



赵洋,李俊杰,苏喆莹,等.白花桔梗不定根固体培养条件的优化研究[J].黑龙江农业科学,2021(11):69-73.

# 白花桔梗不定根固体培养条件的优化研究

赵 洋,李俊杰,苏喆莹,姜 雯,严一字,吴松权

(延边大学 农学院,吉林 延吉 133002)

**摘要:**为进一步提高白花桔梗的产量,本研究优化了白花桔梗不定根固体培养的条件,包括培养基类型、盐强度、激素浓度和不同生长期有效成分含量。结果表明:白花桔梗不定根培养基的最优条件为 1/2 盐浓度 B<sub>5</sub> 培养基添加 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 吲哚-3-丁酸(IBA),培养 35 d 时有效成分含量最高,且皂苷类化合物含量显著高于总黄酮量 and 多糖量。

**关键词:**桔梗不定根;固体培养基;外源激素;有效成分

桔梗为桔梗科植物桔梗(*Platycodon grandiflorus*)的干燥根,始载于《神农本草经》,性平,味苦、辛,归肺经,富含皂苷、类黄酮和多糖等化合物<sup>[1]</sup>。桔梗种质资源以花冠颜色为紫色的植株为主。但紫花株中,有少量白花,白花桔梗为桔梗种植资源带来了新的花色,具有较大的开发潜力<sup>[1-3]</sup>。桔梗具有宣肺、利咽、祛痰、排脓的功效,

临床上多用于治疗咳嗽痰多,胸闷不畅,咽痛音哑,肺痈吐脓等症。桔梗分布广泛,在我国南北方都适宜生长,但其野生资源匮乏,主要依赖于人工栽培<sup>[4]</sup>。不过在栽培过程中常发生病虫害,培养周期长(一般 2~3 年),难以保持遗传稳定性等问题,严重影响了桔梗的品质<sup>[5]</sup>。

不定根培养具有生长周期短、材料来源单一、遗传背景一致、经济方便、重复性强、效率高等优点。不定根培养应用于药用植物,可以快速大量获得药用植物不定根及次生代谢产物,是开发中药资源的一条新途径<sup>[6]</sup>。目前,人参不定根的研究较为系统且非常具有代表性,已达到了规模化

收稿日期:2021-08-18

基金项目:吉林省科研重点项目(20160204)。

第一作者:赵洋(1996—),女,在读硕士,从事特种植物资源与生物技术研究。E-mail:462479028@qq.com。

通信作者:吴松权(1972—),男,博士,副教授,从事特种植物资源与生物技术研究。E-mail:arswsq@ybu.edu.cn。

## Determination of Calycosin 7-O-β-D-Glucopyranoside in Mongolian Milkvetch Root by UPLC-MS

LI Xiao-jie, WEI Peng, MU Ying-tong, WANG Jun-jie

(School of Grassland and Resources and Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** In order to promote the rapid determination of the quality of mongolian milkvetch root the contents of calycosin 7-O-β-D-glucopyranoside in transplanted mongolian milkvetch root from different habitats were determined by Ultra High-Performance Liquid Chromatography tandem triple quadrupole Mass Spectrometry (UPLC-MS). The target product was extracted by methanol method with the aid of ultrasound, and Thenmo-C18 (Hypersil Goldao, 100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) was detected by HPLC. Under the MRM mode, 447/142.98 m/z and 447/284.64 m/z were used as the qualitative ion pairs and 447/142.98 m/z as the quantitative ion pairs, quantitative analysis by external standard method. The results showed that there was a good linear relationship in the concentration range of 0.018 75-0.600 00 μg·mL<sup>-1</sup> (r=0.992), the average recovery was 96.6%, RSD was 2.701%. The results showed that the content of Tongliao Naiman Banner was 0.031%, Linxi County, Inner Mongolia was 0.033% and Hohhot was 0.065%, respectively, the Hohhot was significantly higher than in Tongliao and Chifeng. The method established in this research is simple, sensitive, rapid and reliable. It is suitable for the determination of calycosin 7-O-β-D-glucopyranoside in mongolian milkvetch root.

**Keywords:** Mongolian milkvetch root; HPLC-MS; multi-response monitoring; calycosin 7-O-β-D-glucopyranoside

生产<sup>[7-8]</sup>。Wu 等<sup>[9]</sup>成功诱导出黄芪不定根,并通过鼓泡式生物反应器进行不定根的大规模培养,发现培养的不定根多糖含量高于栽培黄芪。Wang 等<sup>[10]</sup>成功诱导出太子参不定根,并发现太子参不定根的有效成分含量高于大田栽培的根。固体培养是通过添加凝固剂使配制好的营养液形成固体状态供植物生长,是不定根培养的第一步<sup>[11]</sup>。本研究以白花桔梗为试验材料,建立不定根固体培养的基本条件,包括培养基类型、强度、IBA 浓度等,比较不同生长阶段总皂苷、总黄酮、多糖化合物的含量,旨在快速稳定地提高白花桔梗的产量。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2020 年 7 月在延边大学农学院中草药圃地采摘白花桔梗种子,将供试材料先用 75% 酒精浸泡,用无菌水冲洗 2~3 次,再用 0.1% 升汞消毒 5 min,无菌水冲洗 5 次,用消毒滤纸吸干表皮水分,接种于 MS 固体培养基上,置于 25℃、光照条件下进行无菌苗的培养。

1.2 方法

1.2.1 培养基种类 将桔梗无菌苗的根切成约 1.0 cm 的小段,分别接种到 MS、B<sub>5</sub>、White、N<sub>6</sub> 培养基中,每种培养基接种 3 板,每板接种 9 个,以便后期观察培养,每种培养基中均加入 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA,30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖,2.3 g·L<sup>-1</sup> 琼脂,pH 调节为 5.8。

1.2.2 培养基盐强度 依据培养基种类筛选结果将桔梗不定根接种到 1/4、1/2、3/4、1、2 盐浓度的 B<sub>5</sub> 培养基中,只改变原配方组分,其余成分与 1.2.1 相同。

1.2.3 IBA 浓度 依据培养基种类筛选结果,在 1/2 B<sub>5</sub> 培养基上,添加浓度为 0,0.1,0.3,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 和 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 的外源激素

IBA,其余成分为 30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖,2.3 g·L<sup>-1</sup> 琼脂,pH 调节为 5.8。

1.2.4 培养时期 于 20,25,30,35 和 40 d 取样品称量鲜重后放入 55℃ 的恒温干燥箱中,烘干 48 h 后,充分研磨用于后续测定有效成分含量。

1.2.5 有效成分提取和含量测定 总黄酮和多糖的提取和测定参照孙晓春等<sup>[12]</sup>的方法,并稍做改动。桔梗总黄酮的测定采用硝酸铝比色法,用紫外分光光度计于 510 nm 处测定吸光度,建立标准曲线,计算样品的总黄酮量。多糖含量的测定采用苯酚-硫酸显色法,于 490 nm 处测定吸光度,以标准浓度的葡萄糖为横坐标,吸光度为纵坐标,建立标准曲线并计算样品多糖的含量。总皂苷的提取和测定参照李心怡等<sup>[13]</sup>的方法,利用紫外分光光度计,在波长 536 nm 处测定吸光度,制备对照品,建立标准曲线计算桔梗总皂苷含量。

1.2.6 培养条件 培养温度为(25±2)℃,相对湿度 70%,暗培养。30 d 后观察并统计不定根根长、生根外植体数、生根总数并计算生根率。每组试验重复 3 次。

生根率(%) = 生根外植体数/接种外植体数×100

1.2.7 数据分析 利用 Excel 2013 软件整理数据,采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 培养基类型对白花桔梗不定根培养的影响 将不定根接种于培养基中培养,发现培养 10 d 时,接入的不定根组织开始有些膨大,并在不定根的部分部位形成凸起,约 15 d 时凸起部位形成薄而柔软的不定根。但在不同的培养基中,不定根生长能力不同,由表 1 可知,白花桔梗不定根在 B<sub>5</sub> 培养基中生根外植体数、生根率以及总根数表现出最高,与其他 3 种培养基相比差异显著。

表 1 不同培养基对白花桔梗不定根生长的影响

不同培养基	生根外植体数/个	生根率/%	总根数/个	根干重/g
White	7.00±0 bc	78.00±0 bc	72.00±8.08 b	0.045±0.009 b
B <sub>5</sub>	9.00±0 a	100.00±0 a	134.33±20.00 a	0.076±0.013 ab
MS	8.30±0.33 ab	92.67±0.04 ab	76.33±21.99 b	0.089±0.012 a
N <sub>6</sub>	5.70±0.88 c	63.00±0.10 c	30.00±5.51 b	0.008±0.004 c

注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

2.2 培养基盐强度对白花桔梗不定根的影响

由表 2 可知,在 1/2 盐浓度 B<sub>5</sub> 中,B<sub>5</sub> 生根率达到 100.00%,但 1/2 盐浓度 B<sub>5</sub> 的干重和总根数显著优于其他强度,并且 1/2 盐浓度 B<sub>5</sub> 培养基诱导的不定根长而密,几乎覆盖了整个培养基。因此,1/2 盐浓度 B<sub>5</sub> 培养基最有利于桔梗不定根的生长。

2.3 IBA 浓度对白花桔梗不定根培养的影响

由表 3 可知,与对照(不添加激素)相比,添加 IBA 有利于不定根的增殖分化,但不同浓度的 IBA 对不定根的诱导能力不同。在 IBA 浓度为 0.1,0.3,1.0 和 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,不定根的生根率均为 100.00%,不过 IBA 浓度为 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 时,

总根数和根干重都明显优于其他浓度,表现为不定根较粗且生长旺盛,因此诱导桔梗不定根的最佳 IBA 浓度为 0.3 mg·L<sup>-1</sup>。

2.4 培养时间对白花桔梗不定根干重和有效成分含量的影响

由表 4 可知,随着培养天数的增加,不定根的干重呈现逐渐上升的趋势,培养至 40 d 时最高。总皂苷和总黄酮的含量随着培养天数的增加,呈先上升后下降趋势,培养 35 d 时,总皂苷和总黄酮都达到最高值,分别为 34.08 和 9.01 mg·g<sup>-1</sup>;多糖含量随着培养天数的增加,呈现逐渐上升的趋势,培养至 40 d 时最高。综上所述,不定根干重和有效成分积累的最佳周期为 35 d。

表 2 培养基盐强度对白花桔梗不定根生长的影响

盐强度	生根外植体数/个	生根率/%	总根数/个	根干重/g
2 B <sub>5</sub>	8.70±0 a	96.30±0.04 a	99.67±15.88 b	0.022±0.001 b
B <sub>5</sub>	9.00±0 a	100.00±0 a	116.33±8.37 ab	0.027±0.001 b
3/4 B <sub>5</sub>	6.30±0.33 b	70.37±0.04 b	52.33±12.00 c	0.011±0.001 c
1/2 B <sub>5</sub>	9.00±0 a	100.00±0 a	145.67±7.31 a	0.033±0.002 a
1/4 B <sub>5</sub>	8.30±0.33 a	92.59±0.04 a	60.33±8.25 c	0.010±0.001 c

表 3 不同激素对白花桔梗不定根生长的影响

IBA 浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	生根外植体数/个	生根率/%	总根数/个	根干重/g
0(CK)	7.00±1.15 b	77.78±0.13 b	14.33±5.90 e	0.006±0.002 c
0.1	9.00±0 a	100.00±0 a	171.0.0±6.24 ab	0.032±0.002 ab
0.3	9.00±0 a	100.00±0 a	206.00±19.86 a	0.045±0.003 a
0.5	8.70±0.33 a	96.30±0.04 a	151.67±16.02 abc	0.038±0.006 ab
1.0	9.00±0 a	100.00±0 a	121.00±11.02 bcd	0.043±0.003 a
2.0	8.70±0.33 a	96.30±0.04 a	95.67±25.10 cd	0.037±0.007 ab
3.0	8.00±0.58 ab	88.89±0.06 ab	132.67±46.38 bcd	0.032±0.008 ab
4.0	7.70±0.33 ab	85.19±0.04 ab	93.67±27.49 cd	0.025±0.005 b
5.0	9.00±0 a	100.00±0 a	73.00±6.66 de	0.025±0.004 b

表 4 培养时间对白花桔梗不定根干重和有效成分含量的影响

培养天数/d	总皂苷/(mg·g <sup>-1</sup> )	总黄酮/(mg·g <sup>-1</sup> )	多糖/(mg·g <sup>-1</sup> )	根干重/g
20	32.15±0.05 b	8.04±1.16 bc	1.166±0.003 c	0.45±0.03 c
25	33.11±0.84 ab	8.11±1.16 ab	1.169±0.008 c	0.50±0.01 c
30	33.36±0.40 ab	8.01±0.46 abc	1.280±0.004 b	0.52±0.04 bc
35	34.08±0.35 a	9.01±0.26 a	1.509±0.023 a	0.62±0.02 ab
40	32.20±0.10 b	6.82±1.01 c	1.532±0.021 a	0.69±0.02 a

### 3 讨论与结论

不定根形成一般要先形成愈伤组织,再分化成不定根,但 Ghimire 等<sup>[14]</sup>发现不定根的形成不需要事先形成愈伤组织,直接再生出不定根,这有利于缩短诱导时间。与此类似,白花桔梗不定根培养时,外植体先形成一种明显的向外凸起的、类似于旋钮状结构的不定根原基,之后发育成薄而柔软的不定根,诱导时间为 15 d。

本试验中,适合白花桔梗不定根生长的培养基为 B<sub>5</sub>。陈双越<sup>[15]</sup>发现以人参花药为外植体时诱导不定根的最佳培养基为 B<sub>5</sub> 培养基。吴松权<sup>[16]</sup>发现 B<sub>5</sub> 培养基是诱导膜荚黄芪不定根的最佳培养基。田海丽等<sup>[17]</sup>筛选适宜黄芩不定根生长的培养基,发现黄芩不定根在 B<sub>5</sub> 培养基中生长状态良好且生物量较多。而游小英等<sup>[18]</sup>在对红缨海棠茎段快速繁殖技术的研究中发现 N<sub>6</sub> 培养基适合红缨海棠不定根的生长。梁玉勇等<sup>[19]</sup>发现 MS 培养基最有利于太子参不定根的生长。这表明植物物种不同所需的培养类型也不同。

盐强度对不定根的生长有很大影响。Wu 等<sup>[20]</sup>考察了不同盐强度对紫锥花不定根生长的影响,结果发现盐强度为 1/2 时,紫锥花不定根生长最好。Zhang 等<sup>[21]</sup>观察到杠柳在低盐强度(1/4~1/2)培养基中的不定根生长较好,推测与较低的盐强度引起较低的渗透压有关。Wu 等<sup>[22]</sup>认为,低盐会改善养分之间的相互作用,导致外植体离子供应增加,从而促进不定根的生长。本试验中,1/2 的盐强度更适合白花桔梗不定根的生长。

植物生长激素 IBA 多应用于不定根的诱导,本试验结果表明,无论外源激素 IBA 浓度为多少,都能明显促进白花桔梗不定根的生长。这可能是 IBA 通过引起细胞分裂和根原基的形成从而促进根的生长有关<sup>[23-24]</sup>。有研究表明,较高浓度的 IBA 会抑制细胞伸长,低浓度的 IBA 有利于不定根的生长<sup>[25]</sup>。宫惠等<sup>[26]</sup>发现 0.1 mg·L<sup>-1</sup> IBA 是诱导欧洲缬草不定根的理想激素浓度,Bae 等<sup>[27]</sup>发现叶下珠不定根适合生长在含有 0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA 的培养基上,Zhang 等<sup>[28]</sup>研究结

果表明 0.4 mg·L<sup>-1</sup> IBA 是对昆明沙参不定根有利的生长素浓度。本研究结果可知适合白花桔梗不定根生长的 IBA 最优浓度为 0.3 mg·L<sup>-1</sup>。

培养时期对不定根有效成分的积累至关重要。尹双双<sup>[29]</sup>发现甘草不定根有效成分含量的积累在成熟期时达到最大值。与此类似,白花桔梗不定根的有效成分含量也在成熟期(35 d)时达到最高。此外,与药用桔梗中有效成分含量类似,白花桔梗不定根中的总皂苷含量高于黄酮和多糖,占有效成分的 3/4 左右<sup>[30]</sup>,表明通过培养不定根获取桔梗的有效成分是切实可行的途径。

### 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: 中国医药出版社, 2020.
- [2] 中国医学科学院药用植物研究所. 中国药用植物栽培学[M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [3] 谢宗万. 中药材品种论述[M]. 北京: 人民出版社, 1963.
- [4] 陆海洋. 桔梗皂苷类物质积累及其苦味的关系研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.
- [5] 舒雯, 高山林. 桔梗研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(2): 4-6.
- [6] 尹双双, 高文远, 王娟, 等. 药用植物不定根培养的影响因素[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3691-3694.
- [7] SIVAKUMARG, YU K W, PAEK K Y, et al. Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures[J]. Engineering in Life Sciences, 2005, 5(4): 333.
- [8] JEONG C S, CHAKRABARTYD, HAHN E J, et al. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 27: 252.
- [9] WU S Q, LIAN M L, GAO R, et al. Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus*[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2011, 47: 719.
- [10] WANG G R, QI N M. Influence of mist intervals and aeration rate on growth and second metabolite production of *Pseudostellaria heterophylla* adventitious roots in a si-phon-mist bioreactor[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2011, 15: 1059.
- [11] 郝悦君, 孙浩丁, 车成来, 等. 2 种培养方式下人参不定根生长动态观察及活性物质含量测定[J]. 延边大学农学报, 2005, 5(4): 333.
- [12] 孙晓春, 张伟强, 唐平生, 等. 桔梗提取物的主要成分和抗氧化性的测定[J]. 中国农学通报, 2017, 33(31): 139-144.

- [13] 李心怡,陈玲,马逾英,等.不同栽培年限川桔梗中桔梗总皂苷和桔梗皂苷D的含量比较[J].中国药房,2018,29(9):1249-1252.
- [14] GHIMIRE B K,KIM H Y,SEONG E S,et al. Establishment of culturing conditions and assessment of antioxidant activity and somaclonal variation in the adventitious root suspension cultures of *Oplopanax elatus* Nakai[J]. Acta Physiologiae Plantarum,2018,40(3):51.
- [15] 陈双越.人参组培体系建立研究[D].延吉:延边大学,2019.
- [16] 吴松权.膜荚黄芪不定根培养及苯丙氨酸解氨酶PAL基因的克隆与功能鉴定[D].延吉:延边大学,2008.
- [17] 田海丽,全雪丽,秦嘉泽,等. IBA浓度与培养基对黄芩不定根生物量和总黄酮含量的影响[J].江苏农业科学,2015,43(4):65-66.
- [18] 游小英,沈永宝,凌柳聪.红缨海棠茎段快速繁殖技术及组织解剖观察[J].林业科技开发,2010,24(6):23-28.
- [19] 梁玉勇,廖玲,左北梅,等.太子参不定根诱导及增殖培养研究[J].北方园艺,2013(2):147-149.
- [20] WU C H,MURTHY H N,HAHN E J,et al. Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in airlift bioreactors for the production of chichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid[J]. Biotechnology Letters, 2007,29:1179.
- [21] ZHANG J,GAO W Y,WANG J,et al. Effects of explant types and media salt strength on growth and secondary metabolite accumulation in adventitious roots of *Periplocaesepium* Bunge[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33:2447-2452.
- [22] WU C H,DEWIR Y H,HAHN E J,et al. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia* [J]. Journal of Plant Biology,2006,49:193-199.
- [23] CHAN L K,DEWI P R,BOEY P L. Effect of plant growth regulators on regeneration of plantlets from bud cultures of *Cymbopogon nardus* L. and the detection of essential oils from the *in vitro* plantlets[J]. Journal of Plant Biology, 2005,48:142-145.
- [24] AGULLO-ANTON M A, SANCHEZ-BRAVO J, ACOSTA M,et al. Auxins or sugars: What makes the difference in the adventitious rooting of stored carnation cuttings[J]. Journal of Plant Growth Regulation,2011,30:100-113.
- [25] CHAO W J,SERPE M D,ANDERSON R W,et al. Sugars,hormones,environment affect the dormancy status in underground adventitious buds of leaf spurge(*Euphorbia esula*) [J]. Weed Science,2006,54(1):59-68.
- [26] 宫惠,李文杰,孟繁旭,等.欧洲缬草无菌苗培养及其根段不定根的诱导[J].分子植物育种,2020,18(18):6127-6134.
- [27] BAE K H,YUN P Y,CHOI Y E. Induction and *in vitro* proliferation of adventitious roots in *Phyllanthus urinaria* [J]. Korean Journal of Plant Resources, 2009, 22(5): 454-460.
- [28] ZHANG Z S,ZOU D,LIU M,et al. Induction of *Psammosilene tunicoides* adventitious roots and the accumulation of triterpenoid saponins as affected by culture conditions[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2017,19(6):1535-1540.
- [29] 尹双双.太子参、杠柳和甘草不定根培养的研究[D].天津:天津大学,2013.
- [30] 谢雄雄,张迟,曾金祥,等.中药桔梗的化学成分和药理活性研究进展[J].中医药通报,2018,17(5):66-72.

## Optimization of Solid Culture Conditions for Adventitious Roots of *Platycodon grandiflorum*

ZHAO Yang, LI Jun-jie, SU Zhe-ying, JIANG Wen, YAN Yi-zi, WU Song-quan

(Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002, China)

**Abstract:** In order to further improve the yield of *Platycodon grandiflorum*, the solid culture conditions of adventitious roots of *Platycodon grandiflorum* were optimized, including medium type, salt intensity, hormone concentration and effective component content at different growth stages. The results showed that the optimum condition of *Platycodon grandiflorum* adventitious root culture medium was 1/2 B<sub>5</sub> medium supplemented with 0.3 mg·L<sup>-1</sup> indole-3-butyric acid (IBA). The content of active components was the highest after 35 days of culture, and the content of saponins was significantly higher than that of total flavonoids and polysaccharides.

**Keywords:** *Platycodon grandiflorus* adventitious roots; solid medium; exogenous hormones; effective components