

· 中药农业 ·

外源 NO 对桔梗幼苗生长和总皂苷积累的影响[△]

张坚¹, 李先宽¹, 李兴林^{2*}, 马琳¹, 陈志娟¹

1. 天津中医药大学 中药学院, 天津 301617;

2. 天津科技大学 生物工程学院/工业微生物教育部重点实验室, 天津 300457

[摘要] 目的: 考察外源一氧化氮(nitric oxide, NO)对桔梗幼苗生长和次生代谢产物总皂苷类成分积累的影响。方法: 培养桔梗实生苗, 然后利用喷灌法连续1周喷洒不同浓度梯度的NO供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)溶液, 记录幼苗的生长状况, 并对桔梗总皂苷、脯氨酸(proline, Pro)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等生理指标进行测定。结果: 随SNP度增加, 桔梗幼苗生长、皂苷积累和生理指标多数呈现先增加后降低的趋势, MDA含量则呈现先降低后增加的趋势; 低浓度SNP有助于促进桔梗的生长, 并促进其总皂苷成分积累。结论: 低浓度的外源NO对桔梗幼苗的生长有一定的促进作用, 且可明显提高幼苗中总皂苷含量。

[关键词] 桔梗; 硝普钠; 总皂苷

[中图分类号] R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)10-1402-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190101002

The Effects of Exogenous NO on the Seedlings Growth and Accumulation of Secondary Metabolism of *Platycodon grandiflorum*

ZHANG Jian¹, LI Xian-kuan¹, LI Xing-lin^{2*}, MA Lin¹, CHEN Zhi-juan¹

1. College of Chinese Herbal Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;

2. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology/Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of exogenous NO(nitric oxide)on *Platycodon grandiflorum* seedling growth and the total saponins of secondary metabolites accumulation. **Methods:** *Platycodon grandiflorum* seedlings were cultivated, and then, a certain concentration gradient of SNP(sodium nitroprusside), a nitric oxide donor, were sprayed by leaf spraying method for a week. Recorded the situation of seedling growth, and measured the physiological indexes of the total saponins of *Platycodon grandiflorum*, proline, MDA, SOD, POD and CAT. **Results:** With the increase of the concentration of SNP, the seedling growth, the saponin accumulation and the majority of physiological indexes presented first increase and then decrease trend. MDA content showed the trend of decreasing first and then increasing. Low concentrations of SNP helped to promote the seedling growth and the total saponin accumulation. **Conclusion:** Low concentrations of exogenous NO promote the seedling growth of *Platycodon grandiflorum* and can significantly increase the saponin content.

[Keywords] *Platycodon Grandiflorum*; sodium nitroprusside(SNP); total saponins

桔梗 *Platycodon grandiflorum*(Jacq.)A. DC. 为桔梗科桔梗属多年生草本植物, 根为传统中药桔梗, 具有祛痰功效。此外, 桔梗还是一种集药食两用和观赏于一身的植物, 因此桔梗综合应用价值很高。随着桔梗在我国需求量的不断增加, 野生桔梗资源远

远不能满足需求^[1], 所以近年来很多研究者对桔梗人工栽培技术进行了研究^[2]。一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种普遍存在于生物体内的具有生物活性和信号传导作用的易扩散分子, 对植物许多生命活动具有调节作用, 很多研究表明 NO 对植物生长有促

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目(U1332123); 中央本级重大增减支项目(2060302)

* [通信作者] 李兴林, 副教授, 研究方向: 植物生物技术与分子生物学; Tel: (022)60601329, E-mail: lxlszf@tust.edu.cn

进作用,且对逆境胁迫下植物的生长具有改善作用^[3-5]。目前有关外源性NO的促进桔梗生长和诱导桔梗体内皂苷积累的研究还鲜有涉及,故本研究考察了外源性硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)对桔梗幼苗的生长和对幼苗中总皂苷诱导的影响,并对桔梗幼苗中脯氨酸(proline, Pro)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等生理活性指标进行测定,初步分析这一过程的生理机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 当年成熟桔梗 *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. 种子,购于河北安国市场,经天津中医药大学马琳教授鉴定为中药桔梗种子,通风干燥处保存备用。

1.1.2 主要试剂及药品 桔梗皂苷D(上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号:58479-68-8),硝普钠(天津市化学试剂批发公司,分析纯),乙醇(天津市北方天医化学试剂厂,分析纯),甲醇(天津市福晨化学试剂厂,分析纯),浓硫酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,分析纯),蒸馏水(自制)。

1.1.3 主要仪器 XMTB 数显调节恒温水浴锅(北京长风仪器仪表公司),752型可见-紫外分析仪(上海第三分析仪器厂),XCA-80001 电热鼓风干燥箱(天津市华北实验仪器有限公司),FA1004 电子天平(天津市天马仪器厂),TDL-40B 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),DDL-5 低速冷冻离心机(杭州艾普仪器设备有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 幼苗生长试验 取成熟饱满、大小一致的桔梗种子,用蒸馏水浸泡24 h,备用。用7个相同规格的穴盆(长54 cm,宽27 cm,高6 cm),在每个穴里装入等量的基质[珍珠岩-蛭石-营养土(1:1:4)],将桔梗种子播种在穴盆中,每格种5~8株。出苗后间苗,每盆留生长一致、分布均匀的幼苗。待幼苗长出4片真叶时进行SNP诱导。分别用浓度为0.03、0.05、0.07、0.10、0.50、1.00 mmol·L⁻¹的SNP溶液进行诱导处理,每个处理设3个重复,蒸馏水组作为空白对照组(CK)。SNP溶液在处理时采用全株喷洒的方法,每次处理用量约100 mL,以浇透为止,处理

时间为傍晚,1 d处理1次,共喷洒7 d。SNP处理7 d后测量植株长度,并测量生理指标。

1.2.2 总皂苷含量 采用香草醛-硫酸显色比色法测定桔梗总皂苷含量^[6]。具体方法:精确称取3.8 mg桔梗皂苷D置10 mL容量瓶中,甲醇定容得对照品溶液。称取对照品溶液0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL置10 mL具塞试管中,水浴干燥后加入10%香草醛试液0.5 mL,60%硫酸4.5 mL,摇匀,于60℃水浴加热15 min,冰水浴中冷却3 min,以不加皂苷的样品为空白对照,检测波长470 nm,得回归方程 $Y=241.58X-0.0563$ ($r=0.9970$)。然后,取桔梗幼苗(含胚轴的根部)干燥粗粉约1 g(精密质量),置索氏提取器中乙醚回流除杂后甲醇超声提取2次,每次30 min,合并滤液后浓缩,然后进行香草醛-硫酸显色反应,470 nm波长测定样品皂苷含量。

1.2.3 生理指标测定 脯氨酸含量的测定采用茚三酮显色法,得回归方程 $Y=0.0216X-0.0167$ ($r=0.9978$)。脂质过氧化产物MDA含量($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)的测定采用硫代巴比妥酸法。保护酶活性的测定:用氮蓝四唑(NBT)显色法在 $A_{560\text{ nm}}$ 测定SOD活性,以将NBT的还原抑制到对照一半(50%)时所需的酶量为1个酶活单位($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$);用愈创木酚法测定POD的活性^[7],以每分钟 $A_{470\text{ nm}}$ 增加0.01为1个酶活力单位($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$);CAT的活性测定采用紫外吸收法,以每分钟内 $A_{240\text{ nm}}$ 下降0.1为1个酶活力单位($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)。每个处理平行3次,取平均值。

1.2.4 数据处理 采用SPSS 17.0统计软件对数据进行方差分析,以Duncan's新复级差法比较不同处理间的差异性,用Excel软件进行制图,Word文档进行制表。

2 结 果

2.1 不同浓度SNP对桔梗幼苗生长性状的影响

NO是一种无色透明、结构简单、兼具脂溶性和水溶性的小分子生物自由基,可自由通过生物膜在植物体内发挥作用^[8]。NO被认为是在植物体中普遍存在的关键信号分子^[9],适度的NO能够促进植物的生长和发育^[10]。本实验中,SNP(NO供体)喷洒处理后,在短期内(2 d之内)不会出现可见性诱导现象;处理第3天后出现明显的诱导差异,首先表现在植株高度上。较低浓度的SNP有助于桔梗幼苗的生长,幼苗茎高和根长都较对照组(CK)明显增长;随着诱导时间增加,高浓度SNP(1.00 mmol·L⁻¹)处理的桔梗

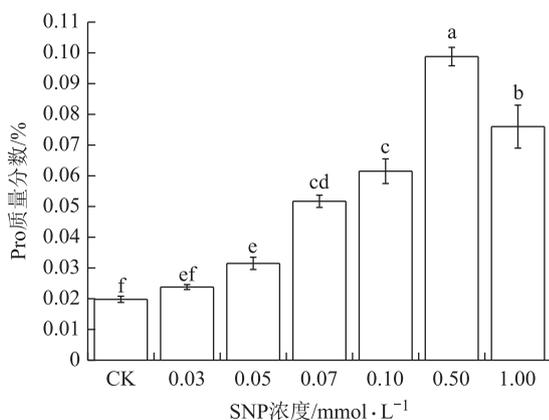
幼苗出现胁迫伤害, 外围叶片已有部分枯萎, 叶片出现黄化畸形现象; 而低浓度 SNP 诱导下的新生小叶长势良好, 没有明显诱导伤害现象。表 1 为 SNP 处理 7 d 后幼苗的生长情况。从表 1 中可见较低浓度 SNP ($\leq 0.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可显著促进桔梗幼苗生长, 尤其当 SNP 浓度为 $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 促生长作用最为明显, 其苗长和根长为对照组 (CK) 两倍以上。

表 1 不同浓度的 SNP 对桔梗幼苗生长性状的影响 (7 d)

SNP 浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	苗长/cm	根长/cm	真叶数/枚
对照 (CK)	2~4	2~3	4
0.03	2~4	2~4	4
0.05	3~4	4~5	4
0.07	4~6	5~6	4
0.10	5~6	5~7	4
0.50	4~5	4~6	4
1.00	3~4	3~5	4

2.2 不同浓度 SNP 对桔梗幼苗生理指标的影响

2.2.1 不同浓度 SNP 诱导下 Pro 的含量 Pro 是植物体内重要的渗透调节物质, 同时也是植物众多可溶性物质中最常见和有效的^[11]。除参与渗透调节外, Pro 还发挥分子伴侣的作用, 可以与细胞中生物大分子结合以稳定蛋白分子构象, 同时还可以缓冲胞质的 pH, 维持细胞的氧化还原状态^[12]。图 1 所示, 不同浓度 SNP 诱导下幼苗中 Pro 含量随浓度增加呈现先增加后降低的趋势。当 SNP 浓度为 $0.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 幼苗中 Pro 的含量最高, 比对照组 (CK) 增加了 3.99 倍; 当 SNP 浓度为 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 游离 Pro 的含量则开始降低。

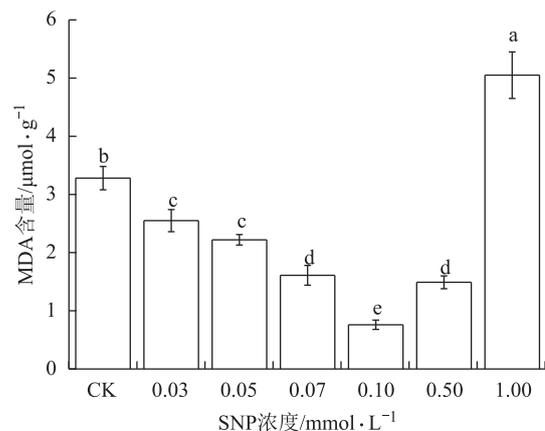


注: 不同小写字母表示各处理样品中 Pro 含量差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

图 1 不同浓度 SNP 对桔梗幼苗中 Pro 含量的影响 ($n = 3$)

2.2.2 不同浓度 SNP 诱导下 MDA 含量 MDA 植物

细胞膜质过氧化的最终产物, 其含量多少可以反映植物受到逆境伤害的程度^[11]。图 2 所示, 在低浓度 SNP 诱导下, 随诱导浓度增加, 幼苗中 MDA 含量逐渐降低; 当 SNP 浓度增加到 $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, MDA 含量降至最低, 为对照组 (CK) 的 23%; 随着 SNP 浓度继续增加, MDA 含量则开始增加; 当 SNP 浓度增加到 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, MDA 含量增加至空白对照组的 1.54 倍。



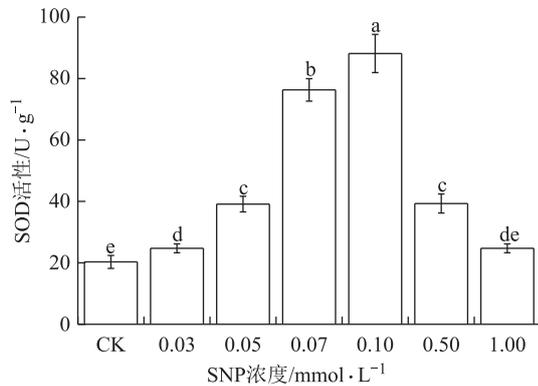
注: 不同小写字母表示各处理样品中 MDA 含量差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

图 2 不同浓度的 SNP 对桔梗幼苗中 MDA 含量的影响 ($n = 3$)

2.2.3 不同浓度 SNP 诱导下抗氧化酶活性 SOD、POD、CAT 为植物体内重要的保护酶, 维持植物细胞内活性氧的代谢平衡。当植物受到逆境胁迫时, 活性氧等有害物质会大量产生并不断积累, 从而导致细胞膜脂质过氧化, 造成细胞通透性增强, 细胞内含物的渗出。植物自身的保护酶系统通过调节酶活性而增强细胞内活性氧清除能力, 减少由于活性氧而对细胞造成的损伤, 保护细胞膜的正常功能^[13-14]。

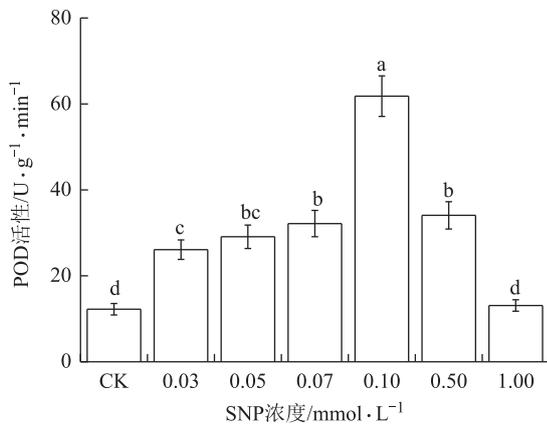
2.2.3.1 SOD 活性 如图 3 所示, SNP 对 SOD 活性的影响表现为低浓度促进, 高浓度抑制。随着 SNP 溶液浓度的增加, SOD 活性不断增加。当 SNP 溶液浓度增加至 $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SOD 的活性最大, 为对照组 (CK) 的 4.34 倍, 当 SNP 浓度继续增加, 则 SOD 活性迅速降低。

2.2.3.2 POD 活性 如图 4 所示, SNP 对幼苗中 POD 活性的影响表现趋势同 SOD。随着 SNP 浓度的增加, POD 活性不断增加, 当 SNP 溶液浓度增加至 $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 幼苗中 POD 的活性增加至空白对照组 (CK) 的 5.05 倍; 继续增加 SNP 浓度, POD 活性迅速下降。



注:不同小写字母表示各处理样品中SOD活性差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

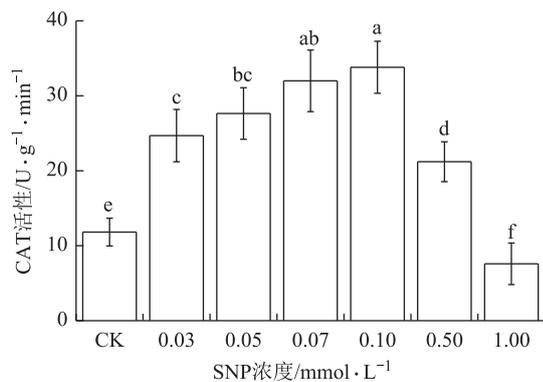
图3 不同浓度的SNP对桔梗幼苗中SOD活性的影响($n = 3$)



注:不同小写字母表示各处理样品中POD活性差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

图4 不同浓度的SNP对桔梗幼苗中POD活性的影响($n = 3$)

2.2.3.3 CAT活性 图5所示,SNP对CAT活性的影响也表现为低浓度促进、高浓度抑制的规律。当SNP溶液浓度增加至 $0.10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时CAT的活性增加至空白对照组(CK)的2.86倍,当SNP浓度继续增加至 $0.50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,CAT活性迅速下降。

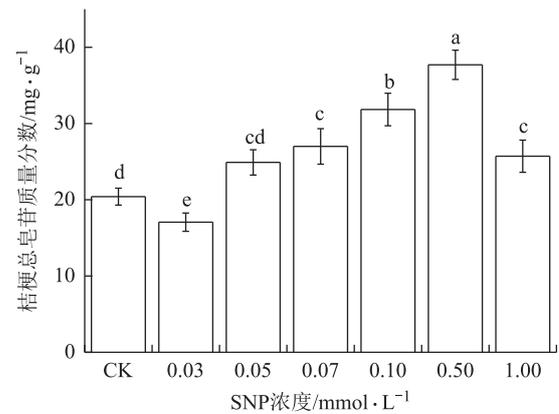


注:不同小写字母表示各处理样品中CAT活性差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

图5 不同浓度的SNP对桔梗幼苗中CAT活性的影响($n = 3$)

2.3 不同浓度SNP对桔梗幼苗总皂苷含量的影响

桔梗总皂苷为桔梗植物的主要次生代谢产物,也是其起治疗作用的主要药效成分。图6所示,随SNP浓度的逐渐增加,桔梗幼苗(含胚轴的根部)总皂苷含量呈现先增加后减小的趋势。当SNP浓度为 $0.50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,皂苷含量最高,为对照组(CK)的1.84倍。当SNP浓度为 $1.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,桔梗总皂苷的含量迅速降低。



注:不同小写字母表示各处理样品中桔梗总皂苷含量差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

图6 不同浓度的SNP对桔梗幼苗中总皂苷含量的影响($n = 3$)

3 讨论

3.1 NO对桔梗幼苗生长的促进作用

王金祥等^[15]在拟南芥的研究中发现,施加外源性NO可以促进插穗生根和根的生长,推测适量NO有促进植物无性繁殖和营养器官建成的作用。尹丹丹等^[16]发现适量的NO处理下的黄长筒石蒜的平均子球茎数、平均根数明显增加;本实验中低浓度SNP显著促进了桔梗幼苗生长,无论幼苗高度还是根系长度均与对照组(CK)有了明显的提高,但过高浓度SNP诱导下,促生长作用明显减弱,而且出现不同程度的胁迫伤害现象。这说明NO促桔梗幼苗生长具有浓度剂量效应,即低浓度促进、高浓度抑制,这与潘龙等^[17]对紫花苜蓿的研究结果相似。

Pro是植物体内重要的渗透调节物质。本实验中,外源性NO可以显著增加桔梗幼苗中Pro含量,这说明在正常条件下生长的桔梗幼苗仍然可以通过施加适量的外源性NO增加Pro含量,以稳定植物体内的生物大分子,保护膜与酶的结构,促进和改善生长。

SOD、POD 和 CAT 为植物体内重要的保护酶,而 MDA 则是反映植物受逆境伤害程度的重要指标。本实验中,当 SNP 浓度在 $0.03 \sim 0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时保护酶 SOD、POD 和 CAT 的活性显著升高,而 MDA 含量则呈现降低的趋势。这说明 SNP 在较低浓度下,通过激活保护酶的活性,可以有效地清除植物体产生的活性氧自由基。从植物生长性状表现可以看出这一浓度范围内植物生长良好,且随 SNP 浓度增加植物根和茎长度均呈增加趋势,这说明 SNP 通过激活植物体内保护酶活性有效清除了植物体内活性氧,防止自由基对植物体产生的伤害,从而促进了植物的生长发育;而当 SNP 浓度增加到 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,幼苗中保护酶活性降低,活性氧平衡被打破,导致 MDA 含量显著增加,植物生长出现抑制。

3.2 NO 对桔梗幼苗总皂苷诱导作用

桔梗皂苷类成分是桔梗重要的次生代谢产物。一般认为次生代谢产物是植物在进化过程中对不断变化的环境适应的结果。一些植物通过次生代谢应对外界环境刺激,例如有研究发现植物在盐碱、水分、温度等环境刺激下,次生代谢产物在其中发挥重要作用^[18]。从本实验可以得出,一定浓度的 SNP 溶液能够促进桔梗幼苗(含胚轴的根部)皂苷类成分的合成,当 SNP 浓度是 $0.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,桔梗总皂苷含量是空白对照组(CK)的 1.84 倍,但当浓度继续增加至 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,总皂苷含量有所下降。有研究表明,过量的 NO 能破坏植物的光合作用和电子链传递,造成 DNA 损伤和细胞死亡,抑制植物的生长发育,从而减少有效成分的合成^[19]。总体上,SNP 对桔梗总皂苷的影响表现在低浓度促进,高浓度抑制。

4 结论

较低浓度的 SNP 对桔梗幼苗生长有促进作用, $0.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SNP 对桔梗幼苗(含胚轴的根部)中总皂苷诱导效果最强。

参考文献

- [1] 于雪杉. 桔梗研究进展综述[J]. 吉林农业,2014(2):35.
- [2] 李国清,毕研文,陈宝芳,等. 中草药桔梗人工栽培研究进展[J]. 农业学报,2016,6(7):55-59.
- [3] 张春平,何平,杜丹丹,等. 外源 Ca^{2+} 及 NO 供体硝普钠

(SNP)对盐胁迫下紫苏种子萌发及幼苗抗氧化酶活性的影响[J]. 中药材,2011,34(5):665-669.

- [4] 吴雪霞,朱月林,朱为民,等. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下番茄幼苗生理影响[J]. 中国农业科学,2006,39(3):575-581.
- [5] 周永斌,殷有,苏宝玲,等. 外源一氧化氮供体对几种植物种子的萌发和幼苗生长的影响[J]. 植物生理学通讯,2005,41(3):316-318.
- [6] 陈方,宋海峰. 皂苷分析方法研究进展[J]. 天津中医药,2005,22(3):257-259.
- [7] 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,2000:164-167.
- [8] 张秀玮,董元杰,邱现奎,等. 外源 NO 对不同作物种子萌发、幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2012,18(2):397-404.
- [9] 徐茂军. 一氧化氮:植物细胞次生代谢信号转导网络可能的关键节点[J]. 自然科学进展,2007,17(12):1622-1630.
- [10] 张玲玲,吴丹,赵子捷,等. 植物一氧化氮信号分子的研究进展[J]. 植物学报,2017,52(3):337-345.
- [11] 张坚,马琳,李先宽,等. 茉莉酸甲酯对杠柳不定根中次生产物的诱导和生理机制研究[J]. 中国科技论文在线精品论文,2017,10(5):540-547.
- [12] SUN C X, SHEN X Y, LIU Z G. Status and advances in studies on the physiology and biochemistry mechanism of crop drought resistance[J]. Rain Fed Crops,2002,22(5):285-288.
- [13] 罗明华,罗英,王璞. 水杨酸处理对干旱胁迫下丹参幼苗抗氧化能力的影响[J]. 干旱地区农业研究,2010,28(4):102-105.
- [14] 陈明,沈文颺,阮海华,等. 一氧化氮对盐胁迫下小麦幼苗根生长和氧化损伤的影响[J]. 植物生理与分子生物学,2004,30(5):569-576.
- [15] 王金祥,陈碧丽,廖红,等. 生长素、乙烯和一氧化氮对拟南芥下胚轴插条形成不定根的调节[J]. 植物生理学通讯,2009,45(10):986-990.
- [16] 尹丹丹,薛泽云,徐迎春,等. 外源一氧化氮对黄长筒石蒜子球发育的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):153-155.
- [17] 潘龙,谷文英. 硝普钠浸种对紫花苜蓿种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 草业学报,2013,30(1):58-62.
- [18] 袁媛,周骏辉,黄璐琦. 黄芩道地性形成“逆境效应”的实验验证与展望[J]. 中国中药杂志,2016,41(1):139-143.
- [19] 王强,刘岩,白中文,等. 次生代谢产物的研究进展[J]. 农业与技术,2008,28(6):66-69.

(收稿日期:2019-01-01 编辑:王丽英)