

丹参不定根离体培养的研究

陈巍¹, 郭肖红¹, 高文远^{1*}, 陈海霞¹, 黄璐琦², 肖培根³

(1. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所, 北京 100094)

[摘要] 目的:对丹参不定根的离体培养进行系统研究。方法:考察了蔗糖质量浓度、培养基 pH、接种、植物生长物质等影响因子对丹参不定根的生长及其次生代谢产物含量的影响。结果:随着蔗糖质量浓度的增加,丹参不定根增殖倍数呈增长趋势,丹参酮的含量呈递减趋势变化,原儿茶醛含量呈折线变化,其中以添加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖最高;培养基 pH 为 6.5, 5.5 (或 6.0), 5.8 时分别最有利于丹参不定根的生长、丹参酮 II_A 的合成和原儿茶醛的合成。当接种量为 2.5% 时,丹参不定根的增殖倍数显著增加;MS 培养基中附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 最有利于丹参酮 II_A 和原儿茶醛合成。结论:蔗糖质量浓度、培养基 pH、接种量、植物生长物质显著影响丹参不定根的生长和次生代谢产物的合成。

[关键词] 丹参;不定根;组织培养;次生代谢

[中图分类号] S 567 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2006)17-1409-04

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 是唇形科鼠尾草属多年生草本植物,以根和根茎入药。和传统的大田栽培相比,利用组织培养方法生产丹参中有用次生代谢产物具有不受时间、地点限制,可以提供均一产物等特点。本实验研究了影响丹参不定根生长和其次生代谢产物合成的一些因素,如蔗糖质量浓度、培养基 pH、接种量、植物生长物质的含量及系统性的探索,为利用丹参不定根进行次生代谢产物的合成奠定了理论和实践基础。

1 材料与仪器

1.1 材料 供试材料为在附加 IBA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, KT $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的基本 MS 液体培养基中继代多次的丹参 *S. miltiorrhiza* 不定根。丹参酮 II_A 对照品(批号 0766-200010)、原儿茶醛对照品(批号 110810-200205)均购自中国药品生物制品检定所。

1.2 仪器 LC-10ATVP 高效液相色谱仪(日本岛津公司, N2000 色谱工作站); METTLER TOLEDO Delta 320 pH 计(上海梅特勒-托利多仪器公司); HY-6 双层摇瓶机(金坛市医疗仪器设备厂)。

2 方法

2.1 理化因子对丹参不定根生长及其有效成分含量的影响 ①蔗糖质量浓度:将约 1.25 g (鲜重)丹参不定根接种到蔗糖质量浓度分别为 20, 30, 40, 50, $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基中,附加 IBA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, KT $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养基在灭菌前调 pH 到 6.0,每个处理 3~4 瓶,置于摇床(转速为 $110 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)上自然光照培养 20 d,培养室的温度为 $(26 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ 。考察不同蔗糖质量浓度对丹参不定根和有效成分合成的影响。②培养基 pH:将约 1.25 g (鲜重)丹参不定根接种到 MS 培养基中,附加 IBA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, KT $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 灭菌前培养基 pH 分别调到 5.0, 5.5, 5.8, 6.0 和 6.5,每个处理 3~4 瓶,培养条件同①。③接种量:将继代多次的丹参不定根接种到 MS 培养基中,附加 IBA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, KT $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种量分别为 2%, 2.5%, 3%, 4% 和 5%。培养基在灭菌前调 pH 到 6.0,培养条件同①。④植物生长物质:将约 1.25 g (鲜重)丹参不定根接种到 MS 培养基中,分别考察 IBA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与不同质量浓度的 KT ($0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 以及 KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与不同质量浓度的 IBA ($0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对丹参不定根的生长有效成分合成的影响,培养基在灭菌前调 pH 到 6.0,培养条件同①。

2.2 不定根生物量的测定 将培养得到的丹参不

[收稿日期] 2005-10-10

[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: pharmgao@tju.edu.cn

定根取出,用滤纸吸去表面的培养基,置于天平进行称重即为鲜重。将称过鲜重的不定根置于烘箱中,首先在105℃下烘30 min,使其酶系灭活;再在60℃下烘3~4 h,使其干燥至恒重,称其干重,并计算其增长率:干重增长率=(收获时的质量-接种量)/接种量。含水量=(收获时的鲜重-干重)/收获时的鲜重。

2.3 丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛含量测定方法 丹参酮Ⅱ_A的含量测定:称取0.3 g左右干燥的丹参不定根,打碎后,置于100 mL具塞三角瓶中,加入50 mL甲醇,超声提取30 min后,将其甲醇提取液进行过滤,然后浓缩至干,残留物用甲醇溶解,转移至2 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,用0.22 μm微孔滤膜过滤,得供试品溶液。色谱条件:色谱柱 Agilent Zorbax C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 甲醇-水(4:1);流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 270 nm;柱温 30℃。

原儿茶醛含量测定:称取丹参不定根0.3 g,置于150 mL圆底烧瓶中,加入50 mL去离子水,加热

回流2.5 h,离心后过滤,取滤液,加入无水乙醇至醇体积为50%,静置48 h后,过滤,将滤液旋干。残留物用甲醇溶解,转移至2 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,用0.22 μm微孔滤膜过滤,得样品供试品溶液。色谱条件:色谱柱 Agilent Zorbax C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 甲醇-0.5% HAC(15:85);流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 280 nm;柱温 25℃。

3 结果与分析

3.1 蔗糖质量浓度对丹参不定根生长及丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛含量的影响 从表1中可以看出,随着蔗糖质量浓度的增加,丹参不定根增殖倍数呈增长趋势。在20 g·L⁻¹时,丹参不定根增殖倍数为3.05;在60 g·L⁻¹时达到8.0,是前者的2.58倍。蔗糖质量浓度为20~60 g·L⁻¹时,随着蔗糖质量浓度的升高,丹参不定根中丹参酮Ⅱ_A的含量呈递减趋势变化,其中20 g·L⁻¹时丹参酮Ⅱ_A的含量最高,而原儿茶醛的含量则呈曲线变化,当蔗糖为30 g·L⁻¹时,原儿茶醛的质量分数最高,为0.22 mg·g⁻¹。

表1 蔗糖质量浓度对丹参不定根培养及其有效成分含量的影响(n=5)

蔗糖 /g·L ⁻¹	接种量 /mg	干重 /mg	鲜重 /mg	含水量 /%	增值倍数	丹参酮Ⅱ _A /mg·g ⁻¹	原儿茶醛 /mg·g ⁻¹
20	64.7±3.81	262.6±18.6	4.33±0.29	93.9±0.96	3.05±0.07	0.012	0.18
30	58.9±2.59	325.9±4.97	5.03±0.32	93.5±0.35	4.53±0.02	0.006	0.22
40	61.9±3.32	376.9±14.7	5.10±0.23	92.6±0.21	5.09±0.07	0.002	0.15
50	59.9±0.96	482.8±29.7	6.04±0.60	92.0±0.23	7.06±0.14	0.002	0.15
60	58.3±3.86	526.8±46.6	6.14±0.31	91.1±0.25	8.04±0.10	0.001	0.13

3.2 pH值对丹参不定根生长及丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛含量的影响 由表2可知,当pH较低时(5.0),无论是丹参不定根中的丹参酮Ⅱ_A还是不定根的生长都受到了抑制,这时,丹参不定根的增殖倍数最小,为3.3;当培养基中的pH为6.5时,丹参不定根的生长情况最好,在培养20 d后,丹参不定根的增殖倍数为

5.1。当pH为5.5和6.0时,丹参不定根中丹参酮Ⅱ_A的质量分数最高,为0.033 mg·g⁻¹。当培养基中的pH为5.8时,其原儿茶醛的质量分数最高,为0.22 mg·g⁻¹。当pH为6.5时,丹参不定根生长情况最好,但是其丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛的质量分数较低,仅为0.003 mg·g⁻¹和0.10 mg·g⁻¹。

表2 培养基pH对丹参不定根生长及其有效成分含量的影响(n=5)

培养基pH	接种量 /mg	干重 /mg	鲜重 /mg	含水量 /%	增值倍数	丹参酮Ⅱ _A /mg·g ⁻¹	原儿茶醛 /mg·g ⁻¹
5.0	73.8±0.69	315.2±6.77	4.79±0.15	93.4±0.11	3.27±0.03	0.015	0.16
5.5	74.8±1.72	337.4±17.7	4.92±0.20	93.0±0.12	3.51±0.03	0.033	0.2
5.8	74.9±0.77	414.8±21.8	6.69±0.43	93.8±0.07	4.54±0.04	0.006	0.22
6.0	74.7±2.29	377.0±7.5	5.70±0.14	93.4±0.04	4.05±0.06	0.033	0.12
6.5	72.6±3.18	452.6±22.6	7.38±0.14	93.9±0.3	5.23±0.11	0.003	0.10

3.3 接种量对丹参不定根生长的影响 实验结果表明在接种量为2%时,丹参不定根培养物的质量由接种时的60.9 mg(干重),增加到151.5 mg(干

重),增加了1.5倍;当接种量为2.5%,丹参不定根增殖倍数达到了最大值,为4.5,不定根的质量由74.2 mg(干重)增加到了370.6 mg(干重);在

2.5%~5%,随着接种量的增加,丹参不定根增殖倍数不断减少,在接种量为5%时,其增殖倍数仅为1.5%。

3.4 植物生长物质对丹参不定根生长及丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛含量的影响 由表3中可以看出,当IBA保持不变($2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,KT质量浓度的变化对丹参不定根的生长有很大的影响。IBA作为唯一植物生长物质时,丹参不定根的增殖倍数最多,为4.2倍;添加 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT时,增殖的倍数最少,为2.5倍。对于丹参酮Ⅱ_A的积累来说,在KT为 $0 \sim 1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,丹参酮Ⅱ_A的质量分数随着KT质量浓度的增加而不断上升,由 $0.004\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 增加

到 $0.19\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,增加了50倍左右。KT质量浓度继续上升,丹参酮Ⅱ_A的质量分数反而下降。KT质量浓度的变化对原儿茶醛质量分数的影响不如丹参酮Ⅱ_A的显著,当KT为 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,原儿茶醛的质量分数达到最大值,为 $0.20\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

由表4中可以看出,在KT保持不变($0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,随着IBA质量浓度的增加,丹参不定根增殖倍数呈增加趋势。IBA质量浓度对其不定根中丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛含量的影响比较明显。不添加IBA时,不定根中的丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛的质量分数均达到最大值,分别为 $0.064\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.32\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

4 讨论

表3 KT质量浓度对丹参不定根生长及有效成分含量的影响($n=5$)

植物生长调节物质配比/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种量/ mg	干重/ mg	鲜重/ mg	含水量/%	丹参酮Ⅱ _A / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	原儿茶醛/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
IBA 2	61.4 ± 1.00	317.7 ± 6.9	4.32 ± 0.31	92.6 ± 0.11	0.004	0.11
IBA 2 + KT 0.5	61.2 ± 2.27	215.5 ± 3.37	2.87 ± 0.02	92.5 ± 0.18	0.042	0.20
IBA 2 + KT 1	58.4 ± 1.67	250.1 ± 2.21	3.42 ± 0.05	92.7 ± 0.06	0.19	0.09
IBA 2 + KT 1.5	58.4 ± 0.72	270.3 ± 14.6	4.01 ± 0.38	93.2 ± 0.28	0.007	0.08
IBA 2 + KT 2	61.1 ± 2.22	277.3 ± 15.6	3.99 ± 0.42	93.0 ± 0.63	0.007	0.12

表4 IBA含量对不定根生长及有效成分含量的影响($n=5$)

植物生长调节物质配比/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种量/ mg	干重/ mg	鲜重/ mg	含水量/%	丹参酮Ⅱ _A / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	原儿茶醛/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
KT 0.5	61.7 ± 2.15	126.0 ± 13.3	1.80 ± 0.14	93.0 ± 0.16	0.064	0.32
IBA 1 + KT 0.5	60.1 ± 0.92	199.5 ± 16.9	3.3 ± 0.47	93.6 ± 0.27	0.012	0.11
IBA 2 + KT 0.5	61.2 ± 2.27	215.5 ± 3.37	2.78 ± 0.02	92.5 ± 0.18	0.042	0.20
IBA 3 + KT 0.5	59.9 ± 1.66	262.9 ± 20.6	4.12 ± 0.23	93.6 ± 0.36	0.005	0.11
IBA 4 + KT 0.5	60.7 ± 0.89	305.5 ± 21.4	4.86 ± 0.36	93.7 ± 0.06	0.008	0.12

培养基初始蔗糖含量影响植物组织或细胞的生长速率、次生代谢产物合成等,在人参悬浮细胞培养生产人参皂苷中,相对较高的蔗糖质量浓度($60\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)有利于皂苷的合成^[1]。本实验表明,相对较高的蔗糖质量浓度($60\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)有利于对丹参不定根生长,而较低质量浓度的蔗糖有利于次生代谢产物的合成。丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛含量分别在添加 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖时达到最大值。综合考虑不定根的生长和有效成分的含量,选择蔗糖质量浓度为 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 较为合适。

培养基pH通过影响植物对离子的吸收从而影响着植物对营养的吸收,进而影响植物器官的生长和次生代谢产物的合成^[2]。本实验表明当pH过低时,无论是丹参不定根的生长还是其次生代谢都受到了抑制。可能是过低的pH抑制了丹参不定根对阳离子的吸收,从而使丹参不定根吸收营养成分不平衡,进而影响其生长和有效成分的合成^[3]。实验还表明

当丹参不定根生长较旺盛时(pH为5.8和6.5时),其丹参酮Ⅱ_A的含量较低。这可能和丹参生长与丹参酮Ⅱ_A的积累不成平行关系,属相斥形有关^[4]。

接种量决定于植物组织培养开始生长所需要时间,以及其后的生长情况^[5]。本实验研究表明当丹参不定根接种量较少时(2%),不定根生长的滞后期较长,而且在1个培养周期中其增殖的倍数也相对较少;当接种量过多时(4%~5%),培养基中营养成分不足,丹参不定根生长缓慢,增殖倍数也相对较低;当接种量适宜时(2.5%),丹参不定根的增殖倍数最多,为4.5%。紫草的培养中也得到了类似的结果^[6]。

Kochiro报道^[7],在B₅培养基中添加 $0.1 \sim 1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA抑制了丹参不定根的生长,却促进了丹参酮的合成。本实验表明当IBA保持不变时,随着KT质量浓度的增加,丹参酮Ⅱ_A的含量变化明

显,这和王康才^[8]等对丹参愈伤组织中KT含量对丹参酮Ⅱ_A含量影响的实验结果一致。当KT保持不变时,随着IBA质量浓度的变化,丹参不定根中次生代谢产物的变化没有什么规律。这可能是由于不同配比激素对丹参不定根中内源性ABA, IAA, GA₃和iPA₃的合成产生了影响所致^[9],将在以后的实验中对其机理进行进一步的探讨。

[参考文献]

- [1] C O Akalezi, Liu S, Li Q S, et al. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng* [J]. *Process Biochem*, 1999, 34:639.
- [2] Marschner H, Mineral nutrition of high plants [M]. London: Harcourt Brace & Company Publishers, 1995: 11.
- [3] 元英进. 植物细胞培养工程 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 132.
- [4] 宋经元, 祁建军, 任春玲, 等. 丹参冠瘿组织的培养和总丹参酮的积累动态 [J]. *药学学报*, 2000, 35(12): 939.
- [5] 周立刚, 郑光植. 影响植物发酵培养的诸因素 [J]. *国外医学·植物分册*, 1991, 6(3): 111.
- [6] Barton S, Bullock C, Weir D. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 18: 190.
- [7] Koichiro Shimomura, Takashi Kitazawa. Tanshinone production in adventitious roots and regenerated of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54(6): 1583.
- [8] 王康才, 罗庆云, 陈红霞. 丹参愈伤组织中次生代谢产物形成的研究 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(10): 592.
- [9] 李国婧, 王树才, 夏凯. 酵母激发子与水杨酸对Ti转化的丹参组培物内源激素含量的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2001, 24(1): 13.

Studies on *in vitro* culture of adventitious root in *Salvia miltiorrhiza*

CHEN Wei¹, GUO Xiao-hong¹, GAO Wen-yuan¹, CHEN Hai-xia¹, HUANG Lu-qi², XIAO Pei-gen³

(1. The College of Pharmaceuticals Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

[Abstract] **Objective:** To study the culture of adventitious root of *Salvia miltiorrhiza* *in vitro* systemically. **Method:** Effects of sucrose concentrations, medium pH, inoculum size and plant growth regulators on adventitious root growth and secondary metabolites production in *S. miltiorrhiza* were investigated. **Result:** With the increase of initial sucrose concentration, adventitious root growth rates increased and tanshinone II_A content decreased, while content of protocatechuic aldehyde showed a broken line change and its highest production was obtained under 30 g · L⁻¹ sucrose in the medium. As for the effect of medium pH, medium pH of 6.5, 5.5 (or 6.0) and 5.8 was favorable for adventitious root growth, tanshinone II_A and protocatechuic aldehyde synthesis respectively. Furthermore, adventitious root growth, rate was greatly increased when inoculum size was 2.5%. MS medium added with 0.5 mg · L⁻¹ KT was much favorable for tanshinone II_A and protocatechuic aldehyde accumulation. **Conclusion:** Parameters including sucrose concentrations, medium pH, inoculum size and plant growth regulators have distinct effects on the *in vitro* culture of adventitious root growth and secondary metabolites synthesis of *S. miltiorrhiza*.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza*; adventitious root; *in vitro* culture

[责任编辑 张宁宁]

欢迎投稿

欢迎刊登广告