

不同激素处理对乌拉尔甘草愈伤组织中甘草酸含量的影响

曹君迈, 赵海燕, 韩凤兰

(北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 为获得乌拉尔甘草愈伤组织中甘草酸生产的最佳配方。现利用随机区组设计和高效液相色谱法分析测定愈伤组织中甘草酸的含量。结果表明: 细胞分裂素与生长素搭配使用有利于甘草酸的积累, 特别是生长素 IAA 与 BA 组合有利于甘草酸形成, 单独使用激素 BA 不利于甘草酸含量积累; 适宜甘草愈伤组织中甘草酸形成的培养基配方为 MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L+蔗糖 20 g/L, 甘草酸产量平均最高为 120 mg/g; 适宜的外植体为根状茎。

关键词: 乌拉尔甘草; 愈伤组织; 甘草酸; 激素组合

中图分类号: S 541 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)09-0206-03

乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 是豆科多年生草本植物, 是以药用、生态价值为主的沙生经济资

源植物。我国主要分布在西北、东北、华北等各省区沙地和砂质灰钙土上^[1]。乌拉尔甘草其药理作用居甘草首位, 是最早被我国药典所收录的甘草属植物^[2]。其主要化学成分为甘草酸及甘草苷, 其中甘草酸有显著的肾上腺皮质激素的作用, 可用于人体抗衰老、抗炎、降压、增强肌体免疫力、提高生理机能、抑制癌细胞生长等, 被美国、日本等国家称为“仙草”、“神草”^[3]。以往人们对甘草有效成分的性质和应用研究较多, 但如何在生产上提

第一作者简介: 曹君迈(1964), 女, 宁夏银川市人, 教授, 硕士生导师, 研究方向为药用植物资源的利用与开发。E-mail: junmaicao@163.com.

基金项目: 宁夏区自然科学基金资助项目(NZ0953)。

收稿日期: 2010-01-13

志 2007, 32(14): 1468-1469.

[7] 邓洪平, 刘光华. 重点保护药用植物金毛狗配子体发育过程的研究

[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1850-1853.

[8] 王玉香, 黄红英. 金毛狗脊口服液制备工艺初探[J]. 时珍国药研究 1995, 6(2): 35-38.

[9] 吴征镒. 中国植被[M]. 北京: 科学出版社 1980: 823-888.

[10] 邓亚妮, 成晓, 焦瑜等. 中国特有濒危植物扇蕨的生物生态学特性及其濒危机制初探[J]. 生物多样性, 2009, 17(1): 62-68.

[11] 程治英, 陶国芝, 许寻富. 桫欏濒危原因的探讨[J]. 云南植物研究 1999, 12(2): 186-190.

[12] Riggs L A. Conserving genetic resources on-site in forest ecosystems[J]. Forest Ecology and Management, 1990(35): 45-68.

[13] 罗吉凤, 龙春林, 周翊兰. 云南几种野生茶生态环境与引种试验的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(1): 39-46.

[14] 万开元, 陈防, 陈树森等. 通过合理利用促进珍稀濒危植物保护[J]. 生态环境, 2008, 17(1): 447-453.

Investigation and Analyzation on Endangered Reasons for Rare Medical and Ornamental Plant Named *Cibotium barometz* in Chongqing

ZHANG Zu-rong^{1,2}, ZHANG Shao-bin^{1,3}

(1. Department of Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan, Chongqing 402168; 2. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715; 3. Chongqing College Garden and Flower Engineering Research Center, Yongchuan, Chongqing 402168)

Abstract: Through information collection and anlyzation, visit and inquisition, field survey, experimentation and summarization, the investigation and anlyzation on endangered reasons for *Cibotium barometz* in Chongqing. The results showed that the main reasons made *Cibotium barometz* in Chongqing endangered were wantonly destroying its living enviroment by people and secretly digging and randomly picking its plants, besides its underdevelopment roots, low efficient rebirth and small adapting ability. For this, this paper advanced some corresponding protecting countermeasures.

Key words: Choqngqing; *Cibotium barometz*; endangered reason; protecting countermeasures

高这些有效成分含量研究很少, 只有梁玉玲等人对胀果甘草愈伤组织培养及甘草酸含量分析进行研究^[4], 杨会琴^[5]等研究了胀果甘草不同外植体和不同 2, 4-D 浓度对甘草酸含量的影响, Kovalenko^[6]等建立了光果甘草毛状根培养体系, 付玉杰等对甘草酸提取方法进行了研究^[7], 到目前为止, 尚未有人研究乌拉尔甘草不同外植体和激素组合对甘草酸含量的影响, 该试验应用高效液相色谱法对不同来源的愈伤组织中甘草有效成分生物合成的影响进行定量分析, 为利用细胞培养技术规模化生产甘草酸提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

乌拉尔甘草根状茎、芽采自北方民族大学校园内。仪器: 638-50 日本高效液相色谱仪。试剂: 所用试剂除甲醇为色谱纯, 其余均为分析纯; 试验用水为去离子水或同等纯度蒸馏水。草酸单铵盐对照品: 购于上海友思生物技术有限公司, 批号为 04123, 含量为 94.25%。

1.2 试验方法

1.2.1 筛选适宜甘草酸生产的激素组合 采用随机区组设计, 共设 5 种处理即: 处理 1: BA 0.5+NA A 0.5; 处理 2: BA 0.5+2, 4-D 0.5; 处理 3: BA 0.5+IAA 0.5; 处理 4: BA 0.5+IBA 0.5; 处理 5: BA 0.5, 4 次重复。基本培养基为 MS, 激素用量单位均为 mg/L, 蔗糖 20 g/L。用乌拉尔甘草根做外植体 将其接种于上述 5 种培养基中诱导愈伤组织^[5]。

1.2.2 不同外植体对甘草酸生产的影响 以甘草的根和芽为外植体, 接种在 BA 0.5 mg/L+ IAA 0.5 mg/L 的 MS 培养基上培养。

1.2.3 培养条件 将接种后的外植体置于温度 (23 ± 2) °C 和光照强度 100 ~ 300 lx, 光照时间 10 h/d, 培养

35 d。

1.2.4 统计方法 5 个处理中所获得的甘草酸含量, 采用 F 检验进行统计分析, 显著后采用 SSR 法 (Duncan 法) 检验^[8]; 不同外植体间获得的甘草酸含量采取 t 测验。

1.3 愈伤组织中甘草酸的测定方法

1.3.1 样品处理 a. 供试样品制备: 取甘草鲜样 3 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相 45 mL, 超声处理 (功率 250 W, 频率 20 KHz) 30 min, 取出, 放冷, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。b. 对照溶液制备: 取甘草酸单铵盐对照品 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 (每 1 mL 含甘草酸单铵盐对照品 0.2 mg, 折合甘草酸为 0.1959 mg)。

1.3.2 色谱条件 色谱柱: C18 柱 4.6 mm × 200 mm; 填充剂: 十八烷基硅烷键合硅胶。流动相: 甲醇 0.2 mol/L 一醋酸铵溶液—冰醋酸 (67 : 33 : 1); 流速: 1.0 mL/min。测定波长: 250 nm; 进样量: 15 μL。

1.3.3 样品测定 样品中的甘草酸用 20% 乙醇溶液超声波提取, C18 柱分离, 高效液相色谱 250 nm 波长测定与对照品的保留时间比较定性, 峰面积上标法定量。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 15 mL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。本品含甘草酸 (C₄₂H₆₂O₁₆) 不得少于 2.0%。

2 结果与分析

2.1 甘草酸对照品及不同激素处理的 HPLC 色谱图 从图 1 中看出: 各处理均与对照品 A 具有相类似的峰出现, 其中 B ~ E 处理有第 2 峰出现, D-处理 3, 峰面积最大, 说明甘草酸含量最高, F 处理仅有单峰, 峰面积与对照品相近, 说明几乎不含甘草酸。

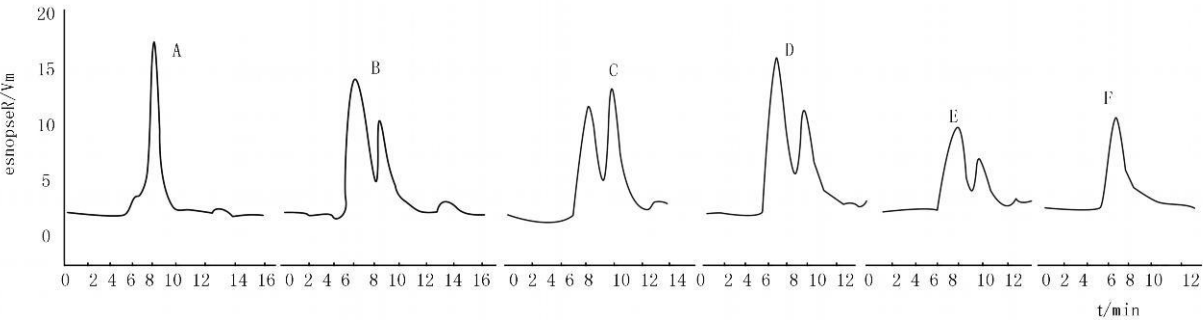


图 1 甘草酸(A)和样品(B~F)HPLC 色谱图
A-甘草酸对照, B-处理 1 C-处理 2 D-处理 3 E-处理 4 F-处理 5

2.2 不同激素组合对根来源愈伤组织形成甘草酸影响 将根来源的愈伤组织培养 35 d 时进行甘草酸含量测定, 其结果见表 1。

不同激素组合处理对甘草酸含量影响差异显著, 经多重比较, 处理 3 显著的高于处理 5 和处理 4 与处理 1 和处理 2 无显著差别, 而处理 1 和处理 2 与处理 4 无显

著差别, 最差为处理 5。由此说明, 单独使用激素 BA 不利于甘草酸含量积累, BA 与生长素搭配使用有利于甘草酸含量的提高, 其中与 IAA 搭配对甘草酸积累较为有利。

表 1 不同激素组合对根来源愈伤组织中甘草酸含量的影响

编号	处理		甘草酸含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$				平均数
	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		I	II	III	IV	
1	BA 0.5+NAA 0.5		123	81	107	82	98.25 ^{ab}
2	BA 0.5+2,4-D 0.5		34	107	102	110	88.25 ^{ab}
3	BA 0.5+IAA 0.5		92	176	102	110	120.00 ^a
4	BA 0.5+IBA 0.5		62	102	73	48	71.25 ^b
5	BA 1.0		0	0	10	0	2.50 ^c

2.3 不同外植体对甘草酸形成的影响

由表 2 可知, 以根为外植体, 形成的愈伤组织所产生的甘草酸含量最高, 平均为 143.67 mg/g 与芽形成的愈伤组织中所产生的甘草酸平均含量差异达显著水平, 其差值为 106 mg/g , 由此说明, 根是生产积累甘草酸的重要器官。

表 2 不同外植体对甘草酸含量的影响

外植体	处理	甘草酸含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$			Σ	平均数	t 值
		I	II	III			
根	BA 0.5+IAA 0.5	133	157	141	431	143.67	9.14 [*]
芽	BA 0.5+IAA 0.5	38	21	53	112	37.33	

注 $t_{0.05(2)}=4.30$ 。

3 结论与讨论

将根愈伤组织置温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和光照强度 100~300 lx, 光照时间 10 h/d, 弱光条件下, BA 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L 的 MS 培养基上培养, 甘草酸含量平均高达 120 mg/g , 与杨会琴等胀果甘草根愈伤组织产生的甘草酸含量相比, 高 25.7 mg/g 。除激素效应外, 可能与品种不同有关, 致使甘草酸含量不同, 这也是乌拉尔甘草

的药用价值高于胀果甘草的原因之一。此外, 试验所得出的适宜外植体为根状茎, 与杨会琴等研究结果相一致。彭励^[8]等对不同生境和同一生境不同生长年限的人工种植乌拉尔甘草进行了比较研究, 得出 4 a 生甘草主根的甘草酸的量最高为 4.48%, 与试验中的根状茎产生的愈伤组织中甘草酸含量相差 75.2 mg/g ; 同时, 根来源的愈伤组织中甘草酸含量显著高于芽来源的愈伤组织中甘草酸含量, 同一处理不同重复间愈伤组织中甘草酸含量也有所差异; 这些现象和结果说明外源激素是影响甘草酸形成积累的关键因素, 而植物器官对次生代谢产物的形成具有组织特异性。因此, 在利用植物组织培养技术生产甘草酸时, 要根据植物学特性进行选材, 加强对高产细胞系进行不断的检测筛选工作。

参考文献

[1] 杨平, 李克昌, 辛健, 等. 宁夏甘草资源现状和保护利用研究[J]. 宁夏农学院学报, 2004, 25(1): 17-20.
[2] 国家药典编委会. 中国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 60.
[3] 王玉庆, 朱玫. 我国甘草资源调查与分析[J]. 山西农业大学学报, 2002(4): 2-6.
[4] 梁玉玲, 管延英, 阳丽, 等. 胀果甘草愈伤组织培养及甘草酸含量分析[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2000, 20(4): 365-368.
[5] 杨会琴, 李敬, 戴翠萍, 等. 甘草愈伤组织培养及其代谢产物甘草酸的研究[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2006, 30(3): 742-743, 843.
[6] Kovalenko P G, Antonjuk V P, Maliuta S. Secondary metabolites production from transformed cells of Glycyrrhiza glabra and petentilla alba as a producers of radioprotective compounds[J]. Ukrainica bioorganica Acta, 2002(1): 21-30.
[7] 付玉杰, 赵文源, 侯春莲, 等. 超声提取-高效液相色谱法测定甘草中甘草酸含量[J]. 植物研究, 2005, 25(2): 111-112, 212.
[8] 彭励, 张琪, 胡正海. 宁夏乌拉尔甘草中甘草酸的积累变化研究[J]. 中草药, 2006, 37(12): 1878-1881.

Effects of Different Hormones Combination on Glycyrrhizic Acid Production in Different Explant Calli of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch

CAO Jun-mai, ZHAO Hai-yan, HAN Feng-lan

(School of Biological Sciences and Engineering The North University for Ethnic, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Get the best prescription that the acid of licorice was produced in the licorice callus. Methods using randomized blocks design and high-performance liquid chromatography to analysis and determine the glycyrrhiza acid content in the callus. Using cytokinin and auxin was conducive to the accumulation of glycyrrhizic acid. In particular, auxin IAA and BA of combination in favor of the formation glycyrrhizic acid. Is not conducive to the use of a single cytokinin accumulation glycyrrhizic acid. In the complex combination of five kinds of hormones, the suitable producing glycyrrhizic acid in the callus medium formula was MS+BA 0.5 mg/L +IAA 0.5 mg/L +sugar 20 g/L . The output of glycyrrhizic acid under this condition was 120 mg/g . The root was taken as optimal tip explant.

Key words: Licorice; callus; Glycyrrhizic acid; Hormones combination