

卵叶钓钟柳的离体再生及 特殊中药成分的 HPLC 检测^①

汤绍虎^{1,2}, 莫秀媚^{1,2}, 李明惠^{1,2}, 杨立^{1,2},
吴秀华^{1,2}, 张艳玲^{1,2}, 罗克明^{1,2}

1. 西南大学 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715; 2. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715

摘要: 以卵叶钓钟柳无菌苗的下胚轴为外植体, 通过不定芽诱导、增殖和生根建立离体再生体系, 并采用 HPLC 检测试管苗中松果菊苷和毛蕊花糖苷含量。结果表明, 在 MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 培养基中, 下胚轴 20 d 不定芽诱导率为 88.33%; 在 MS+0.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 培养基中, 不定芽 1~3 代平均繁殖系数达 7.5; 在 1/2 MS 培养基中, 不定芽 20 d 生根率达 100%; 48 株试管苗移栽到田间, 30 d 成活 46 株, 成活率达 95.83%。试管苗全株含毛蕊花糖苷约 40.37 $\mu\text{g/g}$ DW, 不含松果菊苷。该试验成功建立了卵叶钓钟柳离体再生体系, 为其快速繁殖和遗传转化奠定了基础。

关键词: 卵叶钓钟柳; 植株再生; 松果菊苷; 毛蕊花糖苷; HPLC

中图分类号: Q949.777.8

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)11-0064-06

钓钟柳是玄参科 Scrophulariaceae 钓钟柳属 *Penstemon* 植物的俗称, 主要分布在北美洲至中美洲墨西哥一带的广阔地区, 多数为多年生草本, 少数为灌木或一年生草本, 几乎全株都可药用, 是当地土著居民重要的药物资源, 无论是作外用膏药敷料, 还是内服茶类饮料都极受民众青睐^[1]。钓钟柳色彩艳丽, 花色丰富, 花型多变, 在我国主要用于城市绿化^[2], 其药用价值尚未开发利用。Ismail 等^[3]、谢峻等^[4]先后发现克氏钓钟柳 *Penstemon crandallii* 和红花钓钟柳 *Penstemon barbatus* 含有松果菊苷, 而传统补益中药肉苁蓉的主要药效成分为松果菊苷和毛蕊花糖苷^[5]。松果菊苷具有抗衰老与肿瘤、保护神经与肝脏、提高记忆力和免疫力等药理作用^[6-7]; 毛蕊花糖苷具有抗炎、抗血小板聚集^[8]和保护神经与免疫系统作用, 对治疗老年痴呆症疗效突出^[9-11]。肉苁蓉生长环境特殊, 由于多年的破坏性采挖, 其野生资源现濒临枯竭, 已被国家列为二级濒危保护植物^[5, 12]。因此, 开展肉苁蓉的替代药源研究具有重要的现实意义。

钓钟柳原始种多用种子繁殖^[13]。但种子繁殖的实生苗性状不稳定, 容易造成品种退化^[14]。植物组织培养既可保持物种的优良性状^[14-15]和实现药用植物的快速繁殖^[16-18], 又能通过遗传转化提高其药效成份含量^[19-20]。卵叶钓钟柳 *Penstemon ovatus* Dougl. 是钓钟柳属的一个种。迄今为止, 其组织培养和药效成分分析未见报道。本试验以其无菌苗的下胚轴为外植体, 通过不定芽诱导、增殖和生根建立离体再生体系, 并分

① 收稿日期: 2013-07-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871576); 国家级大学生创新创业训练计划资助项目(201210635072)。

作者简介: 汤绍虎(1960-), 男, 四川渠县人, 博士, 教授, 主要从事植物生理与分子生物学研究。

析试管苗中松果菊苷和毛蕊花糖苷含量,为其快速繁殖和遗传转化奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料、试剂与仪器

试验材料为卵叶钓钟柳 *Penstemon ovatus* 种子,购于南京丰泰园艺花卉公司,经西南大学生命科学学院邓洪平教授鉴定.松果菊苷、毛蕊花糖苷标准品(北京中国药品生物制品检定所,纯度分别超过 99%和 98%)、色谱级甲醇(天津四友精细化学品有限公司)、其他分析纯试剂(成都科隆化学试剂厂);日本岛津高效液相色谱仪(LC-20A)、菲罗门 C18-ODS column(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、十万分之一电子天平(AB135-S,德国 Mettler-Toledo).

1.2 卵叶钓钟柳离体再生体系的建立

1.2.1 无菌苗的培育

种子洗净,25℃清水浸泡 2 h.在无菌条件下,用 70%乙醇处理 10 s,无菌水冲洗 1 次,2%次氯酸钠消毒 15 min,无菌水冲洗 3 次,接入 MS 培养基,25℃萌发,得无菌苗.

1.2.2 不定芽的诱导与增殖

无菌条件下,将大小一致、长势良好的无菌苗的下胚轴切成长约 1 cm 小段,接种在含不同体积质量分数 BA 和 NAA 的 MS 培养基上培养,20 d 后统计不定芽诱导率,记录不定芽生长状况.分离、切割丛芽,将芽簇(长约 1 cm,具 2~3 个不定芽)转入 MS+0.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 培养基继代培养,20 d 后统计繁殖系数(形成不定芽总数/接种不定芽数).

1.2.3 不定芽的生根与试管苗移栽

无菌条件下,将继代增殖的丛芽切割成单芽(长 1~2 cm),接种到含或不含 IBA 或/和 NAA 的 MS 或 1/2 MS 培养基中生根,20 d 后统计生根率.对生根试管苗在室内逐渐打开瓶塞晾苗 2 d,用自来水洗净根部琼脂,假植到盛有苔藓土壤的营养钵中炼苗 10 d 后移栽到田间,30 d 后统计成活率.

本试验所用基本培养基为 MS(1/2 MS 为其矿质含量减半),附含 30 g/L 蔗糖、7 g/L 琼脂,pH=5.8.培养温度(25±1)℃,光照强度 2 000 lx(16 h/d).每个培养基接种 20 个外植体,3 次重复.

1.3 卵叶钓钟柳试管苗松果菊苷和毛蕊花糖苷的质量分数检测

1.3.1 标准曲线的制作及 HPLC 条件

精密称取松果菊苷和毛蕊花糖苷对照品各 0.50 mg,用 HPLC 流动相溶解并定容至 1 mL,充分摇匀后得 500 μg/mL 对照品母液,用其分别配制 25,50,100,250,500 μg/mL 松果菊苷和 1,10,50,125,500 μg/mL 毛蕊花糖苷对照品溶液,然后利用 HPLC 法制作回归曲线.

HPLC 色谱条件:流动相 A 为色谱级甲醇,流动相 B 为 0.1%甲酸.梯度洗脱程序为 0~17 min,26.5% A,73.5% B;17~20 min,26.5%→29.5% A,73.5%→70.5% B;20~27 min,29.5% A,70.5% B.进样量 20 μL(每样品重复进样 3 次),流速 1 mL/min,柱温 25℃,检测波长 330 nm^[21-22].试验所得松果菊苷的回归曲线为 $y=17\,099x+72\,083$, $r=0.999\,2$;毛蕊花糖苷的回归曲线为 $y=30\,482\,072x+126\,397$, $r=0.999\,5$.说明松果菊苷在 25~500 μg/mL,毛蕊花糖苷在 1~500 μg/mL 时线性关系良好.

1.3.2 试管苗松果菊苷和毛蕊花糖苷的提取与质量分数检测

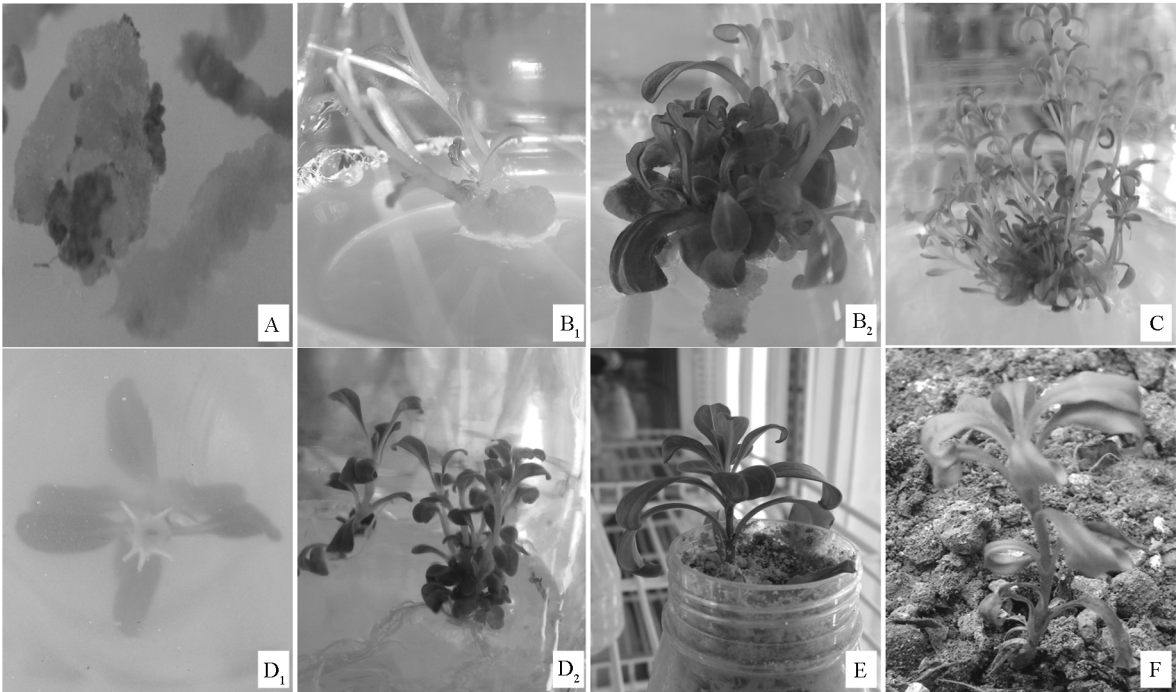
取卵叶钓钟柳无菌试管苗全株,洗净根部琼脂后于 37℃干燥至恒定质量(5 d),研磨成粉,过 50 目筛.准确称取 1 g,加入到 25 mL 棕色量瓶中,加入 50%甲醇 18 mL,密塞摇匀,每隔 10 min 超声(250 W,70 kHz)提取 3 次,每次 10 min,放至室温.上清液过布氏漏斗,收集滤液,过 0.22 μm 微孔滤膜,收集样品提取液,HPLC 检测.松果菊苷、毛蕊花糖苷标准品溶液质量分数分别为 10 μg/mL 和 25 μg/mL,进样量 20 μL,重复 3 次.

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导与增殖

结果表明, 培养基中 BA 与 NAA 的不同质量分数组合, 对卵叶钓钟柳下胚轴分化不定芽有显著影响(表 1). 下胚轴接种后, 7 d 左右开始产生愈伤组织(图 1-A), 各培养基愈伤诱导率均在 95% 以上; 10 d 左右分化出不定芽, 15 d 左右可见明显丛芽(图 1-B₁). 培养 20 d 后, 在所有 9 个培养基中, M₅ 培养基不定芽诱导率最高(88.33%), 并与其他培养基存在显著差异($p \leq 0.05$), 且不定芽生长快、数量多、长势好, 丛芽无玻璃化现象(图 1-B₂); M₆ 培养基诱导率较高(66.67%), 不定芽长势较好, 但部分丛芽发生玻璃化(将严重影响后期不定芽的增殖与生长); 其他培养基诱导率较低, 丛芽长势较差, 有的还发生玻璃化. 因此在本试验中, 诱导卵叶钓钟柳下胚轴分化不定芽的最佳培养基为 M₅ 培养基, 即 MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA.

不定芽在 MS+0.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 培养基(M₁ 培养基)中连续继代培养 3 代(培养周期 20 d), 平均繁殖系数达 7.5(图 1-C).



A. 下胚轴培养 7 d 产生的愈伤组织; B. 由下胚轴愈伤组织再生的不定芽(B₁. 15 d, B₂. 20 d); C. 不定芽继代培养 20 d 形成的丛芽;
D. 不定芽生根(D₁. 7 d, D₂. 15 d); E. 炼苗 10 d 的试管苗; F. 移栽田间 30 d 成活的试管苗.

图 1 卵叶钓钟柳的组织培养和植株再生

表 1 植物生长调节剂对卵叶钓钟柳不定芽分化的影响

培养基 编号	生长调节剂组合 /(mg · L ⁻¹)	接种下 胚轴/个	芽分化 下胚轴/个	不定芽 诱导率/%	丛芽生长状况	丛芽 长势
M1	BA 0.5+NAA 0.2	20	3.67±2.08	18.33±10.40de	数量少、纤细、生长慢	差
M2	BA 1.0+NAA 0.2	20	9.00±1.00	45.00±5.00c	数量较少、纤细、生长较慢	中
M3	BA 2.0+NAA 0.2	20	12.33±1.53	61.67±7.64b	数量较多、纤细、生长较快, 部分玻璃化	中
M4	BA 0.5+NAA 0.5	20	8.67±1.53	43.33±7.64c	数量较多、纤细、生长较快	良
M5	BA 1.0+NAA 0.5	20	17.67±0.58	88.33±2.89a	数量多、粗壮、生长快, 具有多个芽点	优
M6	BA 2.0+NAA 0.5	20	13.33±2.0	66.67±10.41b	数量较多、较粗壮、生长较快, 部分玻璃化	良
M7	BA 0.5+NAA 1.0	20	6.67±2.08	33.33±10.41cd	数量较少、较粗壮、生长较慢	中
M8	BA 1.0+NAA 1.0	20	5.33±1.53	26.67±7.64d	数量少、纤细、生长慢	差
M9	BA 2.0+NAA 1.0	20	2.00±1.00	10.00±5.00e	数量少、纤细、生长慢, 部分玻璃化	差

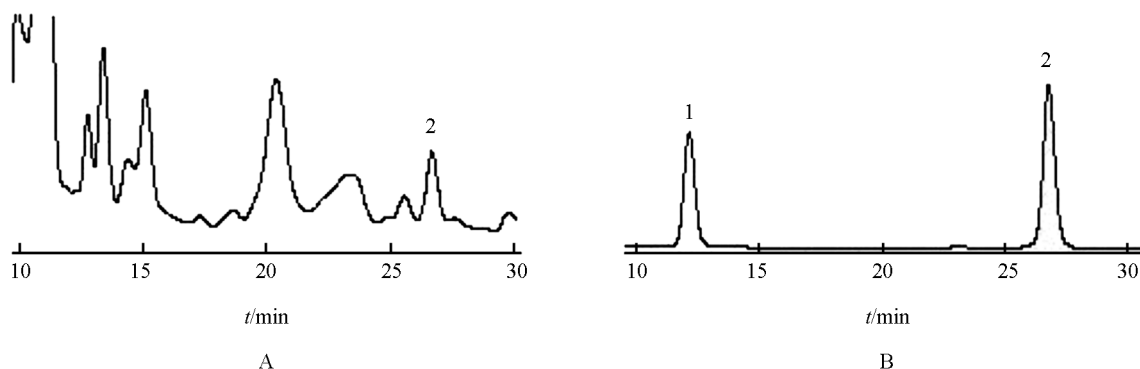
2.2 不定芽的生根与试管苗移栽

在生根培养基中, 4 d 后开始产生不定根(图 1-D₁); 15 d 后形成明显根系(图 1-D₂); 培养 20 d 后, 在 MS 和 1/2 MS 培养基中, 以及添加 0.2 mg/L NAA 和/或 IBA 的培养基中, 生根率均达 100%. 结果表明, 不添加 NAA 或 IBA 时, 1/2 MS 或 MS 基本培养基均能保障卵叶钓钟柳不定根的形成和根系的正常发育. 但是, 添加 0.2 mg/L NAA 和/或 IBA 时, 不定芽下端容易形成愈伤组织, 反而不利于不定根的发生. 试验结果表明, 矿质含量较低的 1/2 MS 基本培养基更适于卵叶钓钟柳不定芽生根.

经室内晾苗和苔藓土壤中炼苗后(图 1-E), 48 株试管苗移栽到田间, 30 d 成活 46 株, 移栽成活率达 95.83%, 且生长良好(图 1-F).

2.3 试管苗中松果菊苷和毛蕊花糖苷的 HPLC 检测

试管苗样品和检测成份对照品的 HPLC 检测结果见图 2. 保留时间为 26.678 min 时, 在对照品 2(毛蕊花糖苷)标准峰处(图 2-B-2)有对应的样品峰出现(图 2-A-2); 保留时间为 12.122 min 时, 在对照品 1(松果菊苷)标准峰(图 2-B-1)却没有对应的样品峰出现. 通过峰面积计算得知, 卵叶钓钟柳试管苗毛蕊花糖苷质量分数约为 40.37 $\mu\text{g/g}$. 检测结果表明, 卵叶钓钟柳试管苗含有少量毛蕊花糖苷, 不含松果菊苷.



1. 松果菊苷; 2. 毛蕊花糖苷.

图 2 样品(A)和对照品(B)的 HPLC 色谱图

3 结论与讨论

本试验首次建立了卵叶钓钟柳的离体再生体系, 并明确其试管苗全株含有毛蕊花糖苷, 表明卵叶钓钟柳有可能成为毛蕊花糖苷和部分替代肉苁蓉新的药源植物. 试验结果为卵叶钓钟柳的无性快速繁殖和遗传转化奠定了基础.

通常, 顶芽分生组织是组织培养的良好材料. 但在本试验中发现, 卵叶钓钟柳的顶芽娇嫩, 在表面消毒过程中易受伤害, 且因其多酚氧化酶活性可能较强, 易产生褐变^[23], 所以本试验最终确定以其无菌苗的下胚轴为外植体建立再生体系. 在本试验中发现, 培养基中 BA 质量分数较高(2 mg/L)时, 形成的部分丛芽发生玻璃化现象, 尤其在继代培养中变得较为严重, 这可能与培养基中 BA 体积质量分数、BA 在不定芽中的积累以及培养基中 BA/NAA 体积质量分数比值有关. 玻璃化现象在植物组织培养中较为普遍, 一般认为应当严格控制培养基中的 BA 体积质量分数^[24]. 因此, 本试验选择 BA 体积质量分数较低的 M₁ 培养基(MS+0.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA)用于不定芽的继代培养, 得到了较好的增殖效果, 前 3 代平均繁殖系数达 7.5, 高于 Wyssokinska^[25]在细齿钓钟柳 *Penstemon serrulatus* 腋芽繁殖中 1 个节位产生 6.8 个不定芽的结果. 但卵叶钓钟柳丛芽的玻璃化问题需要深入研究, 更好的不定芽继代培养基还需进一步筛选.

本试验在检测试管苗全株的 2 种药用成份时, 首次确认卵叶钓钟柳含有毛蕊花糖苷, 但未检测到松果

菊苷. 但在本试验中, 图 2 的色谱图 A 基线不平, 且分离度不好, 而样品中的成份复杂多样, 可能因实验条件限制不能分离或实际质量分数过低而未能检测到松果菊苷. 因此, 其检测的实验条件还需优化, 以期进一步鉴定. 已有研究证明红花钓钟柳富含松果菊苷^[4], 卵叶钓钟柳作为红花钓钟柳的同属近缘物种, 其药效成分、药用价值和遗传转化均有待进一步深入研究.

参考文献:

[1] 龙雅宜. 漫话奇妙的钓钟柳(上) [J]. 中国花卉盆景, 2008, 10: 4—8.

[2] 陶文文, 蒋文伟, 赵丽娟. 3 个钓钟柳品种叶绿素荧光特性比较 [J]. 浙江农林大学学报: 自然科学版, 2011, 28(3): 367—371.

[3] ISMAIL L D, EL-AZIZI M M, KHALIFA T I, et al. Verbascoside Derivatives and Iridoid Glycosides from *Penstemon crandallii* [J]. Phytochemistry, 1995, 39(6): 1391—1393.

[4] XIE J, DENG J, TAN F, et al. Separation and Purification of Echinacoside from *Penstemon barbatus* (Can.) Roth by Recycling High-Speed Counter-Current Chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2010, 878(28): 2665—2668.

[5] 张贵财, 朱旭江, 杜 兴, 等. HPLC 法测定兰州肉苁蓉中毛蕊花糖苷的含量 [J]. 中国药事, 2010, 24(8): 801—803.

[6] 何文君, 方泰惠, 屠鹏飞. 松果菊苷的药理研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(4): 476—479.

[7] 戴 亮, 郝海平, 汪玉馨, 等. 松果菊苷药动/药效研究进展与思考 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(3): 342—349.

[8] 黄才国, 李医明, 贺 祥, 等. 玄参中苯丙素苷 XS-8 对兔血小板 cAMP 和兔血浆中 PGI₂/TXA₂ 的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(8): 0920—0921.

[9] ZHANG H Q, LAI Y L. Acteoside Inhibits Apoptosis in a D-Galac-Tasamine and Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury [J]. Life Science, 1999, 65(4): 421.

[10] XIONG Q, TEZUKA Y, KANEKO T, et al. Inhibition of Nitric Oxide by Phenylethanoids in Activated Macrophages [J]. European Journal of Pharmacology, 2000, 400(1): 137—144.

[11] 何 伟, 宋桂珍, 武桂兰, 等. 肉苁蓉中雄性激素样作用活性成分的初探 [J]. 中国中药杂志, 1996, 21(9): 564—565.

[12] 李 媛, 宋媛媛, 张洪泉. 肉苁蓉的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(1): 7—11.

[13] 龙雅宜. 漫话奇妙的钓钟柳(下) [J]. 中国花卉盆景, 2008, 11: 2—4.

[14] 刘长春, 陈泽雄, 龚雪芹, 等. 金富猕猴桃离体培养与植株再生的优化研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2007, 32(5): 124—128.

[15] 严姜黎, 张 翼, 邢 梅, 等. 红肉猕猴桃离体快速繁殖技术研究 [J]. 华中农业大学学报: 自然科学版, 2008, 27(1): 101—104.

[16] 林丽飞, 陶发清, 刘春国, 等. 药用植物灯笼花组织培养体系的建立 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(12): 82—86.

[17] 闫晓慧, 谈 锋, 胡 凯, 等. 狭叶松果菊的组织培养和植株再生 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2006, 31(3): 148—152.

[18] 赵 静, 帅明蓉, 赵玉飞, 等. 南川百合组织培养与快繁技术体系研究. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2012, 37(6): 109—115.

[19] 张伟玉, 杨静慧. 不同转基因番茄 GalUR 的表达与 Vc 含量 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(3): 43—47.

[20] 王 泓, 廖志华, 田桂香, 等. 发根农杆菌介导云南萝芙木的遗传转化 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2006, 31(2): 137—141.

[21] XIE J, TAN F, ZHU J, et al. Separation, Purification and Quantification of Verbascoside from *Penstemon barbatus* (Cav) Roth [J]. Food Chemistry, 2012, 135: 2536—2541.

[22] 蔡 鸿, 鲍 忠, 姜 勇, 等. 不同产地管花肉苁蓉中有效成分的定量分析 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 452—455.

- [23] 黄宁珍, 唐凤鸾, 付传明, 等. 广西地不容组培快繁研究 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 445—449.
- [24] 余彭娜, 周启贵, 龙云, 等. 降低西瓜试管苗玻璃化因素的优化 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(10): 35—38.
- [25] WYSSOKINSKA H. Micropropagation of *Penstemon serrulatus* and Iridoid Formation in Regenerated Plants [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 33: 171—180.

Regeneration *in vitro* of *Penstemon ovatus* Plantlets and Determination of Their Special Chinese Medicinal Ingredients by HPLC

TANG Shao-hu^{1,2}, MO Xiu-mei^{1,2}, LI Ming-hui^{1,2}, YANG Li^{1,2},
WU Xiu-hua^{1,2}, ZHANG Yan-ling^{1,2}, LUO Ke-ming^{1,2}

1. Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education,
Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Hypocotyls from germ-free *Penstemon ovatus* plantlets were used as explants to establish a plantlet regeneration system *in vitro* of *P. ovatus* via adventitious bud induction, proliferation and rooting. HPLC was employed to determine the contents of echinacoside and verbascoside in the plantlets. The results showed that the maximum regeneration frequency (88.33%) of adventitious buds was achieved after the hypocotyls were cultured on MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA for 20 days; that on MS+0.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA the average multiplication coefficient of the adventitious buds was as high as 7.5 from 1 to 3 subcultures; and that 100% of the adventitious buds rooted readily on 1/2 MS medium for 20 days. Forty-eight plantlets were transplanted to a matrix soil and 46 survived after 30 days, the survival rate being 95.83%. The plantlets contained verbascoside by about 40.37 $\mu\text{g/g}$ DW, and no echinacoside was detected by HPLC. The plant regeneration system *in vitro* of *P. ovatus* is thus successfully established. This procedure of the culture method may be very useful for rapid propagation of *P. ovatus* and for introduction of foreign genes into *P. ovatus*.

Key words: *Penstemon ovatus*; plantlet regeneration; echinacoside; verbascoside; HPLC

责任编辑 夏娟

