

盾叶薯蓣培养细胞的生长及薯蓣皂甙元产生的变化规律

湖北省医药工业研究所(武昌 530061)

任建伟* 白云 郭秋月

摘要 对悬浮培养的盾叶薯蓣细胞的生长及薯蓣皂甙元产生的动态变化进行了研究,比较了不同培养基及激素浓度对愈伤组织生长及皂甙元含量的影响,为细胞连续培养及培养条件的选择提供了科学的依据。

关键词 盾叶薯蓣 组织培养 愈伤组织 生长速率 薯蓣皂甙元

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* 是我国特有的药用植物。其根茎 俗称 黄姜, 所含薯蓣皂甙元(简称皂素)是半合成甾体激素药物的主要原料之一。由于对皂素的需求日益增加,国内外都在探索利用植物组织与细胞培养技术生产皂素的可能性。国外对三角叶薯蓣的研究报道较多[Rorem J S, et al. J Nat Prod, 1985, 48(2): 210]。

有关盾叶薯蓣愈伤组织的生长及其皂素产生的变化规律国内外未见到报道。我们在愈伤组织诱导的基础上对此进行了研究,并比较了不同培养基及激素组合对愈伤组织的生长及皂素含量的影响,为连续培养细胞和获取皂素以及适宜培养条件的选择提供了科学的依据。

1 材料与方法

1.1 愈伤组织的选择:从盾叶薯蓣茎、叶诱导出的愈伤组织在每次继代培养时,均选择生长较好、疏松的新鲜愈伤组织作为下一步的继代材料,连续继代4~5代后,各愈伤组织基本均匀一致并摆脱了母体影响,成为一个新的独立系统,以此作为实验材料进行以下试验。

1.2 细胞悬浮培养:来源于茎的愈伤组织接种在MS附加2,4-D 1.0 (mg/L, 以下同)、6-BA 0.1的液体培养基中,100ml三角瓶装40ml培养液(下同),摇床转速为120r/min,每7d取3~4瓶,收集细胞测定细胞增长量和皂素含量。

1.3 愈伤组织固体培养:选用茎、叶诱导出的愈伤组织,分别接种在MS和6,7-V并附加不同激素浓度的6种固体培养基上,25d后收集愈伤组织,每种至少3瓶,测定项目同上。

1.4 皂素的含量测定:采用薄层层析定量法。将培养物用2mol/LHCl水解4h,洗至中性,烘干。石油醚(60~90°)回流提取5h,提取液蒸干,各加0.5ml无水乙醇使成待测液。

皂素对照品由湖北药厂提供。用无水乙醇配成1~5μg/μl对照液,与样品液同时在硅胶G薄层板上点样,环己烷-乙酸乙酯(6:4)展开,10%H₂SO₄液喷雾,105℃烘干显色,与对照液色斑比色测定皂素含量(μg/gDW)。

1.5 数据的分析与计算:

细胞增长量(g) = 收获细胞 - 接种细胞

细胞干重(gDW):细胞于50℃下干燥至恒重。

细胞生长速率[gDW/(L·d)] = $\frac{\text{收获干重} - \text{接种干重}}{\text{培养基体积} \times \text{培养天数}}$

细胞产率(g/L) = $\frac{\text{细胞增长量}}{\text{培养基体积}} \times 1000$

皂素产率(μg/L) = 干细胞产率 × 皂素含量

2 结果与讨论

2.1 悬浮培养细胞的生长与皂素的累积:结果(表1)表明,细胞在7~28d之间增长较快,其中7~14d之间增长最明显。鲜重净增52.3g/L,干重净增3.37g/L。细胞生长速率曲线呈

*Address: Ren Jianwei, Hubei Provincial Institute of Pharmaceuticals, Wuchang

明显上升趋势(图)。21d后尽管细胞继续增长,细胞的干、鲜重产率继续增加,但增长的幅度变小,所以细胞生长速率曲线呈下降势态。从培养期中皂素累积的动态观察来看,皂素含量随细胞的生长而增高,但达峰时间迟于细胞生长达峰时间,即有用物产量与细胞生长的关系属延迟型[颜昌敬.植物组织培养手册.上海:上海科学出版社,1990.125]。结果与国外有关三角叶薯蓣研究结果相似[Rorem J S,et al.J Nat Prod, 1985, 48(2): 210]。以上结果说明,盾叶薯蓣细胞培养在7~21d之间细胞的生物量增长最快,培养物中干物质累积也最快。因此,如以扩大细胞生物量为目的,继代转接的时间以不超过21d为宜;如以获取皂素为目的,细胞收获的时间在30~35d比较合适,此间皂素含量及每升培养基可得皂素含量均较高。

2.2 不同培养基与激素浓度对愈伤组织生长和皂素含量的影响:结果见表2。茎愈伤组织的生长速率大多高于叶,特别是在MS附加2,4-D 1, 6-BA 0.1和6,7-V附加2,4-D 1。KT0.1 2种培养基上的茎愈伤组织生长旺盛。从皂素产率来比较,培养在MS附加2,4-D 1,6-BA 0.1上的茎愈伤组织和培养在6,7-V附加2,4-D 1、KT0.1、NAA 1上的茎、叶愈伤组织皂素产率较高,分别为12.17、12.34和12.40μg/L。

我们的实验结果显示,在盾叶薯蓣细胞培养中,14~28d细胞增长较快宜选用有利细

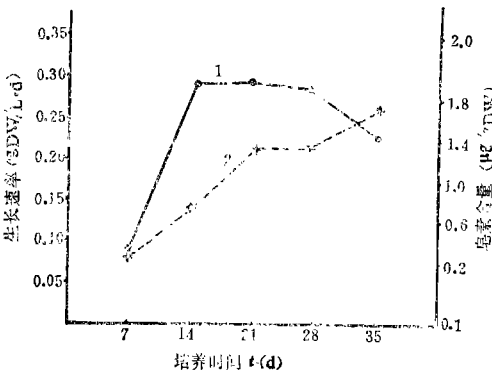


图 盾叶薯蓣悬培细胞的生长和皂素含量的动态变化

1-生长速率 2-皂素含量

表1 盾叶薯蓣悬浮培养细胞生长和皂素含量的变化

培养时间(d)	7	14	21	28	35
鲜重产率(g/L)	12.00	64.30	115.90	141.30	199.20
干重产率(gDW/L)	0.63	4.00	6.03	7.80	8.36
生长速率(gDW/L)	0.090	0.286	0.287	0.279	0.237
皂素含量(μg/gDW)	0.22	0.69	1.33	1.34	1.68
皂素产率(μg/L)	0.14	2.76	8.02	10.45	13.94

表2 不同培养基及激素浓度对盾叶薯蓣愈伤组织生长和皂素含量的影响

培养基	激素浓度 (mg/L)	干重产率 (gDW/L)		生长速率 (gDW/L.d)		皂素含量 (μg/gDW)		皂素产率 (μg/L)	
		茎	叶	茎	叶	茎	叶	茎	叶
MS	2,4-D1 6-BA0.1	6.76	5.72	0.270	0.229	1.80	1.50	12.17	8.58
	2,4-D2 6-BA0.1	2.88	3.72	0.115	0.149	1.40	1.30	4.03	4.84
	2,4-D1 KT0.1	3.36	4.64	0.134	0.186	2.10	2.60	7.06	12.06
6,7-V	2,4-D1 KT0.1NAA1	5.63	4.96	0.225	0.198	2.20	2.50	12.34	12.40
	2,4-D2 KT0.1NAA1	5.69	3.78	0.228	0.151	1.10	2.40	6.26	9.07
	2,4-D1 KT0.1	10.06	3.82	0.402	0.153	0.90	2.20	9.05	8.40

胞增殖的培养基6,7-V(添加2,4-D 1、KT0.1);对生产皂素比较合适的培养基是MS(添加2,4-D 1、6-BA0.1)或6,7-V(添加2,4-D 1、KT0.1、NAA 1),可得到较高的皂素产率。以细胞增殖为目的的培养,继代时间选择在14~21d;以生产皂素为目的,培养时间定为30~35d比较恰当。

致谢:承张榕村高级工程师提出宝贵意见。(1993-02-13收稿)

entry through the potential dependant channel though at high concentrations it may also influenced the NA activated receptor operated channel (ROC).

(Original article on page 84)

Studies on the Preventive Action of *Trichoderma* spp. Against Rhizoctonia Damping-off of American Ginseng (*Panax quinquefolium*)

Ding Wanlong, Gao Qiuyi, et al

Trichoderma spp. showed strong antagonistic action against *Rhizoctonia solani* in screening tests. In green house and field experiments, its effect in the prevention of rhizoctonia damping off of *Panax quinquefolium* was over 60%, which is superior than other conventional fungicides.

(Original article on page 91)

On the Growth Kinetics and Diosgenin Production of Cultured Cells of Peltate Yam (*Dioscorea zingiberensis*)

Ren Jianwei, Bai Yun, and Guo Qiuyue

Growth kinetics and diosgenin production by *Dioscorea zingiberensis* cells under suspension culture were studied. Effect of different culture media and hormones on the yield of diosgenin and growth of callus were compared. The results may provide a scientific basis for the selection of optimum condition for continuous cell culture of *D. zingiberensis*.

(Original article on page 93)

(上接第108页)

国近几年来研究开发出来的一项新兴产品,有广阔的前景,如我所研究的“天府可乐”“亚禄可乐”深受各层次人的欢迎。它既可清热解渴,又有保健作用,这类型的饮料还有绞股蓝饮料,鱼腥草饮料等。而市场上还出现一些适应症较强的饮料,如降高血压、降高血脂等不同类型而又能对老年人出现的病症起预防或治疗作用。

5 保健药茶类

茶作为饮料在我国已具有很长的历史。古人也将保健药加入茶叶中制成保健茶。如川芎就是一个典型的例子。近年来开发了很多保健茶。如绞股蓝系列保健茶、人参茶、柿叶茶、杜仲茶、问荆茶等。

人口老龄化已是全球性的问题,特别是科学水平发达、经济富裕的国家已设立专门机构进行研究。我们认为今后抗衰老药物的研究应从以下方面考虑。①大力发展和开拓保健食疗。其优点是适应性强,制作简便。目前食疗品种不多,适应症差,普及不广,因此这类产品应大力研究。②开发衰老前期的预防药。人不能到了衰老期才进行抗衰老,应在衰老前期(有人研究男,女更年期或女绝经期前为衰老前期),以增强体质,延缓衰老期的到来,同时开发衰老前期的预防药。③抓抗衰老中药资源的开发与利用,多剂型品种的研究与新品种的开发。

(1993-05-08 收稿)