

干旱对铁皮石斛活性多糖代谢的影响

诸燕^{1,3} 刘京晶^{1,*} 丁兰^{2,*}

1 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室

2 临安区农林技术推广中心

3 杭州震亨生物科技有限公司

DOI:10.12238/as.v8i5.3026

[摘要] 为探究干旱对铁皮石斛活性多糖及其代谢机理的影响,在铁皮石斛组培苗培养基中添加不同比例的PEG模拟干旱胁迫,测定处理后根茎叶中总多糖、非淀粉多糖含量和多糖生物合成途径中关键酶基因的表达式,分析干旱胁迫对铁皮石斛活性多糖代谢的影响。采用加热回流-水提醇沉法提取总多糖、 α -淀粉酶处理得到非淀粉多糖,用苯酚-硫酸法测定含量;并对Sucrose Synthase(SUS)、Neutral Invertase(NI)、Cellulase synthase-like(CSL)等酶基因进行实时定量PCR(qRT-PCR)分析。结果表明,轻度干旱胁迫有利于铁皮石斛茎中活性多糖的累积,但随着PEG浓度升高,活性非淀粉多糖含量会随之降低,淀粉含量在根、茎、叶中均显著增加;CsID5可能是响应干旱胁迫、促进活性多糖合成的关键基因。

[关键词] 铁皮石斛; 非淀粉多糖; 干旱胁迫; 生物合成

中图分类号: O636.1+2 文献标识码: A

The effect of drought on the metabolism of active polysaccharides in *Dendrobium officinale*

Yan Zhu^{1,3} Jingjing Liu^{1,*} Lan Ding^{2,*}

1 State Key Laboratory of Subtropical Forest Cultivation jointly built by Zhejiang Agriculture and Forestry University

2 Lin'an District Agricultural and Forestry Technology Promotion Center

3 Hangzhou Zhenheng Biotechnology Co., Ltd

[Abstract] In order to investigate the effects of drought on the active polysaccharides and their metabolic mechanisms of *Dendrobium officinale*, PEG was added to the tissue culture medium of *Dendrobium officinale* at different ratios to simulate drought stress. The total polysaccharide and non starch polysaccharide contents in the treated roots, stems, and leaves, as well as the expression levels of key enzyme genes in the polysaccharide biosynthesis pathway, were measured to analyze the effects of drought stress on the metabolism of active polysaccharides in *Dendrobium officinale*. Total polysaccharides were extracted by heating reflux water extraction and alcohol precipitation method, and non starch polysaccharides were obtained by α -amylase treatment. The content was determined by phenol sulfuric acid method; And for Sucrose Synthase(SUS)、Neutral Invertase(NI)、Cellulase synthase-like(CSL) Perform real-time quantitative PCR (qRT PCR) analysis on enzyme genes. The results showed that mild drought stress was beneficial for the accumulation of active polysaccharides in the stems of *Dendrobium officinale*, but as the PEG concentration increased, the content of active non starch polysaccharides decreased, and starch content significantly increased in roots, stems, and leaves; CsID5 may be a key gene that responds to drought stress and promotes the synthesis of active polysaccharides.

[Key words] *Dendrobium officinale*; Non starch polysaccharides; Drought stress; biosynthesis

引言

铁皮石斛 *Dendrobium catenatum* Lindl. (*D. officinale* Kimura et Migo) 为兰科多年生药用植物,具有极强的抗逆能力,野生条件下在岩壁表面附生仍能存活^[1],干旱耐受性强,李时珍在《本草纲目》中称之“千年润”。现代研究发现,铁皮石斛具

有提高免疫力、抗肿瘤、降血糖、抗氧化、抗阿兹海默症等作用。近年来,随着铁皮石斛人工栽培技术的突破,其应用和研究受到广泛的关注。药用植物的生长发育,有效成分的积累,都与水分、温度等环境因子关系密切,植物在自然环境中生长长期,已经适应了所处环境,当自然环境发生剧烈改变时,尤其是环境

胁迫下,植物将会发生一系列改变去重新适应环境,提高自身竞争力。干旱胁迫是影响植物生长和次生代谢的重要影响因素,植物会通过改变蛋白质、多糖含量等调节细胞渗透压,以此抵御干旱的不良影响。水溶性非淀粉多糖是铁皮石斛中的主要有效成分,其积累受栽培条件影响发生变化,表现为野外环境下栽培的有效成分含量高于大棚栽培,不同的环境会影响铁皮石斛的次生代谢途径,导致次生代谢产物的含量与组成不同^[2]。目前已知 Sucrose Synthase (SUS)、Neutral Invertase (NI)、Pyruvate Kinase (PK)、Glycosyl transferase (GAUT)、Cellulase synthase-like (Csl) 等基因在铁皮石斛活性多糖代谢途径中起着重要作用,但在干旱胁迫条件下,影响其多糖代谢的关键酶基因尚不明确。由于岩壁或活树附生的铁皮石斛长期处于缺水环境,本文从干旱这一非生物胁迫角度来模拟近野生栽培铁皮石斛的生存环境,采用调节培养基中PEG的浓度来模拟植物受到的干旱胁迫,从而改变水分条件来影响次生代谢产物的产生与积累。分析干旱条件对铁皮石斛活性多糖代谢的影响,为铁皮石斛主要活性多糖合成代谢的深入研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用铁皮石斛6月龄无性系组培苗,分别制作PEG6000浓度(W/V)为0%、10%、5%、20%、25%的培养基,在25℃恒温组织培养室中培养七个月,分离根、茎、叶后洗净,冻干,粉碎,过60目筛。

1.2 仪器与试剂

SPECTRA MAX 190型酶标仪(美国Molecular Devices公司); D-37520型高速离心机(德国 Heraeus); ALPHA 1-2 LD Plus冻干机(德国Christ)。α-淀粉酶(来源于猪胰腺,批号:BCBW0400)购于美国Sigma公司; D-葡萄糖(批号: B21882) 购于上海源叶生物科技有限公司; 苯酚(批号: A1812008)购于阿拉丁公司; 浓硫酸(批号: 20200518)购于江苏永华化学科技有限公司; TaKaRa试剂盒购于TaKaRa公司。

1.3 方法

1.3.1 PEG培养基的制作

参考朱健康等人的方法,配制含0%、10%、15%、20%、25%(W/V)PEG6000的1/2MS液体培养基, pH至7.5±0.1,高压灭菌,之后等体积倒入已灭菌凝固的1/2MS培养基,平衡72h后,把上层液体从培养瓶中倒掉,所得的固体培养基即为含PEG固体培养基。以培养基中不添加PEG组为对照。

1.3.2 标准曲线的制备

精密称取葡萄糖标准品5mg,溶于50mL蒸馏水中,配成0.1mg·mL⁻¹的葡萄糖溶液,摇匀后分别取0、1、2、3、4、5、6、7和8mL葡萄糖溶液置于试管中,然后分别依次加入10、9、8、7、6、5、4、3和2mL的蒸馏水配制成葡萄糖浓度为0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07和0.08mg·mL⁻¹的葡萄糖标准品溶液。取上述配置的标准溶液各1mL于试管中,加入1mL新配制5%苯酚溶液和5mL浓硫酸,摇匀后室温放置10min,沸水煮20min

显色,然后以空白为参比,在488nm波长下测定吸光度,最后以葡萄糖含量x为横坐标,吸光度y为纵坐标绘制标准曲线,得其回归方程为Y=5.8071X+0.0655, R²=0.9999。

1.3.3 总多糖的提取

精密称取样品约0.3g于圆底烧瓶中,每组做三个重复。加蒸馏水200mL,加热回流2.5小时,冷却至室温。抽滤后将滤液转移至250mL容量瓶中定容,摇匀,精密量取滤液5mL,置50mL离心管中,加入无水乙醇20mL,摇匀后冷藏醇沉隔夜,取出后在6000r·min⁻¹的速度下离心1h,弃去上清液,沉加80%乙醇洗涤2次,每次20mL,在6000r·min⁻¹的速度下离心20min,弃去上清液,得到沉淀加热水溶解,转移至10mL容量瓶中,冷却后定容摇匀,置于离心管中保存。

1.3.4 非淀粉多糖溶液制备

取多糖水提液4mL于50mL离心管中,加入等体积的10mmol·L⁻¹ Tris-马来酸盐缓冲液,静置30min后沸水浴7min,放冷,于40℃水浴平衡10min,加入100U·mL⁻¹ α-淀粉酶溶液0.4mL,40℃孵育1h,再加入α-淀粉酶溶液0.2mL,40℃孵育0.5h,加入4倍体积的无水乙醇,冷藏过夜,10000r离心30min,弃去上清液,沉淀再加80%乙醇16mL离心2次,每次20min,最后得到的沉淀加热水溶解,定容至10mL,即得非淀粉多糖溶液。

2 结果与分析

2.1 干旱对铁皮石斛农艺性状的影响

对干旱胁迫处理后的铁皮石斛进行株高、叶片数及茎粗的测定,干旱胁迫对铁皮石斛的生长造成了明显的影响(表1)。随着PEG浓度升高铁皮石斛在株高呈现明显下降的趋势,其中株高在PEG浓度为15%时显著降低,在PEG浓度为25%时,植株最为矮小,仅为2.14cm;叶片在干旱条件下存在显著的落叶现象,随着干旱程度的升高,铁皮石斛叶受损伤程度随之升高,这可能是植株通过落叶减少蒸腾作用,保护植株度过逆境胁迫;在茎的粗细方面呈现先降低后增加的趋势,PEG浓度为15%时最细。可见在干旱条件下不利于铁皮石斛的生长。

表1 不同干旱程度对铁皮石斛农艺性状的影响

性状 Traits	CK	10%	15%	20%	25%
株高 Plant height/cm	7.22±1.06a	6.72±1.75a	4.22±0.85b	2.42±0.50c	2.14±0.95c
叶片数 Number of leaves/piece	9.40±2.88a	7.20±1.64abc	8.20±1.3ab	6.00±1.58bc	4.40±1.34c
茎粗 Stem diameter /mm	0.27±0.08a	0.24±0.06ab	0.16±0.04b	0.22±0.02ab	0.25±0.03a

注:同行不同小写字母表示 P<0.05 差异显著,下同。

2.2 干旱对铁皮石斛多糖含量的影响

铁皮石斛水溶性总多糖由非淀粉多糖和淀粉组成,其中非淀粉多糖是铁皮石斛中发挥提高免疫力、抗氧化、降血糖等作用的主要活性成分。经过七个月培养,铁皮石斛茎中总多糖含量在PEG浓度为20%和25%时比对照组显著升高,在PEG浓度为25%达到最高值40.28mg·g⁻¹,为CK组含量的1.5倍。非淀粉多糖含量在PEG浓度为15%、20%和25%时显著高于CK组,其中在PEG浓度为

15%时达到最高为 $25.71\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 相较于CK组, 提高了47.50%。淀粉含量呈现先降低后升高的趋势, 在轻度干旱胁迫下铁皮石斛茎中淀粉含量减少, 但随着干旱程度增加, 淀粉含量逐渐升高, 在PEG浓度为25%时达到最高, 为 $19.70\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 达到CK组的2倍。在叶中, 总多糖含量呈现随着PEG浓度升高而升高的趋势, 这种积累主要表现在淀粉的积累上, 尤其是在PEG浓度为25%时, 叶中淀粉含量达到最高, 达到 $22.47\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 比CK组提高了328.79%。非淀粉多糖含量在轻度干旱胁迫 (PEG浓度为10%和15%时) 变化不显著, 在干旱程度加深 (PEG浓度为20%和25%时) 的情况下, 非淀粉多糖含量有显著性的降低。在根中, 总多糖含量呈现随着PEG浓度升高而升高, 但是非淀粉多糖含量呈现先升高后减少的趋势在PEG浓度为15%达到最高, 为 $29.90\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 比CK组增加了111.91%, 总多糖根这一部位主要体现在淀粉的积累上, 尤其是在PEG浓度为20%和25%时, 淀粉含量积累较之于其他三组有显著性增加 (表2)。

表2 不同干旱程度培养的铁皮石斛多糖含量

部位	多糖种类	CK	10%	15%	20%	25%
position	Type of polysaccharides					
茎	总多糖	26.94±	21.12±	30.98±	34.72±	40.28±
	total polysaccharides	1.4cd	2.53d	3.36bc	1.5ab	3.92a
	非淀粉多糖	17.43±	17.75±	25.71±	23.47±	20.58±
	non-starch polysaccharides	1.46c	1.18bc	0.71a	1.7a	1.07b
	淀粉	9.51±	3.37±	5.27±	11.26±	19.7±
	starch polysaccharides	0.93bc	2.86c	3.8bc	0.81b	4.98a
叶	总多糖	53.52±	61.68±	67.03±	74.49±	77.65±
	total polysaccharides	2.95d	3.48cd	4.15bc	5.16ab	2.89a
	非淀粉多糖	42.51±	45.51±	44.55±	32.96±	30.44±
	non-starch polysaccharides	2.26a	1.51a	0.18a	1.29b	1.23b
	淀粉	11.01±	16.18±	22.47±	41.53±	47.21±
	starch polysaccharides	2.29c	4.21bc	4.31b	4.47a	4.11a
根	总多糖	28.88±	28.85±	47.05±	67.41±	69.54±
	total polysaccharides	1.7c	3.68c	2.65b	3.79a	1.99a
	非淀粉多糖	14.11±	27.24±	29.9±	19.92±	10.66±
	non-starch polysaccharides	0.55c	2.17a	1.76a	0.86b	0.86d
	淀粉	14.77±	1.61±	17.15±	47.49±	58.88±
	starch polysaccharides	2.05c	2.87d	0.98c	3.38b	2.84a

2.3 干旱胁迫下铁皮石斛多糖代谢酶相关基因的表达

铁皮石斛活性多糖主要是由葡萄糖和甘露糖组成的葡甘聚糖类、半乳糖葡甘聚糖, 为水溶性非淀粉多糖, 其生物合成途径以蔗糖为前体物质, 在蔗糖合成酶 (SUS) 作用形成葡萄糖和尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG), UDPG可被活化成GDP-葡萄糖或GDP-半乳糖, 并在糖基转移酶 (GAUT) 的作用下, 通过类纤维素合成酶 (CSLA/CSLD) 进行铁皮石斛活性多糖的合成和延长。对于干旱胁迫处理后的铁皮石斛茎中多糖合成关键酶基因 (表1) 表达量进行测定, 在干旱胁迫程度较高 (PEG浓度为20%和25%) 时, 铁皮石斛茎中参与多糖合成的SUS、PK、NI、AUT基因表达受到显著抑制, 但在受到轻微干旱胁迫 (PEG浓度10%) 时, 铁皮石斛茎中GAUT9、Cs1A8、Cs1D5基因表达量比对照组高, 相关性分析表明所测6个基因的表达量与总多糖、非淀粉多糖含量均未呈显著相关性。Cs1D基因在PEG浓度为20%时有较高的表达量, 与该浓度处理下铁皮石斛茎中非淀粉多糖含量增加存在一定的相关性。Cs1D基因是参与铁皮石斛非淀粉多糖骨架合成的关键酶基因之一, Zhu

Jianhua等人在研究盐过度敏感 (SOS) 突变的拟南芥过程中, 额外发现了一株SOS突变体sos-6, 其编码Cs1D5蛋白基因, 他们认为Cs1D5基因对渗透胁迫的耐受性起着很重要的作用。胡慧贞通过研究拟南芥Cs1D基因家族发现在特定的时期或者组织中Cs1D能替代Cs1A功能参与纤维素合成。Cs1D基因不仅参与细胞壁的合成, 而且也参与植物细胞板的构建^[3]。因此推测在受到干旱胁迫后, Cs1D表达可能改变植物细胞的渗透压, 同时参与纤维素与细胞壁的合成, 形成更耐旱的植株体, 可能是潜在的抵御干旱的关键酶基因。

3 讨论

铁皮石斛的主要有效成分是多糖类物质, 其体内的多糖代谢与外界环境因素有着密切的关系。可溶性糖是调节铁皮石斛细胞渗透压的重要物质。徐小蓉等人通过对金钗石斛间隔干旱胁迫后发现, 金钗石斛中可溶性多糖含量随着干旱胁迫的加深而增加, 这与我们本次的实验结果相符。在外界, 铁皮石斛往往会受到干旱胁迫的影响。通过数据分析可知, 干旱胁迫对于不同的部位以及不同多糖的影响是不同的, 在经过长时间的干旱胁迫后, 干旱胁迫对铁皮石斛农艺性状的影响表现为随着干旱程度的增加, 植株生长越受到抑制, 植株的株高与叶片数均有显著性降低。从干旱对铁皮石斛有效性多糖含量的影响来看, 铁皮石斛可能会通过分解茎中的多糖形成可溶性的糖类, 以此增加细胞质的浓度, 减少细胞质向外界流失水分。推测叶中多糖含量偏高可能是由于叶受到干旱胁迫后, 叶需要增厚其叶肉细胞, 以降低蒸腾作用和储藏水分。重度干旱胁迫不利于铁皮石斛总多糖的累积, 但受到干旱胁迫后, 铁皮石斛茎中的非淀粉多糖和CK组的相比, 累积都有所增加, 其中在培养七个月PEG浓度为15%时为对照组的1.5倍, 说明适度的干旱胁迫有助于非淀粉多糖的形成, 从而增加铁皮石斛活性、提高药材质量。进一步对铁皮石斛有效多糖合成有关基因的表达进行实时荧光定量分析, 在我们所测的基因中未发现在干旱胁迫下与有效性多糖合成有显著正相关的基因, 但Cs1D表现出响应干旱胁迫并调节活性多糖合成的潜在功能, 干旱引起的铁皮石斛活性多糖含量增加的代谢机理尚需进一步深入研究。

[基金项目]

浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2021C02074)。

[参考文献]

- [1]唐丽,王朝勇,龙华,等.环境因子对铁皮石斛生长发育及药效成分含量的影响[J].中药材,2019,42(2):251-255.
- [2]奚航献,刘晨.铁皮石斛化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-marker)的预测分析[J].中草药,2020,51(11):3097-3109.
- [3]裴忠孝.春石斛生理生化特性对不同梯度干旱胁迫的响应[D].武汉:华中农业大学,2013.

作者简介:

诸燕(1983—),女,汉族,浙江绍兴人,硕士研究生,农艺师,研究方向为药用植物遗传育种。