 2 Grey correlation coefficients on production, culture time, treatment and content of bergenin

因素	处理	培养时间	愈伤组织生长量
关联系数	0.5657	0.6520	0.7021

3 讨论与结论

3.1 朱砂根愈伤组织对模拟空间环境的响应

供试的 2 种模拟空间环境都不利于朱砂根愈伤组织的生长，这与许多植物的表现相似，比如，小汤姆番茄经回转后果实产量、叶面积、叶干重、果干重、茎根比、胡萝卜素、叶绿素 a 和 b 以及品质参数等指标都降低^[18]，微重力条件下拟南芥细胞生长受抑制^[19]，这可能是因为模拟微重力对植物的正常生长起到了一定的胁迫作用。

模拟微重力虽然不利于朱砂根愈伤组织生长，但却显著提高了愈伤组织的岩白菜素含量。在植物细胞培养目标产物的时候，细胞生长量和目标产物的产量之间普遍存在着此消彼长的矛盾，朱砂根愈伤组织培养也是如此。这可能是由于细胞的生长机制与目标产物的合成机制不同，2 种途径在一定阶段互相抑制。例如，氨态氮有利于岩白菜素积累，却不利于细胞的生长^[20]。

3.2 朱砂根愈伤组织生长量与岩白菜素含量的关联性

植物细胞次生代谢物的生产和细胞生长之间存在偶联型、半偶联型和非偶联型 3 种关系^[21-22]。何雪娇^[13]、张美萍^[23]等研究结果认为细胞生长同岩白菜素的合成呈一定相关性，朱砂根细胞中岩白菜素的合成与细胞生长量积累趋势相同，呈偶联型。本研究的结果也认为朱砂根愈伤组织岩白菜素的含量与其生长量关联性最大。

总之，本试验考察了 2 种模拟空间环境（模拟

微重力和高紫外辐射）对朱砂根愈伤组织生长和岩白菜素合成的影响，认为 2 种模拟空间环境在一定条件下都能不同程度地促进了朱砂根愈伤组织岩白菜素的合成，但同时又都影响了朱砂根愈伤组织的生长，最终对愈伤组织岩白菜素的产量影响不显著。实际生产时，可考虑二步法培养，即培养前期采用模拟微重力（培养 23 d）或高紫外辐射培养（UV308 培养 5 d）以获得高岩白菜素含量，后期通过恢复正常培养提高愈伤组织生长量。

参考文献：

- [1] 邓素芳, 杨有泉, 陈敏. 植物模拟微重力效应研究进展 [J]. 中国园艺文摘, 2013, 29 (5): 43-45.
- [2] 史金铭, 孙野青, 孙中武, 等. 空间飞行对水稻 CDA 基因甲基化的诱变效应 [J]. 核农学报, 2014, 28 (7): 1149-1154.
- [3] 温贤芳, 张龙, 戴维序, 等. 天地结合开展我国空间诱变育种研究 [J]. 核农学报, 2004, 18 (4): 241-246.
- [4] 俞法明, 严文潮, 毛雪琴, 等. 利用空间诱变技术进行早籼稻新品种的改良 [J]. 核农学报, 2014, 28 (6): 949-954.
- [5] 王乃彦. 开展航天育种的科学研究工作, 为我国农业科学技术的发展做贡献 [J]. 核农学报, 2002, 16 (5): 257-260.
- [6] 韩微波. 我国苜蓿空间环境诱变育种研究进展及展望 [J]. 核农学报, 2014, 28 (8): 1379-1383.
- [7] NECHITAILO, GALINA S. Biotechnological experiments in space flights on board of space stations [C] // 39th COSPAR Scientific Assembly. Held 14-22 July 2012, in Mysore, India. 2012: 1348.
- [8] 赵炜, 蔡伟明. 模拟微重力环境因子对人参细胞生长和人参皂苷含量的影响 [J]. 植物生理学报, 1998, 24 (2): 159-164.
- [9] KAKANI V G, REDDY K R, ZHAO D, et al. Field crop responses to ultraviolet B radiation: a review [J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2003, 120: 191-218.
- [10] CORREIA C M, AREAL E L V, TORRESP M S, et al. Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in maize grown under field conditions: II. Physiological and biochemical aspects [J]. Field Crops Research, 1999, 62: 97-105.
- [11] LYDDON J, TERAMURA A H, COFFMAN C B. UV-B

- irradiation on photosynthesis, growth and cannabinoid production of two *Cannabissativa* chemotypes [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1997, 46: 201-206.
- [12] 彭光天, 黄上志, 黄仲立, 等. 朱砂根愈伤组织诱导及其岩白菜素含量的测定 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2004, 12 (1): 51-56.
- [13] 何雪娇. 朱砂根细胞组织培养及其岩白菜素含量分析 [D]. 福建农林大学, 2009.
- [14] 邓素芳, 杨旸, 赖钟雄. 朱砂根愈伤组织培养及悬浮细胞系建立 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20 (1): 8-13.
- [15] 陈敏, 杨有泉, 邓素芳, 等. 二轴旋转式植物湿润栽培装置的研制 [J]. *农业工程学报*, 2013, 29 (24): 40-48.
- [16] SILVER I L. The dynamics of a discrete geotropic sensor subject to rotation-induced gravity compensation [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1976, 61 (2): 353-362.
- [17] 李双明, 孙蕊, 骆浩, 等. 紫外辐射对东北红豆杉鲜叶紫杉醇及三尖杉宁碱含量的影响 [J]. *植物研究*, 2007, 27 (4): 500-508.
- [18] COLLA G, ROUPHAEL Y, CARDARELLI M, et al. Growth, yield and reproduction of dwarf tomato grown under simulated microgravity conditions [J]. *Plant Biosystems*, 2007, 141 (1): 75-81.
- [19] MATIA I, GONZALEZ-CAMACHO F, HERRANZ R, et al. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167 (3): 184-193.
- [20] 何雪娇, 赖钟雄. 光照和氮源对朱砂根愈伤组织生长及岩白菜素含量的影响 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2012, 41 (5): 486-490.
- [21] COLLIE H A. Secondary product formation in plant tissue cultures [J]. *Plant Growth Regulation*, 2001, 34: 119-34.
- [22] VANISREE M, LEE C Y, LO S F, et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures [J]. *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 2004, 45: 1-2.
- [23] 张美萍, 王义, 孙春玉, 等. 西洋参愈伤组织悬浮培养物细胞分化与皂苷合成关系的研究 [J]. *核农学报*, 2004, 18 (2): 152-154.

(责任编辑: 黄爱萍)