

小叶丁香组织培养生成橄榄苦苷(I)

吴鸣建^{1,2},董建军²,张海艳^{1,2},郭唯²,赵天增^{1,2}

(1. 郑州大学化工学院,河南 郑州 450002; 2. 河南省生物技术开发中心,河南 郑州 450002)

橄榄苦苷(oleuropein)具有多种药理作用,如抗菌抗炎、抗病毒、抗真菌、抗癌、抗氧化、降血压与抗心律不齐、降血糖等^[1~6],是小叶丁香 *S. microphylla* Diels 的主要活性成分^[7]。研究表明,小叶丁香是一种很有潜力的药用植物,主要分布于河南、河北、陕西、山西、甘肃等地,生长在海拔 800~2 400 m 山地、沟内或崖石上,但由于采用这种野生植物的花作为主要药用部位,受地域与季节所限,自然资源较少,因此,对小叶丁香进行组织培养方面的研究,开辟新的资源途径具有重要意义。本实验选择了以小叶丁香为外植体进行组织培养生成橄榄苦苷的研究,为进一步解决资源问题探索有效途径。

1 实验部分

1.1 外植体的来源与选择:外植体采自河南省嵩县车村镇南山坡,经河南农业大学朱长山教授鉴定为木犀科丁香属 *Syringa* L. 植物小叶丁香 *S. microphylla* Diels。

选取生长良好、健康的小叶丁香的植物叶片、嫩茎、芽或根尖,先用自来水冲洗,再用 0.1% HgCl_2 溶液处理清洗后,用无菌滤纸吸干水分,将叶片切成正方形(5 mm×5 mm)、茎或根切成段(6~8 mm),置于无菌容器中备用。

1.2 愈伤组织的诱导:将消毒灭菌处理后的外植体放入分别附加植物生长调节剂并经过灭菌的培养基表面,置于培养箱中进行愈伤组织诱导。诱导条件为暗诱导(无光照)和光诱导(10 h/d),诱导温度为 25 ℃。

1.3 愈伤组织的继代培养:愈伤组织生长到一定时间后进行转接继代。选择生长良好、健壮的愈伤组织,并将大的愈伤组织切成小块(直径为 3~5 mm),放入相应的新培养基上继续培养。继代培养所选用的培养基为 LS 培养基或 MS 培养基,所用的植物生长调节剂列于表 1,培养条件与愈伤组织诱导条件相同。

1.4 生长周期与生长曲线的测定:将培养试样定期取出测定愈伤组织鲜重和干重。愈伤组织细胞生长

表 1 植物生长调节剂的种类与比例(mg/L)

Table 1 Varieties and proportions of plant growth regulators

编号	生长调节剂/(mg·L ⁻¹)				
	KT	2,4-D	NAA	IAA	6-BA
1	1.0~3.0	1.0~3.0			
2	1.0~2.0		1.0~3.0		
3	1.0~2.0		0.5~2.0	0.5~1.0	
4		1.0	1.0~3.0		
5		1.0	1.0		
6		1.0			1.0~3.0
7			1.0~2.0		1.0~2.0
8				1.0~2.0	1.0~2.0

量和生长倍数分别按下式计算:

愈伤组织生长量=收获鲜重-接种鲜重

愈伤组织增长率=收获干重-接种干重/接种干重

愈伤组织生长倍数=收获鲜重/接种鲜重

1.5 愈伤组织中橄榄苦苷的提取和含量测定:将收获的愈伤组织在 40 ℃ 烘干至恒重后研碎,加入无水乙醇或甲醇回流 3 次,每次 3 h,收集滤液,减压浓缩至干,样品采用文献所确定的 RP-HPLC 法测定愈伤组织中橄榄苦苷的含量^[8]。色谱柱为 Shim-pack CLC-ODS C₁₈柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(50:50),柱温 25 ℃,体积流量:1.0 mL/min,检测波长为 285 nm,进样量 10 μL。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织的不同细胞系的生长状况比较:外植体的不同部位诱导所产生的愈伤组织,在不同条件下进行培养形成的不同细胞系有所不同。实验结果表明,在加有 1 mg/L KT 和 1 mg/L NAA 的 LS 培养基上,嫩叶在诱导 5~7 d 后切口边缘开始膨大,7~9 d 有浅绿色愈伤组织出现,愈伤组织呈块状,较松散,触之易碎。而用幼茎诱导产生的愈伤组织则相对坚硬并有较深的绿色,含水量较低。图 1 为愈伤组织培养照片,不同条件下培养所得愈伤组织的生长状况比较列于表 2。从观察结果可知,选择小叶丁香的嫩叶为外植体,采用 LS 培养基,诱导产生的愈伤组织生长较好。其次为幼茎。

收稿日期:2004-08-02

作者简介:吴鸣建,女,博士,教授,主要从事有机化学、天然产物与制药工程方向的教学与研究。

Tel:(0371)5725915 E-mail:wumj@zzu.edu.cn

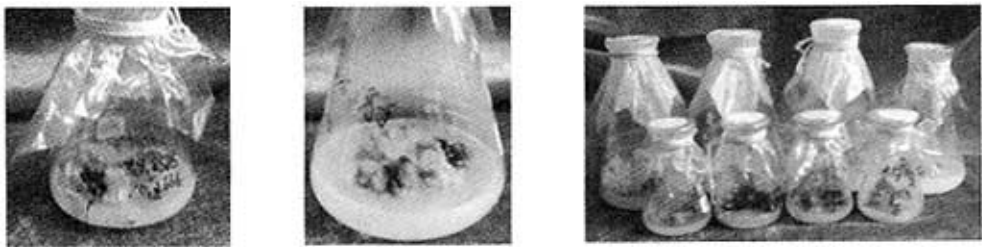


图 1 愈伤组织培养照片

Fig. 1 Pictures of callus culture

表 2 愈伤组织的形态特征和生长状况比较

Table 2 Comparison among form and growth of different calli

编 号	培养基	外植体	培养条件	形态特征	生长状况
11	LS	嫩叶	25 ℃,光照 10 h/d	质地较软,微黄色	+++
12	LS	幼茎	25 ℃,光照 10 h/d	质地较硬,微黄绿色	++
13	LS	嫩叶	25 ℃,暗培养	质地较软,白色	+
21	MS	嫩叶	25 ℃,光照 10 h/d	质地较软,微黄色	+
22	MS	幼茎	25 ℃,暗培养	质地较软,浅绿色	—
31	N ₆	幼茎	25 ℃,光照 10 h/d	质地硬,绿色	++
32	B ₅	嫩叶	25 ℃,光照 10 h/d	质地较软,黄色	+

2.2 外植体诱导形成愈伤组织及对诱导率的影响因素:外植体采集的不同时间、所选择的不同部位、不同种类的培养基与植物生长调节剂以及不同的诱导条件(温度、光照时间)对愈伤组织诱导率的影响结果分别列于表 3~8。

从实验结果来看,在 5、6 月份采集的外植体诱导率较高,可达到约 90%;选用嫩叶、幼茎和芽的诱导率为嫩叶>芽>幼茎,其中嫩叶诱导率>90%;在实验所选的 4 种培养基中,采用 LS 培养基并添加

表 3 外植体采集的不同时间对愈伤组织诱导率的影响;

Table 3 Influence in different collecting time of explants on induction rate of callus

采集时间/月份	接种外植体数	形成愈伤组织数	诱导率/%
4	46	30	65.2
5	69	62	89.8
6	65	56	86.1
7	60	42	70.0
8	45	28	62.2
10	28	9	32.1

表 4 外植体的不同种类对愈伤组织诱导率的影响

Table 4 Influence in different kinds of explants on induction rate of callus

外植体部位	采集时间/月	接种外植体数	形成愈伤组织数	诱导率/%
叶	5	68	62	91.2
茎	5	22	18	81.8
芽	5	17	15	88.2
叶	7	54	50	92.6
茎	7	20	14	70.0
芽	7	15	12	80.0

表 5 不同培养基对愈伤组织诱导率的影响

Table 5 Influence in different media on induction rate of callus

基本培养基	接种外植体数	形成愈伤组织数	诱导率/%	愈伤组织形态特征
MS	52	44	84.6	质地较软,黄白色
LS	65	65	100	质地较软,微绿色
B ₅	31	17	54.8	质地较硬,绿色
N ₆	30	9	30.0	质地较硬,黄绿色

表 6 不同植物生长调节物质对愈伤组织诱导率的影响

Table 6 Influence in different plant growth regulators on induction rate of callus

植物生长调节剂	接种外植体数	形成愈伤组织数	诱导率/%
KT+NAA	42	40	95.2
KT+2,4-D	33	19	54.5
KT+IAA	27	6	28.6
2,4-D+NAA	18	0	0
2,4-D+IAA	18	0	0
KT+NAA+IAA	21	16	76.2

表 7 不同培养温度对愈伤组织诱导率的影响

Table 7 Influence in different cultural temperature on induction rate of callus

培养温度	接种外植体数	形成愈伤组织数	诱导率/%
22 ℃	12	7	58.3
25 ℃	66	62	93.9
28 ℃	15	11	73.3

植物生长调节剂 KT 和 NAA,有利于愈伤组织的形成,其诱导率高于另外几种组合;培养条件亦对愈伤组织的诱导具有较大影响,实验结果表明,在 25 ℃、光照 10 h/d 时,诱导率较高,达到 93% 以上。

2.3 细胞生长曲线:愈伤组织培养的细胞生长曲线

表 8 光照时间对愈伤组织诱导率的影响
Table 8 Influence in illumination time
on induction rate of callus

光照时间/(h·d ⁻¹)	接种外植体数	形成愈伤组织数	诱导率/%
0 (暗培养)	14	0	0
10	36	34	94.4
24	12	8	66.7

如图 2 所示,所用的基本培养基为 LS 培养基,添加植物生长调节剂(PGR)为 KT 1.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L,培养温度 25 ℃,光照时间

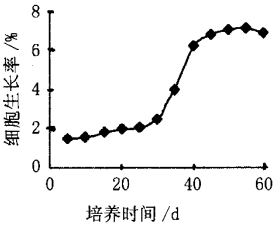


图 2 愈伤组织培养生长周期
Fig. 2 Growth period curve
of callus culture

10 h/d。从图中可以看出,在培养初期,细胞生长呈现出较长的生长延迟期,之后进入对数生长期,细胞迅速繁殖,增长速度明显加快,随着时间的延长和环境条件的改变(如营养物质的消耗、细胞生长空间的减少等),细胞生长经过减速期后逐渐进入平稳期(约为 40 d),最后进入衰亡期。

2.4 愈伤组织的不同细胞系中橄榄苦苷的鉴定和含量比较:将培养所得的愈伤组织烘干后用无水乙醇作溶剂进行回流提取,每次 3 h,重复 3 次,合并提取液并除去溶剂后,先用硅胶柱色谱和薄层色谱粗分,再用高压制备液相纯化得到橄榄苦苷,为淡黄色胶状物,mp 80~83 ℃,UV λ_{max}^{MeOH} nm: 282.0, 232。¹H-NMR 和¹³C-NMR 数据与文献中有关 oleuropein 的数据比较对照^[9],鉴定为橄榄苦苷。表 9 为用不同部位的外植体诱导产生的愈伤组织中橄榄苦苷的含量比较。

3 结论

选择小叶丁香不同部位作为外植体,在添加相应的 PGR 的 LS、MS、B₅ 和 N₆ 培养基上诱导产生出愈伤组织,考察了不同诱导条件、外植体的不同种类和不同时间对于愈伤组织的诱导率、生长状况和形态的影响,测定细胞生长周期,首次建立了小叶丁香的组织培养体系,为组织培养生成橄榄苦苷提供实验数据,有关组培实验条件的设计与优化将另文报道。

表 9 不同外植体所得愈伤组织的不同细胞系中
橄榄苦苷的含量

Table 9 Oleuropein in different cell lines
of callus from different explants

实验号	外植体	培养基	植物生长调节剂/(mg·L ⁻¹)	含量/(mg·g ⁻¹)
1	嫩叶	LS	KT 1.0, NAA 1.0	0.64
2	幼茎	LS	KT 1.0, NAA 1.0	0.31
3	叶芽	LS	KT 1.0, NAA 1.0	0.46
4	嫩叶	MS	KT 1.0, 2,4-D 1.0	0.25
5	幼茎	MS	KT 1.0, 2,4-D 1.0	0.17
6	叶芽	MS	KT 1.0, 2,4-D 1.0	0.21
7	嫩叶	N ₆	KT 1.0, NAA 1.0	0
8	嫩叶	B ₅	KT 1.0, 2,4-D 1.0	0.11
9	嫩叶	LS	KT 0.87, 2,4-D 2.0, NAA 1.1	1.03

经过溶剂回流提取、柱色谱和高压制备液相,从培养的愈伤组织中分离纯化得到目标产物橄榄苦苷,并且利用¹H-NMR 和¹³C-NMR 证实其结构。

References:

[1] Biisignano G, Tomaino A, Cascio R L, et al. On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51(8): 971-974.
[2] Aziz N H, Farag S E, Monsa L A, et al. Comparative anti-bacterial and antifungal effects of some phenolic compounds [J]. *Microbios*, 1998, 93(374): 43-54.
[3] Metz G. Medical effects of polyphenols [J]. *Pharm Ztg*, 2000, 145(6): 1278.
[4] Visioli F, Romani A, Mulinacci N, et al. Derivs, antioxids and other biological activities of olive mill wastewaters [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(8): 3397-3401.
[5] Circosta C, Occhiuto F, Gregorio A, et al. Cardiovascular activity of young shoots and leaves of *Olea europaea* L. and oleuropein [J]. *Plant Med Phytother*, 1990, 24(4): 264-277.
[6] Trovato A, Forestieri A M, Lank L, et al. Hypoglycemic activity of different extracts of *Olea europaea* L. in rats [J]. *Plant Med Phytother*, 1993, 26(4): 300-308.
[7] Wu M J, Zhao T Z, Zhang H Y, et al. Studies on the chemical constituents of *Syringa pubescens* (1) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(1): 7-9.
[8] Wu M J, Wang H S, Zhang H Y, et al. Determination of oleuropein in the calli of *Syringa pubescens* Turcz. by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (sppl): 201-202.
[9] Zhao T Z, Yin W P, Zhang H Y, et al. NMR study on oleuropein [J]. *Chin J Magn Reson* (波谱学杂志), 2002, 19 (1): 57-61.

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅