

# 北沙参愈伤组织诱导及悬浮细胞培养研究

苗晓燕, 何富强, 张筱梅

(保定学院 生化系, 河北 保定 071000)

**摘要:**以北沙参叶片和茎段为外植体, 采用 MS 和 B<sub>5</sub> 培养基对其进行愈伤组织诱导, 继代培养后进行悬浮培养, 研究了不同浓度碳源、6-BA 和 NAA 对其细胞生长的影响, 以期为进一步建立北沙参细胞培养体系以及提高其次生代谢物产量奠定试验基础。结果表明: 1/2MS + 0.4 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L NAA 琼脂培养基为北沙参愈伤组织诱导的较适宜培养基; 1/2MS + 0.2 mg/L 6-BA + 1.2 mg/L NAA 为适宜的继代培养基; 在细胞悬浮培养过程中, 分别添加 0.2 mg/L 6-BA、1.6 mg/L NAA 和 20 g/L 蔗糖有利于细胞的生长。

**关键词:**北沙参; 愈伤组织; 细胞培养

**中图分类号:**R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)06-0104-03

北沙参(*Glehnia littoralis* Fr. Schmidtex Miq) 属伞形科沙参属多年生草本植物, 又名海沙参、野沙参、羊乳根等, 其主产区为山东、河北、内蒙、辽宁等省。药用始载于“神农本草经”, 列为上品, 明代“本草纲目”列为五参(人参、党参、玄参、丹参、沙参)之一<sup>[1]</sup>。经研究表明, 北沙参的主要活性成分有欧前胡素、异欧前胡素、佛手柑内酯、补骨脂素等 14 种香豆素, 还有一种香豆素苷元、多糖、生物碱及挥发油等。药理学研究和临床实践表明, 香豆素类成分主要是有效成分, 具有止咳化痰<sup>[2]</sup>、抗突变<sup>[3]</sup>、抗菌<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>和镇痛镇静<sup>[6]</sup>等作用。

近年来, 由于北沙参的不规范种植, 导致其品种退化、混杂、质量下降和疗效降低, 严重影响了药材的质量稳定。人们关于北沙参的研究主要集中在化学成分<sup>[7]</sup>及药理活性等方面<sup>[8]</sup>, 其组织培养<sup>[9]</sup>仅见零星报道, 而细胞悬浮培养则尚鲜见报道, 因此保定学院生化系细胞实

验室开展了一系列关于北沙参愈伤组织及细胞培养方面的研究。该试验以北沙参叶片和茎段为外植体, 对北沙参愈伤组织诱导培养基及细胞悬浮培养条件进行了研究, 旨在为北沙参的优质种苗繁育以及次生代谢产物香豆素的大规模生产提供一定的试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料北沙参采于安国药材种植基地。

超净工作台(苏州市净化设备公司, 型号: YJ-875s)、全温振荡器(哈尔滨东联电子科技有限公司)、低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂)、万分之一电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)、光照培养箱。

### 1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织诱导 MS 培养基诱导愈伤组织: 取新生北沙参的叶片和茎段为外植体, 自来水冲洗 10 min, 移至超净工作台, 用 70% 酒精浸泡 20 s, 无菌水冲洗 3 次, 再用 0.1% 升汞消毒 8 min, 无菌水洗涤 3 次, 无菌滤纸吸干。用解剖刀将茎段切成 0.5~1 cm, 叶片表面划伤, 接种于 1/2MS + 0.4 mg/L 6-BA + 20 g 蔗糖 + 7 g/L 琼脂培养基, 分别添加不同浓度 NAA (0.5、1.0、1.2、1.5、2.0 mg/L), 调 pH 5.8, (25±1)℃, 暗培养。B<sub>5</sub> 培养

**第一作者简介:**苗晓燕(1980-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事药用植物次生代谢及调控等研究工作。E-mail: miaoxiaoyan3205@126.com.

**基金项目:**保定学院重点基金资助项目(2010Z03); 河北省教育厅资助项目(z2012007)。

**收稿日期:**2013-12-11

**Abstract:** Taking flower buds of 9 *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* cultivars as materials, the effect of genotypes, 6-BA and different solid medium on microspore embryogenesis were studied. The results showed that the embryogenesis rate was significantly different among cultivars. Six cultivars were induced to form embryoids and the highest yield was produced in 'Beijing Tehaochihuoguocai' with 12.38 embryoids per bud. Medium supplemented with 0.3 mg/L 6-BA could promote the embryogenesis rate, especially for 'Beijing Tehaochihuoguocai'. The solid MS medium supplemented with 0.01 g/L active carbon was better than B<sub>5</sub> solid medium for plantlet formation from embryoids.

**Key words:** *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*; microspore culture; embryoid; plantlet

基诱导愈伤组织:用解剖刀切成 0.5~1 cm 茎段,叶片表面划伤,接种于  $B_5 + 0.5 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 20 \text{ g/L 蔗糖} + 7 \text{ g/L 琼脂}$  培养基,分别添加不同浓度 NAA(0.5、1.0、1.2、1.5、2.0 mg/L),调 pH 5.8,  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,暗培养。

1.2.2 细胞悬浮培养 悬浮细胞系的建立:取一定量经多次继代的松散愈伤组织,用解剖刀切碎,接种于含 100 mL  $MS + 0.4 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.8 \text{ mg/L NAA}$  液体培养基的 250 mL 三角瓶中, pH 5.8,  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 100 r/min,黑暗条件下振荡培养。每 7 d 继代 1 次,连续继代 5 次,获得稳定的细胞系,将悬浮细胞系过 40 目筛,滤液作为起始悬浮培养物。不同浓度 6-BA 对北沙参细胞生长的影响:取对数生长期悬浮细胞,按一定接种量接至  $MS + 0.8 \text{ mg/L NAA} + 30 \text{ g/L 蔗糖}$  液体培养基,分别添加不同浓度 6-BA(0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/L),振荡培养,培养条件同上,20 d 收获,称取细胞干重。不同浓度 NAA 对北沙参细胞生长的影响:根据不同浓度 6-BA 对北沙参细胞生长的影响结果,取对数生长期悬浮细胞,按一定接种量接至  $MS + 0.2 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 30 \text{ g/L 蔗糖}$  液体培养基,分别添加不同浓度 NAA(0、0.2、0.4、0.8、1.6、2.4 mg/L),振荡培养,培养条件同上,20 d 收获,称取细胞干重。蔗糖浓度对北沙参细胞生长的影响:根据以上结果,取对数生长期悬浮细胞,按一定种量接至  $MS + 0.2 \text{ g/L } 6\text{-BA} + 0.8 \text{ mg/L NAA}$  液体培养基,添加不同浓度蔗糖(5、10、20、30、40、50 g/L)振荡培养,培养条件同上,20 d 收获,称取细胞干重。

## 2 结果与分析

### 2.1 北沙参愈伤组织诱导

该试验结果表明,叶片在 MS 培养基上很难诱导出愈伤组织,而茎段在  $1/2MS + 0.4 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 1.5 \text{ mg/L NAA}$  琼脂培养基上,15 d 左右开始有愈伤组织形成,诱导率达 95% 以上,大部分为淡黄色,结构比较致密(图 1);而在  $B_5$  培养基上,叶片和茎段均能诱导出愈伤组织,但诱导率仅为 80% 左右,颜色为黄白色,质地较为松软,且均有不定根长出(图 2)。

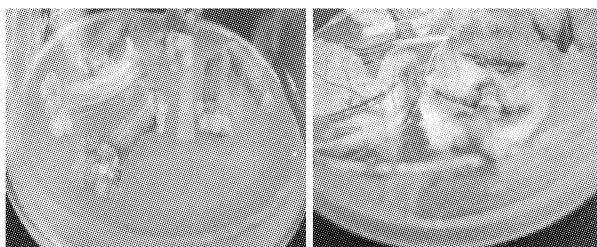


图 1 MS 培养基上北沙参愈伤组织诱导情况

Fig. 1 Results of callus induction of *Glehnia littoralis* on the MS culture medium

$B_5$  培养基诱导出的愈伤组织,转移至继代培养基后生长速度缓慢,不定根较多;MS 培养基诱导出的愈伤



图 2  $B_5$  培养基上北沙参愈伤组织诱导情况

Fig. 2 Results of callus induction of *Glehnia littoralis* on the  $B_5$  culture medium

组织经转移至  $1/2MS + 0.2 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 1.2 \text{ mg/L NAA}$  培养基经多次继代,结构趋于松散,且分散性良好,颜色多为黄色或白色,生长旺盛(图 3),适合作为悬浮培养的材料。综上所述, $1/2MS + 0.4 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 1.5 \text{ mg/L NAA}$  琼脂培养基可作为北沙参愈伤组织诱导的较适宜培养基。

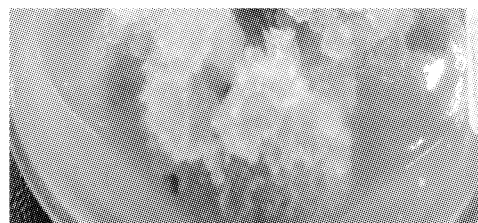


图 3 愈伤组织继代情况

Fig. 3 Results of callus subculture

### 2.2 不同浓度 6-BA 对悬浮细胞生长的影响

从图 4 可以看出,随着 6-BA 浓度的升高,细胞的颜色逐渐加深,出根数逐渐减少,但细胞团的大小呈现先增大后减小的趋势。当 6-BA 浓度达 0.2 mg/L 时,悬浮细胞的生物量达到最高,之后趋于下降。综上可知,0.2 mg/L 为北沙参细胞培养的最适宜 6-BA 浓度,在此浓度下出根少,颜色浅,细胞分散性较好,生物量达到最大。

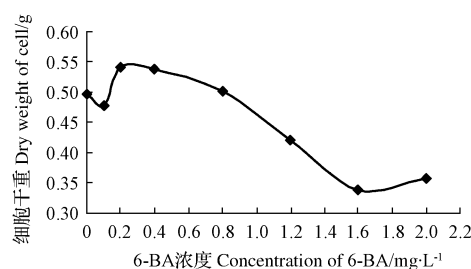


图 4 不同浓度 6-BA 对悬浮细胞生长的影响

Fig. 4 Effect of different concentration 6-BA on the growth of suspension cell

### 2.3 不同浓度 NAA 对悬浮细胞生长的影响

由图 5 可知,随着 NAA 浓度的升高,细胞生物量呈现先升高后下降,之后趋于平稳的趋势,即当 NAA 浓度达 0.8 mg/L 时,悬浮细胞的生物量达到最高。但细胞

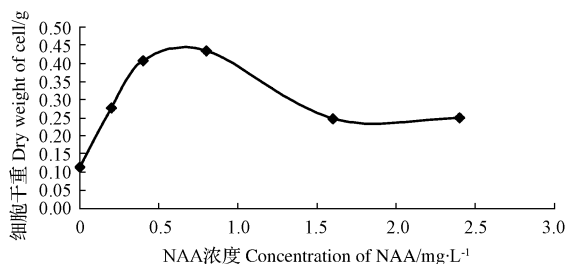


图5 不同浓度NAA对悬浮细胞生长的影响

Fig. 5 Effect of different concentration of NAA on the growth of suspension cell

的颜色随NAA浓度增加由深变浅,细胞团则由大变小,不定根由多到少,且在1.6 mg/L之后,没有不定根长出。因此,认为1.6 mg/L NAA为北沙参细胞培养的较适宜浓度,在此浓度下细胞颜色浅,没有不定根,分散性良好,细胞增长速度快。

#### 2.4 不同浓度蔗糖对北沙参悬浮细胞生长的影响

图6结果表明,随蔗糖浓度升高,细胞生长速率急剧上升,当蔗糖浓度为10 g/L时,细胞生物量达到最大,之后随蔗糖浓度升高,细胞生长速度趋缓。但在蔗糖浓度为10 g/L时,悬浮细胞团达最大,之后逐渐减小,且细胞褐化现象在蔗糖浓度为20 g/L后逐渐加重。因此综合考虑以上情况,选取20 g/L为北沙参细胞生长较适宜碳源浓度。

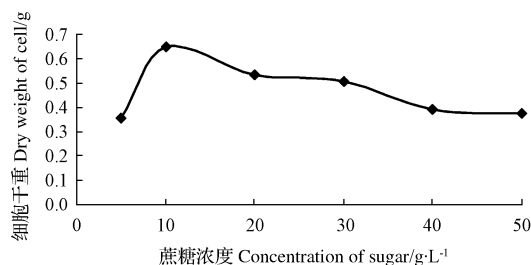


图6 不同浓度蔗糖对北沙参悬浮细胞生长的影响

Fig. 6 Effect of different concentration of sugar on the growth of suspension cell

### 3 结论

该试验结果表明,适宜诱导北沙参愈伤组织的培养基为1/2MS+0.4 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA,这与李森等<sup>[9]</sup>进行珊瑚菜愈伤组织诱导的培养基接近,但不需要添加 $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 一样可以较高效率的诱导出愈伤组织;最适宜愈伤组织继代的培养基为1/2MS+0.2 mg/L 6-BA+1.2 mg/L NAA。同时通过多次继代获得了松散的愈伤组织,以MS为基础培养基进行了北沙参的悬浮细胞培养,初步考查了6-BA、NAA和蔗糖3种因素对悬浮细胞生长的影响。结果发现,3种因素浓度分别为0.2 mg/L 6-BA、1.6 mg/L NAA和20 g/L蔗糖时,细胞的生长状态良好,且生长速度相对较快。在后续的试验当中应对对这3种因子进行正交实验以找到最适宜北沙参细胞生长的培养基,该结果将为北沙参更深层次的研究以及应用奠定理论和试验基础。

#### 参考文献

- [1] 余椿生. 北沙参[J]. 食品与药品, 2005, 7(4): 43-44.
- [2] 龚晓健, 季晖, 李萍, 等. 沙参提取物镇咳祛痰及免疫增强作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2000(4): 6-8.
- [3] 王中民, 张永祥, 史美育, 等. 北沙参抗突变实验研究[J]. 上海中医药杂志, 1993(5): 47-48.
- [4] Matsuura H, Saxena G, Farmer S W, et al. Antibacterial and antifungal polyine compounds from *Glehnia littoralis* ssp. *leiocarpa* [J]. Planta Med, 1996, 62(3): 256-259.
- [5] Okuyama T, Takata M, Nishino H, et al. Studies on the antitumor-promoting activity of naturally occurring substances. II. Inhibition of tumor-promoter-enhanced phospholipid metabolism by umbelliferous materials [J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38(4): 1084-1086.
- [6] Okuyama E, Hasegawa Z, Matsushita Z, et al. Analgesic components of *Glehnia* root (*Glehnia littoralis*) [J]. Nat Med, 1998, 52(6): 491-501.
- [7] 张样柏, 唐旭利, 李国强, 等. 北沙参的化学成分研究[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(5): 757-760.
- [8] 董芳, 刘汉柱, 孙阳, 等. 北沙参中佛手柑内酯的分离鉴定及体外抗肿瘤活性的初步测定[J]. 植物资源与环境学报, 2010, 9(1): 95-96.
- [9] 李森, 蔺博超, 吕平, 等. 珊瑚菜组织的培养及无性系的建立[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2008, 24(5): 85-86.

## Study on Initiation of Callus Tissues and Suspension Cell Culture of *Glehnia littoralis*

MIAO Xiao-yan, HE Fu-qiang, ZHANG Xiao-mei

(Department of Biochemistry, Baoding University, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** Taking leaves and stems of *Glehnia littoralis* as materials, MS and B<sub>5</sub> medium were respectively employed to induce the callus of *Glehnia littoralis*, subculture after suspension culture, and the effects of different concentrations of carbon source, 6-BA and NAA on the growth of the cells were investigated, in order to provide basis for the further establishment of *Glehnia littoralis* cell culture system and improved the secondary metabolite production. The results showed that the more suitable callus induction of culture medium was 1/2MS+0.4 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA; the more suitable subculture medium was 1/2MS+0.2 mg/L 6-BA+1.2 mg/L NAA; and in the process of cell suspension culture, 0.2 mg/L 6-BA, 1.6 mg/L NAA and 20 g/L sucrose would be conducive to cell growth.

**Key words:** *Glehnia littoralis*; callus tissues; cell culture