

# 外源褪黑素对滇黄芩愈伤组织增殖和分化的影响

张来军<sup>1,2</sup>, 贾敬芬<sup>2</sup>

(1. 琼州学院 生命科学与技术学院, 海南 三亚 572022; 2. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069)

**摘要:**以滇黄芩(*Scutellaria amoena*)为试材,研究了不同浓度外源褪黑素(MEL)对滇黄芩愈伤组织增殖和不定芽分化的影响,并与相应浓度的 IAA 和 NAA 作了效果比较。结果表明:在附加 0.1、1.0、10.0 和 100.0  $\mu\text{M}$  MEL 的 MS 培养基上,愈伤组织增殖率均显著高于对照,其作用类似于 IAA,而 NAA 无明显促进作用;低浓度的 MEL(0.1、1.0、10.0  $\mu\text{M}$ )有助于愈伤组织的增殖,0.1  $\mu\text{M}$  MEL 愈伤组织的增殖率最高,达到 171%。同时培养基中附加低浓度 MEL(0.1 或 1.0  $\mu\text{M}$ )有助于不定芽分化,1.0  $\mu\text{M}$  的 MEL 作用下得到最高分化率为 30.4%,而高浓度 MEL(100.0  $\mu\text{M}$ )则对不定芽分化有抑制作用,与 IAA 作用相似。

**关键词:**褪黑素;滇黄芩;愈伤组织;芽增殖

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)08-0106-04

褪黑素(N-acetyl-5-methoxytryptamine; Melatonin; MEL)是由松果腺合成的一种广泛存在于动物界的激素,具有调节昼夜节律、促进睡眠、抗氧化、清除自由基等作用。自从 1995 年发现 MEL 广泛存在于植物中后<sup>[1-2]</sup>,对 MEL 在植物中功能的研究引起了学者们的广泛关注。多数研究报道了对不同植物及植物的不同器官 MEL 含量的测定结果<sup>[3-4]</sup>。也有报道提出,MEL 可能作为一种抗氧化剂广泛存在于细菌、真菌、植物<sup>[5-6]</sup>中。王英利等<sup>[7]</sup>发现外源褪黑素对绿豆在增强 UV-B 辐射下有防护作用。Lei 等<sup>[8]</sup>以胡萝卜悬浮细胞为试材,研究指出外源 MEL 的加入降低了低温胁迫下细胞的凋亡。Zhao 等<sup>[9]</sup>以大花红景天(*Rhodiola crenulata*)愈伤组织

为材料进行研究,表明 MEL 提高了低温胁迫下愈伤组织的存活率。这些离体培养试验揭示了外源 MEL 可能对植物抗环境胁迫方面有防护作用。另外研究发现,MEL 对植物生长也有促进作用,用 MEL 处理贯叶连翘,促进了根的形成<sup>[10]</sup>。将不同浓度 MEL 与 IAA 分别作用于羽扇豆(*Lupinus albus* L.)的下胚轴和子叶,可促进下胚轴形成不定根<sup>[11]</sup>,子叶也显著扩展<sup>[12]</sup>,推测 MEL 与 IAA 可能以相似的作用方式促进了植物的生长。近年来植物中 MEL 的功能研究虽然取得了很大进展,但多侧重于植物中 MEL 含量的测定;MEL 对某些植物抗逆性影响,或对植物生长、形态发生的研究所涉及到的方面非常有限,报道极少,对于阐明植物 MEL 的功能还是初步的,还需要提供更多的科学试验证据。

滇黄芩(*Scutellaria amoena* C. H. W right)属唇形科黄芩属植物,分布于我国西南地区,主要含黄芩素(Baicalin),汉黄芩素(Wogonin),黄芩苷(Baicalin),汉黄芩苷(Wogonoside)等黄酮类化合物,是西南地区药用黄芩的主流品种,药用历史悠久。主要用于治疗各种炎症。滇黄芩的黄芩苷含量居同属药用植物之首,有很大的药用价值及开发潜力<sup>[13]</sup>。该试验以滇黄芩的愈伤组织为试材,在培养基中添加不同浓度 MEL,观察其对愈

**第一作者简介:**张来军(1968-),女,甘肃庆阳人,博士,副教授,现主要从事细胞生物学研究等工作。

**责任作者:**贾敬芬(1938-),女,硕士,教授,博士生导师,研究方向为细胞生物学。E-mail:jjajf38@nwnu.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31260139);陕西省教育厅科学研究计划资助项目(11JS086);三亚市院地科技合作资助项目(2012YD37);琼州学院博士科研启动基金资助项目(QYXB201203)。

**收稿日期:**2012-12-11

RNA of *Manihot esculenta* Crantz can't be extracted using the Thermal Borate method, and total cassava stems RNA can be extracted effectively using the other three methods. The time (only 1.5 h) and quality of RNA extracted by Guanidinium isothiocyanate method were the best, which was a kind of simple and efficient method suitable for the extraction of total RNA from the stems of *Manihot esculenta* Crantz.

**Key words:** *Manihot esculenta* Crantz; total of RNA; different extraction methods; extraction effect

伤组织增殖与芽分化的影响,同时与生长素 IAA 和 NAA 进行比较,以期为更好的开发这种中药资源和揭示 MEL 在植物中的功能提供更多的试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试滇黄芩采自云南。选取春季新发出的植株叶片为外植体。

### 1.2 试验方法

1.2.1 滇黄芩愈伤组织的诱导 将叶片外植体用清水冲洗后,75%乙醇浸泡 30 s,后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 8 min 灭菌,无菌水冲洗 5 次,置于无菌滤纸上吸干水分。将叶片切成约 0.5 cm×0.5 cm 小块,接种于附加 6-BA (2.0 mg/L),NAA(0.2 mg/L),30 g/L 蔗糖和 7.0 g/L 琼脂的 MS 培养基(pH 5.8~6.2)上,培养 3 周,形成愈伤组织。并在相同培养基上继代培养,取旺盛增殖愈伤组织用于以下试验。培养温度(25±2)℃,光照强度 40 mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,16 h/8h 的光/暗培养。

#### 1.2.2 3 种外源生长调节物对愈伤组织增殖的影响

将 MEL、IAA、NAA 设为 100.0、10.0、1.0 及 0.1 μM 4 个浓度梯度,分别加入附加 30 g/L 蔗糖、7.0 g/L 琼脂 MS 培养基中。MEL、IAA、NAA 均过滤灭菌。接种前对盛有培养基的培养瓶先称重,记录其重量。将愈伤组织接种在附加有不同浓度 NAA、IAA、MEL 的 MS 培养基上,每个处理接种 3 瓶,每个瓶中接 20 块大小均一的愈伤组织,称量接种后的瓶重,确定接种的愈伤组织的重量。记录愈伤组织的生长状况,包括颜色,疏松程度及芽分化情况;并称量培养 3 周后愈伤组织的鲜重;105℃烘 30 min,60℃烘 12 h,至恒重即为干物重。培养条件与上述条件相同。试验设 3 次重复。

表 1 MEL、NAA 及 IAA 对滇黄芩愈伤组织生物量增长及芽分化的影响

Table 1 Effects of MEL, NAA and IAA on callus proliferation and differentiation

浓度 Concentration/μM	类型 Compound	接种愈伤组织鲜重 Callus weight inoculated/g	培养后愈伤组织鲜重 Callus weight after culture/g	平均愈伤组织增长率 Average of callus growth / %		平均芽分化率 Differentiation rate of adventitious shoots / %
				鲜重 Fresh weight	干重 Dry weight	
0	CK	1.60	2.91	84bc	85b	5.63c
	MEL	1.60	4.19	171abc	172ab	19.40ab
0.1	IAA	1.92	5.39	244a	248a	19.10ab
	NAA	1.96	3.64	109bc	99b	4.08c
1.0	MEL	1.89	4.77	146abc	149ab	30.40a
	IAA	1.87	5.15	183ab	181ab	26.80a
	NAA	1.81	3.32	80bc	78b	7.87bc
10.0	MEL	1.61	3.85	149abc	145ab	6.65c
	IAA	1.90	5.09	175abc	177ab	0.88c
	NAA	1.86	3.28	73c	74b	1.93c
100.0	MEL	1.93	4.30	124bc	124b	6.60c
	IAA	1.71	5.87	171abc	167ab	0
	NAA	1.63	2.81	74c	72b	0

注:小写字母表示邓肯氏新复极差法检验在 0.05 水平上差异显著。

Note: Lowercase letters mean Duncan's multiple range test in the 0.05 level are significant.

### 1.3 项目测定

鲜重增长率=(培养后愈伤组织鲜重-接种愈伤组织鲜重)/接种愈伤组织鲜重×100%;干重增长率=(培养后愈伤组织干重-接种愈伤组织干重)/接种愈伤组织干重×100%;折干率=∑培养后愈伤组织干重/∑培养后愈伤组织鲜重×100%<sup>[14]</sup>;愈伤组织分化率(%)=分化的愈伤组织块数/接种愈伤组织块数×100%。

### 1.4 数据分析

采用 Excel 2003 对数据进行统计,并用邓肯氏新复极差法检验其在 0.05 水平上的差异显著性,不同字母表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 种外源生长调节物对滇黄芩愈伤组织增殖的影响

NAA、IAA 和 MEL 以不同的浓度分别加在 MS 培养基中。由表 1 可知,培养 3 周后,3 种添加物对滇黄芩愈伤组织的增殖表现出不同的效应。与对照组相比,附加 MEL 和 IAA 的培养基上,施用的 4 种浓度均使愈伤组织显著增殖,且浓度越低,愈伤组织增长率越高,附加 NAA 的培养基上仅低浓度(0.1 μM)时促进愈伤组织增殖。0.1 μM 的浓度使得 3 种附加物对愈伤组织增殖的促进作用分别达到最佳效果,附加 MEL 的培养基,愈伤组织增殖为 171%,附加 IAA 时为 244%,而 NAA 条件下仅为 109%。随着浓度的提高,这种促进作用逐渐降低。浓度为 1.0 和 10.0 μM 时,附加 MEL 和 IAA 的培养基上,愈伤组织增殖率分别为 146%和 183%,149%和 175%,但仍高于对照,NAA 则没有促进作用。浓度为 100.0 μM 时,愈伤组织鲜重增长率最小,分别为 124%(MEL)、171%(IAA),NAA 则有抑制作用。除此以外,

附加的生长调节物种类和浓度对愈伤组织的颜色和质地也有影响,附加 NAA 的培养基上随浓度的逐级提高,愈伤组织由浅褐变为深褐色,结构较为致密,培养 3 周后愈伤组织严重褐化;附加 IAA 的培养基上,随浓度的逐级提高,愈伤组织由淡绿变为灰白,褐化程度也愈严重,MEL 浓度的高低对愈伤组织的颜色和结构影响均不大,几种浓度的培养基上均形成了淡绿、结构疏松的愈伤组织。

## 2.2 3 种外源生长调节物对不定芽和根分化的影响

不同浓度 NAA、IAA 和 MEL 诱导滇黄芩愈伤组织分化芽的效果差异极显著。如表 1 和图 1 所示,IAA 和

MEL 显著促进不定芽的分化。浓度越低,分化率越高。在  $1.0 \mu\text{M}$  的浓度下,附加 IAA、MEL 和 NAA 培养基上得到的愈伤组织分化率各自达到最高值,分别为 26.8%、30.4% 和 7.87%;且在此浓度下,仅有 MEL 作用的培养基上,愈伤组织分化出大量的丛生芽。然而 MEL 浓度越高,不定芽分化愈受到抑制,附加  $10 \mu\text{M}$  或  $100 \mu\text{M}$  MEL 培养基,愈伤组织仅有少量的分化芽。相同浓度 NAA 或 IAA 作用下,愈伤组织几乎没有不定芽分化;然而在附加 NAA 的培养基上产生了大量的不定根。附加 MEL 的培养基上培养 3 周后尚无明显的不定根产生。

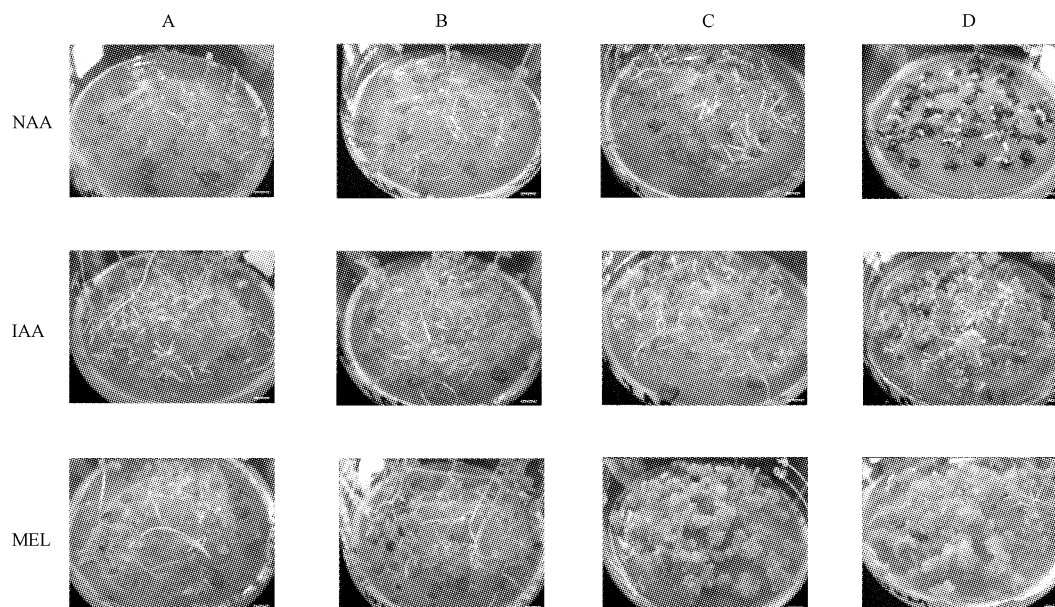


图 1 MEL、NAA 和 IAA 对滇黄芩愈伤组织生物量及分化的影响

注:A:  $0.1 \mu\text{M}$ ; B:  $1.0 \mu\text{M}$ ; C:  $10.0 \mu\text{M}$ ; D:  $100.0 \mu\text{M}$ 。

Fig. 1 Effects of MEL, NAA and IAA on callus proliferation and differentiation after 3 weeks of culture

Note: A:  $0.1 \mu\text{M}$ ; B:  $1.0 \mu\text{M}$ ; C:  $10.0 \mu\text{M}$ ; D:  $100.0 \mu\text{M}$ 。

## 3 讨论

生长素的种类及浓度在植物组织培养中对细胞分裂和器官再生起关键调节作用。在该试验中,相同浓度 MEL 与 IAA 作用类似,均促进了滇黄芩愈伤组织的增殖和芽的分化,且低浓度( $0.1 \mu\text{M}$  或  $1 \mu\text{M}$ )的促进效果更为明显。这一现象与外源 MEL 诱导羽扇豆下胚轴产生不定根<sup>[11]</sup>以及外源 MEL 促进芥菜(*Brassica juncea*)根的生长得到的结果相似<sup>[15]</sup>。试验结果显示,单独使用 NAA 对滇黄芩愈伤组织的增殖没有作用,且高浓度( $100 \mu\text{M}$ )的 NAA 导致愈伤组织严重褐化;NAA 诱导愈伤组织不定芽分化的能力也显著低于相同浓度的 IAA 和 MEL。另外,附加 MEL 的培养基中,各种浓度梯度下均形成了结构疏松,淡绿颜色的愈伤组织,且相比相同浓度的 IAA 高浓度的外源 MEL 诱导生成的愈伤组

织褐化程度更低。

MEL 是一种结构与 IAA 类似的吲哚类化合物,具有高脂性和部分亲水性。动物体内的 MEL 具有广泛的生理活性,参与中枢神经系统、生殖系统、免疫系统等多种生理活动。近年来许多植物的根、茎、叶、果实及其种子中都检测到了 MEL 的存在<sup>[16-18]</sup>。关于植物中 MEL 的功能研究也引起了人们的广泛关注。Chen 等<sup>[15]</sup>研究发现较低浓度的外源 MEL 提高了芥菜(*Brassica juncea*)内源 IAA 的含量,从而推测低浓度的 MEL 促进根的生长原因是外源 MEL 激发内源 IAA 的合成;而高浓度时对植物生长表现的抑制效果可能是由于 IAA 诱导乙烯合成造成的<sup>[19]</sup>;而且植物中 IAA、5-羟色胺(Serotonin)和 MEL 均由前体色氨酸合成,这一通路也可能涉及到器官的形成<sup>[20]</sup>。MEL 与  $\text{Ca}^{2+}$  激活的钙调蛋白有极高的亲和性<sup>[15]</sup>;植物生长素在一些生理反应中具有  $\text{Ca}^{2+}$  依

赖活性,植物中 MEL 与钙调蛋白的相互作用构成了信号传导的可能机制之一<sup>[20]</sup>。此外,在植物组织培养过程中,MEL 可能平衡了外植体在移植(Explanting)或者由于植物生长调节剂的处理而产生的氧化压力<sup>[20]</sup>。这或许是在培养滇黄芩愈伤组织的过程中,与相同浓度的 IAA 比较,高浓度的外源 MEL(100  $\mu$ M)产生更少褐化程度的原因,这一现象的应用价值及其相关的生理机制都值得更深入的研究探讨。

### 参考文献

- [1] Dubbels R, Reiter R J, Klenke E, et al. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Pineal Res, 1995, 18: 28-31.
- [2] Kolár J, Macháková I, Illnerová H, et al. Melatonin in higher plants determined by radioimmunoassay and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Biol Rhythm Res, 1995, 26: 406-409.
- [3] Tettamanti C, Cerabolini B, Gerola P, et al. Melatonin identification in medicinal plants[J]. Acta Phytotherapeutica, 2000(3): 137-144.
- [4] Murch S J, Hall B A, Le C H, et al. Changes in the levels of indoleamine phytochemicals during véraison and ripening of wine grapes[J]. J Pineal Res, 2010, 49: 95-100.
- [5] Hardeland R, Fuhrberg B, Balzer I. Melatonin in plants: mechanism of action in a unicellular alga and some perspectives of its role in multicellular plants. In: Hardeland R, ed. Actions and redox properties of melatonin and other aromatic amino acid metabolites[M]. Gottingen: Cuvillier Verlag, 2001: 70-79.
- [6] Arnao M B, Hernández-Ruiz J. Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots [J]. J Pineal Res, 2009, 46: 295-299.
- [7] 王英利, 王英娟, 郝建国, 等. 褪黑素对绿豆在增强 UV-B 辐射下的保护作用[J]. 光子学报, 2009, 38(10): 2629-2633.
- [8] Lei X Y, Zhu R Y, Zhang G Y, et al. Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: the possible involvement of polyamines[J]. J Pineal Res, 2004, 36: 126-131.
- [9] Zhao Y, Qi L W, Wang W M, et al. Melatonin improves the survival of cryopreserved callus of *Rhodiola crenulata* [J]. J Pineal Res, 2011, 50(1): 83-88.
- [10] Murch S J, Campbell S S B, Saxena P K. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis; regulation of auxin-induced root organogenesis in vitro-culture explants of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2001, 37: 786-793.
- [11] Arnao M B, Hernández-Ruiz J. Melatonin promotes adventitious- and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. [J]. J Pineal Res, 2007, 42: 147-152.
- [12] Hernández-Ruiz J, Arnao M B. Melatonin stimulates the expansion of etiolated lupin cotyledons[J]. Plant Growth Regul, 2008, 55: 29-34.
- [13] 孔祥鹤, 魏朔南. 滇黄芩的研究进展及作为黄芩药用的探讨[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(6): 8-11.
- [14] 文涛, 梁莉, 曾杨, 等. 不同光照强度对虎杖愈伤组织的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1277-1279.
- [15] Chen Q, Qi W B, Reiter R J, et al. Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea* [J]. J Plant Physiol, 2009, 166: 324-328.
- [16] Chen G, Huo Y, Tan D X, et al. Melatonin in Chinese medicinal herbs [J]. Life Sciences, 2003, 73: 19-26.
- [17] Murch S J, Simmons C B, Saxena P K. Melatonin in feverfew and other medicinal plants[J]. Lancet, 1997, 350: 1598-1599.
- [18] Murch S J, Rupasinghe H P, Goodenowe D, et al. A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) genotypes; discovery of novel compounds[J]. Plant Cell Reports, 2004, 23: 419-425.
- [19] Hernández-Ruiz J, Cano A, Arnao M B. Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species[J]. J Pineal Res, 2005, 39: 137-142.
- [20] Jones M P A, Cao J, O'Brien R, et al. The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. [J]. Plant Cell Rep, 2007, 26: 1481-1490.

## Effect of Melatonin on the Proliferation and Differentiation of Calli of *Scutellaria amoena*

ZHANG Lai-jun<sup>1,2</sup>, JIA Jing-fen<sup>2</sup>

(1. College of Biological Science and Technology, Qiongzhou University, Sanya, Hainan 572022; 2. College of Life Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069)

**Abstract:** Taking *Scutellaria amoena* as material, the effects of different concentrations of exogenous melatonin on the callus proliferation and the differentiation of adventitious buds of *Scutellaria amoena* were studied. The results showed that the supplement of melatonin at 0.1, 1.0, 10.0 and 100.0  $\mu$ M in the MS medium remarkably improved the frequency of callus proliferation compared with the control (MS medium without melatonin). Same concentration of indole-3-acetic acid (IAA) in the medium exhibited similar effects, but  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) did not promote callus growth. Lower concentration (0.1 or 1.0  $\mu$ M) of melatonin or IAA added in the medium could increase the differentiation frequency of adventitious buds from callus, however higher level of melatonin or IAA inhibited the bud differentiation.

**Key words:** melatonin; *Scutellaria amoena*; callus proliferation; bud differentiation