

## 玄参愈伤、不定根和内生菌产哈巴俄苷的比较

张林甦<sup>1,3</sup>, 赵德刚<sup>1,2\*</sup>

- (1. 贵州大学贵州省农业生物工程重点实验室, 贵阳 550025;
2. 贵州大学教育部绿色农药与农业生物工程重点实验室, 贵阳 550025;
3. 黔南民族医学高等专科学校药学系药学教研室, 都匀 558003)

**[摘要]** 目的:诱导玄参愈伤、不定根产生,分离内生菌,并比较其中有效成分哈巴俄苷的含量。方法:玄参嫩叶片消毒切成小块接种于含不同激素水平的 MS, N6 培养基诱导愈伤;不定根诱导采用液体培养:将愈伤小块先转入不含激素 MS 液体培养基,100 r·min<sup>-1</sup>室温震荡培养,待开始出现不定根后转入含 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 的 MS 液体培养基继续震荡培养,内生菌分离采用常规方法。哈巴俄苷含量测定采用紫外分光光度法,测定波长 255 nm。结果:MS 培养基 + NAA 0.05, 0.2, 2 mg·L<sup>-1</sup> + 6-BA 2 mg·L<sup>-1</sup> 均能诱导出质地较疏松、生长较快的愈伤组织;接种 1.5 g 愈伤 30 d 左右可得到 100 mL 满瓶不定根;从玄参鲜块根分离出 4 株可产哈巴俄苷的内生菌。玄参愈伤组织、不定根及四株内生菌发酵液的哈巴俄苷含量依次分别为:0.411, 0.099 5, 0.451, 0.444, 0.489, 0.440 g·L<sup>-1</sup>。结论:玄参愈伤组织中哈巴俄苷含量是不定根的 4 倍,内生菌发酵液哈巴俄苷含量可达到与愈伤相当水平,具有开发应用的潜力。同时为研究玄参与内生菌相互作用打下基础。

**[关键词]** 玄参;愈伤;不定根;内生菌;哈巴俄苷

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0136-04

## Comparison of Hapagoside Yield of Callus, Adventitious Root and Endophytes in *Scrophulariae Radix*

ZHANG Lin-su<sup>1,3</sup>, ZHAO De-gang<sup>1,2\*</sup>

- (1. Guizhou Key Lab of Agri-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China;
2. Ministry of Education Key Lab of Green Pesticide and Agri-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China;
3. Qiannan Medical Colloge for Nationalities, Dujun 558003, China

**[Abstract]** **Objective:** Inducing callus and adventitious root from *Scrophulariae Radix*; isolating endophytes; and comparing Hapagoside yield of the different parts of *Scrophulariae Radix*. **Method:** Tender leafs of *Scrophulariae Radix* were cut into small pieces and sterilized to inoculate on MS, N6 mediums with different plant hormones to induce callus; Liquid medium were used in adventitious root inducing and medium transformed according to growing phase during the culture process; general method was used in endophytes isolated. Hapagoside detected with UV spectrophotometry at the wave length 255 nm. **Result:** Moderate density callus were induced with MS + NAA 0.05 or 0.2 or 2 mg·L<sup>-1</sup> + 6-BA 2 mg·L<sup>-1</sup> medium; mass adventitious roots obtained after 30 d' s vibrate cultivation; 4 strains of endophytes produce hapagoside were isolated from *Radix Scrophulariae* root; hapagoside content of callus, adventitious root and fermentation liquor of the four endophyte strains in orderly are 0.411, 0.099 5, 0.451, 0.444, 0.489, 0.440 g·L<sup>-1</sup>. **Conclusion:** Content of hapagoside in callus is 4 times than that of adventitious root; endophytes can yield almost the same amount hapagoside as callus, and have great potential in producing secondary metabolites.

**[Key words]** *Scrophulariae Radix*; callus; adventitious root; endophyte; hapagoside

**[收稿日期]** 20120409(002)

**[第一作者]** 张林甦,在读博士,讲师,从事药用植物次生代谢研究,Tel:010-57833367,E-mail:linsuzhang 009@ yahoo. com. cn

**[通讯作者]** \* 赵德刚,博士,教授,从事植物次生物质代谢与基因表达调控研究,Tel:0851-3805048, E-mail: dgzhao@ yahoo. com

玄参科植物玄参 *Scrophulariae Radix*, 始载于《神龙本草经》, 又名黑参、元参、浙玄参、乌元参等, 药用其根, 因道地产于浙江、断面黑色而得名。因市场需求逐年增加, 现在我国浙江、四川、江苏、安徽、湖北、贵州及东北各省多地均有种植。玄参具有清热凉血, 滋阴降火, 解毒散结的作用, 用于热入营血, 温毒发斑, 热病伤阴, 舌绛烦渴, 津伤便秘, 骨蒸劳嗽, 目赤, 咽痛, 白喉, 瘰疬, 痈肿疮毒等病症。现代药理研究表明, 玄参还具有增强免疫、抗疲劳、降血糖、保肝、抗肿瘤、抗菌<sup>[1]</sup>、抗氧化等作用<sup>[2-3]</sup>。在心血管病方面, 还具有降压、扩张冠状动脉、抗血小板凝集、参与心室重构<sup>[4]</sup>等多种作用。其主要活性成分为环烯醚萜苷、苯丙素、肉桂酸、多酚等<sup>[3]</sup>。

环烯醚萜苷属特殊的单萜, 是玄参属植物具有多种药理作用的次生代谢物<sup>[5]</sup>。次生代谢是相对于初生代谢而言, 指利用初生代谢的中间产物作为起始物(底物)的代谢。一般认为次生代谢跟植物的生长、繁育等基本生活过程没有直接关系, 而与植物的防御、应激等有更紧密的联系, 反映着植物跟周围环境及生物的相互适应、协调<sup>[6]</sup>。植物次生代谢产物是药物的宝库, 我国具有悠久的植物药使用历史, 而这些药物的有效成分主要为植物次生代谢产物, 如黄酮、萜类及生物碱等。西药中大约有 25% 直接或间接来源于从植物中提取的次生代谢物<sup>[7]</sup>。因此提高药用植物次生代谢的产量一直是研究热点。

植物内生菌 (*Plant endophyte*) 是指在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官的细胞间隙或细胞内, 不引起植物组织明显症状改变的微生物, 这些微生物包括细菌、真菌、放线菌等<sup>[4]</sup>。自从 1993 年 Strobel 首次从短叶紫杉中分离到一株产紫杉醇的内生菌<sup>[8]</sup>, 科学家们开始了从植物中寻找相关的内生菌的热潮。已分离到包括产长春碱、长春新碱、鬼臼素等抗癌成分、抑菌作用的内生菌等<sup>[9]</sup>。植物在长期的演进过程中, 不断与外界环境相互作用, 交换物质、能量和信息。植物内生菌是植物微生态的重要组成部分, 对植物的进化、次生代谢等产生影响<sup>[10]</sup>。

本文通过诱导(分离)并测定玄参愈伤组织、不定根及内生菌发酵液中哈巴俄苷的含量, 对研究玄参哈巴俄苷的产生、内生菌与玄参的相互作用以及寻找高产哈巴俄苷菌株打下基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 试剂与仪器** 玄参块根及种子, 由贵州省遵义市道真县科技局吕俊明主管药师惠赠。玄参苗由作

者在实验室温室栽培获得。试剂: MS, N6 培养基粉购自 Sigma 公司, 植物激素 NAA, 6-BA, 2, 4-D, IAA, KT, TDZ 为 Solarbio 公司产品, 牛肉膏、胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂购自 Oxoid 公司哈巴俄苷对照品购自上海同田生化公司, 其余均为国产分析纯试剂。

LB 细菌培养基, PDA 真菌培养基, 查氏放线菌培养基。

电子天平(赛多利斯), 灭菌锅(YAMATO), 超净台(上海上净净化), 超声仪(MSE), 紫外分光光度计(Bechman), 全温震荡培养箱(上海精宏), 电热恒温培养箱(天津泰斯特)。

**1.2 玄参愈伤的诱导** 参照文献[11]方法, 取较嫩的玄参叶片, 75% 乙醇洗 30 s, 用 0.1% 的升汞消毒 5 min, 无菌水漂洗 3~5 次后吸干水分, 切成 1 cm<sup>2</sup> 左右的小片, 接种在培养基中, 置 25 ℃ 16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养。愈伤组织长出后每 15 d 转接 1 次。

**1.3 玄参不定根的诱导** 将愈伤组织转移至液体培养基中, 室温, 100 r·min<sup>-1</sup>, 震荡培养。5~7 d 左右愈伤颗粒上开始长出不定根。以后每 10 d 更换培养液, 30 d 左右培养瓶中得到大量不定根。

**1.4 玄参内生菌的分离** 取鲜玄参块根洗掉泥土等杂质, 用流水冲洗 30 min, 吸干水分, 75% 乙醇洗 1 min, 0.1% 升汞消毒 30 min, 用无菌刀片将外皮去掉, 切成 1 cm<sup>3</sup> 左右的小块, 分别培养在 LB、PDA、查氏培养上分离内生菌。细菌、放线菌在 37 ℃ 倒置培养, 真菌在 28 ℃ 倒置培养。同样的条件做空白对照(消毒后不去外皮的玄参小块)。分离出内生菌后用相对应固体培养基进行纯化: 细菌和放线菌用划线方法得到单菌落, 真菌则从一根菌丝上挑取一点, 然后接种于相应液体培养基, 180~200 r·min<sup>-1</sup>。震荡培养(培养温度同上), 菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.5 时将菌液 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min, 取上清过 0.22 μm 滤膜后测定哈巴俄苷含量。

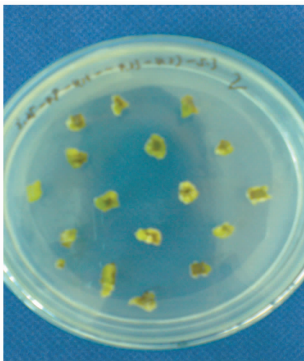
**1.5 哈巴俄苷标准曲线的制作** 精密称取哈巴俄苷 2 mg, 溶于 2 mL 30% 甲醇, 倍比稀释出 5 个质量浓度梯度: 0.500, 0.250, 0.125, 0.062 5, 0.013 2 g·L<sup>-1</sup>。取一管标准溶液, 从 190~300 nm 做吸光度扫描, 255 nm 处有最稳定最大吸收波长, 定为测定波长。标准曲线回归方程:  $A = 4.542 2C + 0.459 9$  ( $r = 0.925 7$ ), 在 0.03~0.5 g·L<sup>-1</sup> 有较好的线性相关性。

**1.6 哈巴俄苷含量测定** 参照文献[12]中处理方法: 精密称取已捣碎待测样品(愈伤组织或不定根)

1.0 g 于具塞三角瓶中,加入 30% 甲醇 25 mL,称重,室温浸泡 1 h 后超声提取 30 min,放冷,补足失重,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取滤液在 255 nm 测哈巴俄苷含量。

## 2 结果与分析

**2.1 玄参愈伤的诱导** 以上 15 种培养基几乎都能诱导愈伤产生,但是产生愈伤的时间和质地有差别:5,7 号培养基出愈慢,要 18 d 左右,而且愈伤生长慢,说明 N6 培养基诱导愈伤不如 MS 培养基;1,2,13 号培养基 15 d 左右产生愈伤,愈伤密度适中,生长较快(图 1),说明愈伤适宜生长的条件是 6-BA 2 mg·L<sup>-1</sup>,而 NAA 从 0.05 ~ 2 mg·L<sup>-1</sup> 均可;6.1,8.1 号培养基因含有较高的 6-BA(3 ~ 4 mg·L<sup>-1</sup>) 和较强效的细胞分裂素(KT/TDZ)愈伤生长快,而且致密,颜色深暗绿。见表 1。



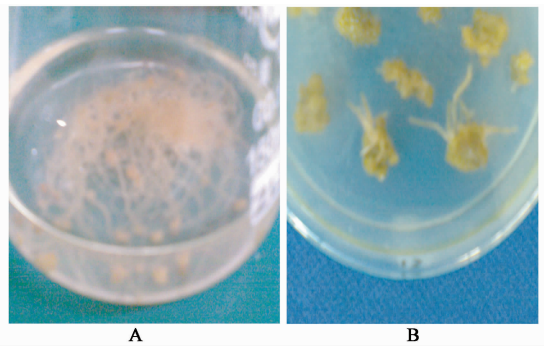
2 号培养基上长出的愈伤  
图 1 玄参愈伤

表 1 不同培养基诱导玄参愈伤

No.	培养基及激素配比/mg·L <sup>-1</sup>
1	MS + NAA 0.2 + 6-BA 2
2	MS + NAA 2 + 6-BA 2
3	MS + 2,4-D 2 + KT 0.2
4	MS + NAA 0.2 + 6-BA 2 + KT 1
5	N6 + NAA 0.2 + 6-BA 2
6	MS + NAA 2 + 6-BA 3 + KT 1
6.1	MS + NAA 2 + 6-BA 3 + KT 4
7	N6 + NAA 2 + 6-BA 4
8	MS + NAA 0.2 + 6-BA 4
8.1	MS + NAA 0.2 + 6-BA 4 + TDZ 4
9	MS + NAA 0.2 + 6-BA 3 + TDZ 0.02
10	MS + NAA 0.2 + 6-BA 3 + TDZ 0.1
11	MS + IAA 0.2 + 6-BA 3 + TDZ 0.2
12	MS + IAA 0.2 + 6-BA 6 + TDZ 0.2
13	MS + NAA 0.05 + 6-BA 2

**2.2 不定根的诱导** 不定根的诱导,以 2 号培养基

产生的愈伤做起始物接种于不含激素的 MS 液体培养基,经 5 ~ 7 d,产生不定根,将此长出不定根的愈伤转入 13 号液体培养基,不定根快速生长,30 d 可得到长满瓶的不定根,见图 2a。同样的操作,将液体培养基更换为固体培养基,也能产生不定根,但是不定根的生长速度和产量远不及在液体条件下培养。见图 2b。若将 2 号培养基产生的愈伤直接转入 13 号培养基则不会产生不定根。可能 6-BA 在启动从愈伤向根分化阶段具有抑制作用,但一旦不定根开始形成,它又发挥促进细胞分裂的作用,使不定根快速生长。



A. 液体培养; B. 固体培养

图 2 不定根生长情况(MS + NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup> + 6-BA 2 mg·L<sup>-1</sup>)

**2.3 内生菌的分离** 分离得到 43 株内生菌,经紫外法测定发酵液,得到 4 株可产生哈巴俄苷内生菌,经形态学初步鉴定:内生菌 1 ~ 3 为细菌,内生菌 4 为真菌。

**2.4 愈伤组织、不定根及内生菌发酵液哈巴俄苷含量** 可以看出:不定根的哈巴俄苷含量最低,内生菌发酵液哈巴俄苷产量可达到愈伤水平,内生菌具有开发利用的潜力。见表 2。

表 2 玄参愈伤组织、不定根、内生菌发酵液哈巴俄苷含量比较

名称	哈巴俄苷含量 /g·L <sup>-1</sup>	名称	哈巴俄苷含量 /g·L <sup>-1</sup>
愈伤	0.411	不定根	0.099 5
内生菌 1	0.451	内生菌 2	0.444
内生菌 3	0.489	内生菌 4	0.440

## 3 结论及讨论

本文以玄参为材料,诱导出愈伤和不定根,并从玄参中分离到 4 种产哈巴俄苷的内生菌,对其主要药用成分哈巴俄苷含量做了对比。愈伤组织哈巴俄苷含量是不定根含量的 4 倍多,由此推测在此实验中哈巴俄苷主要是在愈伤中合成,而根可能是作为次生代谢产物贮存的一个器官。内生菌发酵液的哈巴俄苷含量与愈伤相当,可以作为产有用次生代谢

产物的候选菌。其生产条件方便,易于控制和自动化,而且内生菌的产物相当丰富,可以作为寻找新药的一个资源库<sup>[13]</sup>。

本实验也许未能分离到全部的内生菌。内生菌的分离与培养条件、表面消毒密切相关。如果要分离到尽可能多的内生菌,需找出表面消毒的临界剂量,另外培养条件还需细化(如培养温度),最好能使使内生菌分批长出,这样易于菌的分离纯化<sup>[14]</sup>。另内生菌的形态学鉴定是较初步的鉴定,更明确的鉴定有待下一步用分子生物学方法鉴定(如16S)、归类。

内生菌的起源、与宿主植物的关系、在植物体内生命活动的分子调控、次生代谢产物的合成机制等的研究日益成为生物科学研究的热点<sup>[15]</sup>。内共生学说认为,内生菌在与植物协同进化的过程中,不但自身能够产生特殊的物质,还能诱导宿主植物产生某些代谢物(次生代谢物)<sup>[16]</sup>。为什么植物会产生不同的次生代谢物?除了外在的环境因素,内因可能与内生菌有关。内生菌与植物的相互作用的形式之一是在植物细胞表面形成生物薄膜<sup>[17]</sup>。要弄清楚植物代谢产物的合成部位、机制还需要从相关重要基因的表达及产物运输、转录因子调控<sup>[18]</sup>、运用植物免疫组化、显微等技术手段进行深入研究<sup>[19]</sup>。

#### [参考文献]

- [1] 张洪利,刘瑶,成金乐,等. 玄参破壁粉粒体内抗菌实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):178.
- [2] 谢小艳,夏春森. 中药玄参的化学成分及药理研究进展[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(5):121.
- [3] 俞静静,陈素红,吕圭源. 玄参“凉血滋阴”药效相关研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9):63.
- [4] Gu W L, Chen C X, Wu Q, et al. Effects of Chinese herb medicine *Radix Scrophulariae* on ventricular remodeling[J]. *Pharmazie*, 2010, 65(10):770.
- [5] 华静,戚进,余伯阳. 玄参属植物中的环烯醚萜类化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):233.

- [6] 张康健,董娟娥. 药用植物次生代谢[M]. 西安:西北大学出版社, 2001:2.
- [7] 赵淑娟,刘涤,胡之璧. 植物次生代谢基因工程[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7):52.
- [8] Strobel G, Stierle A, Stierle D. *Taxomyces andreana* A proposed new taxon for a bulbiferous by phomycete associated with pacific yew (*taxus brevifolia*) [J]. *Mycotaxon*, 1993, 40(7):71.
- [9] 周凤,张弘弛,刘瑞. 恒山黄芪内生真菌 *Aspergillus* sp. 代谢产物的分离和生物活性的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4):125.
- [10] 胡桂萍,郑雪芳,尤民生. 植物内生菌的研究进展[J]. 福建农业学报, 2010, 25(2):226.
- [11] 王泽均. 玄参组织培养植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1983, 19(6):42.
- [12] 刘承伟,毕志明,祝艳斐. 玄参中4种主要活性成分的HPLC定量分析[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(21):1614.
- [13] 江曙,陈代杰,陶金华,等. 植物内生菌及其代谢产物的药学研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(6):424.
- [14] 马养民,徐小娜,张弘弛. 无花果内生真菌分离鉴定及其活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):86.
- [15] 黎万奎,胡之璧. 内生菌与天然药物[J]. 中国天然药物杂志, 2005, 3(4):193.
- [16] 余伯阳. 中药生物技术[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2005:169.
- [17] 易婷,缪煜轩,冯永君. 内生菌与植物的相互作用:促生与生物薄膜的形成[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11):1774.
- [18] Nathan De Geyter, Azra Gholami, Sofie Goormachtig, et al. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism [J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 3:27.
- [19] Li J, Kristiansen K A, Hansen B G, et al. Cellular and subcellular localization of flavin-monoxygenases involved in glucosinolate biosynthesis [J]. *J Expe Bot*, 2011, 62(3):1337.

[责任编辑 邹晓翠]