

地研究了柴胡种子的萌发特点。通过研究,第一次明确地指出了不同柴胡种质对发芽温度的反应,及在最适发芽温度下种子的萌发性能,且均有显著性差异。因此,柴胡种子的休眠或萌发特性不能一概而论,而是与种质密切相关的。

3.2 ZC种子优异的萌发性能:本研究揭示了ZC种子具有优良的萌发性能,即萌发适应的温度范围宽,在高温(30℃)及低温(15℃)下均能较好萌发,而且具有萌发速度快、集中(置箱后8d开始大量萌发,第10天萌发种子超过50%)的特点,这非常有利于种子田间出苗,大大降低了苗期管理的难度(柴胡种子千粒质量1.1~1.5g,田间播种覆土不能超过1.5cm,长时间保证出苗期地表的潮湿有很大难度)。使用ZC种子基本解决了柴胡出苗难的问题。

3.3 柴胡种子萌发高温抑制低温(变温)解除特性:多年在北京、河北、山西、甘肃等地的柴胡播种出苗中观察到,6、7月份播种的SX、GS柴胡种子在7、8月基本不萌发,至8月底或9月上中旬时才大量萌发出苗,而ZC种子在夏季也基本上能全部萌发。本

实验揭示出的GS、SX柴胡种子在高温时萌发受抑制,但当低温满足时能大量萌发,而ZC种子在高温也基本能萌发的特点充分地解释了该现象。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2000.
- [2] Wang T P. Cultivation and management technology of *Bupleurum* L. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1993, 18 (4): 207.
- [3] Guo Z Y, Xia X J. Manual cultural technique of *Bupleurum chinense* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1993, 4 (4): 30.
- [4] Wei J H, Cheng H Z, Li K T, et al. Plant growth analysis of *Bupleurum chinense* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2003, 26 (8): 613.
- [5] Pan R L, Chen D H, Chen J M, et al. Determination of saikosaponin a and d in *Radix bupleuri* by RP-HPLC [J]. *Centr South Pharm* (中南药学), 2004, 2 (4): 198.
- [6] Yoshie M, Tadao H, Yasuo O T A, et al. Studies on the germination of seeds of *Bupleurum falcatum* L. N. The germination inhibitors of *Bupleurum falcatum* seeds [J]. *Proc Crop Sci Japan*, 1978, 47 (1): 25.
- [7] Wang X L, Wang W, Wang X Q, et al. Study on the biological nature of bamboo leaf therowax [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 1997, 19 (2): 54.
- [8] Chen Y. *Practical Technical Manual of Chinese Medicinal Materials Seed* (实用中药种子技术手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999.

丹参不定根组织培养的研究(I)

培养基种类、盐强度和有机组分对丹参不定根培养的影响

郭肖红, 高文远*, 李克峰

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要:目的 研究培养基种类、盐强度和有机物对丹参 *Salvia miltiorrhiza* 不定根生长及其丹参酮Ⅰ_A和原儿茶醛合成的影响。方法 利用组织培养技术结合HPLC手段,考察培养基种类、盐强度和有机物对丹参不定根生长和丹参酮Ⅰ_A、原儿茶醛量的影响。结果 通过考察MS、LS、B₅、White和SH培养基对丹参不定根培养的影响,综合考虑不定根生长速率和有效成分的量,确定MS为基本培养基。改变培养基盐强度发现,高盐强度利于不定根生长,低盐强度促进丹参酮Ⅰ_A和原儿茶醛合成。MS培养基5种有机物之间的相互作用对丹参不定根生长起很大作用;甘氨酸有利于丹参酮Ⅰ_A的合成;仅缺少肌醇、甘氨酸、VB₁、VB₆其中一种时,原儿茶醛合成均受阻。结论 确定了丹参不定根悬浮培养的基本培养基为MS,培养基盐强度和有机物处理对丹参不定根生长和次生代谢物合成有显著影响。

关键词:丹参;培养基种类;盐强度;丹参酮Ⅰ_A;原儿茶醛

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)03-0429-04

Adventitious root culture of *Salvia miltiorrhiza* (I)—Effects of various media, salts intensity, and organic components on adventitious root culture of *Salvia miltiorrhiza*

GUO Xiao-hong, GAO Wen-yuan, LI Ke-feng

(College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Objective To study the effects of various media, salt intensity, and organic components on

收稿日期:2006-05-20

基金项目:国家863项目(2003AA2Z2040);国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(04-05ZP10)

*通讯作者 高文远 Tel:(022)87401895 E-mail: pharimgao@tju.edu.cn

the growth of *Salvia miltiorrhiza* adventitious roots and the synthesis of tanshinone I_A and protocatechuic aldehyde. **Methods** The adventitious roots were obtained through tissue culture by manipulation of various media, salt intensity, and organic components and the contents of tanshinone I_A and protocatechuic aldehyde were determined by HPLC. **Results** The effect of media MS, LS, B₅, White, and SH on adventitious roots of *S. miltiorrhiza* was observed. Adventitious roots grew better under high salt intensity while secondary metabolite biosynthesis was accelerated under low salt intensity in MS basal medium. The reciprocity of five organic components had significant effect on root growth; glycine favored the synthesis of tanshinone I_A ; scarcity of one of inositol, glycine, VB₁, and VB₆ inhibited the synthesis of protocatechuic aldehyde. **Conclusion** MS Basal medium is used for adventitious root culture. The results show that salt intensity and organic components have significant effects on adventitious root culture of *S. miltiorrhiza* and secondary metabolite synthesis.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; media; salt intensity; tanshinone I_A ; protocatechuic aldehyde

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 以根和根茎入药, 主要含脂溶性二萜类化合物和水溶性酚酸类化合物, 是治疗心血管疾病的重要中药。国内外学者先后开展了丹参的组织培养研究, 对丹参细胞和毛状根培养次生代谢产物的研究有一些报道^[1~3], 但是关于不定根培养和合成次生代谢产物的报道比较少^[4]。本实验主要研究培养基种类、盐强度和有机物处理对丹参不定根培养的影响。

1 材料与方法

1.1 材料: 供试材料为在附加 IBA 2 mg/L 和 KT 0.2 mg/L 的基本 MS 液体培养基中培养继代多次的丹参不定根。

1.2 方法

1.2.1 培养基种类对丹参不定根培养的影响: 将丹参不定根 (约 1 g 鲜质量) 接种到 MS、B₅、SH、White、LS 5 种培养基中培养 20 d, 培养基附加 2 mg/L IBA 和 0.2 mg/L KT。培养基灭菌前 pH 均为 6.0, 摇床转速为 110 r/min, 每个处理 3~4 瓶。

1.2.2 培养基盐强度对丹参不定根培养的影响: 将约 1.25 g (鲜质量) 丹参不定根接种到 1/2MS (除蔗糖外其余元素质量浓度减半, 其余类同)、3/4MS、MS、3/2MS、2MS 培养基中培养 20 d, 培养基附加 2 mg/L IBA 和 0.2 mg/L KT, 蔗糖质量浓度 30 g/L, 培养基 pH 和摇床转速如上, 每个处理 3~4 瓶。

1.2.3 有机物组分对丹参不定根培养的影响: 丹参不定根接种到 250 mL 三角瓶中培养 20 d, 三角瓶内含有 50 mL 添加 2 mg/L IBA 和 0.2 mg/L KT, 3% 蔗糖的 MS 培养基, 同时有机物组分按照表 1 处理, 培养基 pH 和摇床转速如上, 每个处理 3~4 瓶。

1.2.4 有效成分提取和测定方法: 培养 20 d 后, 分别称取每瓶不定根鲜质量, 并于 105 ℃ 恒温下烘 30 min, 然后于 60 ℃ 恒温烘干 7~8 h 至恒重, 称取不

定根干质量, 并计算其增长率, 计算公式为: 干质量增长率 = (生长量 - 接种量) / 接种量。每个处理的不定根合并后用甲醇超声提取分离测定丹参酮 I_A 量, 水提醇沉法提取分离测定原儿茶醛的量。两者的分析均采用 HPLC 法, 参照前期研究^[5]进行测定, 分析体系分别为甲醇-水 (8:2) 和甲醇-0.5% HAC (15:85) 进行等速洗脱, 体积流量为 1 mL/min。丹参酮 I_A 和原儿茶醛的对照品由中国药品生物制品检定所提供。

表 1 有机物组分处理

Table 1 Disposal of organic components

处理序号	肌醇	烟酸	甘氨酸	VB ₁	VB ₆
1	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+
4	+	+	-	+	+
5	+	+	+	-	+
6	+	+	+	+	-
7	+	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-
9	-	-	+	-	-
10	-	-	-	+	-
11	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-

“+”表示加入原培养基组分, “-”表示不加入

“+” means adding components to original media, “-” means not adding components to original media

2 结果

2.1 培养基种类对丹参不定根生长和次生代谢产物合成的影响: 5 种基本培养基对丹参不定根培养的影响如表 2。5 种培养基对丹参不定根生长的影响不同, 其中 MS 培养基中丹参不定根干质量增殖倍数最大, 达到 2.97 倍, LS 培养基中不定根干质量增殖倍数最小。而对于次生代谢物的量来说, MS 培养

基中丹参酮 I_A 的量最低,原儿茶醛的量相对较高,SH 培养基得到了较高的丹参酮 I_A 和原儿茶醛的量。综合考虑不定根生长速率和次生代谢物的量,选用 MS 为基本培养基。

表 2 培养基种类对丹参不定根培养的影响

Table 2 Effects of various media on adventitious root culture of *S. miltiorrhiza*

培养基种类	干质量/mg	增长率/倍	丹参酮 I _A /($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	原儿茶醛/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
MS	245.20±1.98	2.97±0.11	10.14	179.85
B ₅	167.77±3.21	1.78±0.16	47.57	99.57
SH	151.05±1.17	1.52±0.08	47.49	229.95
White	141.53±5.42	1.29±0.13	34.42	87.92
LS	116.00±2.73	1.00±0.06	31.12	61.94

表 3 盐强度对丹参不定根培养的影响

Table 3 Effects of salt intensity on adventitious root culture of *S. miltiorrhiza*

盐强度	鲜质量/g	干质量/mg	增长率/倍	丹参酮 I _A /($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	原儿茶醛/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1/2MS	3.04±0.31	245.43±22.69	2.24±0.23	82.03	611.51
3/4MS	3.30±0.22	257.40±26.52	2.45±0.09	63.45	471.40
MS	4.16±0.09	313.40±18.01	3.24±0.15	12.58	150.31
3/2MS	5.39±0.98	506.53±38.18	4.70±0.26	9.35	47.25
2MS	4.97±0.36	331.37±17.96	3.56±0.24	72.10	242.37

2.3 有机物成分对丹参不定根生长和次生代谢产物合成的影响:有机成分对丹参不定根培养的影响如表 4。5 种有机物之间的相互作用对于不定根生长起很大作用。与对照组即处理 1 相比,培养基缺少肌醇、烟酸、VB₁ 或 VB₆ 中任何一种,不会抑制反而促进不定根生长,其中以只缺少 VB₆ 效果最好,不定根干质量增长率为对照的 1.46 倍;相反,只缺少甘氨酸时不定根生长率略低于对照组。培养基中完全不加有机物(处理 12),不定根生长严重受阻,其生长率仅为对照的 0.39 倍。培养基中只加入一种有机物时不定根生

2.2 培养基盐强度对丹参不定根生长和次生代谢产物合成的影响:培养基盐强度对丹参不定根生长及其有效成分丹参酮 I_A 和原儿茶醛的量的影响如表 3。随着盐强度的增加丹参不定根生长速率增加,但是更高的盐强度(2MS)抑制不定根生长,其中 3/2 MS 时干质量增值倍数达到最大值,为 4.7 倍。低盐强度对丹参酮 I_A 和原儿茶醛生成均有促进作用,1/2MS 时丹参酮 I_A 和原儿茶醛量达到最大值,分别为 82.03 和 611.51 $\mu\text{g/g}$,是基本培养基的 6.5 倍和 4.1 倍。随着盐强度增加有效成分积聚减少,但更高的盐强度(2MS)时丹参酮 I_A 和原儿茶醛量又上升。

长率均低于对照组,但高于完全不加有机物组。培养基中仅缺少甘氨酸(处理 4)时,丹参酮 I_A 合成严重受阻;只添加甘氨酸得到最高的丹参酮 I_A 干质量(91.83 $\mu\text{g/g}$),是对照组(27.58 $\mu\text{g/g}$)的 3.31 倍,说明甘氨酸能促进丹参酮 I_A 的合成。至于原儿茶醛的合成,只缺少烟酸时产率增加到 261.80 $\mu\text{g/g}$,为对照(105.80 $\mu\text{g/g}$)的 2.47 倍;只添加烟酸,原儿茶醛量略低于完全不加有机物;培养基中仅缺少肌醇、甘氨酸、VB₁、VB₆ 其中一种时,原儿茶醛合成均受阻,以缺少肌醇时产率下降最为显著。

表 4 有机物成分对丹参不定根培养的影响

Table 4 Effects of organic components on adventitious root culture of *S. miltiorrhiza*

处理序号	鲜质量/g	干质量/mg	增长率/倍	丹参酮 I _A /($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	原儿茶醛/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	4.80±0.47	324.50±12.14	4.54±0.46	27.58	105.80
2	4.73±0.15	330.80±6.05	4.56±0.19	57.36	12.32
3	5.33±0.26	363.40±11.51	4.99±0.51	58.02	261.80
4	4.38±0.19	312.23±11.27	4.09±0.44	5.32	55.46
5	5.12±0.52	353.10±7.36	4.95±0.23	59.11	80.67
6	6.60±0.07	454.45±4.31	6.62±0.13	48.04	59.12
7	3.93±0.24	285.77±3.89	3.85±0.11	80.42	60.19
8	4.22±0.34	295.70±9.85	3.90±0.28	91.83	62.56
9	2.46±0.29	189.97±2.69	2.14±0.17	90.37	51.79
10	2.57±0.22	182.80±4.14	2.11±0.09	86.57	74.24
11	2.97±0.21	214.65±10.01	2.72±0.15	45.87	84.80
12	2.16±0.19	160.12±1.20	1.75±0.19	32.09	66.57

3 讨论

植物组织培养中常用的培养基主要区别在于无机盐的种类和量。MS培养基无机盐量较高,微量元素种类较全,质量浓度也较高,尤其是氮源质量浓度较高,可以满足植物细胞的营养要求,广泛应用于植物细胞、组织和原生质体培养,效果良好。LS培养基是在MS培养基基础上演变而来的。B₅培养基主要特点是铵的质量浓度较低,适用于双子叶植物特别是木本植物的组织培养、细胞培养。SH培养基是矿质盐质量浓度较高的培养基,其中铵和磷酸由NH₄H₂PO₄提供。White培养基无机盐较低,适用于生根培养基^[6]。本实验选用上述5种培养基悬浮培养丹参不定根,结果表明MS培养基最利于丹参不定根生长,SH培养基最利于次生代谢物合成,可能是该培养基高质量浓度的矿质盐更能满足次生代谢物合成。

不同的盐强度改变培养物的离子强度和渗透压。研究发现,渗透压改变导致细胞容积改变,从而激活细胞膜上的离子通道,进而影响细胞增殖^[7]。本实验通过改变培养基中无机盐强度调节培养基的渗透压,以考察渗透压对丹参不定根生长和有效成分量的影响,结果表明3/2MS培养基最适于不定根生长,而低盐强度促进次生代谢物合成。

植物体在自然条件下,有机物成分是依靠自身的代谢加以调节的,而培养的离体组织、细胞以及原生质体虽能合成必需的维生素,但是数量上远远不足。为了能使组织很好地生长,在培养基中必需补加一种或几种维生素或氨基酸。一般认为VB₁是一种必需的成分^[8]。本研究表明,不添加甘氨酸时,不定根生长率低于对照组,说明甘氨酸在促进不定根生

长中起一定作用,但未能明显看出VB₁的必需作用。通过HPLC法测定丹参酮I_A和原儿茶醛,发现甘氨酸能促进丹参酮I_A的合成,培养基中缺少烟酸明显促进原儿茶醛的合成,缺少肌醇显著抑制原儿茶醛合成。

植物组织培养中,除了注意选择合适的有机物类型外,有机物质量浓度也是值得注意的问题。笔者将在以后的研究中重点探讨不同有机物质量浓度对丹参不定根生长和有效成分量的影响,从而筛选最佳的有机物类型及其质量浓度。

References:

- [1] Chen H, Chen F, Chiu F C, et al. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Enzyme Microb Tech* 2001, 28 (1): 100-105.
- [2] Chen H, Chen F. Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture [J]. *Process Biochem*, 2000, 35 (8): 837-840.
- [3] Yan Q, Shi M, Ng J, et al. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Plant Sci*, 2006, 170 (4): 853-858.
- [4] Koichiro H, Takashki K. Tanshinone production in adventitious roots and regenerates of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54 (6): 1583-1587.
- [5] Guo X H, Gao W Y, Chen H X, et al. Effects of metal ion on the accumulation of tanshinone I_A and protocatechuic aldehyde in adventitious culture of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30 (12): 885-888.
- [6] Guo Y, Cui T B, Xie X Z. *Plant Cell Culture Technology and Application* (植物细胞培养技术与应用) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [7] Yang Y M, Yuan Y J, Hu Z D. Research progress in inner production release of plant cells [J]. *Prog Biotechnol* (生物工程进展), 1998, 18 (1): 17-22.
- [8] Jiang L, Zhang W C, Ke Y. Effects of five organic elements on cell growth and formation of flavonol glycosides of ginkgo callus [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 1999, 7 (4): 373-376.

半夏工厂化育苗技术体系研究初探

张晓伟¹, 王小峰¹, 周昌华², 张兴翠^{1*}

(1. 西南大学农学与生命科学院, 重庆 400716; 2. 西南大学科技处, 重庆 400716)

摘要:目的 建立一套半夏工厂化育苗体系, 实现半夏的快速繁殖, 解决半夏生产因用种而造成的退化问题。方法 探讨了外植体诱导、植物生长调节物质质量浓度、光照条件及继代周期对丛生芽增殖的影响。结果 外植体的诱导以MS+6-BA (4~5) mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基为宜。组织培养中生长调节物质质量浓度为NAA 0.2 mg/L+6-BA 2 mg/L、转接时组织块带两个或两个以上芽时, 半夏生长状况最好。结论 采用工厂化育苗技术可进行半夏的快速繁殖, 为保护和持续利用这一重要药材资源提供有效途径。

收稿日期: 2006-05-10

基金项目: 重庆市科技计划项目 (8024)

作者简介: 张晓伟 (1980—), 男, 山西省晋城人, 西南大学硕士研究生, 研究方向为药用植物规范化生产。 Tel: 13996269054

E-mail: zxw2004203@163.com

* 通讯作者 张兴翠 Tel: 13637999712 E-mail: zch001@swau. cn