

紫花鄂北贝母愈伤组织诱导及总生物碱的测定

刘 群, 肖 波, 李天祥*, 李庆和, 张伯礼

天津中医药大学, 天津 300193

摘 要: 目的 研究紫花鄂北贝母 *Fritillaria ebeiensis* var. *purpurea* 外植体愈伤组织诱导的激素组合和配比, 并考察原药材及愈伤组织中总生物碱的量。方法 以紫花鄂北贝母新鲜鳞茎为外植体, 用抗生素和 NaClO 组合作消毒剂, 基于 MS 固体培养基添加激素 2,4-D+6-BA、2,4-D+KT 设计正交试验进行离体培养; 采用可见-紫外分光光度法测定总生物碱量。结果 外植体适宜灭菌条件是以 5% NaClO 溶液消毒 8 min; 愈伤组织诱导激素水平为 2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L; 原药材及其愈伤组织中总生物碱量分别为 1.46%、1.09%。结论 愈伤组织质地疏松, 适合继代培养, 其有效成分总生物碱量低于原药材。

关键词: 紫花鄂北贝母; 愈伤组织诱导; 植物生长激素; 总生物碱; 激素

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)12-1836-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.12.024

Callus induction and determination of total alkaloid content from *Fritillaria ebeiensis* var. *purpurea*

LIU Qun, XIAO Bo, LI Tian-xiang, LI Qing-he, ZHANG Bo-li

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the combination and proportion for the explants in NaClO and the suitable hormone induced by callus of *Fritillaria ebeiensis* var. *purpurea*. The total alkaloids content variations of raw herb and callus were investigated. **Methods** The fresh bulbs of *F. ebeiensis* var. *purpurea* were used as the experimental materials and NaClO and antibiotics as disinfectants. It was cultured *in vitro* in MS medium with plant hormones 2,4-D + 6-BA and 2,4-D + KT by orthogonal test design. Alkaloids contents in original bulb and callus were measured with UV. **Results** The best way to sterilization was at a concentration of 5% NaClO with 8 min. The optimal hormone levels was 2,4-D 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L. The alkaloid contents of raw herbs and callus were 1.46% and 1.09%. **Conclusion** Callus induced by tissue culture technique are soft, luster, and transparent, which are suitable for subculture. Total alkaloids content in callus is less than that in raw herb.

Key words: *Fritillaria ebeiensis* var. *purpurea* G. D. Yu et P. Li; callus induction; plant growth hormone; total alkaloid; hormone

紫花鄂北贝母 *Fritillaria ebeiensis* var. *purpurea* G. D. Yu et P. Li 为百合科(Liliaceae)贝母属 *Fritillaria* L. 植物鄂北贝母 *Fritillaria ebeiensis* G. D. Yu et G. Q. Ji 的变种, 野生于鄂豫交界桐柏山脉南端, 为当地民间用药^[1], 其鳞茎具有镇咳、祛痰、平喘等作用^[2]。贝母为常用传统名贵中药, 近年来需求量日趋加大, 然其资源相对匮乏, 紫花鄂北贝母活性成分总生物碱量高达 0.55%, 远远高于其他种类贝母, 其化学成分组成、药理药效等与川贝、浙贝有相似之处,

但未作为商品流通^[3-6]。因此, 鉴于贝母属药材药效活性显著, 紫花鄂北贝母作为新的药用植物资源具有较大的挖掘潜力和成为贝母商品药材的广阔前景。目前, 国内外关于紫花鄂北贝母组织培养的研究未见报道, 仅限于化学成分分离和鉴别以及药理作用等方面的报道^[7-10]。本研究以紫花鄂北贝母鳞茎为外植体, 利用现代生物技术, 展开其愈伤组织诱导等相关研究, 为进一步深入挖掘其药用价值奠定基础。

收稿日期: 2014-12-21

基金项目: 天津市科技支撑计划项目(10ZCZDSY12400); 生多调查(环); 第四次全国中药资源普查天津试点

作者简介: 刘 群(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制与资源开发。E-mail: qun6liu@163.com

*通信作者 李天祥(1968—), 男, 副教授。Tel: (022)59596292 E-mail: litianxiang612@sina.com

1 材料与仪器

1.1 材料

紫花鄂北贝母幼鳞茎,经天津中医药大学李天祥副教授鉴定,基原为百合科植物紫花鄂北贝母 *Fritillaria ebeiensis* var. *purpurea* G. D. Yu et P. Li。

1.2 仪器与试剂

FA-2104 精密电子天平(上海菁海仪器有限公司),JB-CJ-2FXS 型双人双面超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司),LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂),QHX-250BS-III 生态培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司),PHSJ-3F 实验室 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),GH28868 微波炉(美的集团有限公司),GH28868 移液枪(上海亿欣生物科技有限公司)。

蔗糖、邻苯二甲酸氢钾、溴百里香酚蓝、甲醇、浓氨水、三氯甲烷、氢氧化钠均购于天津市江天化工技术有限公司,琼脂购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司,激素 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、6-糠基氨基嘌呤(KT)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、酮康唑、制霉菌素均购于上海瑞齐生物科技有限公司,次氯酸钠溶液购于天津市元力化工有限公司,贝母素乙对照品(批号 10751-201110)购于中国食品药品检定研究院,娃哈哈纯净水为杭州娃哈哈集团有限公司生产,试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 外植体的选取及处理

挑选新鲜幼嫩的紫花鄂北贝母鳞茎作为外植体。将外植体先用毛刷轻轻刷干净,除掉表面尘土,用洗衣粉水超声清洗 15 min 后,自来水冲洗 120 min,洗去附着在材料表面的部分杂菌。

2.2 外植体于次氯酸钠中消毒浓度及时间的考察

首先将上述处理过的外植体于 5 mg/L 制霉菌素和 5 mg/L 酮康唑的混合溶液里浸润 20 min,取出用滤纸吸干,置无菌超净工作台上,将上述材料用 75%乙醇浸润 30 s 立即取出,无菌水冲洗 5 次。再放入不同质量分数 NaClO 溶液(3%、5%、8%、10%)中分别浸泡不同时间(6、8、10 min),无菌水冲洗 6 次,用无菌滤纸吸干材料表面水分,外植体用解剖刀切成 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 左右的立方块,接种在 MS 培养基上,每瓶接种 2 个,每组 10 瓶(每瓶盛有 50 mL 固体培养基),光照培养,培养箱温度(23±1)℃,光照强度

1 600 lx,光照时间 12 h/d,培养周期为 30 d。记录染菌率和死亡率,由白色变为淡绿色至枯萎发黄或褐变视为死亡,结果见表 1。

染菌率=接种染菌数/接种总数

死亡率=外植体死亡数/接种总数

愈伤组织诱导率=产生愈伤组织的外植体数/接种总数

从表 1 可以看出,外植体在 3% NaClO、6 min 时染菌率最高,死亡率低,随着灭菌时间的延长,染菌率虽然降低,死亡率却随之升高。综合考虑 5% NaClO、8 min 时比较适宜,染菌率和死亡率都保持在较低水平。

表 1 不同消毒浓度和时间对外植体的影响

Table 1 Effects of different disinfectant concentration and time on explants

NaClO/%	灭菌时间/min	接种总数/块	染菌率/%	死亡率/%
3	6	20	100.0	0
3	8	20	95.0	5.0
3	10	20	85.0	10.0
5	6	20	65.0	10.0
5	8	20	40.0	10.0
5	10	20	45.0	20.0
8	6	20	55.0	25.0
8	8	20	60.0	30.0
8	10	20	40.0	45.0
10	6	20	35.0	30.0
10	8	20	30.0	55.0
10	10	20	30.0	70.0

2.3 愈伤组织的诱导

2.3.1 培养基 基于 MS 基本固体培养基^[8],添加不同配比的激素 2,4-D (0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L) + KT (1.0、2.0、3.0 mg/L)、2,4-D (0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L) + 6-BA (1.0、2.0、3.0 mg/L),蔗糖质量浓度 30 g/L,琼脂 7.5 g/L, pH 5.8~6.0,每个培养瓶有 50 mL 固体培养基。

2.3.2 不同种类激素及配比对愈伤组织诱导的影响 将外植体接种在添加不同种类和质量浓度激素的 MS 培养基上进行初代培养,以不添加激素的实验组为对照。每瓶接 2 个外植体,每组做 16 瓶,以不加激素的实验组作对照,培养条件同“2.2”项,激素组合配比见表 2。

表 2 可知,不同的激素组合对愈伤诱导的影响不同,差异较为显著。2,4-D 0.5 mg/L 愈伤诱导率为 62.5%,明显高于其他供试组诱导率。因此,2,4-D 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 激素配比较适宜紫花鄂北贝

表2 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different hormone combinations on callus induction

组合	2,4-D/(mg·L ⁻¹)	6-BA/(mg·L ⁻¹)	KT/(g·L ⁻¹)	接种总数/块	产生愈伤组织 的外植体数	诱导率/%	愈伤生长情况
空白	0	0	0	32	5	15.6	发黄, 枯萎死亡
A1	0.2	1.0	0	32	10	31.2	表面黄色, 有细小颗粒凸起
A2	0.2	2.0	0	32	4	12.5	淡黄绿色, 不规则绿色凸起
A3	0.2	3.0	0	32	10	31.2	表面淡黄色, 有细小凸起
A4	0.5	1.0	0	32	10	31.2	表面淡黄色
A5	0.5	2.0	0	32	20	62.5	表面膨起, 淡黄色
A6	0.5	3.0	0	32	10	31.2	质地较坚实, 淡黄色
A7	1.0	1.0	0	32	15	47.0	表面有细小颗粒物
A8	1.0	2.0	0	32	2	6.3	质地较坚实, 切口处褐化
A9	1.0	3.0	0	32	8	25.0	淡黄色
A10	2.0	1.0	0	32	12	37.5	淡黄色, 偶有淡绿色凸起
A11	2.0	2.0	0	32	4	12.5	切口处褐化
A12	2.0	3.0	0	32	4	12.5	质地较坚实
A13	0.2	0	1.0	32	6	18.8	质地较坚实, 淡黄色
A14	0.2	0	2.0	32	4	12.5	质地坚实, 白色
A15	0.2	0	3.0	32	12	37.5	半透明状, 表面膨起且光滑
A16	0.5	0	1.0	32	0	0	表面褐化, 死亡
A17	0.5	0	2.0	32	4	12.5	淡黄色, 表面不规则淡绿色凸起
A18	0.5	0	3.0	32	6	18.8	质地坚实
A19	1.0	0	1.0	32	8	25.0	表面淡黄色, 表面膨起且光滑
A20	1.0	0	2.0	32	4	12.5	半透明状, 表面光滑, 淡黄色
A21	1.0	0	3.0	32	2	6.3	质地较坚实, 切口处有褐点
A22	2.0	0	1.0	32	0	0	表面有白色颗粒状物质, 死亡
A23	2.0	0	2.0	32	4	12.5	淡黄色, 有的表面有微小颗粒
A24	2.0	0	3.0	32	2	6.3	质地较坚实, 淡黄色

母的愈伤诱导, 而 2,4-D+KT 组合的愈伤诱导率普遍较低。

2.4 总生物碱的测定

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒定质量的贝母素乙对照品 15.10 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加三氯甲烷溶解并定容, 摇匀, 即得质量浓度为 0.604 mg/mL 的对照品贮备液。

2.4.2 供试品溶液的制备 取 0.2 g 干燥愈伤组织粉末置于 50 mL 三角瓶中, 加入 0.6 mL 浓氨水浸润 1 h, 接着加入三氯甲烷-甲醇 (4:1) 的混合溶液 16 mL, 水浴 80 °C 回流 2 h, 放冷, 滤过, 用适量的三氯甲烷-甲醇 (4:1) 混合溶液洗涤滤渣, 洗液与滤液合并, 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 80 °C 旋转蒸干, 残渣加入三氯甲烷溶解转移至 10 mL 量瓶中, 得总生物碱的供试液。

2.4.3 标准曲线的制备 精密量取对照品贮备溶液, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各精密加入 0.2 mol/L 邻苯二甲酸氢钾溶液 (取 0.2 mol/L 邻苯二甲酸氢

钾溶液 100 mL, 用 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液约 50 mL 调节 pH 值为 5.0) 2 mL, 再精密加 0.03% 溴百里香酚蓝试液 (取溴百里香酚蓝 0.03 g, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液 0.5 mL 使溶解, 加蒸馏水稀释至 100 mL) 0.8 mL, 加三氯甲烷至刻度, 剧烈振摇, 转移至分液漏斗中, 放置 45 min。取三氯甲烷液, 用干燥滤纸滤过, 取续滤液, 以相应的试剂为空白, 用紫外-可见分光光度法在 412 nm 的波长处测定吸光度 (A), 以 A 值对质量浓度 (C) 作线性回归分析, 得回归方程 $A=20.38 C+0.071$ ($R^2=0.999 0$), 结果表明总生物碱在 6.0~33.0 μg/mL 线性关系良好。

2.4.4 精密度试验 精密称取对照品溶液适量, 连续测定 6 次, 结果 RSD 为 0.074% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 精密称取总生物碱样品供试液, 于 412 nm 处每隔 30 min 测定 1 次, 连续 2.5 h 考察其稳定性。结果 RSD 为 0.33% ($n=6$), 表明样品至少在 2.5 h 内良好稳定。

2.4.6 重复性试验 精密称取样品愈伤组织粉末适量6份,按“2.4.2”项制备供试品溶液,测定 A 值,结果RSD为0.99% ($n=6$),表明该方法有较好的重复性。

2.4.7 加样回收率试验 精取已测定的愈伤组织样品,共6份,分别精密加入对照品溶液,按“2.4.3”项方法测定 A 值,结果平均加样回收率为100.74%,RSD为2.81% ($n=6$)。

2.4.8 总生物碱的测定 30 d后观察并记录,选取健康生长的愈伤组织进行继代培养3~4次,继代周期为30 d。待愈伤组织表面形成颗粒突起、质地疏松、淡黄色的胚性愈伤组织,取出放在培养皿中自然晾干,干燥至恒定质量。精密称取干燥鳞茎和愈伤组织粉末各0.5 g,各5份,制备供试品溶液并量取2.0 mL,测定 A 值,计算紫花鄂北贝母总生物碱的量。结果表明,经过组织培养诱导出的胚性愈伤组织,其总生物碱量为1.09%,低于原鳞茎生物碱量为1.46%^[11],但还是远远高于其他贝母中总生物碱量。

3 讨论

0.1%升汞溶液常作为植物组织培养的灭菌剂,但其对外植体的损伤较大且不易去除,又污染环境,对人体也有一定伤害;抗生素在使用初期能抑制污染菌的生长,但不能完全杀死污染菌;一定浓度的次氯酸钠的消毒能力强,不易残留,对环境无害,但碱性强,消毒时间过长对植物有一定的破坏作用。本实验表明,抗生素和短时间次氯酸钠溶液消毒相结合的灭菌方法既能减小对外植体的伤害,又能杀死大量的污染菌。

在植物组织培养中,生长素主要用于诱导刺激细胞分裂和根的分化;细胞分裂素能刺激细胞分裂,诱导芽的分化、叶片扩大和茎长高,抑制根的生长。生长素和细胞分裂素能保持愈伤组织的快速生长,尤其当两种激素配合使用时,能更强烈地刺激愈伤组织的形成。2,4-D是紫花鄂北贝母愈伤组织诱导的重要激素,与6-BA配合使用最好,能产生质地疏松,活性强的愈伤组织,当二者在高质量浓度时,愈伤诱导率降低且愈伤组织质地坚硬密实,所以为了获得较多且较高质量的愈伤组织,其培养基配方以MS+6-BA 2.0 mg/L +2,4-D 0.5 mg/L 较佳,此外,这也

为紫花鄂北贝母细胞悬浮系的建立提供了参考。

由结果可知,紫花鄂北贝母愈伤组织中总生物碱量为1.09%,低于植物原鳞茎(1.46%),其量还是远远高于其他种类的贝母:鄂北贝母(0.72%)、川贝母(0.05%~0.1%)、浙贝母(0.1%~0.2%)、伊贝母(0.1%~0.2%)、平贝母(0.1%~0.2%),湖北贝母(0.52%)等^[11]。由此可见,以总生物碱为活性成分,紫花鄂北贝母在解决资源短缺的问题方面有较强的开发挖掘潜力和市场开发前景。

紫花鄂北贝母的愈伤诱导及悬浮培养未见报道,利用生物技术如何提高紫花鄂北贝母细胞生长过程中生物碱等活性成分积累量的规律,值得进一步研究。

参考文献

- [1] 余国冀,李萍,徐国钧,等. 中药贝母类的研究——IV. 湖北贝母属药用植物资源 [J]. 南京药学院学报, 1985, 16(3): 25-32.
- [2] 姚丽娜,孙汉清,江湛,等. 湖北贝母,鄂北贝母,紫花鄂北贝母生物总碱对呼吸系统的药理作用 [J]. 同济医科大学学报, 1993, 22(1): 47-49.
- [3] 李萍,徐国钧,金蓉鸾,等. 中药贝母类的研究XV-21种贝母总生物碱含量测定 [J]. 中国药科大学学报, 1990, 21(5): 319-320.
- [4] 俞超,梁孝祺,陈金金,等. DNA条形码技术鉴定贝母属植物 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1613-1619.
- [5] 马临科,李文庭,赵维良. 高效液相-质谱联用法测定浙贝母中12种农药残留成分 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 849-853.
- [6] 吴继洲,孙汉清,马长清,等. 湖北贝母鄂北贝母紫花鄂北贝母品质评价的系统研究 [J]. 医学研究通讯, 1998(1): 21.
- [7] 吴继洲,文玉屏,阮汉利,等. 紫花鄂北贝母含氯元素二萜成分结构 [J]. 中草药, 1999, 30(11): 804-807.
- [8] 李萍,徐国钧,北村有希惠,等. 湖北产紫花鄂北贝母的成分研究 [J]. 中国药科大学学报, 1988(1): 51.
- [9] 吴继洲,潘锡平,娄民安,等. 湖北贝母属植物化学成分的研究——X. 紫花鄂北贝母生物碱的分离与鉴定 [J]. 药学学报, 1989, 24(8): 600-605.
- [10] 李浚明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2005.
- [11] 王曙,徐小平,李涛. 川贝母与其他贝母类药材总生物碱和总皂苷的含量测定与比较 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 25-27.