

sikokianum Franch. et Sav. ;裂片 5,具不规则的粗锯齿至细的啮状锯齿的种群为灯台莲 *A. sikokianum* Franch. et Sav. var. *serratum* (Makino) Hand. -Mazt. ;而裂片 7,边缘具粗锯齿或细牙齿者定为七叶灯台链 *A. sikokianum* Franch. et Sav. var. *henryanum* (Engl.) H. Li.我们在对浙江省天南星族药用资源调查时,发现此种植物的叶枚数、叶裂片的数目、形状、大小和叶缘状态均变异较大,叶 1~2,裂片 3,5,7,许多植株 2 枚叶的分裂情况也不同,裂片数分别为 3 和 5 或 5 和 7,裂片卵形、卵状长圆形或长圆形,有时侧裂片明显耳状,边缘有的仅中上部具细锯齿,鸟足状 7 裂叶有的全缘,裂片大小相差 4~5 倍,很难划清这些变种间的界限,由此可见,裂片数和叶缘形状在本种植物似乎处于变异中,尚未分化到足以成为划分变种依据的程度。我们对这 3 个变种新鲜块茎的过氧化物酶、酯酶和蛋白质进行了电泳分析,发现叶枚数、裂片数、叶缘形状和雌雄状态对分析结果的影响不大,这种差异小于不同产地对其结果的影响。Hiroyoshi 等对灯台莲花粉

粒扫描电镜观察结果表明:其原种和变种间的花粉粒形态特征无区别^[12]。本实验观察和比较了这 3 变种不同产地的新鲜标本叶的显微特征,发现它们的显微特征变异较大,但各变种间无明显区别。因此,我们认为该种上述 3 个变种宜予归并。

参考文献

- 1 李 恒. 云南植物研究,1986,8(4):363
- 2 李 恒. 中国植物志. 第十三卷第二分册. 北京:科学出版社,1979:100
- 3 李 恒,肖 溶,曾孝谦. 植物分类学报,1977,15(2):87
- 4 李 恒. 云南植物研究,1992,(增刊):7
- 5 胡世林. 药学报,1984,19(9):712
- 6 刘晓龙,郭新弧. 云南植物研究,1986,8(2):223
- 7 浙江药用植物志编写组. 浙江药用植物志. 下册. 杭州:浙江科技出版社,1980:1475
- 8 薛祥骥. 见林泉主编. 浙江省植物志. 第七卷. 杭州:浙江科技出版社,1993:327
- 9 Dahlgren R M T,Clifford H T. The monocotyledons: A comparative study. London:Academic Press Inc LTD,1981:90
- 10 French J C,Tonlison P B. Am J Bot,1983,70(5):756
- 11 Genua J M,Hillson C T. Ann Bot,1985,56:351
- 12 Hiroyoshi O,Murata J,Takahashi M. Sci Rep Tohoku Univ Fourth Ser(Biol),1983,38(3):219

(1999-09-130 收稿)

冬凌草愈伤组织诱导及细胞培养的研究

河南师范大学生命科学学院(新乡 453002) 李景原* 王太霞 杨相甫 张晋豫
河南农业大学农学系

李景原* 王太霞 杨相甫 张晋豫
李贺敏

摘 要 用组织培养、细胞悬浮培养和单细胞平板培养技术,诱导出冬凌草愈伤组织,并探讨了细胞悬浮培养时间、培养方法和接种密度对冬凌草单细胞平板培养植板率的影响。结果表明:从冬凌草叶和嫩茎诱导愈伤组织,以 MS+2,4-D 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基较好,愈伤组织诱导率高达 96.80%。用普通单细胞平板培养法培养冬凌草单细胞的植板率很低,而以悬浮培养 15~18 d 的单细胞为材料,接种密度为 5×10⁵ 个/毫升时,进行条件培养和看护培养,植板率达 21.63%。本研究结果可供利用细胞培养技术筛选冬凌草高产冬凌草素细胞株时参考。
关键词 冬凌草 愈伤组织 细胞悬浮培养 单细胞平板培养

Studies on the Induction of Calli and Cell Culture of *Rabdosia rubescens*

College of Life Science, Henan Normal University (Xinxiang 453002) Li Jingyuan, Wang Taixia, Yang Xiangfu and Zhang Jinyu

Department of Agronomy, Henan Agricultural University Li Hemin

Abstract Conditions for cell culture of *Rabdosia rubescens* (Hemsl) Hara. were studied with the aim to develop a new source of rubescensin for antitumor therapy. Calli were induced from the leaf and stem of *R. rubescens* and cultured either by cell suspension culture or unicellular plate culture. Factors affecting plate efficiency, such as cell suspension culture time, ways of plating and cell density were studied. Culture medium MS containing 1 : 0.5 ratio of 2, 4-D : NAA was found to be the most suitable medium for the induction of calli which attained an induction rate well over 96.8%. High plating efficiency could be obtained by plating at a density of 5×10⁵ cells/mL with monocells separated from 15-18 d cells. Result of

* Address: Li Jingyuan, College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang
李景原 男,1988年毕业于南京农业大学植物学专业,获硕士学位。河南省植物学会副理事长,主要从事植物资源研究与开发的工作,发表论文 20 多篇。现于西北大学攻读博士。

the present study may provide some reference for the screening of high yield cell strain for the production of rubescensin.

Key words *Rabdosia rubescens* (Hemsl) Hara. callus cell suspension culture unicellular plate culture

冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Hemsl) Hara. 又称碎米桠、冰凌草和冰凌花,是唇形科植物。1977年作为一种抗菌消炎、防癌抗癌的药用植物资源,收入《中华人民共和国药典》(一部)^[1]。近年的植物化学研究证明,冬凌草中所含的冬凌草甲素和冬凌草乙素具有防癌抗癌作用^[2]。冬凌草提取物可明显对抗环磷酰胺的致突变作用。本实验以我国冬凌草主产地之一(河南济源)生长的冬凌草为材料,对其进行组织和细胞培养,现将实验结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 愈伤组织的诱导和培养:取冬凌草叶和嫩茎,用肥皂水和自来水洗净后,吸干水分,先用70%酒精灭菌2 min,再用0.1%升汞灭菌10 min,无菌蒸馏水冲洗8次。将叶剪成边长约1 cm的小块,将嫩茎剪成长约1 cm的切段,分别接种到附加有不同植物激素的MS, White两种培养基上。在(23±2)℃,光照周期12 h/d,光强为1 500 lx条件下培养,筛选出适合诱导冬凌草愈伤组织的培养基和植物激素配比。诱导出的冬凌草愈伤组织每3周转接1次继续培养。

1.2 细胞悬浮培养:以生长旺盛、质地疏松的愈伤组织为材料进行细胞悬浮培养。在250 mL三角瓶中分别加入100 mL MS液体培养基,接种2 g鲜愈伤组织,在120 r/min恒温摇床上培养,培养温度为(23±2)℃。培养30 d后,收集并称取三角瓶的培养物,每瓶培养基中增加的细胞鲜重(FW)表示细胞生长速度。

1.3 条件培养基的配制:配制1.4%琼脂MS+2,4-D 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基,在121℃下灭菌15 min,冷却至35℃备用。在无菌条件下取培养15 d的冬凌草细胞悬浮培养物,离心10 min,取其上清液置于无菌瓶中备用。取无细胞上清液1份与1份上述备用的MS培养基充分混合,然后分装成5组,即CM₁~CM₅。其中CM₁不加热,CM₂~CM₅分别在50℃、80℃、100℃和121℃下加热10 min。

1.4 单细胞平板培养的制作与培养条件:将细胞悬浮培养物用双层不锈钢网过滤。收集过滤液并用血球计数器测量细胞密度,最终把细胞密度调整到每毫升5×10³个。将1份上述单细胞悬浮培养液与4

份35℃的固体条件培养基充分混合均匀,倒入无菌培养皿中,使培养基的厚度3~5 mm,盖上培养皿的上盖并用蜡膜密封。置于(23±2)℃,光照周期12 h/d,光强为1 500 lx条件下培养。

1.5 看护培养的制作与培养条件:配制1.4%琼脂MS+2,4-D 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基,在121℃下灭菌15 min,冷却至35℃备用。在无菌条件下取培养21 d的冬凌草细胞悬浮培养物1份,与1份上述培养基充分混合均匀,倒入无菌培养皿中。待培养基冷却凝固后,再在培养基上放一张与培养皿直径相同的圆形无菌滤纸。在滤纸上接种已调整好细胞密度冬凌草细胞悬浮培养液。置于(23±2)℃,光照周期12 h/d,光强为1 500 lx条件下培养。

1.6 实验参数:愈伤组织诱导率为产生愈伤组织的外植体数占全部接种的外植体数的百分比。植板率(PE)为培养4周后每个培养皿中新形成的细胞团数占接种的细胞数的百分比。细胞悬浮培养时,细胞生长速度以培养30 d后每瓶培养基中增加的细胞鲜重(FW)表示。每个实验结果重复3次,取其平均数。

1.7 冬凌草素的定性测定:以冬凌草甲素,冬凌草乙素作对照,用硅胶G硬板薄层层析,氯仿-丙酮(7:3)为展开剂,碘为显色剂,检测愈伤组织乙醚提取液中是否有冬凌草素。

2 实验结果

2.1 愈伤组织的诱导:在所实验的MS, White两种培养基上均诱导出愈伤组织,但不同培养基和不同植物激素组合愈伤组织诱导率有显著差异,所产生的愈伤组织生长状况也不相同(表1)。结果表明:MS+2,4-D 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基上愈伤组织诱导率最高,且愈伤组织质地疏松,生长较快,利于以后细胞悬浮培养。所得愈伤组织经薄层层析法定性检测含有冬凌草甲素和冬凌草乙素。

表1 不同培养基和不同植物激素组合愈伤组织诱导率的影响

培养基	植物激素组合(mg/L)	诱导率(%)	愈伤组织生长状况
MS	2,4-D 2+NAA 0.5	69.51	质地疏松,生长较快
	2,4-D 1+NAA 0.5	96.80	质地疏松,生长较快
	2,4-D 0.5+NAA 0.5	58.65	质地疏密,生长较慢
White	2,4-D 2+NAA 0.5	56.32	质地疏密,生长较慢
	2,4-D 1+NAA 0.5	96.84	质地疏密,生长较慢
	2,4-D 0.5+NAA 0.5	58.60	质地疏密,生长较慢

2.2 细胞悬浮培养:本实验比较了 MS,White 两种培养基和不同植物激素组合对冬凌草细胞悬浮培养生长速度的影响,细胞生长速度以培养 30 d 后每瓶培养基中增加的细胞鲜重(FW)表示。结果见表 2。

表 2 不同培养基和不同植物激素组合对细胞悬浮培养生长速度的影响

液体培养基	植物激素组合 (mg/L)	细胞生长量 (FW g/瓶)
MS	2,4-D 3+KT 0.1	4.50
	2,4-D 2+KT 0.1	6.25
	2,4-D 1+KT 0.1	5.52
	2,4-D 0.5+KT 0.1	3.56
	2,4-D 0.1+KT 0.1	2.62
White	2,4-D 3+KT 0.1	3.55
	2,4-D 2+KT 0.1	5.82
	2,4-D 1+KT 0.1	4.90
	2,4-D 0.5+KT 0.1	2.12
	2,4-D 0.1+KT 0.1	2.00

2.3 温度对条件培养基活性的影响:本实验对同源的无细胞培养液制备的条件培养基在不同温度下加热处理,制备一系列条件培养基,比较了各条件培养基上单细胞培养的植板率,结果见表 3。

表 3 温度对条件培养基活性的影响

条件培养基	CM ₁	CM ₂	CM ₃	CM ₄	CM ₅
植板率(%)	16.82	8.25	0.20	0.12	0.02

从表 3 可看出,在无菌条件下制备的,不经加热的条件培养基(CM₁)上,细胞平板培养的植板率最高,达 16.82%。在其它几种加热处理的条件下,随处理温度的升高,植板率逐渐降低。这一实验结果表明,高温能显著地破坏细胞悬浮培养液中的生长因子,降低条件培养基的活性。

2.4 细胞悬浮培养时间对植板率的影响:在条件培养基(CM₁)和看护培养情况下,比较了用悬浮培养 5~30 d 的冬凌草细胞作材料的植板率。结果见表 4。

表 4 细胞悬浮培养时间对植板率的影响

细胞悬浮培养时间(d)	5	10	15	20	25	30
条件培养植板率(%)	3.51	5.82	20.55	16.82	12.05	10.62
看护培养植板率(%)	3.83	5.75	21.63	19.01	16.56	11.85

实验结果表明,用细胞悬浮培养 10 d 以内的单细胞作材料,植板率很低。用细胞悬浮培养 15~20 d 的单细胞作材料,植板率较高。用细胞悬浮培养 30 d 的单细胞作材料,植板率也很低。

2.5 接种密度对植板率的影响:在条件培养基(CM₁)和看护培养情况下,比较了不同接种密度对冬凌草单细胞平板培养植板率的影响。结果见表 5。

表 5 接种密度对植板率的影响

细胞密度($\times 10^3$ 个/毫升)	1	2	3	4	5
条件培养植板率(%)	3.72	6.04	10.51	16.28	18.00
看护培养植板率(%)	4.81	6.75	11.63	16.06	17.25

由表 5 可看出,在条件培养基(CM₁)和看护培养情况下,冬凌草单细胞平板培养植板率随接种细胞密度的增大而升高。

3 讨论与分析

3.1 关于愈伤组织诱导的分析:诱导出愈伤组织,筛选最适合细胞生长的培养基和培养方法是利用植物细胞培养技术生产有用次生代谢产物的基础。本研究用 MS,White 两种培养基附加多种植物激素组合均能诱导冬凌草产生愈伤组织,但在不同培养基上诱导出愈伤组织的质量和生长速度有较大差别,其中以 MS+2,4-D 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基愈伤组织诱导率高达 96.80%。在这种培养基上产生的愈伤组织生长速度快,质地疏松,利于作细胞悬浮培养的材料。实验结果还表明,无论是诱导冬凌草愈伤组织还是进行细胞悬浮培养,在培养基中都需要加入适量的植物生长调节物质 2,4-D,适宜的浓度在 1.0~2.0 mg/L 之间,2,4-D 的浓度过高或过低都会降低愈伤组织的诱导率和生长速度。

3.2 关于单细胞平板培养的分析:植物单细胞平板培养技术即单细胞克隆技术是筛选高产细胞系的基础。然而,这项技术确实还存在一些问题,正如该技术的创始人贝格曼(Bergmann)指出的那样:“在单细胞平板培养植物细胞时,诱导细胞分裂和集落形成方面,通常存在重大问题”^[3]。本实验结果也表明,在冬凌草单细胞平板培养中,细胞悬浮培养时间、培养方式和接种细胞密度等诸多因子都能影响植板率。

实验结果证明,影响植物单细胞平板培养植板率的关键因子之一是培养基中是否有足够的对细胞生长和分裂有显著促进作用的活性成分即条件因子。用经高温灭菌的条件培养基培养冬凌草单细胞,其植板率很低。相反,无论是看护培养,还是用不经高温处理的条件培养基培养都能获得较高的植板率。植板率之所以随灭菌温度的提高而降低,是因为条件培养基中条件因子随高温灭菌而失活。

许多文献报道过细胞悬浮培养时间对植板率有重要影响。本实验结果证明,以悬浮培养不足 10 d 的冬凌草单细胞作材料进行单细胞平板培养,植板率很低。用培养 15~20 d 的冬凌草单细胞作材料进行单细胞平板培养,植板率显著提高。

接种细胞密度是影响植物单细胞平板培养植板率的又一重要因素。从实验结果看,植板率随接种细胞密度的增大而提高。但是,接种细胞密度越大,细胞之间的距离越小,细胞分裂不久,形成的克隆就彼此长合在一起,这就给分离起源于单细胞的无性系带来很大困难。因此,以筛选高产细胞株为目的设计植物单细胞平板培养时,不能为了提高植板率盲目增大接种密度,而应在保证适度植板率的前提下,改

善其它培养条件,尽可能降低接种细胞密度,以便分离起源于单细胞克隆。

参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:人民卫生出版社,1978:186
- 2 王太霞,李景原. 植物杂志,1997,3:9
- 3 孙敬三,桂耀林. 植物细胞工程实验技术. 北京:科学出版社,1995:150

(1999-10-12 收稿)

灵芝菌发酵培养基的优化及灵芝胞外多糖的分离纯化

南京理工大学化工学院(210094) 孙东平* 潘 锋 史小丽 杨树林

摘 要 用正交法研究了不同条件对灵芝菌生长影响,从中选出了灵芝菌液体深层发酵的优化培养基:葡萄糖 3.6%,蛋白胨 0.4%,pH 6.0,酵母膏 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,Vit B₁ 0.005%,每升发酵液产生干菌丝体 15.6 g,粗多糖 0.72 g。经葡聚糖凝胶层析对灵芝胞外多糖进行了分离纯化,共有 5 个组分,并用红外光谱、紫外光谱,气相色谱等手段进一步分析了灵芝胞外多糖的组成,结果表明灵芝胞外多糖系由甘露糖、果糖、葡萄糖通过糖 β -D-糖苷键构成。

关键词 灵芝 发酵 多糖 分离纯化

Selection of Optimal Medium and Extraction and Purification of *Ganoderma lucidum* Extracellular Polysaccharide

Chemical School of NUST (Nanjing 210094) Sun Dongping, Pan Feng, Shi Xiaoli and Yang Shulin

Abstract Optimal medium for deep layer fermentation of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst was selected and conditions for the isolation and purification of its extracellular polysaccharide studied for the purpose to develop a new source for the production of this valuable TCM. Factors influencing the growth of *G. lucidum* on different media were studied by orthogonal experimental design and polysaccharide isolated and purified by Sephadex gel filtration. The structural composition was analysed by UV, IR and GC chromatography. The best medium for the fermentation was found to be composed of glucose 3.6%, peptone 0.4%, yeast extract 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5% and VB₁ 0.005%, at a pH value of 6.0. 15.6 g dry mycellia and 0.72 g crude polysaccharide per liter can be obtained from the fermentation broth. The polysaccharide was composed of glucose, D-fructose and mannose. The method needs further scale up study.

Key words *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst fermentation polysaccharide isolation and purification

灵芝是我国古代劳动人民用之已久的一类珍贵的药用真菌,具有补中、固肾、补肺、止血的功用,对多种慢性病有一定疗效。灵芝多糖对肉瘤 S₁₈₀、肿瘤 AH-B,埃利希氏腹水瘤及腺瘤具有明显的抑制活性,并能迅速恢复和提高机体免疫能力,治疗爱滋病的报道更引人瞩目,掀起了一场“灵芝研究热”^[1]。

灵芝及其多糖广泛应用在医药、食品等领域,市

场需求量与日俱增,但目前灵芝多糖的生产几乎都是从子实体中提取,灵芝野生资源缺乏,人工栽培的周期长(2~3个月以上),占地面积大,又受季节限制,从而影响了灵芝的充分利用,而利用深层培养技术生产灵芝,周期短(7~10 d)、成本低、产量大,具有工业化的生产前景,选取合适的培养基、适当的分离纯化方法,提取灵芝多糖是本研究的最终目的。我

* Address: Sun Dongping, College of Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing

孙东平 男,1970年生,江苏灌云人,现为南京理工大学化工学院博士研究生,讲师,主要从事糖化学及微生物生理、生化研究工作,发表学术论文多篇,参与国家自然科学基金等多项科研工作。