

# 外源激素对丹参愈伤组织诱导和有效成分含量的影响

柳福智<sup>1</sup>, 董娟娥<sup>1,2</sup>, 梁宗锁<sup>1,2</sup>

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 中国科学院 水土保持研究所, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**以丹参(*Salvia miltiorrhiza*)无菌苗的叶为外植体,接种于附加2,4-D、NAA、6-BA及其组合的MS固体培养基上,研究了外源激素对愈伤组织的诱导及有效成分含量的影响。结果表明:单独使用3种外源激素在一定浓度范围内均能诱导外植体产生愈伤组织;2,4-D对丹参愈伤组织的生长有促进作用,但当2,4-D的浓度在4 mg/L以上时,对愈伤组织的生长有抑制作用;配合使用外源生长素和细胞分裂素,能获得出愈率高、生长快、质量好的愈伤组织;外源激素的适宜组合为2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;愈伤组织中丹酚酸B的含量随培养时间的延长呈下降趋势。

**关键词:**丹参;愈伤组织;外源激素;丹酚酸B

**中图分类号:**Q946.885

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-7461(2006)05-0151-03

## A Study on the Effect of Different Exogenous Hormones on Callus Induction and Bioactive Constituent of *Salvia miltiorrhiza*

LIU Fu-zhi<sup>1</sup>, DONG Juan-e<sup>1,2</sup>, LIANG Zong-suo<sup>1,2</sup>

万方数据

(1. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** *Salvia miltiorrhiza* aseptic leaves were used as explants cultured in solid medium MS supplemented with 2,4-D, NAA, 6-BA or combinations of plant exogenous hormones with different concentrations, to study their the effect on callus induction and the bioactive component accumulation. The results showed that all the three exogenous hormones could induce callus under certain concentration ranges. Better results could be obtained by combining three exogenous hormones, the optimum combination was Ms + 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L. Higher concentration of 2,4-D (over 4 mg/L) could restrain callus growth. The content of salvianolic acid B reduced with the increase of induction time.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza*; callus; exogenous hormones; salvianolic acid B

外源激素对愈伤组织的诱导及分化具有十分复杂而重要的影响<sup>[1]</sup>。在植物离体培养过程中,外植体的内源激素水平不断变化,生长素类物质存在极性运输现象,由此导致了其体内分布的特异性改变,这一变化与器官发生和愈伤组织的形成密切相关。在培养基中加入外源激素可以改变和影响外植体的内源激素水平。早在20世纪60年代,Quinlan等用6-BA处理葡萄,发现光合作用产物明显地向处理部

位集中<sup>[2]</sup>。Mazari等在西黄松(*Pinus ponderosa*)子叶的细胞培养中证实低浓度的6-BA和2iP能有效地诱导叶绿体中与光合作用有关的6种多肽的形成<sup>[3]</sup>。外源激素作为诱导和调节愈伤组织的重要因素,并对次生代谢产物的形成有重要作用。丹参(*Salvia miltiorrhiza*)是唇形科鼠尾草属多年生植物。对心血管疾病具有显著的疗效。丹参的细胞培养研究开始于20世纪80年代,细胞培养物中丹参

收稿日期:2006-06-08 修回日期:2006-06-20

基金项目:陕西省“十五”科技攻关项目“主要药用植物的生长发育与有效成分积累研究”(2001KG01-G15-03)

作者简介:柳福智(1976-),男,宁夏隆德人,硕士,研究方向为植物资源化学。

\* 通讯联系人:董娟娥,副教授,博士,主要从事天然产物提取和中药现代化理论与技术的教学与研究工作。dje009@126.com

总黄酮含量远远高于生药<sup>[4]</sup>,培养物中含有迷迭香酸<sup>[5]</sup>,固定化培养细胞可连续产生隐丹参酮和铁锈醇<sup>[4]</sup>。本研究以丹参无菌苗的真叶为外植体,考查外源激素种类及浓度对丹参叶愈伤组织的诱导能力及愈伤组织的分化能力,并对丹参愈伤组织中丹酚酸 B 的合成积累动态规律进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料来源

丹参种子,来源于天士力 GAP 药源基地(陕西商洛)。

### 1.2 仪器与试剂

LC-10ATvp 型高效液相色谱仪(日本岛津),SPD-10A vp 紫外检测器;Module 型超声波提取机(天津科贝尔)。丹酚酸 B(Salvianic acid B)标准品(中国药品生物制品鉴定所)。色谱分析用甲醇(美国 Fisher 公司),水为双重蒸馏水。

### 1.3 无菌苗的获得

丹参种子用自来水冲洗 2~4 h,然后用纱布擦掉其表面霉层,再用自来水冲洗干净,于 70% 的酒精中浸泡 30 s,无菌水冲洗 3~4 次,0.1%Hg-Cl<sub>2</sub> 常规灭菌 10~15 min,无菌水冲洗 3~4 次,接种在 1/2MS 固体培养基上培养。培养基 pH 为 5.8,培养室温度(24±2)℃,每天光照 12~14 h,光强 2 000~3 000 lx,生长 1 个月待用。

### 1.4 丹参愈伤组织的诱导

取生长 1 个月的丹参无菌苗,将叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,接种于附加不同外源激素及浓度配比的 MS 固体培养基上(pH5.8,高压灭菌),每个处理接种 25 瓶,每瓶接 2~3 块外植体,在光照条件下诱导形成愈伤组织。培养室温度为(25±2)℃。每天光照 10~12 h,光强 2 000~3 000 lx,在愈伤组织生长过程中转接 4~5 次,培养过程中观察生长情况,20 d 后统计诱导愈伤组织数量并计算诱导率,同时记录愈伤组织的质地,颜色及生长情况。愈伤组织诱导率按下式计算:

$$\text{诱导率} = (\text{长出愈伤组织的外植体数} / \text{总接种外植体的块数}) \times 100\%$$

### 1.5 不同时期愈伤组织样品的采集

从愈伤组织诱导开始到生长 20 d 后,每隔 10 d 取样 1 次(3 个重复),样品置 90℃ 的烘箱中烘干,研细后密封,保存于冰箱中,待用。培养期间继代 3

~4 次。

### 1.6 愈伤组织中丹酚酸 B 的提取

称取丹参愈伤组织的干燥细粉 0.2 g 左右,加 5 mL 50% 的乙醇,超声波提取 30 min,静置,取上清液,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后作为待分析样品。

### 1.7 丹酚酸 B 的含量测定<sup>[6]</sup>

HPLC 法。色谱柱:shim-pack C18(150 mm×4.6 mm);流动相:甲醇:5%冰乙酸=40:60;流速:1 mL/min;进样量:5 μL;检测波长:281 nm;柱温:30℃;理论塔板数以丹酚酸 B 记不少于 4 000,分离度为 3.76。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源激素对丹参愈伤组织的诱导效应

2.1.1 2,4-D 对丹参愈伤组织的诱导 由表 1 可以看出,不同浓度的 2,4-D 对丹参真叶愈伤组织的诱导效应不同,过低和过高浓度的 2,4-D 均不能使丹参真叶很好地诱导出愈伤组织。当培养基中 2,4-D 浓度为 0.3~4.0 mg/L 时对愈伤组织的诱导率呈先增加后降低的趋势,浓度为 2.0 mg/L 时愈伤组织的诱导率为最大。从愈伤组织生长情况来看,在浓度为 1.0~2.0 mg/L 时,愈伤组织生长状况较好,有光泽。2,4-D 浓度增加到 4.0 mg/L 时,愈伤组织生长差,大部分呈灰褐色,无光泽。浓度增加到 5.0 mg/L 时,虽有少量愈伤组织诱导出,在不能正常生长。可能是因为高浓度的 2,4-D 会诱导愈伤组织内多酚氧化酶活性升高,从而导致愈伤组织褐化<sup>[7]</sup>。

2.1.2 NAA 对丹参愈伤组织的诱导 由表 2 可以看出,NAA 对丹参外植体叶愈伤组织的影响也较强。NAA 的浓度在 1.0 mg/L 时,诱导率最高(100%),NAA 的浓度在 0.3~0.5 mg/L 时,愈伤组织长势较好,但颜色暗淡,没有光泽,继代后生长缓慢。NAA 的浓度在 1.0 mg/L 时,愈伤组织生长好,呈黄绿色,具光泽,转接后长势好。浓度在 3.0 mg/L 以上时,生长缓慢。浓度达到 4.0~5.0 mg/L 时,有少量愈伤组织产生,随后逐渐发褐,死亡。这是因为低浓度的生长素能促进生长,超过适宜浓度,由于生长素可诱导乙烯的产生而干扰内部生理平衡,从而抑制生长<sup>[8]</sup>。

表1 2,4-D对丹参愈伤组织诱导和生长的影响

Table 1 Effect of 2,4-D on callus induction and growth

浓度/mg · L <sup>-1</sup>	诱导率/%	愈伤组织颜色	生长情况
0	0.0		抑制
0.3	70.5	淡绿色 无光泽	生长差
0.5	80.0	淡绿色 有光泽	生长一般
1.0	85.0	淡绿色 有光泽	生长较好
2.0	100.0	淡绿色 有光泽	生长好
3.0	82.5	黄绿色 有光泽	生长一般
4.0	47.5	灰褐色 无光泽	生长差
5.0	10.0	褐色 无光泽	抑制

表2 NAA对丹参愈伤组织的诱导和生长的影响

Table 2 Effect of NAA on callus induction and growth

浓度/mg · L <sup>-1</sup>	诱导率/%	愈伤组织颜色	生长情况
0	0.0		抑制
0.3	70.0	淡绿色 无光泽	生长较好
0.5	85.0	绿色 无光泽	生长较好
1.0	100.0	黄绿色 有光泽	生长好
2.0	65.0	灰白色 有光泽	生长一般
3.0	40.0	灰白色 无光泽	生长差
4.0	15.0	褐色 无光泽	抑制

2.1.3 6-BA对丹参愈伤组织的诱导 从表3可以看出,6-BA对丹参外植体叶的愈伤组织有较大的影响。6-BA浓度为1.0mg/L时出愈率高,愈伤组织呈黄绿色,有光泽,生长好。当6-BA的浓度在1.0mg/L以下时,出愈率低,愈伤组织颜色较暗,生长差;6-BA的浓度在3.0mg/L以上时,有少量愈伤组织产生,生长缓慢。由于6-BA在适宜的浓度时,具有促进细胞分裂和伸长,促进细胞分化及物质的合成和运输,影响细胞中各种酶的活性等作用。如果浓度过低,就容易形成多核体阻止细胞分化,加速细胞衰老,逐渐死亡。而高浓度的6-BA使细胞体积因强烈的分裂活动而急剧缩小,已形成的愈伤组织不能正常生长,逐渐变褐。

表3 6-BA对丹参愈伤组织的诱导和生长的影响

Table 3 Effect of 6-BA on callus induction and growth

浓度/mg · L <sup>-1</sup>	诱导率/%	愈伤组织颜色	生长情况
0	0.0		抑制
0.3	10.0	绿色 无光泽	生长差
0.5	25.0	绿色 无光泽	生长差
1.0	80.0	黄绿色 有光泽	生长好
2.0	82.5	黄绿色 有光泽	生长较好
3.0	30.0	灰白色 无光泽	生长一般
4.0	10.0	褐色 无光泽	抑制

2.1.4 不同外源激素的组合对丹参愈伤组织的诱

导 从表4可以看出,适宜浓度的NAA与6-BA组合,2,4-D与6-BA组合的出愈率均较高。结合愈伤组织诱导后生长发育情况来看,NAA与6-BA组合对愈伤组织的诱导效应较2,4-D与6-BA组合差,愈伤组织不但诱导率低,而且生长较慢。2,4-D2.0mg/L+6-BA1.0mg/L组合不仅生长好,愈伤组织呈黄绿色,具光泽,质地较紧密,此时的愈伤组织可作细胞培养的材料。在2,4-D与6-BA组合的培养基上,随着2,4-D浓度的增加,愈伤组织的诱导率有所增加。当2,4-D浓度在3mg/L以上时,诱导率低且愈伤组织生长缓慢,这时愈伤组织的质地紧密,坚硬,颜色发暗,并且逐渐变褐,其生长受到抑制。

表4 不同浓度的外源激素对比对丹参愈伤组织诱导和生长的影响

Table 4 Effect of combination of different exogenous hormones on callus induction and growth

浓度 /mg · L <sup>-1</sup>	诱导率 /%	愈伤组 织颜色	生长情况
NAA 0.5mg/L+6-BA 1.0mg/L	75.0	绿色无光泽	生长差
NAA 1.0mg/L+6-BA 1.0mg/L	85.0	绿色光泽	生长较好
NAA2.0mg/L+6-BA1.0mg/L	82.5	绿色光泽	生长较好
NAA 3.0mg/L+6-BA 1.0mg/L	70.0	绿色无光泽	生长差
2,4-D 0.5mg/L+6-BA 1.0mg/L	87.5	绿色光泽	生长较好
2,4-D 1.0mg/L+6-BA 1.0mg/L	90.0	黄绿色有光泽	生长较好
2,4-D 2.0mg/L+6-BA 1.0mg/L	100.0	黄绿色有光泽	生长好
2,4-D3.0mg/L+6-BA1.0mg/L	32.0	绿色无光泽	生长差

## 2.2 丹参外植体叶愈伤组织中丹酚酸B含量的变化动态

图1显示,丹参叶愈伤组织中丹酚酸B的含量随培养时间的延长而逐渐减少。从愈伤组织诱导开始生长到20d时,愈伤组织中丹酚酸B含量最高。随着培养时间的延长,丹酚酸B的含量呈明显的下降趋势。愈伤组织生长20d是收获的最佳时期。

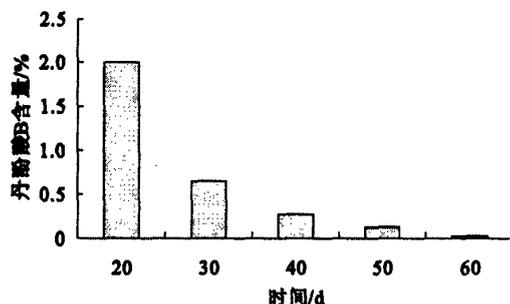


图1 愈伤组织中丹酚酸B含量随时间的变化

Fig 1 Effect of time on the content of salvianolic acid B of callus

(下转第175页)

锦(镶边悬垂)

## 4 结论

我国当前的景观大道的建设方兴未艾,但这种以“政绩工程”和“形象工程”面向世人的“城市化妆运动<sup>[3]</sup>”却不尽如人意,也并没能“以人为本”,更谈不上生态理念的渗透,形成千城一面、万路一形,恰恰丧失了城市特色和道路应有的个性,这样也就很难形成城市的意象。所以在今后的具体实践中,积极

地把场地的精神和生态的理念运用到道路或更大区域的景观设计中去,走出一条能够引领城市良性发展的和谐的景观之路。

### 参考文献:

- [1] 刘滨谊,王敏. 城市道路景观规划设计的系统集成[J]. 新建筑, 2000, (2): 6-9.
- [2] 凯文·林奇著. (方益萍译). 城市意象[M]. 北京: 华夏出版社, 2001.
- [3] 俞孔坚,李迪华. 城市景观之路——与市长们交流[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2003.

(上接第 153 页)

## 3 结论与讨论

诱导丹参叶产生愈伤组织的适宜外源激素及其浓度配比为 2,4-D 2.0mg/L+6-BA 1.0mg/L; 从愈伤组织诱导开始生长到 20 d 时,愈伤组织中丹酚酸 B 含量最高,随着培养时间的延长,丹酚酸 B 的含量呈明显的下降趋势。

外源激素的种类和浓度均影响丹参叶愈伤组织的诱导率和生长。从诱导率及生长情况来看,外源激素在低浓度时,随着浓度的升高,诱导作用逐渐加强,高浓度时相反。单独使用浓度为 2 mg/L 的 2,4-D,对愈伤组织的诱导效果较好,愈伤组织长势好,呈颗粒状,疏松、浅绿色。而单独使用 NAA 和 6-BA 愈伤组织呈块状,坚硬、绿色或灰白色,长势较差。从出愈出时间看,单独使用 2,4-D 愈伤组织出愈时间早于单独使用 NAA 和 6-BA; 生长素与细胞分裂素配合使用的处理,愈伤组织的诱导率明显高于单个生长素的处理。2 mg/L 的 2,4-D 与 1 mg/L 的 6-BA 搭配,丹参叶愈伤组织的诱导率较高,生长情况也较好。

影响愈伤组织诱导的因素很多,如外植体的种类、生育状态、培养方法、培养条件等内外因素<sup>[9]</sup>。外源激素可促进细胞生长、分裂和分化。外源激素的平衡对诱导愈伤组织的形成非常重要,在培养基介质

中,外源激素的平衡是建立在组织内部和器官形成部位的调节剂的平衡。外源激素的种类、浓度和组合错综复杂,会影响植物内源激素的水平,是导致丹参愈伤组织诱导率和生长差异的主要原因。

### 参考文献:

- [1] 林红,程井辰. 植物激素对几种禾本科植物外植体的胚胎发生及形态发生途径的影响[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(2): 117~119.
- [2] Quinlan J D, weaver R J. Influence of benzyl adenine, leaf darkening, and ringing on movement of 14c-labeled of *Vitis vinifera* L[J]. Plant physiol, 1969, 44: 1247.
- [3] Mazari A, Camm E L. Effect of cytokinin P lastid development and photosynthetic polypeptides during organgenesis of *Pinus ponderosa* Dougl. Cytolodons cultured in vitro[J]. Tissue and organ culture, 1993, 33: 81.
- [4] Miyasaka H, Masao N, Toshihiko Y, Y et al. Production of crytotanshinone and terruginol by immobilized cells of *Salvia miltiorrhiza*[J]. Phytochemistry, 1986, 25(7), 1621-1624.
- [5] 黄炼炼,周吉燕,刘涛,等. 丹参细胞培养研究及水溶性有效成分[J]. 上海中医药大学学报. 1999, 13(4): 56~59.
- [6] 程显隆,王峰,冯玉飞,等. 丹参中丹酚酸 B 的高效液相色谱法含量测定[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(2): 149-151.
- [7] 黄桌烈,李明,谭绍满,等. 吲哚丁酸对桉树插条多酚氧化酶的影响及其与生根的关系[J]. 广西植物, 2003, 23(1): 78-82.
- [8] 黄学林,李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [9] Rubery P H, Northcote D H. Site of phenylalanine ammonia-lyase activity and synthesis of lignin during xylem differentiation[J]. Nature 1968, 219: 1230-1234.

(上接第 167 页)

### 参考文献:

- [1] 成俊卿. 木材学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1985.
- [2] 侯伦灯. 马尾松胶合板阻燃技术的研究[J]. 木材工业, 2000, 14(2): 6-12.
- [3] 刘燕吉. 木质材料阻燃处理[J]. 木材工业, 1997, 11(1): 41-42.
- [4] 李玉栋. 木质材料阻燃技术[J]. 森林工业文摘, 1998, (3): 1-8.
- [5] 李玉栋. 阻燃材料应具备的产品性能[J]. 木材工业, 1999, 13(1): 26-28.
- [6] 刘燕吉. 木质材料系列阻燃技术的研究[J]. 木材工业, 1995, 9(6): 12-16.

- [7] 黄晓东. 南方几种常见树种燃烧热释放率研究[J]. 福建林学院学报, 2000, 20(2): 136-139.
- [8] 肖忠平. 阻燃木材的燃烧热释放率研究[J]. 福建林学院学报, 2002, 22(4): 325-328.
- [9] 黄晓东. 樟树、米槠、木荷板材燃烧热释放率研究[J]. 木材工业, 2001, 28(1): 17-19.
- [10] 黄晓东. 福建市场常见装饰板材燃烧热释放率研究[J]. 西北林学院学报. 2002, 17(2): 79-82.
- [11] 林巧佳,黄晓东. 发泡剂对膨胀型聚氨酯防火涂料阻燃性能影响[J]. 木材工业, 2005, 19(1): 16-18.
- [12] 黄晓东,林巧佳. 聚氨酯防火涂料阻燃性能的研究[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(2): 179-182.