

南方红豆杉愈伤组织培养的研究[△]

南开大学生命科学学院(天津 300071) 盛长忠* 王淑芳 王宁宁 陈喜文 刘 静

摘要 对南方红豆杉愈伤组织诱导条件及最适培养基组成成分进行了探讨。结果表明,2,4-D比NAA更有利于愈伤组织的形成。培养基中添加适当浓度的CA Phe和乙酸钠能促进南方红豆杉愈伤组织的生长和紫杉醇的积累。

关键词 南方红豆杉 愈伤组织 水解酪蛋白 苯丙氨酸 乙酸钠

Studies on Callus Culture of Maire Yew (*Taxus chinensis* var. *mairi*) Leaves

College of Life Sciences, Nankai University (Tianjin 300071) Sheng Changzhong, Wang Shufang, Wang Ningning and Chen Xiwen

Abstract The induction condition and optimum medium constitution for callus growth of *Taxus chinensis* var. *mairi* (Lemee et Levl.) Cheng et L. K. Fu leaves were studied. The results indicated that 2, 4-D was more effective in inducing callus than NAA. Certain concentrations of CA (0.1%) phenylalanine (1.0 mmol/L) and sodium acetate (0.5 mmol/L) not only promoted the callus growth, but also increased the accumulation of taxol contents.

Key words *Taxus chinensis* var. *mairi* (Lemee et Levl.) Cheng et L. K. Fu callus tissue casein hydrolysate phenylalanine sodium acetate

红豆杉属植物中次生代谢产物紫杉醇(paclitaxel)是当今新的具有明显疗效的抗癌药物,目前主要是从植物体中获取,来源有限,无法满足患者的需求。所以,国内外不少学者正致力于通过细胞工程技术生产紫杉醇的研究,以期缓和紫杉醇供应短缺的矛盾。目前有关红豆杉愈伤组织和细胞培养的研究已有不少报道。

本文以南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairi* 叶为实验材料,研究了2,4-D和NAA对愈伤组织诱导的影响,并对愈伤组织的培养基组成成分的优化进行了初步探讨。可望为今后细胞大规模培养生产紫杉醇提供些实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料:南方红豆杉叶,由天津大学元英进教授提供。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导:将南方红豆杉叶于自来水下冲洗3~4h,浸入0.1%升汞中灭菌5min后,用无菌水冲洗3次,再剪成0.5cm长的切段,接种到诱导培养基中。

1.2.2 组织培养生长的指标

接种鲜重(克/瓶)=接种后瓶重-接种前瓶重

收获鲜重(克/瓶)=收获前瓶重-收获后瓶重

生长率(鲜重增长倍数)=收获鲜重/接种鲜重

1.2.3 紫杉醇的提取分离和HPLC分析:紫杉醇提取方法同文献^[1]。

HPLC分析:将样品用1mL色谱纯甲醇溶解,在C₁₈反相硅胶柱进行恒速洗脱,流动相为甲醇-水(65:35),流速为1mL/min,在227nm下用紫外检测器检测。紫杉醇定量采用外标法。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织的诱导:将无菌的南方红豆杉叶片切段接种于添加不同浓度的生长素(2,4-D和NAA)和1mg/LKT的B₆培养基上。在25℃黑暗下培养,20d左右,叶切面处膨大,逐渐形成愈伤组织。35d时,统计叶切面处长出的愈伤组织情况(表1)。

表1 生长素对愈伤组织诱导的影响

生长素浓度(mg/L)	叶切段数	出愈段数	诱导率(%)	
2,4-D	0.5	50	48	96.0
	1.0	48	47	97.9
	2.0	50	49	98.0
NAA	0.5	49	25	51.0
	1.0	50	26	52.0
	2.0	47	25	53.2

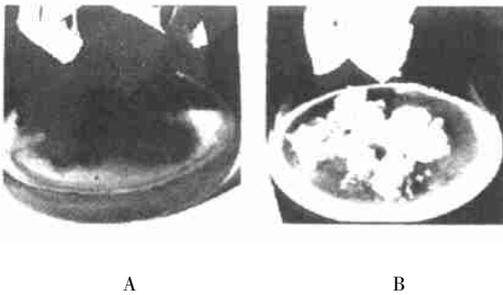
从表1可以看出,2,4-D和NAA的浓度对愈伤组织形成影响不大,但不同生长素诱导结果相差明显。2,4-D比NAA更有利于愈伤组织的形成,诱

* Address: Sheng Changzhong, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin

△ 天津自然科学基金资助项目

导率高得多,这与孙^[2]结果是一致的。观察愈伤组织的颜色和性状也有明显差异,在含有 2,4-D 培养基上的愈伤组织颜色比较新鲜,块大、松软,而在 NAA 培养基上的愈伤组织块小,褐色,较硬。所以,以后的研究选用在添加 2,4-D 的培养基上的愈伤组织为实验材料

2.2 愈伤组织的继代培养: 35 d 时,将愈伤组织剥离下来接种于含有 1 mg/L KT 2 mg/L 2,4-D 的培养基上。几天后,愈伤组织迅速变褐,后来无论是改变激素浓度及配比,还是采取频繁继代等措施,褐色现象均无多大变化,组织块硬,生长速率极为缓慢。大约 1 a 以后,愈伤组织长出新鲜松软的白色细胞团,生长速度变快。第 4 次继代培养的愈伤组织与 1 a 后的相比较,见图 1



A 为愈伤组织发生后第 4 代 30 d 时生长情况,黑褐色生长缓慢 B 愈伤组织生长 1 a 后培养 30 d 时情况,组织块松软,长出新鲜白色细胞

图 1 南方红豆杉愈伤组织发生后的性状

有许多报道称,红豆杉愈伤组织发生后,要经历较长时间的继代培养,生长速率才能有所提高,有的竟长达 2 a 时间之久^[3]。南方红豆杉愈伤组织也有这种特性

2.3 水解酪蛋白 (CA) 对愈伤组织生长和紫杉醇含量的影响: 愈伤组织在含不同浓度 CA 的 B₅ 培养基 (含 1 mg/L KT 2 mg/L 2,4-D 0.5 mg/L GA₃) 上生长 30 d 后收获,称鲜重,提取紫杉醇并测定含量,结果如图 2

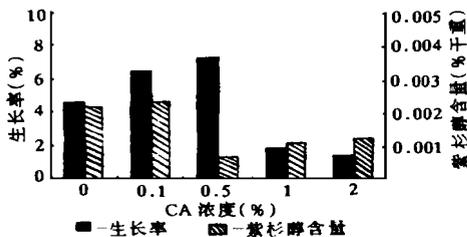


图 2 CA 对南方红豆杉愈伤组织生长和紫杉醇含量的影响

在其它红豆杉愈伤组织的培养中,关于 CA 的

作用既有对愈伤组织生长和紫杉醇含量无显著影响的报道^[4],也有能促进生物产量而不影响紫杉醇含量的报道。但对于南方红豆杉愈伤组织的影响尚未见报道。本实验结果表明,一定浓度 (0.1%, 0.5%) 的 CA 能促进南方红豆杉愈伤组织的生长,最适浓度为 0.5%, 生长率达 7.34%, 是对照的 1.6 倍,但不利于紫杉醇积累,紫杉醇含量仅为对照的 1/3。当 CA 浓度为 0.1% 时既能促进愈伤组织的生长 (为对照的 1.4 倍), 又不影响紫杉醇的含量 (略高于对照)。所以,该浓度是南方红豆杉愈伤组织培养的最适浓度

2.4 苯丙氨酸 (Phe) 和乙酸钠对愈伤组织生长和紫杉醇含量的影响: 将愈伤组织培养在添加不同浓度的 Phe 和乙酸钠的 B₅ 培养基上 (其它成分同前), 30 d 收获。其生长率及紫杉醇含量如图 3, 4 所示。

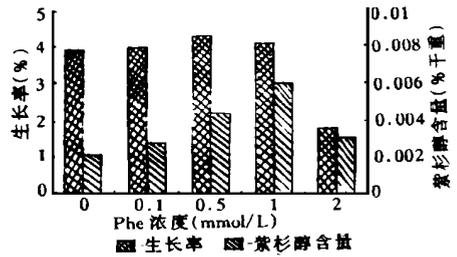


图 3 不同浓度 Phe 对不同愈伤组织生长和紫杉醇含量的影响

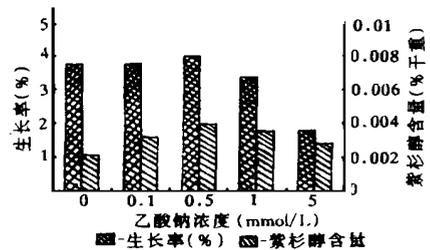


图 4 不同浓度乙酸钠对愈伤组织生长和紫杉醇含量的影响

结果表明, Phe 在 0~1.0 mmol/L 时,愈伤组织生长速率变化不大,但是明显影响紫杉醇的含量。其中, 1.0 mmol/L Phe 效果最好,与对照相比,紫杉醇含量提高了近 3 倍。Phe 浓度继续升高,反而对生长及紫杉醇的积累产生不利影响

培养基中添加 0.1~0.5 mmol/L 的乙酸钠有利于愈伤组织生长和紫杉醇产量的提高。其中 0.5 mmol/L 时效果较好,使愈伤组织中紫杉醇的含量增加了 2 倍多。浓度过高不利于愈伤组织的生长,培养后很快变黑、衰老甚至死亡。

Strobe 等^[5] (1982) 通过饲喂短叶红豆杉无菌树

皮小块,证明苯丙氨酸、亮氨酸和乙酸钠都是紫杉醇的前体,其中乙酸钠不仅掺入到乙酰基,而且还能掺入到苯环和紫杉烷的骨架中。Zamir等^[6](1992)也用放射性同位素标记的前体进行饲喂实验,结果表明,侧链乙酰基来自乙酸,而 C₁₃位酯基侧链中的 Phe-CH₂-CH(OH)-COO 则来自苯丙氨酸。在其他红豆杉细胞培养中,有些报道^[7]证明这些前体都能掺入到紫杉烷中。但也有一些种类红豆杉愈伤组织不能利用乙酸盐作为前体。本实验结果表明,南方红豆杉愈伤组织均能利用一定浓度的苯丙氨酸和乙酸钠

来合成紫杉醇而不降低生物量。

参考文献

- 1 Fett-Neto A G, *et al.* Plant Medica, 1992, 58 461
- 2 孙,等. 中草药, 1997, 28(增刊): 7
- 3 Wickremesinhe ERM, *et al.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1993, 38 181
- 4 Fett-Neto A G, *et al.* Bio /Technology, 1993, 11: 731
- 5 Stobel G A. *et al.* Plant Science, 1992, 84 65
- 6 Zamir L O, *et al.* Tetrahedron Lett, 1992, 33(36): 5235
- 7 Fett-Neto A G, *et al.* Biotechnol /Bioengineer, 1994, 44 966

(1999-08-13收稿)

四倍体菘蓝毛状根培养系统的建立及外界因子对其生长的影响

第二军医大学药学院(上海 200433) 李博华* 张汉明 茹贤 许铁峰

摘要 用发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* R1601, A4, ATCC15834菌株感染菘蓝 *Isatis indigotica* Fort.同源四倍体的子叶 10 d后,在子叶切口处均能陆续长出毛状根。转化根在不含激素的 MS固体培养基上快速生长并表现出典型的毛根性状,经冠瘿碱分析证明确已被转化。建立了毛状根培养系统并比较了各种外界因子生长的影响。

关键词 发根农杆菌 菘蓝同源四倍体 毛状根培养 外界因子

Establishment of Hairy Root Culture of Autotetraploid Indigobue Woad (*Isatis indigotica*) and Different Extrinsic Factors Affecting Their Growth

College of Pharmacy, the Second Military Medical University (Shanghai 200433) Li Bohua, Zhang Hanming, Ding Ruxian and Xu Tiefeng

Abstract Hairy root of autotetraploid *Isatis indigotica* Fortune were induced from cotyledon leaf explants after 10 d inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*, strains R1601, A4 and ATCC15834. Transformed roots grew rapidly on solid MS medium without hormones and showed typical hairy root phenotype. Transformation was confirmed by opine analysis. A culture system of hairy root was established and different extrinsic factors affecting the growth of hairy root was investigated.

Key words *Isatis indigotica* Fortune *Agrobacterium rhizogenes* hairy root culture extrinsic factors

十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort.是常用中药板蓝根、大青叶的主要来源。板蓝根和大青叶都有清热解毒、凉血消斑的功效。板蓝根中含有青黛酮、靛蓝、靛玉红、苯甲酸、水杨酸等多种活性成分。用秋水仙碱处理萌发的菘蓝种子或幼苗生长点,获得了菘蓝同源四倍体植株,经数代选育,得到了性状稳定、繁殖力正常、根与叶中活性成分均较大幅度提高的生产性能优良的品系^[1],经国家科委批准,已列为国家科技成果重点推广项目。

毛状根培养是 80年代以来在植物细胞培养技

术领域中发展起来的一种新技术。近年来已有许多关于二倍体植物的转化及利用毛状根生产药物有效成分的报道^[2-7]。十字花植物中甘蓝^[8]、花椰菜^[9]、萝卜^[10]等都经发根农杆菌诱导出了毛状根。但关于菘蓝和四倍体植物的遗传转化国内外至今尚未见报道。本研究采用发根农杆菌菌株 A4, R1601, ATCC15834转化四倍体菘蓝的子叶,成功地诱导出毛状根,建立了离体毛状根培养系并初步探讨了各种外界因素对毛状根生长的影响。

1 材料与方

* Address: Li Bohua, College of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai