

悬浮培养瑞香狼毒不定芽过程中黄酮和香豆素类物质的累积

夏美玲, 姜红, 郭雯华, 官旭杰, 由香玲*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

摘要: 本文以瑞香狼毒不定芽为材料, 研究了在250 mL培养瓶悬浮培养过程中, 影响其生长及活性物质(伞形花内酯、东莨菪内酯、总黄酮)积累的四类因子(蔗糖浓度、培养基强度、接种量、接种长度), 初步建立了不定芽的悬浮培养体系。在此基础上, 研究了3 L生物反应器内, 影响不定芽生长及活性物质积累的因素(蔗糖浓度、6-BA浓度、初始接种量)。结果显示, 不定芽在250 mL培养瓶中悬浮培养周期是15 d, 最佳蔗糖浓度、培养基强度、接种量、接种长度分别是 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、MS培养基、1.0 g、3 cm。在此培养条件下, 不定芽中伞形花内酯、东莨菪内酯和黄酮累积量都在15 d达到最大值, 分别为0.351、0.035和2.459 mg。3 L生物反应器内不定芽悬浮培养周期为24 d, 最佳培养条件为蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和初始接种量15 g。此条件下, 伞形花内酯、东莨菪内酯和黄酮累积量分别为6.041、0.763和51.334 mg。本研究建立了瑞香狼毒不定芽的小型生物反应器培养体系, 为进一步大规模培养, 高效生产上述三种活性物质奠定了基础。

关键词: 瑞香狼毒; 悬浮培养; 黄酮; 香豆素

瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme*)为瑞香科狼毒属多年生草本植物, 民间称为红狼毒、断肠草等, 主要分布于河北、内蒙古、黑龙江等地, 是我国传统中药材(武雪等2017)。现代研究表明瑞香狼毒具有多种药用活性物质, 其中黄酮类和二萜原酸酯类、尼地吗啉等具有较强的抗肿瘤作用(冯威健等1995), 注射一定量的尼地吗啉可使患有白血病、肺癌、黑色素瘤和结肠癌的小鼠生命延长(史传奇和王臣2011; 王琳2016)。香豆素类化合物是瑞香科植物的特征性成分, 具有一定毒性和较强生物活性(郑宝江和胡海清2006)。瑞香狼毒中含有的香豆素类化合物为伞形花内酯和东莨菪内酯, 伞形花内酯具有抗菌、降压、抗癌、镇痛及解痉的作用(阚晓溪等2013); 东莨菪内酯具有抗炎、祛痰的作用(舒金富2014)。而瑞香狼毒作为使草原退化、危害人畜的一种毒草, 是草原恢复与重建过程中重点清除的对象。所以如何通过人工方式进行繁殖保留, 成为亟待解决的问题。王琳(2016)研究了瑞香狼毒种子的发芽, 为人工有性繁殖提供了技术支持。于福科等(2005)以茎尖为外植体建立了瑞香狼毒的无性繁殖体系。王文星等(2010)、乔立瑞等(2011)通过细胞培养, 分析了其中活性成分种类及其累积规律, 为大规模生产生物活性物质奠定了基础。

生物反应器技术应用于植物细胞培养既可以

打破环境条件的限制, 又有助于人为调控生产过程, 为大规模培养植物细胞或工厂化生产植物细胞药用代谢产物创造了条件, 是当前植物细胞培养工作的研究热点。相对于细胞培养, 利用不定芽进行组织培养更有效, 且不易产生变异, 可长期培养(黄嘉琦等2013; Cui等2010)。近年来植物组织培养和快繁技术已得到飞速发展。Park等(1989)利用2 L的矩形生物反应器进行了青蒿芽的培养。目前, 中国、日本和韩国均利用生物反应器实现了人参不定根的快速增殖, 且已应用于食品工业化生产以及化妆品生产等商业领域。

本研究的主要目的是利用前期获得的瑞香狼毒不定芽, 研究在250 mL培养瓶和3 L生物反应器悬浮培养过程中, 影响不定芽生长及活性物质(香豆素类物质和黄酮)累积的因素, 初步建立不定芽悬浮培养体系, 为瑞香狼毒进一步扩大无性栽培、规模化液体培养, 量产活性物质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

实验所选用的瑞香狼毒种子采自黑龙江省大

收稿 2018-11-18 修定 2019-04-03

资助 国家自然科学基金(30972390)。

* 通讯作者(youxianglingqu@hotmail.com)。

庆市的杜尔伯特蒙贝子草原,经东北林业大学园林学院王菲副教授鉴定为瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)。由于瑞香狼毒的无性繁殖体系已在前期实验中建立,此次实验材料为经过多次继代培养获得的生长状态良好的瑞香狼毒不定芽。

1.2 实验设计

1.2.1 不定芽在悬浮培养条件下的生物量测定

利用本实验室前期研究获得的瑞香狼毒不定芽分化生长的培养条件[MS (Murashige and Skoog medium)+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+20 g·L⁻¹蔗糖],将无菌不定芽切成约1.0 cm长,接种到含100 mL上述液体培养基的250 mL培养瓶中,进行悬浮培养。每瓶接种不定芽1.0 g,光照培养,室温温度25°C,设定摇床转速110~120 r·min⁻¹。每隔3 d取材3瓶,不定芽取出用自来水冲洗后置于滤纸上吸去水分,置于干燥箱120°C杀青后,60°C烘干48 h,称量。

1.2.2 影响不定芽生长的因素分析

在悬浮培养体系中分别设置不同蔗糖浓度(10~50 g·L⁻¹)、培养基的大量元素强度[1/3MS、1/2MS、MS、WPM (woody plant medium)]、初始接种量(鲜重0.1、0.5、1.0、1.5 g)及接种不定芽的长度(整株3.0 cm及切断1.0、2.0 cm)。上述考察因子均为单因素实验,每个实验处理重复4次,收获后处理同上。利用上述获得的不定芽生长的最佳培养条件,悬浮培养不定芽,每隔3 d随机取样,每次3瓶,取样材料处理同上,获得干重,并分析各取材样品的总黄酮、两种香豆素类物质(伞形花内酯、东莨菪内酯)的含量。

1.2.3 小型生物反应器内不定芽的生长及有效物质的积累

在上述培养瓶悬浮培养的基础上,利用3 L小型生物反应器悬浮培养不定芽。精确称取鲜重15.0 g、长度为2 cm且状态良好的不定芽接种于装有2 L液体培养基(MS+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹蔗糖)的3 L小型生物反应器中,悬浮培养32 d,每隔4 d取材3瓶,取样材料处理同上,称定其生物量(干重和鲜重),绘制不定芽的生长曲线。生物反应器置于室温光照培养,每个实验处理重复4次,收获后处理同上。并分析上述取材样

品的总黄酮、两种香豆素类物质(伞形花内酯、东莨菪内酯)的含量。

1.2.4 不定芽最佳反应器培养体系的建立

调节蔗糖浓度(20、30、40、50 g·L⁻¹)、6-BA浓度(0.3、0.5、1.0 mg·L⁻¹)以及初始接种量(10、15、20 g),将不定芽接种于含有2 L培养液的3 L小型生物反应器中,按上述条件培养一个生长周期收获。上述考察因子均为单因素实验,每个实验处理重复4次,收获后处理同上。对不同蔗糖浓度、激素浓度以及接种量培养的不定芽进行黄酮和两种香豆素物质的测定,最终得到不定芽最佳反应器培养体系。

1.3 生物活性物质分析测定方法

1.3.1 总黄酮的提取与测定

实验样品中的总黄酮采用超声波法进行提取。将烘干的不定芽研磨成粉末状后,精密称取0.4 g样品放入10 mL离心管中,加入5 mL 50%的乙醇溶液,密封好后置于超声波反应器中进行超声提取90 min。同时利用分光光度计法,以芦丁(批号100085-201703,购自中国药品生物制品检定所)为测定总黄酮的标准品,绘制标准曲线(回归方程为 $y=0.3615x-0.002$, $R^2=0.9998$);利用标准曲线分析样品中总黄酮的含量,具体方法参照郭文晶等(2007)、邢朝斌等(2012)文献。

1.3.2 香豆素类物质(东莨菪内酯和伞形花内酯)提取与测定

称取2.0 g烘干不定芽,研磨成粉末,加入10 mL 95%乙醇,80°C加热回流1 h,重复3次。每次取上清液过滤、浓缩,用分析纯甲醇定容至2 mL,摇匀,经过0.45 μm微孔滤膜滤过,滤液作为样品溶液备用。

同时利用HPLC(高效液相色谱)法,以东莨菪内酯(批号111768-200504)、伞形花内酯(批号110768-200504)(均购自中国药品生物制品检定所)为标准品,分别建立东莨菪内酯的回归方程($y=2.92 \times 10^7 x + 1.48 \times 10^4$, $R^2=0.999$)和伞形花内酯的回归方程($y=5.37 \times 10^7 x + 4.86 \times 10^5$, $R^2=0.999$)。利用标准曲线分析样品中香豆素类物质含量,具体方法参照黄嘉琦等(2013)文献。高效液相分析香豆素类两种物质(图1)伞形花内酯、东莨菪内酯的保留时间分别为:26.425 min、26.170 min。

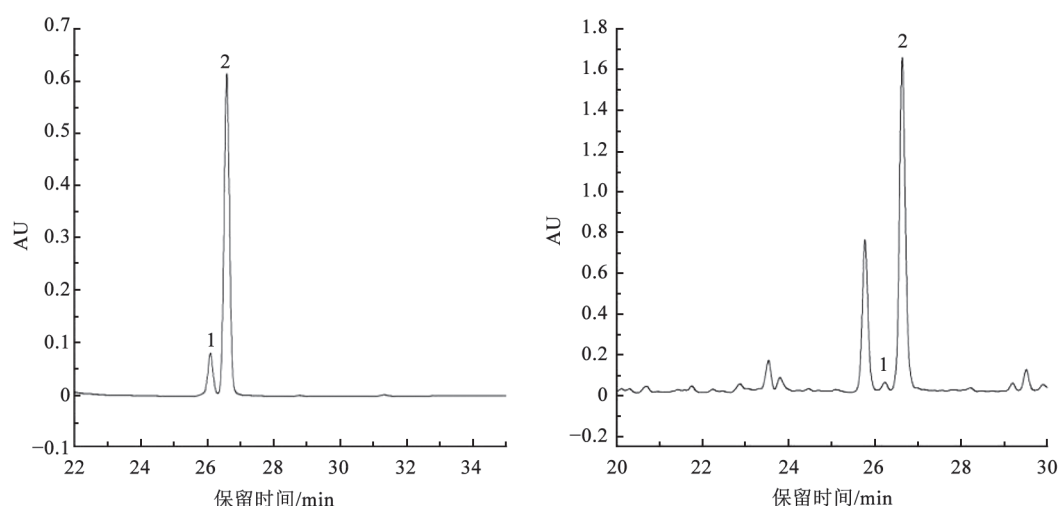


图1 标准品和不定芽中两种香豆素类物质的高效液相图谱

Fig.1 HPLC of two coumarins in standard and adventitious shoots

左图为标准品色谱图, 右图为样品色谱图。1为东莨菪内酯, 2为伞形花内酯。

2 实验结果

2.1 瑞香狼毒不定芽摇瓶悬浮培养体系的建立

2.1.1 不定芽培养瓶悬浮培养条件

1.0 g不定芽接种到250 mL培养瓶悬浮培养过程中, 每隔3 d取材, 烘干称量干重。结果(表1)表明: 在接种9~15 d期间, 不定芽生长速率最快, 活力最强; 在15 d时生长量达到最大, 即为最佳培养时间。在此基础上, 分析影响不定芽生长的因素(蔗糖浓度、培养基强度、接种量、接种长度), 确定最佳生长条件为蔗糖浓度 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、MS液体培养基、接种量1.0 g、不定芽长度3.0 cm (图2)。

2.1.2 悬浮培养过程中不定芽生物量和生物活性物质分析

在最佳培养条件下, 悬浮培养不定芽, 定期取材, 统计不定芽的干重。从表2可以看出, 不定芽生长量在12~15 d达到最大值, 15 d后生物量开始下降, 进入不定芽生长的平稳期。

分析悬浮培养不定芽生长过程中香豆素类物质(伞形花内酯、东莨菪内酯)及黄酮积累规律(表3), 发现它们的累积量都在接种15 d达到最高值, 分别为0.351、0.035和2.459 mg。结合不定芽的生长规律(表2), 悬浮不定芽的生物量在培养15 d时达到最高, 因此, 悬浮培养不定芽获得香豆素类物质和黄酮最佳的培养时间是15 d。

表1 悬浮培养不定芽的生物量

Table 1 Biomass of adventitious shoots in suspension culture

培养时间/d	不定芽干重/g
0	0.107±0.010 ^f
3	0.140±0.011 ^f
6	0.237±0.022 ^e
9	0.610±0.041 ^d
12	0.943±0.110 ^c
15	1.353±0.130 ^b
18	1.350±0.102 ^b
21	1.267±0.005 ^b

采用Duncan多重比较, 同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下表同此。

2.2 3 L生物反应器培养不定芽体系的建立

2.2.1 3 L生物反应器内不定芽的生长规律

在3 L生物反应器中培养不定芽, 接种初期由于不定芽质量较轻, 均悬浮于液体表面(图4-A)。接种0~8 d期间, 不定芽生长较慢。接种8~20 d期间, 不定芽迅速生长(图3), 12 d时观察到不定芽上有很多腋芽萌出, 且整个培养材料几乎处于液面以下(图4-B), 到20 d时, 反应器内的不定芽有1/3的部分伸出液面(图4-C)。24 d不定芽的鲜重和干重达到最大值, 分别为368.55和27.89 g (图3), 是初始接种量的24.6倍和20.7倍。接种28 d时, 不定芽有1/2在液面之上, 且出现明显的黄化及死亡现象(图

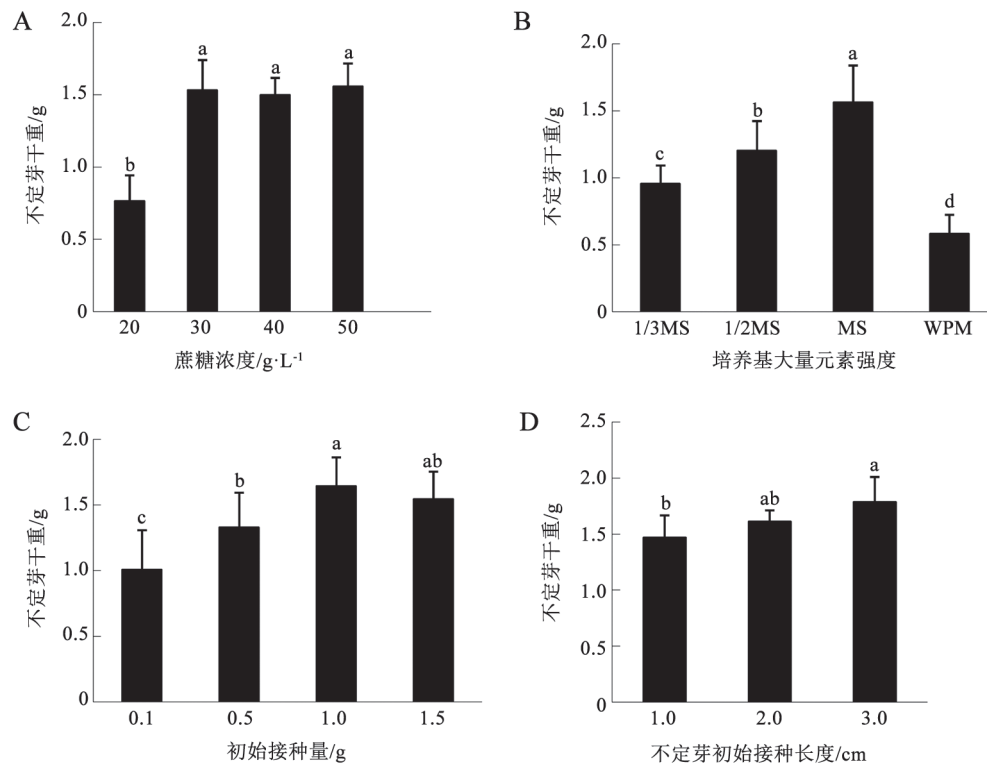


图2 不同影响因素下悬浮培养15 d的不定芽生物量

Fig.2 Biomass of adventitious shoots of suspension culture for 15 days under different influencing factors

A: 蔗糖浓度; B: 培养基强度; C: 初始接种量; D: 初始接种长度。

表2 最佳条件下不定芽的生物量

Table 2 Biomass of adventitious shoots in optimal conditions

培养时间/d	不定芽干重/g
0	0.110±0.010 ^e
3	0.157±0.011 ^e
6	0.363±0.033 ^d
9	0.850±0.034 ^c
12	1.327±0.110 ^b
15	1.587±0.123 ^a
18	1.510±0.144 ^a

4-D和E)。因此, 3 L生物反应器培养的最佳收获周期为24 d。

2.2.2 3 L生物反应器内不定芽中活性物质的累积规律

分析样品中活性物质(黄酮、伞形花内酯、东莨菪内酯)的含量和累积规律(表4), 发现不定芽在生物反应器内培养0~24 d, 三种活性物质的累积量均持续增加, 并于24 d达到最大值: 伞形花内酯

9.021 mg、东莨菪内酯0.542 mg和黄酮49.786 mg。

此后, 伞形花内酯和东莨菪内酯累积量明显下降, 因此从活性物质的累积量角度分析, 不定芽在培养24 d时收获较好。

2.3 影响生物反应器内不定芽生长与活性物质积累的因素分析

2.3.1 蔗糖浓度的影响

分别设置3 L生物反应器内的培养基中的蔗糖浓度为20、30、40、50 g·L⁻¹, 培养不定芽24 d后收获。统计数据(表5)显示30 g·L⁻¹蔗糖更有利于不定芽的生长, 最高生长量为28.704 g; 伞形花内酯、东莨菪内酯、黄酮的累积量都在30 g·L⁻¹蔗糖条件下最高, 分别为5.827、0.752和46.534 mg。因此确定30 mg·L⁻¹蔗糖为培养体系的条件。

2.3.2 6-BA浓度的影响

在上述蔗糖浓度条件下, 研究了不同浓度的6-BA (0.3、0.5、1.0 mg·L⁻¹)对生物反应器内不定芽生长和活性物质积累的影响。培养24 d收获, 不

表3 不定芽悬浮培养过程中香豆素类物质及黄酮的含量与累积量

Table 3 Concentration and accumulation of coumarins and flavonoids in adventitious shoots with suspension culture

培养时间/d	伞形花内酯		东莨菪内酯		黄酮	
	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	累积量/mg	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	累积量/mg	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	累积量/mg
0	0.318 ± 0.002^a	0.035 ± 0.002^e	0.030 ± 0.001^a	0.003 ± 0.001^f	2.313 ± 0.025^a	0.252 ± 0.025^f
3	0.289 ± 0.002^b	0.045 ± 0.002^e	0.029 ± 0.001^a	0.005 ± 0.001^{ef}	1.274 ± 0.021^d	0.205 ± 0.021^f
6	0.247 ± 0.002^c	0.090 ± 0.002^d	0.022 ± 0.001^b	0.008 ± 0.001^e	1.192 ± 0.022^e	0.433 ± 0.022^e
9	0.213 ± 0.002^{de}	0.181 ± 0.002^c	0.016 ± 0.002^c	0.014 ± 0.002^d	1.424 ± 0.023^c	1.205 ± 0.023^d
12	0.218 ± 0.002^{de}	0.289 ± 0.002^b	0.021 ± 0.001^b	0.028 ± 0.001^b	1.522 ± 0.013^b	2.021 ± 0.013^c
15	0.221 ± 0.002^d	0.351 ± 0.002^a	0.022 ± 0.001^b	0.035 ± 0.001^a	1.547 ± 0.017^b	2.459 ± 0.017^a
18	0.196 ± 0.003^e	0.296 ± 0.003^b	0.015 ± 0.002^c	0.023 ± 0.002^c	1.492 ± 0.011^b	2.254 ± 0.011^b

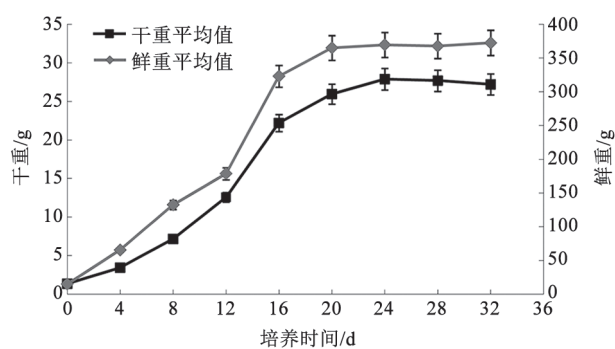


图3 生物反应器培养32 d的不定芽生物量

Fig.3 Biomass of adventitious shoots cultured in bioreactor for 32 days

定芽的活性物质累积统计数据显示, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA更有利于不定芽的生长(表6), 伞形花内酯为 5.927 mg 、东莨菪内酯为 0.783 mg 、黄酮为 50.096 mg 。所以 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA为最优条件。

2.3.3 初始接种量的影响

在 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA条件下, 接种 10、15、20 g不定芽, 培养24 d后收获。由表7可知活性物质的累积量在初始接种量为 15 g时最高, 伞形花内酯含量与累积量分别为 $0.213 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 6.041 mg ; 东莨菪内酯含量与累积量分别为 $0.027 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 0.763 mg ; 黄酮含量与累积量分别为 $1.811 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 51.334 mg 。因此, 确定不定芽最佳初始接种量为 15 g。

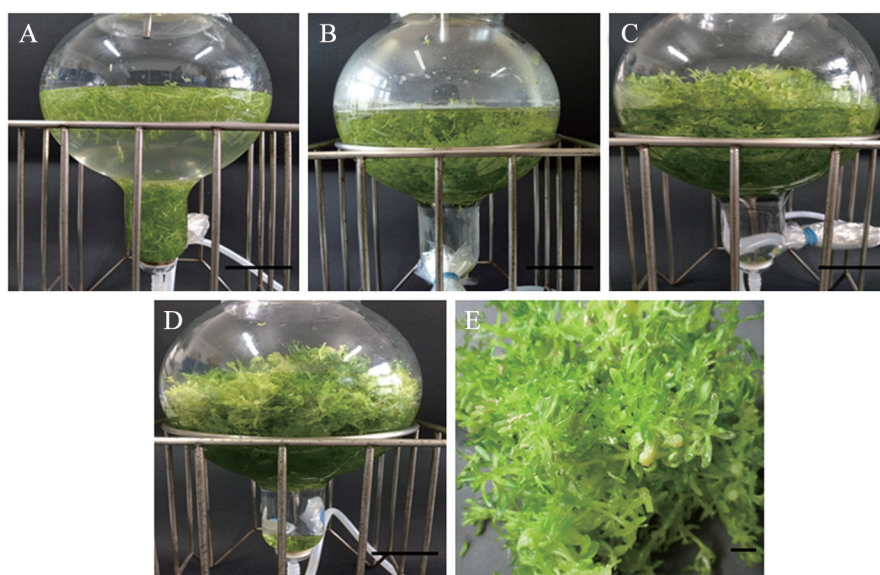


图4 生长在小型生物反应器内的不定芽

Fig.4 Growth of adventitious shoots in a bioreactor

A: 培养4 d; B: 培养12 d; C: 培养20 d; D: 培养28 d; 图A~D比例尺为6 cm; E: 28 d时不定芽扩大图(比例尺为2 cm)。

表4 不定芽生物反应器培养过程中香豆素类物质及黄酮的含量与累积量

Table 4 Concentration and accumulation of coumarins and flavonoids in adventitious shoots with bioreactor culture

培养时间/d	伞形花内酯		东莨菪内酯		黄酮	
	含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg	含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg	含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg
0	0.336±0.002 ^a	0.454±0.002 ^b	0.026±0.001 ^a	0.035±0.001 ^c	2.252±0.017 ^a	3.041±0.017 ^f
4	0.319±0.001 ^b	1.164±0.001 ^{fg}	0.020±0.001 ^b	0.073±0.001 ^c	1.123±0.010 ^f	4.092±0.010 ^f
8	0.250±0.001 ^d	1.770±0.001 ^f	0.021±0.002 ^b	0.149±0.001 ^d	1.161±0.012 ^f	8.203±0.012 ^c
12	0.247±0.002 ^d	3.105±0.002 ^e	0.014±0.001 ^{cd}	0.176±0.001 ^d	1.332±0.008 ^e	15.426±0.008 ^d
16	0.212±0.001 ^e	4.963±0.001 ^{cd}	0.017±0.002 ^c	0.398±0.002 ^b	1.603±0.009 ^d	37.532±0.009 ^c
20	0.213±0.001 ^e	5.527±0.001 ^c	0.020±0.002 ^b	0.519±0.001 ^a	1.752±0.002 ^c	44.682±0.002 ^b
24	0.333±0.002 ^a	9.021±0.002 ^a	0.020±0.001 ^b	0.542±0.001 ^a	1.845±0.009 ^b	49.786±0.009 ^a
28	0.289±0.002 ^c	8.002±0.002 ^b	0.011±0.002 ^d	0.305±0.002 ^c	1.791±0.004 ^c	49.552±0.004 ^a
32	0.147±0.002 ^f	4.206±0.002 ^d	0.010±0.002 ^d	0.286±0.002 ^c	1.723±0.002 ^c	49.315±0.002 ^a

表5 蔗糖浓度对不定芽生长的影响

Table 5 Effect of sucrose concentration on growth of adventitious shoots

蔗糖浓度/g·L ⁻¹	不定芽干重/g	伞形花内酯		东莨菪内酯		黄酮	
		含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg	含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg	含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg
20	18.946±0.162 ^d	0.130±0.001 ^b	2.463±0.001 ^d	0.006±0.002 ^c	0.106±0.002 ^d	1.474±0.033 ^c	27.836±0.033 ^d
30	28.704±0.212 ^a	0.203±0.002 ^a	5.827±0.002 ^a	0.026±0.001 ^a	0.752±0.002 ^a	1.626±0.026 ^b	46.534±0.026 ^a
40	23.985±0.322 ^b	0.197±0.001 ^a	4.725±0.001 ^b	0.027±0.003 ^a	0.669±0.003 ^b	1.711±0.037 ^a	41.016±0.037 ^b
50	21.664±0.145 ^c	0.146±0.001 ^b	3.163±0.001 ^c	0.012±0.006 ^b	0.291±0.006 ^c	1.615±0.028 ^b	38.541±0.028 ^c

表6 6-BA浓度对不定芽生长的影响

Table 6 Effect of 6-BA concentration on growth of adventitious shoots

6-BA浓度/mg·L ⁻¹	不定芽干重/g	伞形花内酯		东莨菪内酯		黄酮	
		含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg	含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg	含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg
0.3	28.668±0.134 ^a	0.166±0.005 ^b	4.759±0.005 ^b	0.012±0.011 ^b	0.702±0.011 ^b	1.651±0.027 ^b	47.472±0.027 ^b
0.5	28.091±0.212 ^a	0.211±0.019 ^a	5.927±0.019 ^a	0.027±0.110 ^a	0.783±0.110 ^a	1.783±0.033 ^a	50.096±0.033 ^a
1.0	22.815±0.154 ^b	0.077±0.011 ^c	1.753±0.011 ^c	0.016±0.013 ^b	0.372±0.013 ^c	1.761±0.056 ^a	40.178±0.056 ^c

表7 初始接种量对不定芽生长的影响

Table 7 Effect of initial quantity of inoculum on growth of adventitious shoots

接种量/g	不定芽干重/g	伞形花内酯		东莨菪内酯		黄酮	
		含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg	含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg	含量/mg·g ⁻¹	累积量/mg
10	20.833±0.134 ^c	0.156±0.011 ^c	3.258±0.011 ^c	0.012±0.001 ^c	0.250±0.001 ^c	1.671±0.028 ^b	34.819±0.028 ^c
15	28.361±0.035 ^a	0.213±0.003 ^a	6.041±0.003 ^a	0.027±0.100 ^a	0.763±0.100 ^a	1.811±0.011 ^a	51.334±0.011 ^a
20	25.157±0.078 ^b	0.170±0.008 ^b	4.275±0.008 ^b	0.021±0.003 ^b	0.523±0.003 ^b	1.503±0.005 ^c	37.804±0.005 ^b

3 讨论

本文主要研究了瑞香狼毒不定芽的悬浮培养体系。首先建立了不定芽的培养瓶悬浮培养体系,发现瑞香狼毒能够在液体环境下生长,且活性物质有一定量的积累,因摇瓶的空间有限,每次仅能装下100 mL培养基,所以生产效率不高。为此考查了3 L小型生物反应器内不定芽的生长、增殖及活性物质累积的影响因素,极大地提高了生长效率,建立了不定芽的生物反应器悬浮体系。

蔗糖在组培体系中既为培养材料提供碳源,又在调节细胞渗透势过程中发挥重要作用。因此蔗糖浓度对细胞、组织的生长、发育起重要作用。其他研究报告显示,在悬浮培养过程中培养材料生长的最佳蔗糖浓度大部分在3%~5%之间。西洋参不定根和铁皮石斛原球茎在3%蔗糖浓度条件下生长最好(王琴2015; 姚睿2014),太子参不定根和人参不定根生长的最佳蔗糖浓度都为4% (由香玲等2011),而东北刺人参不定根在5%蔗糖浓度下增殖最快(姜银姬等2016)。我们在培养瓶和生物反应器培养过程中分别对蔗糖浓度进行了研究,结果显示不定芽的生长增殖和活性物质积累的最佳蔗糖量都是 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (质量浓度为3%)。

初始接种量是影响悬浮培养体系生长效率的重要因素之一。初始接种材料过多,由于培养环境中营养物质的有限性,对植物材料的生长周期产生影响;初始接种量过少,则不能充分利用空间,达不到高效的目的。在黄花蒿悬浮细胞研究中发现,接种量的多少直接影响悬浮细胞生长周期中的延迟期。接种量多时,延迟期短,细胞迅速进入生长对数期;接种量少时,延迟期延长,细胞生长缓慢(李弘剑等1997)。在人参不定根的悬浮培养过程中,接种量为 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 最适宜不定根的生长(朴炫春等2007)。我们在生物反应器培养不定芽过程中对接种量进行了研究,结果显示 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 接种量时,不定芽的生长增殖最快,活性物质的积累最高。

材料中活性物质含量的多少是影响物质累积量的重要因素,一般随悬浮体系的扩大,培养材料中活性物质的含量会降低。在本研究中,培养瓶

培养中伞形花内酯、东莨菪内酯与黄酮含量分别为 0.221 、 0.022 和 $1.547 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;反应器中三种物质的含量分别为 0.333 、 0.020 和 $1.845 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,除东莨菪内酯两者差异不大,反应器中另外两种物质含量均高于培养瓶。主要原因一方面是我们对生物反应器的微环境进行了优化,如调整蔗糖浓度、初始接种量、最优6-BA浓度等;另一方面可能是生物反应器的规模较小。相似的研究也得到同样的结论。Fulzele等(1995)利用钟罩反应器研究青蒿芽的浅层培养生产萜类物质,比较了生物反应器培养与培养瓶培养的生产效率,结果显示在生物反应器中青蒿芽的生长和萜类的合成明显优于培养瓶培养。

本研究建立了小型生物反应器培养瑞香狼毒不定芽的培养体系,为进一步研究扩大培养规模和生产活性物质奠定了基础。

参考文献(References)

- Cui XH, Chakrabary D, Lee EJ, et al (2010). Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresour Technol*, 101: 4708–4716
- Feng WJ, Ikekawa T, Yoshida M (1995). The antitumor activities of gnidimacrin isolated from *Stellera chamaejasme* L. *Chin J Oncol*, 17: 24–26 (in Chinese with English abstract) [冯威健, 池川哲郎, 吉田光二(1995). 瑞香狼毒提取物尼地吗啉的抗癌活性. *中华肿瘤杂志*, 17: 24–26]
- Fulzele DP, Heble MR, Rao PS (1995). Production of terpenoid from *Artemisia annua* L. plantlet cultures in bioreactor. *J Biotechnol*, 40: 139–143
- Guo WJ, Zhang SQ, Wu H, et al (2007). Study on extraction process for total flavonoids in leaves of *Acanthopanax senticosus* harms at ultra high pressure. *Chem Eng*, 35: 66–69 (in Chinese with English abstract) [郭文晶, 张守勤, 吴华等(2007). 超高压提取刺五加叶中总黄酮的研究. *化学工程*, 35: 66–69]
- Huang JQ, Zhao Y, Sun FY, et al (2013). Accumulation of flavonoids and coumarins during adventitious bud growth in *Stellera chamaejasme*. *Chin Trad Herbal Drugs*, 44: 1328–1333 (in Chinese with English abstract) [黄嘉琦, 赵越, 孙凤阳等(2013). 瑞香狼毒不定芽生长过程黄酮类和香豆素类成分累积研究. *中草药*, 44: 1328–1333]
- Jiang YJ, Piao XC, Li H, et al (2016). Effect of several factors on saponin-accumulation in adventitious roots of *Oplopa-*

- nax elatus* cultured with bioreactor culture. J Forest Eng, 1: 68–72 (in Chinese with English abstract) [姜银姬, 朴炫春, 李贺等(2016). 几种因素对生物反应器培养东北刺人参不定根中皂苷积累的影响. 林业工程学报, 1: 68–72]
- Kan XX, Wang ZX, Yang QX, et al (2013). Antitumor effect of alcohol extracts from *Stellera chamaejasme*. Chin J Chin Materia Med, 38: 1219–1225 (in Chinese with English abstract) [阚晓溪, 王志鑫, 杨乾栩等(2013). 瑞香狼毒醇提物的抗肿瘤活性研究. 中国中药杂志, 38: 1219–1225]
- Li HJ, Zhang Y, Guo Y (1997). Effects of inoculated mass on cell growth of *Artemisia annua* L. in suspension culture. J Jinan Univ (Nat Sci Med Ed), 18: 89–92 (in Chinese with English abstract) [李弘剑, 张毅, 郭勇(1997). 生物量对黄花蒿悬浮培养细胞生长的影响. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 18: 89–92]
- Park JM, Hu WS, Staba EJ (1989). Cultivation of *Artemisia annua* L. plantlets in a bioreactor containing a single carbon and a single nitrogen source. Biotechnol Bioeng, 34: 1209–1213
- Piao XC, Lian ML, Wang SM (2007). Mass producing of adventitious roots of *Ginseng* by using bioreactor. For Sci Tech, 32: 54–56 (in Chinese with English abstract) [朴炫春, 廉美兰, 王守明(2007). 利用生物反应器大量生产人参不定根. 林业科技, 32: 54–56]
- Qiao LR, Yang L, Zhang DW, et al (2011). Studies on chemical constituents from callus cultures of *Stellera chamaejasme*. Chin J Chin Materia Med, 36: 3457–3462 (in Chinese with English abstract) [乔立瑞, 杨林, 张德武等(2011). 瑞香狼毒细胞培养物的化学成分研究. 中国中药杂志, 36: 3457–3462]
- Shi CQ, Wang C (2011). Study on the insecticidal activity of *Stellera chamaejasme*. Nat Sci J Harbin Nor Univ, 27: 84–86 (in Chinese with English abstract) [史传奇, 王臣(2011). 瑞香狼毒粗提取物杀虫活性研究. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 27: 84–86]
- Shu JF (2014). Determination of scopoletin, baicalin, baicalin and farrerol in Qinbaohong Zhike Capsule by HPLC. Chin J Mod Appl Pharm, 31: 1114–1117 (in Chinese with English abstract) [舒金富(2014). HPLC测定苓暴红止咳胶囊中东莨菪内酯、黄芩苷、黄芩素和杜鹃素的含量. 中国现代应用药学, 31: 1114–1117]
- Wang L (2016). The seed germination conditions and metabolism analysis of *Stellera chamaejasme* (dissertation). Xi'an: Northwest University (in Chinese with English abstract) [王琳(2016). 瑞香狼毒种子萌发条件及代谢分析(学位论文). 西安: 西北大学]
- Wang Q (2015). Adventitious roots culture in bioreactor of medicinal plants of *Panax quinquefolium* L. and *Pseudostellaria heterophylla* (dissertation). Tianjin: Tianjin University of Science Technology (in Chinese with English abstract) [王琴(2015). 药用植物西洋参和太子参不定根反应器培养研究(学位论文). 天津: 天津科技大学]
- Wang WX, An Q, Wang Y, et al (2010). A study on cell suspension culture and flavonoids accumulation of *Stellera chamaejasme*. Acta Prataculturae Sin, 19: 132–139 (in Chinese with English abstract) [王文星, 安琪, 汪莹等(2010). 瑞香狼毒细胞悬浮培养及黄酮积累的研究. 草业学报, 19: 132–139]
- Wu X, Zhang P, Zhang MT, et al (2017). Simultaneous determination of daphnetin, umbelliferone and scopoletin in *Stellera chamaejasme* L. by HPLC. Chin J Mod Appl Pharm, 34: 1171–1174 (in Chinese with English abstract) [武雪, 张平, 张明童等(2017). HPLC同时测定瑞香狼毒中瑞香素、伞形花内酯和东莨菪内酯的含量. 中国现代应用药学, 34: 1171–1174]
- Xing CB, Long YH, Lao FY, et al (2012). Effect of endophytic fungi on expression amount of key enzyme genes in saponins biosynthesis and *Eleutherococcus senticosus* saponins content. Chin J Chin Materia Med, 37: 2041–2045 (in Chinese with English abstract) [邢朝斌, 龙月红, 劳凤云等(2012). 内生真菌对刺五加皂苷合成关键酶基因表达及皂苷含量的影响. 中国中药杂志, 37: 2041–2045]
- Yao R (2014). Optimizing bioreactor culture system of protocorm-like bodies in *Dendrobium candidum* (dissertation). Yanbian, Jilin: Yanbian University (in Chinese with English abstract) [姚睿(2014). 优化铁皮石斛原球茎生物反应器的培养体系(学位论文). 吉林延边: 延边大学]
- You XL, Tan X, Jia HB, et al (2011). Ginsenosides accumulation in adventitious roots of *Panax ginseng* cultured in small-type bioreactors. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 31: 1700–1705 (in Chinese with English abstract) [由香玲, 谭啸, 贾洪柏等(2011). 小型生物反应器内人参不定根的人参皂苷累积. 西北植物学报, 31: 1700–1705]
- Yu FK, Ma YQ, Li XW (2005). Tissue culture and rapid propagation of *Stellera chamaejasme*. Plant Physiol Commun, 41: 59 (in Chinese with English abstract) [于福科, 马永清, 李秀维(2005). 瑞香狼毒的组织培养及快速繁殖. 植物生理学通讯, 41: 59]
- Zheng BJ, Hu HQ (2006). Variety trends of coumarin in *Stellera chamaejasme* L. in Songnen grassland of Heilongjiang, China. J Nat Sci Heilongjiang Univ, 23: 223–226 (in Chinese with English abstract) [郑宝江, 胡海清(2006). 松嫩草地瑞香狼毒香豆素类化合物含量动态变化. 黑龙江大学自然科学学报, 23: 223–226]

Accumulation of flavonoids and coumarins in the shoots of *Stellera chamaejasme* L. by suspension culture

XIA Mei-Ling, JIANG Hong, GUO Wen-Hua, GUAN Xu-Jie, YOU Xiang-Ling*

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: In this study, during the suspension culture of the shoots of *Stellera chamaejasme* in 250 mL culture flask, four kinds of factors (sucrose concentration, medium strength, quantity and length of inoculum) affecting the growth of shoots and the active substances (umbelliferone, scopoletin, total flavonoids) in them were studied, and the culture-flask suspension culture system of adventitious shoots was established. On this basis, the 3 L bioreactor culture system was established, by analyzing the effects of sucrose concentration, 6-BA concentration, initial inoculum quantity on shoots growth and accumulation of active substances. The results showed that the suspension culture period of adventitious shoots in a 250 mL culture flask was 15 d. The optimal sucrose concentration, medium strength, inoculum quantity and length were $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, MS medium, 1.0 g and 3 cm, respectively. Under the optimal culture conditions, the accumulation of coumarins and flavonoids in adventitious shoots reached the maximum on the 15th day, i.e., umbelliferone 0.351 mg, scopoletin 0.035 mg and flavonoid 2.459 mg, respectively. The suspension culture period of adventitious shoots in the 3 L bioreactor was 24 d. The optimal culture conditions were sucrose $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 6-BA $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and initial quantity of inoculum 15 g. Under these conditions, the cumulative amounts of umbelliferone, scopoletin and flavonoids were 6.041, 0.763 and 51.334 mg, respectively. In this study, a small bioreactor culture system for adventitious shoots of *Stellera chamaejasme* was established, which laid a foundation for further large-scale cultivation and production of the above active substances.

Key words: *Stellera chamaejasme*; suspension culture; flavonoids; coumarins

Received 2018-11-18 Accepted 2019-04-03

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (30972390).

*Corresponding author (youxianglingqu@hotmail.com).