

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.03.006

# 外源添加物对半夏愈伤组织生长及次生代谢物的影响<sup>①</sup>

吴能表<sup>1</sup>, 曹瑞霞<sup>1</sup>, 吴思婧<sup>2</sup>, 刘兴<sup>1</sup>

1. 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;

2. 西南大学 附属中学, 重庆 400700

**摘要:** 研究了添加前体物和诱导子对半夏愈伤组织生长及其生物碱、鸟苷、腺苷的影响。结果表明: 在试验质量浓度范围内, 前体物 Phe, Asp 抑制半夏愈伤组织的生长, 而诱导子 SNP 和 ASA 则促进其生长; 低质量浓度 Phe 促进半夏愈伤组织中总生物碱的积累, 而高质量浓度则抑制其合成, 不同质量浓度的 Asp, SNP, ASA 均促进其体内总生物碱的积累; Phe 和 ASA 对半夏愈伤组织中鸟苷的合成均为低质量浓度时促进而高质量浓度时抑制, 不同质量浓度 Asp, SNP 则均促进其鸟苷的合成; 前体物 Phe 和 Asp 有利于半夏愈伤组织中腺苷的合成, 但是诱导子 SNP 和 ASA 却抑制腺苷的积累。

**关键词:** 半夏; 愈伤组织; 诱导子; 前体物; 次生代谢物

**中图分类号:** Q949.71<sup>+</sup>7.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2018)03-0042-06

半夏 *Pinellia ternata* 为天南星科半夏属多年生宿根草本植物, 块茎可入药, 是一味传统的中药材。其性温、味辛<sup>[1-2]</sup>。生物碱、鸟苷、腺苷是其主要有效成分, 药理作用强, 具有镇咳祛痰、健脾胃、止呕吐、降压降脂、抗心律失常、抗坏血栓及抗肿瘤等功效<sup>[3-6]</sup>。通过植物组织培养技术对半夏进行组织培养来生产有效成分, 而添加特定的外源物质来提高植物体内次生代谢物是目前提高植物次生代谢物的有效办法<sup>[7-12]</sup>。本文以三叶半夏愈伤组织为材料, 用不同质量浓度诱导子硝普钠(SNP), 乙酰水杨酸(ASA)和前体物苯丙氨酸(Phe), 天冬氨酸(Asp)来诱导半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷及腺苷的合成, 筛选出促进半夏愈伤组织次生代谢物积累的外源添加物及最适质量浓度, 为半夏的工业化生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

半夏愈伤组织由本实验室以三叶半夏叶柄为外植体诱导而来, 选取继代 4 次生长均一的稳定体系。培养条件为 MS+2.0 mg/L 2, 4-D+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IAA+3.0%蔗糖+0.7%琼脂, pH 值为 5.8~6.0(灭菌前), 温度(25±1)℃, 暗培养, 培养周期为 30 d。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 添加前体和诱导子试验设计

前体物为 Phe 和 Asp, 添加的质量浓度梯度分别为 0 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L;

① 收稿日期: 2017-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500041); 重庆市教委雏鹰计划项目(CY160204)。

作者简介: 吴能表(1969-), 男, 四川平昌人, 教授, 博士, 主要从事植物次生代谢研究。

诱导子 SNP 添加的质量浓度梯度为 0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L; 诱导子 ASA 添加的质量浓度梯度为 0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L.

将半夏愈伤组织接种于添加有诱导子的固体培养基, 并立即置于培养箱中暗处理 30 d. 对照为不添加任何诱导子.

### 1.2.2 半夏愈伤组织生长测定

将培养 30 d 的愈伤组织取出, 洗去培养基后用吸水纸吸干水分, 放于天平上称鲜质量, 计算半夏愈伤组织的相对生长速率.

$$R = (m_2 - m_1) / m_1 \times 100$$

式中:  $R$  为相对生长率;  $m_1$  为接种鲜质量(g);  $m_2$  为收获鲜质量(g).

### 1.2.3 总生物碱含量测定

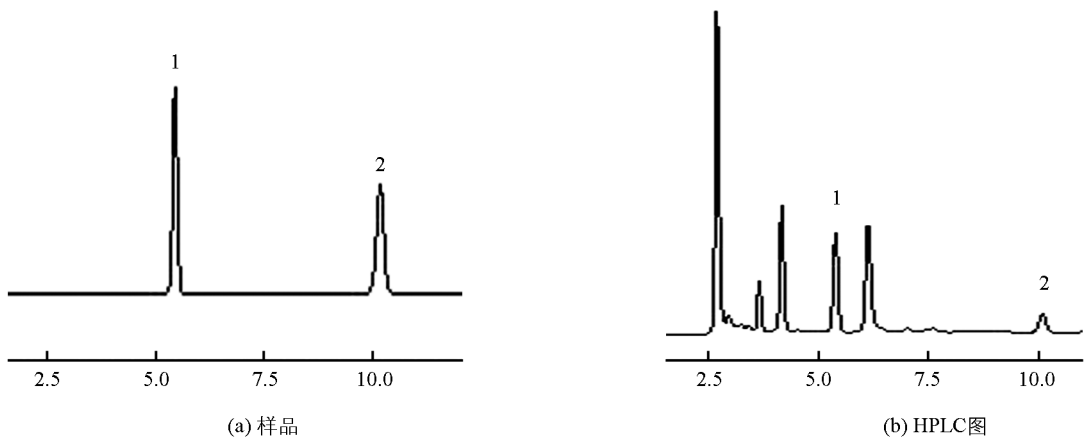
取出培养 30 d 后的各处理组半夏愈伤组织, 用水洗净培养基后放入烘箱中先于 80 °C 烘 2 h, 之后于 60 °C 下烘干, 磨碎后过 60 目筛, 其粉末用于生物碱测定. 测定方法参照于超等<sup>[13]</sup>的紫外分光光度计法.

### 1.2.4 鸟苷、腺苷的测定

色谱条件: 参照张敏等<sup>[14]</sup>的文献略有改动, Xtimate C18 色谱柱(4.60 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇:水=15:85, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL. 鸟苷和腺苷的色谱峰分离良好, 鸟苷保留时间约为 5.5 min, 腺苷保留时间约为 10 min.

样品制备: 将半夏愈伤组织烘干至恒质量, 研碎过 60 目筛, 取各处理组样品粉末 0.3 g 加入 30% 甲醇 3 mL 后称质量, 超声提取 30 min, 用 30% 甲醇补足质量后于离心机 5 000 r/min 离心 10 min, 提取上清液再稀释 3 倍, 过 0.22 μm 微孔滤膜后进样.

鸟苷、腺苷标准品及样品色谱图见图 1.



1. 鸟苷; 2. 腺苷.

图 1 鸟苷、腺苷标准品(a)和样品(b)HPLC图

数据均采用 SPSS 11.5 进行统计分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 Phe 对半夏愈伤组织生长及体内总生物碱、鸟苷及腺苷的影响

不同质量浓度的 Phe 对半夏愈伤组织的生长均有抑制作用. 当 Phe 质量浓度为 25 mg/L 和 50 mg/L 时, 半夏愈伤组织相对生长速率分别比对照降低 22.8% 和 7.9%, 但是与对照差异不显著, 高质量浓度 Phe 则显著抑制其生长.

Phe 在 0 mg/L~150 mg/L 质量浓度范围内, 总生物碱含量呈先增加后降低的趋势, 其中 50 mg/L 时

达到最大,比对照增加了99%,其后随着Phe质量浓度的升高而下降。

鸟苷在Phe质量浓度为0 mg/L~50 mg/L时逐渐升高,50 mg/L时达到最大,在半夏体内鸟苷百分比为0.041%,其后逐渐降低,在150 mg/L时最小,比对照降低了46.7%,说明低质量浓度Phe促进鸟苷的合成,而高质量浓度Phe会抑制鸟苷的积累。

在Phe质量浓度为0 mg/L~100 mg/L范围内,均促进半夏愈伤组织中腺苷的积累,其中50 mg/L时效果最显著,与对照相比增幅为112.5%,呈显著性差异,当Phe质量浓度为150 mg/L时,则抑制了腺苷的积累(表1)。

表1 不同质量浓度Phe对半夏愈伤组织生长及体内总生物碱、鸟苷及腺苷的影响

Phe/ (mg·L <sup>-1</sup> )	指 标			
	相对生长速率/%	总生物碱/%	鸟苷/%	腺苷/%
0	1.206±0.091a	0.192±0.016bc	0.018±0.004c	0.008±0.000c
25	0.930±0.102ab	0.281±0.010b	0.025±0.006b	0.008±0.000c
50	1.110±0.032a	0.382±0.020a	0.041±0.005a	0.017±0.000a
100	0.625±0.028b	0.213±0.007bc	0.019±0.005b	0.012±0.001b
150	0.703±0.024b	0.174±0.021c	0.010±0.001c	0.006±0.000c

注:表1中数据为平均值±标准误差,同一列数据中字母不同者表示差异达5%显著水平(下同)。

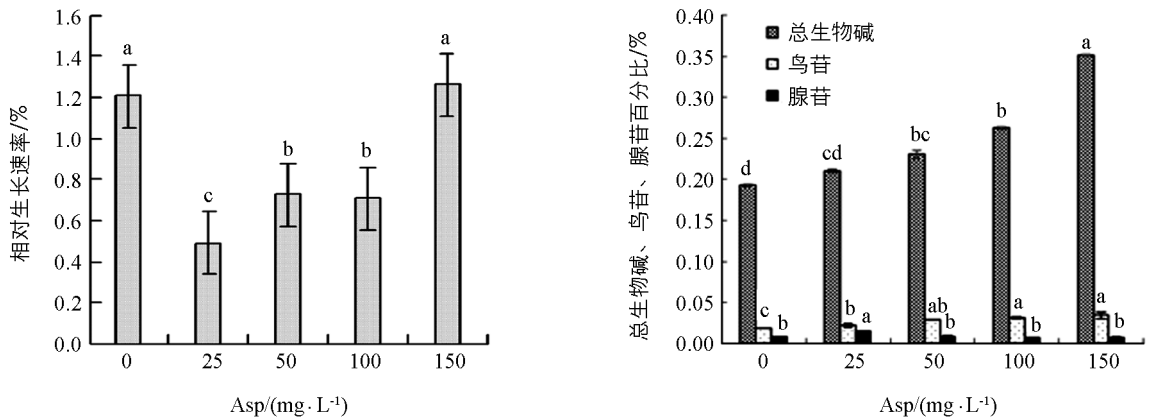
## 2.2 Asp对半夏愈伤组织生长及体内总生物碱、鸟苷及腺苷的影响

在0 mg/L~100 mg/L范围内的Asp均抑制半夏愈伤组织生长,且随着质量浓度升高,其抑制作用逐渐减弱,在Asp质量浓度为150 mg/L时,反而促进了半夏愈伤组织生物量的增加,但与对照差异不显著。

不同质量浓度Asp的加入均有利于半夏愈伤组织中总生物碱的积累,与对照相比分别提高了9.9%,23.4%,36.5%,82.8%。

在培养基中添加质量浓度为0 mg/L~150 mg/L的Asp后,半夏愈伤组织中鸟苷百分比提高,且呈逐渐上升趋势,其中添加150 mg/L Asp使鸟苷达到最大值,与对照相比增加了90%。

在0 mg/L~25 mg/L Asp范围内,半夏愈伤组织体内腺苷迅速增加,当质量浓度为25 mg/L时达到最大值,比对照提高了87.5%,25 mg/L~150 mg/L范围内的Asp抑制其体内腺苷的合成,分别比对照降低了25%,12.5%,但是差异不显著。



图中数据为平均值±标准误差,同一组数据中字母不同者表示差异达5%显著水平(下同)。

图2 不同质量浓度Asp对半夏愈伤组织生长及体内总生物碱、鸟苷及腺苷的影响

## 2.3 SNP对半夏愈伤组织生长及体内总生物碱、鸟苷及腺苷的影响

在试验质量浓度范围内,SNP的添加均有利于半夏愈伤组织的生长,且随着质量浓度的增加,其相对生长速率逐渐增大,当SNP质量浓度为5 mg/L时,与对照相比增幅为173.5%,呈极显著差异。

不同质量浓度SNP的加入,均促进了半夏愈伤组织中总生物碱的积累,整体呈先上升后下降的趋势,

其中 SNP 质量浓度为 1 mg/L 时达到最大值, 比对照增加了 92.7%。

SNP 对半夏细胞内鸟苷的积累为低质量浓度时促进, 高质量浓度时抑制。在 0 mg/L~0.1 mg/L 质量浓度范围内, 半夏细胞内鸟苷百分比增加, 且 SNP 质量浓度在 0.1 mg/L 时达到最大, 比对照增加了 10%, 其后随着培养基中 SNP 质量浓度升高, 半夏细胞内鸟苷的合成开始受到抑制, 且质量浓度越大抑制作用越强。

不同质量浓度 SNP 的添加均抑制半夏愈伤组织中腺苷的积累(表 2)。

表 2 不同质量浓度 SNP 对半夏愈伤组织生长及体内总生物碱、鸟苷及腺苷的影响

SNP/ (mg·L <sup>-1</sup> )	指 标			
	相对生长速率/%	总生物碱/%	鸟苷/%	腺苷/%
0	1.206±0.091c	0.192±0.010d	0.018±0.000ab	0.008±0.000a
0.1	2.670±0.032b	0.278±0.021b	0.020±0.001a	0.007±0.000a
0.5	1.458±0.025c	0.208±0.017c	0.016±0.001b	0.004±0.000bc
1	2.851±0.056ab	0.370±0.014a	0.011±0.001c	0.002±0.000c
5	3.299±0.081a	0.260±0.015bc	0.009±0.000c	0.005±0.001b

## 2.4 ASA 对半夏愈伤组织生长及体内总生物碱、鸟苷及腺苷的影响

添加不同质量浓度的 ASA 于半夏愈伤组织培养基中均可促进半夏愈伤组织生长, 但随着 ASA 质量浓度的升高, 其相对生长速率呈先增加后降低的趋势, 分别比对照增加了 10.4%, 46.7%, 138.4%, 34.7%。

对于总生物碱, 当 ASA 质量浓度为 0 mg/L~1 mg/L 时, 总生物碱的合成量逐渐增加, 在 1 mg/L 时达到最大, 与对照相比增幅为 80.2%。随后开始下降, 但在 ASA 质量浓度为 3 mg/L 时, 仍高于对照组。

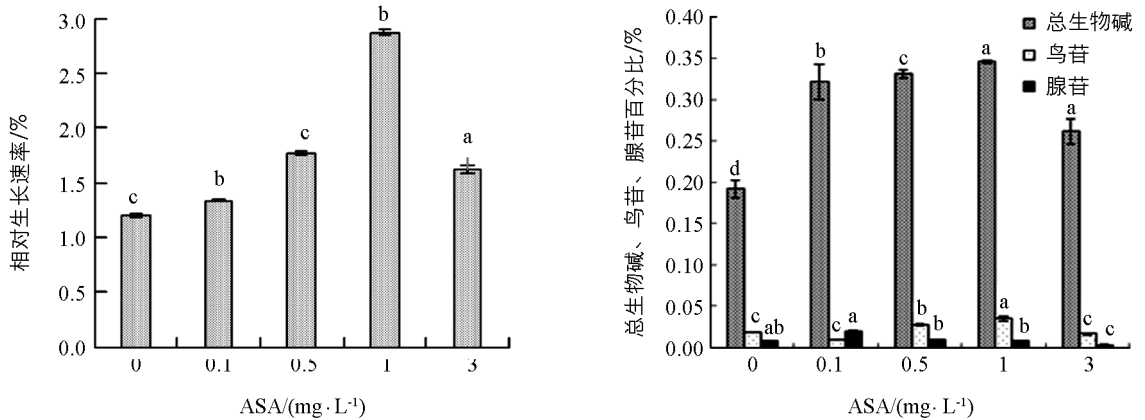


图 3 不同质量浓度 ASA 对半夏愈伤组织生长及体内总生物碱、鸟苷及腺苷的影响

当 ASA 质量浓度较低时促进半夏愈伤组织中鸟苷的积累, 质量浓度较高时则抑制鸟苷的合成, 其中 ASA 质量浓度为 1 mg/L 时合成量最高, 比对照增加了 93.3%。

ASA 对半夏愈伤组织中腺苷的影响与鸟苷类似, 在 ASA 质量浓度低时促进, 质量浓度高时抑制。在 0 mg/L~0.1 mg/L 时, 半夏愈伤组织腺苷合成量增加, 在 0.1 mg/L 时最高, 比对照增加了 150%, 但当 ASA 质量浓度高于 0.1 mg/L 后, 腺苷含量迅速降低, 当 ASA 质量浓度为 3 mg/L 时, 半夏愈伤组织中腺苷比对照降低了 62.5%(图 3)。

## 3 讨论与结论

生物碱、鸟苷和腺苷是半夏的主要有效成分。Phe 作为一种体内必需的氨基酸及前体物质, 可能通过多种代谢通路直接或间接地调控了半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷和腺苷的合成, Asp 是腺苷的直接前体物质<sup>[15-19]</sup>。本研究结果表明, 低质量浓度的 Phe 促进半夏愈伤组织中总生物碱、鸟苷、腺苷的合成, 其中 50 mg/L Phe 效果最好, 较高 Phe 质量浓度的添加则抑制其总生物碱、鸟苷和腺苷的积累。低

质量浓度 Asp 的添加有利于半夏愈伤组织中腺苷的积累,高质量浓度时则抑制腺苷的合成。

一氧化氮(NO)是一种新型的植物信号分子,目前已证实是参与植物细胞次生代谢产物合成调控的必需信号分子之一<sup>[20]</sup>。本研究发现,试验质量浓度范围内的 SNP 均可促进半夏愈伤组织中总生物碱的积累,其中 SNP 为 1 mg/L 时效果最明显;SNP 对半夏愈伤组织中鸟苷的积累具有低质量浓度时促进,高质量浓度时抑制的现象;不同质量浓度 SNP 均抑制半夏愈伤组织中腺苷的积累,说明外源 NO 参与了半夏愈伤组织次生代谢的调控。

ASA 在植物体内具有提高植物抗性,改善果实口感,提高果实品质等多方面的功能<sup>[21-22]</sup>,近年来亦被用于植物次生代谢的调控。在本试验中,不同质量浓度的 ASA 对半夏愈伤组织中总生物碱均有促进作用,以 1 mg/L ASA 对其促进效果最明显,为对照的 180.2%。半夏愈伤组织中鸟苷和腺苷的合成均表现为低质量浓度 ASA 时被促进,而高质量浓度 ASA 时被抑制,其中鸟苷在 1 mg/L ASA 时达到最大,腺苷在 0.1 mg/L ASA 时处于峰值,说明了 ASA 有利于半夏中总生物碱、鸟苷、腺苷的合成,但是诱导不同次生代谢物合成所需的 ASA 质量浓度不同。

在试验质量浓度范围内,前体物 Phe,Asp 的添加均抑制半夏愈伤组织生长,而诱导子 SNP,ASA 的添加促进半夏愈伤组织的生长;Phe 在低质量浓度时促进半夏愈伤组织中总生物碱的积累,高质量浓度时则抑制其合成,不同质量浓度的 Asp,SNP,ASA 添加均可促进半夏愈伤组织中总生物碱的积累;低质量浓度 Phe 和 ASA 的添加可促进半夏愈伤组织中鸟苷的合成,而高质量浓度 Phe 和 ASA 的添加则会抑制鸟苷的积累,不同质量浓度 Asp,ASA 对半夏愈伤组织中鸟苷的合成均起促进作用;除不同质量浓度 SNP 的添加抑制半夏愈伤组织中腺苷的积累外,Phe,Asp,ASA 对半夏愈伤组织中腺苷的合成均具有低质量浓度时促进,高质量浓度时抑制的现象。说明不同外源添加物对半夏愈伤组织生长及总生物碱、鸟苷、腺苷的作用效果与添加物的种类质量浓度有关。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] VERPOORTE R. Exploration of Nature's Chemodiversity: the Role of Secondary Metabolites as Leads in Drug Development [J]. *Drug Discovery Today*, 1998, 3(5): 232-238.
- [3] 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.
- [4] GIBA Z, GRUBIŠIĆ D, TODOROVIĆ S, et al. Effect of Nitric Oxide-Releasing Compounds on Phytochrome Controlled Germination of Empress Tree Seeds [J]. *Plant Growth Regulation*, 1998, 26(3): 175-181.
- [5] CAMP W V, MONTAGU M V, INZÉ D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO Redox Signals in Disease Resistance [J]. *Trends in Plant Science*, 1998, 3(9): 330-334.
- [6] 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 Sinica-English Edition*, 2004, 46(4): 415-422.
- [7] 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.
- [8] 苗志奇,元英进. 水杨酸在紫杉醇生物合成中诱导作用的研究 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(4): 509-513.
- [9] 王玲丽. 喜树营养器官的结构及喜树碱含量动态变化的研究 [D]. 西安:西北大学,2006.
- [10] 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.
- [11] 曾鑫年,张善学,方剑锋,等. 毛鱼藤酮与鱼藤酮杀虫活性的比较 [J]. *昆虫学报*, 2002, 45(5): 611-616.
- [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] 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.
- [14] 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.

- [15] SONG J, ZHANG Y, QI J, et al. Selection of a High Tanshinone-Producing Crown Gall Strain and Production of Tanshinone in the Strain [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1997, 13(3): 207—210.
- [16] 李景川, 孙安慈. 铈对悬浮培养南方红豆杉细胞可溶性蛋白和紫杉醇合成动态的影响 [J]. 中国稀土学报, 2001, 19(2): 162—166.
- [17] EDAHIRO J, NAKAMURA M, SEKI M, et al. Enhanced Accumulation of Anthocyanin in Cultured Strawberry Cells by Repetitive Feeding of L-Phenylalanine Into the Medium [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 99(1): 43—47.
- [18] 孙健玲, 张玉琼, 朱景存, 等. 诱导子对半夏细胞生长和总生物碱积累的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 28—30.
- [19] 赵德修, 汪沂, 赵敬芳. 不同理化因子对雪莲培养细胞中黄酮类形成的影响 [J]. 生物工程学报, 1998, 14(3): 259—264.
- [20] 徐茂军, 董菊芳, 张刚. NO 对金丝桃悬浮细胞生长及金丝桃素生物合成的促进作用研究 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(1): 66—70.
- [21] 王海华. 乙酰水杨酸对镍胁迫下水稻幼苗中 O 水平和膜脂过氧化的影响 [J]. 农业环境保护, 2001, 20(3): 148—151.
- [22] 姜晶, 李天来, 鲁少尉, 等. 乙酰水杨酸在番茄果实发育期间对蔗糖代谢相关酶活性的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 649—652.

## Effects of Exogenous Additives on Callus Growth and Secondary Metabolites Content of *Pinellia ternata*

WU Neng-biao<sup>1</sup>, CAO Rui-xia<sup>1</sup>, WU Si-jing<sup>2</sup>, LIU Xing<sup>1</sup>

1. School of Life Science, Southwest University/Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing 400715, China;
2. High School Affiliated to Southwest University, Chongqing 400700, China

**Abstract:** The effects of elicitors and precursors on callus growth and contents of total alkaloids, guanosine and adenosine in *Pinellia ternata* were studied. The results showed that precursors of Phe and Asp can inhibited callus growth. However, the induction of SNP and ASA promoted the growth of callus in the range of test concentration. Low concentration of Phe increased the total alkaloids accumulation in callus of *Pinellia ternata*. while high concentrations of Phe inhibited the accumulation. Different concentrations of Asp, SNP and ASA could promote the total alkaloids accumulation. Low concentration of Asp and SNP showed positive action on the synthesis of guanosine in callus, but high concentration of them had adverse effects on the synthesis of guanosine. Different concentrations of Asp and SNP could promote the synthesis of guanosine. The precursors of Phe, Asp were conducive to the synthesis of adenosine in callus of *Pinellia ternata*, but SNP and ASA inhibited the accumulation of adenosine.

**Key words:** *Pinellia ternata*; callus; elicitors; precursors; secondary metabolite

