

土贝母组织培养的研究

李翠芹, 王喆之*

(陕西师范大学 教育部药用植物资源与天然药物化学重点实验室, 陕西 西安 710062)

【摘要】 目的:研究土贝母茎段、叶片外植体愈伤组织的诱导和培养方法及其与土贝母皂苷积累的关系。方法:在 MS 或 B₅ 培养基上,试验不同种类、不同含量的植物生长物质及其组合对土贝母茎段和叶片愈伤组织诱导和增殖的影响。结果:茎段愈伤组织诱导的最佳培养基配方是 MS 附加 2,4-D 2.0 mg·L⁻¹, NAA 0.5 mg·L⁻¹ 和 BA 1.0 mg·L⁻¹; 叶片愈伤组织诱导的最佳培养基配方是 MS 附加 2,4-D 0.5 mg·L⁻¹ 和 NAA 2.0 mg·L⁻¹。愈伤组织在 MS 附加 2,4-D 2.0 mg·L⁻¹, NAA 0.5 mg·L⁻¹ 和 BA 1.0 mg·L⁻¹ 的培养基上积累土贝母皂苷的含量最高;在 B₅ 附加 2,4-D 2.0 mg·L⁻¹, NAA 0.5 mg·L⁻¹ 和 BA 1.0 mg·L⁻¹ 的培养基上经多次继代培养后,可形成较为均一、稳定的愈伤组织系。结论:建立了土贝母茎段、叶片外植体愈伤组织的诱导和培养方法,为植物组织细胞培养生产土贝母皂苷提供实验依据。

【关键词】 土贝母;愈伤组织;植物生长物质;土贝母皂苷

【中图分类号】 S 567 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-5302(2006)05-0369-04

土贝母 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim) Franquet 是葫芦科土贝母属植物,其鳞茎供药用。主治乳腺炎、疮疖痈肿、淋巴结核和骨结核,外敷可消肿止血。土贝母皂苷(tubeimoside)是从土贝母的鳞茎中提取分离的一类三萜皂苷,用于治疗各种皮肤疣,药理研究显示具有抗病毒作用^[1]。其中土贝母苷甲(tubeimoside I)对神经胶质细胞瘤、胰腺癌、宫颈癌和尖锐湿疣均有疗效,是当今公认的较好的抗肿瘤和抗病毒活性成分之一^[2-4]。国内外对土贝母的研究主要集中在化学成分、药理活性、药代学以及制剂学等方面^[5-8]。植物组织细胞培养生产土贝母皂苷未见报道。作者开展土贝母的组织培养研究,并为利用细胞培养大规模提取土贝母皂苷等药用成分奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

土贝母采自本校校园内栽培的植株茎段和叶片,经陕西师范大学生命科学学院田宪华教授鉴定为 *B. paniculatum*。

色谱分析系统包括 SPECTRA SERIE P200 色谱泵和 SPECTRA 100 紫外检测器(Thermo Separation

Products, 美国), 7125 型手动进样阀(Rheodyne 公司, 美国)和 ANASTAR 色谱工作站(奥泰科技有限公司, 天津)。土贝母苷甲(陕西中医药研究院, 纯度 > 98%)。

1.2 方法

1.2.1 外植体培养 取茎段和叶片,洗洁剂清洗干净,流水冲洗约 2 h, 0.1% HgCl₂ 常规灭菌 10 min, 无菌水冲洗 4~5 次,将茎切成约 0.5 cm 长的切段,叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,接种在附加不同植物生长物质的 MS 培养基上进行培养。培养基中加蔗糖 3%, 琼脂 0.7%, pH 5.8~6.0, 培养室温度 (25 ± 2) °C, 每天光照 14 h, 光照强度 2 000~3 000 lx。

1.2.2 愈伤组织观察和统计 观察各种培养基中外植体产生愈伤组织的时间及愈伤组织的长势,愈伤组织产生后统计各培养基中出现的愈伤组织块数,计算愈伤组织的诱导率。

诱导率 = 愈伤组织的块数/接种的茎段或叶片的外植体数 × 100%

1.2.3 土贝母皂苷的检测与含量测定 以浓硫酸显色反应定性检测愈伤组织中土贝母皂苷的存在。精密称取干燥至恒重的土贝母愈伤组织粉末(60目)0.3 g, 置 100 mL 量瓶中,加水 45 mL 浸提 3 h, 提取液用 45 mL 正丁醇分 3 次萃取,合并萃取液,用正丁醇稀释至刻度,摇匀,取 8 mL 水浴蒸干作为供试

【收稿日期】 2005-05-18

【通讯作者】 *王喆之, Tel: (029) 85308352, E-mail: zzwang@mail.snnu.edu.cn

品。另取土贝母皂苷对照品以甲醇溶解,精确吸取一定量(线性范围为40~320 μg),热风吹干或水浴蒸干。以上样品冷却至15~20 $^{\circ}\text{C}$,加入5%香草醛冰醋酸溶液0.2 mL,高氯酸2.0 mL,摇匀,恒温水浴60 $^{\circ}\text{C}$ 加热15 min,冷却15 min,在15~20 $^{\circ}\text{C}$ 下加冰醋酸2.8 mL,摇匀,同法作空白对照,于470 nm处测定吸收度。回归方程为 $C = 665.259A - 1.753$ ($r = 0.999$),计算出各种样品土贝母皂苷的含量。

1.2.4 色谱条件 Kromail ODS 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 0.5 μm);流动相70%甲醇;流速1.00 mL $\cdot$ min $^{-1}$;柱温为室温(26 $^{\circ}\text{C}$);检测波长214 nm;进样量10 μL 。

1.2.5 样品含量测定^[9] 精密称取干燥至恒重的土贝母愈伤组织粉末(60目)0.3 g,置100 mL量瓶中,加水45 mL浸提3 h,间歇振摇,用水稀释至刻度,摇匀,过滤,续滤液为供试品溶液。另取105 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥至恒重的土贝母皂苷对照品,加流动相溶解,制成0.1 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 对照品溶液。精密吸取上述2种溶液各10 μL 进样,测定峰面积,计算出各种样品土贝母皂苷的含量。

2 结果

2.1 愈伤组织的产生及形态

在MS培养基上,试验不同种类、不同含量的植物生长物质及其组合对土贝母外植体愈伤组织诱导的影响。茎段愈伤组织的产生先是茎两端膨大,从断面分化出淡绿色、乳白色的愈伤组织,最后整个外植体全部转为愈伤组织。叶片愈伤组织的产生先是叶片切块卷曲,接着产生淡绿色或翠绿色的愈伤组织。所有愈伤组织,依照其外部形态可明显将其分

为2类,第一类愈伤组织为乳白色或黄色,疏松易碎,生长速度快,这类愈伤组织可应用于次生代谢产品的生产;第二类愈伤组织为翠绿色或绿色,一般呈紧密坚实状,生长速度缓慢,这类愈伤组织经培养可产生不定芽。

土贝母愈伤组织诱导的结果(表1)表明,茎段愈伤组织产生时间早于叶片,茎段为7 d左右,叶片约14 d;茎段和叶片的愈伤组织诱导率都较高,一般都在80%以上;茎段在上述培养基的组合中都能诱导产生愈伤组织,而叶片在单独使用BA, ZT, NAA以及2,4-D, NAA与BA的组合中不能诱导产生愈伤组织,BA与ZT使叶片黄化,玻璃化;单独使用2,4-D, NAA或者二者的组合虽能诱导茎段产生愈伤组织,但10 d以后就分化不定根,而且二者同时使用时不定根生长非常旺盛,叶片在2,4-D以及2,4-D与NAA的组合中诱导的愈伤组织在15 d以后也有不定根产生。以上所产生的愈伤组织都为第一类愈伤组织。BA与NAA的组合既能诱导茎段又能诱导叶片产生愈伤组织,并且两类愈伤组织都有,提高BA, NAA含量可提高叶片愈伤组织产生率。另外,在BA与IBA组合中,茎段与叶片的愈伤组织产生晚,愈伤组织产生率低,提高IBA,愈伤组织产生速度和愈伤组织产生率下降,愈伤组织产生后,生长速度非常缓慢。茎段和叶片相比,茎段产生愈伤组织的时间早,诱导率高,愈伤组织生长速度快。茎段愈伤组织诱导的最佳培养基配方是MS附加2,4-D 2.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$, NAA 0.5 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 和BA 1.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$;叶片愈伤组织诱导的最佳培养基配方是MS附加2,4-D 0.5 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 和NAA 2.0 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 。

表1 土贝母愈伤组织的诱导

植物生长物质/mg $\cdot$ L $^{-1}$				时间/d		茎段		叶片	
2,4-D	NAA	BA	ZT	茎段	叶片	成愈数	诱导率/%	成愈数	诱导率/%
2.0				7	12	45	90	50	100
2.0	0.5			7	15	45	90	25	50
2.0	0.5	1.0		6	-	50	100	-	-
	2.0			7	-	46	93	-	-
0.5	2.0			7	12	47	94	50	100
0.5	2.0	1.0		6	-	50	100	-	-
	1.0	5.0		6	12	50	100	50	100
	2.0	5.0		6	12	50	100	50	100
	0.8	1.0		7	14	50	100	40	80
	0.4	1.0		7	14	50	100	41	81
		3.0		8	-	50	100	-	-
			3.0	10	-	50	100	-	-

注:基本培养基为MS;外植体接种数为50个

2.2 愈伤组织增殖和驯化

虽然土贝母的愈伤组织诱导率较高,但诱导后的生长状况却不同。将疏松易碎、浅绿色或乳白色的愈伤组织接种于不同种类和不同含量植物生长物质的培养基中,观察植物生长物质对愈伤组织增殖的效果。植物生长物质的种类和含量对茎段愈伤组

织的生长率和土贝母皂苷含量的影响见表2。从表2中可以看出,愈伤组织在不同植物生长物质作用下生长和土贝母皂苷积累差别较大,其中以MS附加2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 生长率最高,积累土贝母皂苷的含量最多。

愈伤组织在B₅附加2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA 0.5

表2 土贝母愈伤组织增殖和驯化

基本培养基	植物生长物质/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			生长率 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	总皂苷含量 /%	苷甲含量 /%
	BA	NAA	2,4-D			
MS	1.0	0.5	2.0	25.3	0.68	0.074
MS	1.0	2.0	0.5	25.0	0.63	0.062
MS	3.0	0.0	0.0	23.8	0.50	0.062
B ₅	1.0	0.5	2.0	23.1	0.37	0.043
B ₅	1.0	2.0	0.5	21.2	0.36	0.041
B ₅	3.0	0.0	0.0	20.5	0.31	0.041

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上经多次继代培养后,可形成较为均一、稳定的无性系。愈伤组织在MS培养基上比在B₅培养基上生长快,但老化速度快,颜色逐渐加深,由白色或浅绿色到黄色至黄褐色,其中在MS附加2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上颜色最深。

3 讨论

在B₅基本培养基上愈伤组织在继代中基本保持乳白色或浅绿色,而在MS基本培养基上愈伤组织由白色或浅绿色到黄色至黄褐色,由此可见基本培养基组成影响土贝母愈伤组织的生长状况。

在愈伤组织中提取药用成分,为药物生产开辟了新的途径。利用土贝母愈伤组织直接生产其药用成分土贝母皂苷,是一种经济而有效的途径。但此方面的研究未见报道,本实验经过培养与驯化得到的土贝母愈伤组织中土贝母皂苷的含量最高达到0.68%,说明了利用土贝母愈伤组织生产土贝母皂苷是可行的。

组织细胞培养生产皂苷的药用植物还有人参、西洋参和三七等,这些药用植物多采用细胞悬浮培养,植物细胞悬浮培养是走向工业化生产的必经步骤。与固体培养基相比,其特点是细胞增殖速度快,能大规模培养,提供均匀一致的培养物,为进一步大容积发酵罐生产创造条件和提供依据。早在20世纪70年代,就开始了人参细胞大规模的培养工作,到80年代已筛选出人参皂苷含量高、稳定的高产愈伤组织细胞株。关于皂苷的含量,刘长军等^[10]指出,悬浮培养的西洋参细胞经刺盘孢菌丝体诱导子

处理后,总皂苷产率可由对照的 $296 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $679 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,比对照组提高了约1.3倍,而且总皂苷85%排放到培养基中。张以恒等^[11]研究三七悬浮培养,仅添加合适含量的白糖可使干细胞达到 $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,人参皂苷可达 $1.52 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究为组织细胞培养生产土贝母皂苷奠定了一定基础,还有许多工作需要进一步完成。

[参考文献]

- [1] 胥戈. 土贝母化学成分及药理研究概论. 时珍国药研究, 1992, 3(4): 183.
- [2] Yu L, Ma R, Yu T. Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by Tuberimioside I. *Planta Med*, 1996, 62: 119.
- [3] 李笑弓, 南勋义. 中药土贝母对人肾细胞癌影响的实验研究. 中华泌尿外科杂志, 1997, 18(8): 503.
- [4] 李兴华, 王朋, 付章才, 等. 土贝母皂甙A对实验动物免疫功能的影响. 中国药房, 1998, 9(1): 13.
- [5] Liu W Y, Zhang W D, Chen H S, et al. New triterpenoid saponins from bulbs of *Bolbostemma paniculatum*. *Planta Med*, 2004, 70(5): 458.
- [6] 马润娣, 王永清. 土贝母皂甙甲素对鼠耳炎性水肿和小鼠皮肤促癌过程的强抑制作用. 科学通报, 1991, 36(18): 1412.
- [7] Yu L, Ma R, Wang Y, et al. Potent anti-tumor activity and low toxicity of tuberimioside I isolated from *Bolbostemma paniculatum*. *Planta Med*, 1994, 60(3): 204.
- [8] Miyakoshi M, Kasai R, Nishioka M, et al. Solubilizing effect and inclusion reaction of cyclic bisdesmosides from tubers of *Bolbostemma paniculatum*. *Yakugaku Zasshi*, 1990, 110(12): 943.
- [9] 魏有良, 杨小梅, 徐长根, 等. HPLC法测定土贝母中土贝母皂甲含量. 西北药学杂志, 2000, 15(3): 107.
- [10] 刘长军, 侯嵩生, 李新民, 等. 真菌诱导子对悬浮培养西洋参细胞的生理效应. 武汉植物学研究, 1996, 14(3): 240.

[11] 张以恒, 钟建江, 俞俊棠. 三七悬浮细胞高密度培养生产人参

皂甙和多糖. 华东理工大学学报, 1997, 23(3): 310.

Study on tissue culture of *Bolbostemma paniculatum*

LI Cui-qin, WANG Zhe-zhi

(Key Laboratory of Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry of
Ministry of Education, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

[Abstract] **Objective:** To study the method of callus induction and culturing of *Bolbostemma paniculatum* and its relationship with accumulation of tubeimoside. **Method:** Stem and leaf were selected as explants. The effects of growth substances and their combinations at different concentrations on callus formation and propagation on MS and B₅ basic medium were studied. **Result:** The optimal compositions of medium that induced calli from stems and leaves were the MS medium supplemented with 2,4-D 2.0 mg·L⁻¹, NAA 0.5 mg·L⁻¹ and BA 1.0 mg·L⁻¹ and the MS medium supplemented with 2,4-D 0.5 mg·L⁻¹ and NAA 2.0 mg·L⁻¹, respectively. The calli cultured on the MS medium supplemented with 2,4-D 2.0 mg·L⁻¹, NAA 0.5 mg·L⁻¹ and BA 1.0 mg·L⁻¹ were optimal for the accumulation of tubeimoside. A uniform and stable callus line could be formed from the calli cultured repeatedly on B₅ medium supplemented with 2,4-D 2.0 mg·L⁻¹, NAA 0.5 mg·L⁻¹ and BA 1.0 mg·L⁻¹. **Conclusion:** Using stem and leaf as explants, the method of the callus induction and culture of *B. paniculatum* was established and it could provide some references for the production of tubeimoside by tissue and cell culture.

[Key words] *Bolbostemma paniculatum*; callus; plant growth substances; tubeimoside

[责任编辑 张宁宁]

源库比改变对白首乌产量形成的影响

张 锋, 王建华*, 余松烈, 陈雨海, 董庆裕

(山东农业大学 农学院, 山东 泰安 271018)

[摘要] **目的:** 研究人为改变白首乌源库比后对产量、干物质积累及相关生理指标的影响。 **方法:** 以白首乌为材料, 在生育期内人工摘除花蕾、果实或摘除主茎分枝, 以不进行处理的对处理, 测定不同处理和时期的叶面积系数, 叶片叶绿素含量及单叶净光合速率, 干物质积累等指标。 **结果:** 在处理后期, 摘除主茎分枝虽然对叶片减少有补偿效应, 单叶光合速率上升, 但叶面积系数小, 功能叶负荷大, 叶绿素降解快, 有早衰现象, 物质积累低于对照。摘除花蕾和果实处理单叶光合速率与对照相比虽有降低, 但叶绿素含量高, 降解速度慢, 明显延缓了植株衰老, 并且叶面积系数一直处于较高水平, 光合产物供应充足, 干物质积累量以及对根部的分配显著高于对照和摘除侧枝处理, 所以该处理产量显著高于其他处理。 **结论:** 摘除白首乌花蕾能增加叶面积系数, 减缓叶片叶绿素降解, 延长绿叶功能期, 从而可以提高干物质积累和运往根部比例, 提高产量和效益。

[关键词] 白首乌; 源库比; 叶面积系数; 叶绿素; 光合速率**[中图分类号]** S 567 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2006)05-0372-04**[收稿日期]** 2005-06-22**[基金项目]** 山东省优秀中青年科学家奖励基金(03BS049)**[通讯作者]** * 王建华, Tel: (0538) 8248076, E-mail: jhwangjh@

163.com

白首乌为萝藦科鹅绒藤属几种植物的块根, 常见的原植物有白首乌 *Cynanchum bungei* Decne, 耳叶牛皮消 *C. auriculatum* Royle Wight, 隔山牛皮消 *C. wilfordii* (Maxim.) Hemsl. 等。《中国药典》1977年版仅收录白首乌 *C. bungei* 1种, 又名戟叶牛皮消,