

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.05.003

外源物质对半夏愈伤氮代谢关键酶及有效成分积累的影响^①

刘 佳, 曹瑞霞, 吴能表

西南大学 生命科学学院/三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要: 以生长均一旦旺盛的半夏愈伤组织为材料, 研究外源添加物苯丙氨酸(Phe), 天冬氨酸(Asp), 硝普钠(SNP), 乙酰水杨酸(ASA)单独或两两复合对半夏愈伤组织氮代谢关键酶及有效成分含量的影响. 结果表明: 单独添加外源物均可有效提高氮代谢关键酶及 PAL 的活性、可溶性蛋白及总生物碱的含量, SNP 尤其明显; 复合添加外源物时, 1 mg/L ASA 和 150 mg/L Asp 复合加入时诱导氮代谢关键酶及 PAL 的活性升高且具有显著性, 可溶性蛋白、总生物碱、鸟苷含量显著增加. 50 mg/L Phe+1 mg/L ASA 复合加入时腺苷含量比对照提高了 128.6%. 说明外源添加物能有效调控次生代谢过程中氮代谢相关酶的变化, 从而影响半夏愈伤组织中次生代谢产物含量.

关键词: 半夏; 氮代谢; 有效成分; 外源物质

中图分类号: S567.23⁺9

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)05-0015-07

半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit 属于天南星科半夏属, 块茎可入药, 具有燥湿化痰, 降逆止呕, 消痞散结的功效^[1]. 但是药用植物的药用成分含量低一直是困扰人们的一大难题, 而添加外源物质是解决这一问题的有效途径. 外源物质包括营养元素、渗透调节物质、前体物、植物生长调节剂、诱导子、信号分子等^[2], 添加前体物和诱导子是目前提高有效成分常用且有效的方法^[3]. 诱导子是一种能引起植物过敏反应的物质, 其与植物相互作用时能选择性、快速、高度专一地诱导植物特定基因的表达, 从而积累特定的次生代谢产物^[4]. NO 不仅参与植物种子萌发、叶片伸展、根系生长、器官衰老等多种代谢过程^[5-9], 还可诱导植物次生代谢产物的合成^[10]. ASA 作为水杨酸(SA)的衍生物正逐渐被人们重视. 张秀省等^[11]研究发现, 2 mg/L ASA 处理长春花植株显著提高了长春花中长春质碱、总生物碱、长春碱的含量. 前体物是指某一代谢中间体前一段的物质, 添加前体物质会影响植物组织和细胞生长及次生代谢产物的合成^[3]. Phe, Asp 作为植物代谢中重要的氨基酸常被用于提高植物次生代谢产物的合成, 李琰^[12]在雷公藤的培养基中添加天冬氨酸、酪氨酸、精氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸和半胱氨酸, 发现均能不同程度地促进内酯醇的合成.

目前的研究主要集中在半夏再生体系的建立及外源物质对其生理生长的影响, 而外源物质对其次生代谢产物、氮代谢过程的影响及两者之间的关系却鲜有报道. 因此, 研究外源物质对半夏有效成分含量与氮代谢关键酶活性的关系具有重要意义. 本研究以半夏愈伤组织为材料, 通过添加适宜浓度的单一或两两复合外源物 Phe, Asp, SNP, ASA 于培养基中来研究外源物质对半夏愈伤组织中氮代谢相关酶及有效成分的影响, 以期从氮代谢方面探讨外源物质对半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷和腺苷的调控机理, 为提高半夏愈伤组织中有效成分含量提供参考.

① 收稿日期: 2016-06-26

基金项目: 国家自然科学基金(30500041); 重庆市科技攻关项目(CSTC2012gg-yyjs80013).

作者简介: 刘 佳(1990-), 女, 陕西蒲城人, 硕士研究生, 主要从事药用植物生化工程研究.

通信作者: 吴能表, 教授.

1 材料与方法

1.1 愈伤组织的诱导及处理

以半夏幼嫩叶柄为外植体, 0.1% HgCl_2 消毒 10 min 后用无菌水冲洗数遍, 然后切成约 0.5 cm 的小段于愈伤组织诱导培养基($\text{MS}+0.5 \text{ mg/L } 2,4\text{-D}+1.5 \text{ mg/L } \text{KT}+1.0 \text{ mg/L } \text{IAA}, 3.0\% \text{ 蔗糖}, 0.7\% \text{ 琼脂}, \text{pH}=5.8$)中. 诱导出愈伤组织后每 30 d 于继代培养基($\text{MS}+2.0 \text{ mg/L } 2,4\text{-D}+1.0 \text{ mg/L } \text{KT}+1.0 \text{ mg/L } \text{IAA}, 3.0\% \text{ 蔗糖}, 0.7\% \text{ 琼脂}, \text{pH}=5.8$)中继代 1 次, 继而作为实验材料.

根据预实验于继代培养基中添加不同质量浓度及组合的外源物质, 分别为 0 mg/L (CK), 50 mg/L Phe (T1), 150 mg/L Asp (T2), 1 mg/L SNP (T3), 1 mg/L ASA (T4), 50 mg/L Phe+150 mg/L Asp (T5), 50 mg/L Phe+1 mg/L ASA (T6), 150 mg/L Asp+1 mg/L ASA (T7), 1 mg/L SNP+1 mg/L ASA (T8), 50 mg/L Phe+1 mg/L SNP (T9), 1 mg/L SNP+150 mg/L Asp (T10). 30 d 后测定各项指标, 3 次重复.

1.2 测定方法

1.2.1 氮代谢关键酶及 PAL 活性测定

GOGAT, GDH 酶液提取参照 Zhao 等^[13]的方法, 略有改动: 精确称取半夏愈伤组织 1 g 后用 8 mL 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液($\text{pH}=8.0$)冰浴研磨, 随后 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 上清液即为酶提取液. GOGAT 活性测定参照王小纯等^[14]的方法, 每分钟反应混合液减少 1 μmol NADH 为一个酶活单位. GDH 活性测定参照 Loulakis 等^[15]的方法, 以每分钟于 30 °C 下氧化或还原 1 μmol 的辅酶 (NADH 或 NAD^+) 定义为一个酶活单位; GOT 酶提取液的提取: 精确称取半夏愈伤组织 0.4 g 后用 2.0 mL 0.25 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液($\text{pH}=7.2$)冰浴研磨, 然后 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 上清液则为酶提取液, 酶活性测定参照吴良欢等^[16]的方法, 一个 GOT 活性单位定义为每克植物鲜样在 1 h 内生成丙酮酸的微摩尔数. PAL 的活性测定参照孙健玲等^[17]的文献, 以每分钟 0.01 OD 值为一个酶活力单位(U).

1.2.2 可溶性蛋白含量测定

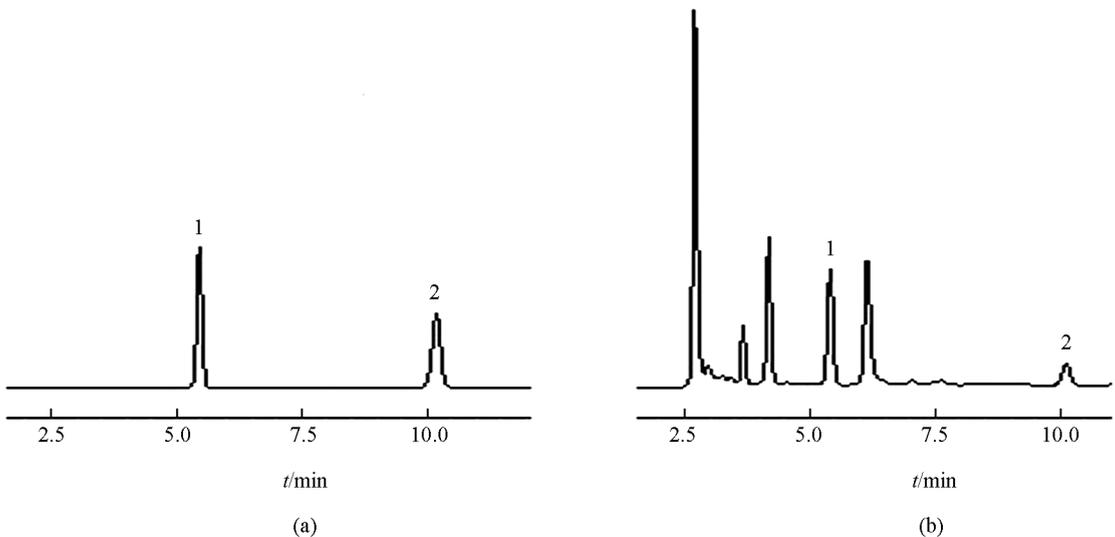
采用李合生^[18]的考马斯亮蓝 G250 比色法, 以牛血清蛋白为标准品.

1.2.3 总生物碱、鸟苷、腺苷含量测定

总生物碱测定方法参照于超等^[19]的方法.

鸟苷、腺苷样品制备采用超声提取法: 将半夏愈伤组织烘干至恒定质量后研碎过 50 目筛, 精密称取 0.3 g 粉末加 3 mL 30% 甲醇后称质量, 超声提取 30 min 后用 30% 甲醇补足至超声之前的质量, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清稀释 3 倍后经 0.22 μm 滤膜过滤后备用. 含量测定采用 HPLC 法^[20]: 色谱条件为 Xtimate C18 色谱柱, 流动相为甲醇: 水=15: 85, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL .

鸟苷、腺苷对照品及样品色谱图分别如图 1a 和图 1b 所示.



1: 为鸟苷; 2: 为腺苷.

图 1 鸟苷、腺苷标准品(a)和样品(b)HPLC 图

1.3 数据处理

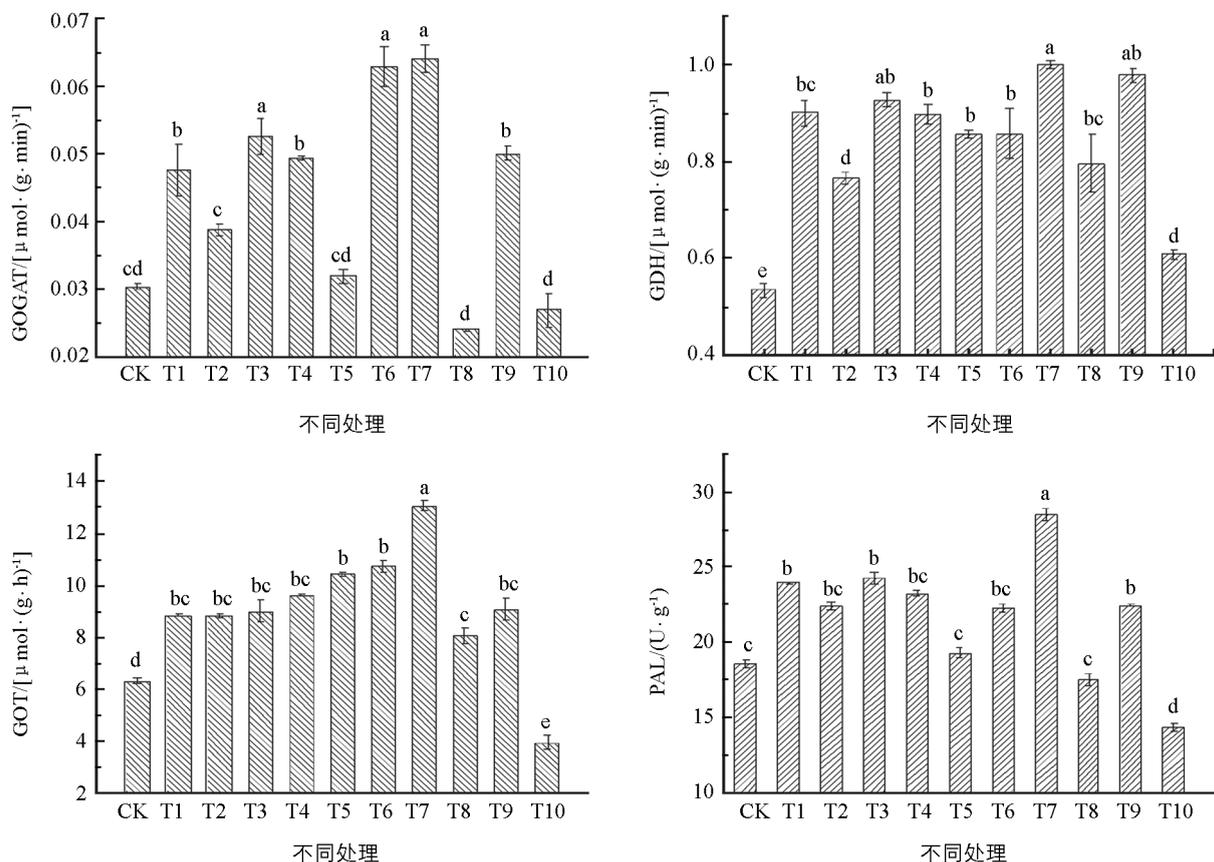
所有指标均重复测定 3 次, 数据采用 SPSS 11.5 进行统计分析和方差检验, 结果以平均值±标准误差表示。

2 结果与分析

2.1 不同处理对半夏愈伤组织中氮代谢相关酶及 PAL 活性的影响

由图 2 可知, 与对照相比, 单独(T1-T4)添加时 T1, T3, T4 处理均可显著提高半夏愈伤组织中 GOGAT 的活性, 提高幅度分别为 57.1%, 78.0%, 62.7%。同时, T1-T4 处理明显提高 GDH, GOT 的活性, 其中 T3, T4 处理效果最佳, GDH 的活性分别较对照提高了 77.4%, 68.2%, GOT 的活性分别较对照增加 42.4%, 52.0%; 复合(T5-T10)添加时, T6, T7, T9 处理可显著提高 GOGAT 的活性, 而 T8 和 T10 处理却抑制了 GOGAT 的活性; T5-T9 均显著提高了半夏愈伤组织中 GDH 和 GOT 的活性, 其中 T7 处理效果最佳, GDH, GOT 的活性分别较对照提高了 87.4%, 106.3%。

如图 2 所示, 与对照相比, T1-T4 处理均能提高半夏愈伤组织中 PAL 的活性, 其中 T1, T3 处理达到显著水平, 分别较对照提高了 26.9%, 28.9%; T5-T10 处理中, 除 T10 处理抑制 PAL 活性外, 其他各处理组均促进 PAL 活性的提高, 其中 T7 处理与其他处理的差异均具有统计学意义, 较对照增加了 63.9%。



图中不同小写字母表示差异具有统计学意义, 下同。

图 2 不同处理对半夏愈伤组织中 GOGAT, GDH, GOT, PAL 活性的影响

2.2 不同处理对半夏愈伤组织中可溶性蛋白含量的影响

如图 3 所示, 在 T1-T4 处理中, 与对照相比 4 种物质均可促进半夏愈伤组织中可溶性蛋白含量的积累且差异均具有统计学意义, 其中 T1 处理效果最明显; 在 T5-T10 处理中, 与对照相比可溶性蛋白含量均有增加且差异具有统计学意义, 其中 T7 处理效果最明显, 比对照提高了 107.9%; 综合 T1-T10 处理组, 最

佳复合处理组(T7)效果好于最优单独处理组(T1),但是两者之间差异不具有统计学意义。

2.3 不同处理对半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷及腺苷含量的影响

如表 1 所示,单独添加外源物(T1-T4)均促进了半夏愈伤组织中总生物碱的合成且与对照组的差异具有统计学意义,其中 T1 和 T3 处理效果最佳,分别提高了 125. % 和 124.24 %; T1, T2, T4 处理均显著提高了鸟苷的含量,其中 T4 处理效果最佳,较对照提高了 106.7 %,而 T3 处理却降低了鸟苷含量; T1 处理显著提高了腺苷的含量,提高幅度为 85.7 %。

两两复合添加时, T5-T9 处理显著提高了半夏愈伤组织中总生物碱含量,其中 T7 处理时升高幅度最大,而 T10 处理却抑制了总生物碱的积累; T5, T7, T10 处理对于鸟苷含量的提高均具有显著性,但 T8 处理抑制了鸟苷的积累; T5, T6 处理可显著提高腺苷的积累,分别比对照升高了 85.7 %, 128.6 %,而 T7, T8, T10 处理降低了腺苷积累。

在单独处理时, T1 处理对总生物碱、鸟苷、腺苷的积累效果最好;复合处理时, T7 处理对总生物碱含量和鸟苷含量提高幅度最大, T6 处理对腺苷含量提高幅度最大,而 T7 对总生物碱含量和鸟苷含量的提高幅度大于 T1, T6 对腺苷含量提高幅度大于 T1,所以复合处理效果更好。

表 1 不同处理对半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷及腺苷含量的影响

%

处理	指 标		
	总生物碱	鸟苷	腺苷
CK	0.165±0.010e	0.015±0.000c	0.007±0.000cd
T1	0.372±0.016b	0.031±0.001a	0.013±0.000ab
T2	0.311±0.015bc	0.026±0.000b	0.010±0.001bc
T3	0.370±0.014b	0.010±0.001d	0.003±0.000e
T4	0.320±0.021bc	0.031±0.001a	0.003±0.001e
T5	0.227±0.010d	0.032±0.001a	0.013±0.000ab
T6	0.277±0.014c	0.013±0.001c	0.016±0.000a
T7	0.381±0.007a	0.037±0.001a	0.005±0.000de
T8	0.350±0.013b	0.008±0.000d	0.003±0.001e
T9	0.379±0.026a	0.013±0.000c	0.007±0.001cd
T10	0.162±0.005e	0.030±0.002ab	0.002±0.000e

3 讨论与结论

3.1 前体物 Asp 和 Phe 对半夏愈伤组织中氮代谢和有效成分合成的影响

植物细胞培养基中添加前体物是提高次生代谢产物产量的有效途径. Carrier 等^[21]用银杏细胞中槲皮素的前体物黄烷酮、苯丙氨酸饲喂银杏细胞后发现,前体物的添加可使有效成分的含量增加 8~10 倍.前体物氨基酸进入植物体内后,可通过转氨基作用、脱氨基作用加以同化^[22]而被植物利用.在本实验中,适宜质量浓度的 Phe 和 Asp 均促进了半夏愈伤组织中氮代谢相关酶活性的提高及可溶性蛋白、总生物碱、鸟苷、腺苷含量的积累.可能是因为 Phe 通过 PAL 的催化作用生成反式肉桂酸,而 PAL 作用释放的 NH_4^+ 又经过同化过程^[23],这一过程刺激了氮代谢过程中相关酶活性的增加.也有可能因为氮代谢底物的增加导

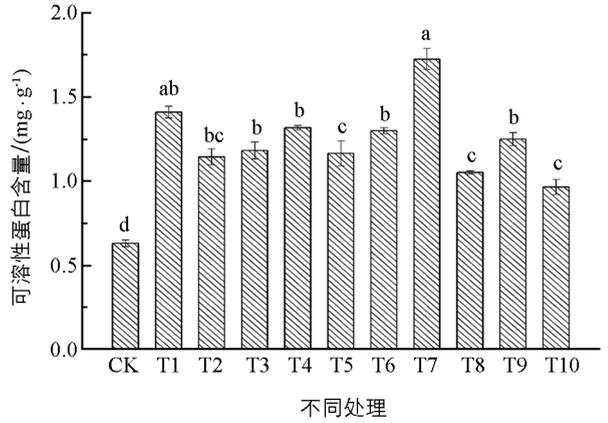


图 3 不同处理对半夏愈伤组织中可溶性蛋白含量的影响

致氮代谢相关酶活性的增加^[24], 从而加速了氮代谢的效率. 氮代谢期间合成的天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸及肉桂酸为半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷及腺苷的合成提供了大量底物. 同时 Phe 和 Asp 本身就是半夏有效成分合成的底物, 底物的增多也会大大提高有效成分合成的效率.

3.2 诱导子 SNP 和 ASA 对半夏愈伤组织中氮代谢和有效成分合成的影响

诱导子除了通过诱导次生代谢关键酶的基因表达提高其活性, 还通过调节氮代谢中某些酶的活性为次生代谢产物的生成提供能量和前体, 如张少颖等^[25]发现 SNP 浸种能促进玉米幼苗叶片 NR 活性的提高. 本研究发现, 向培养基中添加外源 NO 的供体 SNP 后, 半夏愈伤组织体内 GOGAT, GDH, GOT 等酶活性显著高于对照, 可能是外源 NO 提高了植物细胞中 NR 的活性^[26], 将植物吸收的 NO_3^- 还原成 NH_4^+ , NH_4^+ 的增多促使 GOGAT, GDH, GOT 等活性增强, 加速无机氮向有机氮的同化及转化. 由此推断, SNP 可能通过提高植物氮代谢相关酶活性来提高半夏愈伤组织中总生物碱的含量. 但 SNP 的添加却抑制了鸟苷及腺苷的合成, 可能是因为 SNP 对其合成过程中其他途径的关键酶产生了抑制作用, 这还有待于研究.

ASA 是 SA 的衍生物, 在植物体内可调节多种生理过程^[27-28]. 有研究表明, 外源物质 ASA 可提高植物体内 SA 水平, 并通过 SA 的生理效应实现其生理功能^[29]. SA 能激活磷脂酶催化质膜磷酸水解产生第二信使或增加次生代谢合成途径中参与次生代谢物合成酶的活性^[30]. 本研究发现, 添加适宜质量浓度的 ASA 提高了半夏愈伤组织细胞中 GOGAT, GDH, GOT 的活性, 可能是因为 SA 促进了 NR 活性的提高^[31], 使细胞快速将 NO_3^- 转化为 NH_4^+ , 然后通过 GS/OGAT 循环有效固定 NH_4^+ , 为合成前体物质 Phe 提供氨基. 也有可能是 SA 同时提高了 NR 和 GS 活性以及转氨酶的活性^[32], 从而加速了无机氮的吸收、同化及转运、合成游离氨基酸及可溶性蛋白, 并产生能量. ASA 的添加提高了半夏愈伤组织中 PAL 的活性, 可能诱导了 PAL 酶基因活性的表达, 提高了 PAL 的数量及活性^[33]. 研究发现, 添加诱导子 ASA 后, GOGAT, GDH, GOT, PAL 酶活性与总生物碱、鸟苷、腺苷含量呈一定的正相关, 猜测 ASA 可能通过提高氮代谢及次生代谢相关酶的活性, 直接或间接提供半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷和腺苷合成所需的底物及能量来提高半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷和腺苷的含量.

3.3 前体物和诱导子联合添加对半夏愈伤组织中氮代谢和有效成分合成的影响

两种或多种能提高次生代谢物产率的条件联合作用会对次生代谢物产量的提高发挥协同或加和作用. 曲均革等^[34]探索前体物苯丙氨酸和诱导子茉莉酸甲酯及光照等因素联合作用下对葡萄细胞产生花青素的影响, 得出结论是几种因素协同作用使鲜细胞花青素含量提高 2.7 倍, 产量提高 3.4 倍, 比单独加入时效果显著得多. 本研究发现, 复合添加与单独添加相比, 不同复合组合添加对氮代谢相关酶活性及有效成分积累的影响效果不同, 有的甚至出现了抑制现象. 比如 SNP 与 ASA、Asp 组合, 可能是因为质量浓度不合适或者没有协同作用, 也可能是加入的时间不合适, 这些都有待于进一步研究. 而 ASA 与 Asp、phe 组合却能显著提高氮代谢相关酶活性及有效成分含量, 且与单独添加相比差异具有统计学意义. 可能是因为前体物的加入为半夏细胞氮代谢及次生代谢提供了底物, 而诱导子进一步提高了 GOGAT, GDH, GOT 等氮代谢酶及 PAL 酶活性, 加速了无机氮的同化及转化, 为半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷及腺苷积累提供了更多的底物及能量.

综合所有处理可以看出, 单一处理对氮代谢关键酶、有效成分含量及两者之间的关系影响较为清楚, 氮代谢关键酶的变化与有效成分的含量呈正相关. 但对于复合添加, 两者之间的关系较为复杂, 氮代谢关键酶活性的变化与有效成分含量的变化无明显线性相关, 这可能是因为复合添加对外援物质加入的质量浓度及时间要求不同, 这些都有待于进一步研究.

本研究结果表明, 适宜质量浓度的 SNP, ASA, Phe, Asp 单一或两两复合添加调控半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷和腺苷合成与其体内氮代谢有关. 一方面调节 GOGAT, GDH 和 GOT 的活性, 通过提高 GOGAT, GDH 等酶的活性促进无机氮向有机氮转化, 提高 GOT 的活性促进谷氨酸转移为其他氨基酸, 进而合成蛋白质和其他含氮类化合物, 为总生物碱、鸟苷和腺苷合成提供底物及能量; 另一方面通过提高

PAL 活性, 加速苯丙烷类物质代谢, 促进总生物碱的合成. 单独添加时, 添加 phe 对氮代谢相关酶活性的提高及有效成分含量的积累效果最好; 复合添加 1 mg/L ASA 和 150 mg/L Asp 诱导 GOGAT, GDH, GOT, PAL 的活性提高和可溶性蛋白含量的增加效果最好, 此时半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷含量最高.

参考文献:

- [1] 何 萍, 李 帅, 王素娟, 等. 半夏化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 671—674.
- [2] 安晓霞, 曾梁斌, 薛邵东, 等. 外源物质在植物抗逆中的应用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(19): 6241—6244.
- [3] 张敏敏, 陈玉梁, 赵 瑛, 等. 药用植物组织培养生产有效成分的影响因素的研究进展 [J]. 甘肃农业科技, 2013(7): 43—46.
- [4] 任振兴. 黄芩愈伤组织培养及其次级代谢物合成调控的研究 [D]. 太原: 山西大学, 2006.
- [5] DURNER J, WENDEHENNE D, KLESSIG D F. Defense Gene Induction in Tobacco by Nitric Oxide, Cyclic GMP, and Cyclic ADP-Ribose [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(17): 10328—10333.
- [6] GIBA Z, GRUBIŠIĆ D, TODOROVIC S, et al. Effect of Nitric Oxide-Releasing Compounds on Phy-Tochrome Controlled Germination of Empress Tree Seeds [J]. Plant Growth Regulation, 1998, 26(3): 175—181.
- [7] VAN CAMP W, VAN MONTAGU M, INZÉ D. H₂O₂ and NO: Redox Signals in Disease Resistance [J]. Trends in Plant Science, 1998, 3(9): 330—334.
- [8] RUAN H, SHEN W, XU L. Nitric Oxide Modulates the Activities of Plasma Membrane H ATPase and PPase in Wheat Seedling Roots and Promotes the Salt Tolerance Against Salt Stress [J]. Acta Botanica Sinca-english Edition, 2004, 46(4): 415—422.
- [9] CHANDOK M R, YTTERBERG A J, VAN WIJK K J, et al. The Pathogen-Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Plants is a Variant of the P Protein of the Glycine Decarboxylase Complex [J]. Cell, 2003, 113(4): 469—482.
- [10] 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.
- [11] 张秀省, 张荣涛, 聂莉莉, 等. 长春花叶片中吲哚生物碱增产的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 265—267.
- [12] 李 琰. 雷公藤组织培养生产次生代谢产物及其代谢调控研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [13] ZHAO Q, CHEN J, LIU H, et al. Relationship Between Activities of Nitrogen Assimilation Enzymes and Leaf Color of Rice [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(9): 2607—2616.
- [14] 王小纯, 熊淑萍, 马新明, 等. 不同形态氮素对专用型小麦花后氮代谢关键酶活性及籽粒蛋白质含量的影响 [J]. 生态学报, 2005, 25(4): 802—807.
- [15] LOULAKAKIS C A, ROUBELAKIS-ANGELAKIS K A. Intracellular Localization and Properties of NADH-Glutamate Dehydrogenase from Vitis Vinifera L: Purification and Characterization of the Major Leaf Iso-Enzyme [J]. Journal of Experimental Botany, 1990, 41(10): 1223—1230.
- [16] 吴良欢, 蒋式洪, 陶亲南. 植物转氨酶活度比色测定方法及其应用 [J]. 土壤通报, 1998, 29(3): 136—138.
- [17] 孙健玲. 半夏的快繁及诱导子对其愈伤组织总生物碱积累的影响 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [18] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [19] 于 超, 张 明, 王 宇, 等. 栽培野生及不同产地半夏总生物碱测定 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 583—584.
- [20] 张 敏, 何 平, 喻泽莉, 等. 模拟酸雨胁迫及施肥与遮荫对半夏主要药用成分质量分数的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2011, 33(4): 5—11.
- [21] CARRIER D, ARCHAMBAULT J, HEIJDEN R, et al. Formation of Terpenoid Products in *Ginkgo biloba* L. Cultivated Cells [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(12): 888—891.
- [22] 徐春梅, 王丹英, 陈 松, 等. 增氧对水稻根系生长与氮代谢的影响 [J]. 中国水稻科学, 2012, 26(3): 320—324.
- [23] 刘 伟, 朱端卫, 刘大会, 等. 施氮对福田河百叶片氮代谢及其类黄酮量的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 229—333.
- [24] 魏欣芳, 周 斌, 贾景明. 3 种前体饲喂对高山红景天悬浮培养细胞中红景天苷的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 83—86.
- [25] 张少颖, 任小林, 程顺昌, 等. 外源一氧化氮供体浸种对玉米种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 309—310.
- [26] 周万海, 师尚礼, 寇江涛. 盐胁迫下外源 NO 对苜蓿幼苗生长及氮代谢的影响 [J]. J Appl Ecol, 2012, 23(11):

3003—3008.

- [27] 汪晓峰, 张宪政. ASA 提高小麦抗旱性生理效应的研究 [J]. 植物学通报, 1998, 15(3): 48—50.
- [28] 张扬欢, 孙金春, 温 泉, 等. 乙酰水杨酸对增强 UV-B 辐射下长春花光合作用及抗氧化酶活性的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2011, 33(2): 17—22.
- [29] 张 玉. 水杨酸对采后猕猴桃果实成熟衰老的调控及其机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [30] 张倩一. 水杨酸诱导 H₂O₂ 来源及其在酚类化合物生物合成中的作用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [31] JAIN A, SRIVASTAVA H S. Effect of Salicylic Acid on Nitrate Reductase Activity in Maize Seedlings [J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, 51(4): 339—342.
- [32] 曹岩坡, 高志奎, 何俊萍, 等. 外源水杨酸对韭菜硝酸盐累积及还原同化的影响 [J]. 园艺学报, 2009, 36(3): 415—420.
- [33] 梅兴国, 张舟宁. 水杨酸对红豆杉细胞的诱导作用 [J]. 生物技术, 2000, 10(6): 18—20.
- [34] 曲均革, 虞星炬, 张 卫, 等. 前体饲喂、诱导子和光照联合使用对葡萄细胞培养合成花青素的影响 [J]. 生物工程学报, 2006, 22(2): 299—305.

Effects of Exogenous Substances on the Key Enzymes Involved in Nitrogen Metabolism in *Pinellia ternate* Calli and on the Accumulation of Active Components in Them

LIU Jia, CAO Rui-xia, WU Neng-biao

School of Life Science, Southwest University/Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing 400715, China

Abstract: In this study, we took uniform and vigorous calli of *Pinellia ternate* as the experiment materials and studied the effects of exogenous substances (Phe, Asp, SNP and ASA) used alone or in combination on the key enzymes involved in N metabolism and the accumulations of active components in them. The results showed that the activities of nitrogen metabolism-involved key enzymes and the contents of soluble protein and total alkaloids in the calli were increased in all treatments, where an exogenous substance was applied, the effect of SNP being most significant. In treatments, where two exogenous substances were added into the medium, the activities of N metabolism-involved key enzymes and PAL as well as the contents of soluble protein, total alkaloids and guanosine were increased significantly after the addition of 1 mg/L ASA+150 mg/L Asp. In the treatment of 50 mg/L Phe+1 mg/L ASA, the contents of adenosine increased by 129%, compared with the control. To sum up, exogenous substances can effectively regulate the activities of nitrogen metabolism-related enzymes of secondary metabolism, thus affecting the contents of secondary metabolites of the calli of *P. ternate*.

Key words: *Pinellia ternate*; nitrogen metabolism; active component; exogenous substance

责任编辑 夏 娟

