

瓦布贝母组织培养及生物碱的测定

滕俞希<sup>1</sup>, 王晶金<sup>1</sup>, 陈逸菲<sup>1</sup>, 彭 婕<sup>1</sup>, 范维强<sup>2</sup>, 唐 琳<sup>1</sup>

(1. 四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;  
2. 阿坝藏族羌族自治州食品药品检验所, 阿坝 624000)

**摘 要:** 为缓解川贝母的市场供需矛盾, 本研究利用组织培养技术生产瓦布贝母再生鳞茎, 探究了适宜的组织培养条件, 并采取酸性染料比色法测定总生物碱. 结果发现, 鳞茎采用 75% 酒精约 10 s 和 0.1% 升汞 15 min 灭菌, 外植体污染率最低; 不同种类和浓度范围的激素能够影响外植体的启动和生长状况, NAA 和 6-BA 浓度范围分别控制在 0.5~2.0 mol/L, 均能诱导出再生鳞茎; 不同激素培养条件下, 瓦布贝母再生鳞茎总生物碱存在差异, 有超过一半的再生鳞茎总生物碱含量达到中华药典的规定要求, 因此, 组织培养是获取瓦布贝母活性成分的一种有效途径.

**关键词:** 瓦布贝母; 组织培养; 植物生长激素; 生物碱

**中图分类号:** Q94      **文献标识码:** A      **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.016002

Tissue culture and alkaloids determination of  
*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis*

TENG Yu-Xi<sup>1</sup>, WANG Jing-Jin<sup>1</sup>, CHEN Yi-Fei<sup>1</sup>, PENG Jie<sup>1</sup>, FAN Wei-Qiang<sup>2</sup>, TANG Lin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,  
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. Food and Drug Inspection Institute of Aba Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture, Aba 624000, China)

**Abstract:** In order to alleviate the contradiction between market supply and demand of *Fritillaria cirrhosa*, the regenerated bulbs of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* were produced by tissue culture technology in this study, the suitable tissue culture conditions were also explored, and the total alkaloids were determined by acid dye colorimetry. The results showed that the bulbs were sterilized with 75 % ethanol for about 10 s and 0.1 % HgCl<sub>2</sub> for 15 min with the lowest explants contamination rate. Different types and concentrations hormones can affect the initiation and growth of explants, the concentration range of NAA and 6-BA were controlled at 0.5~2.0 mol/L, respectively, and both can promote the growth of regenerated bulbs. The contents of total alkaloids in regenerated bulbs of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* were determined. Under different hormone culture conditions, there were differences in the total alkaloids of regenerated bulbs of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis*, and the total alkaloids of more than half of the regenerated bulbs in tissue culture met the requirements of Chinese Pharmacopoeia. Therefore, tissue culture is an effective way to obtain the active ingredients of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var.

收稿日期: 2021-05-10  
基金项目: 四川省科技计划(2020YFS0473)  
作者简介: 滕俞希(1999—), 女, 重庆人, 本科生, 研究方向为植物天然产物. E-mail: 15823139743@163.com  
通讯作者: 唐琳. E-mail: 1781966295@qq.com

wabuensis.

**Keywords:** *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis*; Tissue culture; Plant hormones; Alkaloids

# 1 引 言

药材川贝母是百合科多种植物包括川贝母(*Fritillaria cirrhosa*)、暗紫贝母(*Fritillaria unibracteata*)和其变种瓦布贝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis*)等的干燥鳞茎<sup>[1]</sup>. 川贝母的活性成分主要有西贝母碱、贝母辛等多种甾体生物碱,具有清热润肺、化痰止咳、散结消痛的功效<sup>[2]</sup>. 由于川贝母生长周期长,种子休眠期长,自然萌发率低,长期被滥采滥挖等原因,川贝母资源严重匮乏.

为了解决川贝母的市场供应需求,现已进行川贝母、暗紫贝母和瓦布贝母的人工栽培和研究,经过长期的研究发现,瓦布贝母是最适合人工种植的种类,且瓦布贝母的总生物碱含量普遍高于其它基源的川贝母<sup>[3]</sup>. 然而,瓦布贝母的最佳采挖期为 3~5 年<sup>[4]</sup>,栽培周期较长,人工栽培的瓦布贝母还易受到季节与地域的限制,不能在全国范围内广泛推广,因此,人工栽培不能完全有效地解决川贝母的供应难题.

组织培养技术不受季节等条件的限制,可实现短时期内迅速扩大植物的数量,获得较高的经济效益. 近年来,随着组织培养技术的发展,组培药用植物的使用价值也在不断提升. Su 等<sup>[5]</sup>将组培得到的瓜蒌生根苗,移至田间种植,短时间内能够收获成熟块根. 研究表明,利用水仙组培技术体外合成加兰他敏(Galanthamine)被认为是可替代生产的一种方法<sup>[6]</sup>. Bhattacharyya 等<sup>[7]</sup>在探究药用兰科植物繁殖的模式组织培养途径中,发现再生植株的次级代谢产物,如酚、生物碱、类黄酮等都有较高的活性水平. Zhao 等<sup>[8]</sup>研究发现体外培养是批量生产用于制药业的川贝母类固醇生物碱的一种有效策略. 目前,以瓦布贝母为材料进行组织培养的研究还未见报导. 本研究利用组织培养体系生产再生鳞茎,提取并研究其活性成分,为川贝母药用价值研发提供资料.

# 2 材料与amp;方法

## 2.1 材 料

瓦布贝母由四川新荷花川贝母生态药材有限

公司提供,由四川大学生命科学学院唐琳教授鉴定.

## 2.2 方 法

2.2.1 植物材料预处理 选取瓦布贝母鲜鳞茎(3 年生,直径约 1.5 cm),切除根系,用自来水冲洗、去除泥污. 再将鳞片剥开,用刷子轻轻刷洗,洗净泥污. 去掉最外面一层腐烂、褐化的鳞片. 放入洗衣粉溶液中浸泡 10~15 min,最后自来水下冲洗 2 h.

2.2.2 外植体灭菌方法 取预处理后的瓦布贝母鲜鳞茎,分别选择两种消毒方式进行灭菌:

(A) 75%酒精约 10 s,无菌水冲洗 3 次,0.1%升汞 15 min,无菌水冲洗,无菌水浸泡 10 min 后冲洗 3 次,灭菌滤纸吸干.

(B) 75%乙醇浸泡约 10 s,无菌水冲洗 2~3 次,再用 10%次氯酸钠浸泡 20 min,无菌水冲洗,无菌水浸泡 10 min 后冲洗 3 次,灭菌滤纸吸干.

将两种方法灭菌后的鳞茎切成约 0.5 cm 的小块,无菌接种于 MS<sup>[9]</sup>培养基中. 将上述材料放 4℃ 冰箱 2 d,再转移至组培室培养,控制温度在 22~24℃,光照培养,记录 30 d 内外植体污染率,比较得出鳞茎外植体最佳灭菌方式, A 处理每次接种外植体约 29 块, B 处理每次接种外植体约 6 块,实验重复 3 次.

污染率=(被污染的外植体数/接种的总外植体数)×100%

2.2.3 植物激素对鳞茎外植体启动率及生长情况的影响 以 MS 为基本培养基, 30 g/L 蔗糖, 8 g/L 琼脂, 0.1 g/L 活性炭, 添加不同种类和浓度的激素, pH 为 5.8, 共配制 10 种培养基(见表 2). 配制完成后, 置于高压蒸汽灭菌锅 121℃ 灭菌 20 min, 冷却待用. 将已经灭菌处理的鳞茎外植体接种至培养基进行启动诱导, 每种培养基接种约 25 块, 放置组培室培养, 控制温度在 22~24℃, 每日光照 16 h, 光照强度 2500~3500 lx. 在 40 d 后观察瓦布贝母鳞茎外植体启动率和生长状况. 实验重复 3 次.

2.2.4 瓦布贝母总生物碱的测定 参照药典<sup>[1]</sup>, 测定各样品(生长期为 4 个月的再生鳞茎和 3 年生瓦布贝母鳞茎)总生物碱含量, 每组混合 3 个样品. 本品按干燥品计算, 总生物碱以西贝母碱计, 不得少于 0.050%. 测得数据采用 SPSS 软件进行方差

分析,按照单因素 ANOVA 检验判断显著性差异,显著水平 0.05.

3 结果与分析

3.1 植体灭菌方法

组培 30 d 后,鳞茎外植体的污染状况见表 1,结果显示采用 B(75%酒精约 10 s+10% NaClO 20 min)消毒方式处理后,污染率较高,而选择 A(75%酒精约 10 s+0.1%升汞 15 min)消毒方式处理后,污染率低,处理效果较好.

表 1 两种灭菌方法处理外植体 30 d 污染率

Tab. 1 Pollution rate of explants treated by two sterilization methods for 30 d

灭菌方法	被污染的总外植体数/块	接种的总外植体数/块	污染率/%
A	23	89	25.8
B	9	20	45.0

3.2 植物激素对鳞茎外植体启动率及生长状况的影响

不同培养基条件下鳞茎外植体 40 d 后启动率和生长状况见表 2. 从表 2 中发现,2,4-D 和 NAA

配合使用虽然可以诱导鳞茎外植体启动,但是在此培养基条件下鳞茎外植体的生长状态不佳,存活数量较少. NAA 与 6-BA 配合使用有助于诱导鳞茎外植体启动或分化,但是较高浓度的 NAA 会抑制鳞茎外植体的生长. 培养基中 NAA 和 6-BA 浓度分别控制在 0.5~2 mg/L,瓦布贝母鳞茎外植体后续生长状况良好,有芽、小鳞茎和少量愈伤组织形成(见图 1).

表 2 不同激素对外植体启动率和生长状况的影响

Tab. 2 Effects of different hormones on initiation rate and growth of explants

培养基编号	NAA/(mg/L)	6-BA/(mg/L)	2,4-D/(mg/L)	启动率/%
1	0.5	0	1	20.8
2	1	0.5	0	64.5
3	2	0.5	0	71.7
4	0.5	1	0	70.0
5	1	1	0	43.8
6	2	1	0	61.5
7	0.5	2	0	67.9
8	1	2	0	47.1
9	2	2	0	31.6
10	3	0.5	0	33.3

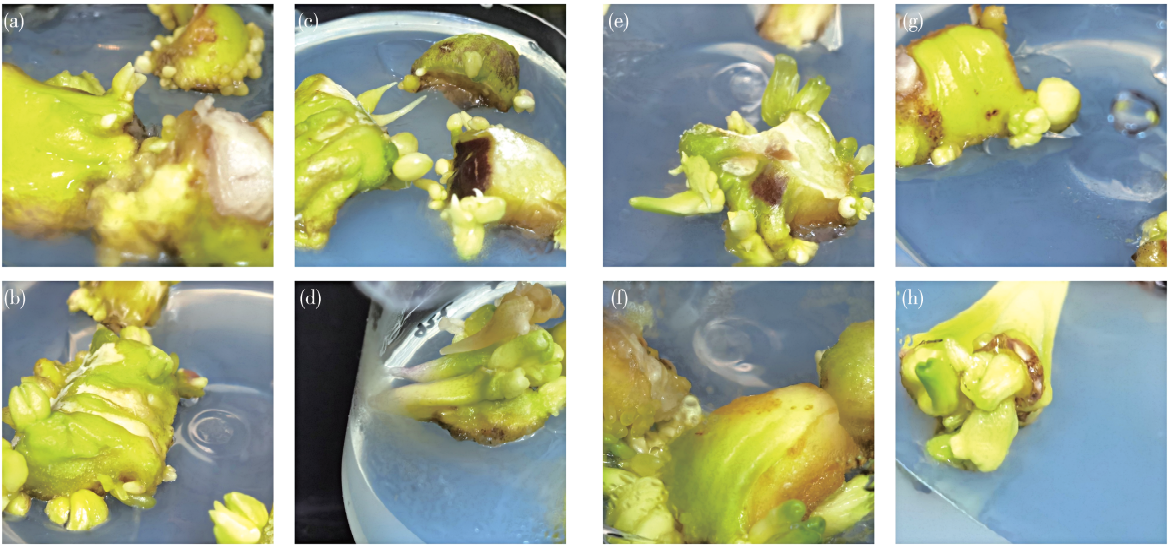


图 1 瓦布贝母外植体生长情况  
注:(a)~(h)分别为 2 号~9 号培养基植物生长情况

Fig. 1 Growth of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *xabuensis* explants  
Note:(a)~(h) are the growth of plants in medium 2~9 respectively

3.3 瓦布贝母总生物碱的测定

实验发现(见图 2),不同培养条件下即随着激素浓度的改变,瓦布贝母再生鳞茎的总生物碱含量

存在显著性差异,说明激素能够影响瓦布贝母鳞茎生物碱的积累. 再生鳞茎中除 5 号和 6 号培养基中再生鳞茎的总生物碱含量测定值较低外,其余培养

基的再生鳞茎总生物碱含量均高于 2015 年版中国药典的规定要求。

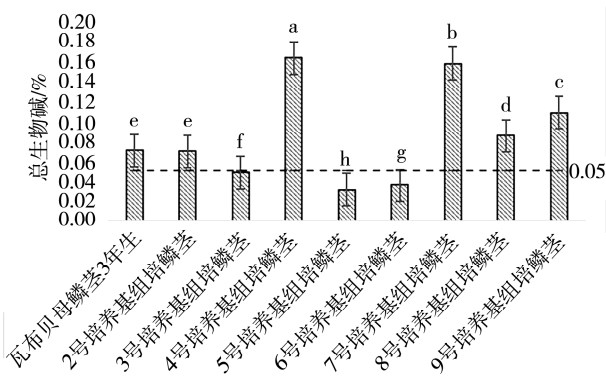


图 2 不同培养条件瓦布贝母总生物碱含量比较( $n=3$ )  
a~h 表示组间有显著性差异( $P<0.05$ )  
注:虚线表示药典规定“总生物碱含量不少于 0.050%”  
Fig. 2 Comparison of total alkaloid content of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* in different culture conditions( $n=3$ )  
a~h indicates there have significant difference ( $P<0.05$ ) between the groups  
Note: Fictitious line indicates that pharmacopoeia stipulates “total alkaloid content is not less than 0.050%”

## 4 讨 论

### 4.1 瓦布贝母的组织培养

瓦布贝母是名贵川产道地药材川贝母的基源种<sup>[3]</sup>。瓦布贝母成功引种栽培,较为有效地缓解了川贝母资源难题,然而栽培瓦布贝母的栽培时间太长<sup>[10]</sup>,栽培品的产量、质量与无机盐<sup>[11]</sup>等外源环境条件也有关。因此,栽培瓦布贝母不能完全有效地解决市场矛盾。本研究希望构建有效的瓦布贝母组织培养体系,以满足生产要求。初步研究结果显示,外源激素种类、浓度和不同激素组配比能够影响外植体的生长状况,与先前研究结果一致<sup>[12]</sup>,但具体激素培养方案有一定差异。川贝母组织培养过程中易发生褐变现象,本实验采取低温预处理外植体和培养基中添加活性炭的方法<sup>[13]</sup>来缓解此现象。后期除优化激素种类和浓度的最佳配比外,还将研究其它因素如光照、温度以及外源化合物等对组织培养物生长的影响,实现对培养条件的优化<sup>[14]</sup>。

### 4.2 瓦布贝母再生鳞茎生物碱含量测定

生物碱是瓦布贝母重要的活性成分。本试验显示,6 种组培方案的瓦布贝母总生物碱含量达到药典规定要求,说明再生鳞茎具有药用潜力。而 5 号和 6 号培养基再生鳞茎总生物碱含量较少,可能与

外源激素有关,金青等<sup>[15]</sup>研究发现外源激素通过改变内源激素水平直接或间接调控生物碱积累。此外,光照<sup>[6]</sup>和外源化合物<sup>[16]</sup>等均能影响生物碱的积累,还有研究显示非生物胁迫有利于植物次生代谢物的产生<sup>[17]</sup>,因此在组培过程中,可以添加多种外源因素,提高有效成分的体外产量。目前,有关瓦布贝母生物碱合成的相关酶和基因的研究资料较少,后续可开展功能基因的研究以探究调控过程。

栽培瓦布贝母鳞茎中含有多种生物碱成分<sup>[18]</sup>。但相比栽培鳞茎,组培鳞茎的生物碱成分是否发生变化,还需要进一步验证。同时,如果组培鳞茎中确有增加或减少的生物碱成分,那么药物活性是否会被影响,也有待研究。后期将继续完善实验体系,为组培瓦布贝母市场化提供可能性。

### 参考文献:

[1] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 36.  
[2] 宁荣彬, 孙海峰. 贝母类中药材病害防治研究进展[J]. 东北农业科学, 2018, 43: 34.  
[3] 刘震东, 王曙, 陈心启. 关于瓦布贝母的分类等级研究[J]. 云南植物研究, 2009, 31: 145.  
[4] 周琪, 雷乾姬, 赵军宁, 等. 川产道地药材川贝母(栽培品)鉴别与品质研究[J]. 世界中医药, 2020, 15: 225.  
[5] Su J J, Yoon A R, Kim Y G, et al. In vitro propagation of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. through nodal segment shoot proliferation [J]. In Vitro Cell Dev-Pl, 2019, 55: 702.  
[6] Berkov S, Ivanov I, Georgiev V, et al. Galanthamine biosynthesis in plant *in vitro* systems[J]. Eng Life Sci, 2014, 14: 643.  
[7] Bhattacharyya P, Kumaria S, Tandon P. High frequency regeneration protocol for *Dendrobium nobile*: A model tissue culture approach for propagation of medicinally important orchid species [J]. S Afr J Bot, 2016, 104: 232.  
[8] Zhao Q, Li R, Zhang Y, et al. Transcriptome analysis reveals in vitro-cultured regeneration bulbs as a promising source for targeted *Fritillaria cirrhosa* steroidal alkaloid biosynthesis [J]. 3 Biotech, 2018, 8: 191.  
[9] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Physiol Plant, 1962, 15: 473.  
[10] 张大永, 王曙, 李庆, 等. 栽培川贝母采收年限的研究[J]. 华西药学杂志, 2010, 25: 725.



[11] Ning S A, A L W, A J S, *et al.* Estimating *Fritillaria thunbergii* Miq. yield, quality, and potassium use efficiency in response to potassium application rate [J]. Ind Crops Prod, 2021, 164: 113409.

[12] 王伟, 张大燕, 文欢, 等. 川贝母组织培养的影响因素研究[J]. 中药与临床, 2017, 8: 1.

[13] 邹利娟, 吴庆贵, 杨敬天, 等. 濒危药用植物珙桐的组织培养及保护研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36: 1885.

[14] Wang J, Li J L, Li J, *et al.* Production of active compounds in medicinal plants: from plant tissue culture to biosynthesis [J]. Chinese Herb Med, 2017, 9: 115.

[15] 金青, 蔡永萍, 林毅, 等. NO 对石斛类原球茎内源激素水平及生物碱积累的影响 [J]. 核农学报, 2010, 24: 1291.

[16] Yuan Y J, Li C, Hu Z D, *et al.* Signal transduction pathway for oxidative burst and taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxysporum* [J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 29: 372.

[17] Gupta P, Sharma S, Saxena S. Effect of salts (NaCl and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172: 2894.

[18] 李成容, 李冬连, 李玲蕊, 等. 栽培瓦布贝母中生物碱类成分的研究 [J]. 华西药学杂志, 2019, 34: 463.

引用本文格式:

中 文: 滕俞希, 王晶金, 陈逸菲, 等. 瓦布贝母组织培养及生物碱的测定[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2022, 59: 016002.

英 文: Teng Y X, Wang J J, Chen Y F, *et al.* Tissue culture and alkaloids determination of *Fritillariaunibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2022, 59: 016002.