

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 巍,等. 中草药, 1997, 28(增刊): 7
- 3 Wickremesinha 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 Strobel 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)

四倍体菰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菌株感染菰蓝 *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 菰蓝同源四倍体 毛状根培养 外界因子

Establishment of Hairy Root Culture of Autotetraploid Indigoblue 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

十字花科植物菰蓝 *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菰蓝种子或幼苗生长点,获得了菰蓝同源四倍体植株,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]。十字花植物中甘兰^[8]、花椰菜^[9]、萝卜^[10]等都经发根农杆菌诱导出了毛状根。但关于菰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转化四倍体菰蓝的子叶,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 材料与方法

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

1.1 细菌菌株: 本实验采用 A4, R1601 和 ATCC15834 3种发根农杆菌菌株, 感染前置于 YEB固体培养基上于 27℃活化 3次, 然后转至 YEB液体培养基中 (R1601菌的培养基中加入 200 mg/L卡那霉素), 于黑暗、25℃、100 r/min振荡培养。用处于对数生长期的菌液转化植物。

1.2 植物材料: 四倍体菘蓝种子由本室乔传卓教授提供。先将种子用清水冲洗干净后在 75%乙醇中浸泡 3 min, 再用 0.1%升汞消毒 3 min, 无菌水冲洗 4次, 置于 MS固体培养基于培养室萌发。

1.3 外植体接种: 将四倍体菘蓝的子叶切成 0.5 cm²的小块, 浸入已达对数生长期的转化子菌液共培养 10 min, 取出共培养的叶片用无菌滤纸吸干菌液, 置于 MS固体培养基上培养 2 d后取出用无菌水冲洗 4次后转移至含头孢噻肟钠的 500 mg/L的 MS固体培养基, 于 25℃、光照 12 h/d下培养, 每隔 5 d转接 1次。

1.4 毛状根离体培养和优良克隆选择: 灭菌后的毛状根在不含激素的 MS固体培养基上培养。选择 3种菌转化所得生长快、分枝多的毛状根各 3个株系于 MS液体培养基中培养。培养容积为 150 mL三角瓶装 50 mL液体培养基, 接种量为 0.25 g (鲜重), 在 25℃、黑暗、100 r/min条件下振荡培养, 两星期后收获毛状根并测鲜重, 60℃烘干后测干重以平均 5瓶的鲜重、干重作为评定毛状根生长状况的指标。

1.5 外界因素对毛状根生长的影响

1.5.1 不同培养基对毛状根生长的影响: 配制 MS 1/2MS B₅ 1/2B₅, White, 1/2White 液体培养基, 比较不同培养基对毛状根生长的影响。

1.5.2 不同碳源对毛状根生长的影响: 配制分别以蔗糖、葡萄糖、果糖、棉子糖、阿拉伯糖、半乳糖为碳源 (均为 30 g/L) 的 1/2MS培养基, 比较没碳源对毛状根生长的影响。

1.5.3 不同氮源对毛状根生长的影响: 在加入不同氮源 (1 g/L牛肉浸膏, 1 g/L酵母粉, 1 g/L蛋白胨, 1 g/L酪蛋白, 1 g/L乳蛋白和 1/2MS浓度的 N H₄NO₃) 的 1/2MS液体培养基中培养毛状根, 以确定毛状根生长的最适氮源。

1.5.4 不同 pH值对毛状根生长的影响: 在不同 pH值 (4.6, 5.4, 5.8, 6.2, 6.6, 7.0, 7.4) 的 1/2MS液体培养基中培养毛状根, 以确定毛状根生长的最适 pH值。

以上所有实验培养条件和接种量均按 1.4中毛

状根液体培养

1.6 冠瘿碱分析: 取毛状根 100 mg置于 1 mL Eppendorf管, 加入 0.1 mol/L HCl 100 μL, 捣成匀浆, 低温浸提 2 h, 15 000 r/min离心 5 min, 取上清液 10 μL及冠瘿碱标准品分别点样于 Whatman 3MM滤纸上进行高压纸电泳。电泳条件和染色参照 Morgan等^[11]的方法进行。

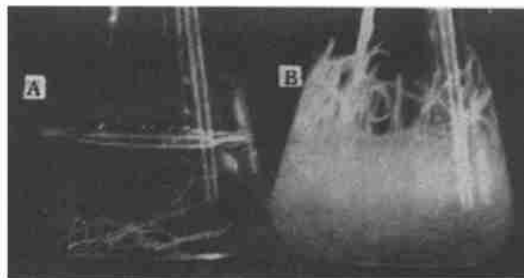
2 结果与分析

2.1 发状根的诱导: 发根农杆菌 ATCC15834, R1601, A4感染四倍体菘蓝子叶 10d后均可在叶片切口处出根。多数根具典型毛状根特征, 有许多白色根毛, 分枝多且根尖向上生长 (图 1)。部分对照子叶 (无农杆菌感染) 也能在切口部位出根, 但出根率低, 且根毛少, 根尖向下生长。



图 1 四倍体菘蓝的子叶被发根农杆菌感染 15 d后的出根情况

2.2 转化毛状根的分离、培养和优良克隆选择: 由于 1条毛状根起源于 1个细胞, 所以我们把外植体上的每条毛状根逐一分开。作为单个克隆进行培养。毛状根在无激素的 MS固体培养基上继续快速生长并分枝。MS液体培养结果 (图 2) 表明不同毛状根株系具有不同生长速度 (表 1)。选出生长最快的 RV₂ (A4) 株系 (生物量在两星期内增加 35倍) 作为以后实验用。



A对照根 B毛状根

图 2 毛状根液体培养

2.3 外界因子对毛状根生长的影响

2.3.1 不同培养基对毛状根生长的影响: 实验结果

(表 2)表明,毛状根培养以 1/2MS培养基为最佳,在这个条件下毛状根的鲜重和干重都达到最大量

2.3.2 不同碳源对毛状根生长的影响:毛状根在以蔗糖为碳源的培养基中生长最快,在添加葡萄糖和果糖的培养基中生长也较快,在含棉子糖的培养基中生长缓慢 毛状根由于不能利用半乳糖和阿拉伯糖作为碳源而枯死. 实验结果见表 3

表 1 不同株系毛状根生长量比较 ($\bar{x} \pm s$)

毛根株系	鲜重(克/瓶)	干重(克/瓶)
RV ₁ (A4)	7.85±1.05	0.429±0.058
RV ₂ (A4)	9.14±0.77	0.470±0.036
RV ₃ (A4)	6.30±1.07	0.335±0.063
RV ₄ (R1601)	5.49±0.76	0.289±0.043
RV ₅ (R1601)	7.06±0.87	0.386±0.051
RV ₆ (R1601)	5.34±1.03	0.293±0.057
RV ₇ (ATCC15834)	7.80±0.87	0.384±0.043
RV ₈ (ATCC15834)	5.62±1.23	0.295±0.075
RV ₉ (ATCC15834)	5.50±0.95	0.285±0.049

表 2 不同培养基对毛状根生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

培养基	鲜重(克/瓶)	干重(克/瓶)
MS	8.48±0.86	0.453±0.042
1/2 MS	9.25±0.81	0.459±0.055
B ₅	8.28±1.21	0.403±0.050
1/2 B ₅	7.11±1.06	0.381±0.049
White	6.57±1.00	0.338±0.053
1/2 White	7.54±0.87	0.402±0.044

表 3 不同碳源对毛状根生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

碳源	鲜重(克/瓶)	干重(克/瓶)
葡萄糖	4.12±0.53	0.215±0.027
蔗糖	9.42±0.79	0.487±0.037
棉子糖	0.81±0.14	0.042±0.008
果糖	3.67±0.33	0.189±0.013

2.3.3 不同氮源对毛状根生长的影响:实验结果(表 4)说明含 1.0 g/L水解酪蛋白或水解乳蛋白作为氮源的培养基最适合毛状根生长,毛根分枝多产量高,而在以 1.0 g/L酵母、蛋白胨、牛肉浸膏为氮源的培养基中,毛状根生长慢、分枝少且形态粗短

表 4 不同氮源对毛状根生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

氮源	鲜重(克/瓶)	干重(克/瓶)
酪蛋白	14.90±1.31	0.779±0.070
NH ₄ NO ₄	8.11±0.81	0.419±0.043
蛋白胨	7.25±0.79	0.390±0.045
乳蛋白	15.69±1.32	0.819±0.069
牛肉浸膏	4.66±0.75	0.241±0.041
酵母粉	7.76±0.79	0.392±0.043

2.3.4 不同 pH值对毛状根生长的影响:实验结果(表 5)表明,当 pH值为 5.8时,毛状根生长量达到

最大,当 pH值大于或小于 5.8时,毛状根生长量均不同程度减少。

表 5 不同 pH值对毛状根生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

pH值	鲜重(克/瓶)	干重(克/瓶)
4.6	7.21±0.92	0.531±0.051
5.0	7.77±0.81	0.377±0.045
5.4	8.41±0.96	0.418±0.058
5.8	10.20±1.03	0.516±0.055
6.2	8.72±0.85	0.429±0.038
6.6	7.99±0.69	0.399±0.032
7.0	7.57±0.58	0.382±0.026
7.4	7.12±0.42	0.365±0.24

2.4 冠瘿碱分析:通过高压纸电泳,从菰蓝同源四倍体的毛状根中检测到了原植物中没有的甘露碱,表明发根农杆菌的 Ri T-DNA部分已在植物毛根中整合和表达

3 讨论

对于四倍体植物的农杆菌转化国内外尚未见报道 本研究采用四倍体双子叶植物菰蓝作为农根菌的转化对象 实验结果证明发根农杆菌同样能诱导四倍体植物产生毛状根 经诱导出的四倍体菰蓝毛状根具有典型二倍体植物毛根的特征,根毛多、无向地性且生长快速 筛选得到的优良毛状根株系于 MS液体培养基中悬浮培养两周左右时生物量可增加 35倍 通过比较实验,发现不同的培养条件对毛状根的生长影响很大,选择适当的培养条件可大幅提高毛状根生长速度。

非转化根的培养需补加生长素,因而抑制了其生产次生物质的能力^[12],而毛状根为激素自养,培养时不需加入任何外源激素,因此通过毛状根大规模培养从中提取有价值的次生代谢物具有广阔的前景 我们今后将进一步对四倍体菰蓝毛根中的活性成分及其含量进行深入的分析。

参考文献

1 乔传卓,等.植物学报,1989,31(9): 678

2 Kennedy A I, *et al.* Phytochemistry, 1993, 32 1446

3 Ishimara K, *et al.* Phytochemistry, 1992, 32 1577

4 丘德有,等.植物学报,1996,38(6): 439

5 费厚满,等.植物学报,1993,35(8): 626

6 Savary B T, *et al.* Plant Physiol, 1993, 102(Suppl.): 31

7 常振战,等.药学报,1998,33(11): 869

8 Birot A M, *et al.* Plant Physiol Biochem (Paris), 1987, 25 323

9 David C, *et al.* Plant Cell Rep, 1998, 7 88

10 Tanaka N, *et al.* Plant Cell Rep, 1985, 4 74

11 Morgan A T, *et al.* Plant Science, 1987, 49 37

12 Mano Y, *et al.* Agric Biol Chem, 1986, 50 2715

(1999-02-11收稿)