

黄芩的愈伤组织培养和黄酮类物质的积累

王梦亮* 任振兴 刘滇生

山西大学现代化学研究所, 太原 030006

摘要 在暗培养条件下, 黄芩愈伤组织生长和黄酮类物质积累的最佳培养条件为: 基本培养基 MS 中的氮源浓度为 $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 为 1:1), KH_2PO_4 为 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 附加 $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA、 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨, 培养温度为 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ 。培养 40 d 后, 愈伤组织生物量为 $28.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 总黄酮产量达 $10.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词 黄芩; 愈伤组织; 类黄酮

Tissue Culture and the Accumulation of Total Flavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi

WANG Meng-Liang*, REN Zhen-Xing, LIU Dian-Sheng

Institute of Advanced Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract The effects of different conditions on the callus growth of *Scutellaria baicalensis* Georgi and the accumulation of total flavonoids were reported in this paper. The results showed that the optimal medium for the callus growth and the synthesis of total flavonoids in the dark is: MS medium, $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-=1:1$), $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA, $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA and $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ peptone. At $(25\pm 1)^\circ\text{C}$, after culture for 40 d, the total biomass reached $28.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the total flavonoids achieved $10.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words *Scutellaria baicalensis* Georgi; callus; flavonoid

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)为唇形科多年生草本植物, 其主要成分为黄酮类物质。此类物质在黄芩根和茎叶中都有分布, 且茎叶中的总黄酮是根中的 2 倍(刘金霞等 2002; 佟继铭等 1999)。对黄芩中黄酮类物质的研究主要集中在其药理作用上, 对黄芩愈伤组织培养和黄酮类物质次生合成的研究尚少见报道。本文研究不同培养基成分对黄芩愈伤组织生长和黄酮类物质积累的影响, 旨在为黄芩规模化生产黄酮类物质提供参考。

材料与方 法

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)种子由山西省陵川县农业综合开发局提供, 经山西大学秦雪梅女士鉴定。

仪器有: 日本岛津 UV-120-02 型紫外分光光度计、SPX-250-GB 光照培养箱(上海医疗器械厂)、JY98-3 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所)。黄芩苷对照品购自中国药品生物制品检定所, 实验用化学药品均为分析纯。

取黄芩种子用自来水漂洗干净后放入 75% 乙

醇中消毒 1 min, 转入 2% 次氯酸钠溶液中消毒 10 min, 用无菌水冲洗 5 次, 接种在 MS 培养基(附加 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)上萌发, 约 2 周后获得无菌苗。

取黄芩试管苗 0.5 cm 左右的茎接种于诱导培养基($\text{MS}+2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA+3% 蔗糖, pH 5.8)上, $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ 下暗培养。大约在培养 2 周后, 于茎与培养基接触处出现灰白色的愈伤组织。6 周后, 将诱导出的愈伤组织进行继代培养, 其培养条件同诱导培养基, 培养 40 d。

测定鲜重时, 从培养容器中取出生长 40 d 的黄芩愈伤组织, 用滤纸吸净其表面水分, 称重后再减去接种量即为鲜重增量。测定干重时, 从培养容器中取出的黄芩愈伤组织置于 60°C 下干燥至恒重, 称重后再减去接种量即为干重增量。

黄芩愈伤组织中总黄酮的含量测定参照文献(周德庆和曾骆 2002; 关崇新等 2000), 精确称 0.3 g 于 60°C 下烘干至恒重的黄芩愈伤组织, 碾

收稿 2006-02-13 修订 2006-05-24

资助 山西省攻关项目(051039-4)。

* E-mail: mlwang@sxu.edu.cn, Tel: 0351-7016101

碎, 加 80 mL 50% 乙醇超声(功率为 1600 W) 20 min, 定容于 100 mL 容量瓶中, 再精确地吸取上清液 2.0 mL, 用 50% 乙醇定容至 10 mL 容量瓶中, 于 280 nm 处测光密度值, 从标准曲线中计算出含量。

结果与讨论

1 不同碳源对黄芩愈伤组织生长和总黄酮积累的影响

从表 1 可以看出, 无论是对于干重增量还是黄酮含量而言, 蔗糖都是一种最佳碳源。

表 1 不同碳源对愈伤组织生长和总黄酮含量的影响

Table 1 Effects of different carbon sources on callus growth and the total flavonoid content

碳源	干重增量/ g·L ⁻¹	黄酮含量/ mg·g ⁻¹	总黄酮含量/ mg·L ⁻¹
甘露醇	0	0	0
麦芽糖	3.13	48.4	151.5
葡萄糖	3.95	65.6	259.1
蔗糖	8.73	76.9	671.3

碳源浓度为 3%。

2 不同浓度蔗糖对黄芩愈伤组织生长和总黄酮积累的影响

图 1 显示, 黄芩愈伤组织的生物量和总黄酮含量都随着蔗糖浓度的增加而增大, 蔗糖浓度达到 80 g·L⁻¹ 时, 二者都达到最大值, 但高到 100 g·L⁻¹ 后, 愈伤组织的生长和总黄酮的积累量都受

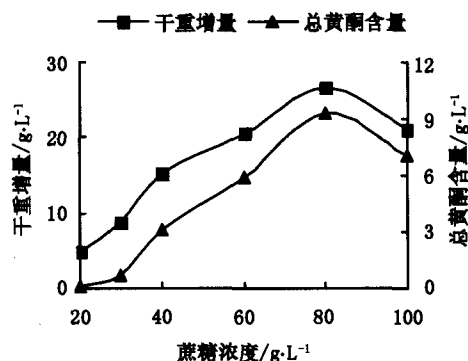


图 1 不同浓度蔗糖对愈伤组织生长和总黄酮含量的影响
Fig.1 Effects of different concentrations of sucrose on callus growth and the total flavonoid content

到明显抑制。从总黄酮的积累来看, 在 2% 蔗糖培养基中的含量很小, 但其积累量随着蔗糖浓度的增加而迅速增大, 8% 的蔗糖中积累的总黄酮量几乎是 2% 蔗糖的 86.3 倍, 3% 蔗糖的 13.8 倍。而 8% 的蔗糖中愈伤组织的生物量增量只有 2% 蔗糖的 5.4 倍, 3% 蔗糖的 3.0 倍。据此认为, 增加蔗糖的浓度有利于黄酮类化合物的合成, 且在一定范围内不影响黄芩愈伤组织的生长。

3 生长调节物质对黄芩愈伤组织生长和总黄酮积累的影响

图 2 显示, 当固定 IAA 的浓度为 0.2 mg·L⁻¹ 时, 黄芩愈伤组织的生物量随着 6-BA 浓度的增大而增加, 6-BA 高于 3 mg·L⁻¹ 时, 其生长趋势又明显减弱。总黄酮的含量也是在 6-BA 为 3 mg·L⁻¹ 时达到最大值, 其含量比 2 mg·L⁻¹ 的大 53.5%。

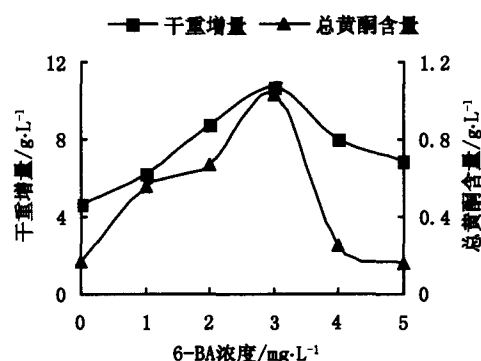


图 2 不同浓度 6-BA 对愈伤组织生长和总黄酮含量的影响
Fig.2 Effects of different concentrations of 6-BA on callus growth and the total flavonoid content

图 3 显示, 当固定 6-BA 的浓度为 3 mg·L⁻¹ 时, 生物量在不加 IAA 时很低, 随着 IAA 浓度的增大而明显增加, 在 0.3 mg·L⁻¹ 时达到最大值, 随着浓度的增加出现了抑制。总黄酮的含量也是在 IAA 的浓度为 0.3 mg·L⁻¹ 时达到最大值, 且随着 IAA 浓度的增加同样出现明显减小的趋势。

4 氮源对黄芩愈伤组织生长和总黄酮积累的影响

植物细胞培养中通常采用一定量的硝酸盐和铵盐作为混合无机氮源, 单独以铵盐或者硝酸盐为氮源, 都对细胞的生长和次级代谢物的生成不利(郭勇等 2004)。黄芩愈伤组织生长对 NH₄⁺ 和 NO₃⁻ 的需求是有差别的, 铵盐和硝酸盐分别用 (NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 来配制。

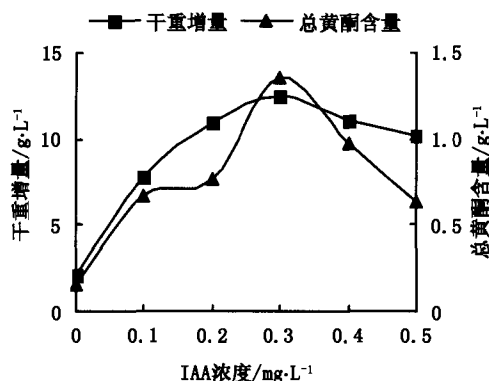


图3 不同浓度 IAA 对愈伤组织生长和总黄酮含量的影响
Fig.3 Effects of different concentrations of IAA on callus growth and the total flavonoid content

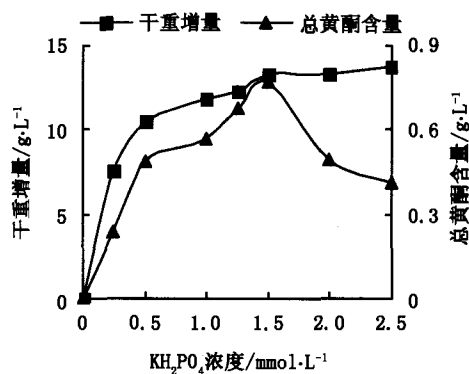


图4 不同浓度 KH₂PO₄ 对愈伤组织生长和总黄酮含量的影响
Fig.4 Effects of different concentrations of KH₂PO₄ on callus growth and the total flavonoid content

从表2可以看出, NH₄⁺:NO₃⁻ 为 1:1 时, 愈伤组织的生物量和总黄酮的含量均达到最高。另外, 在 NH₄⁺:NO₃⁻ 为 1:1 时, 培养基中总氮浓度变化的影响结果表明, 总氮浓度为 60 mmol·L⁻¹ 的愈伤组织生长较好(11.32 g·L⁻¹), 总黄酮的含量最高; 总氮浓度达 120 mmol·L⁻¹ 时, 愈伤组织生长受抑, 总黄酮的含量也显著减低。据此认为, 氮源浓度以 60 mmol·L⁻¹ (NH₄⁺:NO₃⁻ 为 1:1) 为最适宜。

表2 不同 NH₄⁺ 和 NO₃⁻ 浓度比对愈伤组织生长和总黄酮含量的影响

Table 2 Effects of different concentration ratios of NH₄⁺ and NO₃⁻ on callus growth and the total flavonoid content

NH ₄ ⁺ :NO ₃ ⁻	干重增量 / g·L ⁻¹	黄酮含量 / mg·g ⁻¹	总黄酮含量 / mg·L ⁻¹
1:0	0	0	0
0:1	4.73	10.3	48.8
1:1	10.47	72.5	759.1
1:2	9.34	32.4	302.6
2:1	8.65	9.5	81.8

5 磷酸盐对黄芩愈伤组织生长和总黄酮积累的影响

图4显示, 当 KH₂PO₄ 在小于 0.5 mmol·L⁻¹ 时, 黄芩愈伤组织生物量随着 KH₂PO₄ 浓度的增加而明显增大, 在 0.5~2.5 mmol·L⁻¹ 之间的增加幅度不大。总黄酮含量在 KH₂PO₄ 为 1.5 mmol·L⁻¹ 时达到最大值, 并随着浓度的增加而明显减小。据此认为, KH₂PO₄ 的浓度以 1.5 mmol·L⁻¹ 为最适宜。

6 有机添加剂对黄芩愈伤组织生长和总黄酮积累的影响

从表3可以看出, 牛肉膏和蛋白胨对黄芩愈伤组织生长都有促进作用, 且二者均能显著提高总黄酮含量, 以蛋白胨的效果较好; 但酵母粉对黄芩愈伤组织生长和总黄酮的积累量都有抑制。据此认为, 蛋白胨是比较好的有机添加剂。

表3 不同有机添加剂对愈伤组织生长和总黄酮含量的影响

Table 3 Effects of different organic additions on callus growth and the total flavonoid content

有机添加剂	干重增量 / g·L ⁻¹	黄酮含量 / mg·g ⁻¹	总黄酮含量 / mg·L ⁻¹
对照	8.7	76.9	671.3
牛肉膏	11.3	103.3	1167.3
蛋白胨	12.1	97.8	1183.4
酵母粉	6.3	46.9	296.9

参考文献

关崇新, 回瑞华, 候冬岩(2000). 从总黄芩中提取总黄酮的方法研究. 鞍山师范学院学报, 2 (4): 87~90
郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯(2004). 植物细胞培养技术与应用. 北京: 化学工业出版社, 139~140
刘金霞, 邓淑华, 杨贺松, 石艳华, 高巍, 赵铁华(2002). 黄芩茎叶总黄酮的抗炎作用机制的研究. 中国药理学通报, 18 (6): 713~714
佟继铭, 刘玉铃, 符景春(1999). 黄芩茎叶总黄酮长期毒性研究. 承德医学院学报, 16 (1): 11~13
周德庆, 曾路(2002). 黄芩总黄酮的提取工艺研究. 华西药学杂志, 18 (1): 78~79