

不同理化因子对黄连愈伤组织生长和生物碱合成的影响

张浩¹ 陈炜 晁若冰 王雪耕² 庄燕黎² 李小华²

(华西医科大学药学院 成都 610041)

古蔺野连(又称串珠连 *Coptis gulinensis*)为黄连属植物中的一个野生珍稀品种,只生长在我国西南少数山区,其根茎可作中药黄连,含有与商品黄连相同的小檗碱等化学成分^[1]。作者在对黄连细胞培养研究中,通过目视法和 TLC 比较,从古蔺野连的愈伤组织中初步筛选到了生物量增长较快、生物碱合成能力较为稳定的无性系 H292,进行了其生物量及生物碱含量的动态测定。本文报道植物激素、温度、光照等对黄连愈伤组织生长和生物碱合成能力的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用材料为作者 1992 年 2 月从古蔺野连(*Coptis gulinensis*)花萼诱导产生并初步筛选的愈伤组织系 H292。该无性系一直生长在 MS 附加 2,4-D 0.5mg/L、Kt 0.2mg/L 的固体继代培养基上。

1.2 培养条件

根据不同实验要求,选用 MS 固体基本培养基,附加不同浓度的 2,4-D、NAA、Kt 等植物激素,以不同组合考查其对生物量增长和生物碱合成的影响,同时考查了相同激素配比下不同温度、光照或暗培养时的实验数据,详细条例见附表。实验采用经 22 代继代培养后的该无性系,用 150ml 三角瓶盛培养基 30ml,每瓶接种量约为培养物鲜重 0.6g(取 4 次的平均值),培养 4 周后收获。

1.3 培养物生长和生物碱含量测定

培养物产率和生长速率按文献方法^[2]计算,将结果换算成经 4 周培养后平均每升培养基中培养物干、鲜重的增加量,以克为单位,进而计算每天每升培养基中愈伤组织干、鲜重增加的毫克数。

采用 HPLC 法测定培养物中生物碱含量。产物于 60℃ 干燥至恒重,粉碎,精密称取约 0.1g,用盐酸甲醇液(0.5:100)超声振荡提取 1h,经定容、过滤后供测试。HPLC 仪为岛津 LC-6A 型;ODS 柱;流动相为乙腈:水(1:1),内含 0.025mol/L KH_2PO_4 ,0.025ml/L SDS,磷酸调 pH 至 4.8;标温 35℃;流速 1.0ml/min;检测波长 UV345nm。标准品为盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、硫酸黄连碱(中国药品生物制品检定所和武汉药检所提供)。未知物 2(Un 2)和未知物 3(Un 3)经检测初步鉴定为培养中新产生的生物碱,其含量按盐酸小檗碱折算,HPLC 图谱见图 1。

2 结果与讨论

2.1 植物激素的影响

植物生长激素的种类和浓度对培养物生物量增长和次生代谢产物合成均有一定影响,以 2,4-D 或 NAA 的不同浓度与细胞分裂素 Kt 组成的 6 个配比中,2,4-D 浓度 1mg/L 对培养物生长最为有利(表 1),4 周中平均日增培养物干重分别比 2,4-D 浓度为 0.1ml/L 和 10.0mg/L 时提高 24% 和 21%。

* 国家自然科学基金资助项目。

1 通讯联络人。

2 本校 92、95 届本科毕业生。

· 本文于 1995 年 4 月 17 日收到。

表 1 MS 培养基中不同激素配比对黄连愈伤组织生长的影响

Hormone			Fresh weight	Dry weight	Fresh weight	Dry weight	Growgh rates	Increase
2,4-D	NAA	Kt	of inoculum	of inoculum	of cultures	of cultures	(mg. dw/L)	(dw. time)
	(ml/L)		(g fw/L)	(g dw/L)	(g fw/L)	(g dw/L)		
0.1	0	0.2	20.06	2.57	101.79	13.46	311	5.23
1.0	0	0.2	19.40	2.49	122.79	15.99	386	6.42
10.0	0	0.2	17.32	2.22	95.46	13.41	319	6.03
0	0.1	0.2	19.98	2.56	69.39	9.50	198	3.70
0	1.0	0.2	17.23	2.21	65.89	10.00	222	4.52
0	10.0	0.2	17.82	2.28	76.80	11.16	230	4.88

NAA 促进培养物生长的作用不如 2,4-D; 但 NAA 对黄连生物碱合成和积累明显有利(表 2), 在同等植物激素浓度条件下, NAA 培养培养物中总生物碱含量分别为 2,4-D 培养时含量的 2.20、2.26 和 1.90 倍, 折算成产量分别为后者的 1.55、1.44 和 1.58 倍(分别得出各培养物中生物碱总产量, 再计算前者与后者之间的比值)。

关于 NAA 对培养物中生物碱合成能力影响有不同报道, Zenk 等(1977)认为 NAA 抑制长春花中生物碱合成; Hara(1983)和张荫麟等(1991)分别在日本黄连和延胡索培养中观察到 NAA 对生物碱合成的有利影响^[3-5]。因此, 对于 NAA 的作用一定要结合具体研究对象加以分析。

2.2 培养温度的影响

温度对组织培养物生长的影响方面有较多报道^[6,7], 但是关于其对培养物中次生代谢产物合成和积累的影响讨论较少。作者探讨了在其它条件相同的情况下, 温度为 35℃、25℃、15℃ 和 5℃ 时 4 周培养物生长和次生代谢产物合成和积累的结果(表 3)。生物碱合成和积累能力以温度越低越强, 5℃ 培养 4 周后生物碱含量为培养物干重的 2.03%, 尽管其生物量增长仅及 25℃ 下培养的 10.5%, 但总碱增量则达后者的 52.4%。如何既满足生物量增长又提高次生代谢产物的合成能力是组织培养中要解决的主要问题, 过去的研究多认为, 培养物中次生代谢产物的合成和积累抑制了培养物生物量增长, 表 3 结果提示, 有可能是生物量增长过快使次生代谢产物合成能力跟不上。由于黄连培养物在 25℃ 下超过 60d 细胞就死亡分解, 我们进行的实验中 5℃ 下培养 120d, 仍能继续生长, 因此如条件许可, 可在 25℃ 下培养一段时间以促使细胞快速增长, 然后于低温下培养以促进生物碱合成, 既提高日的产物的产率, 又能避免细胞死亡。

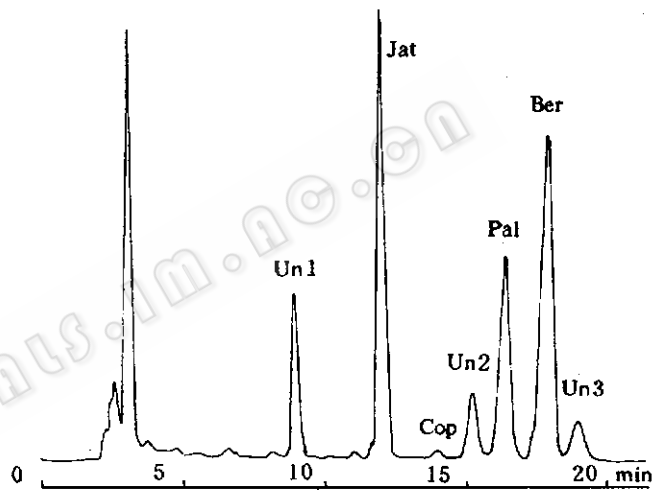


图 1 黄连愈伤组织的高效液相图谱

1. 未知物 1(Un1);
2. 药根碱(Jat);
3. 黄连碱(Cop);
4. 未知物 2(Un2);
5. 巴马汀(Pal);
6. 小檗碱(Ber);
7. 未知物 3(Un3)

表 2 不同植物激素配比对黄连愈伤组织中生物碱含量的影响

Hormone			Alkaloid content							Alkaloid yield Increased weight	
2,4-D	NAA	Kt	J	C	P	B	Un 2	Un3	T	(mg/L)	of alkaloid (ml/L·d)
(mg/L)			(mg/L)								
0.1	0	0.2	1.88	0.21	0.63	2.08	1.41	1.06	7.29	97.85	2.72
1.0	0	0.2	2.09	0.24	0.91	1.93	1.14	1.57	7.88	126.00	3.75
10.0	0	0.2	2.57	0.25	0.58	3.00	1.24	1.35	8.99	120.56	3.66
0	0.1	0.2	8.78	0.18	1.12	3.48	1.13	1.29	15.98	151.81	4.65
0	1.0	0.2	9.98	0.22	1.22	3.78	1.22	1.35	17.77	177.70	5.68
0	10.0	0.2	9.57	0.21	1.14	3.69	1.17	1.31	17.09	190.72	6.13

1. J = Jatrorrhizine; C = Coptisine; P = Palmatine; B = Berberine; Un 2 = Unknown 2; Un 3 = Unknown 3;
T = Total alkaloid.

$$2. \text{生物碱产率} = \frac{\text{生物碱收获量} - \text{接种时生物碱量}}{\text{培养基体积} \cdot \text{培养时间}} \quad \text{单位: mg/L} \cdot \text{d}$$

表 3 温度对黄连愈伤组织生长和生物碱含量的影响

T	Dry weight of cultures (g dw/L)	Growth rate (mg dw/L·d)	Alkaloid content							Alkaloid yield (mg/L)	Increased of alkaloid (mg/L·d)
			J	C	P	B	Un2	Un3	T		
			(mg/L)								
35℃	2.33	-5	1.92	0.24	0.67	1.36	1.50	1.24	6.93	16.15	-0.17
25℃	16.83	404	2.52	0.24	0.84	1.63	1.31	1.26	7.80	131.27	3.89
15℃	9.58	216	2.34	0.26	0.39	2.57	1.53	1.35	8.44	80.86	2.29
5℃	3.75	43	6.26	0.59	1.44	8.53	1.37	2.06	20.25	75.94	2.03

2.3 光照的影响

光照培养箱中(800 Lx, 每日 24h)和暗培养相比较,光照培养愈伤组织生物量增长仅及暗培养的 76.5%,其生物碱合成能力亦受抑制,光照条件下培养物生物碱含量仅及暗培养条件下含量的 80% (表 4)。

表 4 光照对黄连愈伤组织生长和生物碱含量的影响

	Dry weight of cultures (g dw/L)	Growth rate (mg dw/L·d)	Alkaloid content							Alkaloid yield (mg/L)	Increased weight of alkaloid (mg/L·d)
			J	C	P	B	Un 2	Un 3	T		
			(mg/L)								
light	13.24	309	6.33	0.36	1.50	6.35	1.86	0.95	6.26	82.88	2.23
dark	16.83	404	7.00	0.40	1.66	7.03	1.31	1.26	7.80	131.27	3.89

根据文献记载,光照对培养细胞生长与成分形成在不同的研究对象中有不同的表现,如人参细胞培养^[8],光照条件下色素产量明显较暗培养高;而紫草细胞培养,光照则明显抑制色素形成。对于我们研究的黄连属植物来说,暗培养既有利于细胞生长,又有利于次生代谢产物产生与积累。

参 考 文 献

- [1] 方析平,王天志,张浩等. 中国中药杂志 1989, 14(20):33~35.
- [2] 董教望,叶和春,吴新等. 植物学报 1993, 35(1):57~61.
- [3] Zenk, M H, Elshagi H, Arens I, *et al.* In: Barz W. (eds.) Plant cell cultures and their biotechnological applicatoin, Springer Verlag Berlin, 1977, pp27.

- [4] Hara Y. Eur Pat Appl EP 71999, 1983.
- [5] 张荫麟, 朱敏, 赵保华. 中草药, 1991, **22**(10):463~465.
- [6] 丁葆祖, 杨静仪, 李晋川等. 中草药, 1984, **15**(12):28~30.
- [7] Asaka I, Ichio L, Yoxhikawa T *et al.* Planta Medica, 1993, **59**:345~346.
- [8] 李树敏, 朱蔚华, 植物学报. 1990, **32**(2):103~111.

Effects of Physical and Chemical Factors on Growth and Alkaloid Synthesis of Callus from *Coptis gulinensis*

Zhang Hao Chen Wei Chao Ruobin Wang Xuegeng Zhuang Yanli Li Xiaohua
(Pharmacy School, West China University of Medical Sciences, Chengdu 61004)

Abstract The kinds and compositions of external hormones, temperature and light, all had effects on the cell growth and the alkaloid yield in *Coptis* tissue culture. Selecting 2,4-D as auxin contributed to the increase of culture biomass, and the most increased dry weight and fresh weight per day amount to 386 mg/L and 2954 mg/L, respectively, while selecting NAA as auxin contributed to the production and accumulation of alkaloids, and increased content of total alkaloids per day and the total yield can attain 6.13 mg/L and 190.72 mg/L, respectively. The varying auxin had important effects on the composition of metabolite in cultures. On the medium containing 2,4-D, the content of Jatrorrhizine is approximately equal to the content of Berberine. When 2,4-D was replaced by NAA, the content of Jatrorrhizine surpassed the content of Berberine greatly, and can attain 2.5 times of latter. The temperature had the greatest effect on the cultures. At 35°C, the negative increase of the cultures biomass and the content of alkaloid emerged. At 5°C, the growth of the cultures was inhibited while the accumulation of alkaloid was improved. The increase of biomass was only up to 10.5% of that at 25°C, but the increase of the contents of total alkaloids can reach 52% of latter. Light inhibited the growth of cultures and the yield of alkaloids. In light, the increase of biomass and contents of alkaloids were only up to 76.5% and 57.9% of those in dark, respectively.

Key words *Coptis* callus, Physical and chemical factors, Increase of biomass, Production of alkaloids