

Study on Callus Induction and Alkaloid Accumulation in *Fritillaria cirrhosa*

Guozhen Zhang^{1,2*}, Tingwei Dai^{1*}, Fei Wang^{1*}, Bingbing Zhang^{1*}, Xiaobo Qin^{1,2,3#}, Jihai Gao^{4#}, Peng Wu¹, Xiaodong Shi³, Lijuan Fan¹

¹Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu Sichuan

²Sichuan Natural Resource Institute, Chengdu Sichuan

³Key Laboratory of Coarse Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu Sichuan

⁴National Key Laboratory of Chinese Medicine Resources with Southwest Characteristics, School of Pharmaceutical, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

Email: [#]qxb_2003@163.com, [#]365421402@qq.com

Received: Dec. 10th, 2019; accepted: Jan. 10th, 2020; published: Jan. 17th, 2020

Abstract

A highly effective and rapid culture system of callus was developed by cultivating callus from explants of *Fritillaria cirrhosa*. The design and analysis of multifactorial orthogonal experiments showed the optimum medium for callus induction was MS + 2.0 mg/L 6-BA+ 0.5 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L NAA. By analyzing the content of total alkaloids in the original medicinal materials and callus, the effects of biomass and accumulation of effective substances in the callus were investigated, and it was revealed that the content of total alkaloids in the normal callus was slightly lower than that in the original medicinal materials. Therefore, callus culture is an effective way to obtain a large number of active substances of *Fritillaria cirrhosa*, which provides a way to obtain raw materials for the production of *Fritillaria cirrhosa*.

Keywords

Fritillaria cirrhosa, Callus, Alkaloid, Plant Growth Hormone, Content

川贝母愈伤组织诱导及生物碱积累的研究

张国珍^{1,2*}, 代庭伟^{1*}, 王菲^{1*}, 张冰冰^{1*}, 秦小波^{1,2,3#}, 高继海^{4#}, 吴朋¹, 时小东³, 樊莉娟¹

¹四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 张国珍, 代庭伟, 王菲, 张冰冰, 秦小波, 高继海, 吴朋, 时小东, 樊莉娟. 川贝母愈伤组织诱导及生物碱积累的研究[J]. 植物学研究, 2020, 9(1): 59-64. DOI: 10.12677/br.2020.91008

²四川省自然资源科学研究院, 四川 成都

³成都大学农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川 成都

⁴成都中医药大学药学院西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都

Email: #qxb_2003@163.com, #365421402@qq.com

收稿日期: 2019年12月10日; 录用日期: 2020年1月10日; 发布日期: 2020年1月17日

摘要

通过对川贝母外植体愈伤组织的培养, 建立了培养周期短、愈伤组织生长效率高的培养体系。利用多因子正交实验设计及分析, 筛选出最佳愈伤组织诱导培养基是MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L NAA。通过分析原药材与愈伤组织中总生物碱的含量, 从而考察愈伤组织生物量及药效物质积累的影响, 并揭示正常培养的愈伤组织中总生物碱含量稍低于原药材。因此, 通过培养愈伤组织是一种获得大量川贝母活性物质的有效方法, 为川贝母产品生产的提供一种原材料途径。

关键词

川贝母, 愈伤组织, 生物碱, 植物生长激素, 含量

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

川贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)为百合科贝母属的一种多年生草本植物, 始载于《神农本草经》, 以干燥地下鳞茎入药, 为名贵的川产道地药材之一。川贝母是《中华人民共和国药典》收录的药材川贝的基源品种之一, 主要分布于西藏、云南、四川和青海等海拔 1800~4200 m 的高寒区域[1] [2] [3]。其具有清热润肺、化痰止咳、散结消痛的功效[4], 用于肺热燥咳、干咳少痰、阴虚劳嗽、痰中带血等, 具有止咳圣药之称[5], 中药处方用量巨大。

目前, 以川贝母为原料的中成药达 100 种以上[6]; 因其生境, 种子休眠期长、自然萌发率低、野生资源长期滥采滥挖以及生态环境恶化等原因[4] [7], 川贝母资源严重匮乏, 已被列入国家三级保护植物名单[3], 并且来源物种已被《国家重点保护野生药材物种名录》收录[5]。

采用组织培养技术可在一定程度上解决这一问题。而川贝母作为道地药材, 其总生物碱是其主要的有效活性成分。因此, 通过分析各种因素对川贝母叶形成愈伤组织的影响, 从而获得生长速度快、有效活性组分含量高的组织培养物, 是实现大规模生产川贝母有效活性组分的重要途径之一; 同时, 为进一步深入挖掘其药用价值奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 植物材料

试验所需植物材料来源于四川的川贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)。

2.2. 外植体的处理

叶片用清水冲洗干净,再用 75% (V/V)酒精浸泡 15 s,用无菌水清洗 3 次,然后放入 0.5%的氯化汞 (HgCl₂)溶液浸泡 5 min,最后用无菌水冲洗干净。

2.3. 愈伤组织的诱导和继代培养

将无菌的叶片切成 1 cm² 的小块,块中可带有叶缘或中脉,接入愈伤组织诱导培养基。愈伤组织诱导培养基配方为如下: MS [8] + 1.0~3.0 mg/L 6-BA,或是 MS + 1.0~3.0 mg/L 6-BA + 0.1~1.0 mg/L 2,4-D + 0.05~0.2 mg/L NAA。愈伤组织诱导培养基附加有 3%蔗糖、0.7%琼脂粉, pH = 5.8, 室温 22℃。叶块分为 2 组,一组置于光周期 16 h/8 h 中培养,光强 2000 Lx;另一组暗培养,均培养 20 d,对比光培养与暗培养对愈伤组织的影响。愈伤组织诱导设计为 20 个叶块一个处理,3 次重复。20 d 后,将诱导出的愈伤组织切成 1.0 cm³ 的小块,分成 2 组,一组接入再生培养基诱导不定芽,另一组转接入新鲜的愈伤组织诱导培养基中进行继代培养,每 20 d 重复一次,比较多次继代培养对愈伤组织的影响。

2.4. 总生物碱的测定[9][10][11]

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甲素对照品约 2.0 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,其浓度为 0.2 mg/mL 的对照品贮备液。

2.4.2. 供试品溶液的制备

称取采集的待测贝母样品各 5.0 g 左右,用液氮处理后研磨至粉末,然后过 100 目筛,置烘箱中 60℃ 干燥 2 h。精密称取各贝母样品粉末约 0.5 g,加氨水 1.2 mL 放置 30 min,加入氯仿 20 mL,密封,放置 24 h 后,干燥滤纸过滤。吸取滤液 10 mL,回收氯仿至干,残渣加甲醇定溶于 2 mL 量瓶中,放置 1 h 后取出,通过孔径 0.45 μm 的微孔滤膜,滤液即为样品供试液,4℃ 保存并备用。

2.4.3. 标准曲线的制备

采用 WondaSil C18-WR 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 色谱条件为流动相: 水 - 乙腈 - 二乙胺(体积比, 70:30:0.03); 进样量: 20 μL; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 泵压: 5.7 Mpa; 检测波长: 208 nm。分别进样 5 μL, 10 μL, 20 μL, 30 μL, 40 μL, 50 μL 的对照品溶液各 4 次,并记录各色谱图及峰面积数据。以其进样量为 X 轴(μL), 峰面积为 Y 轴构建标准曲线。

2.4.4. 样品含量测定及精密度实验

制备同批次样品供试溶液,每批次 4 份,共 16 份,每份取 20 μL 进样,按照 HPLC 法进行实验并记录色谱图及相关数据,计算其每批次每份贝母甲素含量、各样品组贝母甲素平均含量及 RSD 值。

2.4.5. 样品贝母甲素含量测定计算

$$V_{\text{样品}} = S_{\text{样品峰}} / (S_{\text{对照峰}} / V_{\text{对照品}});$$

$$m_{\text{样品}} = V_{\text{样品}} \times C_{\text{对照品}};$$

$$A_{\text{样品}} = m_{\text{样品}} / M_{\text{样品}};$$

其中, C 对照品为 0.2 g/L, M 样品为约 0.5 g。

2.4.6. 回收率测定

向已知贝母甲素含量的各批次每份样品溶液中分别加入(每批次样品为 4 份,共 16 份) 0.2 mg/mL 的

贝母甲素对照品溶液 10 μL ，依法提取测定，计算回收率、平均回收率及 RSD 值。

2.5. 计算方法

$$\text{愈伤组织诱导率} = (\text{愈伤组织块数} / \text{接种外植体数}) \times 100\%$$

试验数据用 SPSS 软件进行方差分析，采用邓肯氏最小显著差数测验进行差异分析，显著水平为 0.05，每个处理 3 次重复。

3. 结果与分析

3.1. 植物生长素对愈伤组织的诱导

将叶片接种到愈伤组织诱导培养基后，7 d 内就会产生愈伤组织。表 1 显示，6-BA 是诱导川贝母叶片产生愈伤组织的关键植物生长调节剂，培养基中添加 6-BA，可顺利诱导叶片出愈。随着 6-BA 浓度的升高，叶片出愈率随之升高，但愈伤组织的质地变得松散。浓度 2.0 mg/L 的 6-BA 能诱导 $82.93\% \pm 3.2\%$ 的叶片产生瘤状愈伤组织，3.0 mg/L 的 6-BA 虽然也能诱导愈伤组织大量产生，但愈伤组织质地疏松，瘤状结构稀少，再生能力差。添加 2,4-D、NAA 后发现，浓度 0.5 mg/L 的 2,4-D 和 0.1 mg/L 的 NAA 对川贝母叶片形成愈伤有促进作用。2.0 mg/L 6-BA 与 0.5 mg/L 的 2,4-D 及 0.1 mg/L 的 NAA 组合对诱导川贝母叶片产生瘤状愈伤组织的效果最佳，诱导率高达 $87.91\% \pm 2.5\%$ 。

Table 1. Effect of plant growth regulators (PGRs) on callus induction from leaf of *Fritillaria cirrhosa*
表 1. 植物生长调节剂对川贝母叶片愈伤组织诱导的影响

| 激素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of PGRs ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | | | 出愈率/% Callus induction rate ($r/\%$) | 愈伤组织形态 Morphology of callus |
|--|-------|------|---|--------------------------------|
| 6-BA | 2,4-D | NAA | | |
| 1.0 | 0 | 0 | 61.14 ± 4.0^b | 紧实，瘤状结构少 |
| 2.0 | 0 | 0 | 82.93 ± 3.2^a | 紧实，瘤状结构多 |
| 3.0 | 0 | 0 | 85.51 ± 4.2^a | 疏松，瘤状结构少 |
| 1.0 | 0 | 0.05 | 62.57 ± 3.8^b | 紧实，瘤状结构少 |
| 2.0 | 0 | 0.1 | 84.34 ± 2.9^a | 紧实，瘤状结构多 |
| 3.0 | 0 | 0.2 | 86.36 ± 4.1^a | 疏松，瘤状结构少 |
| 1.0 | 0.1 | 0 | 64.16 ± 1.8^b | 紧实，瘤状结构少 |
| 2.0 | 0.5 | 0 | 86.77 ± 2.3^a | 紧实，瘤状结构多 |
| 3.0 | 1.0 | 0 | 88.15 ± 1.9^a | 疏松，瘤状结构少 |
| 1.0 | 0.1 | 0.05 | 65.52 ± 1.7^b | 紧实，瘤状结构少 |
| 2.0 | 0.5 | 0.1 | 87.91 ± 2.5^a | 紧实，瘤状结构多 |
| 3.0 | 1.0 | 0.2 | 88.73 ± 2.7^a | 疏松，瘤状结构少 |
| 1.0 | 0.5 | 0.2 | 65.48 ± 1.6^b | 紧实，瘤状结构少 |
| 2.0 | 1.0 | 0.1 | 80.26 ± 2.2^a | 紧实，瘤状结构多 |
| 3.0 | 0.1 | 0.05 | 85.04 ± 2.1^a | 疏松，瘤状结构少 |

表中不同字母表示邓肯氏最小显著差数测验差异显著 ($P \leq 0.05$)。其它表同。The different letters in the same column mean the significant difference ($P \leq 0.05$) by Duncan's LSD Test, the same below.

3.2. 光周期对愈伤组织诱导的影响

外植体分别进行光培养与暗培养 10 d，观察发现光培养与暗培养均能诱导愈伤组织形成。暗培养产生的愈伤组织出现早，平均 5 d 就能观察到愈伤产生，且体积大、质地松散、无法分化，须在光下培养

10 d, 并转绿后才能恢复分化能力。光培养条件下, 至少 6 d 后才有愈伤组织生成, 但愈伤组织颜色墨绿, 质地紧密, 瘤状结构明显; 30 d 后愈伤组织则需要继代培养。

3.3. 继代次数对愈伤组织及总生物碱含量的影响

多次继代培养会使愈伤组织的结构和颜色发生明显变化。随着继代次数的增加, 愈伤组织逐渐失绿褐化, 增殖能力下降, 质地变得松散, 瘤状结构消失; 同时总生物碱含量在前 3 代基本稳定, 且随继代次数的增加有上升趋势, 但到第 4 代开始, 总生物碱含量明显下降(表 2)。结果表明, 继代次数过多不仅影响愈伤组织生长, 使其增殖能力下降, 同时也影响总生物碱的积累。

Table 2. Effect of subculture times on callus growth and alkaloid contents of *Fritillaria cirrhosa*

表 2. 继代次数对愈伤组织生长和总生物碱含量的影响

| 继代次数 Subculture times | 愈伤组织形态 Morphology of callus | 总生物碱含量 Alkaloid contents |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 绿白色, 瘤状结构丰富 | 1.170% |
| 2 | 绿白色, 瘤状结构丰富 | 1.139% |
| 3 | 绿白色, 较少瘤状结构 | 1.215% |
| 4 | 黄绿色, 较少瘤状结构 | 0.948% |
| 5 | 黄褐色, 松散 | 0.789% |

2.4. 愈伤组织生长与总生物碱积累的关系

愈伤组织在培养 7 d 后, 开始采样, 分别为 7, 14, 21, 28, 35, 42 d, 愈伤组织的干物重基本稳定。在培养的第 35 d, 愈伤组织中川贝母总生物碱含量达最大值(表 3)。同时随着培养时间继续增加, 川贝母总生物碱的含量和产量也开始大幅度下降。因此, 在愈伤组织培养第 28~35 d 之间为最佳采集时间。

Table 3. Effect of growth days on callus biomass and accumulation of alkaloid in *Fritillaria cirrhosa* (n = 4)

表 3. 川贝母愈伤组织生长天数和总生物碱积累的情况(n = 4)

| 生长天数(d) Growth days | 干重(g) Dry Weight | 总生物碱含量(μg/g) Alkaloid contents | RSD (%) |
|------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------|
| 7 | 0.512 | 0.714 | 2.65 |
| 14 | 0.527 | 0.888 | 2.61 |
| 21 | 0.506 | 0.939 | 3.18 |
| 28 | 0.533 | 1.170 | 5.02 |
| 35 | 0.519 | 1.325 | 1.77 |
| 42 | 0.551 | 0.847 | 3.98 |

4. 讨论

适宜的激素水平、继代次数以及愈伤组织疏松程度是川贝母愈伤组织培养体系建立所必需的。本实验对川贝母的愈伤组织诱导进行了研究, 结果显示多组合的植物激素配合可以有效地缓冲外植体细胞适应性的影响, 稳定诱导愈伤组织。植物激素在愈伤组织增殖生长中起关键作用, 生长素与细胞分裂素的多种组合使用优于单一生长调节剂; 继代培养时间对川贝母愈伤组织生长能力有较明显的影响, 随着继代时间的延长, 活力逐渐下降。川贝母属于高海拔植物, 在低海拔区生长时, 其生长状态会受到一定的影响, 最直接的表现是生长速度有可能减慢, 对愈伤组织的形成及生长产生不利影响。川贝母初代愈伤

组织是由颜色、质地和形态无明显差异的细胞团块形成,经继代后产生绿色致密型、略黄色致密型等外观,但不影响稳定生长。

为实现中药资源的可持续利用,将植物组织培养技术应用于药用植物的生产开发中具有重大意义。药用植物组织培养是指在无菌和人为控制的营养(培养基)及环境条件下对药用植物器官、组织或细胞进行培养,用来生产药用活性成分[12]。目前,商品川贝母主要为野生品种,其采收期一般是6~7月的川贝母开花的时期(8月份川贝母化苗后难以采挖);而其他栽培品种,采收期一般在8月份。因此,川贝母在成分含量上的波动与采收期的不同有一定的关系,需要进一步研究。此外,生物碱是各种贝母的主要有效成分;川贝母是贝母中品质最佳的品种,其生物碱含量按理应该比较高[13]。本研究测定发现其生物碱含量并没有明显优势,其结果可能表明,代表川贝母药效特色的成分不仅有生物碱类成分,还可能有其他成分类型。

研究川贝母愈伤组织的诱导与快速繁育,获得大量生长速度快、有效组分含量高的愈伤组织,可以为进一步开展川贝母细胞悬浮培养,大规模工业生产药物有效成分奠定坚实基础。同时,利用川贝母诱导愈伤组织,更可充分地利用川贝母植物资源,对川贝母野生资源的保护也具有重要的作用。

基金项目

四川省科技计划项目(2018NZ0091)、四川省级公益性科研院所基本科研业务费项目、农业农村部杂粮加工重点实验室开放基金资助(No.2018CC12)、四川省中医药管理局科研项目(NO.2016ZY008)共同资助。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [2] 肖培根,姜艳,李萍,罗毅波,刘勇. 中药贝母的基原植物和药用亲缘学的研究[J]. 植物分类学报,2007,45(4):473-487.
- [3] 刘辉,陈士林,姚辉,李西文,张艺. 川贝母的资源学研究进展[J]. 中国中药杂志,2008,33(14):1645-1648.
- [4] 张志勇,杨洁,齐泽民. 川贝母的研究进展[J]. 江苏农业科学,2017,45(24):9-13.
- [5] 张婕. 川贝母产地生态适宜性分析和转录组学研究[D]. [硕士学位论文]. 北京:北京中医药大学,2018.
- [6] 中国药材公司. 中国常用中药材[M]. 北京:科学出版社,1995:59.
- [7] 于婧,魏建和,陈士林,代勇,杨成民. 川贝母种子休眠及萌发特性的研究[J]. 中草药,2008,39(7):1081-1084.
- [8] Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- [9] 张东杰,张爱武,王丽杰. HPLC-ELSD法测定平贝母中贝母素甲、贝母素乙含量[J]. 中国食品学报,2009,9(2):199-204.
- [10] 吴晓民,王艳红,郑友兰. HPLC测定不同产地平贝母中贝母甲素的含量[J]. 中国药学杂志,2006,41(20):1535-1537.
- [11] 薛燕,刘文啟. RP-HPLC法测定浙贝炮制品中主要生物碱的含量[J]. 药物分析杂志,2006(1):58-60.
- [12] 叶南,陈元胜. 药用植物组织培养在中药领域的应用研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(24):7502-7510.
- [13] 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.