

苦豆子愈伤组织培养及其药用成分含量测定

杨春霞,黄丽莉,章挺,朱培林
(江西省林业科学院,南昌 330032)

摘要:本研究利用组织培养技术考察外植体种类、激素水平、水解酪蛋白浓度等不同因子对愈伤组织的生长状态的影响;同时采用分光光度法和HPLC测定不同继代次数愈伤组织中总黄酮和槐定碱的含量。结果表明,苦豆子愈伤组织诱导的最适外植体是子叶;愈伤组织诱导的最佳培养基为MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,最佳继代培养基为MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+CH 1000 mg/L;总黄酮和槐定碱在第5次继代培养的愈伤组织中含量最高,分别为0.53%和0.0112%。因此,可选择第5次继代培养的愈伤组织作为苦豆子细胞悬浮培养的材料。

关键词:苦豆子;愈伤组织;组织培养;总黄酮;槐定碱

中图分类号:Q943.1

文献标志码:A

论文编号:2011-0853

Callus Culture of *Sophora alopecuroides* L. and Its Medicinal Components Determination

Yang Chunxia, Huang Lili, Zhang Ting, Zhu Peilin
(Jiangxi Academy of Forestry Science, Nanchang 330032)

Abstract: The effects of explants type, hormone levels, casein hydrolysate on the growth of callus were measured by tissue culture. Meanwhile, the contents of total flavonoids and sophoridine in callus of different subculture times were determined by ultraviolet spectrophotometry and HPLC. The results showed that the cotyledon was optimum explants of callus induction, the best medium of callus induction was MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, and the best subculture medium was MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+CH 1000 mg/L. Contents of total flavonoids and sophoridine in callus of fifth subculture had the maximum, and 0.53% and 0.0112% respectively. So, the callus of fifth subculture was selected to use for material of cell suspension culture of *S. alopecuroides*.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.; callus; tissue culture; total flavonoids; sophoridine

0 引言

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)别名苦豆根、苦甘草、西豆根、苦豆草、欧苦参等,为豆科槐属多年生草本植物,主要分布在中国西北、华北地区以及中亚一带,具有清热解毒、祛风燥湿、止痛杀虫、抗癌、增强免疫等作用^[1]。苦豆子含有多种化学成分,主要包括生物碱、黄酮类、有机酸、氨基酸、蛋白质和多糖类等,其他还有脂肪酸及无机元素等^[2],但天然植物体内化学成分的含量较低,为了提取药用成分,必须大量开采苦

豆子野生植株,势必造成野生资源枯竭,破坏生态平衡。生物技术的快速发展为解决这一问题带来曙光,通过植物细胞培养可以生产天然的植物成分并提高其成分含量,这一技术在红豆杉^[3]、杜仲^[4]、人参^[5]等植物中应用较为成熟。

2006年,李雪梅等^[4]从苦豆子中分离出抗肿瘤新药槐定碱后,利用苦豆子细胞培养来生产槐定碱等药用成分则更具重要现实意义。然而,截止目前为止,对利用苦豆子细胞培养来生产槐定碱等药用成分的研究

基金项目:中央财政林业科技推广示范资金项目([2010]JXTG-04);江西省林业科学院青年科技人才培养项目(2008521202)。

第一作者简介:杨春霞,女,1979年出生,河南滑县人,助理研究员,硕士,主要从事林木育种及中药材种植方面的科研研究。通信地址:330032 江西省南昌经开区枫林西大街1629号 江西省林业科学院, Tel: 0791-3833641, E-mail: kelongrenyihao@126.com。

通讯作者:朱培林,男,1964年出生,江西南康人,研究员,主要从事中药材育种与栽培方面的研究。通信地址:330032 江西省南昌经开区枫林西大街1629号 江西省林业科学院, Tel: 0791-3833803, E-mail: yczpl@126.com。

收稿日期:2011-03-29, **修回日期:**2011-06-27。

几乎是空白,在苦豆子组织培养及愈伤组织中化学成分提取等方面的研究有较少报道,如饶品昌等^[5]对苦豆子愈伤组织诱导培养基及愈伤组织生物碱成分进行研究,研究较浅,且愈伤组织中槐定碱含量较低(0.0045%);李晓莹等^[6]以得到苦豆子再生植株为目的也进行了愈伤组织诱导及增殖研究,但不系统,且出愈率较低;王立强等^[7]对苦豆子愈伤组织诱导及继代培养研究较为成熟,得到了愈伤组织诱导及继代的最佳培养基,但容易褐化;曹有龙等^[8]对苦豆子的组织培养及植株再生进行了研究,虽然研究中愈伤组织出愈率达到了100%,但愈伤组织褐化提前。本研究在已有的研究基础上,开展苦豆子愈伤组织培养实验,得到生长状态良好的愈伤组织,且褐化率低;分别采用紫外分光光度计法和HPLC测定愈伤组织中总黄酮及槐定碱的含量,槐定碱含量远远高于以往的研究(0.0112%),为建立大规模细胞培养生产苦豆子槐定碱等药用成分提供优质原料和必要的技术依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

购于中国甘肃省武威市苦豆子种子,由江西省药物研究所药用植物学专家朱良辉研究员鉴定。

芦丁购于中国药品生物制品检定所(批号:100080-200707),槐定碱对照品购于上海同田生物技术有限公司(批号:09061521)。

1.2 外植体处理

将浸泡24 h苦豆子种子用洗洁精清洗,流水冲洗2~3 h,置于超净工作台上,75%酒精消毒1 min,无菌水冲洗2次,然后再用0.1%升汞浸泡15 min,无菌水冲洗6~8次,无菌滤纸吸干水分,放入基本培养基MS(30 g/L蔗糖,6 g/L卡拉胶,调节pH为5.7~5.8,121℃高压灭菌20 min)上,诱导其发芽。

1.3 不同因素对愈伤组织诱导的影响

研究不同外植体、不同激素浓度对愈伤组织诱导的影响,30天后观察愈伤组织的生长情况,并计算出愈率,筛选最佳苦豆子愈伤组织诱导培养基。

1.4 愈伤组织继代培养

研究不同激素配比及水解酪蛋白浓度对苦豆子继代增殖的影响,25天左右观察愈伤组织增殖情况,计

算增殖系数,确定最佳苦豆子继代培养基配方和最适的水解酪蛋白浓度。

1.5 紫外分光光度法测定愈伤组织中总黄酮含量

精密称取于芦丁对照品25.147 mg置于50 mL量瓶中,加入无水乙醇,50℃水浴使溶解,放冷,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液(含无水芦丁0.50294 mg/mL)。

精密称取苦豆子愈伤组织粉末约0.2 g,加70%乙醇适量煮沸煎煮2次,每次2 h,合并2次煎液,滤过后浓缩至膏状,加无水乙醇,定容至10 mL,摇匀,即得供试品溶液。精密吸取供试品溶液1 mL,以30%无水乙醇作为空白对照,在510 nm处立即测定吸光度,根据标准曲线方程计算总黄酮含量。

1.6 HPLC测定槐定碱含量

精密称取60℃条件下干燥恒重的苦豆子培养物(过40目)0.2 g,置10 mL具塞锥形瓶中,精密加入甲醇至刻度,超声提取30 min,取上清液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,滤液保存在4℃冰箱中即为样品制备液^[8]。Merck C18色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈:0.1%磷酸水溶液(用三乙胺调pH值至(2.00±0.03)(80:20);体积流量1.0 mL/min^[9]。检测波长220 nm;柱温30℃;进样量20 μL。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对苦豆子愈伤组织诱导的影响

以苦豆子下胚轴、子叶、茎段为外植体,接种于MS+2,4-D 0.5 mg/L(以下单位同)+NAA 0.5+6-BA 1.0培养基上,30天后愈伤组织诱导情况见表1。结果显示,以子叶为外植体诱导愈伤组织效果最好,出愈率最高,达到100%,且愈伤组织生长状态好,呈浅绿色,结构致密;下胚轴为外植体诱导愈伤组织出愈率较高,达到80%,愈伤组织呈乳白色,结构疏松;茎段为外植体诱导愈伤组织最差,出愈率低,仅为20%,且愈伤组织生长状态不佳,略呈黄色,愈伤组织坚硬,不易进行继代培养。

2.2 不同植物生长调节剂对苦豆子愈伤组织诱导的影响

将苦豆子子叶接种在添加不同浓度激素2,4-D、6-BA及NAA的MS培养基上,培养7天后,部分叶片

表1 不同外植体诱导愈伤组织诱导的效果

外植体	接种数/个	出愈数/个	出愈率/%	愈伤组织生长情况
子叶	60	60	100	呈浅绿色,结构致密
下胚轴	60	48	80	呈乳白色,结构疏松
茎段	60	12	20	略呈黄色,质地较硬

开始膨胀,15天后切口处有细小的绿色愈伤组织突起,30天后愈伤组织生长结果,见表2。

由表2可知,不同植物生长调节剂对苦豆子愈伤组织诱导有显著差异。在2,4-D和6-BA配比为1/2时,出愈率较高位80%,在此基础上,添加0.5 mg/L NAA诱导效果更好,达到100%,且愈伤组织生长状态较好。随着激素浓度的增加,出愈率不断降低,当2,4-D、6-BA、

NAA浓度分别为2.0、1.5、1.0 mg/L时,出愈率最低,仅为8.33%。因此,苦豆子愈伤组织诱导的最佳培养基为:MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

2.3 愈伤组织继代培养

选择生长状态较好的愈伤组织小块,接种于添加不同激素配比的继代培养基上,25天后计算增殖系数,结果见表3。

表2 不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

编号	激素/(mg/L)			外植体数/个	愈伤组织数/块	出愈率/%
	2,4-D	6-BA	NAA			
1	0.5	0.5	0	60	25	41.67
2	0.5	1.0	0	60	48	80
3	0.5	1.0	0.5	60	60	100
4	1.0	1.0	0.5	60	41	68.33
5	1.0	1.5	0.5	60	36	60
6	1.5	1.0	0.5	60	28	46.67
7	1.5	1.0	1.0	60	15	25
8	2.0	1.5	1.0	60	5	8.33

表3 不同激素对比对愈伤组织增殖的影响

编号	培养基	平均接种鲜重/g	平均收获鲜重/g	增殖系数
1	MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L	3.5	6.8	1.94
2	MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L	3.2	7.1	2.21
3	MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L	4.0	6.0	1.50
4	MS+2,4-D 0.2 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L	3.8	4.86	1.28

表3结果显示,不同激素浓度对比对愈伤组织增殖的影响明显,较低激素浓度不利于苦豆子愈伤组织的增殖,较高激素浓度可以较好地使愈伤组织得到增殖,试验中苦豆子增殖的最佳培养基为MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L,增殖系数达2.21,且生长状态良好,见图1。

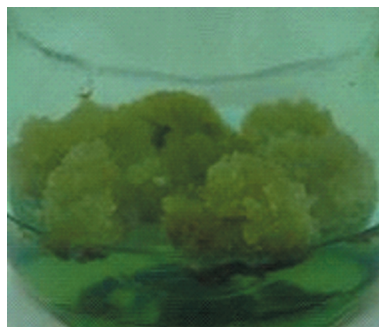


图1 苦豆子愈伤组织继代增殖

2.4 添加不同浓度的水解酪蛋白对愈伤组织生长的影响

在苦豆子愈伤组织继代培养中,添加不同浓度的

水解酪蛋白(CH)对愈伤组织的生长有一定的影响,结果见图2。结果表明,起初随着CH浓度的增加,增殖系数也不断增加,当CH浓度增至1000 mg/L时,增殖系数达到最大,为2.85;CH浓度再增加,增殖系数变小,当CH浓度为2000 mg/L时,增殖系数仅为1.78。

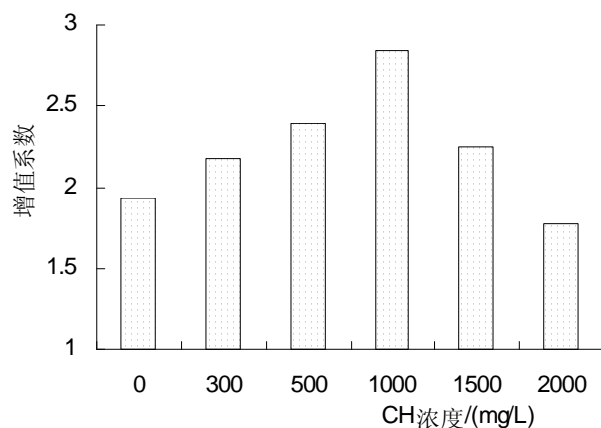


图2 不同浓度CH对愈伤组织生长的影响

因此,添加CH的最佳浓度为1000 mg/L。

2.5 总黄酮及槐定碱含量测定

以苦豆子全株(组培苗)为参照,分别取不同继代次数愈伤组织样品测定总黄酮和槐定碱含量,结果见图3。从图3可知,苦豆子愈伤组织中总黄酮和槐定碱的含量都是随着继代次数增加而增加,到第5代时达到最大值,总黄酮和槐定碱的含量分别达到0.53%和0.0112%,略低于或高于苦豆子全株植物,第6代后又开始减少,因此从有效成分含量上讲,取第5代愈伤组织来进行细胞悬浮培养较好。

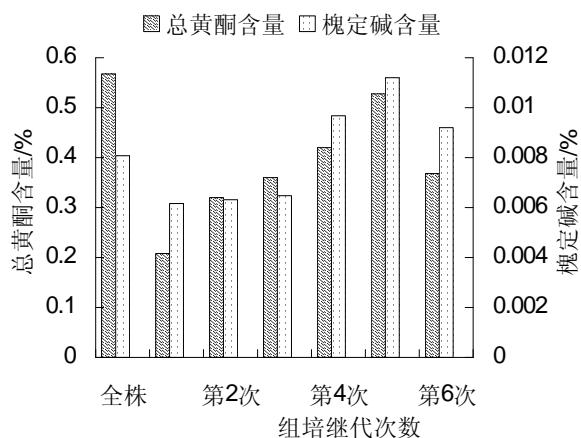


图3 总黄酮及槐定碱含量测定结果

3 讨论与结论

3.1 愈伤组织培养

愈伤组织培养受基本培养基、外植体、激素、碳源、pH值等因素的影响,其中,生长调节物质对愈伤组织的诱导的影响最为复杂^[10-11],在植物离体培养的过程中,外植体的内源激素水平不断变化,在培养基中添加不同种类、不同浓度的生长调节物质可以改变和影响内源激素的水平,从而影响到外植体的生长状况。本研究在已有研究的基础上,摸索了不同外植体种类、激素配比等因素对苦豆子愈伤组织培养的影响。在外植体选择上,以子叶为外植体时愈伤组织生长最好;以下胚轴为外植体时,愈伤组织诱导率也较高,但愈伤组织生长状态不佳,特别是在最初诱导时,外面被一层类似“表皮”的东西包裹,含水量高,结构疏松,不利于愈伤组织的生长;茎段为外植体时,诱导效果最差,可能是由于茎段较为细嫩,致使诱导愈伤组织较为困难。

在激素选择及配比上,试验结果表明,在愈伤组织诱导时添加NAA诱导效果更好,且激素浓度不易过高,过高愈伤组织容易褐化死亡;但在愈伤组织继代培养中,则需要提高激素浓度,特别是需要提高细胞分裂

素6-BA的浓度,有利于愈伤组织的生长,且不易出现褐化现象,而王立强等^[7]研究愈伤组织继代中激素浓度相对较低,容易褐化,本研究通过调整激素浓度及配比克服了这一缺陷。在苦豆子继代培养时,添加浓度为1000 mg/L的水解酪蛋白能更好地促进愈伤组织生长,这可能是因为水解酪蛋白是氨基酸、多肽、蛋白质等混合物,能为愈伤组织的生长提供丰富的有机氮素营养的缘故,因此,水解酪蛋白常常被应用于组织培养实验中,Chawla^[12]认为100~1000 mg/L的浓度比较适宜,与本实验结果一致,而以往的研究中除了曹有龙等^[8]在愈伤组织诱导中添加500 mg/L CH外,其他研究中均没有添加CH^[5-7],这可能是本研究中愈伤组织生长较好的一个因素之一。

3.2 有效成分提取分析

以苦豆子组培苗全株为对照,笔者测定了不同继代次数愈伤组织样品中总黄酮及槐定碱含量,发现继代次数与有效成分含量的关系呈抛物线型,起初愈伤组织中总黄酮和槐定碱的含量都随着继代次数的增加而增加,至第5代时均达到最大值,之后总黄酮及槐定碱含量又逐渐减少,这可能是由于在继代过程中,随着愈伤组织细胞对生长环境的不断适应,其生长能力在不断加强,而往往与抗病、抗逆相关的次生代谢产物的形成和积累却逐渐被削弱了的缘故。苦豆子愈伤组织中总黄酮和槐定碱含量与组培苗全株相比,差别不大,甚至在第5代槐定碱含量还高于全株,但与野生植株(总黄酮含量为1.28%^[13];槐定碱含量为0.5702%,其中茎叶中含量为0.0136%,种子中含量为0.5566%^[4])相比,总黄酮含量相差不大,槐定碱含量差异较明显,可能是由于生长环境不同,或是本研究诱导愈伤组织以子叶为材料的缘故。但相比以前的研究中愈伤组织中槐定碱的含量仅为0.0045%而言,本研究得到的愈伤组织中槐定碱的含量得到很大的提高,特别是第5次继代的愈伤组织中槐定碱含量达到0.012%。因此,综合考虑愈伤组织生长量、稳定性及药用成分含量,可选择第5代愈伤组织作为细胞悬浮培养的接种材料,并且在后续的细胞悬浮培养研究中,可采取适当的措施来增加药用成分含量,特别是槐定碱的含量,为通过细胞培养来大规模生产药用成分提供技术支撑。

参考文献

- [1] 杨家新,喻志芳.苦豆子的研究进展[J].天津药学,1998,10(1):43-45.
- [2] 王键,王洪新,吕潭玲.苦豆子种子无机元素及其油中脂肪酸成分分析[J].中药材,2002,25(2):107.
- [3] Homare Tabata. Paclitaxel Production by Plant-Cell-Culture

- Technology[J]. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 2004,(7):1-23.
- [4] 王亚琴,朱媛,杜仲细胞悬浮培养生产桃叶珊瑚甙的研究[J]. *广西植物*,2007,27(2):236-239.
- [5] 岳才军,何彦平.人参胚愈伤组织诱导和悬浮培养的研究[J]. *安徽农业科学*,2010,(14):7193-7194.
- [6] 李雪梅,吴运光,潘达鑫,等.新型抗肿瘤药槐定碱[J]. *中国新药杂志*, 2006,15(8):654-657.
- [7] 饶品昌,刘贤旺.苦豆子组织培养及有效成分分析[J]. *江西中医学院学报*,1992,4(2):33.
- [8] 李晓莺,曹有龙,贝鑫临,等.苦豆子组织培养初步研究[J]. *甘肃农业科技*,2004,(12):12-14.
- [9] 王立强,杨军,王光碧,等.苦豆子愈伤组织的诱导与继代培养的去褐化研究[J]. *西华师范大学学报:自然科学版*,2008,29(4):421-430.
- [10] 曹有龙,李晓莺,罗青,等.苦豆子的组织培养及植株再生的研究[J]. *广西植物*,2010,30(1):102-105.
- [11] 古丽娜·沙比尔,吴韬,阿吉艾克拜尔·艾萨,等.苦豆子 HPLC 色谱指纹图谱研究[J]. *中药材*,2008, 1(31):38-41.
- [12] 史文静.苦豆子营养器官的结构发育及其有效成分积累相关性的研究[D].西安:西北大学,2008.
- [13] 任冬梅,黄学林,黄上志.细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. *植物生理学通讯*,1996,32(5):373-377.
- [14] 谷瑞升,蒋湘宁,郭仲琛.植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J]. *植物学通报*,1999,16(3):1-4.
- [15] H S 查夫拉.植物生物技术导论(第二版)[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [16] 李艳艳,冯俊涛,张兴,等.苦豆子化学成分及其生物活性研究进展[J]. *西北农业学报*,2005,14(2):133-136.