

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201404027

李群,谭韵雅,梁红英,等. 不同外源激素对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’愈伤组织生物量生长和绿原酸含量的影响[J]. 广西植物, 2015, 35(5):692—696  
Li Q, Tan YY, Liang HY, et al. Effects of different exogenous hormones on chlorogenic acid content and the growth of biomass in callus of *Lonicera macranthoides* ‘Yulei 1’[J]. *Guihaia*, 2015, 35(5):692—696

## 不同外源激素对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’ 愈伤组织生物量生长和绿原酸含量的影响

李群<sup>1\*</sup>, 谭韵雅<sup>1</sup>, 梁红英<sup>2</sup>, 唐明<sup>1</sup>, 马丹炜<sup>1</sup>, 王亚男<sup>1</sup>

(1. 四川师范大学 生命科学学院, 成都 610101; 2. 成都市林业局 龙溪—虹口国家级自然保护区, 成都 611830)

**摘要:** 为探索外源激素对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’愈伤组织生长及其代谢产物绿原酸含量的影响, 该研究通过在培养基中添加不同种类和浓度的外源激素, 以诱导其愈伤组织的产生及增殖生长, 并采用称量法和高效液相色谱法分别检测愈伤组织生物量和绿原酸含量。结果表明: 不同外源激素及其组合对愈伤组织生物量和绿原酸含量的积累产生不同的影响; 培养基中添加单一外源激素时, 对愈伤组织生物量影响最大的为 TDZ 激素; 和对照相比, 不同浓度的 TDZ 均使生物量显著提高, 其中  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 TDZ 使生物量达最大, 为  $0.62 \text{ g}$ ; 对绿原酸积累影响的结果不太一致, 除 TDZ 激素影响最小以外,  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NAA 使愈伤组织中的绿原酸含量积累最多, 为  $11.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 外源激素组合中, 含有 TDZ 激素的组合生物量偏高, 但绿原酸含量偏低, 这与单一外源激素的结果一致。MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D 培养基使愈伤组织中绿原酸含量积累较多, 为  $15.53 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 且生物量达最高, 为  $0.65 \text{ g}$ , 因此该激素组合为该研究最适培养基组合。通过筛选适宜的外源激素及其组合能促进灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’愈伤组织生物量的提高和次生代谢产物绿原酸的积累。研究结果对从灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’愈伤组织中获得大量的绿原酸提供了重要依据。

**关键词:** 灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’; 愈伤组织; 绿原酸; 生物量

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)05-0692-05

## Effects of different exogenous hormones on chlorogenic acid content and the growth of biomass in callus of *Lonicera macranthoides* ‘Yulei 1’

LI Qun<sup>1\*</sup>, TAN Yun-Ya<sup>1</sup>, LIANG Hong-Ying<sup>2</sup>, TANG Ming<sup>1</sup>,  
MA Dan-Wei<sup>1</sup>, WANG Ya-Nan<sup>1</sup>

(1. *Sichuan Normal University of Life Sciences*, Chengdu 610101, China; 2. *Chengdu Forestry Bureau of Longxi-hongkou National nature Reserve*, Chengdu 610101, China)

**Abstract:** Influence of exogenous hormones on the growth of biomass and the generation of chlorogenic acid in callus of *Lonicera macranthoides* ‘Yulei 1’ was investigated in this study. Different kinds and concentrations of exogenous hormones were added in culture media to induce the proliferation and differentiation of callus. The biomass and amount of chlorogenic acid in callus were analyzed by weight and HPLC. The result showed that the biomass of callus and amount of chlorogenic acid were affected by variation of hormones. TDZ in all hormones had the strongest influ-

收稿日期: 2014-10-16 修回日期: 2015-03-24

基金项目: 四川省教育厅成果培育项目(12ZZ009); 四川师范大学实验技术项目(SYJS2014-12)。

作者简介: 李群(1971-), 女, 重庆秀山人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物细胞工程方面的研究, (E-mail)liqun01234@163.com。

\*通讯作者

ence on the biomass of callus when single exogenous hormone was added. It reached the maximum of 0.62 g in 0.5 mg · L<sup>-1</sup> TDZ. On the other hand, TDZ had the least influence on the generation of chlorogenic acid, whereas 0.5 mg · L<sup>-1</sup> of NAA had the highest amount (11.18 mg · g<sup>-1</sup>). In the groups of combination of hormones, the ones with TDZ generated abundant biomass but low chlorogenic acid. The group of MS+TDZ 0.5 mg · L<sup>-1</sup>+ 2,4-D 0.5 mg · L<sup>-1</sup> which had the highest biomass (0.65 g) and relatively high chlorogenic acid (15.53 mg · g<sup>-1</sup>), was the most appropriate culture media. Therefore, this study provides an important basis on obtaining enormous chlorogenic acid from callus of *L. macranthoides* ‘Yulei 1’ through screening the different exogenous hormones and their combinations.

**Key words:** *Lonicera macranthoides* ‘Yulei 1’; callus; chlorogenic acid; biomass

金银花是我国中医临床使用的常用名贵药材, 药用历史悠久(国家药典委员会, 2010; 徐建伟等, 2011), 中医 1/3 的方剂中要用到金银花。灰毡毛忍冬‘渝蕾 1 号’(*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. ‘Yulei 1’)是 2008 年经重庆市林木品种审定委员会专家审定的金银花新品种, 也是重庆市审定通过的首个药用植物新品种(黄昌银, 2009)。与传统的灰毡毛忍冬相比较, 该品种具有产量高、抗逆性强、易采摘的特点, 更重要的是该品种的绿原酸含量较高(5.16%~7.37%)。

绿原酸是金银花质量的主要成分指标(于生兰等, 2002; Iwanhas, 1986)。它具有清除自由基、抗菌消炎、抗病毒、降糖、降脂、保肝利胆等多种功效(Hu *et al.*, 2001; Chiang *et al.*, 2002; Rodriguez, 2002; Frank *et al.*, 2003)。近年来发现绿原酸类物质有抗癌、抗艾滋病的作用(Lin *et al.*, 2004)。作为良好的抗氧化剂, 绿原酸在医药、日用化工、食品等领域都有广泛应用。尽管我国绿原酸产量增长很快, 但仍低于需求量的增长, 供需缺口相当大。国内高纯绿原酸市场仍然依赖于进口, 尤其是下游医药行业市场持续看好, 绿原酸增长势必会持续相当长的时间(杨大坚等, 2011)。传统提取金银花中绿原酸的原材料为金银花的全植株, 会消耗大量的再生资源。要获得大量药用植物次生代谢产物, 细胞培养是一个非常有效的方法。因为植物细胞培养是在离体条件下, 将愈伤组织或其它易分散的组织置于液体培养基中进行震荡培养, 得到分散成游离的悬浮细胞, 通过继代培养使细胞增殖, 从而获得大量细胞群体的一种技术。由于悬浮细胞中含有多种有用的次生代谢产物, 因此培养大量的悬浮细胞即可获得大量有用的次生代谢产物。到目前为止, 通过药用植物细胞培养研究过的药用植物超过 400 种, 从培养细胞中分离到的次级代谢产物在 600 种以上, 其中 60 多种药用植物代谢物含量超过或等于原植

物的含量(王娟等, 2012)。

本研究以‘渝蕾 1 号’叶片为外植体, 诱导出愈伤组织, 观察记录愈伤组织生长情况, 待愈伤组织生长稳定后继代培养 3 代, 第三代的愈伤组织作为测定材料。采用称重法测定愈伤组织中的生物量和高效液相色谱法测定愈伤组织中绿原酸的含量, 以期筛选能够提高‘渝蕾 1 号’愈伤组织生长和绿原酸含量的外源激素或激素组合, 为利用灰毡毛忍冬‘渝蕾 1 号’愈伤组织生产绿原酸奠定基础。

## 1 材料

本研究所用材料为重庆市秀山自治县隘口镇农民张胜海发现的, 经过多年的栽培和比较, 最后经重庆市林木品种审定委员会定名为灰毡毛忍冬‘渝蕾 1 号’(*Lonicera macranthoides* ‘Yulei 1’)。

## 2 方法

### 2.1 ‘渝蕾 1 号’叶片愈伤组织的诱导及继代培养

取金银花新品种‘渝蕾 1 号’的幼嫩叶片为外植体。将外植体先用自来水清洗表面, 然后在洗衣粉溶液中浸泡 15 min, 流水冲洗 1 h 后, 移至超净工作台。再把预处理好的外植体用 75% 酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 2 次, 再用 0.1% 升汞溶液加 2 滴吐温 80 灭菌 1~4 min, 根据灭菌时间长短用无菌水冲洗 4~6 次, 每次停留 3 min。在无菌条件下切割材料至 0.5 cm × 0.5 cm 大小, 分别将材料接种到不同浓度激素的培养基上, 25 °C 条件自然光照培养。3 周左右可见大部分材料在边缘均开始出现愈伤组织, 1 个月左右将诱导出的愈伤组织进行继代培养, 继代培养基同诱导培养基。培养基中基本培养基均为 MS。外源激素的设计如下: 单一外源激素中, 采用单因素设计, 均考虑外源激素 2,4-D、NAA、6-BA 及

TDZ 分别在  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度条件下对愈伤组织生物量生长和绿原酸含量的影响(表 1); 在外源激素组合中, 固定 6-BA 的浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , TDZ 的浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 生长素 2,4-D 和 NAA 的浓度选择  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  三个浓度并分别与 6-BA 和 TDZ 组合(表 2), 观察并测定这些培养基条件对愈伤组织生物量生长和绿原酸含量的影响。继代培养时, 连续继代培养 3 次, 继代培养时间为 25 d 左右, 最后一次继代培养时, 用千分之一的电子天平称取 1.5 g 左右愈伤组织进行继代, 培养完成后的愈伤组织用来测定生物量和绿原酸含量。每种相同的培养基选择 3 瓶进行生物量和绿原酸含量的测定, 取平均值。整个实验重复 2 次。

## 2.2 生物量的测定

称量法: 收获的愈伤组织于  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘干至恒重, 放入干燥器内冷却, 称其干重。

## 2.3 绿原酸含量的测定

2.3.1 色谱条件 美国戴安低压双三元高效液相色谱仪的色谱条件 Alltech C18 色谱柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ ); 流动相甲醇: 冰乙酸溶液 (28:72) (pH 2.60); 检测波长 328 nm; 柱温  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;

进样量  $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。

2.3.2 供试样品液的制备 渝蕾愈伤组织  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  烘干至恒重, 粉碎过 60 目, 分别精密称取 0.2 g, 各自加入到有 10 mL 60% 的甲醇试管中, 称其重量并记下, 在超声波清洗仪下超声 30 min, 用 60% 的甲醇补足其重量, 取上清进行检测。

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品(购自中国药品生物制品检定所, 批号: 110753-200413) 1 mg, 用 60% 的甲醇溶解, 摇匀、定容在干燥精确的 10 mL 容量瓶中, 制成浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液作为母液。在  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  母液中分别取 5、4 mL 分别定容在 10 mL 容量瓶, 配制成 50、40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液, 然后从  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液中分别取 5、1、2.5 mL 分别定容在 10 mL 容量瓶, 配制成 20、4、10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液。取上述 6 种浓度梯度溶液依次取  $10 \text{ } \mu\text{L}$  注入色谱仪, 测定绿原酸的峰面积, 绘制其标准曲线。以进样浓度和峰面积进行回归分析, 并求其回归方程和相关系数 ( $r$ )。通过回归方程计算出待测样品中绿原酸含量。

## 2.4 数据统计与分析

采用 SPSS17.0 软件进行方差分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 在  $P \leq 0.05$  下多范围 Duncan 检测数据显著性。

表 1 不同浓度的单一外源激素对灰毡毛忍冬‘渝蕾 1 号’愈伤组织生物量和绿原酸含量的影响

Table 1 Effects of different concentrations of single exogenous hormones on biomass and chlorogenic acid of *Lonicera macranthoides* ‘Yulei 1’ callus

| 外源激素<br>Exogenous hormone | 实验项目<br>Experimental project  | 浓度 Concentration ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |                   |                   |                   |
|---------------------------|---|--|-------------------|-------------------|-------------------|
|                           |   | 0  | 0.5               | 1.0               | 2.0               |
| 2,4-D                     | 接种量 Inoculums density ( $\text{g} \cdot \text{bottle}^{-1}$ )           | $1.50 \pm 0.01$                                      | $1.52 \pm 0.03$   | $1.50 \pm 0.02$   | $1.51 \pm 0.01$   |
|                           | 干重 Dry weight (g)   | $0.31 \pm 0.003a$                                    | $0.35 \pm 0.003b$ | $0.44 \pm 0.01d$  | $0.38 \pm 0.003c$ |
|                           | 绿原酸 Chlorogenic acid ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )                | $3.20 \pm 0.01a$                                     | $10.23 \pm 0.07d$ | $8.53 \pm 0.17c$  | $7.65 \pm 0.05b$  |
| NAA                       | 初始接种量 Initial inoculums density ( $\text{g} \cdot \text{bottle}^{-1}$ ) | $1.50 \pm 0.02$                                      | $1.51 \pm 0.02$   | $1.51 \pm 0.02$   | $1.49 \pm 0.01$   |
|                           | 干重 Dry weight (g)   | $0.31 \pm 0.01a$                                     | $0.36 \pm 0.02b$  | $0.40 \pm 0.01bc$ | $0.44 \pm 0.02c$  |
|                           | 绿原酸 Chlorogenic acid ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )                | $3.27 \pm 0.03a$                                     | $11.18 \pm 0.11d$ | $9.47 \pm 0.11c$  | $8.64 \pm 0.08b$  |
| 6-BA                      | 初始接种量 Initial inoculums density ( $\text{g} \cdot \text{bottle}^{-1}$ ) | $1.50 \pm 0.02$                                      | $1.50 \pm 0.01$   | $1.50 \pm 0.01$   | $1.53 \pm 0.02$   |
|                           | 干重 Dry weight (g)   | $0.31 \pm 0.02a$                                     | $0.37 \pm 0.02b$  | $0.37 \pm 0.01b$  | $0.38 \pm 0.01b$  |
|                           | 绿原酸 Chlorogenic acid ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )                | $3.33 \pm 0.02a$                                     | $7.36 \pm 0.11c$  | $10.25 \pm 0.05d$ | $6.35 \pm 0.12b$  |
| TDZ                       | 初始接种量 Initial inoculums density ( $\text{g} \cdot \text{bottle}^{-1}$ ) | $1.52 \pm 0.02$                                      | $1.51 \pm 0.01$   | $1.51 \pm 0.01$   | $1.50 \pm 0.02$   |
|                           | 干重 Dry weight (g)   | $0.32 \pm 0.01a$                                     | $0.62 \pm 0.01c$  | $0.59 \pm 0.01bc$ | $0.57 \pm 0.02b$  |
|                           | 绿原酸 Chlorogenic acid ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )                | $3.32 \pm 0.02a$                                     | $6.09 \pm 0.05c$  | $5.95 \pm 0.05c$  | $5.15 \pm 0.06b$  |

注: 字母相同表示无差异, 字母不同表示具有显著差异 ( $P \leq 0.05$ ); 字母顺序按所对比数据从小到大排列。下同。

Note: Common letters are not significantly different, and different letters show contrary results ( $P \leq 0.05$ ). The same below.

## 3 结果与分析

### 3.1 绿原酸标准曲线建立及待测样品绿原酸色谱图

在 2.3.1 色谱条件下, 按 2.3.3 方法, 以浓度 4、

10、20、40、50、100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  为进样体积, 以进样体积和峰面积进行回归分析, 求得标品回归方程为  $y = 2.063574x + 1.104074$ ,  $r = 0.9999278$ 。

按 2.3.2 的方法提取绿原酸, 在 2.3.1 的色谱条件下, 某一待测样品绿原酸色谱图如图 1 所示: 色谱

峰 4 为绿原酸。从图 1 看出, 绿原酸分离良好。

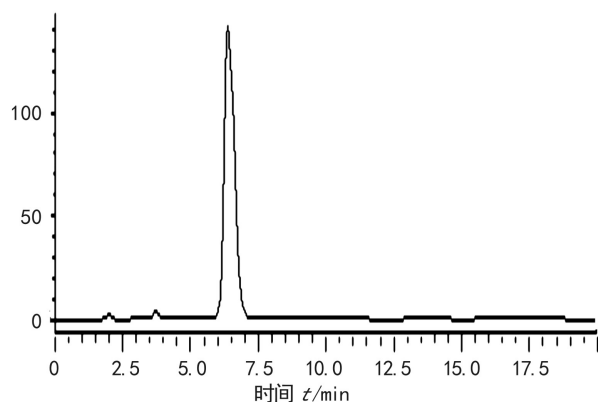


图 1 某样品绿原酸色谱峰图

Fig. 1 Chlorogenic acid chromatographic peak of sample

### 3.2 不同浓度的单一外源激素对灰毡毛忍冬‘渝蕾 1 号’愈伤组织生物量生长和绿原酸含量的影响

从表 1 看出, 不同浓度的外源激素对灰毡毛忍冬‘渝蕾 1 号’愈伤组织生物量和绿原酸含量的影响是有差异的。具体如下: 添加不同浓度的 2,4-D 对‘渝蕾 1 号’愈伤组织生物量影响较大, 各浓度之间差异显著,  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时生物量最大, 为  $0.44 \text{ g}$ ; 同时不同浓度间绿原酸的积累均是显著的, 实验组中的绿原酸均高于对照组, 其中添加质量浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 2,4-D 对绿原酸积累作用最为显著, 绿原酸含量是对照组的 3.20 倍。添加不同浓度的 NAA 对‘渝蕾 1 号’愈伤组织生物量的影响除  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  之间差异不显著以外, 其余浓度之间差异是显著; 对绿原酸的积累来说, 各浓度之间差异显著, 其中添加质量浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的积累作用最为显著, 绿原酸含量是对照组的 3.42 倍, 随着激素浓度的增大, 绿原酸积累逐渐减弱。添加不同浓度的 6-BA 对‘渝蕾 1 号’愈伤组织生物量影响除对照以外, 各实验组之间差异不显著, 但与对照组相比均差异显著; 对绿原酸的积累影响显著, 其中添加质量浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 6-BA 对绿原酸积累作用最为显著, 绿原酸含量为对照组的 3.08 倍。添加不同浓度的 TDZ 对‘渝蕾 1 号’愈伤组织生物量影响较大, 除  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度之间没有显著差异以外, 其余各浓度之间差异显著; 愈伤组织生长较快较好; 对绿原酸的积累影响显著, 其中添加质量浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 TDZ 对绿原酸积累作用最为显著, 绿原酸含量是对照组的 1.83 倍, 但  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ 浓度之

间绿原酸积累差异不显著。

### 3.3 外源激素组合对灰毡毛忍冬‘渝蕾 1 号’愈伤组织生物量生长和绿原酸含量的影响

按以上单一激素实验结果设定实验方案(表 2)。从表 2 看出, 整体上对生物量生长来说, 部分实验组之间有显著差异, 特别是 TDZ 实验组与 6-BA 实验组之间差异显著, 添加 TDZ 激素的效果明显好于添加 6-BA 激素的效果, 且  $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D 的组合使生物量达最大值  $0.65 \text{ g}$ ; 对绿原酸积累来说, 除  $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D 和  $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D 两个实验组之外, 其余各实验组间绿原酸的积累差异均显著, 但添加 6-BA 的效果明显好于添加 TDZ。由此看出, 最有利于绿原酸积累的最佳激素组合为  $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA, 绿原酸含量达  $17.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 但综合生物量和绿原酸积累量, 得出最佳的激素组合为  $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D。

表 2 外源激素组合对灰毡毛忍冬‘渝蕾 1 号’愈伤组织生物量和绿原酸含量的影响

Table 2 Effects of different concentrations of exogenous hormone combination on biomass and chlorogenic acid of *Lonicera macranthoides* ‘Yulei 1’ callus

| 外源激素<br>Exogenous<br>hormone<br>( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 初始接种量<br>Initial inoculum<br>density<br>( $\text{g} \cdot \text{bottle}^{-1}$ ) | 干重<br>Dry weight<br>(g)  | 绿原酸<br>Chlorogenic<br>acid<br>( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) |
|---|---|--------------------------|---|
| MS+6-BA1.0+<br>2,4-D0.5   | $1.50 \pm 0.01$   | $0.39 \pm 0.01\text{b}$  | $11.32 \pm 0.06\text{h}$  |
| MS+6-BA1.0+<br>2,4-D1.0   | $1.53 \pm 0.02$   | $0.31 \pm 0.02\text{a}$  | $10.23 \pm 0.05\text{g}$  |
| MS+6-BA1.0+<br>2,4-D2.0   | $1.50 \pm 0.02$   | $0.33 \pm 0.02\text{a}$  | $10.01 \pm 0.10\text{g}$  |
| MS+6-BA1.0+<br>NAA0.5   | $1.51 \pm 0.02$   | $0.44 \pm 0.02\text{c}$  | $17.67 \pm 0.06\text{j}$  |
| MS+6-BA1.0+<br>NAA1.0   | $1.53 \pm 0.02$   | $0.32 \pm 0.02\text{a}$  | $8.97 \pm 0.28\text{e}$   |
| MS+6-BA1.0+<br>NAA2.0   | $1.49 \pm 0.01$   | $0.50 \pm 0.01\text{d}$  | $9.43 \pm 0.04\text{f}$   |
| MS+TDZ0.5+<br>2,4-D0.5  | $1.50 \pm 0.02$   | $0.65 \pm 0.01\text{e}$  | $15.53 \pm 0.05\text{i}$  |
| MS+TDZ0.5+<br>2,4-D1.0  | $1.51 \pm 0.01$   | $0.52 \pm 0.02\text{d}$  | $6.31 \pm 0.03\text{b}$   |
| MS+TDZ0.5+<br>2,4-D2.0  | $1.52 \pm 0.01$   | $0.59 \pm 0.02\text{e}$  | $5.19 \pm 0.07\text{a}$   |
| MS+TDZ0.5+<br>NAA0.5  | $1.51 \pm 0.01$   | $0.51 \pm 0.01\text{d}$  | $9.59 \pm 0.29\text{f}$   |
| MS+TDZ0.5+<br>NAA1.0  | $1.53 \pm 0.01$   | $0.57 \pm 0.02\text{e}$  | $7.74 \pm 0.08\text{d}$   |
| MS+TDZ0.5+<br>NAA2.0  | $1.51 \pm 0.01$   | $0.61 \pm 0.01\text{ef}$ | $6.79 \pm 0.01\text{c}$   |

## 4 讨论

植物激素是植物组织培养中的关键因子,不仅影响细胞生长,还影响细胞次生代谢产物的合成(Meyer *et al.*, 1995)。目前在培养基中加不同种类和浓度的激素仍是应用最广泛的提高次生代谢产物方法。本研究选用常用的几种生长素和细胞分裂素及其组合诱导灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’愈伤组织生物量生长和次生代谢产物绿原酸的积累。结果表明,不同激素间的诱导效果差异较大。本研究得到两个明确的结果:一是添加激素以后,生物量和绿原酸的积累都高于对照(表1),而且激素不同,绿原酸积累量差异显著,说明灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’愈伤组织的生长和次生代谢产物绿原酸的积累对激素比较敏感。这与何文广等(2009)、唐建军等(2002)、万贵香等(2012)的研究结果一致。另一个是添加 TDZ 激素以后,灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’愈伤组织生物量明显高于其它三种激素,但绿原酸的积累又明显低于其它三种激素(图2,图3)。说明 TDZ 能诱导愈伤组织的快速生长,但绿原酸的积累没有同步合成和积累。这在其它物种中使用其它激素的研究中有所报道(Zhao *et al.*, 2001; 张广辉等, 2002)。

通过添加外源激素对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’愈伤组织生物量影响程度进行比较得出 TDZ > NAA > 2,4-D > 6-BA; 对绿原酸含量的积累程度比较得出 NAA > 2,4-D > 6-BA > TDZ。前人研究表明,适当浓度的外源激素组合明显优于单独使用一种外源激素。因此,本研究在前期研究的基础上,设计了如表2的实验方案,并得到了相应的结果。综合生物量和绿原酸含量两个因素,适合灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’愈伤组织生物量和绿原酸积累的最佳外源激素组合为 MS + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D, 此时,生物量达到每瓶 0.65 g, 绿原酸含量为 15.53 mg · g<sup>-1</sup>。同时,该组合中的激素浓度与单因素实验所得的激素浓度相吻合,并且组合以后生物量和绿原酸含量都大大提升,再次证明了激素的协同作用。值得注意的是,在本研究中,如果仅考虑绿原酸的积累,从表2可以看出最大的积累量为 17.67 mg · g<sup>-1</sup>, 是在 MS + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> NAA 培养基条件下得到的。在本研究中,17.67 mg · g<sup>-1</sup> 相当于 1.767%, 远低于该品种报道中的含量(5.16%~7.37%), 但和其它研究结果比较(含量

仅 0.51%~1.44%)(Wu, 2007), 认为也是正常的。推测由两个原因造成:一是报道中的数据是花中绿原酸的含量,而本研究分析的是叶片诱导的愈伤组织中绿原酸的含量。据报道,叶片含量本身就远低于花中的含量;第二个原因是在诱导愈伤组织并用愈伤组织进行继代培养过程中并没有对愈伤组织进行目标产物绿原酸含量方面的筛选,而是随机接种,有可能接种的愈伤组织本身绿原酸含量较低。当然也不排除其它因素如绿原酸提取、检测方面的误差。如果与经济效益结合起来,在以后的研究中可以考虑两个方面的研究内容:一是用花做外植体诱导愈伤组织的产生,其次选择绿原酸含量高的愈伤组织进行继代培养,再结合适当的培养条件,包括外源激素组合、物理培养条件等等,可能会提高绿原酸的产量,但有待下一步的研究。

## 参考文献:

- Chiang LC, Chiang W, Chang MY, *et al.* 2002. Antiviral activity of *plantago* major extracts and related compounds in vitro [J]. *Antivir Res*, **55**(6): 53-62
- Frank J, Kamal-Eldin A, RazAan A, *et al.* 2003. The dietary hydroxycinnamate caffeic acid and its conjugate chlorogenic acid increase vitamin E and cholesterol concentrations in Sprague-Dawley rats [J]. *J Agric Food Chem*, **51**(9): 2 526-2 531
- Huang CY(黄昌银). 2009. The first new medicinal plant of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. ‘Yulei 1’ callus in Chongqing (重庆市首个药用植物新品种—‘渝蕾1号’金银花) [J]. *Farm Sci Technol* (农家科技), **6**: 53
- Hu KJ(胡克杰), Sun KX(孙考祥), Wang L(王璐), *et al.* 2001. Inhibited effect of Chlorogenic acid on virus *in vitro* (氯原酸体外抗病毒研究) [J]. *J Harbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), **35**(6): 430-432
- He WG(何文广), Su YQ(苏印泉), Xu YM(徐咏梅), *et al.* 2009. Effects of external hormones on secondary metabolites in the leaf of *Eucommia ulmoides* (外源激素影响杜仲叶中次生代谢物含量的研究) [J]. *J Northwest For Univ* (西北林学院学报), **24**(6): 121-123
- Iwanhashi H, Negoro Y, Ikeda A, *et al.* 1986. Inhibition by chlorogenic acid of haematin-catalysed retinoic acid 5, 6-epoxidation [J]. *J Biochem*, **239**(3): 641-646
- Lin XZ, Liu CY, Chen KS. 2004. Extraction and content comparison of chlorogenic acid in *Arctium lappal* L. leaves collected from different terrain and its restraining bacteria test [J]. *Nat Prod Res Dev*, **16**(4): 328-330
- Meyer HJ, Van Standen J. 1995. The in vitro production of an anthocyanin from cell cultures of *Oxalis linearis* [J]. *Plant Cell Tiss Org*, **40**(1): 55-58
- National Pharmacopoeia Committee (国家药典委员会). 2010. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典(一部)) [M]. Beijing (北京): Chinese Medicine Science and Technology Press(中国医药科技出版社)
- (下转第 655 页 Continue on page 655)