

# $\text{Cu}^{2+}$ 对离体培养的红花百里香 不定芽生长及挥发油的影响<sup>①</sup>

徐治朋<sup>1,2</sup>, 李晓东<sup>2</sup>, 鲁朝晖<sup>2</sup>, 李 凌<sup>1</sup>

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715; 2. 深圳职业技术学院化生学院, 广东 深圳 518055

**摘要:** 以离体培养的红花百里香不定芽为材料, 采用不同浓度  $\text{CuCl}_2$  处理, 测定不定芽的各种指标, 研究  $\text{Cu}^{2+}$  对红花百里香不定芽的增殖生长及挥发油的影响. 结果表明, 低浓度的  $\text{CuCl}_2$  可以促进红花百里香不定芽的增殖生长, 而高浓度的  $\text{CuCl}_2$  起抑制作用; 其中  $50 \mu\text{mol/L}$  的  $\text{CuCl}_2$  对不定芽的增殖效果最好, 增殖系数高达 20.35, 精油含量达到 27.25%, 提高了 23.98%, 且颜色更深. 说明一定浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  能促进红花百里香不定芽的增殖生长, 增强其抗逆性, 促进百里香挥发油的合成积累, 改变其成分组成.

**关键词:** 红花百里香;  $\text{Cu}^{2+}$ ; 可溶性糖; 可溶性蛋白; SOD; POD; PAL; 挥发油

**中图分类号:** Q945.78

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2016)05-0037-08

红花百里香 *Thymus serpyllum* L. 是多年生芳香植物, 隶属于唇形科百里香属, 是一种重要的药用植物, 广泛分布在欧洲、亚洲及非洲北部, 世界上存在的百里香属植物约有 300~400 种<sup>[1]</sup>. 研究表明, 百里香属植物提取物中含有的物质成分主要是黄酮类、挥发油类及一些其它物质, 其中挥发性的物质大致分为芳香族化合物、单萜类、倍半萜类、脂肪酸衍生物等. 挥发油中的主要成分香芹酚、百里香酚、芳樟醇、石竹烯等, 是由焦磷酸香叶酯经过一系列的生化反应变化而来, 具有较强的抗真菌性和高效防腐性<sup>[2]</sup>. 百里香的挥发油含量较高, 品质优越, 其成分中的一些物质具有天然的抑菌、抗氧化作用<sup>[3]</sup>. 百里香属植物具有丰富的生态多样性及化学多型性特点, 其中最常见的化学型是酚型, 包括香芹酚型、百里香酚型等, 还有桉叶油型、芳樟醇型、龙脑型和一些混合型<sup>[4]</sup>. 一方面是百里香挥发油的市场需求越来越大, 另一方面是百里香挥发油人工合成困难, 植物提取率较低, 有效成分含量偏低, 远远没有达到人们的需求. 有研究表明, 在合适条件下, 通过适宜浓度的外源物刺激, 能大幅提高植物组织培养物中次生代谢产物的含量及改变其成分组成.

前人实验证明铜离子能够促进一些次生代谢产物的生物合成. 当把植物培养基中相应的铜离子浓度升高时, 黄连培养细胞中的小檗碱<sup>[5]</sup>、硬紫草细胞中的紫草素<sup>[6]</sup>和红豆杉培养细胞中紫杉醇<sup>[7]</sup>形成的产量都大大提高及成分组成发生改变. 而氯化铜( $\text{CuCl}_2$ )可以作为某些次生代谢物质的非生物诱导因子. 本研究探讨了  $\text{Cu}^{2+}$  对红花百里香离体培养中增殖、生理代谢及挥发油形成的影响.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

红花百里香种子(德国进口原种)购于厦门爱垦园艺有限公司, 以 1/2MS 培养基组织培养, 附加 8 g/L

① 收稿日期: 2015-09-07

基金项目: 重庆市农业科技成果转化资金项目(cstc2013jcsf-nycgzhA80001).

作者简介: 徐治朋(1991-), 男, 山东济南人, 硕士研究生, 主要从事观赏植物生物技术与遗传育种研究.

通信作者: 李 凌, 教授, 硕士生导师.

琼脂和 30 g/L 的蔗糖, pH 值 5.8, 光照度 2 000~2 500 lx、温度(25±2) °C、光/暗周期 12 h/12 h. 以培养 30 d 的组培苗作为实验材料.

挥发油提取: 挥发油常压提取器. 成分分析: 仪器 HP6890GC/5975MSD 气-质联用分析仪, 配套的 G1701BA-B. 0 1.00ChemStation 软件.

## 1.2 处 理

对照组: 红花百里香不定芽增殖培养的对照培养基采用 MS 为基础培养基, 添加 6-苄基腺嘌呤(6-BA)0.25 mg/L 和萘乙酸(NAA)0.25 mg/L; 附加 8 g/L 琼脂和 30 g/L 的蔗糖(记作 CK);

Cu<sup>2+</sup> 处理组: 在对照培养基基础上分别添加 10, 50, 100, 150, 200 μmol/L 的 CuCl<sub>2</sub> 组成 5 个水平的 Cu<sup>2+</sup> 处理培养基(分别记作 A1, A2, A3, A4, A5);

每种培养基接种 20 瓶, 每瓶接种量为 0.2 g, 光照度 2 000~2 500 lx、温度(25±2) °C、光/暗周期 12 h/12 h.

## 1.3 测定方法

### 1.3.1 红花百里香不定芽增殖情况测定

红花百里香不定芽培养 30 d 时取样称取鲜质量和干质量, 进行不定芽增殖系数的统计, 每个处理 3 个重复. 不定芽增殖系数=(接种 30 d 时不定芽的鲜质量-接种时不定芽鲜质量)/接种时不定芽鲜质量.

### 1.3.2 各种生理指标测定

参照文献方法<sup>[8]</sup>测定不定芽的可溶性糖含量、可溶性蛋白含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性. 每 7 d 测定 1 次, 共测 6 次; 其中每次剪取 0.15 g 红花百里香不定芽, 进行 3 次重复.

## 1.4 不定芽挥发油的提取

取红花百里香不定芽干样 30 g, 进行粉碎, 放在 1L 圆底烧瓶中, 再加入 300 mL 蒸馏水与 10 粒玻璃珠. 采用水蒸气蒸馏法进行提取, 蒸馏时间为 3.5 h, 用正己烷进行萃取; 提取的挥发油样品保存于 2 mL Agilent 样品瓶中, 放置于 4 °C 冰箱.

## 1.5 挥发油成分分析

参照李建国<sup>[2]</sup>的方法, 对红花百里香精油进行 GC/MS 测定分析.

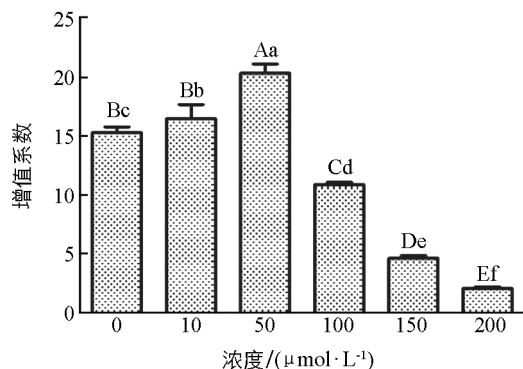
## 1.6 数据分析

实验数据用 office excel 2010 进行整理, 用 GraphPad Prism 5 进行图表合成处理, 最后应用 SPSS Statistics 统计软件进行分析处理.

# 2 结果与分析

## 2.1 Cu<sup>2+</sup> 对红花百里香不定芽增殖的影响

在培养 30 d 后, 不同浓度的 CuCl<sub>2</sub> 处理对红花百里香不定芽增殖生长影响不同(图 1). 当 CuCl<sub>2</sub> 浓度为 50 μmol/L(A2 处理组)时, 红花百里香不定芽的增殖系数最高达 20.35, 极显著高于其余处理及对照组( $p < 0.01$ ); 当 CuCl<sub>2</sub> 浓度为 10 μmol/L(A1 处理组)时, 不定芽的增殖系数为 16.49, 显著高于对照组( $p < 0.05$ ); 当 CuCl<sub>2</sub> 浓度为 100, 150, 200 μmol/L(A3, A4, A5 处理组)时, 不定芽的增殖系数分别为 10.90, 4.65, 2.10, 极显著低于对照组( $p < 0.01$ ). 由此可见, 低浓度的 CuCl<sub>2</sub> 可以促进红花百里香不定芽的增殖生长, 而高浓度的 CuCl<sub>2</sub> 抑制了不定芽的增殖生长, 50 μmol/L 的 CuCl<sub>2</sub> 对不定芽的增殖生长效果最好(图 2).



数据为平均数±标准差( $n=3$ ); 小写表示  $p=0.05$  的显著水平, 大写表示  $p=0.01$  的显著水平.

图 1 红花百里香不定芽在不同浓度培养基中的增殖情况

2.2  $\text{Cu}^{2+}$  对红花百里香不定芽中可溶性糖含量的影响

添加了不同浓度的  $\text{CuCl}_2$  培养基中红花百里香不定芽增殖过程中可溶性糖含量的变化情况如图 3 所示. 可溶性糖含量呈现先上升后下降, 再接连上升后下降的变化趋势, 由图 3 我们可以看出在第 28 d, 对照组和 A1,A2,A3 处理组达到峰值, 而 A4,A5 在第 21 d 的时候就已经达到峰值且均低于其他组. 在第 28 d, A1, A3 处理组分别比对照组提高了 2.08%, 10.70%, A2 处理组含量高达 14.14 mg/g, 是最初含量的 2.70 倍, 比同期对照组显著提高了 36.17% ( $p<0.05$ ); 而 A4,A5 处理组分别比对照组降低了 7.37%, 34.63%. 植物体内的可溶性糖不但是植物细胞活动的能源物质, 是合成其他物质的碳架, 而且对植物细胞内的渗透压具有调节作用, 对原生质体起到了保护作用. 第 7 d, 可溶性糖含量上升说明, 红花百里香不定芽初到新环境而且受外界电解质胁迫, 可溶性糖含量上升可以达到适应新环境, 保护植物细胞, 保持渗透平衡的作用. 第 14 d, 可溶性糖含量的下降说明红花百里香不定芽的细胞对胞质中可溶性糖的利用率提高了, 对碳源的吸收、转化的作用加强了, 从而增强了植物的光合作用, 不定芽快速增殖. 随着不定芽的不断增殖, 植物体内可溶性糖含量越来越多, 为植物细胞合成其他物质提供充足的能量. 第 28 d 后由于培养基中碳源及其他物质的不足, 植物细胞代谢降低, 可溶性糖含量随之降低, 其中因为 A4,A5 处理组  $\text{Cu}^{2+}$  浓度太高, 胁迫力太强, 不定芽难以适应, 在第 21 d 后可溶性糖含量就开始下降.

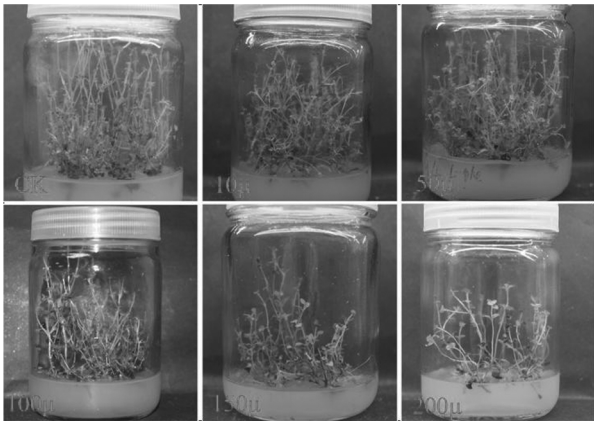


图 2 红花百里香不定芽在不同培养基中生长状况

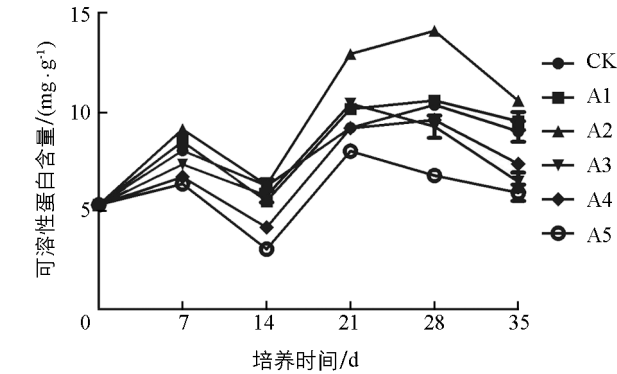


图 3 不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  对红花百里香不定芽中可溶性糖含量的影响

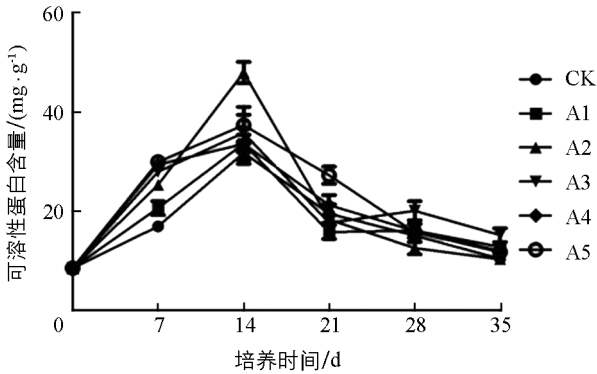


图 4 不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  对红花百里香不定芽可溶性蛋白含量的影响

2.3  $\text{Cu}^{2+}$  对红花百里香不定芽中可溶性蛋白含量的影响

由图 4 可以看出红花百里香不定芽中可溶性蛋白含量的变化情况, 所有处理的可溶性蛋白呈现先上升后下降趋势. 在第 14 d 时, 对照组和各处理组都达到其峰值, 而此时可溶性糖含量正处于最低水平. 说明植物细胞大量利用碳源进行蛋白质的合成, 为以后不定芽的快速增殖提供物质保障. 此时, A1,A2,A3,A4, A5 处理组分别比对照组提高了 5.80%, 50.93%, 12.64%, 5.57%, 17.59%; 其中 A2 处理组可溶性蛋白含量高达 48.13 mg/g, 是最初含量的 5.69 倍, 显著增加 ( $p<0.05$ ). 后面随着培养基内碳源的减少, 植物细胞利用的增加, 可溶性蛋白含量越来越低.

2.4  $\text{Cu}^{2+}$  对红花百里香不定芽中超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

$\text{Cu}^{2+}$  处理组和对照组培养的红花百里香不定芽增殖过程中 SOD 活性变化情况如图 5. 从图 5 中我们可以看出, 在红花百里香不定芽增殖过程中 SOD 保护酶的活性呈基本一致的先上升后下降的变化趋势. 在培养的第 14 d, 各处理组和对照组百里香不定芽中的 SOD 保护酶的活性达到峰值; A1,

A2 处理组的 SOD 活性比对照组极显著增强了 19.39%, 34.11% ( $p < 0.01$ ), A2 处理组的 SOD 保护酶的活性高达 490.82 U/(g · min), 而 A3, A4, A5 处理组比对照组显著降低了 5.10%, 1.9%, 15.44%。随着不定芽的快速增长, SOD 的活性开始降低。高浓度的 A4, A5 处理组的酶活性始终低于对照组。

## 2.5 $\text{Cu}^{2+}$ 对红花百里香不定芽中过氧化物酶(POD)活性的影响

图 6 为添加了不同浓度  $\text{CuCl}_2$  培养基中红花百里香不定芽增殖过程中 POD 活性的变化情况。从图 6 中可以看出对照组、A1、A2 处理组的 POD 活性呈先上升后下降的变化趋势。在第 14 d 时, POD 活性达到峰值, 其中 A2 处理组红花百里香不定芽的 POD 活性高达 276.53 U/(g · min), 是最初酶活性的 3.16 倍, 且相比同时期对照组极显著提高了 30.88% ( $p < 0.01$ )。而 A3, A4, A5 处理组呈先上升后下降, 再上升的变化趋势。A3, A4, A5 处理组在第 28 d 后, 不定芽的 POD 活性又呈现上升趋势。在第 35 d 时, A3, A4, A5 处理组百里香不定芽的 POD 活性比对照组极显著提高了 28.52%, 77.63%, 80.03% ( $p < 0.01$ ), 而 A1, A2 处理组比对照组显著降低了 19.66%, 47.30% ( $p < 0.05$ )。

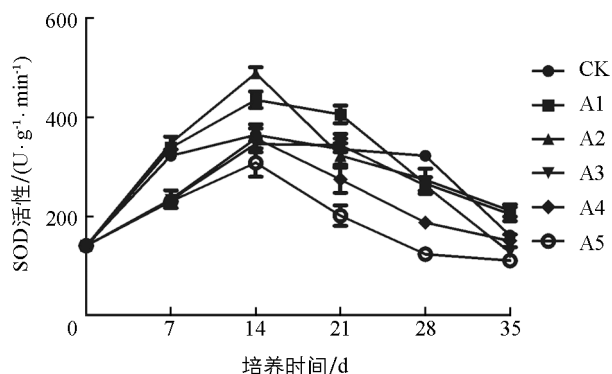


图 5 不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  对红花百里香不定芽中超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

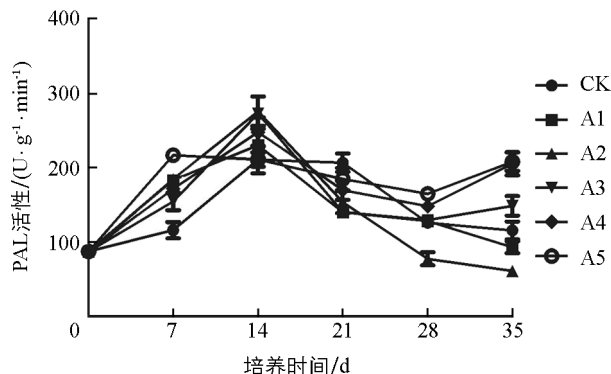


图 6 不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  对红花百里香不定芽中过氧化物酶(POD)活性的影响

## 2.6 $\text{Cu}^{2+}$ 对红花百里香不定芽中苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的影响

由图 7 可知, 添加了不同浓度的  $\text{CuCl}_2$  和对照培养基中红花百里香不定芽增殖过程不定芽 PAL 活性的变化情况, PAL 的活性呈现出先上升后下降的趋势。在第 14 d 的时候, A3, A4, A5 处理组的不定芽 PAL 活性达到峰值, 其 A3, A4, A5 处理组的不定芽 PAL 活性比对照组极显著提高了 96.38%, 73.27%, 70.50% ( $p < 0.01$ ), 其 A3 处理组的 PAL 活性高达 218.65 U/(g · min), 是初始酶活性的 3.62 倍; 在第 21 d 时, A1, A2 处理组的不定芽 PAL 活性比对照组极显著提高了 89.63%, 117.21% ( $p < 0.01$ ), 其 A2 处理组的 PAL 活性高达 211.51 U/(g · min), 是初始酶活性的 3.50 倍。在整个培养过程中, 添加了不同浓度的  $\text{CuCl}_2$  的处理组的不定芽 PAL 活性始终高于对照组的水平。

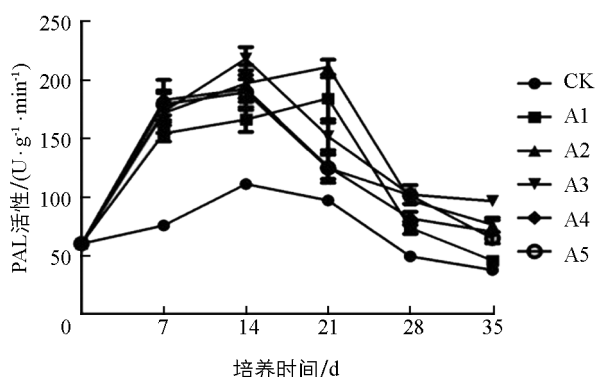


图 7 不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  对红花百里香不定芽中苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的影响

## 2.7 $\text{Cu}^{2+}$ 对红花百里香不定芽挥发油的影响

### 2.7.1 $\text{Cu}^{2+}$ 对挥发油含量的影响

以不添加  $\text{CuCl}_2$  的对照组(样品 I)和生长表现优良的 A2 处理组(样品 II)为材料提取挥发油, 得到红花百里香挥发油的含量分别为 21.98%, 27.25%, 经过添加  $\text{Cu}^{2+}$  处理后的红花百里香不定芽的含油量提高了 23.98%; 所提取的挥发油均有特殊香气, 颜色依次为淡黄色、深黄色(图 8)。

2.7.2 Cu<sup>2+</sup> 对挥发油成分的影响

用 GC-MS 联用仪对 2 个样品的挥发油化学成分进行分析, 总共鉴定出 27 种化合物(表 1), 对照组组培红花百里香挥发油含有 22 种化合物, 添加 CuCl<sub>2</sub> 的处理组挥发油含有 21 种化合物, 两个样品共同存在 16 种化合物, 如芳樟醇、百里香酚、香芹酚、β-甜没药烯、α-松油醇等, 对照组还存在独有的 6 种化合物, 分别是: 乙酸-3-辛醇酯、异龙脑、松油烯-4-醇、茨烯、甘香烯、对苯二甲酸二辛酯; 添加了 Cu<sup>2+</sup> 处理的 A2 处理组也存在对照组没有的 5 种化合物, 分别是: 2-甲氧基-1, 7, 7-三甲基二环[2. 2. 1]庚烷、桉叶油醇、10-十一炔-1-醇、δ 杜松烯、α-衣兰烯。

我们通过运用面积归一的方法, 计算红花百里香挥发油中各物质的相对百分含量, 分析的结果如表 1. 其中样品 I 挥发油含量最多化合物成分是芳樟醇(14. 809%)、乙酸芳樟酯(16. 362%)、β-甜没药烯(13. 396%), 按化学型分类可以归为偏芳樟醇类; 样品 II 中含量最多化合物成分是芳樟醇(12. 362%)、香芹酚(26. 226%)、β-甜没药烯(19. 03%), 按化学型可以归为偏香芹酚类, 和对照组相比, 大部分酯类化合物含量减少, 酚类烯类化合物含量增加了, 如乙酸芳樟酯含量由 16. 362%减少到 6. 989%, 减少了约 57. 29%; 乙酸橙花酯含量由 2. 918%减少到 0. 805%; 5-甲基-2-(1-甲基乙烯基)-4-己烯-1-醇乙酸酯含量由 6. 182%减少到 1. 446%; 对苯二甲酸二辛酯含量由 5. 784%到无; 百里香酚含量由 2. 327%增加到 2. 66%, 香芹酚含量由 5. 758%增加到 26. 226%, 1-石竹烯由 5. 207%增加到 6. 487%, β-甜没药烯由 13. 396%增加到 19. 03%。



图 8 不同样品精油

表 1 红花百里香挥发油所含化学成分的分析结果

| 编号 | 保留时间/<br>min | 化合物英文名称                                               | 化合物中文名称                        | 分子式                                            | 分子量      | 匹配度  |       | 百分比/%   |         |
|----|--------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------|----------|------|-------|---------|---------|
|    |              |                                                       |                                |                                                |          | 样品 I | 样品 II | 样品 I    | 样品 II   |
| 1  | 9. 968       | 1, 6-Octadien-3-ol, 3, 7-dimethyl-                    | 芳樟醇                            | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 154. 136 | 96   | 96    | 14. 809 | 12. 362 |
| 2  | 10. 23       | 3-Octanol, acetate                                    | 乙酸-3-辛醇酯                       | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 172. 146 | 67   | —     | 0. 574  | —       |
| 3  | 11. 677      | Isoborneol                                            | 异龙脑                            | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 154. 136 | 86   | —     | 0. 27   | —       |
| 4  | 11. 678      | Bicyclo[2. 2. 1]heptane, 2-methoxy-1, 7, 7-trimethyl- | 2-甲氧基-1, 7, 7-三甲基二环[2. 2. 1]庚烷 | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O              | 168. 151 | —    | 64    | —       | 0. 371  |
| 5  | 11. 814      | Eucalyptol                                            | 桉叶油醇                           | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 154. 136 | —    | 63    | —       | 0. 448  |
| 6  | 11. 815      | Terpinen-4-ol                                         | 松油烯-4-醇                        | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 154. 136 | 58   | —     | 0. 283  | —       |
| 7  | 12. 169      | . alpha. -Terpineol                                   | α-松油醇                          | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 154. 136 | 80   | 58    | 7. 023  | 1. 213  |
| 8  | 12. 729      | Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-        | 百里香酚甲基醚                        | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O              | 164. 12  | 97   | 95    | 5. 795  | 2. 943  |
| 9  | 12. 922      | Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-        | 异百里香酚甲基醚                       | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O              | 164. 12  | 90   | 90    | 4. 17   | 6. 383  |
| 10 | 13. 045      | Linalyl acetate                                       | 乙酸芳樟酯                          | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 196. 146 | 91   | 80    | 16. 362 | 6. 989  |
| 11 | 13. 204      | 2, 6-Octadien-1-ol, 3, 7-dimethyl-, (Z)-              | 橙花醇                            | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 154. 136 | 86   | 50    | 3. 974  | 0. 796  |
| 12 | 14. 3        | Thymol                                                | 百里香酚                           | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              | 150. 104 | 90   | 93    | 2. 327  | 2. 66   |
| 13 | 14. 485      | Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-                   | 香芹酚                            | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              | 150. 104 | 94   | 94    | 5. 758  | 26. 226 |
| 14 | 15. 081      | 2, 6-Octadien-1-ol, 3, 7-dimethyl-, acetate, (Z)-     | 乙酸橙花酯                          | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 196. 146 | 87   | 78    | 2. 918  | 0. 805  |

| 续表 1 |              |                                                                                |                              |                                                |         |      |       |        |       |
|------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------|---------|------|-------|--------|-------|
| 编号   | 保留时间/<br>min | 化合物英文名称                                                                        | 化合物中文名称                      | 分子式                                            | 分子量     | 匹配度  |       | 百分比/%  |       |
|      |              |                                                                                |                              |                                                |         | 样品 I | 样品 II | 样品 I   | 样品 II |
| 15   | 15.283       | Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, acetate                                   | 香芹酚乙酸酯                       | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> | 192.115 | 73   | 91    | 0.153  | 0.575 |
| 16   | 15.447       | 4-Hexen-1-ol, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)-, acetate                           | 5-甲基-2-(1-甲基乙烯基)-4-己烯-1-醇乙酸酯 | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 196.146 | 91   | 72    | 6.182  | 1.446 |
| 17   | 15.787       | 10-Undecyn-1-ol                                                                | 10-十一炔-1-醇                   | C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O              | 168.151 | —    | 58    | —      | 0.299 |
| 18   | 16.461       | Caryophyllene                                                                  | 1-石竹烯                        | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 204.188 | 99   | 99    | 5.207  | 6.487 |
| 19   | 16.652       | (Z, Z)-. alpha. -Farnesene                                                     | [Z, Z]-α-法尼烯                 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 204.188 | 53   | 53    | 0.218  | 0.309 |
| 20   | 17.318       | Camphene                                                                       | 茨烯                           | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 136.125 | 53   | —     | 0.163  | —     |
| 21   | 17.98        | . beta. -copaene                                                               | β-古巴烯                        | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 204.188 | 97   | 95    | 1.747  | 2.844 |
| 22   | 18.372       | Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)-    | 甘香烯                          | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 204.188 | 50   | —     | 0.134  | —     |
| 23   | 18.637       | . beta. -Bisabolene                                                            | β-甜没药烯                       | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 204.188 | 94   | 96    | 13.396 | 19.03 |
| 24   | 19.009       | Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)- | δ-杜松烯                        | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 204.188 | —    | 93    | —      | 0.788 |
| 25   | 19.172       | cis-. beta. -Farnesene                                                         | α-衣兰烯                        | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 204.188 | —    | 59    | —      | 0.538 |
| 26   | 33.363       | 1,4-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester                          | 对苯二甲酸二辛酯                     | C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> | 390.277 | 91   | —     | 5.784  | —     |
| 27   | 33.969       | Phytol                                                                         | 叶绿醇                          | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 296.308 | 87   | 87    | 0.463  | 1.817 |

### 3 讨 论

植物的次生代谢物的生物合成途径有很多条,因而人们可以通过改变植物的培养条件来达到定向地诱导生成目的产物.诱导剂是指可以激发植物抗病防御反应的生物因子或非生物因子,它能够改变植物次生代谢环节中促进某些酶的活力或者抑制某些酶的活力,从而引起次生代谢途径通量和反应速率的改变,达到改变次生代谢物产量或成分的目的<sup>[9]</sup>.合适浓度的茉莉酸甲酯均能够诱导提高丹参细胞中迷迭香酸<sup>[10]</sup>、甘草细胞中黄酮的合成积累<sup>[11]</sup>,适宜浓度的外源 NO 能够提高半夏体内总生物碱和鸟苷的质量分数<sup>[12]</sup>,适宜浓度的外源 Ca<sup>2+</sup>可以显著提高丹参细胞中迷迭香酸<sup>[13]</sup>和半夏类原球茎中有机酸<sup>[14]</sup>的合成积累量,适宜的外源 Cu<sup>2+</sup>可以促进红豆杉中紫杉醇<sup>[7]</sup>、硬紫草中紫草素<sup>[6]</sup>、黄连细胞中小檗碱<sup>[5]</sup>的合成.本试验正是以 Cu<sup>2+</sup>作为诱导剂,研究其对红花百里香的诱导作用.

#### 3.1 Cu<sup>2+</sup>对红花百里香不定芽增殖的影响

Cu<sup>2+</sup>作为微量元素参与红花百里香不定芽的增殖生长,是蛋白质和酶结构重要组成部分,是生物体不可或缺的重要元素.本实验结果表明,在一定浓度范围内,Cu<sup>2+</sup>能够促进红花百里香不定芽的生长,当CuCl<sub>2</sub>为50 μmol/L时,其增殖系数最高达到20.35,极显著高于对照组;过高浓度的Cu<sup>2+</sup>对红花百里香不定芽形成了盐胁迫,抑制其细胞生长,不利于不定芽的增殖生长.可见红花百里香不定芽生长存在最佳诱导浓度为50 μmol/L.

#### 3.2 Cu<sup>2+</sup>对红花百里香不定芽中有机渗透调节物质的影响

在受到外界金属离子Cu<sup>2+</sup>胁迫时,植物细胞为维持正常的生理生化功能,会通过调节胞内的渗透调节物质来维持稳定的胞内膨压,防止脱水,对生物大分子功能与结构起到保护作用,其中可溶性糖和可溶性蛋白正是这种渗透物质<sup>[15]</sup>.在低浓度的时候,随着时间的延长,可溶性糖显著增加,这有利于降低植物细胞渗透势,细胞能够从外界环境中吸取水和养分,另一方面可溶性糖的增加可能与植物光合作用增强、碳水化合物积累有关<sup>[16]</sup>;在生长前期(第7~14 d),可溶性糖含量降低,而可溶性蛋白显著增加,可能这两者之间存在转化关系,植物细胞利用胞内碳源进行功能蛋白质的合成,为以后不定芽的快速增殖提供物质保

障.当高浓度时和生长后期,一方面植物为了尽量适应外界的胁迫环境而消耗过多能量,另一方面外界胁迫强度太大致使植物细胞结构受损伤,从而导致可溶性蛋白和可溶性糖的含量偏低,物质积累速度降低,不定芽增殖生长减慢.

### 3.3 $\text{Cu}^{2+}$ 对红花百里香不定芽中抗氧化酶(SOD,POD)活性的影响

红花百里香在不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  处理、不同生长时间段,其 SOD,POD 活性表现出不同的变化情况,具有一定的差异性.在不定芽生长旺盛时期(第 7~28 d),低浓度(10,50  $\mu\text{mol/L}$ )的  $\text{Cu}^{2+}$  能够诱导红花百里香 SOD,POD 活性的增强,有利于清除植物细胞内的氧自由基、丙二醛,有效地保护机体组织.但当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度过高时,红花百里香不定芽的生长过程中的 SOD 活性始终低于对照组,说明浓度太高对百里香细胞造成不可逆转的损伤,清除氧自由基的能力减弱;在第 28 d 时,浓度较高的处理组的 POD 活性明显要高于对照组和浓度低的处理组,说明高浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  导致植物体内氧自由基增加,加速了植物组织老化.

### 3.4 $\text{Cu}^{2+}$ 对红花百里香不定芽中 PAL 活性及挥发油的影响

苯丙氨酸解氨酶(PAL)是植物连接初级代谢和苯丙酸类代谢的关键酶和限速酶<sup>[17]</sup>.本实验中,  $\text{CuCl}_2$  作为外源诱导因子对红花百里香不定芽进行处理,发现在不定芽增殖生长过程中,添加  $\text{CuCl}_2$  的处理组的 PAL 活性始终要高于对照组;这说明  $\text{Cu}^{2+}$  有利于提高 PAL 活性,有利于红花百里香次生代谢物的合成积累,这就解释了其挥发油的含量为何增加了 23.98%.

花香挥发油是植物的次生代谢产物,含有酚、醚、醛、醇、酯类、烯烃类、芳香族化合物等,按照挥发油的合成路径可以分为苯丙酸类化合物、萜烯类化合物、脂肪族类化合物三大类.苯丙酸类化合物起源于植物体内的莽草酸途径;由莽草酸途径产生分支酸,分支酸再转换成苯丙氨酸(Phe),后经过 PAL 催化脱氨反应生成反式肉桂酸,之后再经过一系列的生化反应形成各种苯丙酸类/苯环型化合物<sup>[18]</sup>.有研究表明,高等植物体内的酚类化合物的生物合成是从苯丙氨酸脱氨反应开始的,而这反应正是在苯丙氨酸解氨酶(PAL)催化下完成的<sup>[19]</sup>.本实验中,随着 PAL 活性加强,植物细胞生成苯环型化合物含量增多,如百里香酚、香芹酚.其中,香芹酚含量由 5.758%增加到 26.226%,提高了 4.55 倍,效果十分显著.纯香芹酚是黄色稠厚油状液体,观察样品挥发油的颜色,可看出  $\text{Cu}^{2+}$  处理组的黄色更深一点(图 8),正是由于香芹酚的含量增加的缘故.另一方面,处理组挥发油中大部分酯类在减少,说明  $\text{Cu}^{2+}$  可能作用于某些酯类生物合成途径中某些环节,使其前体物质减少或者其催化酶的活性减弱,这一点有待进一步研究.

### 参考文献:

- [1] 张继,田玉汝,刘忠旺,等.百里香属植物研究进展[J].北方园艺,2010(1):226—228.
- [2] 李建国,杨莉,徐世千,等. NaCl 和壳聚糖对离体培养百里香精油的影响[J].热带作物学报,2011,32(10):1910—1914.
- [3] ARSLAN M, DERSIS S. Antifungal Activity of Essential Oils Against Three Vegetative Compatibility Groups of *Verticilliumdahliae* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(10): 1813—1821.
- [4] 黄健,马莉,姚雷,等.七种百里香精油的主成分分析及其化学型[J].上海交通大学学报(农业科学版),2009,27(3):206—209.
- [5] MORIMOTO T, HARA Y, KATO Y, et al. Berberine Production by Cultured *Coptis Japonica* Cells in a One-stage Culture Using Medium with a High Copper Concentration (Microbiology & Fermentation Industry) [J]. Agricultural & Biological Chemistry, 1988, 52(7): 1835—1836.
- [6] FUJITA Y, HARA Y, SUGA C, et al. Production of Shikonin Derivatives by Cell Suspension Cultures of *Lithospermumerythrorhizon*: II. A New Medium for the Production of Shikonin Derivatives [J]. Plant Cell Reports, 1981, 1(2): 61—63.
- [7] 李家儒,管志勇,刘曼西,等.  $\text{Cu}^{2+}$  对红豆杉培养细胞中紫杉醇形成的影响[J].华中农业大学学报,1999,18(2):117—120.
- [8] 王学奎.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [9] 谷荣辉,洪利亚,龙春林.植物细胞培养生产次生代谢物的途径[J].植物生理学报,2013,49(9):869—881.
- [10] 焦蒙丽,曹蓉蓉,陈红艳,等.水杨酸对丹参培养细胞中迷迭香酸生物合成及其相关酶的影响[J].生物工程学报,2012,28(3):320—328.

- [11] 杨 英, 郑 辉, 李 赟, 等. 茉莉酸甲酯与二氢茉莉酮酸甲酯对悬浮培养的甘草细胞生长和黄酮积累的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(5): 903—906.
- [12] 曹瑞霞, 周心渝, 李姣姣, 等. 外源 NO 对半夏组培苗次生代谢的调控 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(4): 14—19.
- [13] 刘连成, 董娟娥, 张婧一, 等.  $\text{Ca}^{2+}$  对丹参培养细胞中迷迭香酸合成及其相关酶活性的影响 [J]. 生物工程学报, 2012, 28(11): 1359—1369.
- [14] 邢建永, 王康才, 汤兴利, 等.  $\text{Ca}^{2+}$  对悬浮培养半夏类原球茎生长及次生代谢物累积的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 376—379.
- [15] 王 娟, 何 平, 张春平, 等. 外源 NO 供体硝普钠、甜菜碱、腐植酸对干旱胁迫下鸡冠花幼苗生理指标的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(4): 14—21.
- [16] 方志红, 董宽虎. NaCl 胁迫对碱蒿可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(16): 147—149.
- [17] LISTER C E, LANCASTER J E, WALKER J R L. Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) Activity and Its Relationship to Anthocyanin and Flavonoid Levels in New Zealand-grown Apple Cultivars [J]. Journal of the American Society for Horticulturalence, 1996, 121(2): 281—285.
- [18] SCHIE C V, HARING M A, SCHUURINK R C. Regulation of Terpenoid and Benzenoid Production in Flowers [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(2): 203—208.
- [19] 程水源, 顾曼如, 束怀瑞. 银杏叶黄酮研究进展 [J]. 林业科学, 2000, 36(6): 110—115.

## Effects of $\text{Cu}^{2+}$ on the Growth of the Adventitious Buds of *Thyme serpyllum* in in vitro Culture and Their Essential Oil

XU Zhi-peng<sup>1,2</sup>, LI Xiao-dong<sup>2</sup>, LU Zhao-hui<sup>2</sup>, LI Ling<sup>1</sup>

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. School of Applied Chemical and Biological Technology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen Guangdong 518055, China

**Abstract:** The adventitious buds of *Thyme serpyllum* induced in in vitro culture were treated by  $\text{Cu}^{2+}$  at different concentrations, and then various indicators were measured to investigate effect of  $\text{Cu}^{2+}$  on their growth and essential oil. The results showed that low concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  facilitated the proliferation of the adventitious buds while high concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  inhibited it. Of all the concentrations of  $\text{CuCl}_2$  studied, the treatment of  $50\mu\text{mol/L}$  gave the highest proliferation coefficient (20.35) and the highest essential oil content (27.25‰), which was 23.98% more than the control, and the color of the essential oil was deeper. Therefore, the study showed that the addition of  $\text{Cu}^{2+}$  at a suitable concentration could promote the proliferation of adventitious buds of *T. serpyllum* and enhance their resistance, and promote the accumulation of essential oil and change its composition.

**Key words:** *Thyme serpyllum*;  $\text{Cu}^{2+}$ ; soluble sugar content; soluble protein content; SOD; POD; PAL; essential oil

责任编辑 欧 宾



了解通信作者  
李凌的更多成  
果, 请扫二维码

