

金线莲种质的生理生化特性及内源激素含量差异*

梁莹^{1,2}, 李林轩¹, 蔡锦源³, 林伟¹, 秦双双^{1,2}, 张重义², 缪剑华¹, 李蕴琦³, 韦坤华^{1**}

(1. 广西药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西南宁 530023; 2. 福建农林大学作物科学学院, 福建福州 350002; 3. 广西科技大学鹿山学院, 广西柳州 545616)

摘要:比较两个金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 种质的生理生化特性及内源激素含量差异, 为后续的金线莲优良品种选育提供参考依据。本研究以福建小圆叶金线莲和福建黑叶金线莲 30 d 扩繁丛生苗、30 d 生根试管苗和 30 d 温室移栽苗为材料, 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)分别测定两个金线莲种质的内源激素含量; 可溶性蛋白、可溶性糖、叶绿素和丙二醛(MDA)含量, 以及过氧化物酶(POD)活性采用分光光度法测定。试验结果显示在扩繁、生根、移栽过程中, 福建小圆叶金线莲可溶性蛋白含量、可溶性总糖含量、POD 活性、MDA 含量及其体内脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)含量均高于福建黑叶金线莲, 且两个不同种质金线莲扩繁、生根苗的可溶性蛋白、可溶性总糖及其体内玉米素(ZR)、GA 和生长素(IAA)含量均显著($P < 0.05$)高于移栽苗。因此, 福建小圆叶金线莲可能更易于适应环境的变化。

关键词:金线莲 生理生化特性 内源激素含量

中图分类号: R282 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2019)01-0045-06

0 引言

金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 属于兰科(Orchidaceae)开唇兰属(*Anoectochilus*), 为许多亚洲国家的珍贵植物, 又名花叶开唇兰、金线兰、金线草, 其性平、味甘, 具有独特的药用特性, 如清热凉血、祛湿、解毒等, 享有“药王”的美称, 广泛应用于观赏、烹饪和药用等方面^[1-3]。最近研究表明金线莲还具有抗氧化、抗肝损伤、保护血管等功

效^[4-6]。目前金线莲的需求量极大, 但由于民间长期采挖, 生态环境遭到破坏, 野生金线莲资源趋于枯竭。因此, 金线莲的人工种植规模迅速壮大, 金线莲的产业化发展前景巨大。但金线莲的种质资源较为混杂, 各种质之间的性状表现各不相同, 因而显微镜鉴别法、薄层色谱法及 DNA 条形码技术等方法已被应用于识别药用植物金线莲及其伪品上^[7]。本课题组在研究不同种质资源金线莲的遗传进化关系的基础上发现, 不同种质金线莲性状分化较明

*国家中医药行业科研专项(201507002), 国家中药材产业技术体系项目(CARS-21), 广西科技计划项目(桂科AD17129044), 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室开放基金项目(2017), 广西医疗卫生适宜技术与开发项目(S2015 30)和河池市科学研究与技术开发计划项目(河科攻1489-2-20)资助。

【作者简介】

梁莹(1985—), 女, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事药用植物保育学原理与技术研究。

【**通信作者】

韦坤华(1983—), 女, 副研究员, 主要从事药用植物生物技术研究, E-mail: divinekh@163.com。

【引用本文】

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20190123.005

梁莹, 李林轩, 蔡锦源, 等. 金线莲种质的生理生化特性及内源激素含量差异[J]. 广西科学院学报, 2019, 35(1): 45-50.

LIANG Y, LI L X, CAI J Y, et al. Differences of physiological and biochemical activities and endogenous hormone contents in *Anoectochilus roxburghii* germplasm[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2019, 35(1): 45-50.

显^[8]。前期课题组通过对金线莲进行组织培养,纯化扩繁后获得性状表现单一的优良种质福建小圆叶金线莲和福建黑叶金线莲,在此基础上对这两个不同种质金线莲的生理生化特性及内源激素含量进行比较,拟为后续的金线莲优良品种选育提供参考依据,为筛选优良金线莲株系,促进金线莲产业化生产奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试金线莲由福建农林大学提供,经广西药用植物园组培扩繁,纯化后获得性状表现单一的优良种质:福建小圆叶金线莲和福建黑叶金线莲。试验在广西药用植物园实验室及科研基地进行。

仪器:电热恒温鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司)、UV 5100型紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)、Agilent 1260高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、高速万能粉碎机(大德药机)、DK-8D型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司)、超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)、JJ500型电子天平(双杰测试仪器厂)、FA2004型电子天平(舜宇恒平科技仪器有限公司)、22331Hamburg型离心机(Eppendorf公司)、各型号移液枪(Eppendorf公司)。

试剂:三氯乙酸(国药集团化学试剂有限公司,批号:20141110)、盐酸(成都市科龙化工试剂厂,批号:20101118)、硫酸(廉江市爱廉化试剂有限公司,批号:20150113)、磷酸氢二钠(广州新建精细化工厂,批号:20141203)、葡萄糖(广东汕头市西陇化工厂,批号:0501311)、考马斯亮蓝G-250(北京天根生化科技有限公司,批号:03907)、磷酸、乙醇均为分析纯。所用水均为去离子水。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

试验设2个因子(福建小圆叶金线莲、福建黑叶金线莲)、3个处理(30 d扩繁丛生苗、30 d生根试管苗、30 d温室移栽苗)。试验开始后取整株植物完全展开叶片进行生理生化、内源激素测定试验。

1.2.2 测定项目与方法

(1)主要生理生化特性测定

可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝比色

法^[9];可溶性糖含量采用苯酚-硫酸法^[9];过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚比色法^[10];叶绿素含量测定采用李合生(2000)的方法进行^[10];丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)反应法^[9]。以上各项均用鲜样测定,每处理3次重复。

(2)内源激素测定

内源激素生长素(IAA)、赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)和玉米素(ZR)含量测定均按照Elisa试剂盒使用说明进行操作,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)。试剂盒使用时均在弱光下。

1.3 统计分析

采用Excel 2007进行数据整理,用SPSS 17.0对数据进行统计分析,采用单因素(one-way ANOVA)和LSD法进行多重比较($\alpha=0.05$),数据为平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 不同种质金线莲生理生化特性比较

如表1所示,整体上看,福建小圆叶金线莲在3个不同处理下的可溶性蛋白、可溶性总糖、MDA含量和POD活性均略高于福建黑叶金线莲,其中福建小圆叶金线莲和福建黑叶金线莲经扩繁、生根后其可溶性蛋白、可溶性总糖含量无显著差异($P>0.05$,下同),而在移栽到温室大棚后可溶性蛋白、可溶性总糖均显著下降。与之相反,福建小圆叶金线莲和福建黑叶金线莲经扩繁、生根后叶绿素含量均有小幅下降,但无显著差异,而在移栽到温室大棚后叶绿素含量均显著上升($P<0.05$,下同),其中黑叶金线莲的上升幅度较大。两个不同种质金线莲的不同处理中POD活性和MDA含量均无显著差异。

2.2 不同种质金线莲内源激素含量比较

如表2所示,整体上看,福建小圆叶金线莲在扩繁、生根、移栽处理下ABA和GA的含量均显著高于福建黑叶金线莲,而ZR和IAA含量在3个不同处理下与福建黑叶金线莲差异不显著,且移栽30 d后含量变化程度相同。福建小圆叶金线莲和福建黑叶金线莲在扩繁、生根、移栽温室大棚的处理中,扩繁30 d丛生苗ABA含量均略大于其他两个处理,但差异不显著;然而移栽30 d温室苗的ZR、GA和IAA含量均显著低于扩繁和生根苗。

表1 不同种质金线莲的生理生化指标

Table 1 Physiological and biochemical parameters in different species of *A. roxburghii*

品种 Species	处理 Treatment	可溶性蛋白 Soluble protein (mg·g ⁻¹ ·FW)	可溶性总糖 Soluble sugars (mg·g ⁻¹ ·FW)	POD (U·g ⁻¹ ·FW·min ⁻¹)	MDA (μmol·g ⁻¹ ·FW)	叶绿素 Chlorophyll (mg·g ⁻¹ ·FW)
福建小圆叶金 线莲 <i>A. rox- burghii</i> with small round leaves	扩繁30 d丛生苗 30 d of propagation cluster seedlings	18.55±0.19a	46.11±0.89a	8.46±0.23a	0.156±0.003a	1.26±0.02cd
	生根30 d试管苗 30 d of rooting tube seedlings	18.62±0.36a	45.74±1.46a	8.37±0.24a	0.156±0.008a	1.24±0.01d
	移栽30 d温室苗 30 d of greenhouse transplanting seedlings	17.65±0.20b	42.70±0.42b	8.04±0.21ab	0.157±0.009a	1.45±0.12b
福建黑叶金 线莲 <i>A. rox- burghii</i> with black leaves	扩繁30 d丛生苗 30 d of propagation cluster seedlings	17.64±0.35b	45.08±1.62a	8.21±0.21ab	0.153±0.002a	1.39±0.05bc
	生根30 d试管苗 30 d of rooting tube seedlings	17.71±0.27b	45.27±1.08a	8.15±0.31ab	0.153±0.005a	1.37±0.04bcd
	移栽30 d温室苗 30 d of greenhouse transplanting seedlings	16.63±0.24c	42.16±0.68b	7.90±0.28b	0.154±0.002a	1.67±0.16a

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different small letters in the same column indicate the significant difference at 0.05 level

表2 不同种质金线莲内源激素含量测定结果

Table 2 Measured results of endogenous hormone content in different species of *A. roxburghii*

品种 Species	处理 Treatment	ABA (μg·L ⁻¹ ·FW)	ZR (ng·L ⁻¹ ·FW)	GA (pg·mL ⁻¹ ·FW)	IAA (ng·L ⁻¹ ·FW)
福建小圆叶 金线莲 <i>A. rox- burghii</i> with small round leaves	扩繁30 d丛生苗 30 d of propagation cluster seedlings	2.77±0.05a	1.54±0.09a	4 374.17±64.13a	4.63±0.24a
	生根30 d试管苗 30 d of rooting tube seedlings	2.68±0.10ab	1.56±0.02a	4 291.58±127.62ab	4.62±0.36a
	移栽30 d温室苗 30 d of greenhouse transplanting seedlings	2.71±0.17a	1.20±0.04b	3 285.30±70.40d	4.14±0.10b
福建黑叶金 线莲 <i>A. rox- burghii</i> with black leaves	扩繁30 d丛生苗 30 d of propagation cluster seedlings	2.51±0.07bc	1.58±0.04a	4 184.66±74.63bc	4.65±0.23a
	生根30 d试管苗 30 d of rooting tube seedlings	2.44±0.05c	1.60±0.02a	4 033.03±116.17c	4.68±0.07a
	移栽30 d温室苗 30 d of greenhouse transplanting seedlings	2.65±0.13ab	1.18±0.08b	2 921.02±59.30e	3.88±0.15b

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different small letters in the same column indicate the significant difference at 0.05 level

3 讨论

在长期的进化过程中,植物为保护自己免受或少受伤害而形成相应的清除活性氧自由基保护酶系统,在逆境条件下调动自身的防御系统,如POD活性的变化。在某些环境下,虽然POD酶系统的功能加强,但其调节能力有限,因而体内积累了过剩的氧自由基,导致膜脂过氧化作用,产生大量MDA,MDA含量上升^[11]。福建小圆叶金线莲在扩繁、生根、移栽过程中POD活性和MDA含量略高于福建黑叶金线莲,但其叶绿素含量低于福建黑叶金线莲,且在移栽30 d后达显著水平。Yu等^[12]研究结果表明,MDA含量升高意味着氧化应激增加,同时MDA可以促进叶绿素降解,从而减少光合作用。因此,福建小圆叶金线莲对环境变化的自身调节能力更强,适应性更好。另外,金线莲移栽到温室大棚后叶绿素含量升高,可能是自然光更有利于叶绿素的合成,从而利于光合作用,为植株积累更多的养分,与符真珠等^[13]研究的牡丹大田苗叶绿素含量较试管苗高的结果类似。

可溶性蛋白和可溶性糖含量的高低可间接反映各种代谢活动的强弱^[12]。福建小圆叶金线莲可溶性蛋白和可溶性总糖含量均高于福建黑叶金线莲,且福建小圆叶金线莲、福建黑叶金线莲扩繁和生根苗的可溶性蛋白、可溶性总糖含量均显著高于移栽苗,说明福建小圆叶金线莲体内代谢活动较福建黑叶金线莲活跃,福建小圆叶金线莲适应环境变化的能力更强;而扩繁、生根苗体内代谢活动较移栽苗活跃。

段娜等^[14]的研究结果表明,植物生长发育与其体内的内源激素密切相关,内源激素含量变化在植物响应环境变化中发挥重要作用。其中,ABA是调控植物发育及对外界环境适应的重要信号分子,如干旱胁迫下苗期木薯中内源ABA的生物合成量增加^[15];弱光胁迫下甘蔗ABA含量增加以利于其适应弱光环境^[16]。另外,低温下笃斯越橘幼苗GA₃含量上调,有助于降低自由水的含量,延缓植物叶片枯黄衰老和维持细胞膜的稳定性,使其对低温环境表现出较强的适应性^[17]。本研究中,在环境变化时福建小圆叶金线莲体内ABA和GA含量均显著高

于福建黑叶金线莲,推测出福建小圆叶金线莲对环境的适应性可能强于福建黑叶金线莲。另外,两个不同种质金线莲的扩繁和生根苗的ZR、GA、IAA含量均显著高于移栽苗,可能是由于金线莲移栽到温室大棚后缓苗、昼夜温度变化、生存环境变化等导致植株健康受到威胁,ABA含量逐渐增加以适应外界环境,另一方面则抑制ZR、GA和IAA信号途径,使其含量下降。

4 结论

本研究比较金线莲组织培养纯化育种中获得的两个不同金线莲的生理生化指标与内源激素含量变化,结果表明福建小圆叶金线莲可能更易于适应环境的变化。由于金线莲生长速度较慢,本研究仅对金线莲组培苗种植后30 d的生理生化活性及内源激素含量进行测定,在后续研究中,将针对持续不同时间的金线莲种植苗做进一步研究,或对野生金线莲进行同时期比较试验,并进行有效成分测定。

参考文献

- [1] 许梦洁,叶申怡,吴梅,等.不同种质金线莲氨基酸和矿物质元素量的比较[J].中草药,2017,48(2):368-372.
- [2] 邵清松,叶申怡,周爱存,等.金线莲种苗繁育及栽培模式研究现状与展望[J].中国中药杂志,2016,41(2):160-166.
- [3] SHAO Q S, WANG H Z, GUO H P, et al. Effects of shade treatments on photosynthetic characteristics, chloroplast ultrastructure, and physiology of *Anoectochilus roxburghii*[J]. Plos One, 2014, 9: e85996.
- [4] YANG Z G, ZHANG X H, YANG L W, et al. Protective effect of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide against CCl₄-induced oxidative liver damage in mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 96: 442-450.
- [5] LIU Z L, ZHANG J G, LIU Q, et al. The vascular protective effects of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose under high glucose conditions[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 202: 192-199.
- [6] ZENG B Y, SU M H, CHEN Q X, et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii*[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 153: 391-398.

- [7] LV T W, TENG R D, SHAO Q S, et al. DNA barcodes for the identification of *Anoectochilus roxburghii* and its adulterants[J]. *Planta*, 2015, 242: 1167-1174.
- [8] 王剑锴, 李明杰, 王建明, 等. 金线莲 RAPD-SCAR 标记的开发和种质遗传多样性评价[J]. *中草药*, 2016, 47(1): 122-129.
- [9] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [10] 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.
- [11] 李璇, 岳红, 王升, 等. 影响植物抗氧化酶活性的因素及其研究热点和现状[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(7): 973-978.
- [12] YU B, ZHAO C Y, LI J. et al. Morphological, physiological, and biochemical responses of *Populus euphratica* to soil flooding[J]. *Photosynthetica*, 2015, 53: 110-117.
- [13] 符真珠, 王利民, 孟月娥, 等. 牡丹品种岛锦试管苗与大田苗生理指标差异研究[J]. *河南农业科学*, 2015, 44(1): 98-100.
- [14] 段娜, 贾玉奎, 徐军, 等. 植物内源激素研究进展[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(2): 159-165.
- [15] 周芳, 刘恩世, 赵平娟, 等. 干旱胁迫对苗期木薯内源激素含量的影响[J]. *干旱地区农业研究*, 2013, 31(5): 238-244.
- [16] 丘立杭, 李强, 黄杏, 等. 弱光胁迫影响甘蔗叶片内源激素的平衡和分蘖进程[J]. *植物生理学报*, 2017, 53(2): 280-290.
- [17] 乌凤章. 低温锻炼期光周期对笃斯越橘幼苗生理特性的影响[J]. *北方园艺*, 2018(15): 45-52.

Differences of Physiological and Biochemical Activities and Endogenous Hormone Contents in *Anoectochilus roxburghii* Germplasms

LIANG Ying^{1,2}, LI Linxuan¹, CAI Jinyuan³, LIN Wei¹, QIN Shuangshuang^{1,2}, ZHANG Zhongyi², MIAO Jianhua¹, LI Yunqi³, WEI Kunhua¹

(1. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning, Guangxi, 530023, China; 2. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, 350002, China; 3. Lushan College of Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou, Guangxi, 545616, China)

Abstract: The physiological and biochemical characteristics and endogenous hormone content of two germplasms of *Anoectochilus roxburghii* were compared to provide reference for the subsequent breeding of fine varieties of *A. roxburghii*. The 30-day of propagation cluster seedlings, 30-day of rooting tube seedlings and 30-day of greenhouse transplanting seedlings of Fujian *A. roxburghii* with small round leaves and Fujian *A. roxburghii* with black leaves were used as materials. The content of endogenous hormones in two germplasms of *A. roxburghii* was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The contents of soluble protein, soluble sugar, chlorophyll, malondialdehyde (MDA) and the activity of Peroxidase (POD) in two germplasms of *A. roxburghii* were measured by spectrophotometry. The results showed that during the process of propagation, rooting and transplanting, the contents of soluble protein, total soluble sugar, MDA, ABA, GA and the activity of POD in *A. roxburghii* with small round leaves were higher than those in *A. roxburghii* with black leaves. Moreover, in the

process of propagation and rooting, the contents of soluble protein, total soluble sugar, ZR, GA and IAA in two germplasm of *A. roxburghii* were significantly ($P < 0.05$) higher than those of transplanting seedlings. Therefore, *A. roxburghii* with small round leaves may be easier to adapt to changes in the environment.

Key words: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl, physiological and biochemical activities, endogenous hormone content

责任编辑:米慧芝

《广西科学》《广西科学院学报》 分别获广西十佳科技期刊和广西优秀科技期刊称号

从广西科学技术期刊编辑学会和广西出版协会的文件获悉,由于2018年的期刊工作出色,《广西科学》获“2017—2018年度广西十佳科技期刊”称号,《广西科学院学报》获“2018年度广西优秀科技期刊”称号。这是《广西科学》和《广西科学院学报》(下简称“两刊”)自2014年以来首次获得期刊界的奖励。

两刊自2014年以来,推崇专家办刊的方式,大力推行特色栏目策划,获得了较好的成绩。《广西科学》初步形成了生物技术、海洋技术、材料技术、中药资源等特色栏目,其影响因子提升到0.758(据中国知网信息),影响力排在全国429种综合类学术期刊的百名内。《广西科学院学报》形成了信息学、生物学、海洋科学等优势栏目,其影响因子在前年提升了近1倍的基础上,去年又提升了45%,达到0.697,排在广西综合类学术期刊第4名。

为了更好地为广西的经济社会服务,两刊将继续打造特色栏目,并在条件允许的情况下,打造特色专刊,通过提高期刊影响力,实现期刊的飞跃!



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱: gxkxyxbjb@126.com

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkxyxb/ch>