·中药农业·

不同激素对冬凌草花瓣愈伤组织的诱导及其次生代谢产物的影响

贾星远*

（河南中医院第二附属医院，河南　郑州　450000）

［**摘要**］　**目的**：研究不同激素对冬凌草花瓣愈伤诱导及次生代谢产物含量的影响。**方法**：以冬凌草花瓣为外植体，在 1/2 MS 附加不同激素配比的培养基上诱导愈伤组织，HPLC 法测定冬凌草甲素、乙素的含量，研究不同处理对愈伤组织诱导及次生代谢产物的影响。**结果**：当 NAA 的浓度过高时将会引起冬凌草花瓣愈伤组织的褐化。在一定浓度范围的 6-BA 可以促进冬凌草花瓣愈伤组织中冬凌草乙素的生物合成。1/2 MS + 6-BA 2.0 $mg \cdot L^{-1}$ + 2,4-D 0.5 $mg \cdot L^{-1}$ 为冬凌草花瓣愈伤组织诱导最佳培养基。**结论**：不同激素对冬凌草花瓣愈伤组织的诱导及冬凌草乙素的含量影响不同，为进一步研究冬凌草愈伤组织的培养提供了依据。

［**关键词**］　冬凌草；花瓣；愈伤组织；激素；甲素；乙素

Effects of Different Phytohormone on Callus Tissue Induction of *Rabdosia rubescens*（Hemsl.）Hara Petal and the Accumulation of Main Secondary Metabolites

JIA Xingyuan*

（*Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine*，*Zhengzhou* 450000，*China*）

［**Abstract**］　**Objective**：To study the effects of different phytohormone on callus tissue induction of *Rabdosia rubescens* petal and the accumulated of main secondary metabolites. **Methods**：With *R. rubescens* petals as explant，the callus was induced on 1/2 MS medium with different phytohormone combination. HPLC method was used for the determination of oridonin，ponicidin content. The effects of different treatments on callus tissue induction and the accumulated of main secondary metabolites were studied. **Results**：NAA is an important phytohormone，high concentrated NAA easily led to callus browning. 6-BA can promote the synthesis of ponicidin of callus tissue in the certain concentration range. The best medium of inducing callus was 1/2 MS + 6-BA 2.0 $mg \cdot L^{-1}$ + 2,4-D 0.5 $mg \cdot L^{-1}$. **Conclusion**：Each phytohormone had different efferent on callus tissue induction and the accumulated of ponicidin. The research provides reference for further studies on the callus tissue culture of *R. rubescens*.

［**Keywords**］　*Rabdosia rubescens*；petal；callus tissue；phytohormone；oridonin；ponicidin

doi：10.13313/j.issn.1673-4890.2015.4.017

冬凌草为唇形科香茶菜属多年生草本或亚灌木植物碎米桠 *Rabdosia rubescens*（Hemsl.）Hara. 的干燥的上部分。碎米桠产于我国河南、山西、贵州、河北等地。具有清热解毒、活血止痛等功效，同时对治疗食管癌、结肠癌均有一定疗效[1]。研究表明冬凌草中的主要抗癌、抗菌活性成分为二萜类化合物（冬凌草甲素、冬凌草乙素）[2]、迷迭香酸。

目前国内外关于冬凌草叶片愈伤组织的诱导及分化研究较多[3-5]，但对其花瓣组织诱导的研究未见报道。不同激素对愈伤组织的诱导及次生代谢产物含量有不同的作用，如不同激素对白及愈伤组织总酚含量的影响[6]中，2,4-D 促进白及愈伤组织褐化。因此通过添加不同配比激素促进冬凌草花瓣愈伤组织的形成及其次生代谢产物合成，为冬凌草组织培养快繁体系的建立提供新的途径。此外，植物愈伤组织的诱导是进一步研究再生植株的必要步骤以及

*［**通信作者**］　贾星远，初级中药师，研究方向：中药质量控制与配伍研究；E-mail：745672523@qq.com

建立植物细胞悬浮系的基础，通过正交试验法研究不同激素组合对冬凌草花瓣愈伤组织的诱导及次生代谢产物合成的影响，为冬凌草细胞悬浮培养材料的筛选奠定基础。

1　实验材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为实验室内冬凌草无菌苗花瓣。

1.2 实验方法

1.2.1 不同配比激素条件下冬凌草花瓣愈伤组织的诱导　将冬凌草无菌苗花瓣剪成 0.2 cm×0.2 cm 大小块状，分别接种于 1/2 MS 加不同激素配比的培养基中(如表 1 所示)，在光照 12 $h \cdot d^{-1}$、(25 ±1) ℃、无菌条件下培养。第 20 d 统计诱导率，褐化率。

表 1　不同激素配比

/$mg \cdot L^{-1}$

编号	6-BA	NAA	2，4-D
1	1	0.2	0
2	1	0.4	0.2
3	1	0.8	0.5
4	1.5	0.2	0.2
5	1.5	0.4	0.5
6	1.5	0.8	0
7	2	0.2	0.5
8	2	0.4	0
9	2	0.8	0.2

1.2.2 冬凌草有效成分含量的测定　第 20 d，取出不同激素配比条件下得到的愈伤组织，称重后放置于烘箱中，80 ℃烘至恒重，用研钵研成粉末，备用。采用 HPLC 法，测定冬凌草甲素、乙素含量(干重含量)，具体提取、测定方法如下。

1.2.2.1 供试品溶液的制备　精密称取 0.10 g 的冬凌草愈伤组织粉末，置于 100 mL 的具塞三角瓶中，加入 30 mL 的甲醇，称重，静置 30 min，超声 30 min后放置室温，补足重量，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤即得，作为供试样品测定冬凌草甲素含量[7]，每个样品重复 3 次。精密称取 0.10 g 的冬凌草愈伤组织粉末，置于 100 mL 的具塞三角瓶中，加入 30 mL 的丙酮，称重，静置 30 min，水浴回流 90 min 后放置室温，补足重量；摇匀，过滤，吸取过滤液 20 mL，水浴蒸干，用甲醇定容于 10 mL 容量瓶中；摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤即得，作为供试样品测定冬凌草乙素的含量[8]，每个样品重复 3 次。

1.2.2.2 色谱条件的选择　Waters e2695，Waters 2489 紫外检测器；色谱柱为 Agilent XDB-C18 (4.6 mm×250 mm，5 μm)；冬凌草甲素流动相:甲醇-水(55:45)，冬凌草乙素流动相:甲醇-0.5% 磷酸水溶液(51∶49)；检测波长为 238 nm，流速为 0.8 $mL \cdot min^{-1}$，柱温为 30 ℃。

2　结果与分析

2.1 不同激素对冬凌草花瓣愈伤组织诱导的影响

冬凌草花瓣接种于不同激素组合的培养基上，第三天花瓣向上卷曲并开始长大，随着培养时间延长花瓣越长越大，第七天的部分花瓣变成透明状态，第十二天部分愈伤组织开始形成，第十七天不同激素配比条件下冬凌草花瓣愈伤出现褐化现象，但不同激素组合对冬凌草花瓣愈伤组织的诱导及褐化作用不同(见表 2)。

表 2　不同激素配比对冬凌草愈伤组织诱导及次生代谢产物的影响

编号	接种数	诱导率(%)	褐化率(%)	甲素 /$mg \cdot g^{-1}$	乙素 /$mg \cdot g^{-1}$
1	80	91.7	96.1	0.0	0.082
2	80	85.2	0.0	0.0	0.081
3	80	75.0	0.0	0.0	0.083
4	80	100.0	100.0	0.0	0.082
5	80	100.0	84.6	0.0	0.075
6	80	60.0	35.0	0.0	0.080
7	80	88.0	90.0	0.0	0.096
8	80	91.7	95.0	0.0	0.091
9	80	100.0	0.0	0.0	0.090

由表 2 可以得出不同激素配比条件下冬凌草花瓣愈伤组织的诱导率差异性不显著，将花瓣接种到上述 9 种培养基中后，冬凌草花瓣愈伤组织的诱导率在 60%-100% 之间，6 号诱导率为 60.00%，相对较低，其中 4、5、9 号诱导率最高为 100.00%。其他诱导率在 75%-90% 之间。但是不同激素配比条件下所诱导的冬凌草愈伤组织褐化现象差异显著。上述结果表明不同激素配比条件下冬凌草花瓣愈伤组织中冬凌草甲素含量为 0 $mg \cdot g^{-1}$。

通过 SPSS 分析软件对上述结果进行相关性分析

结果如表 3。

表 3　不同激素对冬凌草花瓣愈伤诱导及次生代谢产物影响的相关性分析

	6-BA	2，4-D	NAA	诱导率	褐化率	乙素
6-BA	1	0	0	0.127	0.279	0.684*
2，4-D		1	0	0.324	-0.119	0.23
NAA			1	-0.519	-0.788*	-0.106
诱导率				1	0.276	0.217
褐化率					1	0.095
乙素						1

注：表中* 表示显著相关，$P<0.05$。

由表 3 可以得出冬凌草花瓣愈伤组织的诱导与 6-BA、2，4-D 成正相关，与 NAA 成负相关，但是相关性不显著。NAA 与冬凌草花瓣愈伤组织的褐化成显著的负相关，相关系数为 -0.788（$P<0.05$），上述结果表明 NAA 是冬凌草花瓣愈伤组织诱导较为重要的一种激素，当 NAA 的浓度过高时将会引起冬凌草花瓣愈伤组织的褐化。6-BA 与冬凌草花瓣愈伤组织中冬凌草乙素的生物合成成正相关相关系数为 0.684*（$P<0.05$），随着 6-BA 浓度增加愈伤组织中冬凌草乙素的含量相对提高，当其浓度为 2 $mg\cdot L^{-1}$ 时浓度达到最高，若再增加 6-BA 的浓度愈伤组织中冬凌草乙素的变化有待进一步研究。

3　讨论与结论

本实验应用组织培养的方法研究了不同激素对冬凌草花瓣愈伤组织诱导的影响，实验结果表明 NAA 是冬凌草花瓣愈伤组织诱导较为重要的一种激素，当 NAA 的浓度过高时将会引起冬凌草花瓣愈伤组织的褐化。6-BA 可以在一定浓度范围内促进冬凌草花瓣愈伤组织中冬凌草乙素的生物合成，但其浓度超过 2 $mg\cdot L^{-1}$ 以后，若再增加 6-BA 冬凌草花瓣愈伤组织中冬凌草乙素的变化有待进一步研究。上述结果中 9 号激素条件下冬凌草花瓣愈伤组织诱导率为 100.00%，褐化率为 0.00%，且冬凌草乙素含量相对较高，综合考虑将 9 号激素条件作为冬凌草花瓣愈伤组织诱导的最佳条件选择。9 种激素配比条件下冬凌草花瓣愈伤组织中冬凌草甲素的含量均为 0 $mg\cdot L^{-1}$。故不同激素均不能刺激冬凌草甲素的生物合成。与冬凌草组织培养中主要次生代谢产物积累动态的研究结果相同[9]，培养过程中随着细胞脱分化的进行冬凌草甲素含量逐渐降低，在细胞分化初期、芽分化初期含量为零，随着植物器官的再生，冬凌草甲素含量逐渐上升，这说明冬凌草甲素的生物合成可能与冬凌草植株内特定的组织或器官有关，而愈伤组织细胞往往缺少特定组织或器官，使得其次生代谢产物一冬凌草甲素的合成不能够进行。冬凌草植株再生过程中冬凌草甲素积累机制的研究表明[10]，冬凌草培养物内叶绿素、丙酮酸的含量、可溶性蛋白与冬凌草甲素积累有相互促进的关系，冬凌草内主要次生代谢产物冬凌草甲素为二萜类化合物，该代谢产物的形成是以光合产物为基础，冬凌草愈伤时期不能进行光合作用故冬凌草甲素的生物合成受到限制。大量研究表明，萜类物质生物合成在植物发育过程中由于控制时间和地点的不同使这一过程的调控变得较为复杂，总的来说可分为空间调控和阶段调控[11]。阶段调控主要指萜类化合物的产生与植物的发育过程有密切的相关性。如药用植物青蒿中有效成分青蒿素的形成、积累及分布不仅具有较强的组织特异性，而且与植株的生长发育（尤其是开花）存在着一定的相关性。辣椒中的辣椒素只有在生殖生长的后期才能在果皮中合成并积累[12]。本实验为进一步研究研究冬凌草愈伤组织的培养提供了依据。

参考文献

[1]　刘晨江，赵志鸿. 冬凌草的研究进展[J]. 中国药学志，1998，33(10)：577-579.

[2]　李继成，刘晨江，孙汉董. 鲁山冬凌草乙素和丙素的结构研究[J]. 云南植物研究，1986，8(1)：93-97.

[3]　张艳贞，董诚明，苏秀红，等. 冬凌草对冬凌草愈伤组织生长及冬凌草甲素、乙素含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(3)：132-135.

[4]　徐莉莉，聂世现，黄文静，等. 冬凌草组织培养及愈伤组织遇到的研究[J]. 生物学杂志，2010，27(3)：24-26.

[5]　李东杰，魏景芳，鲁绍伟，等. 不同植物激素对冬凌草愈伤组织增殖及褐化的影响[J]. 水土保持研究，2006，13，(3)149-151.

[6]　叶佳丽，李卫平，熊明星，等. 不同激素对白及愈伤组织总酚含量的影响[J]. 中药材，2014，37(2)：192-194.

[7]　国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2010：106.

[8]　董诚明，徐鹏，苏秀红，等. 锌对冬凌草产量及有效成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17(3)：58-60.

（下转第 394 页）

4.2 溶剂系统的调整

本文根据二苯乙烯苷在上下相中的分配系数 K 值对高速逆流色谱的溶剂体系进行调整。一般来说，K <0.5，出峰太快，峰之间的分离度较差；K >2 出峰时间较长，峰形变宽，最佳 K 值应在 1.0 左右[10]。本研究适当增大了正己烷的比例，使得上相的疏水性更强，二苯乙烯苷在上相中的溶解度减小。最终测得的二苯乙烯苷在溶剂体系中的 K 值为 1.196，出峰时间较合适，分离度较好。本研究中分离纯化二苯乙烯苷的方法避免了大孔吸附树脂等柱色谱分离时的吸附损失和大量的溶剂消耗，为制备高纯度的二苯乙烯苷提供了一种简单可行的途径。

参考文献

[1] 周莹,刘广锋,冯娟,等. 何首乌 3 种组分的提取及其清除 DPPH 自由基作用的研究[J]. 广东药学院学报,2014,30(3):301-304.

[2] 苗明三,方晓艳. 制何首乌多糖对衰老模型小鼠抗氧化作用的研究[J]. 中药药理与临床,2002,18(5):23-24.

[3] Zequn Jiang, Jimin Xu, Minghai Long, et al. 2,3,5,4′-tetrahydroxystilbene-2-O-β-d-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MA Pkinase activation and tyrosinase upregulation[J]. Life Sciences, 2009, 85(9): 345-350.

[4] 吕丽爽. 何首乌中二苯乙烯苷的制备及抗氧化机理研究[D]. 无锡:江南大学,2006.

[5] Oka F, Oka H, Ito Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatograph[J]. J. Chromatogr. A, 1991, 538(1): 99-108.

[6] 管淑玉,彭维,苏薇薇. 高速逆流色谱法一步分离何首乌中的二苯乙烯苷[J]. 中药材,2008,31(7):1079-1080.

[7] 班翊,刘其礼,金悠,等. 二苯乙烯苷的稳定性研究[J]. 中草药,2004(11):39-41.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:164-165.

[9] 张志国,吕泰省,姚庆强. 何首乌的研究进展[J]. 解放军药学学报,2008,24(1):62-64.

[10] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005.

(收稿日期　2014-07-12)

(上接第 381 页)

[9] 苏秀红,董诚明,王伟丽,等. 冬凌草组织培养物中主要次生代谢产物积累动态的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(9):1080.

[10] 苏秀红,史应强,董诚明,等. 冬凌草植株再生过程中冬凌草甲素积累机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):104.

[11] 宏蕾,朱旭芬,曾云中. 类异戊二烯的生物合成及调控[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2002,28(2):224.

[12] 陈大华,叶和春,李国凤,等. 植物类异戊二烯代谢途径的分子生物学研究进展[J]. 植物学报,2000,42(6):551.

(收稿日期　2014-12-19)