

三尖杉愈伤组织培养的研究

许金光 刘长江* 岳喜庆

(沈阳农业大学食品学院 沈阳 116110)

摘要 以三尖杉幼茎为培养材料,诱导出愈伤组织,并分析了不同的生长素组合、温度、糖浓度、接种量、活性炭等因素对愈伤组织诱导和生长的影响,结果表明,NAA激素组合比2,4-D更适合三尖杉愈伤组织的诱导,在25±1℃、3%蔗糖、0.75%琼脂、完全黑暗的条件下愈伤组织诱导率可达90%以上。在100ml的容量瓶中,2.0g的接种量适合三尖杉愈伤组织的继代培养,同时,一定量的活性炭可以适当改善愈伤组织的褐化状况。

关键词 三尖杉 愈伤培养

中图分类号 Q813

三尖杉(*Cephalotaxus fortunei* Hook. f)属于三尖杉属,分布于东亚及中南半岛北部,主产中国。三尖杉现存资源稀少,加上其雌雄异株,因此,天然更新极其缓慢。国外自1969年开始对三尖杉属植物进行研究,1972年发现提取物中有抗肿瘤成分^[1];目前,抗癌活性成分含量较高^[2]。日本粗榧、海南粗榧、三尖杉是国际上研究热点之一^[2~6];1971年,我国开始对三尖杉进行研究,迄今已经提取了30~40种生物碱^[7],其中三尖杉酯碱(harringtonine)和高三尖杉酯碱(homoharringtonine)已用于临床治疗急性白血病和实体瘤^[8];目前这些药物来源全部靠从三尖杉植物中提取相关成分来获得,显然,在当前无法通过人工合成获取这些药物^[9]的前提下,仅仅靠从植物中提取这些药物不仅破坏了三尖杉资源和生态平衡,也根本无法满足人们日益增长的需要,而植物细胞培养法由于其不受自然条件限制、不破坏自然资源以及便于提取分离纯化等优点而成为当今研究热点。本文通过对三尖杉愈伤组织诱导研究,为进一步获得高产三尖杉细胞培养系并最终完全通过细胞培养来获得目标产物打下了良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

三尖杉(*Cephalotaxus fortunei* Hook. f)采自中国科学院大连化学物理研究所

1.2 培养基

以MS为基本培养基,补加不同浓度、不同组合的激素和蔗糖,0.75%琼脂,灭菌前调pH值至5.7~5.8,115℃灭菌30min备用。

1.3 消毒与接种

选取直径2~4mm的幼茎,用流水洗净,去芽片,用70%乙醇浸泡30~40s,再用0.1%升汞(HgCl₂)消毒12min,

然后用无菌水冲洗5~8次,每次约1min,最后在无菌条件下将已经消毒的幼茎剪成1~1.5cm的切段,接种于预先配制的固体培养基中,在暗培养条件下分别于20℃、25℃、30℃培养。

1.4 愈伤组织的生长参数

接种鲜重=接种后瓶重-接种前瓶重

收获鲜重=收获前瓶重-收获后瓶重

鲜重增长率=(收获鲜重-接种鲜重)/接种鲜重

1.5 HPLC定性检测愈伤组织中的有效成分

将愈伤组织在60℃烘箱中烘干至恒重,研成细粉,称取1g,按1:1的比例与氨水搅拌混合,然后氯仿提取24h后过滤,滤液浓缩至干,甲醇2ml定容待测;对照品均来自中国药品生物制品检定所。

色谱分析条件:色谱柱:YWG-C₁₈ H₃₇ 250mm×4.6mm;流动相:0.08mol/L醋酸铵-甲醇(55:45)溶液;检测波长:290nm;流速:0.8ml/min。

2 结果与讨论

2.1 激素对愈伤组织诱导的影响

三尖杉幼茎接种到以MS为基本培养基补加不同激素组合的培养基中(表1),在3%糖浓度、0.75%琼脂、pH5.8的培养条件下观察愈伤组织诱导情况;着重研究了不同激素组合对三尖杉愈伤组织诱导率的影响(表2)。

表1 诱导愈伤组织的激素组合*(mg/L)

Table 1 The combination of different hormone inducing the calli of the *Cephalotaxus fortunei* Hook. f

	1	2	3	4	5	6
NAA	1.0	3.0	5.0			
2,4-D				1.0	2.0	3.0
KT	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15

*空白处代表“零”

收稿日期:2006-03-29 修回日期:2006-04-06

* 通讯作者,电子信箱:jgxu002@163.com

表 2 不同激素组合对愈伤组织诱导率的影响*

Table 2 Effect of different hormone combination on the inductivity of callus

	1	2	3	4	5	6
接种外植体数/个	146	127	78	94	132	155
15days 诱导率(%)	31	88	40	19	13	21
30days 诱导率(%)	35	90	52	19	14	21

* 表中数据均包括染菌外植体数。

由表 2 可知,两种激素组合对三尖杉愈伤组织诱导率具有明显差别,其中 2 号组合诱导率最高,NAA 组合愈伤组织诱导率明显好于 2,4-D,且 NAA 组合愈伤组织长势非常好,呈淡黄色、黄色和浅绿色,愈伤组织较疏松。

2.2 温度对愈伤组织的影响

以 MS 为基本培养基,补加表 1 中组合 2 的激素配比,另加 3% 蔗糖、0.75% 琼脂,调 pH 至 5.8,在该培养基中接种三尖杉外植体,观察愈伤组织诱导率,结果见表 3。

表 3 温度对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of temperature on the inductivity of callus

培养温度	20℃	25℃	30℃
外植体数/个	20	36	27
30d 愈伤组织诱导率	65%	98%	42%
生长状况	较好	最好	最差

从表 3 可见,温度对愈伤组织具有较大影响,从 30d 统计结果可以看出,相对于低温,三尖杉愈伤组织对高温更为敏感;25℃ 时三尖杉愈伤组织诱导率最高,长势旺盛。在其它温度下,虽也可诱导愈伤组织,但诱导率低,长势缓慢,不适合三尖杉愈伤组织诱导。

2.3 糖浓度对愈伤组织诱导的影响

碳源含量即糖浓度也是影响愈伤组织诱导率的一个重要因素;选择合适生理碳源和浓度对愈伤组织诱导极为重要,表 4 列出了不同蔗糖浓度对愈伤组织诱导情况,其它培养条件为以 MS 为基本培养基,激素组合为表 1 组合 2,补加 0.75% 琼脂,pH5.8,统计结果为观察 30d 后结果。

表 4 蔗糖浓度对愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of the sugar concentration on induction of callus

糖浓度	0.5%	1.0%	3.0%	5.0%	7.0%
外植体数/个	132	101	98	144	128
30d 愈伤组织诱导率	29%	63%	89%	76%	43%
愈伤组织生长状态	最不好	较好	最好	较好	较次

本研究以蔗糖为生理碳源,研究发现 3% 蔗糖浓度最适合三尖杉愈伤组织诱导,愈伤组织长势旺盛,诱导周期短,其他浓度诱导率低,生长萎缩,长势不旺盛。

2.4 活性炭(AC)对愈伤组织生长速度的影响

活性炭对三尖杉愈伤组织生长有一定影响,在不添加 AC 的培养基中,愈伤组织诱导出来以后,会有明显褐化现象,且生长比较缓慢。这是因为愈伤组织在生长过程中不断向培养基中分泌一些褐色物质,最终抑制了愈伤组织的生长。在本研究中,尝试添加了 0.1% 的 AC,结果发现,褐化状况有了一定程度的改善(图 1),原因可能是 AC 吸附了培养基中的一些酚类化合物,而这些化合物是导致细胞褐化和生长缓慢的原因之一。

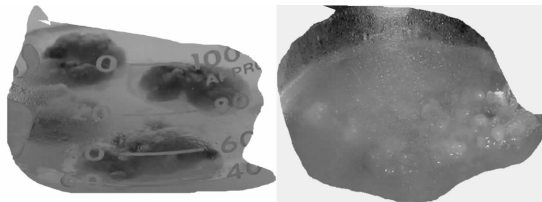


图 1 AC 对三尖杉愈伤组织生长的影响

Fig. 1 Effect of AC on the growth of callus

2.5 接种量对愈伤组织生长的影响

培养细胞在开始分裂增殖前,需要一个最低临界密度,这是因为细胞分裂启动,需要细胞内一种称为条件因子物质达到一定内源水平^[7];本试验按照优化后的培养条件对三尖杉愈伤组织进行继代培养,将不同接种量接种到含 40ml 固体培养基的 100ml 三角瓶中,在 30d 时,对三尖杉愈伤进行收获称重,结果见图 2。

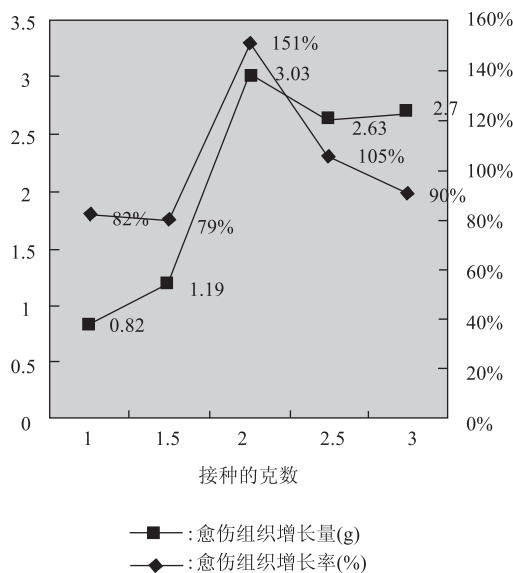


图 2 不同的接种量对愈伤组织生长的影响

Fig. 2 Effect of different inoculation weight on the growth of callus

从图 2 可知,无论是增长量还是增长率均在接种 2.0g 时达到了最高点,而多于或少于 2.0g 均出现较大幅度下降。

滑,显然,2.0g接种量比较适合三尖杉愈伤组织培养。

2.6 愈伤组织的生长动力学

以 MS 为基本培养基,补加 3% 蔗糖、0.75% 琼脂、0.1% 活性炭,将 pH 调至 5.8,接种 2.0g 色泽鲜艳,质地疏松愈伤组织到新鲜培养基中,在 25℃ 下进行暗培养;通过对不同时间段愈伤组织称重,得到三尖杉愈伤组织生长周期曲线,结果如图 3。

从图 3 中可以看出,三尖杉愈伤组织生长停滞期为 7~9d,对数生长期为 8~10d,稳定期为 6~9d,培养周期为 30d。

2.7 HHT 在愈伤组织中的定性分析

用 HPLC 法对所诱导的愈伤组织进行检测,以确定其中是否含有有效生物碱,结果表明,愈伤组织含有一定量的三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱等有效成分,表明我们的试验是有意义和价值,详见图 4。

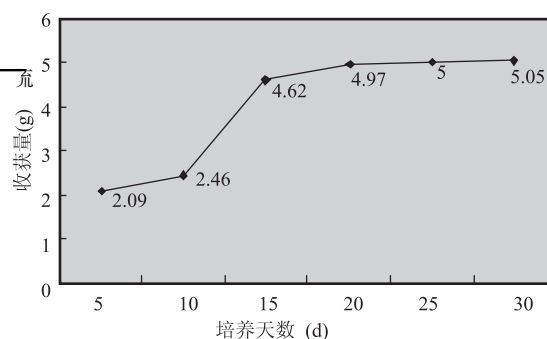


图 3 三尖杉愈伤组织生长动力学曲线

Fig. 3 The growth curve of callus of *Cephalotaxus fortunei* Hook. f

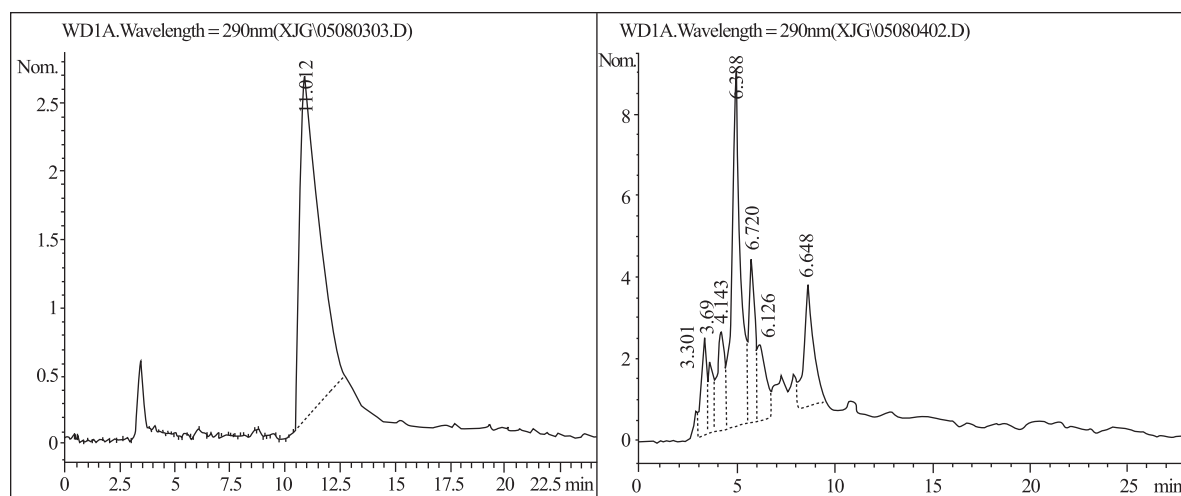


图 4 HPLC 定性分析图谱

Fig. 4 HPLC determination

3 讨论

3.1 诱导培养基的选择

相对于 2,4-D, NAA 在三尖杉愈伤组织诱导过程中作用更为重要,其质量浓度大小显著影响三尖杉愈伤组织诱导率,但是在实验过程中发现,当诱导愈伤组织培养到 3~6 代时,其生长速度和刚诱导相比,有放缓迹象。显然,三尖杉愈伤组织诱导培养基可能并不能长期用作继代培养基来进行三尖杉愈伤组织大量培养,这就需要在解决了三尖杉愈伤组织诱导培养基后,需要下一对其继代培养基进行优化。

3.2 AC 对培养过程中某些成分的影响

AC 具有较强吸附性,在细胞培养过程中可以吸附并去除培养基中有害成分,特别是蔗糖在高温灭菌过程中产生的 5-羟甲基糠醛,但同时它也吸附培养基中生长调节物质、Fe-EDTA、VB₆、叶酸和烟酸等有益物质,将来对继代培养基优化可以把 AC 作为一个影响因子,对其在

培养基中含量进行系统优化,以减少其对培养基中有益成分影响。

3.3 褐化的愈伤组织在继代培养过程中的表现

正常植物细胞愈伤组织继代大多是挑选长势旺盛、色泽鲜艳的愈伤组织接种到新鲜培养基中,但是在本研究偶尔发现,那些完全没有褐化色泽鲜艳的愈伤组织接种到培养基上后,其长势反而没有含有少量褐化愈伤组织细胞长势良好,这就是说,对于三尖杉而言,可能褐化并不总是有害。

参考文献

- [1] Pharmasi J, Powell R G. Structures of harringtonia alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*. *Phytochemistry*, 1972, 11 (4): 1467~1472
- [2] Takana I, Yasuda I, Nishijima M. Cephalotaxidine, a novel dimeric alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea*. *Tetrahedron Letters*, 1996, 37(39): 7053~7054

- [3] Bocar M, Jossang A, Bodo B. A new alkaloids from *Cephalotaxus fortunei*. J Nat Prod, 2003, 66: 152~154
- [4] Morita H, Arisaka M, Yoshida N, et al. Cephalozomines A-F, potent cytotoxic alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*. Tetrahedro, 2000, 56: 2929~2934
- [5] Takana I, Yasuda I, Nishijima M, et al. Ester-type cephalotaxus alkaloids from *Cephataxus harringtonia* var. *drupacea*. Phytochemistry, 1997, 44(4): 735~738
- [6] Kobayashi J, Yoshinaga M, Yoshida N, et al. Cephalocyclidin A, a novel pentacyclic alkaloid from *Cephalotaxus harringtonia* var. *nana*. J Org Chem, 2002, 67: 2283~2286
- [7] 朱太平. 三尖杉植物生物碱研究及化学分类问题. 植物分类学报, 1979, 17: 7~20
- [8] Smith C R, Mikolajczals K L, Powell K G. Anticancer Agents Based on Natural Product Models. New York: Academic Press, 1980

Study in Callus Culture of *Cephalotaxue fortunei* Hook. f

XU Jin-guang LIU Chang-jiang YE Xi-qing

(College of Food Science, Shenyang Agriculture University Shenyang 116110, China)

Abstract Callus were induced from *Cephalotaxue fortunei* Hook. f, the effect of hormone, temperature, sugar concentration, active carbon and quantity of inoculation on the inductivity and growth of callus were studied. Under the condition of 3% sugar concentration, 0.75% agar concentration, and $25 \pm 1^\circ\text{C}$, the rate of callus inductivity reached to 90%. The optimum weight of inoculation in the flask of 100ml is 2.0g, at the same time, active carbon can reduce the effect of browning to a certain extent.

Key words *Cephalotaxus fortunei* Hook. f Callus culture