

# 硒对铁皮石斛拟原球茎生长及抗氧化系统的影响

徐国华<sup>1</sup>, 常俊<sup>1</sup>, 毛善国<sup>1, 2</sup>, 罗玉明<sup>1, 2</sup>, 丁小余<sup>1</sup>

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

(2 淮阴师范学院生物系, 江苏 淮安 223001)

[摘要] 通过在培养基中添加  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 研究不同浓度硒对铁皮石斛组织培养拟原球茎的生长及抗氧化系统的影响。结果表明: 适量加硒 ( $\leq 0.2 \text{ mg/L}$ ) 促进了拟原球茎的增殖生长, 而高浓度硒 ( $> 0.2 \text{ mg/L}$ ) 则抑制了增殖, 并且发现拟原球茎生长的最佳硒浓度为  $0.05 \text{ mg/L}$ 。低浓度硒 ( $\leq 0.05 \text{ mg/L}$ ) 显著增强了拟原球茎 SOD、CAT、GSH-PX 活性, 而使 POD 活性降低、 $\text{O}_2^-$  产生速率变小, MDA 含量明显下降; 硒浓度过高 ( $> 0.1 \text{ mg/L}$ ), SOD、CAT、GSH-PX 活性被抑制, POD 活性升高,  $\text{O}_2^-$  产生速率变大, MDA 含量大幅上升。总之, 适量加硒可增加产量, 提高机体抗氧化能力。

[关键词] 铁皮石斛, 拟原球茎, 硒, 抗氧化系统

[中图分类号] Q 949.95 Q 945.14 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)03-0086-05

## Effects of Selenium on Growth and Antioxidative System in Protocom-like Bodies of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

Xu Guohua<sup>1</sup>, Chang Jun<sup>1</sup>, Mao Shanguo<sup>1, 2</sup>, Luo Yuming<sup>1, 2</sup>, Ding Xiaoyu<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2. Department of Biology, Huaiyin Teachers College, Huai'an 223001, China)

**Abstract** The aim of this study was to investigate the effects of different concentrations of selenium in medium on growth and antioxidative system in protocom-like bodies of *D. officinale*. The results showed that low concentration of selenium ( $\leq 0.2 \text{ mg/L}$ ) could promote the growth of protocom-like bodies; however, high concentration of selenium ( $> 0.2 \text{ mg/L}$ ) showed the opposite effect. Furthermore, the most appropriate selenium concentration for the growth of protocom-like bodies was  $0.05 \text{ mg/L}$ . Low concentration of selenium could significantly increase the activations of SOD, CAT and GSH-PX, however, inhibit the activation of POD, the rate of  $\text{O}_2^-$  generation and the level of MDA. Opposite effects were seen at high concentration of selenium. Therefore, it was indicated that proper selenium concentration could increase the yield and antioxidative activity of protocom-like bodies of *D. officinale*.

**Key words** *Dendrobium officinale*, protocom-like bodies, selenium, antioxidative system

硒是人体和动物生命中必需的微量元素, 人体缺硒是造成癌症、心脑血管疾病等 40 多种疾病的主要原因<sup>[1]</sup>, 硒对高等植物的生长也具有重要作用。富硒食品的研制<sup>[2-3]</sup>及硒对植物体影响<sup>[4,5]</sup>的研究也渐渐成为热点, 但硒对植物组织培养物的影响方面尚未见有报道。

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 在《神农本草经》中被列为上品, 有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、明目强身等功效<sup>[6]</sup>, 因其特殊的生存环境和卓著的滋补功效而名列“中华九大仙草”之首。近年来, 野生石斛资源日渐枯竭, 铁皮石斛已处于濒危状态, 人们已开始利用组织培养方法进行快速繁殖。

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、过氧化物酶 (Peroxidase, POD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-PX) 等是植物中重要的抗氧化酶系, 它们能够清

收稿日期: 2008-02-25

基金项目: 国家自然科学基金 (30370144)、淮安市科技发展计划项目 (SN0766) 资助项目。

作者简介: 徐国华, 博士, 副教授, 研究方向: 植物分子生物学与生物技术, E-mail: njxgh@hotmail.com

通讯联系人: 丁小余, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物学, E-mail: dingxyn@263.net

除活性氧,在愈伤组织诱导和抗病过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>.抗氧化酶还是植物生理代谢的指标酶,其活性的变化在一定程度上反映出外植体生理代谢水平的变化<sup>[8-9]</sup>.本试验拟以铁皮石斛组织培养中诱导产生的胚性组织——拟原球茎为材料,在培养基中添加硒元素,研究不同浓度硒对拟原球茎增殖、生长以及抗氧化系统等方面的影响,以期探讨硒对组织培养物生理生化的影响,确定添加硒的适宜浓度,为铁皮石斛组织培养的富硒研究提供理论依据,进而为合理开发铁皮石斛富硒保健食品及药材等提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验所用的铁皮石斛采自我国石斛主产区广东、福建的原始森林.外植体经过无菌消毒,组织培养诱导产生拟原球茎,继代保存,并在本试验前经预培养 20 d 达到生长旺盛状态,再经挑选转入各含硒培养基.

### 1.2 试验设计

试验所用培养基为 N6+ 0.5 mg/L NAA+ 3% 蔗糖.每瓶培养基中添加  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 硒浓度分别为 0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mg/L.培养基 pH 5.6~5.8,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.在不同硒浓度培养基上转接生长旺盛的铁皮石斛拟原球茎,培养 30 d 后观察比较并取样测定,分别记录其鲜样质量,同时取样测定酶活性及其它生理指标.对每个处理的测量数据取平均值,每个处理各 10 瓶,试验重复 3 次.

### 1.3 指标测定方法

#### 1.3.1 酶液的制备

取拟原球茎组织,加入少量 50 mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  缓冲液 (pH 7.8),冰浴中研磨成匀浆,定容,  $4^\circ\text{C}$  下 16 000 r/min 离心 20 min,上清液即为酶液.

#### 1.3.2 SOD、CAT、POD 活性的测定 (鲜叶)

SOD 活性测定采用化学比色法,单位 NU/g. CAT 活性的测定采用分光光度法,单位 U/g. SOD、CAT 试剂盒购自南京建成生物工程研究所. POD 活性测定采用 Maehly (1955) 的愈创木酚氧化法,单位  $\Delta A_{470} / (\text{min} \cdot \text{g})$ .

#### 1.3.3 GSH-PX 活性测定 (鲜叶)

GSH-PX 试剂盒购自南京建成生物工程研究所.单位 U/g.

#### 1.3.4 $\text{O}_2^-$ 产生速率、MDA 含量的测定 (鲜叶)

$\text{O}_2^-$  产生速率参照王爱国 (1990) 等的方法,单位  $\text{U} / (\text{min} \cdot \text{g})$  ( $A_{530}$  条件下检测). MDA 含量采用 TBA (硫代巴比妥酸) 法,单位  $\text{nmol/g}$ .

## 2 结果与分析

### 2.1 硒对铁皮石斛拟原球茎增殖及生长状况的影响

由表 1 可看出,低浓度硒 ( $\leq 0.1 \text{ mg/L}$ ) 促进了拟原球茎生长,增重明显,其中以浓度  $0.05 \text{ mg/L}$  处理生长最佳.经方差分析,  $P = 0.027 < 0.05$  达显著水平.此浓度下拟原球茎堆叠于培养基表面,生长旺盛,结构紧密而饱满.高浓度硒 ( $0.2 \sim 10.0 \text{ mg/L}$ ) 则抑制了拟原球茎的增殖,其产量随硒浓度升高而下降.硒浓度上升到  $1.0 \text{ mg/L}$  时,表现出一定的毒害作用,上层拟原球茎虽生长良好,但贴近培养基的拟原球茎有白化现象.达到  $2 \text{ mg/L}$  时,拟原球茎基本不增殖;  $5.0 \text{ mg/L}$  时,有部分白化死亡;  $10.0 \text{ mg/L}$  时,拟原球茎生长完全受到抑制,大部分已白化死亡.

### 2.2 硒对铁皮石斛拟原球茎抗氧化酶系统活性的影响

加硒处理对铁皮石斛拟原球茎抗氧化酶活性的影响因酶种类而有不同程度的调节作用.由图 1 可知, GSH-PX 活性呈现先升后降的趋势.在硒浓度  $0.01 \sim 1.0 \text{ mg/L}$  范围内, GSH-PX 活性均高于对照,硒浓度在  $0.1 \text{ mg/L}$  时最高,为对照的 1.77 倍,  $P = 0.0004 < 0.01$ ,极显著.硒浓度大于  $1.0 \text{ mg/L}$  后, GSH-PX 活性明显下降.

SOD是目前已知的清除  $O_2^-$  的惟一酶类,主要作用是将  $O_2^-$  歧化生成无毒的  $O_2$  和毒性较低的  $H_2O_2$ . 加硒处理后,在硒浓度 0.01~0.1mg/L 范围内, SOD 活性迅速上升,  $P < 0.01$  在 0.1mg/L 时,达到最大值,比对照提高了 39.68%;而后活性开始下降,0.5mg/L 时,仍比对照提高 21.61%,  $P = 0.022 < 0.05$  在 10.0mg/L 时, SOD 活性到达最低值,为对照的 59.21%.

表 1 硒对铁皮石斛拟原球茎生长的影响

Table 1 Effects of selenium on the growth of protocorms of *D. officinale*

| 硒浓度 /(mg/L) | 平均始重 /g | 平均鲜重 /g | 增殖倍数  | 拟原球茎生长状况    |
|-------------|---------|---------|-------|-------------|
| 0           | 3.079   | 11.755  | 3.818 | 生长正常        |
| 0.01        | 3.062   | 12.380  | 4.043 | 生长正常        |
| 0.02        | 2.984   | 12.754  | 4.274 | 生长正常,拟原球茎饱满 |
| 0.05        | 3.047   | 13.140  | 4.312 | 生长正常,拟原球茎饱满 |
| 0.1         | 2.974   | 11.981  | 4.028 | 生长正常,拟原球茎饱满 |
| 0.2         | 2.563   | 10.035  | 3.915 | 生长正常        |
| 0.5         | 2.309   | 8.408   | 3.641 | 生长正常        |
| 1.0         | 2.243   | 6.985   | 3.114 | 有白化         |
| 2.0         | 1.863   | 4.014   | 2.155 | 有白化         |
| 5.0         | 3.084   | 2.817   | 0.913 | 部分白化死亡      |
| 10.0        | 3.045   | 1.535   | 0.504 | 大部分白化死亡     |

CAT和 POD是植物体内担负清除  $H_2O_2$  的主要酶类,它们将  $H_2O_2$  分解成水和氧.不同硒处理下 CAT 活性也表现为先升后降.在 0.01~0.05mg/L 处理下, CAT 活性迅速上升,至 0.05mg/L 时达到高峰,比对照提高 57.27%,  $P = 0.009 < 0.01$ ,极显著;浓度继续增大, CAT 活性开始下降,达 1.0mg/L 后, CAT 活性迅速降低.

POD活性随硒浓度的升高先缓慢降低后快速上升再小幅下降.加硒后, POD 活性低于对照,在处理浓度 0.01~0.1mg/L 范围内, POD 活性随硒浓度上升而下降,在 0.1mg/L 时降到最低,为对照的 80.64%,  $P = 0.0009 < 0.01$ ,极显著.当浓度大于 0.1mg/L 后, POD 活性逐渐增加,在 2.0mg/L 处理浓度,有最大值是对照的 1.17 倍,  $P = 0.033 < 0.05$  显著.之后 POD 活性开始下降,在 10.0mg/L 处仍比对照高 6.63%.

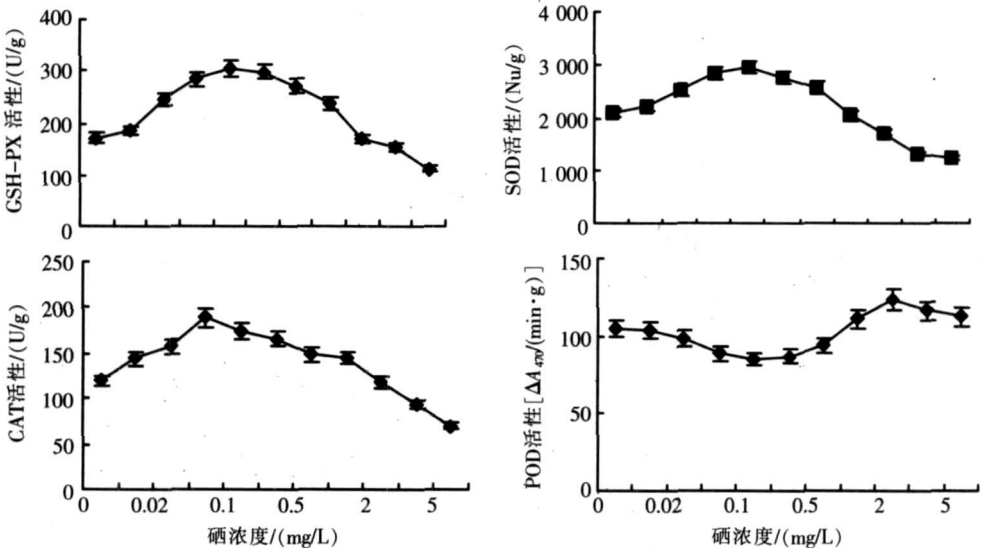


图 1 硒对铁皮石斛拟原球茎 GSH-PX、SOD、CAT 及 POD 活性的影响

Fig.1 The effects of selenium on the activities of GSH-PX、SOD、CAT and POD in *D. officinale* protocorm

2.3 硒对铁皮石斛拟原球茎活性氧代谢的影响

试验表明(图 2),  $O_2^-$  产生速率随硒浓度的升高呈先降后升的趋势.在 0.01~0.5mg/L 范围内,  $O_2^-$  产生速率明显低于不加硒的对照,0.05mg/L 硒浓度下其产生速率,降到最低为对照的 67.77%,  $P = 0.002 < 0.01$ ,极显著.硒浓度超过 0.5mg/L 后,  $O_2^-$  产生速率大幅升高,在 10.0mg/L 上升到最高峰,为对照的 1.56 倍,  $P = 0.004 < 0.01$ ,极显著.

加硒处理 MDA 含量变化趋势类似  $O_2^-$  产生速率, 两者相关系数  $R = 0.9387$ , 为极显著正相关. 均为低浓度下降, 高浓度时上升. 但最低值出现在  $0.05\text{ mg/L}$  硒浓度下,  $P = 0.011 < 0.05$  显著; 随后逐渐升高, 在  $2.0\text{ mg/L}$  时有较大幅度上升, 在  $10.0\text{ mg/L}$  硒浓度下, MDA 含量是对照的  $2.07$  倍,  $P = 0.0007 < 0.01$ , 极显著.

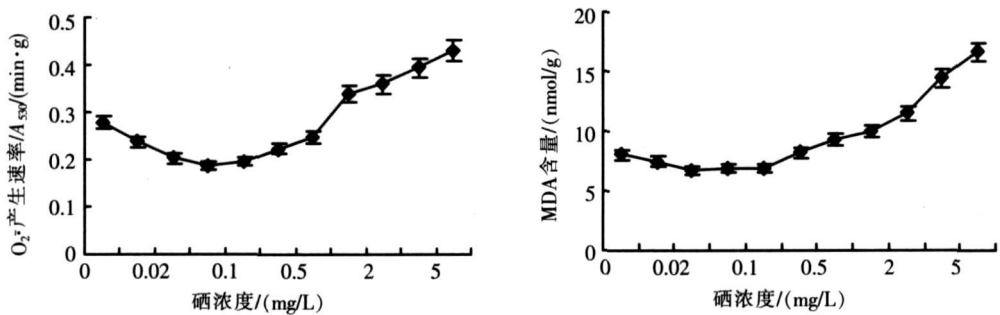


图 2 硒对铁皮石斛拟原球茎  $O_2^-$  产生速率及 MDA 含量的影响

Fig. 2 The effects of selenium on the  $O_2^-$  generating rate and MDA content of *D. officinale* protocorm

3 讨论

3.1 硒对拟原球茎生长的影响

本试验结果表明, 适量浓度硒 ( $\leq 0.2\text{ mg/L}$ ) 促进了铁皮石斛拟原球茎的增殖生长, 而高浓度硒 ( $\geq 0.2\text{ mg/L}$ ) 则抑制了增殖, 并且发现拟原球茎生长的最佳硒浓度为  $0.05\text{ mg/L}$ . 由此推断, 硒对植株生长发育具有剂量效应, 适量浓度起到促进作用, 增加产量, 但过量硒对植株有毒害作用, 这与前人研究结果一致<sup>[4-10]</sup>. 其机理可能是适量硒进入体内提高了某些酶活性, 增强了植株体内的抗氧化能力; 而高浓度硒处理, 过饱和的硒取代了硫氢键中的硫, 影响了正常的蛋白质代谢, 从而抑制了某些酶的生理活性, 表现为抑制生长, 降低产量.

3.2 硒对拟原球茎抗氧化系统的影响

硒参与生物体酶促或非酶促抗氧化过程, 更主要是通过 GSH - PX 酶促抗氧化反应来实现的<sup>[11, 12]</sup>. 本试验研究结果表明, 在不同浓度硒处理下, 铁皮石斛组织培养拟原球茎体内均检测到 GSH - PX 活性, 其活性大小随硒浓度的升高呈现先升后降的趋势. 说明硒对植物体内该酶存在一定的剂量效应, 在一定的硒浓度范围内, 硒促进该酶活性, 而超过一定硒浓度, 植株体内游离硒增加, 硒与 GSH - PX 结合过饱和, 则抑制该酶活性, 产生毒害, 植物生长受到抑制. 这与在小麦、水稻、丝瓜、黄瓜、大白菜等萌发种子和幼苗<sup>[13]</sup>以及菠菜<sup>[10]</sup>中的研究结果一致.

前人研究表明, 适量硒对不同植物不同时期的抗氧化酶活性作用不同, 可增强大蒜 SOD、CAT 活性, 使 POD 活性降低<sup>[12]</sup>; 可促进汕优 50 水稻幼苗 SOD 活性提高, 而降低 CAT、POD 活性<sup>[14]</sup>; 可提高菠菜 SOD、CAT 活性<sup>[10]</sup>; 可促进早稻中组 1 号秧苗 SOD、CAT、POD 活性相应提高<sup>[15]</sup>, 但都促进 GSH - PX 活性. 本试验结果表明, 硒对铁皮石斛拟原球茎的抗氧化酶活性和膜系统有显著影响. 适量加硒 ( $0.01 \sim 0.05\text{ mg/L}$ ) 能显著增强拟原球茎 SOD、CAT、GSH - PX 活性, 而 POD 活性降低,  $O_2^-$  产生速率, MDA 含量明显下降.

由以上可推断, 由于 GSH - PX 与 CAT 有共同的底物  $H_2O_2$ , 因此 GSH - PX 活性的改变直接影响了 CAT 活性, 在低浓度硒时 ( $0.01 \sim 0.05\text{ mg/L}$ ), GSH - PX 活性的提高还不足以清除体内  $H_2O_2$ , 使部分  $H_2O_2$  进入过氧化体, 诱导 CAT 活性上升, 两者协同作用有效清除植物体内  $H_2O_2$ , 阻止了  $H_2O_2$  在体内与  $O_2^-$  经 Haber-Weiss 反应产生毒性更强的  $\cdot OH$ , 并使得 POD 反应底物明显减少, 因此 POD 活性有所下降. 当硒浓度达到  $0.1\text{ mg/L}$  时, GSH - PX 活性继续升高, 清除  $H_2O_2$  的能力也进一步增强, 进入过氧化体中的  $H_2O_2$  开始减少, 导致 CAT 活性开始下降. 随着硒浓度继续上升, GSH - PX 活性下降, CAT 活性持续下降, 导致  $H_2O_2$  增多, POD 底物增加, 其活性也有所回升. 过高浓度的硒 ( $5.0 \sim 10.0\text{ mg/L}$ ) 也抑制了 POD 的活性.

硒促进抗氧化反应的作用方式具有多样性, 主要通过 GSH - PX 来实现, 而 GSH - PX 活性的变化会对植物体内整个保护酶系统产生影响, 抗氧化酶作用底物的相互关联及在细胞内分布的区间性等因素, 决定了硒对不同抗氧化酶活性影响的差异<sup>[16]</sup>. SOD、POD、CAT、GSH - PX 协同作用, 共同防御活性氧或其他

过氧化自由基对细胞膜的伤害,抑制膜脂过氧化.本试验也进一步说明硒参与了植物体内的新陈代谢,增强了组织培养物的抗氧化能力以及抗逆性.

# [参考文献]

- [1] PoggiV, ArcioniA, FilippiniP, et al. Foliar application of selenium and selenate to potato (*Solanum tuberosum*): Effect of a ligand agent on selenium content of tubers [J]. J Agril Food Chem, 2000, 48(10): 4749-4751.
- [2] 黄志立, 麦炳培. 硒元素在绿豆芽中的富集研究 [J]. 食品科学, 2004, 25(6): 200-203
- [3] 刘信平, 张驰, 周大寨, 等. 营养元素硒在南瓜中赋存形态及分布研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(10): 61-64
- [4] Hartkainen H, Xue T, Piironen V. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass [J]. Plant Soil, 2000, 225(1): 193-200
- [5] 王新风, 戴传超, 蒋海龙, 等. 硒对栽培平菇产量及营养成分影响的研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(8): 91-95
- [6] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典 (一部) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 75
- [7] 杨淑慎, 高军凤. 活性氧、自由基与植物的衰老 [J]. 西北植物学报, 2001, 21(2): 215-222
- [8] 王俊刚, 陈国良, 张承烈. 水分胁迫对 2 种生态型芦苇 (*Phragmites communis*) 的可溶性蛋白含量、SOD、POD、CAT 活性的影响 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(3): 561-565
- [9] 姜慧芳, 任小平. 干旱胁迫对花生叶片 SOD 活性和蛋白质的影响 [J]. 作物学报, 2004, 30(2): 169-174
- [10] 李登超, 朱祝军, 徐志豪. 硒对菠菜抗氧化系统及过氧化氢含量的影响 [J]. 园艺学报, 2002, 29(6): 547-550
- [11] Rotruck J, Pope A, Ganther A, et al. Se: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase [J]. Science, 1973, 179: 588-590
- [12] 段咏新, 傅庭治, 傅家瑞. 硒在大蒜体内的生物富集及其抗氧化作用 [J]. 园艺学报, 1997, 24(4): 343-347
- [13] 郭静成, 尹顺平. 硒对高等植物中谷胱甘肽过氧化物酶活性及谷胱甘肽含量的影响 [J]. 西北植物学报, 1998, 18(4): 533-537
- [14] 张承东, 韩朔睽, 魏钟波. 硒对除草剂胁迫下水稻幼苗活性氧清除系统响应的作用 [J]. 环境科学, 2002, 23(4): 93-96
- [15] 林匡飞, 徐小清, 金霞, 等. 硒对水稻的生态毒理效应及临界指标研究 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(4): 678-682
- [16] 尚庆茂, 陈淑芳, 张志刚. 硒对高温胁迫下辣椒叶片抗氧化酶活性的调节作用 [J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 35-38

[责任编辑: 孙德泉]