

锗对铁皮石斛原球茎的生长及抗氧化酶系的影响

唐凤¹, 丁小余¹, 丁鸽¹, 刘冬扬², 贺佳², 沈洁¹, 褚必海²

(1. 南京师范大学生命科学学院 210097 江苏 南京)

(2. 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室 210097 江苏 南京)

[摘要] 研究了不同浓度的锗(GeO_2)对组培铁皮石斛原球茎的鲜重、可溶性蛋白质、叶绿素含量以及保护酶系统(SOD, CAT, POD)活性的影响. 结果表明 适宜浓度的 GeO_2 (5.00 mg/L)能够显著增加铁皮石斛原球茎的鲜重, 提高可溶性蛋白质和叶绿素含量, 使 SOD、CAT 活性明显升高, 而 POD 的活性则呈现缓慢的下降趋势. 由此可见 培养基中添加 5.00 mg/L 的锗时, 对铁皮石斛原球茎的生长是有明显促进作用的.

[关键词] 锗, 铁皮石斛, 原球茎, 抗氧化酶系统

[中图分类号] Q946, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)04-0086-04

Effects of Dioxide Germanium on the Protocorm of *Dendrobium Officinale* in Vitro

Tang Feng¹, Ding Xiaoyu¹, Ding Ge¹, Liu Dongyang², He Jia², Shen Jie¹, Chu Bihai²

(1. School of life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, 210097, Nanjing, China)

Abstract The effects of dioxide germanium on soluble protein and chlorophyll contents, activities of protective enzymes of the protocorm of *Dendrobium officinale* are studied in this article. The results show that the suitable concentration of dioxide germanium (5.00 mg/L) can significantly enhance the fresh weight of protocorm, greatly improve soluble protein and chlorophyll contents, significantly increase the activities of SOD and CAT but slowly decrease POD. It follows that the addition of dioxide germanium 5.00 mg/L to the media can obviously improve the growth of *Dendrobium officinale*.

Key words dioxide germanium, *Dendrobium officinale*, protocorm, protective enzymes

前人研究表明微量元素不仅为人体生长发育所必须, 而且对疾病具有特异的治疗效果, 已日渐受到人们的重视^[1]. 其中, 锗(germanium, Ge)对人体具有独特的保健及治疗功效. 1968 年日本学者浅井一彦发现, 凡具有抗癌作用的中草药, 其所含的锗均比其它植物高, 并从中草药中提取了锗的有机成分. 近几十年来, 国内外大量的研究工作证明, 有机锗具有显著的调节免疫力、抗肿瘤、抗病毒、抗白细胞减少、抗衰老美容、延年益寿等功效. 有关锗的生物效应研究日益受到重视, 人们对锗投入了极大的关注, 纷纷研制开发了各种富锗食品和饮料^[3]. 本研究以名贵中药材铁皮石斛的胚性组织——原球茎为材料, 通过研究锗对铁皮石斛原球茎的生长和生理指标的影响, 确定了添加锗的最适浓度, 旨在为铁皮石斛原球茎的富锗培养提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料 with 处理

本室培养的铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)原球茎, 经两次继代培养达到生长旺盛状态时, 再挑选处

收稿日期: 2005-05-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370144).

作者简介: 唐凤, 女, 1976—, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学的学习与研究. E-mail: tangfenghf@163.com

通讯联系人: 丁小余, 1965—, 教授, 博士生导师, 主要从事植物学的教学与研究. E-mail: dingxyjn@263.net

于同一生长期、没有分化的原球茎分别转入各含镉固体培养基上. 以 N_6 为基本培养基, 不添加任何附加物和激素, 在培养基中加入 GeO_2 的浓度分别为 0.02、0.50、1.00、3.00、5.00、8.00、10.00、15.00、20.0 mg/L, 以不加镉的培养基作对照, 共 10 个处理, 每个处理各 5 瓶, 每瓶均转入上述圆球茎 10 g. 培养基 pH5.6 ~ 5.8, 培养温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 每日光照 12 h, 光照强度 1 600 ~ 2 500 lx. 培养 30 d 后观察并记录现象, 分别称量原球茎鲜重, 同时选取没有任何分化的原球茎进行生理指标的测定(每个试验重复 3 次).

1.2 实验方法

可溶性蛋白质的测定参照 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 法^[3], 以下均为鲜叶重, 单位为 mg/g. 叶绿素含量测定参照 Arnon 的方法^[4], 单位 mg/g. 超氧化物歧化酶粗酶液的制备参照程光宇等的方法^[5], 活性的测定采用南京建成生物研究所提供的 SOD 测试试剂盒进行, 单位 $N\mu\text{g}$. 过氧化物酶活性的测定参照李合生的测定方法——愈创木酚法^[6], 单位 $\Delta 470\text{ nm}/(\text{min}\cdot\text{g})$. 过氧化氢酶活性的测定采用南京建成生物研究所提供的 CAT 测试试剂盒进行, 单位 U/g.

2 结果与分析

2.1 镉对铁皮石斛原球茎增殖及生长状况的影响

2.1.1 镉对铁皮石斛原球茎鲜重的影响

培养 30 d 后, 不同浓度的镉对铁皮石斛原球茎鲜重的影响如图 1 所示. 从图 1 中可以看出, 培养基中附加了低浓度镉时, 原球茎的鲜重量增长不明显. 当镉浓度在 1.00 ~ 5.00 mg/L 时, 促进了原球茎的生长, 增重明显, 呈极显著正相关($r=0.999\ 5$, $P<0.01$). 其中以镉浓度为 5.00 mg/L 时生长最佳, 其铁皮石斛原球茎的鲜重比对照增加了 36.8%, 在此浓度下原球茎堆叠在培养基表面 2 cm 左右, 生长旺盛, 色绿而饱满. 当镉浓度在 8.00 mg/L 时, 铁皮石斛原球茎的鲜重开始下降, 但仍比对照增加 21.39%. 高浓度 10.0 ~ 20.0 mg/L 时, 表现出一定的毒害作用, 上层原球茎有白化现象. 达 20.0 mg/L 时, 原球茎生长完全受抑制, 大部分白化死亡, 鲜重下降了 43.73%.

2.1.2 镉对铁皮石斛原球茎叶绿素含量的影响

不同浓度的镉对铁皮石斛原球茎叶绿素含量影响也是不同的, 由图 2 可以看出: 低浓度即 0.00 ~ 0.50 mg/L 内, 叶绿素含量稍有升高, 在 1.00 ~ 5.00 mg/L 浓度时, 叶绿素含量随镉浓度增大而明显上升, 1.00 mg/L 时铁皮石斛叶绿素含量比对照增加了 28.54%, 5.00 mg/L 时出现最大值, 比对照增加了 39.37%, 呈显著正相关($r=0.883\ 2$, $P<0.05$). 浓度大于 10.00 mg/L 后, 叶绿素含量则迅速降低, 当镉浓度为 20.00 mg/L 时, 铁皮石斛原球茎的叶绿素含量仅为对照的 65.92%.

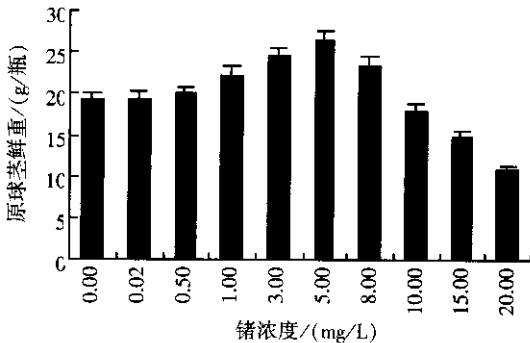


图 1 镉对铁皮石斛原球茎鲜重的影响

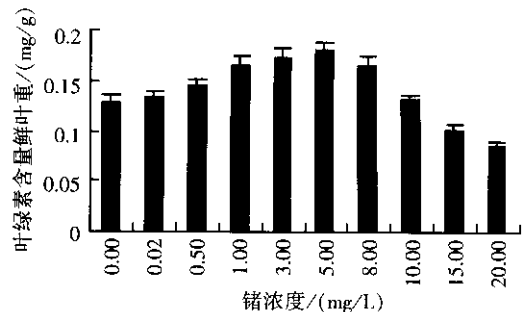


图 2 镉对铁皮石斛原球茎叶绿素含量的影响

2.1.3 镉对铁皮石斛原球茎可溶性蛋白质含量的影响

试验结果显示, 镉可以提高铁皮石斛原球茎可溶性蛋白质的含量. 从图 3 可以看出, 加镉后铁皮石斛原球茎的可溶性蛋白质含量呈现先轻微降低再明显上升, 以后又降低的趋势. 低浓度处理下, 即 0.02 ~ 0.50 mg/L, 可溶性蛋白质呈轻微下降趋势, 在 0.50 mg/L 达到最低值, 比对照降低了 11.51%. 在处理浓度 1.00 ~ 5.00 mg/L 内, 可溶性蛋白质随镉浓度而升高, 并且在 5.00 mg/L 时, 达到最高值, 比对照增加了 8.91% ($r=0.803\ 0$, $P<0.05$), 呈显著正相关. 当镉浓度在 5.00 mg/L 以上时, 可溶性蛋白质随着镉浓度的升高则出现了下降趋势, 当镉浓度为 20.00 mg/L 时, 铁皮石斛原球茎可溶性蛋白质的含量仅为对照的 77.37%.

2.2 锆对铁皮石斛原球茎抗氧化酶系统活性的影响

2.2.1 锆对 SOD 活性的影响

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase ,SOD)在需氧原核生物和真核生物中广泛存在 ,是活性氧清除系统中第一个发挥作用的抗氧化酶.由图 4 可以看出 ,加锆处理后 ,铁皮石斛原球茎的 SOD 呈现出先升后降的趋势. 锆浓度在 1.00 ~5.00 mg/L 内 ,SOD 活性迅速上升 ,1.00 mg/L 时 ,铁皮石斛原球茎 SOD 活性比对照增加了 21.34% ,5.00 mg/L 时 ,铁皮石斛原球茎 SOD 活性达到最大值 ,比对照增加了 32.11% ,呈显著正相关($r=0.993\ 0$, $P<0.01$).此后 ,SOD 活性随着锆浓度的增加而明显下降.

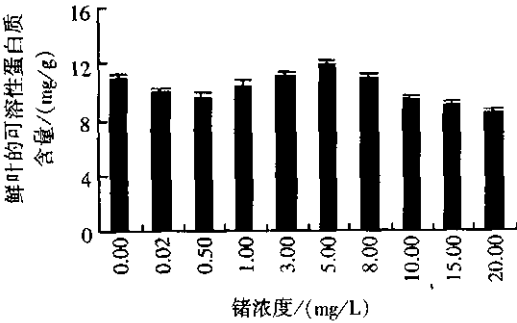


图 3 锆对铁皮石斛原球茎可溶性蛋白质含量的影响

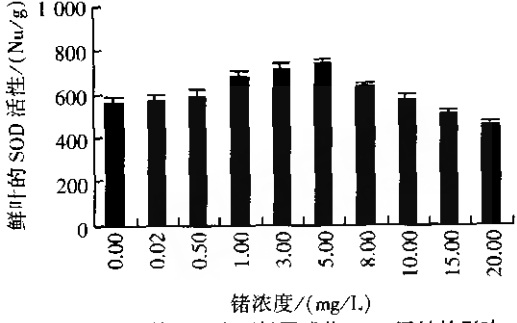


图 4 锆对铁皮石斛原球茎 SOD 活性的影响

2.2.2 锆对 CAT 活性的影响

由图 5 可以看出 ,锆对铁皮石斛 CAT 活性的影响表现为先升后降.在 1.00 ~5.00 mg/L 处理下 ,CAT 活性随锆浓度升高而上升 ,1.00 mg/L 时 ,铁皮石斛原球茎 CAT 活性比对照增加了 31.38% ,5.00 mg/L 时 ,铁皮石斛原球茎 CAT 活性达到最大值 ,比对照提高 65.57% ,呈显著正相关($r=0.976\ 1$, $P<0.01$).之后 ,随着锆浓度的继续增大 ,CAT 活性开始下降 ,在 20.0 mg/L 时 ,仅为对照的 46.33% .

2.2.3 锆对 POD 活性的影响

POD 也是植物体内清除 H_2O_2 的保护酶之一.由图 6 可见 ,POD 活性随锆浓度先缓慢降低 ,然后又快速上升.其趋势与 SOD、CAT 略有不同.锆处理后 ,铁皮石斛原球茎的 POD 活性稍有降低 ,在 1.00 ~5.00 mg/L 范围内 ,POD 活性随锆浓度增加而明显下降 ,在 5.00 mg/L 时 ,达到最低值 ,仅为对照的 69.20% ,呈显著负相关($r=-0.985\ 5$, $P<0.01$).锆浓度在 5.00 mg/L 以上时 ,POD 活性随锆浓度增加而迅速升高 ,当锆浓度为 20.00 mg/L 时 ,POD 活性已经比对照增加了 19.01% .

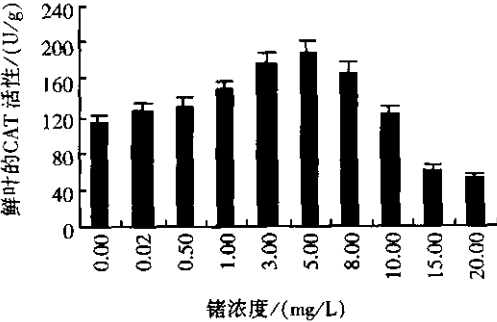


图 5 锆对铁皮石斛原球茎 CAT 活性的影响

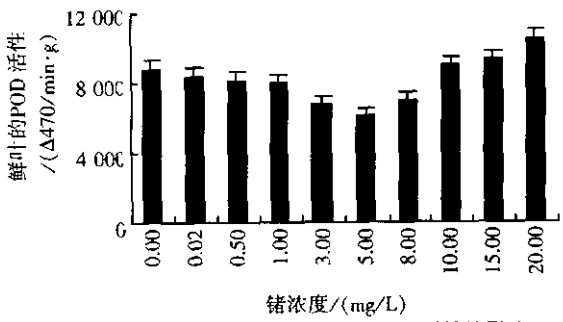


图 6 锆对铁皮石斛原球茎 POD 活性的影响

3 讨论

据国内外有关的研究 ,锆对植物体的作用 ,大致有两方面 :一是正效应即促进生长 ,杨宁生等^[7]报道在绞股蓝愈伤组织培养中 ,Ge - 132 可促进其愈伤组织的生长和皂苷的积累.王习霞^[8]等曾报道在绞股蓝培养基中加入锆元素可明显提高绞股蓝愈伤组织细胞的生长量 ,大大提高了绞股蓝细胞对培养基的有效利用率.二是负效应即抑制生长 ,Markham^[9]等报道 :GeO₂ 在一定浓度时即抑制硅藻生长 ,锆主要影响硅藻的蛋白质和叶绿素的合成 ,从而抑制了细胞的生长.本实验结果表明 ,当培养基中外源锆浓度处于 1.00 ~5.00 mg/L 时 ,锆促进了铁皮石斛原球茎的增殖生长 ,其中 5.00 mg/L 是原球茎生长的最佳锆浓度.而锆浓度高于 10.00 mg/L 后 ,则对组培铁皮石斛原球茎的生长和增殖都是极为不利的.

在本实验中,适量的锗(1.00~5.00 mg/L)能有效提高组培铁皮石斛原球茎可溶性蛋白质和叶绿素的含量,5.00 mg/L时两者均达到最大值.蛋白质直接关系到植物的生长发育和器官建成,是重要的物质基础,本实验表明适当浓度 GeO_2 处理可加快蛋白质的合成速度,从而为组培铁皮石斛原球茎的生长和分化提供了物质基础.

植物体内的多余的活性氧主要是通过保护酶类及小分子抗氧化剂来清除^[10].SOD、POD 和 CAT 等构成植物体内的“保护酶系统”.这些酶协调一致,使活性氧的产生与清除处于平衡状态.本研究发现,适宜浓度的锗(1.00~5.00 mg/L)增强了铁皮石斛原球茎的 SOD、CAT 活性,降低了 POD 活性,尤以 5.00 mg/L 效果最为明显.植物正常代谢过程和在各种环境胁迫下均能产生活性氧和自由基,活性氧和自由基的积累引起细胞结构和功能的破坏.适量的锗增强了 SOD 的活性,从而使 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率得以下降.随着 SOD 活性的升高,有利于消除铁皮石斛原球茎细胞中形成的 $\text{O}_2^{\cdot-}$,从而减少由于 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的大量生成导致的膜系统活性氧损伤,对于降低膜脂过氧化,维持细胞质膜的稳定性和完整性,提高对离子吸收和运输的选择性都有重要意义.当锗的浓度在 1.00~5.00 mg/L 时,CAT 活性随锗浓度的增加而提高,而 POD 活性却显著降低了,可能是因为它们具有共同的作用底物过氧化氢.在生理代谢条件下所产生的活性氧,可在体内相互转化,各抗氧化系统的作用对象之间存在动态平衡,因此,某一抗氧化系统的改变,就有可能影响到其它抗氧化系统,不同的抗氧化系统在体内相互影响协同作用,共同调节体内的抗氧化作用.

综上所述,培养基加入适当浓度的锗元素后,明显促进了铁皮石斛原球茎内可溶性蛋白质含量及叶绿素含量的升高,极大提高了保护酶系统(SOD、POD、CAT)的活性,说明适当浓度的锗对提高铁皮石斛原球茎的生长是十分有益的.另外,我们也期待以铁皮石斛原球茎快速增殖体系为基础,建立有机锗转化的高效生物反应器,为铁皮石斛原球茎的富锗保健食品的开发奠定基础.

[参考文献]

- [1] 蔡君峰,赵恒,孙劲彦,等.富锗人参的研制[J].人参研究,1994,2(1):32—33.
- [2] 刘德宗,王俊勇.有机锗及富锗食品的研究与开发[J].中国乳品工业,1998,26(1):27—28.
- [3] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantity of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(5): 248—254.
- [4] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in Beta vulgaris[J]. Plant Physiol, 1949, 24(1): 1—5.
- [5] 程光宇,魏锦城,邹玉珍,等.构果实铜锌超氧化物歧化酶的纯化及其性质研究[J].南京师大学报:自然科学版,1991,14(2):82—92.
- [6] 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.
- [7] 杨宁生.有机锗对绞股蓝愈伤组织生长及皂甙含量的影响[J].植物生理学通讯,1994,30(4):313.
- [8] 王习霞,屠春燕,萧民耕,等.富锗绞股蓝组织培养的研究[J].南京化工大学学报,1996,18(1):13—15.
- [9] Makham J W, Hagmeier E. Observation on the effects of germanium dioxide on the growth of macro-algae and diatoms[J]. Phycologia, 1982, 21(8):125—130.
- [10] 秦晓琼,贾士荣.植物抗氧化逆境的基因工程[J].农业生物技术学报,1997,5(4):14—24.

[责任编辑:孙德泉]