

培养基中蔗糖浓度及添加氨基酸对组培暗紫贝母生长的影响

蔡朝晖 朱丹妮 陶金来¹ 高山林 徐德然

(中国药科大学遗传育种研究室,南京 210038)

摘要 研究了培养基中不同蔗糖浓度和添加 L-酪氨酸或 L-赖氨酸对组培暗紫贝母鳞茎的生长率和生物碱含量等的影响。结果表明:蔗糖浓度为 5% 时,鳞茎的生长率和生物碱含量最高,培养基中添加氨基酸可以提高鳞茎的生长率。

关键词 暗紫贝母; 鳞茎培养; 生长率; 生物碱

有关暗紫贝母 (*Fritillaria unibracteata* Hisao et K. C. Hsia) 组织培养技术的研究,已有报道^[1~3]。本文在此基础上,进一步对暗紫贝母鳞茎培养的培养基中蔗糖浓度、添加氨基酸对生长率和生物碱含量等的影响进行了研究,以期找出较佳的培养基配方。

1 材料和方法

1.1 材料

无菌材料为本室长期继代培养的暗紫贝母鳞茎。标准品由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 蔗糖浓度试验 将无菌材料在尽量保持丛生小鳞茎形状完整的情况下,分切成 0.5 cm 大大小的小块,接种到预先称重的附加适宜激素,并分别附加 2%, 3%, 4%, 5%, 6% 蔗糖的五种 MS 固体培养基中,接种完毕再次称重,计算接种量。

1.2.2 附加氨基酸试验 将培养材料接种在含有 6-BA 和 IAA 的 MS 固体培养基上,每组培养基中再分别附加 50 ppm 的 L-酪氨酸和 L-赖氨酸,以不另外附加这两种氨基酸的 MS 培养基为对照。接种方法同前。

以上材料均在 20±1℃ 的光照培养箱中

培养,每天光照 12 h,光照强度为 600 lx,培养 50 d 后计算收获量,生长率,折干率等数据,并测定干品生物碱含量和可增生物碱 mg/L 等指标。计算方法见文献^[1]。对接种量、收获量和生长率均计算标准差($\bar{x} \pm s$),并对生长率进行了方差分析,比较各种处理间的差异。

1.3 总生物碱含量测定——酸碱滴定法^[4~6]

精称样品 1 g,用适量 10% 氨水碱化,加入乙醚-氯仿-乙醇(25:8:2.5)混合溶剂 20.00 ml,精密称重,冷浸 24 h 后,补至原重,吸取上清液 10.00 ml,水浴蒸干,再加入乙醚溶解,加入一定量 5 mmol/L 硫酸,在水浴上挥去醚,加新煮沸冷却的蒸馏水稀释,用 10 mmol/L 氢氧化钠回滴,滴至溴甲酚绿甲基红混合指示剂由酒红变绿。

用上述方法测出每毫克浙贝甲素所需消耗硫酸的摩尔数 $n = NV_1/W_1$

$$\text{百分含量} = \frac{NV_2 \times 2}{W_2 n} \times 100\%$$

其中: W_1 ——标准品毫克数; N ——标准硫酸溶液摩尔浓度; V_1 ——滴定标准品时净耗标准硫酸液毫升数; V_2 ——滴定样品时净耗标准硫酸液毫升数; W_2 ——样品毫克数

2 结果与分析

2.1 蔗糖浓度试验

接种材料在培养 20 d 左右即可看到原

有的鳞茎长大，在材料的表面长出数个小突起，并逐渐长成小鳞茎。结果见表 1，主要特征数据见图 1，生长率差异显著性测试结果见表 2。

Tab 1. The effects of different concentrations of sucrose on the growth of bulbs

Concentration	A 2%	B 3%	C 4%	D 5%	E 6%
N	20	18	18	20	19
Inoculated wt, g/frask	0.821±0.031	0.728±0.019	0.747±0.064	0.672±0.037	0.760±0.051
Harvested wt, g/frask	2.020±0.168	2.670±0.194	2.840±0.143	2.900±0.140	2.915±0.163
Growth rate, %	2.520±0.175	3.670±0.206	3.840±0.220	4.425±0.209	3.750±0.186
Yield of fresh drug, g/L	38	66.75	71	85.62	68.75
Rate of dry/fresh, %	10.92	13.63	15.59	18.18	19.58
Yield of dry drug, g/L	4.15	9.1	11.07	15.57	13.46
Content of alkaloid, %	0.05998	0.06709	0.06733	0.06471	0.05845
Yield of alkaloid, mg/L	2.49	6.16	7.45	10.07	7.87

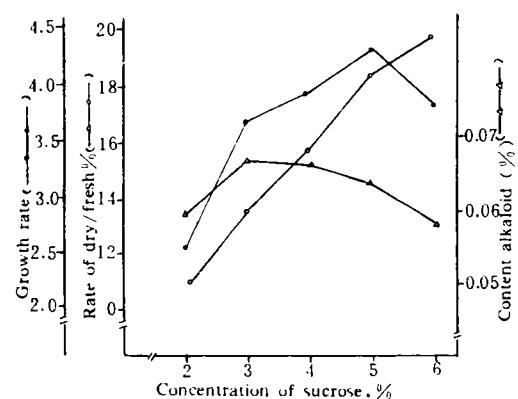


Fig 1. Effects of different concentrations of sucrose on cultured bulbs of *F. unbracteata*

Tab 2. SSR test for growth rate among different concentrations of sucrose

No.	Growth rate	Significance of difference	
		0.05	0.01
D, 5%	4.425	a	A
C, 4%	3.84	b	B
E, 6%	3.75	b	B
B, 3%	3.67	b	B
A, 2%	2.52	c	C

2.1.1 生长率变化 从表 1 和图 1 可以看出,蔗糖浓度在 2%~5% 之间,随着蔗糖浓度的增加,生长率逐渐增大,且上升速度较快;在浓度为 5% 时,生长率比浓度为 2% 时高 75.6%,在浓度为 6% 时,生长率有所下降,其生长率比浓度为 2% 时的高 48.81%。经显著性测定表明,D 组(5%)与其它组的差异极

显著。蔗糖浓度在 5% 时,贝母鳞茎的生长率最高。

2.1.2 生物碱含量变化 从表 1 和图 1 中可以看出生物碱含量在 3%、4% 时最高,5% 时次之,而过高或过低的蔗糖浓度时生物碱含量均较低。

2.1.3 折干率变化 从图 1 可以看出,随着蔗糖浓度的增加,折干率也不断增大,这可能是由于培养基中的蔗糖浓度增高,能够提供较多的碳源,除了提供足够的能量外,还能积累较多的干物质。

综合折干率、生物碱含量和生长率计算出每升培养基净增生物碱量,可以看出 D 组(5%)最高,是其它组的 1.2~4 倍。从我们的实验观察来看,D 组材料的外形好,鳞茎色白,似商品贝母环抱。因此,选用 5% 的蔗糖浓度效果最好。

2.2 添加氨基酸试验

L-酪氨酸和 L-赖氨酸作为有机氮分别添加到 MS 培养基中后,无菌材料的生长情况同前述,结果见表 3,生长率差异显著性测定结果见表 4。

从表 3 中看出,添加酪氨酸组生长率最高,添加赖氨酸组次之,它们分别比对照组高 30% 和 17%。从表 4 看出,添加酪氨酸组与

Tab 3. The effects of L-lysine and L-tyrosine on cultured bulbs of *F. unibracteata*

Condition	L-tyrosine	L-lysine	Control
N	22	22	24
Inoculated wt, g/frask	0.666±0.029	0.675±0.014	0.809±0.026
Harvested wt, g/frask	2.200±0.150	2.026±0.106	2.078±0.085
Growth rate, %	3.360±0.208	3.025±0.167	2.588±0.092
Yield of fresh drug, g/L	59.00	50.63	39.70
Rate of dry/fresh, %	11.80	12.67	11.56
Yield of dry drug, g/L	6.96	6.41	4.59
Content of alkaloid, %	0.05162	0.05223	0.06456
Yield of alkaloid, mg/L	3.59	3.35	2.97

Tab 4. SSR test for growth rate among L-lysine, L-tyrosine and control

No	L-tyrosine	L-lysine	Control
Growth rate	3.360	3.025	2.588
Significance of difference 0.05 0.01	a A	ab AB	b B

对照组差异极显著,看来添加氨基酸有利于鳞茎的生长。从生物碱含量来看,对照组最高,比添加氨基酸组高24%以上。添加氨基酸抑制了生物碱的合成,但干物质的积累以对照组最低,因而每升培养基净增生物碱的量以添加氨基酸组较对照组高。

3 讨 论

1)培养基中的糖起到提供碳源和维持一定的渗透压的作用。暗紫贝母鳞茎的生长需要较高的糖浓度,但过高的糖浓度对细胞的生长不利。在3%~5%糖浓度时的渗透压对暗紫贝母细胞生物合成最有利,过高或过低的糖浓度都会大大影响生物碱的合成。

2)氨基酸作为蛋白质的组成成分,参与蛋白质的代谢,可以起到促进生长的作用。从

本试验结果可以看到,添加氨基酸,尤其是酪氨酸后,暗紫贝母鳞茎的生长率明显提高,但是降低了生物碱的含量,可能由于细胞的生长和代谢需要一定的C/N比,氮源的加入影响了这一比值,这一问题尚待深入研究。试验结果也提示,在贝母鳞茎的大规模培养中,有必要采用两步法,在生长培养基中加入氨基酸来提高生长率。

参 考 文 献

- 高山林,朱丹妮,蔡朝晖等.暗紫贝母鳞茎器官培养生长特征和生物碱积累的研究.中国药科大学学报,1992,23(3):144
- 蔡朝晖,高山林,徐德然等.不同培养条件及方法对组培暗紫贝母生长的影响.中国药科大学学报,1992,23(6):367
- 徐德然,高山林,蔡朝晖等.暗紫贝母鳞茎培养基的选择和简化试验.中国药科大学学报,1992,23(5):304
- 章育中,周同惠,沙世炎等.植物药中一些主要成分测定方法研究.药学学报,1962,IX(9):541
- 徐凤林,沙世炎,曾纪锁等.中草药有效成分分析法.北京:人民卫生出版社,1981.57
- 钟凤林,陈和荣,陈敏等.贝母不同器官总生物碱含量的比较.中药材,1987,(1):40

The Effects of Concentration of Sucrose and Addition of Aminos on the Growth of Cultured Bulb of *Fritillaria unibracteata*

Cai Zhaojun, Zhu Danni, Tao Jinlai, Gao Shanlin, Xu Deran

Department of Plant Genetics and Breeding, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038

Abstract The paper reports growth rate and alkaloid content of *Fritillaria unibracteata* in tissue culture by different sucrose concentrations and 2 aminos additional experiments. The results show that the highest growth rate and yield of alkaloid is in 5% sucrose concentration. The addition of aminos is favorable to the growth of bulb, but not to the accumulation of alkaloid.

Key words *Fritillaria unibracteata*; Bulb culture; Growth rate; Alkaloid