

不同理化因素对天山雪莲组培苗生长及总黄酮量的影响

吕亚丽^{1,2}, 王艳芳², 张福生¹, 郭顺星^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 内蒙古科技大学 包头医学院, 内蒙古 包头 014040

摘要: **目的** 研究不同理化因素对天山雪莲组培苗生长和总黄酮生物合成的影响。**方法** 测定不同理化因素影响下天山雪莲组培苗干质量和总黄酮量。**结果** 利于天山雪莲生长及黄酮积累的培养条件: MS培养基附加 6-BA 0.5 mg/L, NAA 0.05 mg/L, 氮源浓度 40 mmol/L, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例为 15 : 25, 碳源蔗糖质量浓度 40 g/L, pH 值 5.0~6.0, 光照强度 2 500 lx, 温度 25 ℃。**结论** 各项最佳培养条件的组合总体上可以促进天山雪莲生长和总黄酮生物合成, 氮源、碳源和温度对天山雪莲生长及总黄酮量的影响最为明显。

关键词: 天山雪莲; 组织培养; 理化因素; 黄酮; 氮源; 碳源

中图分类号: R282.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)01-0173-05

Effects of different physicochemical factors on growth of tissue culture seedlings and accumulation of total flavonoids in *Saussurea involucrata*

LV Ya-li^{1,2}, WANG Yan-fang², ZHANG Fu-sheng¹, GUO Shun-xing¹

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of physicochemical factors on the growth and total flavonoids accumulation of *Saussurea involucrata*. **Methods** The dry weight and total flavonoids accumulation in multiple seedlings of *S. involucrata* were measured. **Results** The optimal cultural condition for the growth and total flavonoid accumulation of *S. involucrata* was as following: MS culture medium adding 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L, 40 mmol/L of nitrogen source, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (15 : 25), 40 g/L of carbon sucrose, pH values 5.0–6.0, illumination intensity of 2 500 lx, temperature 25 ℃. **Conclusion** The optimal culture conditions could significantly improve the growth and total flavonoids accumulation of *S. involucrata*. And the nitrogen, carbon, and temperature have the most obvious effects on the growth and total flavonoids accumulation of *S. involucrata*.

Key words: *Saussurea involucrata* Kar. et Kir.; tissue culture; physicochemical factors; flavonoids; nitrogen; carbon

天山雪莲 *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. 又名新疆雪莲、雪莲花, 为菊科凤毛菊属植物, 是我国高山地区的一种稀有名贵中药。天山雪莲含有黄酮、生物碱、雪莲内酯等多种有效成分, 其中黄酮为主要成分。天山雪莲具有清热解毒、活血化瘀、抗炎镇痛、祛风除湿等功能, 多用于风湿性关节炎、月经不调、肾虚腰痛、肺寒咳嗽、胎衣不下等症的治疗^[1-4]。本实验在天山雪莲无菌培养条件下, 研究了不同理化因子对天山雪莲组培苗生长及总黄酮量

的影响, 对提高天山雪莲有效成分产率, 实现大规模生产具有重要意义。

1 材料

所用材料为本实验室继代培养的天山雪莲组培苗, 经中国医学科学院北京协和医学院药用植物所郭顺星研究员鉴定为天山雪莲 *Saussurea involucrata* Kar. et Kir.。芦丁对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 00809705)。其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2011-04-15

基金项目: 国际科技合作项目(2009DFA32250)

作者简介: 吕亚丽, 女, 博士, 就职于包头医学院, 讲师, 研究方向为生药学。Tel: 13264259077 E-mail: lvyali1978@sina.com

*通讯作者 郭顺星 Tel: (010)62829619 E-mail: sxguo2006@yahoo.com.cn

2 方法

2.1 组培苗的培养

天山雪莲组培苗在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养, 光照强度为 $1\ 000 \sim 1\ 500\ \text{lx}$, $12\ \text{h/d}$, 组培苗接种在 MS+6-BA $0.5\ \text{mg/L}$ +NAA $0.05\ \text{mg/L}$ 培养基上, 4 周继代 1 次。选取植株大小和高矮基本一致的天山雪莲组培苗, 在超净工作台上分别接种到不同的供试培养基中。接种干质量为 $0.082\ 4\ \text{g/瓶}$, 每组实验设置 10 个重复。接种后第 27 天测定天山雪莲组培苗干质量和总黄酮量。

2.2 氮源对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

调节 MS 培养基中的总氮 (NH_4NO_3 和 KNO_3) 浓度分别为 5、10、20、40、60、80 mmol/L, 考察天山雪莲干质量和总黄酮生物合成量。

保持 MS 培养基中总氮浓度为 40 mmol/L, 调节 $\text{NH}_4^+-\text{NO}_3^-$ 比例分别为 0:40、5:35、10:30、15:25、20:20、25:15、30:10、35:5 和 40:0, 考察天山雪莲干质量和总黄酮生物合成量。

2.3 碳源对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

分别采用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖和可溶性淀粉单独作碳源, 质量浓度均为 $30\ \text{g/L}$, 考察天山雪莲干质量和总黄酮生物合成量。

采用蔗糖作碳源, 使质量浓度分别为 10、20、30、40、50、60、70 g/L, 比较天山雪莲干质量和总黄酮生物合成量。

2.4 培养基 pH 值对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

调节培养基 pH 值, 使其分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 考察天山雪莲干质量和总黄酮生物合成量。

2.5 光照强度对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

分别采用 $1\ 000 \sim 1\ 500$ 、 $1\ 500 \sim 2\ 000$ 、 $2\ 000 \sim 2\ 500$ 、 $2\ 500 \sim 3\ 000\ \text{lx}$ 光照强度进行培养, 考察天山雪莲干质量和总黄酮生物合成量。

2.6 温度对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

分别采用 5、15、25、30 $^\circ\text{C}$ 进行培养, 考察天山雪莲干质量和总黄酮生物合成量。

2.7 培养条件的组合对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

MS 培养基为基本培养基附加 6-BA $0.5\ \text{mg/L}$, NAA $0.05\ \text{mg/L}$ 的基础上, 采用氮源浓度为 40 mmol/L; $\text{NH}_4^+-\text{NO}_3^-$ 比例为 15:25; 碳源为蔗糖,

质量浓度 $40\ \text{g/L}$; pH 值 5.0~6.0; 光照强度 $2\ 000 \sim 2\ 500\ \text{lx}$; 温度 $25\ ^\circ\text{C}$, 考察天山雪莲干质量和总黄酮生物合成量。

2.8 天山雪莲生长的测定

组培苗收获时用蒸馏水把支持物冲洗干净, 晾干, $50\ ^\circ\text{C}$ 烘干至恒质量, 称量得干质量。

2.9 培养物中总黄酮的分析

总黄酮量采用分光光度法^[5-6]: 将干质量 $0.2\ \text{g}$ 组培苗用 80%乙醇 $10\ \text{mL}$ 超声提取 $20\ \text{min}$, 浸泡一夜, 再超声提取 $20\ \text{min}$, 滤过, 吸取滤液 $0.5\ \text{mL}$, 加 $4.5\ \text{mL}$ 蒸馏水和 5% NaNO_2 $0.3\ \text{mL}$, 摇匀, 放置 $6\ \text{min}$, 再加 10% AlCl_3 $0.3\ \text{mL}$, 摇匀, 静置 $6\ \text{min}$, 加 4% NaOH $4\ \text{mL}$, 最后加蒸馏水至 $10\ \text{mL}$, $510\ \text{nm}$ 处测得吸光度 (A) 值。用芦丁对照品以同样方法得标准曲线方程 $C=85.925\ 6\ A-0.830\ 98$, $r=0.999\ 2$, 其中 C 为总黄酮量, 线性范围 $10 \sim 60\ \text{mg/L}$ 。

2.10 统计方法

以上实验均为单因子实验, 重复 3 次, 所有数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 实验数据用 SPSS 13.0 软件的 One-Way Anova 分析后, 进行 t 检验。

3 结果与分析

3.1 氮源浓度对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

当氮源总浓度为 40 mmol/L 时, 天山雪莲生长量和总黄酮合成量均达到最大, 天山雪莲组培苗生长量达到 $0.399\ 6\ \text{g/瓶}$, 总黄酮量为 4.96%。当氮源总浓度 $>40\ \text{mmol/L}$ 时, 再增加氮源浓度, 天山雪莲组培苗生长量及总黄酮类生物合成量并没有随之继续增加。保持 MS 培养基中总氮浓度为 40 mmol/L, 当 $\text{NH}_4^+-\text{NO}_3^-$ 比例为 15:25 时, 组培苗生长量和总黄酮量均达到最大, 分别为 $0.369\ 8\ \text{g/瓶}$ 和 5.42%, 结果见表 1、2。

表 1 氮源对天山雪莲生长和总黄酮量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects of nitrogen source on growth and total flavonoids accumulation of *S. involucreta* ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

总氮浓度 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	干质量 / ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	总黄酮 / %
5	$0.23 \pm 0.05\ \text{c}$	$3.96 \pm 0.40\ \text{c}$
10	$0.29 \pm 0.04\ \text{b}$	$4.23 \pm 0.44\ \text{b}$
20	$0.39 \pm 0.03\ \text{a}$	$4.89 \pm 0.51\ \text{a}$
40	$0.40 \pm 0.04\ \text{a}$	$4.96 \pm 0.49\ \text{a}$
60	$0.30 \pm 0.05\ \text{b}$	$4.15 \pm 0.50\ \text{b}$
80	$0.29 \pm 0.05\ \text{b}$	$4.13 \pm 0.47\ \text{b}$

不同字母表示 $P < 0.05$ 时有统计学差异, 下同

Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$, same as below

表 2 $\text{NH}_4^+ - \text{NO}_3^-$ 比例对天山雪莲生长和总黄酮量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of $\text{NH}_4^+ - \text{NO}_3^-$ on growth and total flavonoids accumulation of *S. involucrata* ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

$\text{NH}_4^+ - \text{NO}_3^-$	干质量 / ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	总黄酮 / %
0 : 40	0.19 ± 0.02 d	3.79 ± 0.43 d
5 : 35	0.28 ± 0.01 b	4.54 ± 0.51 c
10 : 30	0.32 ± 0.02 b	5.16 ± 0.47 a
15 : 25	0.37 ± 0.02 a	5.42 ± 0.50 a
20 : 20	0.25 ± 0.03 c	5.00 ± 0.51 b
25 : 15	0.21 ± 0.02 c	4.08 ± 0.49 d
30 : 10	0.21 ± 0.02 c	3.76 ± 0.40 d
35 : 5	0.18 ± 0.03 d	3.50 ± 0.46 e
40 : 0	0.15 ± 0.02 d	3.12 ± 0.44 e

3.2 碳源及其浓度对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

结果表明蔗糖最有利于天山雪莲组培苗的生长, 收获干质量和总黄酮量均达到最高。采用蔗糖作碳源, 随着蔗糖量的增加, 植株生长增快, 总黄酮量增加, 在蔗糖量 40 g/L 时植株生长和黄酮类化合物的合成达到最高, 平均每瓶苗干质量达 0.346 8 g, 总黄酮量为 4.79%。此后, 再增加蔗糖浓度, 天山雪莲组培苗的生物量和总黄酮量并没有随之继续增长, 所以将 40 g/L 作为实验中蔗糖的用量, 结果见表 3、4。

表 3 碳源对天山雪莲生长和总黄酮量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of carbon source on growth and total flavonoids accumulation of *S. involucrata* ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

碳源	干质量 / ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	总黄酮 / %
葡萄糖	0.37 ± 0.02 a	4.23 ± 0.17 b
果糖	0.29 ± 0.03 b	4.01 ± 0.12 c
蔗糖	0.38 ± 0.02 a	4.80 ± 0.15 a
可溶性淀粉	0.31 ± 0.01 b	4.34 ± 0.10 b

表 4 蔗糖浓度对天山雪莲生长和总黄酮量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effects of sucrose concentrations on growth and total flavonoids accumulation of *S. involucrata* ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

蔗糖 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	干质量 / ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	总黄酮 / %
10	0.22 ± 0.01 c	3.26 ± 0.43 d
20	0.27 ± 0.02 b	3.90 ± 0.50 c
30	0.32 ± 0.02 a	4.33 ± 0.47 b
40	0.35 ± 0.02 a	4.79 ± 0.38 a
50	0.31 ± 0.03 a	4.32 ± 0.46 b
60	0.28 ± 0.02 b	4.30 ± 0.51 b
70	0.24 ± 0.02 b	4.01 ± 0.49 c

3.3 培养基 pH 值对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

由图 1 可知, 天山雪莲对培养基 pH 值有较大的适应范围, 其中 pH 5.0~6.0 适合天山雪莲生长和总黄酮生物合成。组培苗生物量(干质量)在 pH 5.0 时达到最高为 0.31 g/瓶, 是 pH 1.0 时组培苗生物量(收获干质量 0.09 g/瓶)的 3.44 倍, pH 10.0 (收获干质量 0.174 g/瓶)时的 1.76 倍; 总黄酮量在 pH 6.0 时达到最高为 3.43%, 是 pH 1.0 时总黄酮量(2.1%)的 1.63 倍, pH 10.0 (2.05%) 时的 1.67 倍, 说明过高和过低的 pH 值都不适合天山雪莲生长和总黄酮生物合成。所以天山雪莲培养的最佳 pH 为 5.0~6.0。

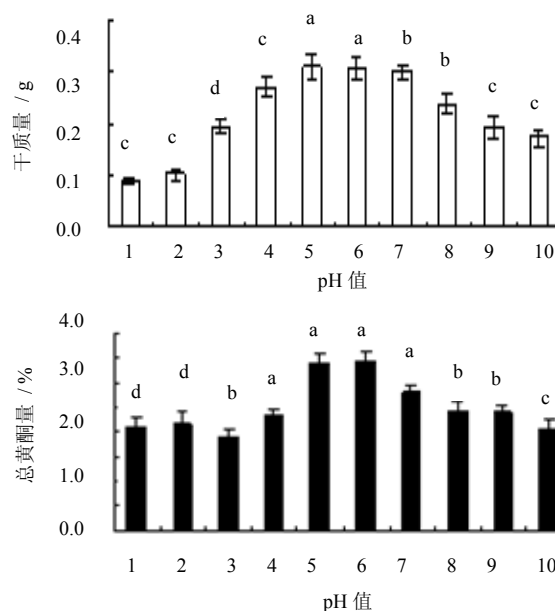


图 1 培养基 pH 值对天山雪莲生长和总黄酮生物合成的影响

Fig. 1 Effects of pH values in media on growth and total flavonoids biosynthesis of *S. involucrata*

3.4 光照强度对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

图 2 表明光照强度为 2 000~2 500 lx 更利于天山雪莲组培苗的生长, 收获干质量达到最高 0.362 3 g, 总黄酮量也达到了 3%; 光照强度在 2 500~3 000 lx 时总黄酮量达到最大为 3.05%。考虑到生物增长量及节约能源等方面, 采用 2 000~2 500 lx 作为天山雪莲组培苗的光照强度。

3.5 温度对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

由图 3 可知, 随着培养温度的升高, 天山雪莲组培苗生物量不断增加。当温度为 25 ℃, 此时组培苗生长量达到最大 0.42 g/瓶, 总黄酮量为 4.78%。

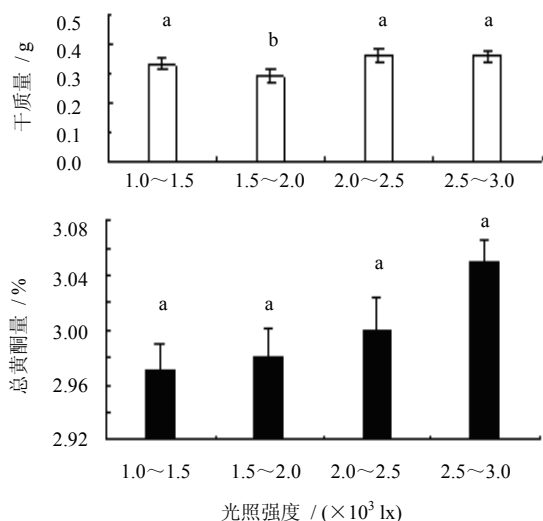


图2 光照强度对天山雪莲生长和总黄酮生物合成的影响
Fig. 2 Effects of illumination intensity on growth and total flavonoids biosynthesis of *S. involucrata*

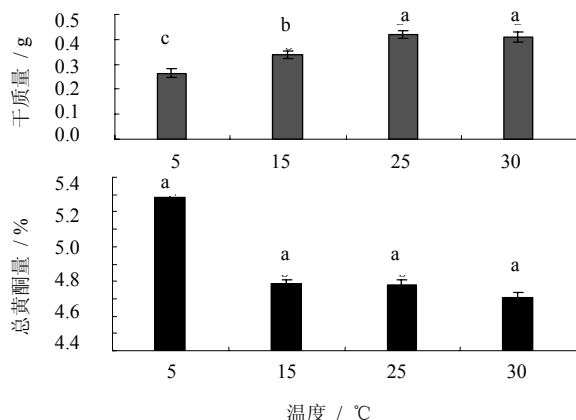


图3 温度对天山雪莲生长和总黄酮生物合成的影响
Fig. 3 Effects of temperature on growth and total flavonoids biosynthesis of *S. involucrata*

总黄酮生物合成适宜温度为 5 °C, 总黄酮合成量达到最大为 5.28%。温度为 30 °C 时组培苗生长开始受到抑制, 叶片开始发黄, 收获干质量为 0.40 g/瓶, 总黄酮量下降仅为 4.71%。综合考虑, 选择培养温度为 25 °C。

3.6 培养条件组合对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响

组合各项最佳培养条件经过 27 d 培养, 天山雪莲组培苗生长量可达到 0.371 2 g/瓶, 是基本培养条件下 (0.269 0 g/瓶) 的 1.38 倍; 总黄酮合成量为 5.58%, 是基本培养条件下总黄酮产量 (4.35%) 的 1.28 倍。说明各项最佳培养条件的组合总体上可以促进天山雪莲生长和总黄酮生物合成。

4 讨论

本实验证明高浓度的氮 (包括 NH_4^+ 和 NO_3^-) 会抑制总黄酮合成, 而硝态氮 (NO_3^-) 在总氮中量大于 40% 时更有利于天山雪莲生长和总黄酮积累, 这一现象与杨睿^[7]、Lamine^[8]、Pedro^[9]、Nussbaumer^[10]、Wang^[11] 和瞿凯荣^[12] 等报道相一致。此外, 天山雪莲生长及其总黄酮的量呈正相关, 这与杨睿等^[7] 研究的结果相一致, 认为氮是一种重要的大量元素, 其与植物生长和基因表达的信号传导有关, 硝态氮 (NO_3^-) 可提高氨基酸和蛋白质质量, 改变激素量, 同时调节碳代谢, 从而影响总黄酮的生物合成。

碳源是植物组织培养不可缺少的物质, 其不仅能给外植体提供能量, 而且也能维持一定的渗透压。碳源的种类及碳源的浓度大小不仅影响组培苗的生长速度, 而且还影响组培苗的生长状态和总黄酮的生物合成。天山雪莲组培苗培养中蔗糖浓度为 40 g/L, 有利于苗的生长和总黄酮的积累。

培养基 pH 值会影响其矿质元素的存在状态, 从而影响植物对元素的吸收和利用。pH 5~6 适于天山雪莲的生长和总黄酮的合成。植物的营养元素的吸收过程会因为培养基 pH 高低而不同, 从而影响其呼吸代谢、多胺代谢与脱氧核糖核酸合成、植物激素进出细胞等作用, 进而直接或间接地影响植株形成^[13-15]。大多数植物种类要求 pH 值在 5.0~6.0。

光照对诱导分化通常是必要的, 可激活某些酶的活性以及光诱导的叶绿体或叶绿体代谢产物的存在^[16-17]。光强为 2 000~2 500 lx 时天山雪莲组培苗生长量达到最大; 随着光照强度的增加天山雪莲总黄酮量逐渐增加。天山雪莲生长于高海拔强紫外线的环境中, 可能高的光照强度对其次生代谢产物如黄酮类化合物合成更有利。

一般植物组织培养的温度在 20~25 °C。次生代谢产物的积累对温度的依赖性因不同的植物而异^[15]。根据本研究结果, 天山雪莲组培苗生长适宜温度为 25 °C, 总黄酮生物合成适宜温度为 5 °C。温度升高对天山雪莲组培苗生长和总黄酮生物合成有抑制作用。综合考虑天山雪莲培养适宜温度是 25 °C。

本实验各项最佳培养条件的组合总体上可以促进天山雪莲生长和总黄酮生物合成。在各种理化因子中氮源、碳源和温度对天山雪莲生长及总黄酮生物合成的影响最为明显, 对此将开展进一步的实验研究, 为天山雪莲资源的开发和利用奠定理论基础。

参考文献

- [1] 卫生部药品生物制品检定所. 中国民族药志 (第1卷) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984.
- [2] 邢建国, 翟科峰, 何承辉, 等. 大孔吸附树脂纯化天山雪莲中有效成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1062-1066.
- [3] 王晓玲, 李启发, 丁立生. 天山雪莲的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1795-1797.
- [4] 肖 皖, 李 宁, 波拉提·马卡比力, 等. 雪莲化学成分和药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 344-348.
- [5] 关家彦, 张淑媛. 天山雪莲浸提液制备工艺的考察 [J]. 沈阳药科大学学报, 1995, 12(3): 209-211.
- [6] Fujita Y, Hara C, Suga C, *et al.* Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Plant Cell Rep*, 1981, 1: 61.
- [7] 杨 睿, 付春祥, 金治平, 等. 不同理化因子对雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 233-238.
- [8] Lamine B, Francoise G, Jose E N S, *et al.* The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots [J]. *J Biotechnol*, 2001, 85: 35-40.
- [9] Pedro M L L, Susana D C, Tiago M M, *et al.* Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31: 242-249.
- [10] Nussbaumer P, Kapetanidis I, Christen P. Hairy roots of *Datura candida* x *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis [J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 405-409.
- [11] Wang J W, Tan R X. Artemisinin production in *Artemisia annua* hairy root cultures with improved growth by altering the nitrogen source in the medium [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24: 1153-1156.
- [12] 瞿凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [13] 李浚明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [14] 黄学林, 李筱菊. 乙烯和多胺的生物合成与植物体细胞胚胎发生 [J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(2): 81-85.
- [15] 邓成木, 刘进平. 热带亚热带植物繁殖 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001.
- [16] Wang P, Flores H E, Humphrey A E. Production of expansin from light/dark growing *Trichosanthes kirilouii* var. *japonium* root cultures [J]. *Biotechnol Lett*, 1994, 16: 955-958.
- [17] Liu C Z, Wang Y C, Ouyang F, *et al.* Technical factors of artemisin biosynthesis in *Artemisia annua* hairy root culture [J]. *Acta Bot Sin*, 1998, 40(9): 831-835.