

外源生长素对黄芩悬浮细胞有效成分和内源激素含量的影响

胡国强,陈顺钦,袁媛*,伍肿,林淑芳
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

[摘要] 目的:探讨外源生长素对黄芩悬浮细胞有效成分和内源激素含量的影响。方法:将稳定继代的黄芩愈伤组织在含有不同浓度 NAA 或 KT 的 MS 液体培养基悬浮震荡培养,光照 16 h 黑暗 8 h 进行培养 18 d 后,采用 HPLC 的方法,测定黄芩苷的含量,采用酶联免疫吸附法测定内源激素的含量,以黑暗条件为对照。结果:①与对照组相比,光照和黑暗条件下分别加入 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 后,黄芩苷含量显著降低,分别为未加入 NAA 时的 2.56%,3.36%。②黑暗条件下,加入外源 NAA 后,ZR 含量显著降低,但 IAA,ABA 和 GAs 含量变化不明显。③ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和不同浓度 KT 的协同作用对黄芩苷的含量呈现先增长后降低的趋势。其中 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KT 作用下黄芩苷含量最高,且黑暗条件下显著高于光照条件,达到 $2.13 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:外源生长素不利于黄芩有效成分黄芩苷的积累, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 的组合对黄芩苷的积累量具有显著的促进作用。

[关键词] 外源生长素;黄芩;悬浮细胞;有效成分;内源激素

[中图分类号] R927 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0127-04

Effects of External Auxin on Effective Components and Endogenous Hormones Contents in *Scutellaria. baicalensis* Suspension Cell

HU Guo-qiang, CHEN Shun-qin, YUAN Yuan*, WU Chong, LIN Shu-fang

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of auxin on the active compounds and endogenous hormones in *Scutellaria baicalensis* suspension cell cultures. **Method:** The subculture scutellariae callus were cultivated in MS liquid medium containing various concentration of NAA or KT on a gyratory shaker with a 16-h photoperiod. After 18 d, the contents of baicalin and endogenous hormones were determined with HPLC and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively. Darkness condition was as control. **Result:** (1) After $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA treatment, the content of baicalin was 2.56% and 3.36% lower than of untreated, respectively. (2) After NAA treatment on the dark conditions, the content of ZR was significantly reduced. (3) The synergistic effect of $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA with different concentration of KT on the content of baicalin presented the trend of rising then declined. And after $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT treatment, the content of baicalin was the highest levels on the dark conditions and significantly higher than light condition. **Conclusion:** Auxin is not suitable for the active compound production of *S. baicalensis*. The combination of $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT promotes the accumulation of baicalin.

[Key words] Auxin; *Scutellaria baicalensis*; suspension cell; active compound; endogenous hormones

[收稿日期] 2010-09-27

[基金项目] 中国博士后基金(20090450559),国家中医药管理局项目(06-07ZP51),国家工程实验室项目(2010ZHSH001)

[第一作者] 胡国强,硕士研究生,Tel: 010-64014411-2956,Email:huguoqiang4521@sina.com

[通讯作者] *袁媛,博士,助理研究员,研究方向:分子生药学,Tel: 010-64014411-2956,E-mail:yyuan0732@gmail.com

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 为唇形科药用植物黄芩的干燥根,具有重要的药用价值。生态学研究表明,野生黄芩中汉黄芩素等黄酮类化合物含量与光照时数密切相关^[1]。受控试验也表明,光诱导对黄芩悬浮细胞中有效成分的积累有显著的促进作用,且刺激了与有效成分的积累相关基因的表达^[2]。陈顺钦等研究表明,光照条件下在黄芩悬浮细胞中,伴随着 IAA 含量的降低,黄芩苷含量也随之降低,两者变化曲线显著相关,且相对较高的 IAA 含量和相对较低的 GAs 含量有利于黄芩苷的积累^[3]。

利用植物生长调节剂可以改变植物体内次生代谢物的积累,如胡尚连^[4]等报道了低浓度 GA3 和高浓度 IAA 配比对慈竹叶黄酮的合成具有促进作用。在生产上利用植物生长调节剂,就是通过其影响植物内源激素的合成、运输、代谢、与受体结合以及此后的信号转导过程,来改变作物生长发育的过程。其原理在于主动调节植物自身的生育过程,不仅使其能及时适应环境条件的变化,充分利用自然资源,且有效的协调个体与群体、营养生长与生殖生长。利用生长物质间的互补和增效作用可以开发调节剂的复配产品。

本文旨在分析光照条件下外源生长素对黄芩有效成分的影响,并从内源激素的角度讨论造成该影响的机制,为合理使用植物生长调节剂生产优质药材提供理论和技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料及培养条件 黄芩愈伤组织由本实验室诱导。将在 MS 固体培养基上稳定继代的愈伤组织,转入到含有不同浓度 NAA 或 KT 的 MS 液体培养基(3% 蔗糖, pH 5.8)中进行悬浮培养,光照 16 h 黑暗 8 h 进行培养,以黑暗条件作为对照,摇床转速 120 r·min⁻¹,培养温度(25 ± 1) °C,接种量约为 2 g·L⁻¹鲜重,设 3 个重复。培养液中附加 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D 和 3 mg·L⁻¹ TDZ。分别于第 15 天取样,备用。

1.2 内源激素的测定 取黄芩悬浮细胞液 5 mL,4 °C 12 000 r·min⁻¹离心后,除去上清,置于液氮中冷冻 20 min,再转入 -70 °C 下保存,待测。样品用 80% 甲醇(含有 0.02% 2,6-二叔丁基对甲酚)提取,内源 IAA(indole-3-acetic acid),GAs(gibberellin),ZR(zeatin riboside),ABA(abscisic acid)的测定均采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosor-

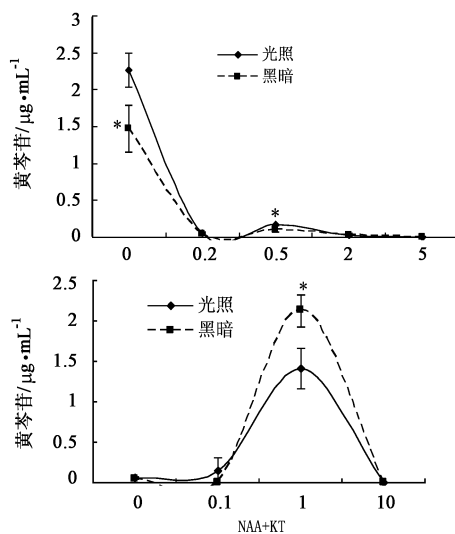
bentassay, ELISA)^[5],重复 3 次。激素测定试剂盒由中国农业大学王保民博士提供,按照 ELISA 说明书,用酶联免疫检测仪(华东电子管厂生产 DG-3022A 型)进行测定。

1.3 黄芩苷含量的测定 取黄芩悬浮细胞液 5 mL,4 °C 12 000 r·min⁻¹离心后,除去上清,沉淀中精密加入甲醇 1 mL,定量,超声提取 120 min,取出,再定量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,0.45 μm 滤膜滤过,即得。采用李晓明等^[6]HPLC 法测定样品中黄芩苷、黄芩素含量。色谱柱:Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm)。流动相乙腈-水-甲酸(23:77:1.0)(A);乙腈-水-甲酸(80:20:1.0)(B);梯度洗脱,梯度洗脱程序为:0 ~ 15 min,100% (A);15 ~ 25 min,100% ~ 87% (A);25 ~ 40 min,87% ~ 52% (A);40 ~ 60 min,52% ~ 0% (A)。检测波长 280 nm;分析时间 60 min;柱温 30 °C。

1.4 数据分析 采用 SPSS,Excel 软件对相关数据进行相关性分析和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 黄芩悬浮细胞黄芩苷含量动态变化 在光照条件下,黄芩苷含量达到 2.27 μg·L⁻¹,显著高于黑暗条件(P < 0.05)。加入外源生长素后,黄芩苷含量显著降低。在光照和黑暗条件下分别加入 0.2 mg·L⁻¹ NAA 后,黄芩苷含量分别为未加入 NAA 时的 2.56%,3.36%。但随着 NAA 浓度的增加,黄芩苷含量变化不显著,见图 1。



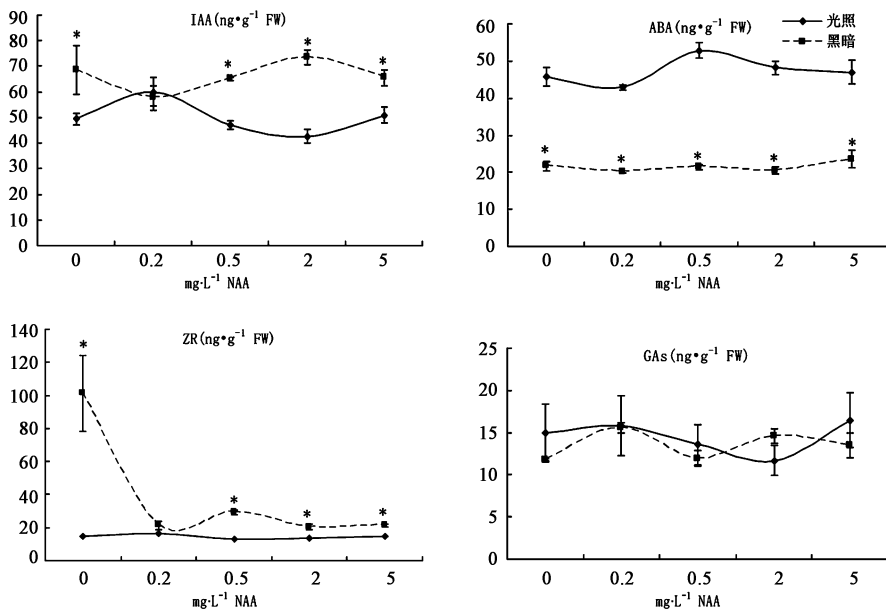
* 表示光照和黑暗显著差异

图 1 黄芩悬浮细胞中黄芩苷含量的动态变化

2.2 外源生长素对黄芩悬浮细胞内源激素含量的

影响 在光照条件下,黄芩悬浮细胞中的 IAA,ZR 含量显著低于黑暗条件下,而 ABA 含量显著高于黑暗条件($P < 0.05$)。加入外源生长素后,只有 ZR 含

量在黑暗条件下显著降低,但随着 NAA 浓度的增加,ZR 含量变化不显著。IAA,ABA 和 GAs 含量变化无论在光照和黑暗条件下变化都不明显,见图 2。



* 表示光照和黑暗显著差异

图 2 外源生长素对黄芩悬浮细胞内源激素含量的影响

2.3 生长素和细胞分裂素的协同作用对黄芩苷含量的影响 在含有 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的黄芩悬浮细胞培养基中分别加入 $0, 0.1, 1.0, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KT, 结果表明细胞中的黄芩苷含量随着 KT 浓度的增加呈现先增长后降低的趋势。其中 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KT 作用下黄芩苷含量最高,且黑暗条件下显著高于光照条件,达到 $2.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1)。

3 讨论

生长素 NAA 是一种常用的植物生长调节剂。一般来说,较低浓度生长素可以促进生长,而较高浓度则会抑制生长。植物不同的器官对生长素最适浓度的要求是不同的,不同有效成分的积累对生长素浓度的要求也可能是不同的。杨世海^[7]等研究表明 NAA 虽对决明毛状根生长有抑制作用,却明显促进蒽醌类化合物的合成。在本研究中, $\geq 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 抑制了黄芩悬浮细胞中黄芩苷的积累。

在植物生长发育的过程中,任何一种生理活动都不是受单一激素的控制,而是各种激素相互作用的结果。也就是说,植物的生长发育过程,是受多种激素的相互作用所控制的。黄诚梅^[8]等研究在茉莉开花前期喷施不同浓度的 NAA,在正常的生长条件下,其新梢内源激素 ABA、ZR 的含量都没有显著的

变化。本研究表明,与光照相比,黑暗条件下外源 NAA 使得黄芩细胞中的内源 ZR 含量显著降低,这可能是造成黄芩有效成分含量下降的原因之一。何含杰等^[9]报道了 6-BA 可以促进三裂叶野葛毛状根中异黄酮类化合物的含量。在黄芩细胞中同时加入 NAA 和 KT,可以显著促进黄芩苷的积累,并且不同的配比对黄芩苷的积累也有显著的差别。另一方面,在黑暗条件下,加入外源 NAA 同时抑制黄芩苷和内源 ZR 的含量,在同时加入 NAA 和 KT 后,黄芩苷显著增高,且恢复至对照水平(未加植物生长调节剂),暗示在黑暗条件下,外源生长素 NAA 可能是由于降低了内源 ZR 的含量从而影响黄芩苷的积累。

[参考文献]

[1] Li H, Huang L Q, Yang B, et al. (2008) Content change of active compounds in different growth and development periods of *Scutellaria baicalensis* [J]. China Tradition and Herbal Drugs, 39:604.
 [2] 陈顺钦,袁媛,罗毓健.光照对黄芩黄酮类活性成分积累及其相关基因表达的影响[J].中国中药杂志,2010,6:682.
 [3] 陈顺钦,黄璐琦,袁媛,等.光照对黄芩悬浮细胞内源激素与有效成分相关性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(4):72.

蔓荆子种子生活力的测定及其与发芽率的相关性研究

孙荣进¹, 杜婷¹, 杨光义², 李鹏¹, 朱继孝¹, 曾金祥¹, 王晓云¹, 吴波¹, 朱玉野¹, 罗光明^{1*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 鄱阳医学院附属太和医院, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的: 筛选测定蔓荆子种子生活力的最佳方法, 明确生活力与发芽率之间的相关性。方法: 以 5 个不同产地的蔓荆子作为实验材料, 分别用四氮唑染色法、红墨水染色法、BTB 指示剂法测定种子的生活力。测定不同培养床(滤纸、海绵、沙子、蛭石)和不同温度(15, 20, 25, 30, 30/20, 25/15 ℃)对发芽率的影响, 优化种子发芽条件。结果: 四氮唑染色法测定种子的生活力是 3 种测定方法中最准确的, 在蛭石培养床、30 ℃恒温培养条件下, 蔓荆子的发芽率最高。四氮唑染色法测定的蔓荆子生活力与发芽力比值为 0.992, 存在显著的正相关性, 进一步求得蔓荆子四氮唑测定生活力 X 与发芽率 Y 的回归方程为 $Y = 0.967X + 6.038$ 。结论: 四氮唑染色法是蔓荆子种子生活力测定的最佳方法, 生活力与发芽率呈显著的正相关。

[关键词] 单叶蔓荆; 生活力; 发芽率; 相关性

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0130-05

Measurement of Seed Viability and Correlation with Germination Rate for *Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham.

SUN Rong-jin¹, DU Ting¹, YANG Guang-yi², LI Peng¹, ZHU Ji-xiao¹,
ZEN Jin-xiang¹, WANG Xiao-yun¹, WU Bo¹, ZHU Yu-ye¹, LUO Guang-ming^{1*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicines, Nanchang 330004, China;

2. Taihe Affiliated Hospital of Yunyang College, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the optimized seed viability test methods for *Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham, and then measure the correlation between the germination rate and seed viability. **Method:** TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) staining, red ink staining and BTB staining were used respectively to evaluate seed viability of *V. trifolia* L. var. *simplicifolia* from five habitats. Conditions for seed germination contained

[收稿日期] 20110220(002)

[基金项目] 国家重大科技专项(2009ZX09308-002)

[通讯作者] * 罗光明, 博士, 教授、硕士研究生导师, 国务院特殊津贴享受者、江西省高校学科带头人, 研究方向: 中药资源开发与利用及中药材 GAP 生产技术, Tel: 0791-7118982, E-mail: jzlgm88@163.com

[4] 胡尚连, 贾攀庆, 曹颖等. GA3 和 IAA 对慈竹黄酮含量动态积累的调控效应[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(8): 3114.

[5] Carolyn E L, Jane E L, John R L. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivators[J]. Sei Food Agric, 1996, 71: 313.

[6] 李晓明, 罗毓健, 袁媛等. 高效液相色谱法测定黄芩愈伤组织中黄芩苷、黄芩素含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 1.

[7] 杨世海, 刘晓峰, 果德安等. 决明毛状根诱导及激素与诱导子对毛状根生长和蒽醌类化合物合成的影响[J]. 中草药, 2005, 36(5): 752.

[8] 黄诚梅, 江文, 吴建明等. 萘乙酸与多效唑对茉莉成花及新梢内源激素含量的影响[J]. 西北植物学报, 2009, 29(4): 742.

[9] 何含杰. 细胞分裂素 6-BA 影响三裂叶野葛毛状根生长及其异黄酮产生的机理研究[D]. 硕士论文, 2006.

[责任编辑 蔡仲德]