

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.06.006

3 种常用培养基对颠茄毛状根生长与 次生代谢产物积累的影响^①

张翠平, 李琳琳, 韦悦,
卢克欢, 郭双, 吴能表

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

摘要: 研究了 B5, MS, N6 3 种培养基对颠茄毛状根的生长及托品烷类生物碱质量分数和产量的影响. 结果表明: B5, MS 培养基中颠茄毛状根的生物量明显高于 N6 培养基, 两者之间差异无统计学意义, 但 B5 培养基中东莨菪碱和莨菪碱质量分数与产量均显著高于 MS 培养基. 因此, 比较 3 种培养基, B5 培养基作为基本培养基不仅有利于颠茄毛状根的生长, 也对托品烷类生物碱的合成有促进作用, 为建立适合其生长和次生代谢产物产生的离体培养体系提供了理论依据.

关键词: 颠茄; 毛状根; 培养基; 托品烷类生物碱

中图分类号: Q945.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)06-0036-06

颠茄 (*Atropa belladonna* L.) 为茄科颠茄属, 多年生草本植物, 有效化学成分为托品烷类生物碱 (Tropane Alkaloids, TAs), 主要为莨菪碱、东莨菪碱以及阿托品, 是我国药典规定的唯一托品烷类生物碱的药用植物^[1-3]. 莨菪碱和东莨菪碱已在临床上广泛应用, 主要用于镇痛、麻醉、抗晕动症、治疗帕金森症、改善微循环、戒毒脱瘾、治疗农药中毒等, 市场需求十分巨大^[2].

颠茄中莨菪碱和东莨菪碱的主要合成场所在根^[4], 杨春贤等^[5]用农杆菌 A4 侵染颠茄无菌苗真叶, 得到颠茄毛状根. 毛状根基本具有植株根的生长功能, 具有生长快、分化程度高以及代谢与遗传性能相对稳定等优点, 是植物次生代谢产物生产可持续发展的有效途径之一^[6]. 虽然毛状根可在无激素培养基上快速自主生长, 且具有次生代谢产物高而稳定的特点, 但建立其合适的生长和次生代谢产物产生的离体培养条件, 是应用毛状根培养来规模生产其次生代谢产物的前提条件. 已有的研究表明, 培养基类型是影响毛状根生长和次生代谢产物的一个重要影响因素^[7-8], 如在供试 MS, 1/2 MS, B5 和 1/2 B5 培养基中, B5 培养基最适宜新疆紫草毛状根的固体培养及生长^[9]. 姚庆收等^[10]研究发现 1/2MS 和 MS 培养基有利于花生毛状根生物量的积累, 而 B5 和 N6 培养基有利于其白藜芦醇的积累. 但至今为止, 未见有关培养基类型对颠茄毛状根生长和次生代谢产物产生的影响. 因此, 本研究以颠茄毛状根为试验材料, 比较颠茄毛状根在 B5, MS, N6 3 种不同培养基中的生长与次生代谢产物的积累状况, 从而为进一步优化并建立适宜的颠茄毛状根培养条件奠定理论基础.

① 收稿日期: 2016-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500041); 重庆市科技攻关项目(cstc2012gg-yyjs80013).

作者简介: 张翠平(1991-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事植物生理与分子生物学的研究.

通信作者: 吴能表, 教授, 硕士研究生导师.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 颠茄毛状根

颠茄毛状根由西南大学生命科学学院天然产物与代谢工程实验室保存, 25 ℃, 110 r/min, 黑暗下悬浮培养.

1.1.2 培养基

MS, B5, N6^[11] 3 种液体培养基, 添加蔗糖 30 g/L, MS, N6 培养基 pH 值为 5.8, B5 培养基 pH 值为 5.5.

1.1.3 仪器与试剂

LC-60A 高效液相色谱仪(泵: LC-20AD, 柱温箱: CTO-10AS vp, 控制器: SPD-20A), 日本岛津(Shimadzu); Ultimate XB-C18 液相色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm), 月旭科技(上海)股份有限公司; SIGMR 3K15 冰冻离心机, 北京五洲当方科技发展有限公司; QYC200 摇床, 上海福玛实验设备有限公司. 莨菪碱和东莨菪碱标准品均购自 Sigma; 植物组织培养所用的蔗糖, 冰醋酸, β-巯基乙醇, 氯仿, 乙酸铵, SDS, 氨水等, 购自重庆川东化工试剂厂或成都市科龙化工试剂厂; HPLC 流动相所用的甲醇为色谱纯, 购自天津市光复精细化工研究所.

1.2 方 法

1.2.1 毛状根生长测定

取等量(约 0.1 g)来自同一克隆的毛状根, 分别接种于装有 150 mL 无菌 MS, B5 或 N6 液体培养基的三角瓶中, 置于 25±1 ℃, 110 r/min 转速的摇床中暗培养, 并分别于 7 d, 14 d, 21 d 后, 用蒸馏水冲洗颠茄毛状根上残留的液体培养基, 滤纸吸干水分, 称其鲜质量后, 再取颠茄毛状根置于 60 ℃烘箱中烘至质量恒定, 并称干质量.

1.2.2 毛状根中托品烷类生物碱质量分数检测

取培养 21 d 的颠茄毛状根于 60 ℃烘箱中烘至质量恒定后, 检测毛状根中托品烷类生物碱的质量分数. 参照 Zárate R 等^[12] 的提取方法, 略有改动: 取上述 60 ℃烘干至恒质量的颠茄毛状根, 充分研磨成粉过 50 目筛后, 称取 0.1 g 干粉加入 10 mL 三氯甲烷-甲醇-氨水(15:5:1)提取液超声提取 30 min, 25 ℃室温放置过夜后滤纸过滤, 用 2 mL CHCl₃ 冲洗 2 遍, 合并滤液; 40 ℃真空浓缩至干, 残留物用 5 mL CHCl₃ 和 2 mL 1 mol/L H₂SO₄ 溶解, 收集硫酸相, 于冰浴中用浓氨水调 pH 值至 10, 再分两次加入 4 mL CHCl₃ 提取; 静置分层后收集氯仿层, 于 40 ℃真空浓缩至干, 1 mL 甲醇溶解, 为样品液; 用 0.22 μm 滤膜过滤样品液, -4 ℃保存备用.

日本岛津(Shimadzu)LC-60A 高效液相色谱仪, 色谱条件: Ultimate XB-C18 液相色谱柱(5 μm, 4.6×250 mm), 流动相甲醇与醋酸缓冲液(0.05 mol/L 醋酸铵, pH 值为 4.6)比例为 58:42, 0.0025 mol/L SDS, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 215 nm, 柱温 40 ℃, 进样量: 10 μL. 分别精密称取莨菪碱和东莨菪碱标准品(Sigma 公司产品), 分别配制成质量浓度为 100 μg/mL, 200 μg/mL, 300 μg/mL, 400 μg/mL, 500 μg/mL 的标准品贮备液, 按照上述的 HPLC 检测条件进行测定, 根据峰面积(Y)对标准品质量浓度(X)绘制标准曲线, 并分别计算出莨菪碱和东莨菪碱的线性回归方程. 东莨菪碱线性回归方程为

$$Y = 33\ 664.3X + 1\ 411\ 221.6 \quad R^2 = 0.999\ 3$$

莨菪碱的线性回归方程为

$$Y = 9\ 930.4X + 102\ 781 \quad R^2 = 0.999\ 0$$

2 结果分析

2.1 不同培养基对颠茄毛状根生长的影响

颠茄毛状根暗培养 7 d 后, 在 MS, B5, N6 3 种培养基中的生长差异无统计学意义. 培养 14 d 后, B5 培

培养基中的毛状根生物量增长最显著. 培养 21 d 后, MS 培养基中的鲜质量为 13.2 g, B5 培养基中的毛状根鲜质量为 11.8 g(图 1). 这两种培养基中的毛状根生长量增长明显(图 1, 图 2), 统计结果为 3 个重复平均值±标准差, 字母相同表示差异无统计学意义($p>0.05$). 观察生长 21 d 颠茄毛状根的生长状况, 发现 B5 和 N6 培养基的根系较粗壮白嫩, 分支较少. MS 培养基中的根分支较多, 根体细软变黄, 含水量较高(图 3). 因此, 虽然 B5 培养基和 MS 培养基中的毛状根生长量差异无统计学意义, 但是 B5 培养基中的毛状根粗壮, 生长状况更好.

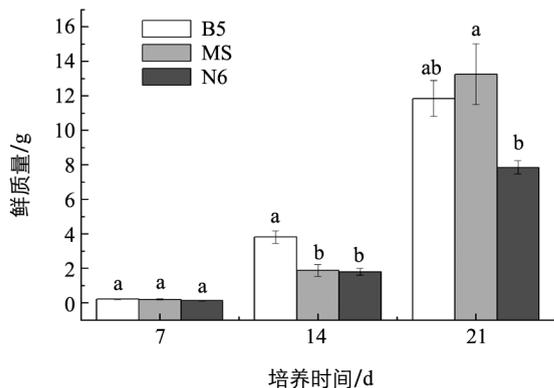


图 1 不同培养基对颠茄毛状根鲜质量的影响

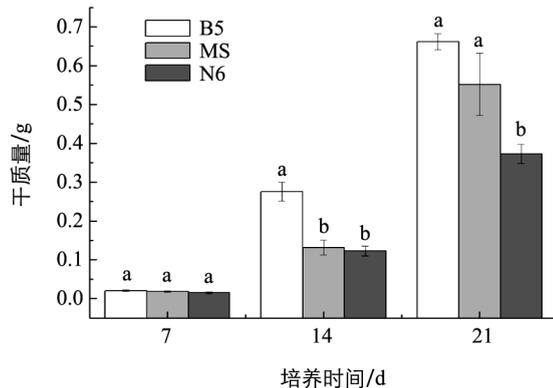
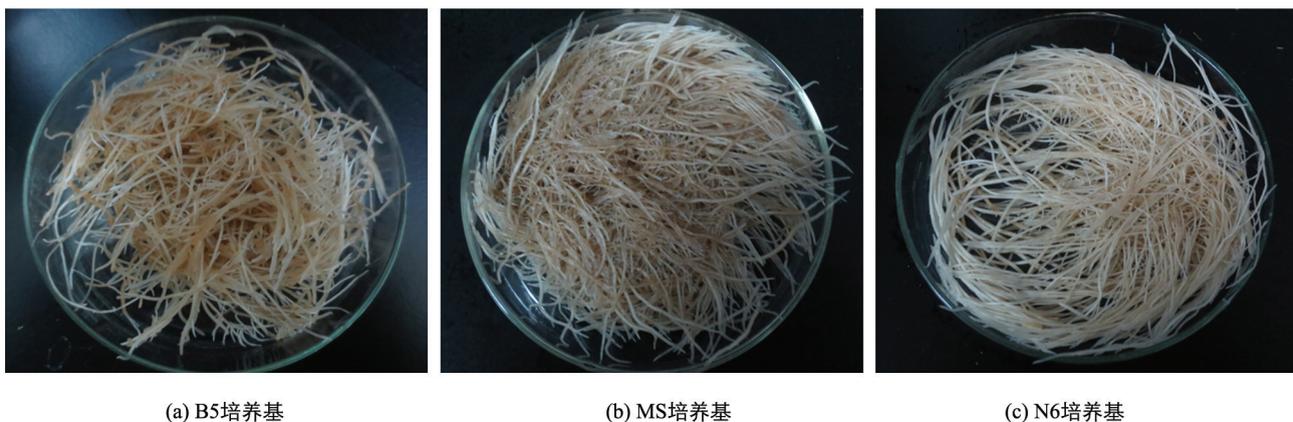


图 2 不同培养基对颠茄毛状根干质量的影响



(a) B5培养基

(b) MS培养基

(c) N6培养基

图 3 不同培养基中 21 d 颠茄毛状根的生长状态

2.2 不同培养基对颠茄毛状根托品烷类生物碱质量分数的影响

采用 HPLC 方法检测不同培养基培养的毛状根中东莨菪碱和莨菪碱质量分数. 东莨菪碱对照品的保留时间为 9.871 min, 莨菪碱对照品的保留时间为 11.682 min, 样品中东莨菪碱和莨菪碱的保留时间与对照品基本一致, 见图 4. 图 5 为培养基类型对 21 d 颠茄毛状根托品烷类生物碱质量分数的影响. 从图 5 可见, 培养 21 d 后, B5 培养基中毛状根东莨菪碱质量分数为 1.2 mg/g, 是 MS 培养基中的 3.4 倍, 莨菪碱质量分数为 3.1 mg/g, 是 MS 培养基中的 2.1 倍; 而 N6 培养基培养的毛状根东莨菪碱质量分数为 0.7 mg/g, 莨菪碱质量分数为 1.8 mg/g, 分别为 MS 培养基的 2.0 倍和 1.8 倍. 可见, B5 和 N6 培养基中的毛状根东莨菪碱和莨菪碱质量分数均显著高于 MS 培养基, 但 B5 培养基培养的莨菪碱和东莨菪碱质量分数的增加量更大(图 5). 图 6 为 3 种培养基对颠茄毛状根托品烷类生物碱产量的影响. 从图 6 可见, 虽然 N6 培养基培养的毛状根生物碱质量分数显著高于 MS 培养基, 但由于 N6 培养基培养的毛状根生长量明显低于 MS 培养基, 因而在培养 21 d 后, MS 和 N6 培养基单瓶毛状根中的生物碱产量差异无统计学意义. 而 B5 培养基中的生物碱质量分数显著高于 MS 培养基, 两组培养基的毛状根生物量差异不大, 所以, B5 培养基中单瓶毛状根的生物碱产量最高, 显著高于 MS 和 N6 培养基(图 6).

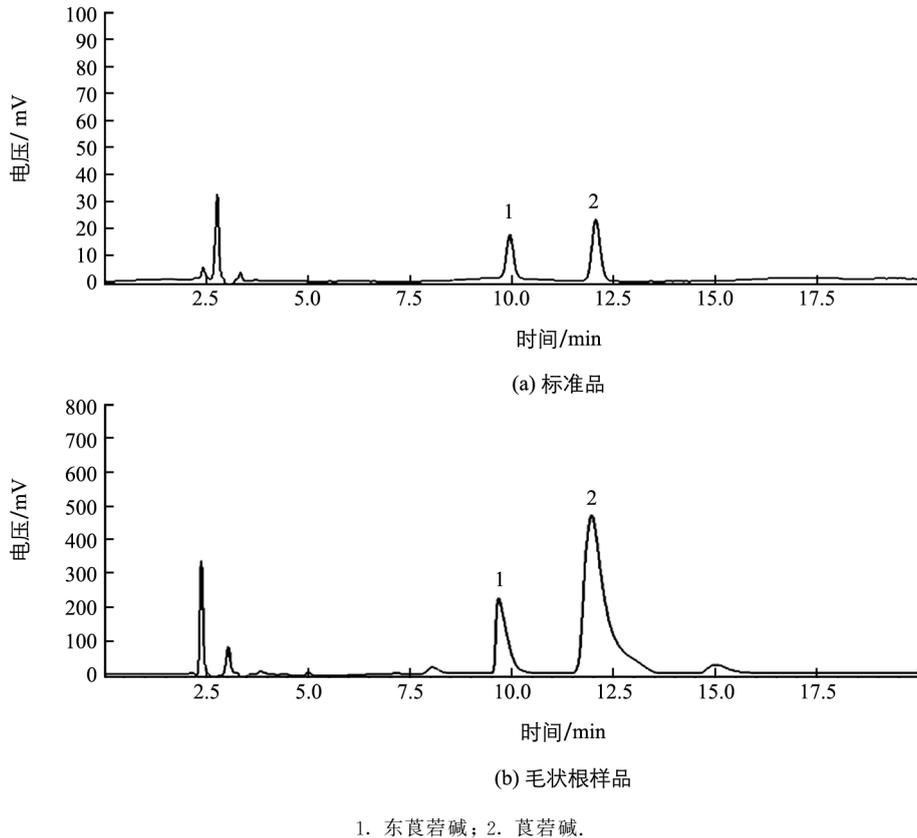


图 4 东莨菪碱和莨菪碱的 HPLC 图

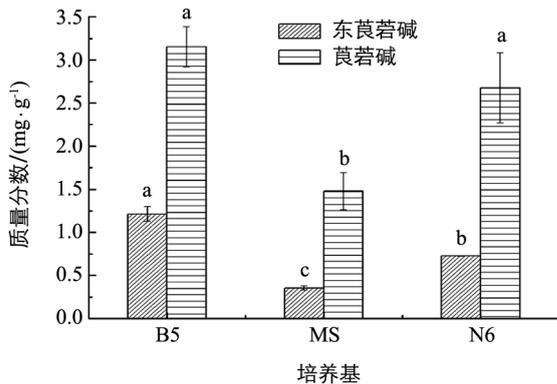


图 5 不同培养基对颠茄毛状根托品烷类生物碱质量分数的影响

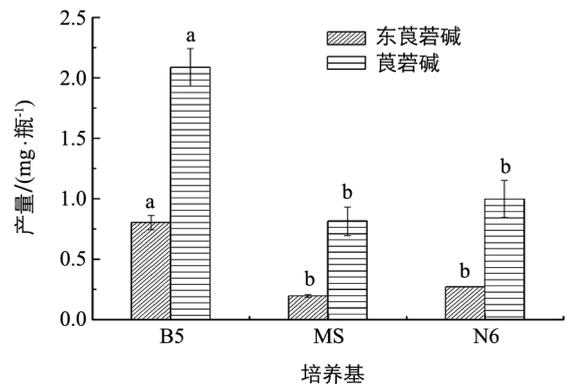


图 6 不同培养基类型对颠茄毛状根托品烷类生物碱产量的影响

3 讨论与结论

不同类型的培养基由于所含组分及其比例不同,对毛状根生长与次生代谢产物的积累有不同的影响^[13-15].本试验所用的3种类型培养基成分各不相同,MS培养基是富集元素平衡的培养基,营养元素全面,成分丰富^[16-17];B5和N6培养基是高硝酸钾培养基.本试验显示:颠茄毛状根培养14d时,B5培养基中的生物量最高,而21d时MS培养基培养的颠茄毛状根生物量最高,显著高于N6培养基.这可能是由于颠茄毛状根在生长前期生长速度较慢,对营养元素需求较少,而在14d后细胞分裂和生长等复杂生化过程加快,所需营养全面,从而MS培养基有助于颠茄毛状根生物量的积累.而N6培养基营养物质种类相对较少,故相同时间内生物量积累少.说明不同培养基对毛状根生物量的影响较大,选择适合颠茄毛状根培

养的基本培养基, 是提高其生物量的前提。

铵态氮和硝态氮的比例也是影响培养基中毛状根生长和次生代谢产物产生的因素之一^[18-21]。本试验中, 培养 21 d 时 B5 和 N6 培养基有利于莨菪碱和东莨菪碱的产生, 显著优于 MS 培养基。这可能是由于 B5 和 N6 培养基属于高硝酸钾培养基, 二者所含硝态氮比例高, MS 培养基所含铵态氮比例较高。而高硝态氮有助于促进颠茄毛状根次生代谢, 更有利于含氮生物碱的积累, 从而提高了 B5 和 N6 培养基培养的颠茄毛状根的莨菪碱和东莨菪碱质量分数。又因 B5 培养基培养的颠茄毛状根生物量显著高于 N6 培养基, 故 B5 培养基培养的颠茄毛状根莨菪碱与东莨菪碱产量最高。

试验表明根据单一的生物量或莨菪碱与东莨菪碱质量分数, 并不能判定某种培养基是最适合的颠茄毛状根培养的培养基, 需要结合生物量和莨菪碱、东莨菪碱质量分数共同判定。在本试验的 B5, MS, N6 3 种类型的培养基中, B5 培养基不仅有利于生长, 也对照品烷类生物碱的合成有促进作用, 可作为颠茄毛状根培养的基本培养基。今后应向寻求颠茄毛状根生长速度和莨菪碱、东莨菪碱质量分数达到最佳结合的培养基探索, 使之达到生产上的更大效益。

参考文献:

- [1] 李 慧, 吴 松, 孙其文, 等. 颠茄的离体培养与快速繁殖研究 [J]. 北方园艺, 2007, 31(12): 192-194.
- [2] 汪开治. 有毒药用植物颠茄 [J]. 植物杂志, 2003(2): 26-27.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 262.
- [4] 王金华. 药用植物颠茄的特性及高产栽培技术 [J]. 中国农村小康科技, 2007(7): 92-93.
- [5] 杨春贤, 阳义健, 彭梅芳, 等. 颠茄发根培养系统的建立 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2006, 31(2): 115-118.
- [6] 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.
- [7] 孙 晶, 高 珂, 王 玲, 等. 不同培养基、外源激素和真菌诱导子对北柴胡毛状根生长及柴胡皂含量的影响 [J]. 生物技术通讯, 2015, 26(4): 546-550.
- [8] 杨世海, 刘晓峰, 果穗安, 等. 不同培养基对掌叶大黄毛状根克隆系质量的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(4): 595-598.
- [9] 李翠芳, 王 芳, 麻 浩, 等. 培养基及温度对新疆紫草毛状根生长的影响 [J]. 新疆农业科学, 2009, 46(5): 1117-1120.
- [10] 姚庆收, 姜吉刚, 武王永, 等. 培养基种类对花生毛状根株系生物量和白藜芦醇含量的影响 [J]. 生物技术通报, 2014, 30(5): 174-178.
- [11] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 297.
- [12] ZÁRATE R, HERMOSIN B, CANTOS M, et al. Tropane Alkaloid Distribution in *Atropa Baetica* Plants [J]. Journal of Chemical Ecology, 1997, 23(8): 2059-2066.
- [13] 孙际薇, 张 鸿, 王凤英, 等. 茉莉酸甲酯对曼陀罗毛状根中主要莨菪烷类生物碱成分积累和释放的影响 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1712-1718.
- [14] 盛东峰, 张永亮. 脱落酸处理对丹参毛状根中丹参酮积累的影响 [J]. 中药材, 2013, 36(3): 354-358.
- [15] 张 兴, 刘晓娟, 吕巧玲. 毛状根生产次生代谢产物的研究进展 [J]. 化工进展, 2007, 26(9): 1228-1232.
- [16] 杨秀平, 刘莉丽. 植物组织培养常用基本培养基的数量分析 [J]. 西北林学院学报, 2010, 25(1): 97-100.
- [17] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 352-353.
- [18] BENSADDEK L, GILLET F, SAUCEDO J E, et al. The Effect of Nitrate and Ammonium Concentrations on Growth and Alkaloid Accumulation of *Atropa belladonna* Hairy Roots [J]. J Biotechnol, 2001, 85(1): 35-40.
- [19] PEDRO M L L, SUSANA DE C, TIAGO M M. Growth and Proteolytic Activity of Hairy Roots from *Centaurea Calci-trapa*-Effect of Nitrogen and Sucrose [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(3): 242-249.

- [20] HUANG S Y, CHOU S N. Elucidation of the Effects of Nitrogen Source on Proliferation of Transformed Hairy Roots and Secondary Metabolite Productivity in a Mist Trickleing Reactor by Redox Potential Measurement [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(6): 803–813.
- [21] 侯艳玲, 邱 飞, 王 辉, 等. 天仙子发根诱导及碳源、氮源和磷源对发根培养的影响 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2016, 38(6): 23–29.

Effects of Three Media on the Growth and Secondary Metabolite Contents of *Atropa belladonna* L. Hairy Roots

ZHANG Cui-ping, LI Lin-lin, WEI Yue,
LU Ke-huan, GUO Shuang, WU Neng-biao

Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education/
School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to provide a basis for establishing an in vitro culture system suitable for the growth and secondary metabolite production of *Atropa belladonna* L., a suspension culture was made in which the effects of medium types on the growth of *A. belladonna* hairy roots and TAs production in them were studied. The biomass of *A. belladonna* hairy roots in B5 and MS was significantly higher than in N6, with no significant difference between the two media. However, the content and production of scopolamine and hyoscyamine in B5 were significantly higher than in MS. These results showed that B5 was the best medium for hairy root growth of *A. belladonna* and for the accumulation of tropane alkaloids in it.

Key words: *Atropa belladonna* L.; hairy root; medium; tropane alkaloids (TAs)

责任编辑 周仁惠

