

## 濒危药材明党参愈伤组织培养条件研究

胡琼 (杭州万向职业技术学院, 浙江杭州 310023)

**摘要** [目的]研究培养条件对明党参愈伤组织生长及多糖积累的影响。[方法]分别采用单因素及正交试验的方法,以明党参叶片诱导产生的愈伤组织为材料,从外植体种类、激素种类及浓度、大量母液添加量、光照条件等培养条件比较愈伤组织生长情况及多糖含量。[结果]叶片外植体、大量母液1倍添加量、0.5 mg/L 2,4-D及暗培养等培养条件较有利于明党参愈伤组织生长及多糖的合成。[结论]该研究为培养生产明党参愈伤组织及多糖提供理论和方法依据。

**关键词** 明党参;愈伤组织;多糖;培养条件

中图分类号 S567.23 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)20-0195-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.20.053



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Study on the Culture Conditions of Callus of Endangered *Changium smyrnioides*

HU Qiong (Hangzhou Wanxiang Polytechnic, Hangzhou, Zhejiang 310023)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the culture conditions for the callus growth and the accumulation of amylose in *Changium smyrnioides*. [Method] Using single factor and orthogonal test methods, the callus induced by the leaves of the ginseng was used as the material, the callus growth and polysaccharide content were compared from the explant species, hormone type and concentration, the amount of mother liquor added, and the light conditions. [Result] The culture conditions of leaf explants, large amount of mother liquor 1 times, 0.5 mg/L 2, 4-D and dark culture were more favorable for the growth of callus and the synthesis of polysaccharides. [Conclusion] This study provides theoretical and methodological basis for the cultivation of callus and polysaccharides from *Changium smyrnioides*.

**Key words** *Changium smyrnioides*; Callus; Polysaccharides; Culture conditions

明党参(*Changium smyrnioides*)属于伞形科明党参属植物,是我国特有的单种属植物,分布于湿润亚热带地区的长江流域东、中部,具有补气生津、润肺化痰、平肝和胃、消肿解毒的功效,是我国著名的特产药用植物之一,以根块利用为主。多糖是其含有的一种主要活性成分,试验均发现明党参具有增强机体免疫力、提高机体适应力的功效<sup>[1-3]</sup>。由于明党参自身的生物学特性、人为的毁林开荒、植株的过度采挖及生境的破碎化、乱砍滥伐和开发旅游,破坏了明党参生长的适宜生境,其野生资源破坏严重,分布范围和数量日益减少。如殷现伟<sup>[4]</sup>、蒋志刚等<sup>[5]</sup>对明党参种群生存过程进行了数量分析,结果显示目前种群表现出衰退趋势,濒临灭绝。

多糖广泛存在于多种中草药中,因其能提高机体免疫系统,具有多种生物活性,是理想的免疫增强剂,故是中药材中最有效的药用成分之一<sup>[6-7]</sup>。研究发现,明党参尤其是块根中多糖含量较高<sup>[8-10]</sup>。在野外或常规的栽培情况下,明党参块根至少需要3~5年才能富集一定的多糖含量,历时长,产量低。笔者考虑用愈伤组织生产明党参多糖具有可行性。利用组培方法产生愈伤组织,对愈伤组织生长中的部分影响因素进行试验,比较其在各种条件下生长和多糖积累的动态特征,以为大规模细胞培养生产明党参愈伤组织及多糖提供理论和方法依据。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 3—5月采自浙江杭州市宝石山和玉皇山多年生明党参幼嫩叶片和茎段,经鉴定为伞形科植物明党参。

## 1.2 试验设计

**1.2.1 愈伤组织培养激素条件初筛。**采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行设计,共4种因素(2,4-D、NAA、6-BA、KT),各3个水平(表1)。叶片和茎段均采用这9种培养基配方,每项试验平行做2组,每组接种20瓶外植体,每瓶接种5~7块外植体,定期观察外植体的生长状况,接种15 d后,统计愈伤组织诱导率并进行直观分析生长势和愈伤率。愈伤组织诱导率=形成愈伤组织的外植体数/接种的外植体数×100%。将初筛后得到的愈伤转接相同培养基30 d后,备用。

表1 正交试验因素水平

水平 Level	A (2,4-D)	B (NAA)	C (6-BA)	D (KT)
1	0.5	0.5	0.5	1.0
2	1.0	1.0	1.0	0.2
3	2.0	1.5	2.0	0.3

**1.2.2 愈伤组织培养激素条件再筛。**在初筛的基础上,围绕较理想的培养激素种类和浓度进一步筛选。将初筛后得到的转接相同培养基30 d后的愈伤组织其重量进行无菌称量,后无菌接种到激素组合分别为6-BA-1(6-BA 1.0 mg/L, 2,4-D 0.5 mg/L)、6-BA-2(6-BA 1.0 mg/L, 2,4-D 1.0 mg/L)、KT-1(KT 1.0 mg/L, 2,4-D 0.5 mg/L)、KT-2(KT 1.0 mg/L, 2,4-D 1.0 mg/L)4种培养基中,其他的基质条件和培养条件都一致,每个处理重复4瓶。培养30 d后称量各自的愈伤鲜重,计算其前后的平均值,通过平均值的比率大小来了解较优的激素组合。

**1.2.3 愈伤组织中多糖含量测定方法。**将各处理的愈伤组织在60℃下快速烘干至恒重,将其研磨60目过筛后备用。多糖含量测定采用分光光度比色法测定,在620 nm处测定标准其吸光度。通过测量不同处理下吸光度的大小,粗略比

**基金项目** 杭州万向职业技术学院院级课题(YN2016016);浙江省教育厅一般科研项目(Y201840525)。

**作者简介** 胡琼(1977—),女,浙江舟山人,副教授,博士,从事植物组培、植物保护、生物化学和分子生物学研究。

**收稿日期** 2019-07-13;修回日期 2019-07-24

较愈伤组织中多糖含量的高低,来分析该因素对多糖积累的影响<sup>[11-13]</sup>。

**1.2.4 培养基中大量元素不同倍数处理。**在其他条件一样的情况下,将愈伤组织无菌接种到大量元素分别为2倍、1倍、1/2倍的3种培养基中,分别对应D-1、D-2、D-3。通过测量大量元素处理下组织鲜重增长倍数、多糖含量变化,来分析该因素对活性物质积累的影响。愈伤组织培养、称重及多糖抽提方法同“1.2.2”和“1.2.3”。

**1.2.5 不同光照条件处理。**在其他条件一样的情况下,将愈伤组织无菌接种到同一配方培养基中,以连续24 h光照(L-1)、12 h/d 光暗交替(L-2)及24 h黑暗(L-3)3种光照形式,

进行明党参愈伤组织继代培养。通过测量不同光照形式下愈伤组织鲜重增长倍数、多糖含量变化,来分析该因素对活性物质积累的影响。愈伤组织培养、称重及多糖抽提方法同“1.2.2”和“1.2.3”。

## 2 结果与分析

**2.1 激素种类及浓度影响愈伤生长** 明党参的叶片和茎段在含有不同激素的9种MS培养基上培养8~9 d均可诱导出愈伤组织,且愈伤率一般可达到50%以上,甚至接近100%。2种外植体产生的愈伤组织颜色、质地差别并不是很明显,但长势有一定的差异,尤其是在继代培养后。其中来自于叶片的愈伤组织的产量及长势比较理想(图1、表2)。

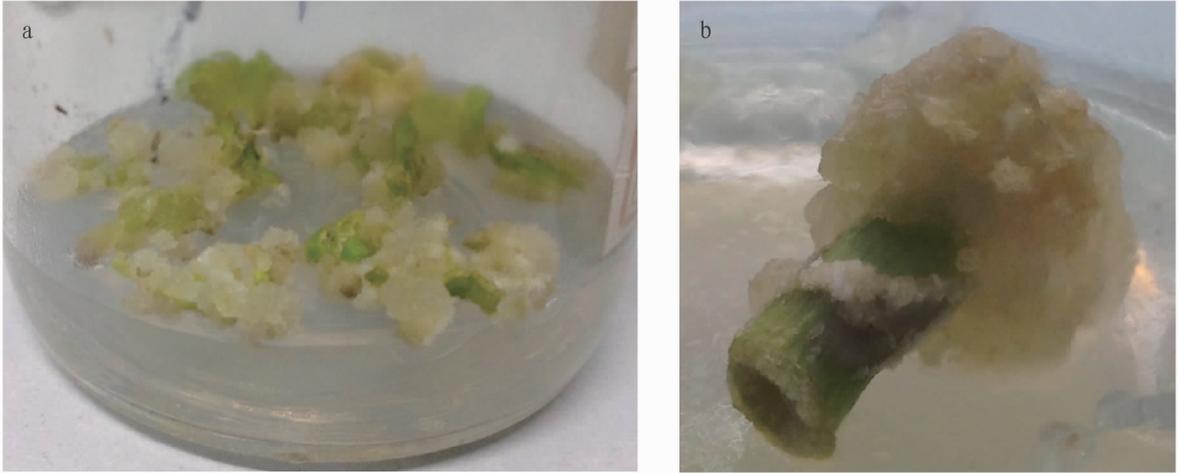


图1 明党参的成叶(a)和茎段(b)所产生愈伤组织的形态

Fig.1 Morphology of callus produced by the leaf (a) and stem (b) of *Changium smyrnioides*

表2 不同激素配比对明党参愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different hormone ratios on callus induction of *Changium smyrnioides*

培养基编号 Media number	成叶 Leaf		茎段 Stem	
	出愈伤率 Callus rate//%	生长势 Growth potential	出愈伤率 Callus rate//%	生长势 Growth potential
1	77.54	+	35.12	+
2	91.36	++	29.32	+
3	87.25	+++	39.40	+
4	75.58	+	52.45	+
5	75.69	+	73.26	++
6	79.71	+	95.26	+++
7	79.08	++	49.35	+
8	76.25	+	47.86	+
9	73.20	+	39.17	+
CK	8.05	+	5.38	+

注:+.少量且色白;++.数量一般,浅黄白色;+++。大量,长势旺盛,浅黄白(绿)色。CK为不加激素

Note:+.A small amount and white color; ++.The quantity is general, light yellowish white; +++.A large number, strong growth, light yellow white (green) color.CK is no hormone

**2.2 不同激素组合对愈伤组织及其多糖合成的影响** 从表3和图2可看出,4种不同激素组合均能使初代愈伤组织扩张,新鲜愈伤组织颜色、长势及多糖含量差异不明显。其中6-BA-1(6-BA 1 mg/L,2,4-D 0.5 mg/L)组合相对理想。

**2.3 培养基中大量元素对愈伤组织及其多糖合成的影响** 观察不同大量元素处理中愈伤组织生长结果(图3、表4)

发现,色泽方面D-2处理比较理想,色微黄;生长状态及生长势方面D-1处理状态均较好;鲜重变化量比率D-2则明显优于另2个处理。综上结果,大量元素添加量为D-2处理即1x时,对愈伤组织生长有显著促进作用,愈伤组织生长较理想。

表3 不同激素组合处理下愈伤组织鲜重变化

Table 3 Fresh weight changes of callus under different hormone combinations

处理 Treatment	鲜重 Fresh weight//g		比率 Ratio//倍
	原重 Original weight	现重 Current weight	
6-BA-1	1.16	7.58	6.53
6-BA-2	1.02	6.12	6.13
KT-1	0.88	5.35	6.08
KT-2	0.99	5.89	5.95

表4 不同大量元素处理下愈伤组织鲜重变化

Table 4 Fresh weight changes of callus under different macroelements

处理 Treatment	鲜重 Fresh weight//g		比率 Ratio//倍
	原重 Original weight	现重 Current weight	
D-1	0.805 0	6.957 5	8.642 9
D-2	0.587 5	6.662 5	11.340 4
D-3	0.575 0	3.510 0	6.104 3

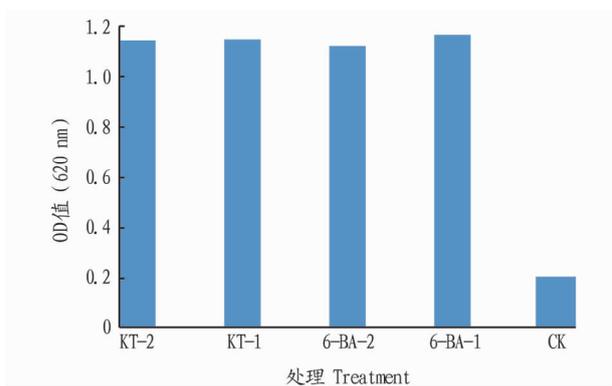


图2 4种不同激素组合处理下愈伤组织的生长情况比较

Fig.2 Comparison of callus growth under the treatment of four different hormone combinations



图3 3种不同大量元素处理下愈伤组织的生长情况比较

Fig.3 Comparison of callus growth under three different macroelements

由图4可知,3种处理中D-2多糖的OD值最高,高于D-1和D-3,对多糖合成有促进作用。愈伤组织培养中大量元素添加量为MS培养基的1倍(1x)时比较适合多糖的积累。

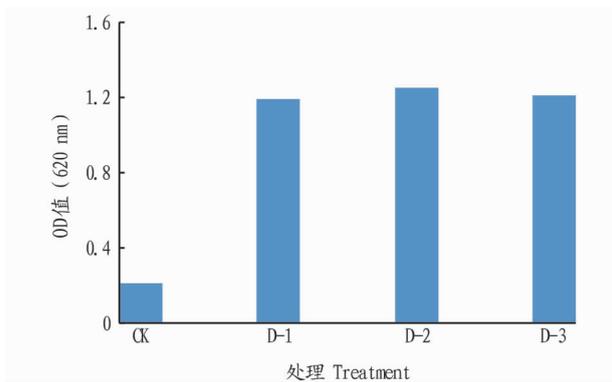


图4 不同大量元素倍数处理下多糖的OD值比较

Fig.4 Comparison of OD values of polysaccharides treated with macroelements

**2.4 不同光照条件处理对愈伤组织及其多糖合成的影响** 图5显示,色泽方面L-1处理微黑褐,目测生长量、全絮状最差,颗粒状最明显;L-2处理色泽也是微黑褐色,愈伤生长率80%,但长势一般;L-3处理色泽最好,色微黄,愈伤生长率80%,且长势较好,全絮状明显。愈伤鲜重变化量比率

区别较明显,L-3>L-2>L-1(表5)。3种处理中L-3处理的多糖OD值远高于L-1和L-2(图6)。故愈伤组织培养中暗培养比较适合多糖的积累。



图5 不同光照条件对愈伤组织生长的影响

Fig.5 Effect of different light conditions on callus growth

3 讨论与结论

**3.1 明党参最优外植体的选择** 江曙等<sup>[14]</sup>试验认为利用明党参的根、叶柄、叶片均可诱导出愈伤组织,且来自于叶柄的愈伤组织长势最好。该试验发现叶片愈伤诱导的效果最为理想。该结果与其他研究结果有所出入。笔者认为可能与明党参的种类、原材料采集的时间、激素的种类等有一定的关系。该种外植体来源广、可采集量大,故可作为大批量生产愈伤组织的外植体首选。这对明党参野生资源的保护利用具有重要意义。

表5 不同光照条件下愈伤组织鲜重变化

Table 5 Fresh weight changes of callus under different light conditions

处理 Treatment	鲜重 Fresh weight//g		比率 Ratio//倍
	原重 Original weight	现重 Current weight	
L-1	0.590	4.608	7.810
L-2	0.638	5.088	7.975
L-3	0.604	11.500	11.500

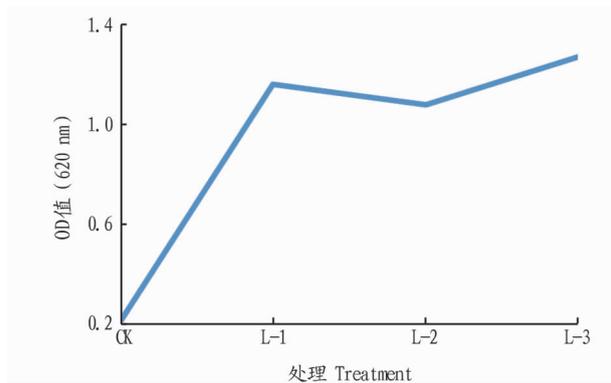


图6 不同光照条件下多糖的OD值

Fig.6 OD value of polysaccharides treated under different light conditions

**3.2 培养基成分对明党参愈伤组织的影响** 在其他条件一致的情况下,加入2,4-D 0.5 mg/L与2,4-D 1.0 mg/L的效果差别不显著。试验也发现,6BA-1与KT-1的愈伤质地有较明显的区别,分属于疏松型和紧密型。彭昕等<sup>[15]</sup>在中药

材三叶青愈伤组织研究中发现疏松型和紧密型2种类型的愈伤质量有较大的差异。故该方面可作为后续研究的方向。

上官新晨等<sup>[16]</sup>研究发现,高盐的培养基较适合愈伤组织的生长,低盐的培养基较适合次生代谢产物的积累。与该试验中基础母液的大量元素含量对明党参愈伤生长和多糖积累影响基本相符。大量元素在常规1倍的情况下愈伤组织的长势及增长率要高于1/2倍添加量,而多糖积累情况刚好相反。

**3.3 光照条件对明党参愈伤组织的影响** 研究表明,光照可影响细胞的生长和次生代谢物的积累,影响效果因植物种类不同而不同<sup>[17-18]</sup>。齐琳琳等<sup>[19]</sup>发现三七愈伤组织在不同光强下每天光照12h的愈伤组织,皂苷含量均低于黑暗培养的愈伤组织,猜测光照引起愈伤组织表面变绿及细胞分化,是抑制愈伤组织中皂苷合成与积累的主要原因。该研究表明24h/d黑暗最有利于明党参愈伤组织的生长,这可能与明党参适生于较荫环境有关;且黑暗有利愈伤组织的生长不利分化,也不抑制多糖的形成,这可能与多糖合成条件有关。

综上所述,叶片、大量元素常规1倍培养基、2,4-D 0.5 mg/L激素及暗培养等方式生产明党参多糖,不仅可以大大地缩短生产周期,而且细胞培养物中的多糖含量也明显增高,具有较大的可行性。该研究对于缓解珍稀濒危药用植物资源的短缺矛盾具有重要的理论意义和应用价值,有助于实现中药资源的可持续发展。

#### 参考文献

- [1] 单人骅,余孟兰.中国植物志[M].北京:科学出版社,1979:122-124.  
[2] 傅立国.中国植物红皮书——稀有濒危植物[M].北京:科学出版社,

1991:532-535.

- [3] 吴泽鹏.明党参的活性成分分析[J].亚太传统医药,2010,6(3):32-33.  
[4] 殷现伟.濒危植物明党参与对照植物的生理生态学研究[D].杭州:浙江大学,2003.  
[5] 蒋志刚,葛颂.探索长江流域物种濒危机制与保护对策[J].生物多样性,2005,13(5):367-375.  
[6] 肖建辉.江西虫草多糖含量的快速检测方法研究[J].中药材,2008,31(5):689-692.  
[7] 邓泽元,刘娟,余迎利,等.决明子水溶性多糖提取的研究[J].食品科学,2002,23(1):72-75.  
[8] 任东春,钱士辉,杨念云,等.明党参化学成分研究[J].中药材,2008,31(1):47-49.  
[9] 白钢钢,袁斐,毛坤军,等.明党参根皮化学成分研究[J].中药材,2014,45(12):1673-1676.  
[10] 余鹏,吕鹏,王慧忠.滁州市琅琊山明党参可溶性多糖分析[J].滁州学院学报,2012,14(5):53-55.  
[11] 刘云.当归多糖含量的提取及含量测定[J].现代中药研究与实践,2003,17(1):49-53.  
[12] 杜清,秦民坚,郭巧生.明党参多糖提取工艺研究[J].现代中药研究与实践,2005,19(4):51-53.  
[13] 郭巧生,王长林,厉彦森,等.明党参干物质积累及多糖含量的动态研究[J].中国中药杂志,2007,32(1):24-26.  
[14] 江曙,段金彪,陈建伟,等.明党参愈伤组织诱导及其细胞悬浮培养的研究[J].中国中药杂志,2009,34(9):1078-1081.  
[15] 彭昕,张剑,何军邀,等.三叶青松散型和致密型愈伤组织悬浮培养及黄酮积累的比较研究[J].中草药,2012,43(3):577-580.  
[16] 上官新晨,郭春兰,杨武英,等.培养基及培养条件对青钱柳愈伤组织生长和黄酮含量的影响[J].福建农林大学学报(自然科学版),2006,35(6):588-592.  
[17] 朱红威,邵菊芳,李庆,等.不同培养条件对银杏愈伤组织生长及黄酮含量的影响[J].食品科学,2007,28(11):102-105.  
[18] 彭昕,林言娜,何军邀,等.培养条件对三叶青愈伤组织生长及总黄酮含量的影响[J].药物生物技术,2012,19(2):138-141.  
[19] 齐琳琳,李刚,刘志伟,等.培养条件对三七愈伤组织生长和皂苷积累的影响[J].广西植物,2017,37(8):1035-1042.  
[13] 邓桂明,何海,葛金文,等.连苓解毒颗粒成型工艺研究[J].中南药学,2016,14(6):595-598.  
[14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:7-8.

(上接第194页)

- [11] 吕兴萍,郑小莹,刘海燕,等.灵芝多糖颗粒剂的处方优化研究[J].安徽农业科学,2018,46(18):150-152,162.  
[12] 孙淑萍,陈靠山,吴少云.牛蒡低聚糖防潮颗粒的研制[J].中国中医药科技,2009,16(4):297-299.