

紫锥菊不定根悬浮培养技术研究进展

田启云^{1,2}, 安冬¹, 孙丽娜¹, 张宗申², 吴春华^{1*}¹大连市农业科学研究所, 大连 116036; ²大连工业大学生物工程学院, 大连 116000

摘要: 紫锥菊是可替代化学抗病毒药物的绿色、安全的天然免疫增强剂。传统栽培紫锥菊需要 3~5 年, 产量低, 药理活性物质含量不稳定, 而不定根的大规模培养具有生产周期短、药性稳定、可工厂化生产, 是解决目前对紫锥菊需求日益增长的有效途径。本文综述紫锥菊不定根的诱导, 理化因子对生理活性物质积累影响及气升式生物反应器培养技术研究进展, 并阐述其发展前景和优势。

关键词: 紫锥菊; 不定根; 悬浮培养; 咖啡酸衍生物

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

Recent Advances in Adventitious Root Suspension Cultures of *Echinacea*TIAN Qi-yun^{1,2}, AN Dong¹, SUN Li-na¹, ZHANG Zong-shen², WU Chun-hua^{1*}¹Dalian Agricultural Science Research Institute, Dalian 116036, China; ²College of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116000, China

Abstract: *Echinacea* are food supplements for enhancing the immune system. However, cultivation of *Echinacea* species in fields is greatly impeded by long process (3-5 years), low yield and unstable contents of caffeic acid derivatives. The adventitious root culture of *Echinacea* is regarded as an efficient alternative for biomass production due to its fast growth and stable metabolite production at the industrial levels. In the present review we summarize adventitious root induction, chemical and physical factors affecting the accumulation of bioactive compounds and the progress in the area of adventitious root cultures in a bioreactor. In addition, future perspectives of adventitious roots are also discussed for application.

Key words: *Echinacea*; adventitious roots; suspension culture; caffeic acid derivatives

紫锥菊 *Echinacea* spp. 是菊科紫锥菊属多年生药用植物, 原产于北美, 是国际公认的免疫促进剂及免疫调节剂^[1]。该属作为药物开发的主要有 3 个品种: 紫松果菊 *Echinacea purpurea*, 狭叶紫锥菊 *Echinacea angustifolia* 和白色紫锥菊 *Echinacea pallida*^[2]。紫锥菊提取物具有抗细菌、抗病毒、抗真菌以及抗氧化活性, 广泛应用于各种流行感冒、呼吸道及泌尿系统感染治疗^[3]。紫锥菊主要生理活性物质有, 多糖、黄酮、咖啡酸衍生物、精油、多炔、烷基胺 (Alkylamides) 和生物碱, 其最主要生物活性成分之一是咖啡酸衍生物即是咖啡酸 (caffeic acid)、绿原酸 (chlorogenic acid)、洋蓟酸 (cynarin)、松果菊苷 (echinacoside)、菊苣酸 (cichoric acid)、咖啡酰酒石酸 (caftaric acid)^[4]。在咖啡酸衍生物中, 菊苣酸具有免疫刺激作用, 提高体外和体内吞噬细胞活

性^[3], 还具有抗透明质酸酶活性, 能保护胶原蛋白, 避免自由基引起胶原蛋白的降解^[4,5], 近来又发现其具有抑制 HIV-1 整合酶和复制酶活性, 促进胰岛素释放等作用^[6]。紫锥菊苷具有抗肿瘤作用, 对肝癌、肺癌、胃腺癌有明显抑制效果, 还具有壮阳、抗衰

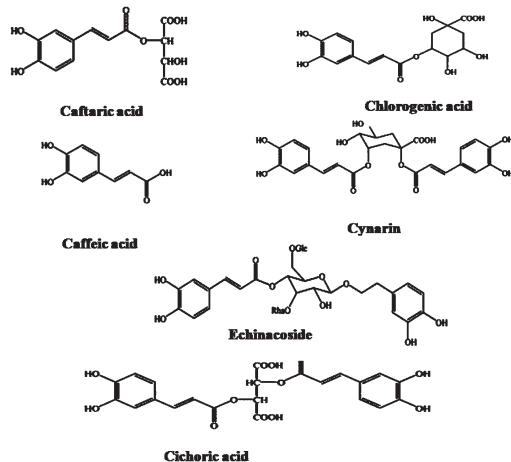


图 1 紫锥菊中咖啡酸衍生物

Fig. 1 Caffeic acid derivatisis in the *Echinacea*

收稿日期: 2014-07-10 接受日期: 2014-11-06

基金项目: 国家自然科学基金 (31370388)

* 通讯作者 Tel: 86-411-86700342-8067; E-mail: wuchunhua1970@

aliyun.com

老和治疗糖尿病等作用^[7,8]。在北美印第安人时期,紫锥菊被作为治疗外伤、蛇咬、头痛及感冒的最佳药物,目前其提取物及制剂销售额居美国医药市场销售排名前五^[9,10]。

紫锥菊传统栽培主要采用种子育苗繁殖,由于种子发芽率低,需要低温春化处理,难以实现规模化种植,而且紫锥菊生长3~5年才能作为药材,不仅消耗大量人力、物力,药材成分含量还易受气候、栽培条件及病虫害的影响^[8,10]。不定根培养具有生长周期短、条件可控误差小、材料来源单一、可快速大量生产目标代谢产物,从而有效解决野生药用资源不足及生产中出现的一系列问题^[11,12]。药用植物不定根研究最多的是人参,韩国 Paek 的研究团队对人参不定根大规模培养研究较为系统且具有代表性,并且成功进行了人参不定根的产业化,还以培养的人参不定根为材料开发一系列的化妆品和保健品^[13,14]。目前国内药用植物不定根培养的种类数目达数百种,但仅有少数达到生产规模,大多数都处于摇瓶阶段,与韩国、日本相比具有很大差距^[15]。本文综述了国内外紫锥菊不定根培养研究进展,并阐述其发展前景和优势。本文对紫锥菊不定根的合理开发利用和保护野生紫锥菊资源具有重要意义,同时为紫锥菊药物现代化发展提供重要途径。

1 紫锥菊组织培养研究

紫锥菊是世界性的草药,国内外学者重点研究了紫锥菊的化学成分^[3-5]、药理活性及临床应用^[6-10]。我国对紫锥菊的认识是20世纪90年代开始,肖培根院士将紫锥菊介绍引入我国,被认为与传统抗病毒免疫增强中药黄芪具有相似的作用,在抗病毒中草药中广泛应用^[7]。2003年紫锥菊提取物被卫生部指定为防治“非典”专用产品。紫锥菊在我国备受关注,目前人类和畜牧业各种紫锥菊免疫增强剂产品逐渐增加的趋势。

紫锥菊生物技术的研究最初多侧重于快速繁殖优良种苗的培养^[16,17],近来重点研究利用愈伤组织和毛状根培养技术生产其药用次生代谢产物。祝连彩等^[18]利用叶、茎和根诱导了愈伤组织,结果根诱导的愈伤组织总酚和多糖含量均较高,且生长速度快、质地疏松,是细胞培养获取紫锥菊主要生物活性成分的适宜材料。湖南中医药大学,雷思琦等^[19]利用紫果菊试管苗的根系直接诱导愈伤组织和不定根,且测定不同培养基及光照对物体生长和菊苣酸

积累的影响。中国科学院过程工程研究所多年实践的基础上,通过植物生物技术建立了紫锥菊快速育苗技术,并成功建立生长速度快且药用成分含量高的紫锥菊离体根培养物,生产的紫锥菊根中有效成分和生物学功效明显优于野生根,显示出巨大的商业化前景^[20]。杨世海等^[21]用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) A4, R1601, 1025 感染紫锥菊外植体而诱导毛状根及活性成分,结果紫锥菊外植体被3种发根农杆菌感染后伤口处均能陆续分化生长出白色的毛状根,培养的紫锥菊毛状根中的多糖含量为15.54%,总酚含量达2.491%。目前,对紫锥菊不定根培养研究最多的是 Wu 研究团体,他们利用从加拿大引进三种药用紫锥菊种子,诱导出不定根,并成功生产出紫锥菊的各种次生代谢产物。

2 紫锥菊不定根培养

2.1 植物激素对不定根诱导及生长的影响

植物不定根的发生是由于植物器官受伤或植物激素等外界刺激,从植物的茎、叶、节、愈伤组织诱导而产生。生长素类物质对不定根的发生起着关键性的作用,目前离体器官或组织在不定根的诱导时,大多要添加 IBA、NAA、IAA 等生长素类生长调节剂。紫锥菊不定根可从愈伤组织直接诱导,也可从试管苗子叶切片中诱导。紫果菊菊块根愈伤组织接种于含 1.0 mg/L IBA, 50 g/L 蔗糖, pH6.0 的 0.75 MS 培养基上,在室温 25 ± 1 °C 中暗培养 4 周,诱导不定根^[22];白色紫锥菊种子萌发形成的试管苗子叶外植体切成 0.5 cm × 0.5 cm 左右的小块,接种于 1.0 mg/L IBA, 50 g/L 蔗糖, pH6.0 的 MS 培养基上,在室温 25 ± 1 °C 下暗培养 4 周,诱导不定根数目达 22.5 根/培养皿^[23]。钟湘云等^[24]利用紫锥菊组织培养再生的二倍体和多倍体无菌苗,在含有 1.0 mg/L IBA 与 1.0 mg/L NAA 的 0.5 MS 培养基中诱导根及愈伤组织,并用薄层色谱显示培养根中含菊苣酸。

狭叶紫锥菊不定根悬浮培养时,发现 IBA 比 IAA 和 NAA 更适合不定根的生长,在含有 2 mg/L IBA 培养基中,不定根增长率达 6.0,是 2 mg/L IAA 培养基的 2.7 倍;多酚和黄酮类物质含量也分别为 2 mg/L IAA 培养时的 1.54 倍和 1.37 倍^[25]。白色紫锥菊不定根悬浮培养时,不含有生长素的培养基中不定根生长量及次生代谢含量最少,是其它浓度

处理的1/3;在含有IBA 1 mg/L培养基中,不定根长势最好,干重达4.26 g/L;不定根中咖啡酸衍生物积累与不定根生势相同,1 mg/LIBA对白色紫锥菊不定根中咖啡酸衍生物积累最适合,总咖啡酸衍生物含量达14.08 mg/g DW^[23]。

2.2 培养基中无机盐和蔗糖浓度的影响

MS培养基是植物组织培养中应用最广泛的培养基之一,其无机盐浓度较高。无机盐含有细胞组成的主要营养物质,其浓度决定培养基的水分渗透压。白色紫锥菊不定根在300 mL三角瓶液体悬浮培养时,0.75 MS培养基中不定根增长率以及总酚类和总黄酮类化合物含量均达到最高^[25]。狭叶紫锥菊不定根三角瓶液体悬浮液时,获得不定根生物量、总黄酮和多酚含量最高的无机盐浓度是0.5 MS^[26]。

蔗糖是组织培养中重要的碳源,培养基中蔗糖浓度可改变渗透压等很多因素,对植物组织或细胞生长,次级代谢产物的合成有很大影响。狭叶紫锥菊不定根分别在0%,1%,3%,5%,7%,9%(w/v)6组蔗糖浓度中三角瓶悬浮培养时,蔗糖浓度5%对不定根生长及总酚类和总黄酮类化合物积累最有效,其不定根中总酚类和总黄酮含量分别达25.62 mg/g DW,13.39 mg/g DW,是0%浓度的4.8倍和3.7倍^[25]。白色紫锥菊不定根也是在不含碳源的0%培养基中,鲜重和干重均最低,生长率为负值,酚类及黄酮量含量是其它处理的1/2;蔗糖浓度在0~5%之间,不定根生长量及活性物质含量随蔗糖浓度提高而增加,最适蔗糖浓度5%中生长的不定根中各种咖啡酸衍生物含量是对照无糖培养基的3~5倍^[26]。

2.3 培养基中氨态氮/硝态氮和pH的影响

氮元素是植物细胞的重要组成元素之一,也是一些次级代谢产物的组成元素。植物组培时,培养基一般采用一定量的硝酸盐和铵盐为混合氮源,优化培养基中硝铵比是十分必要的。Wu等^[25]在研究狭叶紫锥菊不定根悬浮培养时,发现NO₃⁻比NH₄⁺更有利于不定根生长和次级代谢产物的积累,但单独使用NO₃⁻不如适合比例培养基中的不定根生长及代谢产物积累,最适比例是NH₄⁺:NO₃⁻=5:25,此时不定根增长率是7.0,多酚类和黄酮类化合物含量分别为62.1 mg/g DW和39.0 mg/g DW。

培养基的pH不仅能影响细胞对培养体系中碳

和氮的吸收,而且胞外pH还可能作为细胞信号在一定程度上影响细胞次级代谢产物的积累与释放,另外pH还能够影响细胞酶活性进而影响细胞代谢。Wu等^[25]研究狭叶紫锥菊不定根培养时,发现培养基初始pH在5.0~6.0时,最有利于紫锥菊不定根生长和多酚与黄酮类物质的积累,pH低于5.0或高于6.0都会抑制根的生长。

2.4 温度与光照影响

一般植物组织培养的温度在15~32℃之间,过高或过低,均不利于细胞的生长。温度主要影响植物相关酶活性的发挥,故细胞生长与次级代谢物的形成最适温度往往不同。Wu等^[27]在研究温度对紫松果菊不定根生长影响时,分别设计了10,15,20,25,30℃五个处理,结果紫松果菊不定根最适培养温度是20℃,过高或过低温度都不适不定根生长及咖啡酸衍生物的积累。

光照参与植物生理、生化的许多过程,植物的生长、发育离不开光。光对于体内的许多酶具有诱导和抑制作用,光的影响表现在光照强度、光谱特性和光照时间三个方面。Wu等^[27]研究了光照对紫松果菊不定根生长的影响,发现光照会抑制不定根的生长,但促进咖啡酸衍生物的积累。他们提出紫锥菊不定根“二步培养法”,第一阶段,先将不定根暗培养3周,以促进不定根的生长;第二阶段调整光照3

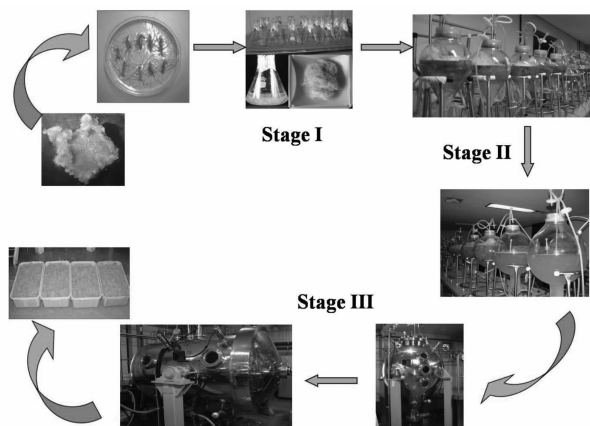


图2 紫松果菊不定根培养

Fig. 2 Schematic diagram of *in vitro* adventitious roots production in *Echinacea pupurea* by bioreactor

Stage I:不定根的诱导及三角瓶中的悬浮培养;Stage II:不定根在5 L、20 L生物反应器中培养;Stage III:不定根在500 L、1000 L反应器中的培养。Stage I:Induction and suspension culture adventitious roots of *Echinacea*. Stage II:Adventitious root production in 5 L and 10 L balloon type bubble bioreactor. Stage III:Adventitious root production in 500 L and 1000 L bioreactor.

h/21 h(光/暗)再培养2周,促进其咖啡酸衍生物的积累。此方法培养的不定根,咖啡酸衍生物总含量达47.3 mg/g DW,其中咖啡酸含量为6.5 mg/g DW,绿原酸为5.2 mg/g DW,菊苣酸为34.2 mg/g DW,是暗培养不定根总含量的1.2倍,咖啡酸含量的1.5倍,菊苣酸含量的1.2倍。

3 紫锥菊不定根生物反应器培养

生物反应器是利用不定根工厂化生产药用植物次生代谢产物的最佳核心设备,具有生产规模大、单位体积生产能力高,还可为培养物的生长和代谢提供优化的物理和化学环境,使其能够更好地生长,从而得到更多生物量和代谢产物。植物生物反应器培养中,多种因素,如接种大小(接种量)、培养基组成、通氧量及其它化学物理因素均对反应器中的细胞与器官培养具有一定影响。

3.1 接种量与通气速率影响

接种量对不定根的生长有一定的影响,研究发现接种量过大容易造成溶氧不足,生物体无法充分吸收营养,影响代谢产物的积累;而接种量过小,不仅浪费空间还会延长培养时间,降低产率。Wu等^[28]研究了不同接种量(鲜重2.5~20 g/L)对三角瓶悬浮培养中狭叶紫锥菊不定根生长的影响,结果随接种量的增加产量显著提高,然而较大接种量20 g/L会降低酚类和黄酮类的含量,狭叶紫锥菊不定根三角瓶培养时最佳接种量为10 g/L。紫松果菊不定根在5 L气升式生物反应器中培养时,最适不定根接种量为7 g/L,此时多酚和类黄酮代谢产物积累达最高,同时咖啡酸衍生物含量中,咖啡酰酒石酸4.1 mg/g DW,绿原酸5.1 mg/g DW,菊苣酸28.1 mg/g DW分别达最高。

所有植物细胞都是好气性的,培养过程需要连续不断的供氧。通气速率主要通过两方面来影响植物细胞生长,通气过慢时满足不了植物细胞生长需求,而通气过快时则会抽走培养液中的有益气体如CO₂, C₂H₂等,从而影响细胞生长;通入的气泡破碎形成剪切力,而植物细胞对剪切力十分敏感。Jeong等^[28]使用5 L气升式生物反应器培养紫松果菊不定根,发现前3周通气速率为0.05 vvm,随后2周调整0为0.3 vvm时,最适于生物量和次级代谢物的积累。

3.2 紫松果菊不定根生物反应器培养生长规律

Jeong等^[28]以5 L气升式生物反应器培养紫松

果菊不定根,加入4 L的0.5 mM培养基,25℃下暗培养8周。不定根的典型生长曲线显示0~1周为延滞期,2~7周生物量稳步上升,其中5周后生物量缓慢上升。紫锥菊不定根的单位生长率(μ)起始几天较大,于14天时达的峰值(0.128),生长率翻倍时间(Td)为5.42天。电导率随培养时间的延长而降低,生物量随时间延长而增大。随着不定根的生长,培养基中蔗糖含量稳步减少;在培养一周后,蔗糖由5%骤降至1.35%,尽管只添加了蔗糖,但培养基中可检测出葡萄糖和果糖;其中葡萄糖的浓度在培养的最初两周时显著增加,然后降低。培养基中阴阳离子的变化表明了NH₄⁺、Ca²⁺、Na⁺、K⁺、NO₃⁻、Mg²⁺、SO₄²⁻的消耗和Cl⁻的稳定。HPO₄⁻消耗迅速,在培养一周后浓度即趋近于0。NH₄⁺、Mg²⁺在培养两周后才消耗尽。不定根中多酚和类黄酮含量呈直线增长,最高值分别可达60 mg/g DW和32.8 mg/g DW,五周后不定根中多酚和类黄酮的含量平缓下降。咖啡酰酒石酸的含量在第一周培养时首先降低(0.8 mg/g DW),然而在第三、第四周时含量提高到5.2 mg/g DW,之后含量逐渐降低;绿原酸的含量第一周培养结束后同样较低(3.9 mg/g DW),但是在第三周培养结束后提高至5.5 mg/g DW,之后一直保持该浓度直至实验结束;菊苣酸和咖啡酸衍生物总含量在第一周培养时较低(5.4 mg/g DW和10.1 mg/g DW),但在随后的几周含量逐渐升高,5周后基本稳定。上述不定根的生长,各次生代谢产物的积累及培养基中营养成分的消耗规律看出,紫松果菊不定根生物反应器内液体悬浮培养最佳培养周期是五周。

3.3 诱导子

从细胞培养的角度讲,诱导子是指能促进植物细胞生产目标产物的因子,诱导子能够与细胞发生相互作用,通过细胞内一系列信号转导过程,作用于与细胞次级代谢产物相关的基因表达,进而改变细胞次级代谢相关酶的活力,最终使细胞次级代谢水平发生改变。Wu等^[29]在进行人参与紫松果菊不定根共培养时,发现向体系中加入200 μ M茉莉酸甲酯,该甲基化合物能促进人参皂苷在共培养体系中的积累,但对咖啡酸衍生物的积累无显著效果。Wu等^[30]进行紫松果菊不定根培养时加入100 μ M硝普酸钠(SNP),发现不定根中多酚和类黄酮类化合物含量达61.07 mg/g DW,39.93 mg/g DW,比之对照组的两类化合物含量均有所增加。这可能是由于

SNP 能促进提高不定根中 NO 含量,而一氧化氮是一类重要的信使分子,能够在植物防御系统中起关键作用。

3.4 利用紫锥菊不定根生产咖啡酸衍生物

自然栽培紫锥菊具有周期长,产量低,有效成分含量不稳定等弊端。窦德明等^[31]对北京地区引种的紫锥菊花期根以及根茎中菊苣酸含量进行了测

表1 不同培养条件对紫松果菊根系中各种咖啡酸衍生物含量影响

Table 1 Growth, productivity of adventitious roots of *Echinacea purpurea* cultured in different capacity air-lift bioreactors and comparison of the contents of bioactive components of *in vitro* cultivated adventitious roots with natural roots²

培养条件 Culture type	生物量 Biomass yield(kg)		咖啡酸衍生物 DW Caffeic acid derivatives(mg/g DW)			
	鲜重 Fresh weight	干重 Dry weight	咖啡酰石酒酸 Caftaric acid	绿原酸 Chlorogenic acid	菊苣酸 Chichoric acid	总量 Total ^x
500L	26.3b ^y ± 0.1	3.6b ± 0.1	2.8b ± 0.1	4.4b ± 0.4	20.2b ± 0.8	27.4b ± 0.5
1000L	40.5a ± 0.1	5.1a ± 0.1	3.9a ± 0.1	4.9a ± 0.1	22.5a ± 0.6	31.5a ± 0.6
3 年根	-	-	2.4b ± 0.2	-	6.2c ± 0.9	8.6c ± 1.1

²不定根培养在 0.5 MS + 1 mg/L IBA + 30 g/L 蔗糖。^y5% 显著水平,相同字母代表无显著性。^x总咖啡酸衍生物含量是各咖啡酸衍生物含量之和。下同。

²Adventitious roots were cultured in half strength MS medium containing 2 mg/L indole butyric acid and 50 g sucrose/L;^yValues are mean of three replicates along with standard error;^xTotal caffeic acid derivatives = caftaric acid + chlorogenic acid + chichoric acid. The same as below.

紫松果菊不定根在 500 L 和 1000 L 反应器中培养 50 d,分别能得到鲜重约 26.3 kg 和 40.5 kg 的不定根,其干重约 3.6 kg 和 5.1 kg;不定根生长时咖啡酸衍生物的积累依旧高效,两种反应器中所得咖啡酸衍生物净含量分别为 27.4 mg/g DW 和 31.5 mg/g DW。在植物细胞和器官的等比例扩大培养中,所得产物净重并不按反应器比例,可能会有所降低。然而,紫锥菊不定根大规模培养中,生物量和咖

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

表2 不同培养条件对白色紫锥菊根系生长与咖啡酸衍生物含量的影响

Table 2 Contents of caffeic acid derivatives in *Echinacea pallida* adventitious roots by different culture type

培养条件 Culture type	干重 Dry weight (g/L)	咖啡酸衍生物 Caffeic acid derivatives(mg/g DW)		
		绿原酸 Chlorogenic acid	紫锥菊苷 Echinacoside	菊苣酸 Chichoric acid
三角瓶(Flask)	4.38 b ± 0.11	3.58b ± 0.11	6.87b ± 0.23	4.01a ± 0.13
生物反应器 Bioreactors	8.98a ± 0.78	8.71a ± 0.23	14.08a ± 0.24	4.98a ± 0.82
栽培根系 Natural roots	0.2	0.34c ± 0.01	5.96c ± 0.24	0.66b ± 0.02

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

啡酸的含量并未降低,反而与大田栽培的不定根和植株中咖啡酸衍生物的含量相比,反应器中培养的各种咖啡酸衍生物含量高,其 1000 L 反应器培养的不定根中菊苣酸提高了 3.6 倍。

优良材料,具有较高生产价值。

3.5 不定根中生理活性物质提取工艺优化

设计不定根最佳提取工艺是避免生理活性物质流失,提高抗氧化活性物质含量,是合理开发利用紫锥菊资源的必要条件。植物有效物质提取工艺一般包括干燥温度,干燥时间,萃取方法,萃取溶剂等影响因素,每一步环节都会影响活性物质的提取率。Wu 等^[34]研究不同溶剂水、甲醇、乙醇(20、40、60、80、100)%和不同提取温度(40、60、80)℃对紫松果菊不定根提取咖啡酸衍生物的最佳方案,其中60%乙醇最适提取活性物质溶剂;当乙醇浓度高于60%时,提取活性物质质量降低。紫松果菊不定根在60℃下萃取最适合,提取率分别为多酚53.4 mg/g DW,类黄酮33.1 mg/g DW,多糖56.6 mg/g DW,咖啡酰酒石酸4.1 mg/g DW,绿原酸3.6 mg/g DW,菊苣酸28.8 mg/g DW。

4 总结与展望

通过对国内外紫锥菊不定根悬浮培养及次生代谢产物生产研究的总结分析,结果:(1)紫锥菊不定根诱导与悬浮培养时,IBA、NAA 和 IAA 生长素中 IBA 是最佳激素,其最适浓度是 1.0 mg/L 或 2.0 mg/L,比人参不定根培养最佳浓度 IBA5.0 mg/L 还低。(2)适合紫锥菊不定根生长无机盐浓度是 0.5 或 0.75 MS,糖浓度是 5%,此时不定根中黄酮、多酚及咖啡酸衍生物含量是无糖培养基的 3~5 倍。(3)温度与光照对紫锥菊不定根的生长及次生代谢产物的形成有很大影响,光照培养可进行“二步培养法”,第一阶段暗培养促进不定根的生长;第二阶段进行每天 3 小时光培养,促进咖啡酸衍生物含量的积累。(4)紫锥菊不定根在生物反应器中悬浮培养时,最佳培养周期是五周,此时获得较高生物量及各种次生代谢产物的含量。(5)从紫锥菊不定根中提取生理活性物质时,利用 60% 乙醇在 60℃ 温度中萃取,其提取率最高。(6)紫锥菊不定根在 5、20、500、1000 L 气升式生物反应器中培养时,生物量是三角瓶悬浮培养的 2 倍以上,其不定根中紫锥菊苷、绿原酸、菊苣酸含量是栽培根的 2~25 倍。上述结果表明,紫锥菊不定根在利用生物反应器成功生产抗肿瘤作用的菊苣酸、紫锥菊苷等咖啡酸衍生物和抗氧化及消除自由基功能的酚类和黄酮类物质等方面具有很好的前景。

不定根培养是解决野生珍稀濒危药用植物资源

不足的有效途径,实现不定根大规模培养可大大加速中药现代化进程。在我国,虽已进行多种药用植物不定根培养研究,但大多都处于实验室阶段,不能实现大规模生产,科技成果转化率低。目前,紫锥菊不定根悬浮技术研究比较系统,但多是进行单独培养,即单独培养某一品种紫锥菊不定根,关于共培养的研究报告则较少。3 种药用紫锥菊各自含有特定的咖啡酸衍生物,因此单一培养不定根中不能同时含有多种咖啡酸衍生物,利用 2 个或 3 个品种紫锥菊不定根共培养技术,可获得抗氧化活性高且共含有多种生理活性物质的医学药材。以后的研究中可将共培养作为一个方向,如两种或三种紫锥菊不定根共培养,或是将紫锥菊愈伤组织细胞与不定根共培养,或是进行种间不定根的共培养等。此外研究紫锥菊生理活性物质的合成机制可为不定根的扩大培养及合理开发利用提供理论基础。

参考文献

- 1 Wu L, et al. Diacetylenic isobutylamides of *Echinacea*; synthesis and natural distribution. *Phytochemistry*, 2004, 65: 2477-2484.
- 2 Pellati F, et al. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 35: 289-301.
- 3 Chen R(陈荣), et al. Dynamic changes of yield and chichoric acid contents in *Echinacea purpurea* at different harvest time. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 6: 1186 - 1190.
- 4 Goel V, et al. Alkylamides of *Echinacea Purpurea* stimulate alveolar macrophage function in normal rats. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2: 381-387.
- 5 Liu XL(刘晓琳), et al. The pharmacological action and clinical application of *Echinacea*. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine* (黑龙江畜牧兽医), 2007, 6: 83-85.
- 6 Zhai ZL, et al. *Echinacea* increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophage cells indicative of alternative macrophage activation. *J Ethnopharmacology*, 2009, 122: 76-85.
- 7 Xiao PG(肖培根). The international popular immune regulator *echinacea* and its preparations. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27: 46-48.
- 8 Sharma SM, et al. Bactericidal and anti-inflammatory properties of a standardized *Echinacea* extract (*Echinaforce*): dual actions against respiratory bacteria. *Phytomedicine*, 2010, 17:

- 563-568.
- 9 Benson JM, *et al.* Echinacea purpurea extracts modulate murine dendritic cell fate and function. *Food and Chem Toxicol*, 2010, 48:1170-1177.
 - 10 Liu Y B. Chemical and immune functions and clinic of preparations of *Echinacea purpurea*. *World Phytomed*(国外医药·植物药分册), 2001, 16(2):4-7.
 - 11 Murthy HN, *et al.* Adventitious roots and secondary metabolism. *Chin J Biotech*, 2008, 24:711-716.
 - 12 Rao SR, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 2002, 20:101-153.
 - 13 Hahn EJ, *et al.* Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer and ginsenoside production through large-scale bioreactor system. *J Plant Biotechnol*, 2003, 5:1-6.
 - 14 Sivakumar G, *et al.* Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. *Eng Life Sci*, 2005, 5:333-342.
 - 15 Yin SS(尹双双), *et al.* Influencing factors on medicinal plants adventitious roots. *Chin J Chin Meter Med*(中国中药杂志), 2012, 37:3691-3694.
 - 16 Harbage JF. Micropropagation of *Echinacea angustifolia*, *E. Pallida*, and *E. pupurea* from stem and seed explants. *Hort Sci*, 2001, 36:360-364.
 - 17 Mechanda SM, *et al.* Direct shoot regeneration from leaf segments of mature plants of *Echinacea purpurea*. *In Vitro Cell Dev Biol-Pl*, 2003, 39:505-509.
 - 18 Zhu LC(祝连彩), *et al.* Callus induction and its bioactive ingredient analysis of *Echinacea purpurea*. *Acta Bot Borea Occiden Sin*(西北植物学报), 2007, 27:2451-2455.
 - 19 Lei SQ(雷思琦). Echinacea adventitious roots induction and culture in vitro study of chicory acid produced. Chang Sha: Hunan University of Chinese medicine, MSc. 2009.
 - 20 Liu CC(刘春朝). Echinacea, antiviral immunity of medicinal plant. Institute of process engineering, Chinese academy of sciences; Science times Newspaper. 2005, 12(13):47-56.
 - 21 Yang SH(杨世海), *et al.* Echinacea hairy root induction and in vitro culture. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2011, 46:1557-1562.
 - 22 Wu CH, *et al.* Improved Production of caffeic acid derivatives in suspension cultures of *Echinacea purpurea* by medium replenishment strategy, *Arch Pharm Res*, 2007, 30:945-949.
 - 23 Wu CH(吴春华), *et al.* Medium salt strength and sucrose concentration affect root growth and secondary metabolite contents in adventitious root cultures of *Echinacea pallida*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2012, 37:3768-3772.
 - 24 Zhong XY(钟湘云), *et al.* Research in Echinacea root in vitro culture. *J of TCM Univ of Hunan*(湖南中医药大学学报), 2007, 8:278-279.
 - 25 Wu CH, *et al.* Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *J Plant Biol*, 2006, 49:193-199.
 - 26 Wu CH(吴春华), *et al.* Medium salt strength and sucrose concentration affect root growth and secondary metabolite contents in adventitious root cultures of *Echinacea pallida*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 9:1167-1171.
 - 27 Wu CH, *et al.* Enhanced production of asaric acid, chlorogenic acid and cichoric acid in suspension cultures of *Echinacea purpurea* by the manipulation of incubation temperature and photoperiod, *Biochem Eng J*, 2007, 36:301-303.
 - 28 Jeong JA, *et al.* Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2009, 14:91-98.
 - 29 Wu CH, *et al.* Establishment of adventitious root co-culture of Ginseng and Echinacea for the production of secondary metabolites, *Acta Physiol Plant*, 2008, 30:891-896.
 - 30 Wu CH, *et al.* Nitric oxide elicitation induces the accumulation of secondary metabolites and antioxidant defense in adventitious roots of *Echinacea purpurea*. *J Plant Biol*, 2007, 50:636-643.
 - 31 Dou DM(窦德明), *et al.* Assaying of cichoric acid in introducing plant of *Echinacea purpurea*. *China Tradit Herb Drugs*(中草药), 2001, 32:987-988.
 - 32 Wu QL(吴启林), *et al.* Studies on chicory acid extraction and purification technology in Echinacea. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2004, 35:995-997.
 - 33 Wu CH, *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. *Biotechnol Lett*, 2007, 29:1179-1182.
 - 34 WU CH, *et al.* Efficient extraction of caffeic acid derivatives from adventitious roots of *Echinacea purpurea*. *Czech J Food Sci*, 2008, 2:254-258.