

文章编号: 1000-5862(2019)03-0248-05

# 不同色光对蛇足石杉离体叶状体产 HupA 及内源激素水平的影响

黄倩, 涂艺声\*, 余晓, 袁慧慧

(江西师范大学生命科学学院 江西 南昌 330022)

**摘要:** 为探究不同色光对蛇足石杉离体叶状体生长和石杉碱甲(HupA)累积的作用, 设置了二极管白光(W)、二极管蓝光(B)、二极管红光(R)3种不同色光处理, 以普通荧光灯(CK)为对照, 研究不同色光下叶状体生长和HupA累积的差异及其与IAA、ZT、ABA、GA几种内源激素水平的关系。结果表明: 红光处理对蛇足石杉离体叶状体生长繁殖有促进效果, 但对HupA含量累积有极显著的抑制作用; 蓝光相较CK提高了叶状体的生长量和HupA的含量, 其叶状体HupA生产率最高达 $1\,811.728\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 较CK提高了49.67%; 蓝光处理的叶状体IAA/ZT值、ABA含量、ABA/ZT值、ABA/IAA值在全生育期均高于CK。依据不同类型激素功能, 该研究结果说明: 蓝光培养的叶状体中存在高水平的生长型激素IAA/ZT, 促进其生长, 增加了生物量, 且其体内成熟型激素ABA的高水平存在, 促进了次级代谢产物HupA累积增加。

**关键词:** 蛇足石杉; 不同色光; 生长; 石杉碱甲; 内源激素

**中图分类号:** R 931.2 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2019.03.06

## 0 引言

蛇足石杉(*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.) 是我国传统药用植物, 又名千层塔、千金虫等, 属蕨类石杉科(Huperiaceae) 石杉属(*Huperzia* Benth.)<sup>[1-2]</sup>, 全草入药, 主要用于治疗跌打损伤, 能退热、止血、消肿解毒<sup>[3]</sup>, 其有效成分石杉碱甲(Huperzine A, HupA) 是一种高效、低毒、可逆且具有选择性的乙酰胆碱酯酶(AchE) 抑制剂<sup>[4]</sup>。HupA的合成方法国内外都有研究<sup>[5-6]</sup>, 但由于其合成过程较为复杂且成本高, 因此蛇足石杉成为HupA的主要来源。野生蛇足石杉对环境要求苛刻, 生长十分缓慢, 由于长期大量采挖, 蛇足石杉野生资源面临枯竭, 故蛇足石杉资源开发研究十分紧迫<sup>[7]</sup>。一些研究人员对蛇足石杉组培进行了培养基成分筛选以及茎尖培养快繁技术体系研究<sup>[8-9]</sup>, 并对蛇足石杉培养时前体物或生长激素的添加进行了探索<sup>[10]</sup>。此外, 对蛇足石杉生长的生态环境的研究也有报道<sup>[11-12]</sup>, 但其中光因子对蛇足石杉生长代谢的研究鲜见报道。光不仅是植物的能量来源, 且作为信号因子影响植物的代谢反应, 调

控植物的形态建成和生长发育<sup>[13]</sup>。韩兴邦等<sup>[14]</sup>发现较高的光强会破坏蛇足石杉抗氧化酶活性平衡, 进一步验证蛇足石杉是一种喜阴植物, 而光质对蛇足石杉组织培养影响的研究鲜见报道。

本文研究了不同色光对蛇足石杉离体叶状体的生长和HupA含量的影响及其与内源激素水平之间的关系, 为蛇足石杉离体培养生产次生代谢产物HupA提供技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验材料为本实验室前期建立的具有产HupA能力的蛇足石杉离体叶状体繁殖株系SHQ。

### 1.2 培养方法及处理

在无菌条件下, 取出培养50 d的蛇足石杉叶状体分割成小块, 均匀接种在培养基上, 每瓶接种0.3 g。培养基为1/4 MS固体培养基(含蔗糖 $20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $5.8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、培养基pH值为5.8, 每个100 mL的锥形瓶盛装约50 mL培养基, 设置4组不同色光处理, 分别为二极管白光(处理代号: W, 以下

收稿日期: 2018-06-10

基金项目: 国家自然科学基金(81660597, 81360614)和江西省自然科学基金(20132BAB204023)资助项目。

通信作者: 涂艺声(1957-), 女, 江西奉新人, 教授, 主要从事植物资源与利用研究。E-mail: ysttz2012@163.com

代号为相应的处理), 二极管蓝光(B), 二极管红光(R), 对照组为普通荧光灯(CK), 各处理重复 4 次. 光照强度为 1 000 lx, 光照周期昼夜比为 15 h: 9 h. 培养箱温度为  $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 、湿度为  $(75 \pm 10) \%$ . 培养周期为 80 d<sup>[15]</sup>, 即培养至 80 d 时收获叶状体, 分别统计各处理的鲜质量、干质量以及检测 HupA 含量.

1.3 检测方法

1.3.1 HupA 提取与含量测定 收获培养至 80 d 的叶状体, 洗去培养基, 放置在 45  $^\circ\text{C}$  烘箱中烘干至恒质量, 研磨成粉末状. 准确称取 0.5 g 粉末于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 20% 酒石酸, 在 55  $^\circ\text{C}$  条件下水浴浸泡 24 h, 然后于 100 MHz 下超声 30 min, 5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 12 min, 取上清液. 向沉淀中加 7 mL 酒石酸再次超声提取, 重复 2 次. 合并提取液后加氨水调节 pH 值为 9~10, 再将提取液蒸干至恒质量, 然后用色谱甲醇多次洗脱 HupA 混合物, 供 HPLC 检测样品中 HupA 含量. 采用岛津 LC-20AT 检测, 色谱柱为 Waters C18 柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为甲醇: 醋酸铵(0.08  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 值 6.0) = 30: 70, 流速为 0.8  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波长为 308 nm, 柱温为 25  $^\circ\text{C}$ , 进样量为 20  $\mu\text{L}$ <sup>[9]</sup>, HupA 对照品购自中国食品药品检定研究院, 批号为 100243-201603.

1.3.2 内源激素提取与含量检测 分别收取不同处理下不同培养时期的新鲜叶状体, 准确称取 1 g, 液氮预处理后剪碎, 用预冷的 PBS 缓冲液(0.01  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 值为 7.4) 以料液比 1: 4 冰浴研磨, 4 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 收集上清为内源激素提取液, 置  $-80 ^\circ\text{C}$  保存以备检测.

酶标分析仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司, 型号 RT-6100. 采用酶联免疫吸附检测法(ELISA) 测定: 向微孔酶标板中分别加入 50  $\mu\text{L}$  样品和不同浓度的标准品, 然后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  辣根过氧化物酶标记的检测抗体, 封住反应孔, 置于 37  $^\circ\text{C}$  水浴锅中温育 60 min; 弃去液体, 用吸水纸拍干, 每孔加满洗涤液静置 1 min, 甩去洗涤液, 如此重复洗板 5 次;

加入相应的底物 50  $\mu\text{L}$ , 37  $^\circ\text{C}$  避光孵育 15 min 后加入终止液 50  $\mu\text{L}$ , 15 min 内在 450 nm 波长处测定各孔的吸光值, 每个样品重复测定 3 次. 由上海酶联生物科技有限公司提供试剂盒及进口抗体, 产品批号为 20180105-308.

1.4 数据统计与处理

1.4.1 相对增长百分率 准确称量接种前后培养瓶的质量, 记其质量差为  $m_1$ , 待蛇足石杉叶状体培养至 80 d 时收获培养叶状体, 去除培养基后称质量, 记其收获质量为  $m_2$ . 相对增长百分率 =  $(m_2 - m_1) / m_1 \times 100\%$ .

1.4.2 干物质累积量 将培养至 80 d 的叶状体洗净培养基, 在 45  $^\circ\text{C}$  条件下烘干至恒质量, 干物质累积量是指每升培养基培养至 80 d 时收获的叶状体干质量.

使用 SPSS19.0 软件进行生物统计和运用 Excel 2013 进行数据整理及作图分析, 采用 Duncan 法进行多重比较.

2 结果与分析

2.1 不同色光对叶状体生长及 HupA 累积的影响

蛇足石杉离体叶状体在不同色光下培养(见图 1) 至 80 d 时, 其生长及 HupA 累积效果见表 1. 由表 1 可知, 与 CK 相比: W 处理抑制了叶状体的生长, 但 2 者 HupA 生产率无显著差异; R 处理对叶状体的生长和干物质的累积促进效果显著, 然而 R 处理明显抑制了 HupA 的含量, 每克叶状体干质量含 HupA 仅 43.640  $\mu\text{g}$ ; B 处理对叶状体生长的相对增长率影响不大, 但能显著提高干物质累积, 尤其促进了 HupA 累积增加, 每克叶状体干质量含 HupA 高达 92.850  $\mu\text{g}$ , 相较 CK 处理增长了 49.67%, 且 HupA 生产率远高于其他处理, 达到 1 811.728  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 综合表 1 各项指标可知, B 处理是叶状体生长、干物质累积、HupA 生产率最适的光照处理.

表 1 不同色光对叶状体的生长和 HupA 含量的影响

| 处理 | 相对增长百分率 / %                         | 干物质累积量 / ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | HupA 含量 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DW) | HupA 的生产率 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |
|----|-------------------------------------|---|---|---|
| CK | 3 143.470 $\pm$ 35.845 <sup>b</sup> | 15.990 $\pm$ 0.529 <sup>b</sup>             | 62.036 $\pm$ 0.958 <sup>b</sup>                   | 991.956 $\pm$ 18.960 <sup>a</sup>                 |
| W  | 2 447.101 $\pm$ 99.709 <sup>a</sup> | 13.525 $\pm$ 0.293 <sup>a</sup>             | 71.372 $\pm$ 1.162 <sup>c</sup>                   | 965.306 $\pm$ 27.786 <sup>a</sup>                 |
| B  | 3 293.333 $\pm$ 50.753 <sup>b</sup> | 19.512 $\pm$ 0.449 <sup>c</sup>             | 92.852 $\pm$ 0.497 <sup>d</sup>                   | 1 811.728 $\pm$ 27.126 <sup>b</sup>               |
| R  | 3 533.120 $\pm$ 75.363 <sup>c</sup> | 21.617 $\pm$ 0.955 <sup>d</sup>             | 43.640 $\pm$ 0.775 <sup>a</sup>                   | 942.717 $\pm$ 19.580 <sup>a</sup>                 |

注: 表 1 数据是均值  $\pm$  标准误差; 不同小写字母(a, b, c, d) 表示在不同显著水平下差异显著( $P < 0.05$ ), 下同.



( a ) 不同二极管色光处理 ( b ) 普通荧光灯处理

图 1 不同色光处理下生长的蛇足石杉离体叶状体

2.2 不同色光培养叶状体收获期的内源激素含量差异

为探究不同色光对蛇足石杉离体叶状体 HupA 累积的效应与内源激素水平的关系 ,分别检测了 4 种色光培养叶状体在 80 d 收获期时内源激素含量 ,结果见表 2. 由表 2 可知 ,CK、W、B 和 R 这 4 种不同色光下培养的叶状体内源激素含量有显著差异 ,ZT 和 IAA 均以 R 培养的叶状体含量最高 ,分别为 0.339 ng ·

g<sup>-1</sup> FW 和 3 761.017 ng · g<sup>-1</sup> FW ,ABA 则是以 B 培养的叶状体中含量最高( 91.143 ng · g<sup>-1</sup> FW) ,而以 R 培养的叶状体中 ABA 含量最低 ,仅有 60.534 ng · g<sup>-1</sup> FW ,前者 ABA 含量是后者的 1.51 倍. 4 种处理中 R 培养的叶状体中 GA 含量最高 ,其值为 0.045 ng · g<sup>-1</sup> FW ,其他 3 种处理的 GA 水平均低 ,它们的 GA 含量均不足 R 处理的 65% .

表 2 不同色光培养的蛇足石杉叶状体在 80 d 收获期时内源激素含量差异

| 处理 | ZT/( ng · g <sup>-1</sup> FW) | IAA/( ng · g <sup>-1</sup> FW)  | ABA/( ng · g <sup>-1</sup> FW) | GA/( ng · g <sup>-1</sup> FW) |
|----|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| CK | 0.280 ± 0.010 <sup>b</sup>    | 2 999.935 ± 61.919 <sup>b</sup> | 81.474 ± 3.691 <sup>b</sup>    | 0.024 ± 0.002 <sup>a</sup>    |
| W  | 0.280 ± 0.013 <sup>b</sup>    | 2 981.436 ± 94.287 <sup>b</sup> | 83.260 ± 2.064 <sup>b</sup>    | 0.029 ± 0.002 <sup>b</sup>    |
| B  | 0.140 ± 0.003 <sup>a</sup>    | 2 299.632 ± 41.025 <sup>a</sup> | 91.143 ± 0.377 <sup>c</sup>    | 0.027 ± 0.002 <sup>a,b</sup>  |
| R  | 0.339 ± 0.014 <sup>c</sup>    | 3 761.017 ± 78.081 <sup>c</sup> | 60.534 ± 1.286 <sup>a</sup>    | 0.045 ± 0.004 <sup>c</sup>    |

2.3 红光与蓝光处理的叶状体内源激素特点与其生长和 HupA 含量的关系

对比表 1 和表 2 发现 ,R 处理促进叶状体生长和干物质明显增加 ,具有内源激素 ZT、IAA、GA 高水平的基础 ,但其 HupA 含量低 ,与 ABA 低水平呈现一致; B 培养的叶状体生长和干物质积累低于 R 处理 ,其内源激素 ZT、IAA、GA 水平亦较 R 处理低 ,但 B 培养的叶状体 HupA 含量高 ,与该叶状体中 ABA 高水平存在一致.

2.4 蓝光与对照处理的叶状体生育期内源激素变化特征

对比 B 处理与 CK 处理叶状体的生育期内源激素水平 ,结果见图 2. B 处理的叶状体 ABA 含量随培养时间延长而逐渐增加 ,在 70 d 时达到最高值 93.360 ng ·

g<sup>-1</sup> FW ,在 90 d 时降至与 CK 处理的 ABA 值相近 ,且 B 培养的叶状体 ABA 含量几乎全生育期高于 CK 处理 ,见图 2( a) ;同时 ,由图 2( c) 、图 2( d) 可知 B 处理的叶状体 ABA/ZT 值、ABA/IAA 值在全生育期各阶段亦高于 CK. 由图 2( b) 可知 ,B 处理的叶状体 IAA/ZT 值生育期的变化趋势与 CK 处理类似 ,但 B 处理的 IAA/ZT 值全生育期远高于 CK 处理.

依据公认的不同类型激素功能 ,由本试验结果可知 ,B 处理的蛇足石杉叶状体中存在较高水平的生长型激素 IAA/ZT 值 ,促进其生长 ,增加了生物量; 且 B 处理引起了叶状体内源激素 ABA 应答 ,其体内成熟型激素 ABA 或 ABA/ZT 或 ABA/IAA 值高水平存在 ,促进了次级代谢产物 HupA 的含量增加.

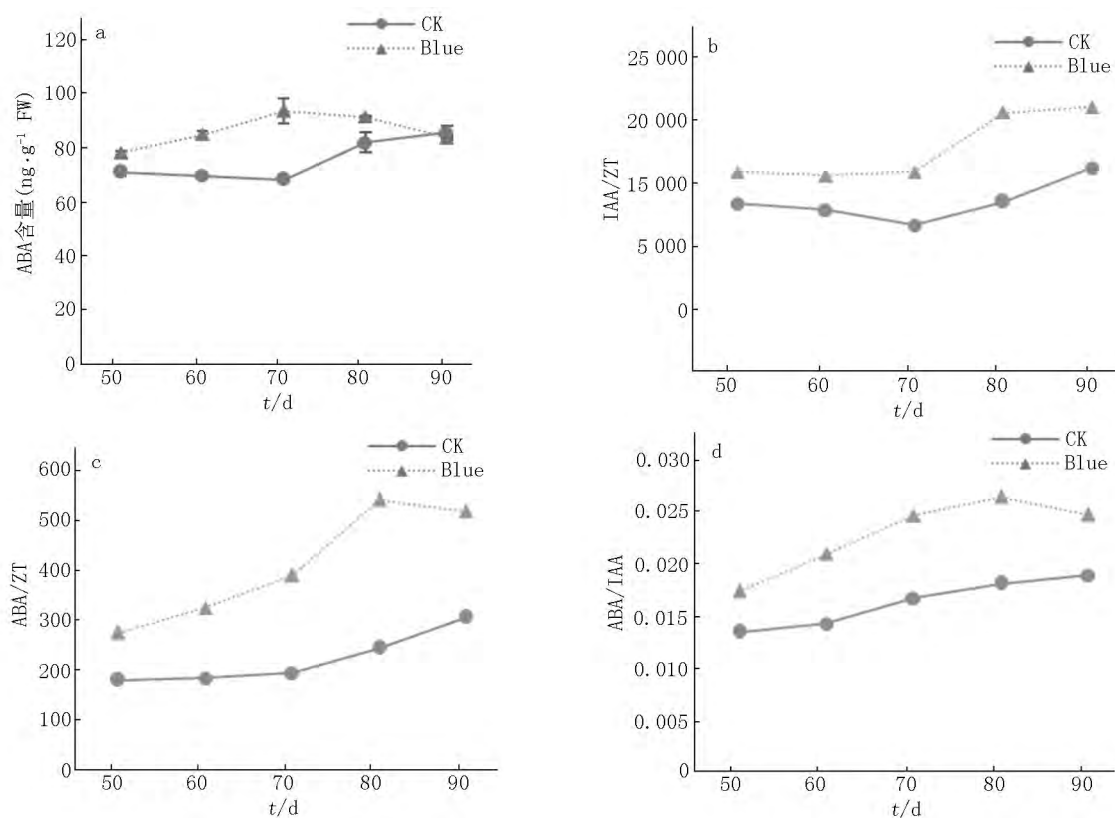


图2 B与CK处理下不同时期的内源激素变化

### 3 讨论

光是影响植物生长发育的重要因素之一,贯穿了植物的整个生命周期.不同光质对植物次生代谢产物的累积有不同影响.王昭清<sup>[16]</sup>以鱼腥草为实验材料研究发现,与白光相比,有色光对鱼腥草黄酮类化合物的生成有促进作用,且蓝光的促进效果最显著.刘慧雯<sup>[17]</sup>研究发现红光下铁皮石斛组培苗的生长显著高于其他光处理,且红光有利于多糖的累积,而蓝光有利于铁皮石斛生物碱的合成.

本研究结果表明:二极管白光处理与普通荧光灯处理对蛇足石杉离体叶状体的 HupA 生产率的影响差异不大,且4类内源激素水平相近.二极管红光培养的蛇足石杉叶状体中 IAA、ZT 和 GA 含量高于其他处理,在这些生长激素的调控下,二极管红光处理对叶状体生长的促进作用强于其他处理,且在生长过程中对干物质的累积也有促进效果,而内源激素 ABA 水平最低,其值为  $60.534 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,这与王海波等<sup>[18]</sup>报道的红光减少了 ABA 含量的结果相似,ABA 含量的降低可能影响物质合成流向不能转入次生代谢;二极管蓝光培养的蛇足石杉叶状体 ABA 含量远高于其他处理,在适当高水平的 ABA 调控下,二极管蓝光培养的叶状体内物质合成转向

次生代谢,促进了离体叶状体的石杉碱甲累积增加.

ABA 是一种生长后期作用的成熟激素,随着培养时间的增加,二极管蓝光培养的蛇足石杉离体叶状体 ABA 含量整体呈现上升趋势,在培养后期以 ABA 主调控叶状体的代谢,且 ABA/ZT、ABA/IAA 比值在二极管蓝光处理下均高于普通荧光灯处理,同时二极管蓝光培养的蛇足石杉叶状体 HupA 生产率远高于普通荧光灯处理,这说明蓝光处理有利于蛇足石杉离体叶状体 HupA 含量的累积,并与内源激素 ABA 水平变化存在内在联系.

### 4 参考文献

- [1] 余红英,孙远明,杨跃进. 草药蛇足石杉的研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(3): 279-281.
- [2] 蔡龚莉,方帅,张起辉. 蛇足石杉的药学研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(5): 931-939.
- [3] 林如辉,刘美龙. 中草药蛇足石杉的研究概况 [J]. 海峡药学, 2013, 25(9): 21-25.
- [4] Ferreira A, Rodrigues M, Fortuna A, et al. Huperzine A from *Huperzia serrata*: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology [J]. Phytochemistry Reviews, 2016, 15(1): 51-85.
- [5] Ding Rui, Sun Bingfeng, Lin Guoqiang. An efficient total synthesis of (–)-Huperzine A [J]. Organic Letters, 2016, 17(12): 3080-3083.

- 2012, 14(17): 4446-4449.
- [6] White J D, Li Yang, Kim J, et al. A novel synthesis of ( - )-Huperzine A via tandem intramolecular aza-prins cyclization-cyclobutane fragmentation [J]. *Organic Letters* 2013, 15(4): 882-885.
- [7] Shu Shaohua, Zhao Xinmei, Wang Wenjuan, et al. Identification of a novel endophytic fungus from *Huperzia serrata* which produces Huperzine A [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2014, 30(12): 3101-3109.
- [8] 李晓君, 杨雪飞, 朱皖南. 蛇足石杉茎尖组织培养研究 [J]. *中国现代中药* 2014, 16(5): 387-390.
- [9] 吉枝单. 蛇足石杉离体叶状体生产石杉碱甲的工艺条件研究 [D]. 南昌: 江西师范大学 2015.
- [10] 张小红, 李晓君, 杨雪飞. 不同条件对蛇足石杉组培苗生长及石杉碱甲积累的影响 [J]. *中国现代中药*, 2016, 18(4): 472-477.
- [11] 黄馨凤, 李万成. 蛇足石杉的生态环境研究进展 [J]. *中国林副特产* 2011(2): 73-76.
- [12] 石玮, 罗建平, 赵晓丹. 影响九华山千层塔石杉碱甲含量的主要环境因子分析 [J]. *植物资源与环境学报*, 2008, 17(3): 58-62.
- [13] Liu Yang, Fang Shengzuo, Yang Wanxia, et al. Light quality affects flavonoid production and related gene expression in *Cyclocarya paliurus* [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2018, 179: 66-73.
- [14] 韩邦兴, 陈乃富, 代剑平, 等. 光照对蛇足石杉某些生理生化指标的影响 [J]. *植物资源与环境学报* 2009, 18(3): 88-90.
- [15] 陈曼, 涂艺声, 叶丽娟, 等. 氨基酸对蛇足石杉叶状体增殖及石杉碱甲积累的影响 [J]. *植物学报*, 2017, 52(2): 218-224.
- [16] 王昭清. 不同光质的 LED 光源对鱼腥草生理生化及次生代谢的影响 [D]. 太原: 山西师范大学 2017.
- [17] 刘慧雯. LED 光质对铁皮石斛组培拟原球茎和幼苗生长及主要有效成分的影响 [D]. 济南: 山东农业大学, 2017.
- [18] 王海波, 王帅, 王孝娣, 等. 光质对设施葡萄叶片衰老与内源激素含量的影响 [J]. *应用生态学报*, 2017, 28(11): 3535-3543.

## The Effects of Different Colored Light on HupA Accumulation and Endogenous Hormone Content Produced by the Thallus of *Huperzia serrata* in vitro

HUANG Qian, TU Yisheng\*, YU Xiao, YUAN Huihui

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

**Abstract:** For exploring the effect of different colored lights on the growth and Huperzine A accumulation of the thallus of *Huperzia serrata*, set up several different colored lights treatment including diode white light (W), diode blue light (B), diode red light (R) are set up to treat. Compared with the common fluorescent lamp (CK), and studied the difference of the growth and HupA accumulation of the thallus under different colored lights and the relationship between them and endogenous hormone including IAA, ZT and ABA, GA are studied. The results show that red light is helpful to promote the growth and proliferation of the thallus of *Huperzia serrata* in vitro, but it had an extremely significant inhibitory effect on content of HupA. Compared with CK, blue light treatment increase the growth amount and HupA content of the thallus, and the HupA productivity is highest  $\mu\text{p}$  to  $1\,811.728\,\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , which is higher 49.67% than CK. The total IAA/ZT value, the ABA content, ABA/ZT value, ABA/TAA value of the thallus treated with diode blue light are all higher than CK during full period. Depending on the function of different types of hormones, the results of this study indicate that there is high level of growth hormone IAA/ZT in the thallus treated with blue light, which promotes its growth and increased the biomass, and the high level of ABA promotes the accumulation of secondary metabolite HupA.

**Key words:** *Huperzia serrata*; different colored lights; growth; Huperzine A (HupA); endogenous hormone

(责任编辑: 刘显亮)