

大量元素和植物生长物质对怀牛膝愈伤组织生长及多糖量的影响

宋运贤^{1,3}, 石晶莹², 薛建平^{1,3}

(1 淮北煤炭师范学院生命科学院, 安徽 淮北 235000; 2 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002; 3 资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000)

摘要:目的 研究大量元素和植物生长物质对怀牛膝愈伤组织生长及怀牛膝多糖量的影响。方法 以怀牛膝无菌苗的叶片、茎段为材料, 采用正交试验设计方法研究培养基中大量元素和植物生长物质 6-BA、IBA、NAA 和 2, 4-D 对怀牛膝愈伤组织生长的影响, 并在愈伤组织形成高峰期 30 d 时, 采用酚-硫酸比色法对其中多糖的量进行检测, 对所得实验数据进行极差分析、方差分析比较。结果 大量元素的添加量对愈伤组织的诱导、生长和多糖的量无显著影响, 6-BA 对怀牛膝愈伤组织多糖量影响显著。结论 诱导怀牛膝愈伤组织形成多糖的适宜培养基是 1/4 MS+ 6-BA 0.5 mg/L+ 2, 4-D 1.0 mg/L。

关键词: 怀牛膝; 愈伤组织; 大量元素; 植物生长物质; 多糖

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)01-0135-03

怀牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume. 为苋科牛膝属植物, 主产于河南武陟、温县等地(古怀庆府所辖), 是我国著名的“四大怀药”之一。其根含有多种化学成分, 包括多糖类、皂苷类、植物甾酮类、黄酮类、生物碱及香豆素等, 具有补肝肾、强筋骨、通血脉、降血压及镇痛、引药下行和泻浊通淋等功效^[1]。牛膝多糖(A. *bidentata* polysaccharides, ABPS)是一种免疫调节剂, 能够促进细胞免疫和体液免疫, 具有抗肿瘤和抗凝血的作用, 临床应用前景十分广阔^[2]。国内外对怀牛膝的研究主要集中于成分分析、药理作用、栽培措施等方面^[3-6], 关于组织培养方面的研究报道较少^[7]。近年来, 一些学者对怀牛膝的愈伤组织诱导、分化及植株再生进行了研究^[8,9], 但对怀牛膝愈伤组织中多糖量的调控鲜见报道。本实验就培养基中大量元素和植物生长物质对怀牛膝愈伤组织生长及多糖量的影响进行研究, 为建立高效的 ABPS 离体生产体系提供技术基础。

1 材料方法

1.1 材料: 参照文献报道^[8]中的方法, 建立怀牛膝的无菌培养体系。

1.2 外植体: 在无菌操作台上将无菌苗的叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 茎段切成 0.5 cm 长的切段, 接入不同试验培养基中。每瓶培养基接 4 个外植体, 每种培养基接 10 瓶, 重复 3 次。

1.3 培养条件: 光照培养箱温度 (25 ± 1) °C, 光照

强度 2 000 lx, 光照时间 12 h/d。定期观察各培养基中愈伤组织开始形成的时间, 30 d 统计愈伤组织的诱导率。愈伤组织的诱导率 = 形成愈伤组织的外植体数 / 接种的外植体数 × 100%。

1.4 大量元素对愈伤组织生长和多糖量的影响: 以 MS+ 2, 4-D 1.0 mg/L+ 6-BA 1.0 mg/L 为愈伤组织诱导基本培养基^[8], 在此基础上研究 MS 培养基大量元素的添加量对愈伤组织诱导、生长和多糖量的影响。培养基中蔗糖质量浓度均为 30 g/L, 琼脂质量浓度为 7 g/L, pH 值为 5.8。

1.5 植物生长物质对愈伤组织生长及多糖量的影响: 采用 L₉(3⁴) 正交设计, 研究植物生长物质 6-BA、IBA、NAA 和 2, 4-D 4 种因素 3 个水平对怀牛膝茎段愈伤组织诱导的影响(表 1)。培养基中蔗糖质量浓度均为 30 g/L, 琼脂质量浓度为 7 g/L, pH 值为 5.8。

表 1 L₉(3⁴) 正交设计

Table 1 Orthogonal design of L₉(3⁴)

水平	因素			
	A 6-BA/ (mg · L ⁻¹)	B IBA/ (mg · L ⁻¹)	C NAA/ (mg · L ⁻¹)	D 2, 4-D/ (mg · L ⁻¹)
1	0.5	0	0	0.5
2	1.0	0.5	0.5	1.0
3	2.0	1.0	1.0	2.0

1.6 标准曲线的制备^[10]: 以干燥至恒重的葡萄糖为对照品, 精密称定 0.045 g, 用蒸馏水定容至 1 000

¹ 收稿日期: 2008-04-21

基金项目: 安徽省科技厅重点项目(06093007)

作者简介: 宋运贤(1976—), 男, 江苏宿迁人, 讲师, 硕士, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: songyunxian@yahoo.com.cn

* 通讯作者 薛建平 Tel: (0561) 3802025 E-mail: xuejp2000@yahoo.com.cn

mL, 使其成为质量浓度为 45 μg/mL 的对照品溶液。精密吸取 0、0.05、0.1、0.10、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL, 置于试管中, 加蒸馏水至 2.0 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL 混匀, 迅速加入 5 mL 浓硫酸, 振摇 5 min, 置沸水浴中 15 min, 再置冷水浴中 30 min, 在可见紫外分光光度计上 485 nm 处测吸光度, 以吸光度(A)为纵坐标, 葡萄糖浓度(W)为横坐标, 经回归处理得回归方程 $A = 0.014 W + 0.002$, $r = 0.9987$ 。

1.7 ABPS 定量测定: 取牛膝愈伤组织, 精密称定, 放入试管中, 加 7.5 mL 蒸馏水, 与沸水浴中提取 30 min(提取 2 次), 提取液滤过入 25 mL 量瓶中, 反复漂洗试管及残渣, 定容至刻度。计算相当于 0.1 g 牛膝愈伤所得糖液体积, 吸出至 100 mL 量瓶中, 用水定容至刻度, 精密吸取 100 mL 至 50 mL 量瓶中用水稀释至刻度, 即得各供试品溶液。每个处理重复 3 次。测定方法如上。

1.8 数据处理: 运用 Excel、SPSS 软件对试验数据进行极差分析和方差分析。

2 结果与分析

2.1 大量元素对愈伤组织生长和 ABPS 量的影响: 茎段培养 10 d 时两端开始膨大, 14 d 时茎段伤口处稍有愈伤长出; 18 d 时均有较大块愈伤长出。叶片培养 6 d 时大部分叶片开始卷曲, 10 d 时有少许愈伤长出, 13 d 时均有明显愈伤长出。用茎段作为外植体, 随着大量元素添加量的减少, 牛膝多糖的量增加; 用叶片作为外植体, 随着大量元素添加量的减少, 牛膝多糖的量减少。经统计分析, MS 培养基大量元素的量与外植体对愈伤组织的出愈率、形成时间、鲜质量和 ABPS 的量均没有显著影响(表 2)。因此, 针对以牛膝愈伤组织培养生产牛膝多糖为目的, 本实验选择茎段为外植体以及多糖量最高的 1/4 MS 大量元素添加量, 进一步研究植物生长物质对愈伤组织生长的影响。

2.2 植物生长物质对愈伤组织生长及多糖量的影响

表 2 大量元素对愈伤组织生长和多糖量的影响

Table 2 Effects of macroelements on callus growth and ABPS contents					
大量元素	外植体	开始出愈时/d	出愈率/%	鲜质量/g	ABPS/(mg·g ⁻¹)
MS	茎段	14	100	0.876 4	29.285 5
1/2 MS	茎段	14	100	0.798 6	37.143 0
1/4 MS	茎段	14	100	0.896 5	64.643 0
MS	叶片	10	100	0.762 4	57.143 0
1/2 MS	叶片	10	100	0.834 5	51.428 5
1/4 MS	叶片	10	100	0.865 7	44.643 0

响: 从表 3、4 可知, 怀牛膝愈伤组织鲜质量(FW)的极差 R 值大小顺序为 IBA> NAA> 2,4-D> 6-BA; 其最优水平为 6-BA(0.5 mg/L), IBA(0), NAA(0), 2,4-D(1.0 mg/L)。各因素对愈伤组织鲜质量影响差异不显著。

对于怀牛膝愈伤组织多糖(ABPS)量影响的极差 R 值顺序为 6-BA> NAA> IBA> 2,4-D; 最优水平为 6-BA(0.5 mg/L), IBA(0), NAA(0), 2,4-D(0.5 mg/L)。6-BA 对愈伤组织中 ABPS 量影响达到显著水平($P < 0.05$), 而其他植物生长物质对愈伤组织鲜质量和 ABPS 量影响均不显著(表 5)。

表 3 植物生长物质对比对愈伤组织鲜质量和 ABPS 量的影响 (30 d)

Table 3 Effects of plant growth substances on callus fresh weight and ABPS contents (30 d)							
培养基		因 素				结 果	
序号	6-BA	IBA	NAA	2,4-D	鲜质量/g	ABPS/(mg·g ⁻¹)	
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	1.034 2	82.143 0	
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	0.677 8	48.928 5	
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	0.472 5	62.143 0	
4	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	0.649 9	35.000 0	
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	0.640 4	27.500 0	
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	0.669 1	36.785 5	
7	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂	0.784 4	22.500 0	
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	0.676 3	27.500 0	
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁	0.448 2	26.428 5	

表 4 植物生长物质对愈伤组织鲜质量和 ABPS 量的极差分析

Table 4 Range analysis of Plant growth substance on callus fresh weight and ABPS contents									
均值	鲜质量				ABPS				
	A	B	C	D	A	B	C	D	
K ₁	0.728	0.823	0.793	0.708	64.405	46.548	48.809	45.357	
K ₂	0.653	0.665	0.592	0.710	33.095	34.643	36.786	36.071	
K ₃	0.636	0.530	0.632	0.600	25.476	41.786	37.381	41.548	
R	0.092	0.293	0.201	0.110	38.929	11.905	12.023	9.286	

表 5 植物生长物质对愈伤组织鲜质量和 ABPS 量的方差分析

Table 5 Variance analysis of plant growth substance on callus fresh weight and ABPS contents										
变异来源	df	鲜质量				ABPS				
		χ^2	F	F _{0.05}	F _{0.01}	χ^2	F	F _{0.05}	F _{0.01}	
6-BA	2	0.014	1.000	19.00	99.00	2 553.785	19.54*	19.00	99.00	
IBA	2	0.129	9.14	19.00	99.00	215.422	1.65	19.00	99.00	
NAA	2	0.068	4.857	19.00	99.00	275.538	2.11	19.00	99.00	
2,4-D	2	0.024	1.714	19.00	99.00	130.729	1.00	19.00	99.00	
试验误差	2	0.01				130.73				
总变异	10	0.245				3 306.204				

* 表示差异显示($P < 0.05$)

* means significant difference at $P < 0.05$

综合以上分析得出怀牛膝茎段诱导愈伤组织形成的优化培养基为 1/4 MS+ 6-BA 0.5 mg/L+ 2, 4-D 1.0 mg/L。做验证试验, 将该培养基与正交试验中所得结果最好的 1 号培养基进行平行比较试验, 30 d 时, 对照 1 号培养基中愈伤组织鲜质量为 1.130 5 g, ABPS 量为 81.785 7 mg/g; 而优化培养基中愈伤组织鲜质量为 1.260 3 g, ABPS 量为 83.928 6 mg/g, 均高于对照培养基, 即优化培养基中愈伤组织生长速度较快, 多糖的量较高。

3 讨论

迄今为止, 对影响植物细胞生长和次生代谢物量的各种化学和物理因素已有大量研究^[11]。Hayashi 等^[12] 研究指出, 提高培养基中硝酸盐、磷酸盐及钾盐浓度有利于促进细胞生长, 而降低氮源和磷酸盐浓度则能增加代谢物的量。本研究发现, 培养基中大量元素的改变对怀牛膝鲜质量、多糖的量虽有一定的影响, 但影响并不显著, 因此从规模化生产和经济的角度, 培养基中添加 1/4 MS 大量元素即可。

植物生长物质对细胞的生长有很大影响, 生长素能够诱导细胞分裂, 促进细胞伸长, 细胞分裂素主要作用是促进细胞分裂和使细胞体积加大。生长素和细胞分裂素对植物愈伤组织的生长及次生代谢产物的合成有一定的促进作用^[13]。李明军等^[14] 研究发现 6-BA 对怀牛膝茎段愈伤组织中 ABPS 量的影响显著, 2, 4-D 达到极显著水平。本研究中发现 6-BA 各水平对怀牛膝愈伤组织的诱导虽不显著, 但对多糖的量达到显著影响水平, 2, 4-D 对多糖的量影响不显著, 与李明军的结果部分一致, 其作用和调控机制值得深入研究, 从而为今后规模化生产提供

技术支持。

本实验采用正交设计研究了植物生长物质 4 因素 3 水平对怀牛膝愈伤组织诱导及愈伤组织中多糖量的影响, 用最少的处理组合研究较多的试验因素, 通过分析试验结果不仅选择出适宜的培养基, 还可以揭示各因素的影响程度, 最终确定出最适宜的试验方案。既提高了工作效率, 又保证了实验结果的正确性和可靠性。

参考文献:

- [1] 陆维承. 牛膝考辨 [J]. 中国药业, 2007, 16(2): 55
- [2] 吕小兰, 赖小平, 郭惠, 等. 牛膝多糖研究进展 [J]. 实用临床医学, 2005, 6(2): 137-138
- [3] Marcone M F, Jahaniaval F, Aliee H, et al. Chemical characterization of *Achyranthes bidentata* seed [J]. *Food Chem*, 2003 (81): 7
- [4] Sun H X. Adjuvant effect of *Achyranthes bidentata* saponins on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice [J]. *Vaccine*, 2006, 24: 3432
- [5] 李宗锴, 李电东. 牛膝的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(12): 756-758
- [6] 杨胜亚, 崔援军, 刘超, 等. 怀牛膝种植与加工 [J]. 中草药, 2002, 33(5): 470
- [7] 张丽萍, 董诚明, 金盖宇. 怀牛膝组织培养及齐墩果酸定量分析的研究 [J]. 河南中医学院学报, 2003, 18(4): 32-33
- [8] 李明军, 于相丽, 陈明霞, 等. 怀牛膝愈伤组织的诱导和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 343
- [9] 李明军, 李萍, 洪森荣, 等. 怀牛膝愈伤组织诱导及分化的研究 [J]. 河南师范大学学报, 2005, 33(4): 118-121
- [10] 李根林, 杜天信, 梁生旺. 怀牛膝中多糖的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(5): 6-7
- [11] 薛建平, 司怀军, 田振东. 药用植物生物技术 [M]. 合肥: 中国科学技术大学, 2005
- [12] Hayashi T, Yoshida K, Sano K. Formation of alkaloids in suspension-cultured *Colchicum autumnale* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27: 1371-1374
- [13] 吕冬霞, 曲长福. 植物生长调节剂对愈伤组织培养的影响 [J]. 北方园艺, 2004(5): 68
- [14] 李明军, 李萍, 张晓丽, 等. 培养基成分对怀牛膝愈伤组织诱导及牛膝多糖含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(7): 745-749

HPLC 法测定不同产地喜树果中喜树碱

黄瑞松^{1,3}, 叶云锋², 梁启成¹, 周芳礼³, 苏青¹, 付小红^{4*}, 林翠恬³

(1. 广西民族医药研究所, 广西南宁 530001; 2. 广西兽药监察所, 广西南宁 530001; 3. 广西大学化学化工学院, 广西南宁 530003; 4. 广西中医学院, 广西南宁 530001)

摘要: 目的 建立喜树果药材中喜树碱定量测定的 HPLC 方法, 并对不同产地喜树果药材中喜树碱的量进行比较分析。方法 用 HPLC 法测定喜树果药材中喜树碱的量, 色谱条件: 色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (55: 45), 体积流量: 0.8 mL/min, 检测波长: 254 nm。结果 喜树碱在 0.112~0.672 μg 与峰面积有良好的线性关系, 平均回收率为 102.19%, RSD=2.90% (n=6)。40 批不同产地喜

¹ 收稿日期: 2008-05-10

基金项目: 广西自然科学基金项目 (桂科自 0542055); 广西大型仪器协作共用网资助项目 (327-2006-016)

* 2001 级实习生