

## 不同碳源对柽柳丛生芽生长、三萜及黄酮物质积累的影响

王思瑶<sup>1</sup>, 崔瞳彤<sup>1</sup>, 翟睿<sup>1</sup>, 林香雨<sup>1</sup>, 李欣<sup>1</sup>, 孙璐<sup>1</sup>, 詹亚光<sup>1,2</sup>, 尹静<sup>1,2\*</sup>

东北林业大学<sup>1</sup>生命科学学院, <sup>2</sup>林学院林木遗传育种与生物技术国家重点实验室, 哈尔滨150040

**摘要:** 本研究以内蒙古柽柳(*Tamarix chinensis*)嫩枝为外植体, 分别在培养基中添加不同碳源(蔗糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉)及不同浓度(10、20、30、40 g·L<sup>-1</sup>)的蔗糖, 研究柽柳丛生芽生长量和次生产物含量积累的变化。结果表明, 不同碳源及蔗糖浓度均对柽柳丛生芽生长量和次生产物积累有显著影响, 其中, 适合柽柳丛生芽生长的碳源为蔗糖, 最适蔗糖浓度为10 g·L<sup>-1</sup>, 培养35 d后其生长量显著高于其他处理。当以蔗糖为碳源时, 柽柳组培苗一个生长周期(35 d)内的总黄酮及三萜组分(白桦脂酸、白桦脂醇、齐墩果酸)含量均较高。当蔗糖浓度为30 g·L<sup>-1</sup>时有利于总黄酮的积累, 含量可达16.65 mg·g<sup>-1</sup> (DW); 而10 g·L<sup>-1</sup>蔗糖浓度对三萜组分积累更有利, 白桦脂酸、白桦脂醇、齐墩果酸含量分别可达2.67、6.86、0.85 mg·g<sup>-1</sup> (DW)。当碳源浓度为30 g·L<sup>-1</sup>时, 总三萜含量以葡萄糖处理为最高, 可达62.43 mg·g<sup>-1</sup> (DW), 蔗糖次之, 麦芽糖最低。该研究结果为通过生物发酵方法进行柽柳药用成分的规模化生产奠定了基础。

**关键词:** 柽柳; 碳源; 次生代谢; 组织培养

柽柳(*Tamarix chinensis*)具耐旱、耐盐碱、耐贫瘠等多种生物抗性, 是良好的巩固沙土地带树木和盐碱地改造树木(尹克杰2002)。近年来的研究显示, 柽柳嫩枝叶中含有丰富的次生代谢产物, 如黄酮、三萜、苯丙酸、有机酸、甾体、鞣质等及脂肪烷烃等(张媛和屠鹏飞2008), 具有保肝护肝、抗炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤作用(Ksouri等2009; 廖菁等2012; 夏江宝等2013), 其中, 萜类和多酚类成分是近年来天然产物研究热点, 具有很强的抗氧化、抗衰老活性(黄时伟和梁敬钰2007)。王斌等(2009)对柽柳抗肿瘤化学成分进行分离和鉴定, 发现部分萜类化合物成分对人肝癌、肺癌细胞显示有意义的细胞毒活性, 分离的甾类和黄酮化合物对人肺癌细胞有较强的细胞毒活性。之前的研究也显示, 白桦脂酸和白桦脂醇三萜成分可高效抑制多种肿瘤及HIV病毒活性, 极具开发潜力(Dang等2012)。毕江涛等(2013)通过对柽柳内生真菌分离及其抑菌活性研究, 初步明确11株菌对2种或多种植物病原真菌有不同程度的抑制作用。可见, 柽柳属植物具有丰富的活性药用成分, 其进一步开发与利用具有广阔前景。

关于柽柳组织培养和快速繁殖的研究已有报道(韦小敏等2006; 刘振林等2013; 乔梦吉等2007), 但利用柽柳丛生芽、组织培养材料进行次生产物研究的不多, 原因是其次生产物丰富, 常常会抑制生长而影响其进一步扩大培养。利用植物细胞大规模培养生产有用的次生代谢产物是解决目前部分天然产物资源短缺的有效途径之一(李雅丽等2015)。本实验

室前期以内蒙柽柳嫩枝为外植体, 分别进行8种激素组合及5种类型培养基处理, 探讨了柽柳组培苗生长和次生产物积累的最适激素及培养基, 明确柽柳丛生芽的最佳生长培养基为MS附加6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>和NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>(王思瑶等2014)。

糖是植物的能量来源和组成结构物质的重要元件(何亚飞等2016), 也是培养基的主要成分, 其不同种类和浓度对药用植物的生长及次生代谢产物的积累至关重要。研究显示, 果糖最有利于甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)愈伤组织生物量积累和黄酮类化合物的生物合成(杨世海等2006); 而30 g·L<sup>-1</sup>的蔗糖浓度有利于秦艽(*Gentiana macrophylla*)悬浮细胞的生长及龙胆苦苷积累(齐香君等2010)。碳源对雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)愈伤组织生长和次生代谢产物含量也有显著的影响(李琰等2010)。可见, 不同的物种对于碳源种类及量的反应不同。本实验以柽柳为试材, 通过不同碳源及浓度的筛选, 以期明确柽柳组织生长及次生产物合成对碳源的需求, 为进一步通过发酵方法规模生产柽柳药用成分技术体系的建立提供依据。

## 材料与amp;方法

### 1 植物材料

2015年8月, 取直径为1~2 cm的十五年生内蒙

收稿 2017-07-21 修定 2017-11-08

资助 国家自然科学基金(31570589)、中央高校基本科研业务费(257-2017DY02)和东北林业大学本科创新课题(201710225109)。

\* 通讯作者(E-mail: yinjing20135@163.com)。

古红皮柽柳(*Tamarix chinensis* Lour.)组织培养苗枝条,扦插于花盆中,待嫩芽长至1 cm左右,进行无菌消毒(乔梦吉等2007)后,移至MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA的培养基中培养。

## 2 实验设计

柽柳组织培养中常选用蔗糖为碳源,添加量为3% (程磊和周根余2001; 孙旭旭等2009; 韩琳娜和周凤琴2010),故将上述继代培养多次的柽柳组培苗进行不同碳源(蔗糖、果糖、麦芽糖、淀粉、葡萄糖)处理时,以MS为基本培养基,碳源统一添加浓度为30 g·L<sup>-1</sup>,筛选最佳碳源。进行不同蔗糖浓度筛选时,设10、20、30、40 g·L<sup>-1</sup>四个处理。不同处理均接种在100 mL三角瓶中,内装50 mL固体培养基,接种量为柽柳组培芽0.30 g,每个处理重复接种10瓶。培养35 d后收获材料,测定鲜重,烘干至恒重后测定干重,同时进行次生产物总黄酮、总三萜、白桦脂酸、白桦脂醇、齐墩果酸含量检测和分析。所有处理及测量均3次重复。利用SPSS软件对不同处理获得数据进行邓肯方差分析。

所采用的固体培养基中添加琼脂粉5.3 g·L<sup>-1</sup>, pH值为6.0~6.5,以121°C高压蒸汽灭菌20 min。培养条件为:温度24~26°C;光照强度36 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照16 h·d<sup>-1</sup>;湿度40%~50%。

## 3 检测方法

### 3.1 总三萜样品的制备及检测

总三萜含量采用紫外分光光度法测定,具体步骤参考李春晓等(2012)。每种处理3次重复,分别精确称取0.05 g柽柳芽烘干材料,检测样品总三萜的含量,计算平均值。

### 3.2 黄酮样品的制备及检测

黄酮样品的制备及检测参考王思瑶等(2014)的方法。

### 3.3 白桦脂酸、白桦脂醇及齐墩果酸的测定

齐墩果酸、白桦脂酸和白桦脂醇的提取参照谭朝阳和袁宏佳(2010)的方法,线性关系考察参考任春林等(2012)的方法。齐墩果酸回归方程为:  $y=10^7x+33\ 446$ ,  $R^2=0.9992$ ; 白桦脂醇回归方程为:  $y=10^7x+8\ 269.9$ ,  $R^2=0.9994$ ; 白桦脂酸回归方程为:  $y=3\times 10^6x-2\ 349.6$ ,  $R^2=0.9994$ 。3种物质均在0.2~5.0 μg范围内具有良好的线性关系。高效液相色谱(HPLC)检测条件为:用Waters公司600-717-2487色谱系统,色谱柱HiQsil C18V 4.6 mm×250 mm;流动相为乙腈:水=9:1;柱温25°C;灵敏度16 AUFS;流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长210 nm,进样量20 μL。

## 实验结果

### 1 不同碳源对柽柳组培苗生长及次生产物含量的影响

#### 1.1 不同碳源对组培苗生长量的影响

不同碳源中以葡萄糖和蔗糖处理对柽柳组培苗鲜重增加较明显,分别比初始接种量提高6.17和5.99倍;其次为果糖;而当以麦芽糖和淀粉为碳源时对柽柳生长促进作用不及其他处理,柽柳鲜重只分别为原接种量的1.71和1.96倍。干重与鲜重的变化趋势基本接近,不同碳源对柽柳生长量的促进作用表现为:蔗糖>葡萄糖>果糖>麦芽糖>淀粉(图1)。

#### 1.2 不同碳源对次生产物含量的影响

由图2可见,最利于柽柳生长及代谢产物积累

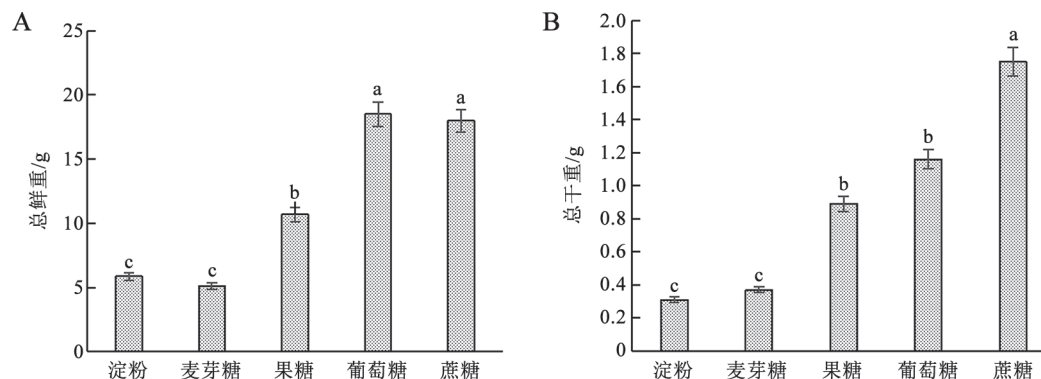


图1 不同碳源对柽柳从生芽生长的影响

Fig.1 Effects of different carbon sources on cluster bud growth of *T. chinensis*

小写字母表示不同处理在 $P<0.05$ 水平上差异显著,下同。

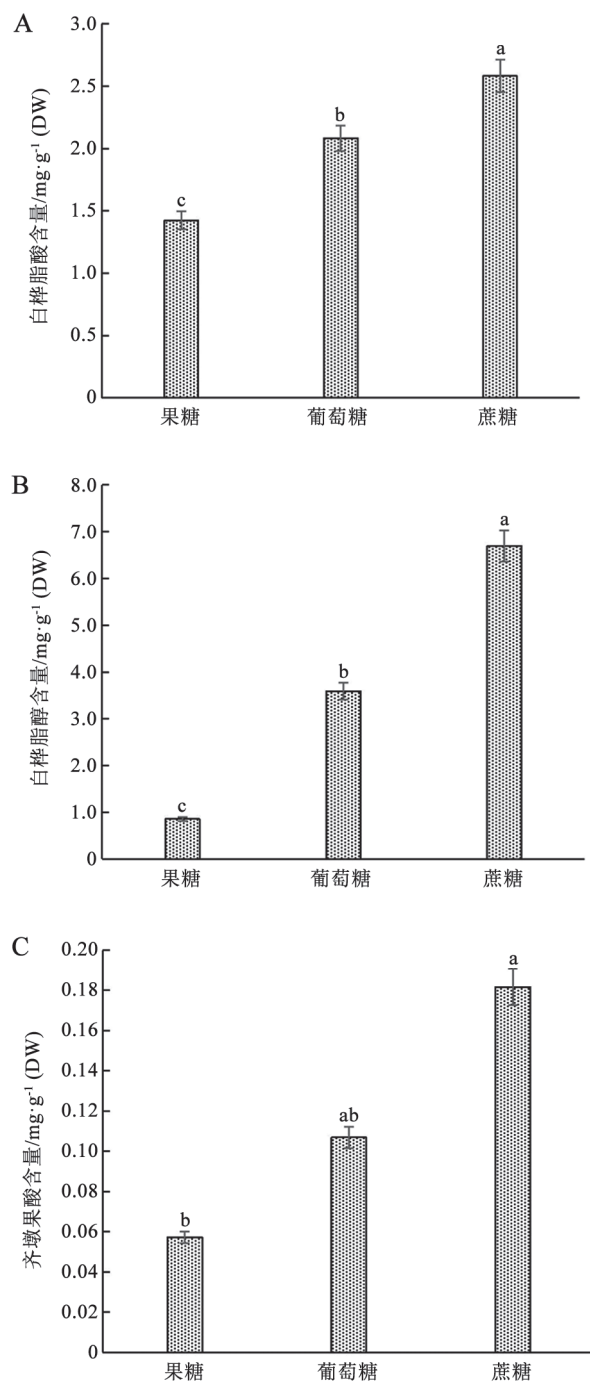


图2 不同碳源对柞柳丛生芽中白桦脂酸、白桦脂醇、齐墩果酸含量的影响

Fig.2 Effects of different carbon sources on contents of betulinic acid, betulin and oleanolic acid in *T. chinensis* cluster buds

的碳源是蔗糖,除总三萜含量外,总黄酮、齐墩果酸、白桦脂酸、白桦脂醇的含量均最高,葡萄糖的作用仅次于蔗糖。不同碳源中,以添加蔗糖的总黄酮含量最高,其次为葡萄糖和果糖,而麦芽糖

和淀粉的较低,以蔗糖为碳源的总黄酮含量是淀粉的5.06倍(图3)。淀粉和果糖不利于柞柳生长,干物质积累过低,所以未测定以这两种碳源培养的组培苗中齐墩果酸、白桦脂酸、白桦脂醇3种代谢产物的含量。值得注意的是,以葡萄糖为碳源时,柞柳鲜重比接种量提高6.17倍,且柞柳中总三萜含量最高,为62.43 mg·g<sup>-1</sup> (DW),其次是蔗糖和果糖,麦芽糖最低(图3)。

## 2 不同蔗糖浓度对柞柳组培苗生长量及次生产物含量的影响

### 2.1 不同蔗糖浓度对生长量的影响

由图4可见,添加的不同蔗糖浓度中以10 g·L<sup>-1</sup>的柞柳丛生苗鲜重比接种量增加最高,培养35 d生长量提高6.82倍,其次为20和30 g·L<sup>-1</sup>,当蔗糖浓度为40 g·L<sup>-1</sup>时鲜重增加量最小,35 d生长量提高2.87倍。表明添加的蔗糖浓度越高越不利于柞柳鲜重增加。总干重与总鲜重的变化趋势基本一致。

### 2.2 不同蔗糖浓度对次生产物含量的影响

图5显示,当添加的蔗糖浓度为30 g·L<sup>-1</sup>时,总黄酮含量最高,可达16.65 mg·g<sup>-1</sup> (DW),其次为20和10 g·L<sup>-1</sup>,40 g·L<sup>-1</sup>时总黄酮含量较低。当添加的蔗糖浓度为40 g·L<sup>-1</sup>时总三萜含量最高,为65.14 mg·g<sup>-1</sup> (DW),其次为30 g·L<sup>-1</sup>,再次为20和10 g·L<sup>-1</sup>。表明随着蔗糖浓度的升高,柞柳中总三萜含量也呈现升高趋势。

随着蔗糖浓度的升高,柞柳中白桦脂酸和白桦脂醇含量呈现下降趋势(图6)。不同蔗糖浓度对柞柳齐墩果酸含量影响的结果表明,只有当蔗糖的添加量为10 g·L<sup>-1</sup>时,柞柳中可检测到齐墩果酸的含量为0.85 mg·g<sup>-1</sup> (DW);提高蔗糖浓度后,由于齐墩果酸含量过低,未能检出(结果未列出)。说明高浓度的蔗糖不利于柞柳中齐墩果酸含量的积累。

## 讨 论

糖作为培养基中不可或缺的碳源,在植物组织培养中维持着渗透压,并提供植物生长所需的物质能量,同时糖的种类对植物的生长和次生代谢产物积累起着重要的作用(董诚明等2009)。较多的研究都证明组织培养时,采用蔗糖作为碳源最好(李汉伟等2010)。方强等(2008)在研究中发现,碳源对促进黄芩(*Scutellaria baicalensis*)中黄芩素含量提高的影响顺序依次为:蔗糖>葡萄糖>麦

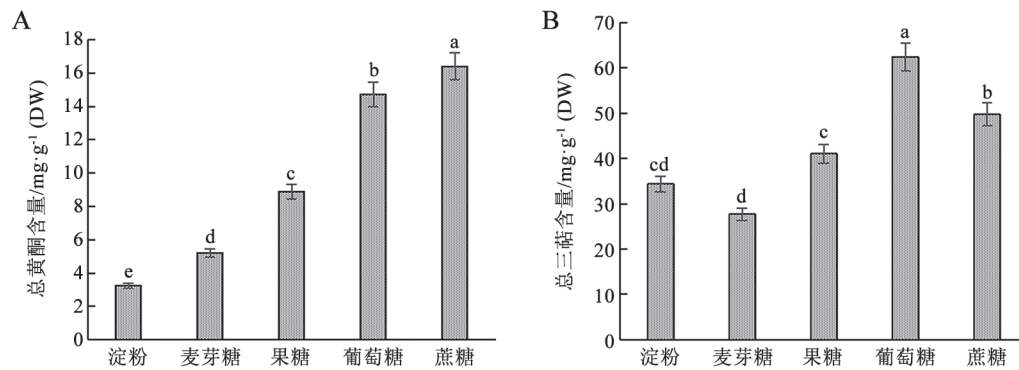


图3 不同碳源对柞柳丛生芽中总黄酮和总三萜含量的影响

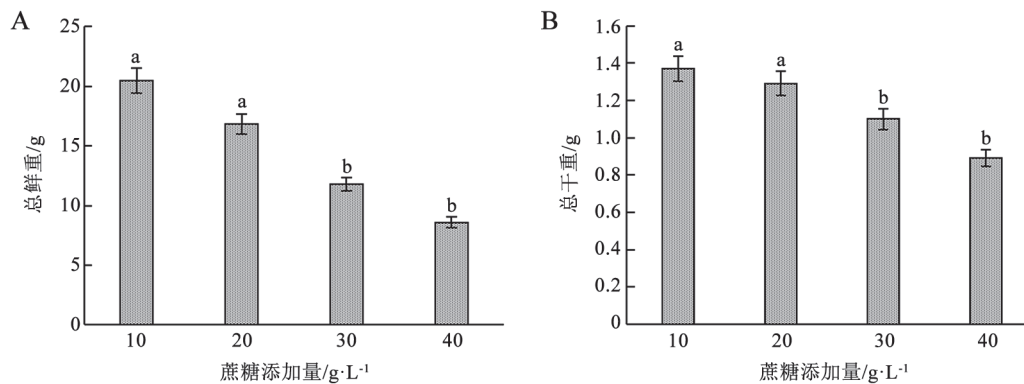
Fig.3 Effects of different carbon sources on contents of flavonoids and total triterpenoids in *T. chinensis* cluster buds

图4 不同蔗糖浓度对柞柳丛生苗生长的影响

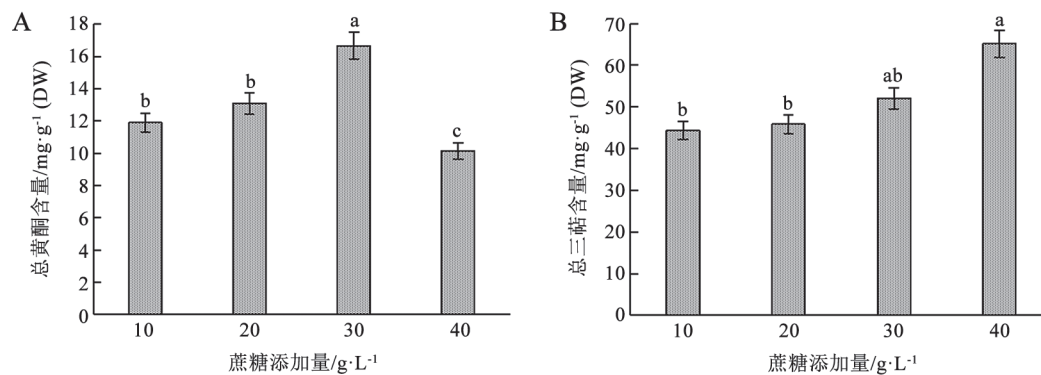
Fig.4 Effects of different concentrations of sucrose on cluster bud growth of *T. chinensis*

图5 不同蔗糖浓度对柞柳丛生芽中总黄酮和总三萜含量的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of sucrose on contents of flavonoids and total triterpenoids in *T. chinensis* cluster buds

芽糖; 李琰等(2004)在研究碳源对杜仲(*Eucommia ulmoides*)愈伤组织生长和次生代谢产物含量影响后发现, 蔗糖的作用效果好于葡萄糖; 李汉伟等(2010)研究了不同碳源对冬凌草(*Rabdosia rubescens*)中迷迭香酸积累的影响, 结果表明, 以蔗糖作

为碳源是最好的选择。Pérez等(2000)发现, 蔗糖和葡萄糖可作为葡萄(*Vitis vinifera*)浆果生长的良好碳源, 果糖则不利于葡萄浆果的生长。本实验研究结果与以上结论基本相似, 发现当以蔗糖为碳源时, 柞柳干物质的积累及总黄酮、齐墩果酸、

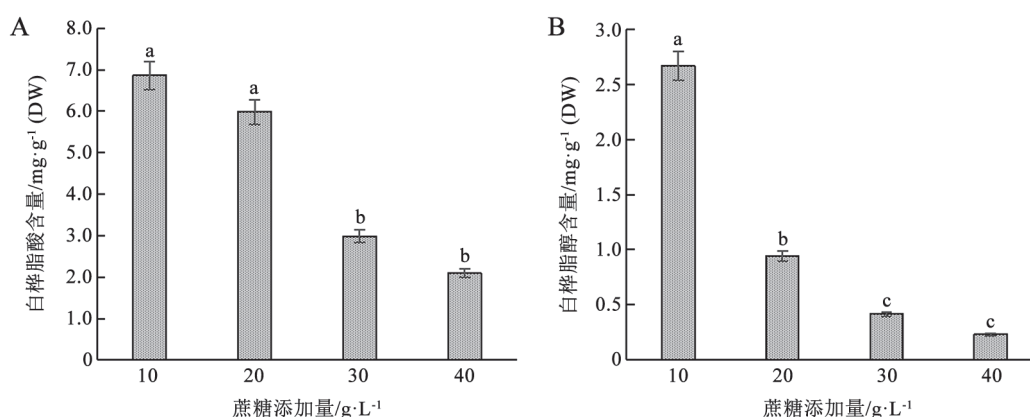


图6 不同蔗糖浓度对柽柳丛生芽中白桦脂酸和白桦脂醇含量的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of sucrose on contents of betulinic acid and betulin in *T. chinensis* cluster buds

白桦脂酸、白桦脂醇含量均为各实验组最高,最有利柽柳鲜重增加及总三萜含量积累的碳源为葡萄糖,而淀粉和麦芽糖均不利于柽柳的生长。可见,不同碳源对柽柳中黄酮和总三萜含量的积累有显著的影响。

不同植物培养过程中所需的碳源浓度也不同。Cui等(2010)研究了添加不同浓度蔗糖时贯叶连翘(*Hypericum perforatum*)不定根的生长和次生代谢产物积累,发现高浓度的糖使培养基产生较高的渗透压从而抑制生物量的增加,而高渗透压却促进了次生代谢产物的积累。刘雅静等(2012)在研究蔗糖对蒙古黄芪(*Astragalus mongholicus*)愈伤组织生长及黄酮积累的影响中也发现,高浓度的蔗糖能提高次生代谢产物的含量,其原因之一是提高了培养基的渗透压;同时降低了愈伤组织的干重增量,原因是高浓度的蔗糖使愈伤组织褐化死亡。赵德修等(1998)的研究显示5%的蔗糖对雪莲(*Saussurea involucreta*)培养细胞黄酮的形成有促进作用;李琰等(2004)在研究碳源对杜仲愈伤组织生长和次生代谢产物含量的影响中发现蔗糖浓度为40 g·L<sup>-1</sup>时黄酮含量达最大值。本研究发现当以蔗糖为碳源时,10 g·L<sup>-1</sup>的蔗糖最利于柽柳生长量的提高,可能是由于其较低的渗透压;最利于柽柳总黄酮积累的蔗糖浓度为30 g·L<sup>-1</sup>,其含量可达16.65 mg·g<sup>-1</sup> (DW);最利于柽柳总三萜积累的蔗糖浓度为40 g·L<sup>-1</sup>,其含量可达65.14 mg·g<sup>-1</sup> (DW)。这与前人研究结果基本类似。虽不同物种及代谢产物对碳量的需求仍有所差异,但高浓度的蔗糖含量确实有利于植物中黄酮和三萜的积累。

另外,本研究中值得注意的是,虽然总三萜含量随添加蔗糖浓度的升高有增加的趋势,但三萜组分白桦脂酸和白桦脂醇含量却显示降低,且齐墩果酸仅在蔗糖浓度为10 g·L<sup>-1</sup>时可检测到。可能是因为总三萜组分复杂多样,包含各种三萜前体角鲨烯和2,3-氧化角鲨烯及其他羽扇烷类、达玛烷类、齐墩果烷类及固醇类物质,它们均为异戊二烯合成途径产生的三萜产物(Yin等2012, 2015),蔗糖浓度增加促进了总三萜组分中其他产物的积累,而对本研究中检测的白桦脂酸和白桦脂醇积累未显示正效应,这有待进一步深入研究。

### 参考文献

- Bi JT, Ma P, Yang ZW, Guan XQ (2013). Isolation of endophytic fungi from the medicinal plant *Tamarix chinensis* and their microbial inhibition activity. *Acta Pratacult Sin*, 22 (3): 132–138 (in Chinese with English abstract) [毕江涛, 马萍, 杨志伟, 关晓庆 (2013). 药用植物柽柳内生真菌分离及其抑菌活性初步研究. *草业报*, 22 (3): 132–138]
- Cheng L, Yu GR (2001). Tissue culture and rapid propagation of *Tamarix chinensis* Lour. *J Shanghai Teachers Univ (Nat Sci)*, 30 (2): 67–71 (in Chinese with English abstract) [程磊, 周根余(2001). 柽柳的组织培养与快速繁殖. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 30 (2): 67–71]
- Cui XH, Murthy HN, Wu CH, Paek KY (2010). Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 103 (1): 7–14
- Dang Z, Qian KD, HO P, Zhu L, Li KH, Huang L, Chen CH (2012). Synthesis of betulinic acid derivatives as entry inhibitors against HIV-1 and bevirimat-resistant HIV-1 variants. *Bioorg Med Chem Lett*, 22 (16): 5190–5194
- Dong CM, Su XH, Wang WL (2009). Effects of sucrose concentration, nitrogen on the growth and main secondary metabolites accumu-

- lated of regeneration plant of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 29 (3): 494–498 (in Chinese with English abstract) [董诚明, 苏秀红, 王伟丽(2009). 氮碳源对冬凌草再生植株生长及次生代谢产物的影响. 西北植物学报, 29 (3): 494–498]
- Fang Q, Qiao YJ, Wang HH (2008). Effect of different plant growth regulators and carbon sources on the growth of calluses and production of secondary metabolites of *Scutellaria baicalensis* Georgi. J Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci), 26 (1): 33–37 (in Chinese with English abstract) [方强, 乔勇进, 王海宏(2008). 不同植物生长调节剂、碳源对黄芩细胞生长及次生代谢产物的影响. 上海交通大学学报(农业科学版), 26 (1): 33–37]
- Han LN, Zhou FQ (2010). *In vitro* regeneration of one-step seedling formation for *Tamarix chinensis*. Hubei Agric Sci, 49 (11): 2629–2632 (in Chinese with English abstract) [韩琳娜, 周凤琴(2010). 柽柳一步成苗离体培养技术. 湖北农业科学, 49 (11): 2629–2632]
- He YF, Li X, Xie YF (2016). Research progress in sugar signal and its regulation of stress in plants. Plant Physiol J, 52 (3): 241–249 (in Chinese with English abstract) [何亚飞, 李霞, 谢寅峰(2016). 植物中糖信号及其对逆境调控的研究进展. 植物生理学报, 52 (3): 241–249]
- Huang SW, Liang JY (2007). Progress of studies on *Tamarix* Linn. Strait Pharm J, 19 (3): 5–9 (in Chinese with English abstract) [黄时伟, 梁敬钰(2007). 柽柳属植物研究进展. 海峡药学, 19 (3): 5–9]
- Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, Bakrouf A, Magné C, Abdelly C (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. Food Chem Toxicol, 47 (8): 2083–2091
- Li CX, Yin J, Zhang YG, Ren CL, Wang ZH (2012). Effects of water, nitrogen and methyl jasmonate treatment on triterpenes accumulation in birch (*Betula Platyphylla* Suk.). Acta Bot Boreal-Occident Sin, 32 (1): 155–161 (in Chinese with English abstract) [李春晓, 尹静, 詹亚光, 任春林, 王智慧(2012). 水分、氮肥及MeJA处理对白桦三萜积累特性的影响. 西北植物学报, 32 (1): 155–161]
- Li HW, Su XH, Dong CM, Wang WL (2010). Effects of carbon nitrogen sources on growth and rosmarinic acid accumulation of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara callus. Lishizhen Med Mater Med Res, 21 (6): 1348–1350 (in Chinese with English abstract) [李汉伟, 苏秀红, 董诚明, 王伟丽(2010). 氮源和碳源对冬凌草愈伤组织生长及迷迭香酸的积累的影响. 时珍国医国药, 21 (6): 1348–1350]
- Li Y, Wang DM, Jiang ZM, Tang R (2004). Effects of basic media and culture conditions on growth of calluses and production of secondary metabolites of *Eucommia ulmoides*. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 24 (10): 1912–1916 (in Chinese with English abstract) [李琰, 王冬梅, 姜在民, 唐锐(2004). 培养基及培养条件对杜仲愈伤组织生长及次生代谢产物含量的影响. 西北植物学报, 24 (10): 1912–1916]
- Li Y, Yang YL, Feng JT, Huang ZQ, Zhang X (2010). Effects of carbon sources and plant growth regulators on callus growth and secondary metabolite content of *Tripterygium wilfordii*. Sci Silva Sin, 46 (9): 34–39 (in Chinese with English abstract) [李琰, 杨广隶, 冯俊涛, 黄正清, 张兴(2010). 碳源及植物生长调节剂对雷公藤愈伤组织生长和次生代谢产物含量的影响. 林业科学, 46 (9): 34–39]
- Li YL, Meng TT, Wang MM, Li XX, Li RR, Guo XQ (2015). Amplification culture of *Glycyrrhiza uralensis* cell in stirring bioreactor. Plant Physiol J, 51 (3): 302–306 (in Chinese with English abstract) [李雅丽, 孟婷婷, 王毛毛, 李晓雪, 李蓉蓉, 郭晓强(2015). 甘草细胞在搅拌式生物反应器中的放大培养. 植物生理学报, 51 (3): 302–306]
- Liang SH, Tao J, Liu XF, Guo DA, Zheng J (2006). Effects of carbon source and nitrogen source on callus growth and flavonoid content in *Glycyrrhiza uralensis*. China J Chin Mater Med, 31 (22): 1857–1859 (in Chinese with English abstract) [杨世海, 陶静, 刘晓峰, 果德安, 郑俊(2006). 培养基中碳源和氮源对甘草愈伤组织生长和黄酮类化合物合成的影响. 中国中药杂志, 31 (22): 1857–1859]
- Liao J, Xing YC, Li N, Zhang J, Jia XG (2012). Advances in studies on chemical constituents in plants of *Tamarix* L. and their pharmacological activities. Drugs Clinic, 27 (4): 404–408 (in Chinese with English abstract) [廖菁, 邢亚超, 李宁, 张娟, 倪慧, 贾晓光(2012). 柽柳属植物的化学成分和药理活性研究进展. 现代药物与临床, 27 (4): 404–408]
- Liu YJ, Xing JZ, Zhang YT, Chen GL (2012). Effects of methyl jasmonate, sucrose concentration and nitrogen on the growth and flavonoid accumulation of *Astragalus mongholicus* Bge. J Inner Mongolia Univ (Nat Sci), 43 (1): 63–68 (in Chinese with English abstract) [刘雅静, 邢菊展, 张宇婷, 陈贵林(2012). 茉莉酸甲酯、蔗糖和氮源对蒙古黄芪愈伤组织生长和黄酮含量的影响. 内蒙古大学学报(自然科学版), 43 (1): 63–68]
- Liu ZL, Pan YX, Ji Y, Yang LW, Yang JM (2013). Tissue culture and rapid propagation of *Tamarix androssowii* Litv. China Forest Sci Technol, 27 (5): 111–114 (in Chinese with English abstract) [刘振林, 潘玉霞, 姬玉, 杨立文, 杨俊明(2013). 白花柽柳的组培与快繁技术. 林业科技开发, 27 (5): 111–114]
- Pérez FJ, Meza P, Berti M, Pinto M (2000). Effect of carbon source and sucrose concentration on growth and hexose accumulation of grape berries cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss Org Cult, 61 (1): 37–40
- Qi XJ, Chen RY, Wang W (2010). Cell suspension culture of *Gentiana macrophylla* (II). Chin Tradit Herbal Drugs, 41 (4): 472–475 (in Chinese with English abstract) [齐香君, 陈如意, 王薇(2010). 秦艽细胞悬浮培养研究(II). 中草药, 41 (4): 472–475]
- Qiao MJ, Lin SZ, Zhang ZY, Lin L (2007). Tissue culture and rapid propagation of *Tamarix laxa* Willd. Plant Physiol Commun, 43 (1): 116 (in Chinese) [乔梦吉, 林善枝, 张志毅, 林灵(2007). 短穗柽柳的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 43 (1): 116]
- Ren CL, Yin J, Pan YJ, Zhan YG, Li CX, Zhao W (2012). Effects of salicylic acid on accumulation of oleanolic acid and defense enzyme activity in suspension cells of *Betula platyphylla*. Chin Tradit Herbal Drugs, 43 (5): 972–977 (in Chinese with English abstract) [任春林, 尹静, 潘亚婕, 詹亚光, 李春晓, 赵薇(2012). 水杨酸对白桦悬浮细胞中齐墩果酸积累及防御酶活性的影

- 响. 中草药, 43 (5): 972-977]
- Sun XX, Chen YF, Yuan F, Zou CX, Jiang CY (2009). The study of tissue culture of *Tamarix chinensis*. J Fujian Forest Sci Technol, 36 (3): 167-170 (in Chinese with English abstract) [孙旭旭, 陈一飞, 袁芳, 邹翠霞, 姜长阳(2009). 柽柳的组织培养研究. 福建林业科技, 36 (3): 167-170]
- Tan CY, Yuan HJ (2010). Determination of oleanolic acid in cortex *Aralia elatae* by HPLC. Chin J Inf Tradit Chin Med, 17 (1): 46-47 (in Chinese with English abstract) [谭朝阳, 袁宏佳(2010). HPLC法测定龙芽楸木药材中齐墩果酸的含量. 中国中医药信息杂志, 17 (1): 46-47]
- Wang B, Ren SW, Li GQ, Guan HS (2009). Studies on antitumor steroids and slavonoids from *Tamarix chinensis* Lour. Chin Pharm J, 44 (8): 576-580 (in Chinese with English abstract) [王斌, 任舒文, 李国强, 管华诗(2009). 柽柳抗肿瘤甾体和黄酮类化合物研究. 中国药学杂志, 44 (8): 576-580]
- Wang SY, Li MY, Shao ZY, Yin J (2014). Accumulation of total phenolics, triterpenoids and flavonoids in tufted buds of *Tamarix chinensis* under different medium and hormone treatment. J Beijing Forest Univ, 36 (5): 74-81 (in Chinese with English abstract) [王思瑶, 李明阳, 邵占媛, 尹静(2014). 不同培养基及激素处理下柽柳丛生芽总酚、三萜及黄酮物质的积累. 北京林业大学学报, 36 (5): 74-81]
- Wei XM, Li XF, Li LH, Wang P (2006). Comparison on the effect of two different rapid propagation methods of *Tamarix chinensis*. J Fujian Forest Sci Technol, 33 (3): 88-90 (in Chinese with English abstract) [韦小敏, 李先芳, 李利红, 王鹏(2006). 柽柳两种不同快速繁殖途径的效果比较. 福建林业科技, 33 (3): 88-90]
- Xia BJ, Liu YT, Zhu JF, Xu JW, Lu ZH, Liu JT, Liu Q (2013). Quality level assessment of lowly efficient *Tamarix chinensis* secondary shrubs in Laizhou Bay of Yellow River Delta. Chin J Appl Ecol, 24 (6): 1551-1558 (in Chinese with English abstract) [夏江宝, 刘玉亭, 朱金方, 许景伟, 陆兆华, 刘京涛, 刘庆(2013). 黄河三角洲莱州湾柽柳低效次生林质效等级评价. 应用生态学报, 24 (6): 1551-1558]
- Yang SH, Tao J, Liu XF, Guo DA, Zheng J (2006). Effects of carbon source and nitrogen source on callus growth and flavonoid content in *Glycyrrhiza uralensis*. China J Chin Mater Med, 31 (22): 1857-1859 (in Chinese with English abstract) [杨世海, 陶静, 刘晓峰, 果德安, 郑俊(2006). 培养基中碳源和氮源对甘草愈伤组织生长和黄酮类化合物合成的影响. 中国中药杂志, 31 (22): 1857-1859]
- Yin J, Liang T, Wang SY, Zhang MY, Xiao JL, Zhan YG, Li CX (2015). Effect of drought and nitrogen on betulin and oleanolic acid accumulation and *OSC* gene expression in white birch saplings. Plant Mol Biol Rep, 33 (3): 1-11
- Yin J, Zhan YG, Ren CL, Xiao JLi, Qiu W, Li CX, Li XY (2012). Distribution and expression characteristics of triterpenoids and *OSC* genes in white birch (*Betula platyphylla* Suk.). Mol Biol Rep, 39 (3): 2321-2328
- Yin LK (2002). The *ex-situ* protection and the ecological adaptability of *Tamarix L.* in China. Arid Zone Res, 19 (3): 12-16 (in Chinese with English abstract) [尹林克(2002). 柽柳属植物的生态适应性与引种. 干旱区研究, 19 (3): 12-16]
- Zhang Y, Tu PF (2008). Advances in studies on medicinal plants of *Tamarix* Linn. Chin Tradit Herbal Drugs, 39 (6): 947-951 (in Chinese with English abstract) [张媛, 屠鹏飞(2008). 柽柳属药用植物研究进展. 中草药, 39 (6): 947-951]
- Zhao XD, Wang Q, Zhao JF (1998). Effect of physical and chemical factors on callus growth and flavonoids biosynthesis in the callus cultures of *Saussurea medusa*. Chin J Biotechnol, 14 (3): 259-264 (in Chinese with English abstract) [赵德修, 汪沂, 赵敬芳(1998). 不同理化因子对雪莲培养细胞中黄酮类形成的影响. 生物工程学报, 14 (3): 259-264]

## Effects of different carbon sources on the growth and accumulation of triterpenoids and flavonoids in tufted buds of *Tamarix chinensis*

WANG Si-Yao<sup>1</sup>, CUI Tong-Xi<sup>1</sup>, ZHAI Rui<sup>1</sup>, LIN Xiang-Yu<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, SUN Lu<sup>1</sup>, ZHAN Ya-Guang<sup>1,2</sup>, YIN Jing<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, <sup>2</sup>State Key Laboratory of Tree Genetics Breeding, School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** Explants from shoots of *Tamarix chinensis* were cultured in medium containing five kinds of carbon sources (sucrose, fructose, glucose, maltose and starch) and different concentrations of sucrose (10, 20, 30 and 40 g·L<sup>-1</sup>), and the growth of cluster buds and contents of secondary metabolite products in them under different treatments were analyzed. The results showed that there were significant effects of different carbon sources and different concentrations of sucrose on the growth of the cluster buds and accumulation of secondary products, and the best medium for their growth contained 10 g·L<sup>-1</sup> of sucrose. When using sucrose as a carbon source, the contents of flavonoids and triterpenoids were the highest after the culture of 35 d. The addition of 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose helped to improve the content of flavonoids markedly [up to 16.65 mg·g<sup>-1</sup> (DW)], and 10 g·L<sup>-1</sup> of sucrose was optimum for the accumulation of betulinic acid, betulin and oleanolic acid [2.67, 6.86 and 0.85 mg·g<sup>-1</sup> (DW) respectively]. When the concentration of carbon source was 30 g·L<sup>-1</sup>, the content of total triterpenoids reached the highest level in cluster buds with the addition of glucose, up to 62.43 mg·g<sup>-1</sup> (DW), and the second and the lowest contents were with the addition of sucrose and maltose, respectively. This study will lay a foundation for the large-scale production of medicinal active ingredient from *T. chinensis* by biological fermentation method.

**Key words:** *Tamarix chinensis*; carbon sources; secondary metabolism; tissue culture

Received 2017-07-21 Accepted 2017-11-08

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31570589), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No. 257-2017DY02) and the Undergraduate Innovative Projects of Northeast Forestry University (Grant No. 201710225109).

\*Corresponding author (E-mail: yinjing20135@163.com).