

不同石灰处理对丹参生长、生物量和活性成分的影响

张燕¹, 李晓明¹, 任振丽², 张志伟², 李丰胜³, 金艳¹, 郭兰萍^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;
2. 菏泽步长制药有限公司, 山东 菏泽 274000; 3. 莱芜紫光生态园有限公司, 山东 莱芜 271100)

[摘要] 目的:探讨不同石灰添加量对丹参产量和质量的影响,为该药材的栽培和自毒作用缓解提供参考。方法:添加不同梯度的生石灰,以生长指标、产量及丹参素、迷迭香酸、二氢丹参酮等7种活性成分含量为指标,探讨石灰对丹参生长和活性成分的影响。采用HPLC测定各指标成分含量,流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水(B)梯度洗脱(0~15 min, 25% A; 15~16 min, 25%~40% A; 16~18 min, 40%~50% A; 18~55 min, 50%~75% A; 55~56 min, 75%~25% A),检测波长280 nm。结果:添加石灰对丹参生长和生物量的差异均未达到显著水平。但随石灰添加量的增加,丹参酮类和丹酚酸类物质呈现了显著地负相关趋势,丹酚酸类物质先升高后降低;丹参酮类物质先降低后增加。在连作土中按60 g·m⁻²添加石灰和在新土中按45 g·m⁻²添加石灰均能使丹酚酸类成分显著增加,丹参酮类成分显著降低;而当石灰添加量提高至75 g·m⁻²时,这两类成分均与对照组无显著差异。结论:添加石灰未对丹参的生长指标和生物量会产生显著影响;但丹参酮类和丹酚酸类物质呈现了竞争性变化趋势,这可能与pH对次生代谢物质合成途径关键酶的调控有关。

[关键词] 丹参; 石灰; 产量; 丹酚酸类; 丹参酮类

[中图分类号] R339.3+5; TM938.84; R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0075-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015070075

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150211.1510.013.html>

[网络出版时间] 2015-02-11 15:10

Effects of Lime on Seedling Growth, Biomass and Active Ingredients of *Salvia miltiorrhiza* ZHANG Yan¹, LI Xiao-ming¹, REN Zhen-li², ZHANG Zhi-wei², LI Feng-sheng³, JIN Yan¹, GUO Lan-ping^{1*} (1. State Key Laboratory Breeding Base of Daodi Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Heze Buchang Pharmaceutical Co. Ltd., Heze 274000, China; 3. Laiwu Ziguang Ecological Park Co. Ltd., Laiwu 271100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effects of different amounts of lime on yield and quality of *Salvia miltiorrhiza*, and provide a reference for cultivation and autotoxicity ease of this herb. **Method:** With growth targets, yield and contents of seven kinds of active ingredients (salvianolic acid B, tanshinol, rosemary acid, tanshinone II_A, tanshinone I, cryptotanshinone, dihydrotanshinone) as indexes, effects of different gradients of lime on growth and active ingredients of *S. miltiorrhiza*. HPLC was employed to determine the content of these seven components with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid water for gradient elution and detection wavelength at 280 nm. **Result:** Effects of adding lime on growth and biomass of *S. miltiorrhiza* did not reach significant levels. But with addition of lime, salvianolic acids substances and tanshinones substances presented a significant negative correlation trending, salvianolic acids first increased, then decreased; while tanshinones decreased first, further increased. Salvianolic acids increased significantly and tanshinones reduced significantly

[收稿日期] 20140707(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81130070, 81325023, 81473307); 国家科技支撑计划项目(2012BAI29B02, 2012BAI28B02); 中国中医科学院“名医名家传承”项目(CM20143001); 北京中医药薪火传承3+3工程项目“胡世林中药专家传承工作站”; 北京市中医药科技发展基金项目(JJ2012-25)

[第一作者] 张燕, 博士, 副研究员, 从事中药资源与栽培研究, Tel: 010-64014411-2836, E-mail: zhangyan8669@126.com

[通讯作者] * 郭兰萍, 博士, 研究员, 从事中药资源生态研究, Tel: 010-64011944, E-mail: glp01@126.com

when added $60 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ of lime in continuous cropping soil or added $45 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ of lime in the new soil. But the amount of lime added up to $75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$, there were no significantly difference in these two types of components with the control group. **Conclusion:** Effects of adding lime on growth and biomass of *S. miltiorrhiza* do not reach significant levels; but with addition of lime, salvianolic acids and tanshinones presents competitive trend, this may be related to regulation of pH to key enzymes of secondary metabolites biosynthesis pathway.

[**Key words**] *Salvia miltiorrhiza*; lime; production; salvianolic acids; tanshinones

丹参是我国常用大宗中药材^[1], 种植面积积极广, 但其生产上存在严重的自毒和连作障碍问题, 常表现为土壤板结、酸化、线虫增加、土传真菌病害加重等^[2]。在丹参生长过程中, 根会分泌并积累 34 种酚酸类物质^[3], 这些物质会透过根皮进入土壤中, 引起自毒和土壤酸化, 这可能是连作障碍的一个原因。施用石灰是一项古老而有效的酸性土壤改良措施。因为施用石灰可以中和土壤酸碱度, 改善土壤物理、化学和生物学性质, 从而提高土壤养分有效性, 降低铝和其他重金属对作物的毒害^[4], 可通过直接抑菌防治土传病害、根结线虫^[5-8]、对土壤酶和微生物区系的调节, 提高作物的产量、品质和抗病性等作用^[9-10]。但石灰在中药材中的应用鲜见报道。

据文献报道, 不同 pH 培养条件会对药用植物的次生代谢和关键酶产生影响, 房翠萍^[11]研究发现 pH 9 时山东丹参毛状根的生长量及其体内的丹参酮含量最高; 宛国伟等^[12]发现丹参根中水溶性酚酸类次生代谢产物合成途径中关键酶——苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶的最适反应 pH 分别为 6.0 和 8.8; pH 对槐角愈伤组织中黄酮类化合物产量^[13]、雷公藤愈伤组织中雷公藤内酯醇和总生物碱含量^[14]、人参愈伤组织中皂苷含量^[15]等均有调控作用。推测土壤中添加石灰可能会对丹参的次生代谢产生影响。为缓解丹参的连作障碍, 提高其产量和有效成分含量, 本实验设计以石灰对栽培土壤进行杀菌和调节 pH, 观察不同梯度石灰添加量对丹参生长、产量、有效成分含量和连作障碍的影响, 为栽培丹参的规范化生产提供参考。

1 材料

2695 型高效液相色谱系统(美国 Waters 公司), BS 2202S 型电子天平(德国赛多利斯公司)。丹参素、迷迭香酸、二氢丹参酮、隐丹参酮及丹酚酸 B, 丹参酮 I, 丹参酮 II_A 对照品(江西本草天工科技有限责任公司, 批号分别为 1103-110101, M24-110421, E06-110116, Y53-110616, 1022-101019, 1428-070321, 1067-080314), 紫花丹参种苗(山东莱芜, 经中国中医科学院黄璐琦研究员鉴定为唇形科

植物丹参 *Salvia miltiorrhiza*, 采用常规栽培管理), 市售块状生石灰(山东省莱芜市汇鑫石灰厂, 施用前砸成粉末状), 乙腈为色谱纯, 磷酸为优级纯, 水为自制高纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试验设计 于山东莱芜丹参 GAP 试验示范基地进行, 供试土壤理化特性为沙壤土, pH 6.0, 有机质 $0.807 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全氮 0.147% , 速效磷 $4.979 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效钾 $206.349 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。分别在新土(头茬)和连作土(重茬)两片地上进行, 2 种土壤的理化特性一致, 每种土均设 4 个处理, 分别为处理 1(对照, 不加石灰), 2(按 $45 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 加石灰), 3(按 $60 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 加石灰), 4(按 $75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 加石灰)。采用田间小区试验, 小区面积 15 m^2 , 移栽密度 $50 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$, 重复 3 次, 随机区组设计。丹参于 3 月份进行移栽, 选择 10 月份进行观测、采取取样, 每个小区取 10 株, 即每个处理调查 30 株。

2.2 测定项目 株高采用钢卷尺测量, 芦头直径采用游标卡尺测量, 生物量和单株产量采用天平称量。丹参中有效成分测定样品于 10 月取样, 每个处理取 10 株作为混合样, 晾干, 样品采用常温、避光、防潮方式保存, 次年 3 月测定。样品粉碎后过 60 目筛, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘烤 14 h, 采用 HPLC 测定, 色谱条件为 SGE ENDURO C₁₈ 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B) 梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 25% A; 15 ~ 16 min, 25% ~ 40% A; 16 ~ 18 min, 40% ~ 50% A; 18 ~ 55 min, 50% ~ 75% A; 55 ~ 56 min, 75% ~ 25% A), 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $10 \text{ } \mu\text{L}$, 检测波长 280 nm。经方法学考察, 本法准确、快速、重复性好。数据采用 Excel 进行录入和作图, 运用 SPSS 18.0 软件进行描述性统计和方差分析。

2.3 不同石灰处理对丹参生长指标和生物量的影响 由表 1 可知, 采用连作土和新土种植丹参时, 多数情况下按 $45, 60 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 添加石灰能促进丹参株高、芦头直径、单株地上鲜重和单株地下鲜重的提高。经方差分析, 在同一种土壤中, 添加石灰对丹参

生长和生物量影响的差异均未达显著水平;但头茬土种植的丹参比重茬土种植的单株株高、芦头直径、

单株地上鲜重和单株地下鲜重等指标均有极显著增加。说明丹参种植时,换地轮作很重要。

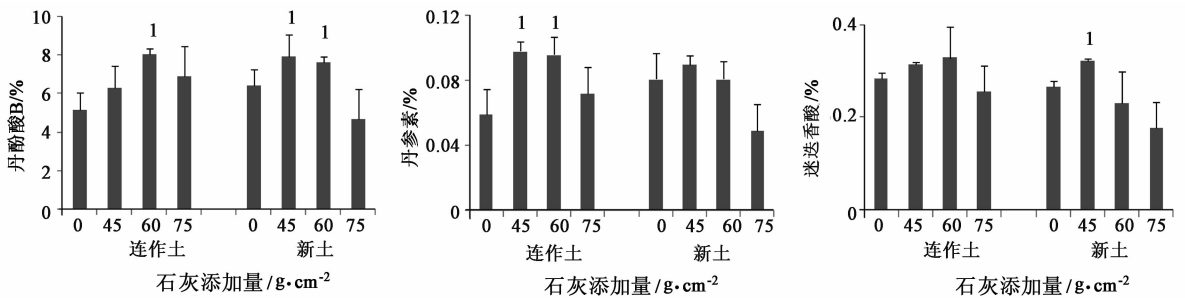
表 1 不同石灰处理对丹参生长和生物量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 1 Effects of different lime treatment on growth and biomass of *Salvia miltiorrhiza* ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

土壤类型	生石灰添加量/ $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$	株高/cm	芦头直径/cm	单株地上鲜重/g	单株地下鲜重/g
连作土	0	58.4 ± 16.6	2.0 ± 0.7	140.9 ± 70.7	197.6 ± 64.4
	45	65.2 ± 11.1	2.3 ± 1.2	184.6 ± 69.0	203.5 ± 87.2
	60	56.3 ± 8.7	2.8 ± 0.9	148.8 ± 49.6	204.1 ± 55.1
	75	60.0 ± 10.2	2.8 ± 1.4	177.9 ± 97.0	239.6 ± 122.3
新土	0	65.4 ± 20.6	3.1 ± 1.1	276.5 ± 99.8	344.8 ± 145.2
	45	75.9 ± 21.3	3.2 ± 0.7	272.7 ± 121.8	316.4 ± 115.6
	60	71.8 ± 19.8	3.3 ± 0.7	292.8 ± 139.6	412.1 ± 166.5
	75	58.7 ± 24.2	3.3 ± 1.1	255.8 ± 155.6	308.3 ± 111.6

2.4 不同石灰处理对丹参中活性成分的影响 不同石灰处理对丹参中 7 种活性成分的影响见图 1, 2。结果显示新土和连作土添加石灰后,丹参中丹酚酸 B 均呈现先增加后降低的趋势,且差异达显著水平。在连作土中添加石灰均能使丹酚酸 B 增加,以按 $60 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 添加石灰的增加量最大

(8.071%),显著高于对照组(5.165%);在新土按 $45, 60 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 添加石灰能使丹酚酸 B 含量显著提高,但石灰添加量提高到 $75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 时,丹酚酸 B 与对照组无显著差异。丹参素和迷迭香酸与丹酚酸 B 表现了近似的变化趋势,即随着石灰的添加先增加后降低。



与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 1 不同石灰处理对丹参中丹酚酸类成分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Fig. 1 Effects of different lime treatment on salivianolic acids in *Salvia miltiorrhiza* ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

在种植的新土和连作土中添加石灰,丹参中丹参酮类物质的变化表现出与丹酚酸类物质截然相反的趋势。在连作土中按 $45, 60, 75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 添加石灰均能使丹参酮 II_A 降低,其中处理 3 组显著低于对照组;而在新土中按 $45 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 添加石灰会使丹参酮 II_A 含量较对照组显著降低;但石灰添加量提高到 $75 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 时,丹参酮 II_A 与对照组无显著差异。添加不同量石灰后,其他丹参酮类物质(隐丹参酮、二氢丹参酮、丹参酮 I)与丹参酮 II_A 表现了完全相同的变化趋势。

前期研究发现丹酚酸类物质和丹参酮类物质的合成途径在丹参根内本来就存在 2 条竞争性路

线^[16]。随着石灰的添加,即土壤 pH 的增大,丹参酮类物质和丹酚酸类物质呈现了竞争性变化趋势,丹酚酸类物质先升高后降低;而丹参酮类物质则相应的先降低后增加。新土种植丹参时,以上 7 种成分普遍低于连作土中种植的丹参,可能是因为连作土中自毒物质较多,极显著影响了其生长指标,但对丹酚酸类和丹参酮类物质均有促进作用,符合次生代谢产物随环境变化的 3 个假说^[17]。一是符合生长/分化平衡(growth/differentiation balance, GDB)假说,当丹参收到自毒胁迫时,生长缓慢,以分化为主,而次生代谢产物是细胞分化过程中生理活动的产物;二是符合最佳防御(optimum defense, OD)假说,

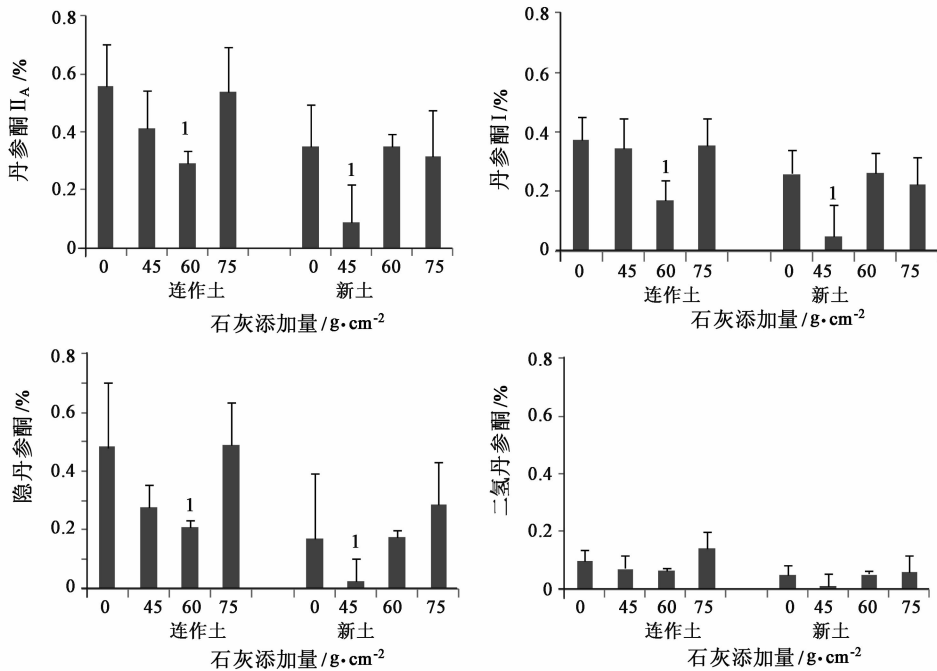


图 2 不同石灰处理对丹参中丹参酮类成分的影响($\bar{x} \pm s, n = 30$)
Fig. 2 Effects of different lime treatment on tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

即自毒胁迫下,丹参生长缓慢,产生次生代谢产物所获得的防御收益大于其生长所获得的收益,所以连作土中丹参有效成分含量高。三是符合资源获得(resource availability, RA)假说,即丹参潜在的生长速度降低时,其产生的用于防御的次生代谢产物的数量就会增加,所以连作土中丹参有效成分含量高。

3 讨论

丹参在生长过程中根会合成酚酸类物质并向土壤中分泌,导致土壤酸化,而且本文的供试土壤 pH 偏酸,故往土中添加石灰,会提高土壤的 pH^[18-19],在一定程度上缓解丹参的土壤酸化问题。同时外界 pH 的改变反过来会对丹参次生代谢产物和关键酶产生反馈调节,这与文献[11-12]中表述一致。说明土壤中添加石灰会对丹参的次生代谢产生影响。添加石灰对次生代谢物质产生的影响可能与 pH 对这些次生代谢物质合成途径中关键酶的调控有关。对环境酸碱度敏感是酶的特点之一,每种酶只能在一定 pH 范围内才表现活性,不同酶反应的适宜 pH 不同;pH 的改变影响底物与酶的亲和力、酶活性中心的空间构象、酶和底物的结合和分离状态,进而影响酶的活性和催化作用,从而对次生代谢产生影响^[20]。

栽培中药材已成为目前中医临床用药的主要来源,中药材栽培中土壤酸化和自毒问题已经引起业

界的重视^[21]。本文研究发现,不同石灰添加量对丹参产量的促进作用未达到显著性水平,但对新土和连作土中种植丹参的丹参酮类物质和丹酚酸类物质均产生了相同的竞争性变化趋势。石灰添加或不同 pH 对丹参及其他中药材生长和活性成分的调控作用应得到进一步研究,并将研究成果应用于中药材生产中。

[参考文献]

[1] 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,2010:70.
 [2] 郭兰萍,黄璐琦,蒋有绪,等. 药用植物栽培种植中的土壤环境恶化及防治策略[J]. 中国中药杂志,2006,31(9):714-717.
 [3] 赵娜,郭治怡,赵雪,等. 丹参的化学成分与药理作用[J]. 国外医药:植物药分册,2007,2(4):155-160.
 [4] 蔡东,肖文芳,李国怀. 施用石灰改良酸性土壤的研究进展[J]. 中国农学通报,2010,26(9):206-213.
 [5] 闫芳芳,夏先全,张伟. 2 种土壤改良措施防治烟草青枯病研究[J]. 西南农业学报,2013,26(1):177-180.
 [6] 崔国庆. 石灰氮防治土传病害机理及对蔬菜生长影响研究[D]. 重庆:西南大学,2006:2-5.
 [7] 李志安,邹碧,丁永祯,等. 植物残茬对土壤酸度的影响及其作用机理[J]. 生态学报,2005,25(9):2382-2388.
 [8] 李洪连,黄俊丽,袁红霞. 有机改良剂在防治植物土

- 传病害中的应用[J]. 植物病理学报, 2002, 32(4): 289-295.
- [9] 唐莉娜, 熊德中. 土壤酸度的调节对烤烟根系生长与烟叶化学成分含量的影响[J]. 中国生态农业学报, 2002, 10(4): 65-67.
- [10] 蔡东. 鄂南棕红壤区施用石灰对桃园土壤和树体营养的效应研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 4-13.
- [11] 房翠萍. 丹参多倍体诱导、毛状根培养及其丹参酮产量提高的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011: 6-10.
- [12] 宛国伟, 董娟娥, 梁宗锁, 等. 培养条件对离体丹参根苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2007, 27(12): 2471-2477.
- [13] 魏振园, 汤若风, 王晋飞, 等. pH 对槐角愈伤组织黄酮类化合物产量的影响[J]. 广西植物, 2013, 33(2): 203-207.
- [14] 李琰, 冯俊涛, 王永宏. 培养基及培养条件对雷公藤愈伤组织生长和次生代谢产物含量的影响[J]. 林业科学, 2010, 46(5): 64-69.
- [15] 王建华. 人参愈伤组织无性系培养条件优化及次生代谢调控研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2006: 3-20.
- [16] 王学勇. 丹参毛状根基因诱导表达分析及其有效成分生物合成基因的克隆研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2007: 3-16.
- [17] 黄璐琦, 郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 277-280.
- [18] 杨林, 陈志明, 刘元鹏, 等. 石灰、活性炭对铬污染土壤的修复效果研究[J]. 土壤学报, 2012, 49(3): 518-525.
- [19] 于宁, 娄翼来, 颜丽, 等. 施石灰对北方连作烟田土壤酸度调节及酶活性恢复研究[J]. 土壤通报, 2008, 39(4): 849-851.
- [20] 吴作为, 黄晓玮, 张克勤. 植酸酶酶学特性研究进展[J]. 西南农业学报, 2004, 17(S1): 455-460.
- [21] 郭兰萍, 张燕, 朱寿东, 等. 中药材规范化生产(GAP) 10 年: 成果、问题与建议[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1143-1151.

[责任编辑 刘德文]