

凹叶厚朴愈伤组织诱导及其有效成分变化研究

马英姿¹, 许欢¹, 王志毅¹, 张凤宇¹, 刘江海¹, 王晓明²

1. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南长沙 410004

2. 湖南省林业科学院无性系重点实验室, 湖南长沙 410004

摘要: **目的** 研究凹叶厚朴愈伤组织的诱导, 并对其产生的有效成分厚朴酚与和厚朴酚总量进行检测, 以期获得生产药用成分的新途径, 补充药材资源的不足。**方法** 以不同母株种子幼苗的不同营养器官为外植体, 采用不同种类及不同质量浓度的植物调节剂诱导愈伤组织, 并在继代培养基中加入前体化合物 *L*-苯丙氨酸及 *D, L*, β -苯丙氨酸对愈伤组织进行诱导培养; HPLC 法检测不同培养途径获得的愈伤组织中厚朴酚与和厚朴酚量的总和。**结果** 筛选出最佳愈伤组织诱导培养基为: B₅+6-BA 2.0 mg/L+2, 4-D 1.5 mg/L; 不同母株种子幼苗诱导的愈伤组织总酚量存在显著差异, 质量分数变化范围为 0.004%~0.228%; 不同营养器官作为外植体诱导的愈伤组织总酚量存在差异, 以幼茎为外植体诱导的愈伤组织总酚量最高可达 0.25%; 继代培养基中添加前体化合物 *D, L*, β -苯丙氨酸, 能有效提高愈伤组织总酚量 8~10 倍。**结论** 凹叶厚朴愈伤组织中含有少量的厚朴酚和和厚朴酚, 不同的母株种子幼苗及不同幼苗器官诱导的愈伤组织总酚量都有差异, *D, L*, β -苯丙氨酸能有效促进愈伤组织中总酚的合成。

关键词: 凹叶厚朴; 愈伤组织; 前体化合物; 诱导; 厚朴酚; 和厚朴酚

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)04-0546-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.018

Callus induction and content variation of major active constituents of *Magnolia officinalis* subsp. *biloba*

MA Ying-zi¹, XU Huan¹, WANG Zhi-yi¹, ZHANG Feng-yu¹, LIU Jiang-hai¹, WANG Xiao-ming²

1. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

2. Key Laboratory of Clones, Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China

Abstract: Objective To study the callus induction and the content of active components magnolol and honokiol from *Magnolia officinalis* subsp. *biloba* and to find a new way to obtain medicinal ingredients in order to supplement the medicinal resources. **Methods** Different vegetative organs from different provenances were adopted as explants, and different kinds of plant regulators with different concentration were used to induce the callus. The precursor compounds, *L*-phenylalanine and *D, L*, β -phenylalanine, were added into the subculture medium to induce the synthesis of callus; HPLC method was used to detect the total phenolic content of magnolol and honokiol in callus obtained through different culturing ways. **Results** The optimal callus induction medium was: B₅+6-BA 2.0 mg/L+2, 4-D 1.5 mg/L; The total phenolic content of callus induced from different provenances had a significant difference in the range of 0.004%—0.228%; There was difference of total phenolic content in different vegetative organs as explants, the callus cultured from young stems had the highest magnolol and honokiol content of 0.25%; Adding the precursor compound *D, L*, β -phenylalanine into the subculture medium could effectively improve the total phenolic content of callus by 8—10 times. **Conclusion** There is little content of magnolol and honokiol in the callus of *M. officinalis* subsp. *biloba*, and the synthesis of total phenolic contents are significantly different in the callus from different provenances and different organs. *D, L*, β -phenylalanine could effectively improve the synthesis of total phenolic content in callus, and this research has the important significance for sustainable utilization of resources of *M. officinalis* subsp. *biloba*.

Key words: *Magnolia officinalis* subsp. *biloba* (Rehd. et Wils.) Law.; callus; precursor compound; induction; magnolol; honokiol

收稿日期: 2013-09-16

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费“金银花、凹叶厚朴新品种创制及利用技术研究”(201104023); 湖南省教育厅学位与研究生教育教学改革项目(JG2011B027); 湖南省教育厅重点项目(2012A0146)

作者简介: 马英姿(1967—), 女, 河南巩义人, 博士, 副教授, 主要从事药用植物资源保护与利用。

Tel: (0731)85623494 E-mail: ma_yingzi@163.com

网络出版时间: 2014-01-08 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.html>

凹叶厚朴 *Magnolia officinalis* subsp. *biloba* (Rehd. et Wils.) Law., 为厚朴的亚种, 已被列入国家三级珍稀濒危保护植物和国家二级野生中药材保护植物。主要分布在浙江南部、福建西部、湖南南部, 及贵州东部等地^[1]。药用部位为树皮, 有效成分为厚朴酚与和厚朴酚^[2], 其量的高低是鉴定药材质量优劣的依据^[3-5]。近年来由于市场需求量大, 野生资源被大量地砍伐, 已渐趋枯竭, 人工栽培已成为资源获取的主要途径^[6], 但由于凹叶厚朴生产周期长, 达18年以上才能利用, 短期内仍不能满足市场, 因此资源不足的问题急需解决。许多珍稀木本植物如红豆杉等都存在资源不足的现象, 国内外对这方面都有相似的研究, 主要是通过愈伤组织诱导, 获得细胞化生产手段, 提取所需有效药用成分, 以弥补资源的不足^[7-9]。凹叶厚朴中富含多酚类化合物, 其组织在诱导及培养过程中极易被氧化造成褐化现象^[10-13], 愈伤组织的诱导培养极为困难。本研究通过对凹叶厚朴幼苗的根、茎、叶等不同营养器官进行愈伤组织诱导, 并试图在愈伤组织继代培养基中添加相应的前体化合物, 以期提高愈伤组织中的有效成分量, 为开发凹叶厚朴药用成分细胞化生产途径奠定基础, 为实现资源的可持续性提供方法。

1 材料

样品采自湖南省永州市凹叶厚朴基地, 经湖南省林业科学院王晓明研究员鉴定为凹叶厚朴 *Magnolia officinalis* subsp. *biloba* (Rehd. et Wils.) Law. 的种子。经过灭菌后培养健壮无菌苗, 分别取其根、茎、叶片、下胚轴等作为外植体, 进行愈伤组织诱导。

厚朴酚与和厚朴酚的对照品购自北京世纪奥科生物技术有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$; 高效液相色谱分析仪 (仪器型号 LC-2010AHT, 日本岛津)。

2 方法

2.1 愈伤组织的诱导

2.1.1 愈伤组织诱导培养基筛选 通过单因素试验后, 选择基本培养基、6-BA、2, 4-D 进行3因素5水平正交设计, 每种处理30瓶, 每瓶3个外植体, 重复3次。28 d后观察记录相关指标。

2.1.2 不同器官的外植体对愈伤组织诱导的影响 截取无菌苗的茎段、叶片、下胚轴、根段, 分别接种在同种筛选的培养基上, 每种处理30瓶, 每瓶3个外植体, 重复3次。每5天观察1次, 记录出愈时间, 28 d统计愈伤组织诱导率和出愈量。

2.1.3 数据统计 根据公式, 对出愈时间和愈伤组织诱导率进行统计。

出愈时间 = 愈伤组织块直径达到0.2 cm 以上的天数

愈伤组织诱导率 = 形成愈伤组织的外植体数 / 接种外植体的总数

2.2 愈伤组织总酚量的测定

2.2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 进样量: 20 μL; 体积流量 1.5 mL/min; 柱温: 40 °C; 流动相: 甲醇-水 (80:20); DAD 二极管阵列紫外检测器, 检测波长 294 nm^[14]。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取厚朴酚与和厚朴酚对照品适量, 加甲醇分别制成质量浓度为厚朴酚 40 μg/mL、和厚朴酚 24 μg/mL 的溶液, 即得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取干燥愈伤组织粉末 100 mg, 置于棕色锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 称其质量并作记录, 采用超声法: 40 °C 水浴, 超声提取 90 min, 冷却擦干, 再称质量并作记录, 加甲醇补足损失的质量, 取上清液滤过, 即得供试品溶液。

2.2.4 标准曲线绘制 取厚朴酚对照品溶液, 配制不同质量浓度: 0.1、0.2、0.4、0.8、2.0、4.0、8.0 μg/mL, 同时进样 20 μL, 以进样浓度 (μg/mL) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制厚朴酚标准曲线, 得厚朴酚标准方程: $Y=32\ 187X-690.05$, $r=0.999\ 8$; 取和厚朴酚对照品溶液, 配制成和含厚朴酚 0.06、0.12、0.24、0.48、1.20、2.40、4.80 μg/mL 的溶液, 同时进样 20 μL, 同样方法绘制和厚朴酚标准曲线, 得和厚朴酚标准方程: $Y=32\ 458X-268.87$, $r=0.999\ 6$ 。

2.2.5 稳定性试验 取供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、24、48 h 进样 20 μL, 计算厚朴酚与和厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 1.33%、1.72%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.6 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液 20 μL, 连续重复进样 5 次, 测定厚朴酚与和厚朴酚峰面积值, 计算其标准差, 结果表明, 厚朴酚与和厚朴酚进样精密度良好, RSD 分别为 1.31%、1.74%。

2.2.7 重复性试验 按“2.2.3”项供试品制备方法进行, 取同一愈伤组织样品, 同时制备 5 份进行测定, 按厚朴酚与和厚朴酚色谱条件进样 20 μL, 计算厚朴酚与和厚朴酚的质量分数及 RSD, 结果 RSD 均为 1.87%, 说明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率 准确量取已知厚朴酚与和厚朴

酚量的愈伤组织样品溶液 500 μL ，加入对照品溶液 500 μL ，按照供试品制备及测定方法进行定量测定，测得厚朴酚与和厚朴酚的加样回收率分别为 99.45%、98.34%，RSD 分别为 1.56%、1.42%。

2.2.9 样品的测定 根据以上方法，测定愈伤组织中厚朴酚及和厚朴酚量，并计算总酚量。

总酚量 = 厚朴酚量 + 和厚朴酚量

2.2.10 不同株源及其不同外植体诱导的愈伤组织总酚量比较 选取 5 个不同母株种子来源的无菌苗，每个无菌苗分别截取根、茎、叶片、下胚轴 4 个不同的营养器官为外植体诱导愈伤组织，再分别测定不同的愈伤组织总酚量，每种处理重复 3 次。

2.2.11 前体化合物对愈伤组织总酚量的影响 选取 MS、B₅、WPM 3 种不同的基本培养基进行愈伤组织继代培养，每种基本培养基里分别添加 L-苯丙氨酸、D, L, β -苯丙氨酸两种前体化合物，不加前体化合物的为对照，进行愈伤组织继代培养，培养 28 d 后取愈伤组织进行定量测定，每种处理重复 3 次。

3 结果与分析

3.1 愈伤组织的诱导与培养

3.1.1 不同部位的外植体对愈伤组织诱导的影响 从图 1 可以看出，以叶片、下胚轴、根、茎段为外植体进行愈伤组织诱导时，下胚轴和茎段的诱导率最高，达 90% 以上，其次是叶片，诱导率可达 82%，根部诱导率最低，低于 40%；从出现愈伤的时间上看，下胚轴和茎段的出愈时间相差不大，下胚轴诱导的出愈时间略短些，在培养 5 d 后，下胚轴整体开始慢慢的膨大形成愈伤，且下胚轴诱导的愈伤组织生长量最大，根部的愈伤组织生长量最少，但幼茎比下胚轴的材料更易获取。因此，幼茎与下胚轴都可作为愈伤组织诱导的最佳外植体。

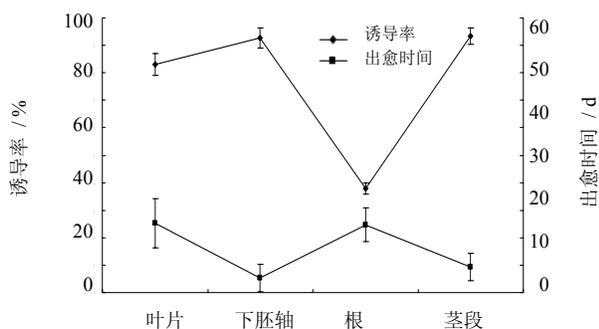


图 1 不同营养器官为外植体对愈伤组织诱导的影响

Fig. 1 Effects of different organs as explants on callus induction

3.1.2 最佳愈伤组织诱导培养基选择 以下胚轴为外植体，选择基本培养基 (A)、6-BA (B)、2, 4-D (C) 进行 3 因素 5 水平正交设计 (表 1)，结果表明，4 号处理为最佳愈伤组织诱导培养基，即：B₅+6-BA 2.0 mg/L+2, 4-D 1.5 mg/L，愈伤诱导率最高，可达 96.7%。极差分析可知，基本培养基、6-BA 浓度、2, 4-D 浓度对愈伤组织诱导率的影响顺序依次是基本培养基 > 6-BA 浓度 > 2, 4-D 浓度。方差分析表明，因素 A 对愈伤组织诱导率的影响不显著 ($P > 0.05$)；因素 B 和因素 C 对愈伤组织诱导的影响显著 ($P < 0.05$)，见表 2。

3.2 不同培养途径获得的愈伤组织总酚量的比较

3.2.1 不同株源诱导的愈伤组织总酚量的测定 随机选取 38 个不同母株种子诱导无菌幼苗，分别取其茎段诱导的愈伤组织样品进行测定，分别测定厚朴酚与和厚朴酚的量，然后计算总酚量，结果见图 2。38 个不同母株来源样品总酚量差异明显，厚朴酚量最低的为 2 号样品，为 0.004%，量最高的为 8 号样品，为 0.228%，两者差值达 0.224%，差异极显著；和厚朴酚量最低的为 3 号样品，为 0.002%，质量分数最高的为 6 号样品，为 0.065%，两者差异为 0.063%，可见，不同母株来源的厚朴酚量的差异更显著；总酚量最低的为 2 号样品，为 0.006%，最高的为 8 号样品，总酚量占 0.253%，其结果与厚朴酚的检测结果相似，说明愈伤组织中总酚的量高低主要决定于厚朴酚量的高低。

3.2.2 不同营养器官诱导的愈伤组织总酚量测定 选取 5 个不同母株种子萌发无菌苗，分别取其不同营养器官为外植体进行愈伤组织诱导，并检测愈伤组织中总酚量，结果见图 3。从图 3 中可以看出，由茎段诱导的愈伤组织中，总酚量普遍高于其他部位，质量分数在 0.08%~0.25%，其中 5 号样品总酚量最高，达 0.25%；由根诱导的愈伤组织总酚量在 0.01%~0.05%；由叶片诱导的愈伤组织，总酚量在 0.05%~0.12%；由下胚轴诱导的愈伤组织中总酚的量 0.02%~0.18%。通过比较分析，凹叶厚朴不同营养器官为外植体诱导愈伤组织时，其总酚量有显著差异，由茎段诱导的愈伤组织总酚量最高，是细胞化生产总酚的最佳外植体。

3.3 前体化合物对愈伤组织中总酚量的影响

采用相同母株的种子幼苗茎段诱导出愈伤组织后，分别采用 MS、B₅、WPM 3 种基本培养基继代培养，并在继代培养基中分别加入 2 种前体化合物，

表1 L₂₅(3⁵) 正交设计结果
Table 1 Results of L₂₅(3⁵) orthogonal design

处理	A	B / (mg·L ⁻¹)	C / (mg·L ⁻¹)	诱导率 / %	直径 / cm	出愈时间 / d
1	B ₅	0.5	0.1	62.1	0.3	11
2	B ₅	1.0	0.5	68.2	0.5	12
3	B ₅	1.5	1.0	86.3	0.4	14
4	B ₅	2.0	1.5	96.7	0.6	6
5	B ₅	3.0	2.0	90.4	0.2	11
6	MS	0.5	0.5	38.3	1.6	10
7	MS	1.0	1.0	72.6	1.5	14
8	MS	1.5	1.5	58.4	1.8	13
9	MS	2.0	2.0	60.9	1.1	13
10	MS	3.0	0.1	49.6	0.5	11
11	1/2MS	0.5	1.0	71.6	1.1	8
12	1/2MS	1.0	1.5	65.3	1.5	4
13	1/2MS	1.5	2.0	70.8	0.6	11
14	1/2MS	2.0	0.1	68.9	0.9	14
15	1/2MS	3.0	0.5	52.3	1.3	13
16	3/4MS	0.5	2.0	68.7	0.7	13
17	3/4MS	1.0	0.1	72.1	1.1	14
18	3/4MS	1.5	0.5	77.6	0.5	13
19	3/4MS	2.0	1.0	94.1	0.6	8
20	3/4MS	3.0	1.5	83.8	1.2	6
21	WPM	0.5	1.5	79.2	1.8	4
22	WPM	1.0	2.0	88.7	1.2	16
23	WPM	1.5	0.1	88.4	1.8	4
24	WPM	2.0	0.5	87.4	1.5	5
25	WPM	3.0	1.0	76.1	0.9	7
K ₁	403.7	319.9	341.1			
K ₂	279.8	366.9	323.8			
K ₃	313.1	381.5	394.4			
K ₄	305.8	408.0	383.4			
K ₅	318.2	352.2	379.5			
R	123.9	88.1	70.6			

表2 方差分析
Table 2 Analysis of variance

方差来源	偏度平方和	自由度	变异均方	F 值	P 值
A	2 808.044	4	702.011	12.825	0.287
B	864.052	4	216.013	3.946	0.029
C	817.900	4	204.475	3.736	0.034
误差	656.844	12	54.737		
总和	138 883.330	25			

检测其愈伤组织中总酚量。从图4可知,3种基本培养基中加入L-苯丙氨酸时,与对照相比,总酚量差异不显著,但加入D, L, β-苯丙氨酸后,3种基本培养基的愈伤组织中的总酚量都有显著提高;特别是以MS为基本培养基时,总酚量达到0.18%,增高了7.2倍;以B₅为基本培养基时,愈伤组织总酚量达到0.06%,提高了9.6倍;以WPM为基本培养基时,总酚量达到0.10%,提高了1.7倍。总之,3种基本培养基中加入D, L, β-苯丙氨酸后

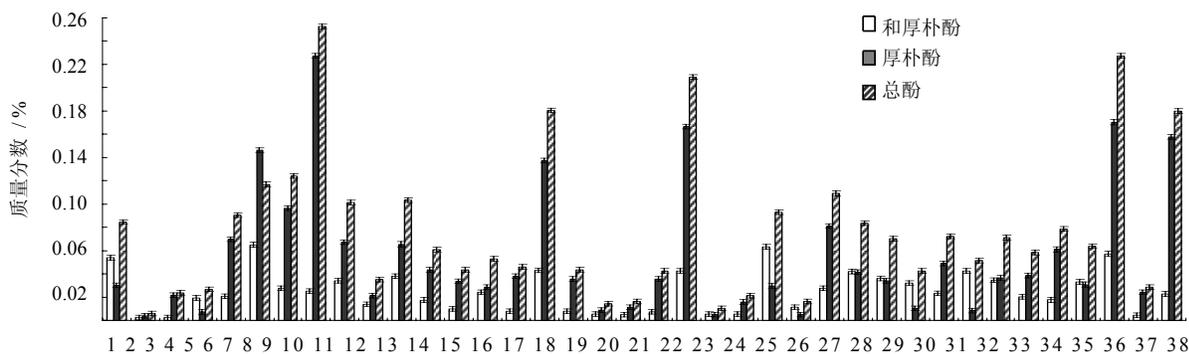


图 2 不同母株来源愈伤组织和厚朴酚、厚朴酚及总酚量的比较

Fig. 2 Comparison on contents of magnolol, honokiol, and total phenols in callus from different provenances

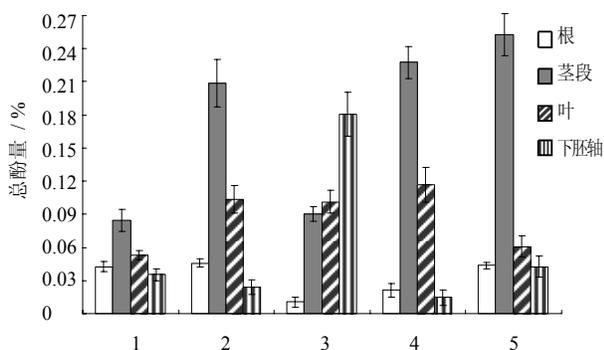
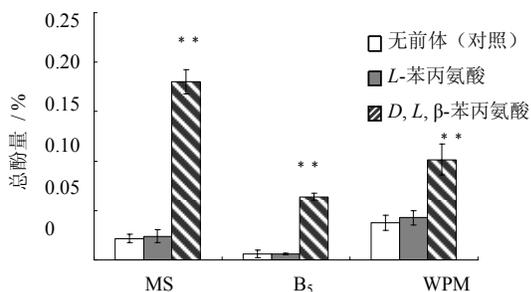


图 3 不同营养器官诱导的愈伤组织总酚量比较

Fig. 3 Comparison on total phenolic contents in callus induced from different organs



与对照组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group

图 4 2 种前体化合物对愈伤组织中总酚量的影响

Fig. 4 Effects of two precursor compounds on total phenolic contents in callus

培养产生的愈伤组织, 与对照相比, 总酚量差异极显著 ($P < 0.01$)。

4 讨论

植物愈伤组织的诱导及生长主要受外植体、培养基和培养环境三大因素的调控^[15-16], 生长调节剂

对愈伤组织的诱导及分化具有十分复杂而重要的影响。利用凹叶厚朴不同幼嫩的营养器官为外植体, 在适宜的培养条件下都可以诱导产生愈伤组织, 且愈伤组织中都含有少量的厚朴酚与和厚朴酚, 以茎为外植体诱导的愈伤组织中总酚量普遍偏高。不同母株来源种子诱导的愈伤组织中总酚量差异较大, 因此, 在进行细胞化生产前, 必须先筛选出优质的母株为种子来源。研究证明, 在愈伤组织继代培养时, 加入前体化合物 *D, L, β*-苯丙氨酸对愈伤组织中总酚的诱导合成有明显的促进作用, 可以提高总酚量 8~10 倍。目前, 《中国药典》对药材厚皮中的厚朴酚的量标准为 2%^[17], 本研究中检测到优质母株来源的愈伤组织中的总酚量可达到 0.25%, 今后如果在此基础上再添加前体化合物诱导, 进一步提高总酚的量, 将会使凹叶厚朴细胞化生产有效成分成为可能, 其结果将大大节约自然资源, 具有较好的社会效益和经济效益。

参考文献

- [1] 斯金平, 童再康. 厚朴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] 黄坤水. 闽产凹叶厚朴抑菌活性及资源利用研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2006.
- [3] 何关福, 马忠武. 凹叶厚朴树干有效成分研究 [J]. 植物学通报, 1991, 8(1): 48.
- [4] 王晓明, 杨硕知, 裴刚, 等. 凹叶厚朴树皮厚朴酚、和厚朴酚含量变化模型的研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(2): 1-5.
- [5] 冯华, 王祥培, 邹孔强, 等. HPLC 色谱法测定贵州黔北凹叶厚朴中厚朴酚的含量 [J]. 安徽农业科学 2010, 38(15): 7864-7865.
- [6] 李卫民, 牛志强, 王治平, 等. 超声强化超临界提取厚朴酚与和厚朴酚的工艺研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4):

- 680-683.
- [7] 翟雪霞, 杨靖, 李友勇. 红豆杉高产细胞系快速成建立和更新的方法 [J]. 生物技术通讯, 2009, 20(3): 376-379.
- [8] 陈超, 付春华, 姜革民, 等. 红豆杉细胞中的酚类化合物含量与紫杉醇产量之间的关系 [J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(1): 83-87.
- [9] 杜亚填, 许建宇, 卜晓英, 等. 红豆杉植物和愈伤组织培养物中紫杉醇含量的检测 [J]. 林产化工通讯, 2005, 39(1): 17-20.
- [10] 刘贤旺, 杜勤. 凹叶厚朴愈伤组织的超低温保存 [J]. 植物资源与环境, 1996, 5(1): 10-13.
- [11] 苏梦云, 姜景民. 乐东拟单性木兰茎段愈伤组织诱导与褐变控制的研究 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(6): 757-762.
- [12] 吴锦玉, 吴岩斌, 易骏, 等. 凹叶厚朴叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 2965-2968.
- [13] Wang Y W, Lv X H, Huang B, *et al.* Plant regeneration through somatic embryo in *Herpetospermum pedunculatum*, an Endangered Tibetan Medicinal Herb [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(3): 224-230.
- [14] 杨红兵, 詹亚华, 陈科力, 等. 湖北恩施产厚朴中厚朴酚与和厚朴酚的定量分析 [J]. 中国医药学杂志, 2007, 27(6): 767-768.
- [15] 杜雪玲, 张振霞, 刘萍, 等. 2, 4-D 和 6-BA 对多年生黑麦草愈伤组织诱导影响的研究 [J]. 草原与草坪, 2005, 17(3): 49-51.
- [16] 陈军营, 文付喜, 何盛莲, 等. ABA 和 AgNO₃ 对小麦幼胚愈伤组织诱导和分化的影响 [J]. 麦类作物学报, 2006, 26(2): 42-44.
- [17] 江苏新医药学院. 中药大辞典(下册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.