

乌柏毛状根培养与次生代谢产物累积研究

黄素梅^{1,2}, 石丸幹二²

(1. 广西农业科学院 生物技术研究所, 广西 南宁 530007; 2. 佐贺大学 农学部, 日本 佐贺 840-8502)

摘要:利用发根农杆菌 ATCC 15834 诱导获得乌柏毛状根, 研究了不同培养条件对乌柏毛状根生长及次生代谢产物累积的影响。结果表明: 乌柏毛状根生产量随培养时间的增加而增加, 在第 6 周时达到最大产量(0.6668 g/瓶, DW); 1~4 周内暗培养更利于毛状根的生长, 其后则光照培养更好; 在相同培养时间内, 毛状根在 B5 和 1/2MS 基本培养基上产量大于 1/4MS、1/8MS 及 WP 培养基; HPLC 测定结果表明, 1/4MS 较其它培养基更利于多酚类代谢产物的累积。

关键词:乌柏; 毛状根; 培养; 次生代谢产物; 累积

中图分类号:S 718.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)22-0103-03

乌柏(*Sapium sebiferum*)为大戟科乌柏属乔木, 其根、茎、叶及种子均可入药。现代药理试验表明, 乌柏具有抑菌消炎、降压、降胆固醇等多种生理活性。这些生理活性与其含有的多酚、萜类等活性代谢成分密切相关^[1-3]。近年, 乌柏活性代谢成分的研究受到越来越多的关注^[3-7]。国外研究发现, 乌柏树皮及离体培养的愈伤组织中含有老鹳草素(Geraniin)、绿原酸等多种活性代谢产物^[7-8]。据《陆川本草》及《广西民间常用草药》记载, 乌柏的主要药用部位为根, 它具有清热解毒、消肿、利尿通便等作用, 主治水肿、肝硬化等病症^[9]。但直接采集乌柏根会对植株造成极大的伤害, 因此有必要探索其它的乌柏根活性物质的生产途径。

用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)感染宿主植物, 可诱导产生的毛状根, 其生长无需激素, 而且生长迅速、周期短, 次生代谢产物含量稳定。目前, 利用毛状根生产次生代谢产物的技术已经在一些植物上得到成功应用^[10-11]。但较少有木本植物成功转化的报道^[11]。迄今为止, 关于乌柏毛状根的诱导国内外均未见报道。如果能在该领域取得突破, 对减少乌柏资源的毁坏性采集, 实现资源保护与可持续性开发利用等具有极其重要的意义。

该试验研究了培养条件对乌柏毛状根生长、次生代谢产物累积的影响及主要次生代谢成分的累积规律, 探讨利用乌柏毛状根培养产生有用次生代谢物质的可行性, 为利用基因工程技术调控乌柏次生代谢产物的合成提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要仪器与试剂 岛津 LC-10A 高效液相色谱仪; 头孢噻肟钠(Claforan)(购于 Hoechst Pharmaceuticals and Chemicals K K); 没食子酸(Gallic acid)及老鹳草素(Geraniin)纯品(由佐贺大学农学部植物代谢解析研究室分离、鉴定); 乙腈为色谱纯, 甲醇为分析纯。

1.1.2 菌株 发根农杆菌菌株 ATCC 15834 为佐贺大学农学部植物代谢解析研究室提供。发根农杆菌培养于 YEB 固体培养基上备用。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体及无菌苗的制备 乌柏种子采集于日本佐贺大学校园内, 将种子表面的蜡质去掉后, 用浓硫酸浸泡 30 min 后取出, 用清水将种子表面的浓硫酸冲洗干净, 再用 10% NaClO 表面消毒 10 min, 用无菌水冲洗干净后接入 1/2MS 固体培养基中。约 1 周后种子发芽, 长出无菌小苗用于毛状根的诱导。

1.2.2 毛状根的诱导及培养 将乌柏小苗切成长约 1~1.5 cm 的茎段, 用农杆菌直接涂抹切口处, 将经农杆菌感染后的茎段, 接种于 1/2MS 固体培养基上。15~20 d 后在茎段的菌感染部位陆续长出 3~5 条 1~2 cm 的根(图 1), 将这些根转至含有 0.5 g/L 头孢噻肟钠(Claforan)的 1/2MS 培养基上除菌, 5~7 d 转接 1 次, 2~3 次反复除菌后观测能在该培养基生长并伸长的为毛状根, 而不定根则逐渐变黄死亡。将毛状根转入不含抗生素的 1/2MS 固体培养基上, 待毛状根长到 5~6 cm 后, 将毛状根切成 2 cm 的小段接入液体培养基中进行振荡培养(图 2)。

1.2.3 生长量测定 接种后一定时间, 将液体培养基中的毛状根取出, 用滤纸吸干毛状根表面的液体后, 称

第一作者简介: 黄素梅(1974-), 女, 博士, 副研究员, 现主要从事药用植物资源开发利用等方面的研究工作。E-mail: sumeihuang2002@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2011-08-01

其鲜重,再将其冷冻干燥后测重量。

1.2.4 毛状根中多酚类物质的测定 将 10 mg/mL 毛状根甲醇提取液用于 HPLC 检测。HPLC 检测条件为:色谱柱为:TOSOH ODS 80Ts (4.6 mm i. d. × 250 mm) (TOSOH Corporation),流动相:水(含 1 mM Tetrabutylammonium chloride)(pH 2.9,用醋酸调节)-乙腈(V/V: 90 : 10 → 20 : 80,保持 30 min),流速: 0.6 mL/min,柱温:40℃,检测波长:280 nm(UV)。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对毛状根生长的影响



图 1 诱导产生的毛状根

Fig. 1 Introduced hairy roots

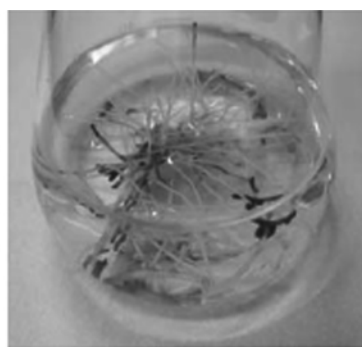


图 2 继代的毛状根

Fig. 2 Sucultured hairy roots

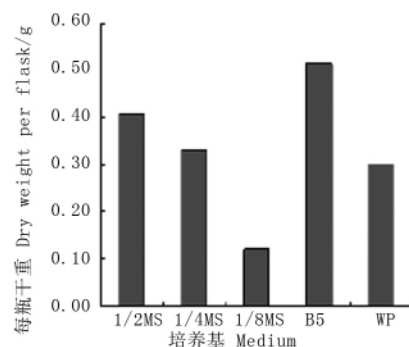


图 3 不同培养基中毛状根生长量

Fig. 3 Production of hairy roots on different basal medium

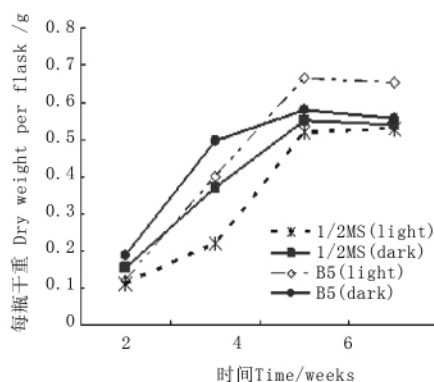


图 4 毛状根生长曲线

Fig. 4 Growth curve of hairy roots

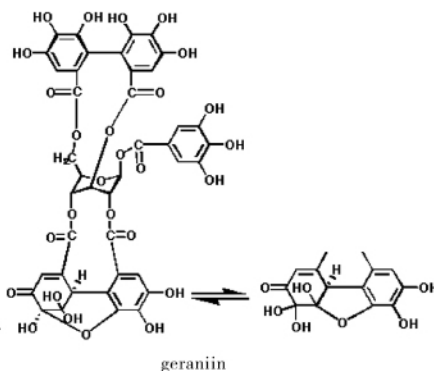


图 5 老鹳草素化学构造式

Fig. 5 Chemical structure of geraniin

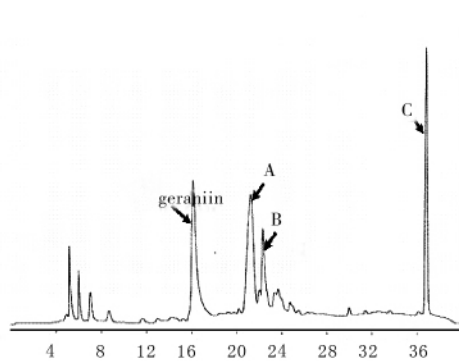


图 6 乌柏毛状根的 HPLC 图谱

Fig. 6 HPLC profile of hairy roots

2.2 毛状根的生长曲线

将毛状根切成长约 1.5 cm 的小段,转入不含植物激素的 1/2MS 及 B5 培养基中进行光照或暗培养,每 2 周将毛状根取出,冷冻干燥后测重量。从图 4 可看出,暗培养比光照培养对毛状根的生长稍好,但在 B5 培养基中,在 0~4 周时光照培养更利于毛状根的生长,之后则光照培养优于暗培养。在 0~6 周内,所有的毛状根生长均随时间的增加而增加,第 6 周时毛状根的生长量达到最大,其中以在光照培养下 B5 培养基中的毛状根生长量最大(0.6668 g/瓶,DW),其它各处理之间相差不大。第 6 周后毛状根生长量几乎不再增加,因

将毛状根转入不同的基本培养基中进行培养。结果发现,毛状根在 1/2MS 及 B5 培养基中生长速度及表现要优于其它培养基,在 1/8MS 培养基中生长极慢,B5 培养基中的毛状根较为粗壮,而其它培养基中的毛状根则比较细长。1 个月后分别测其重量(图 3)。由图 3 可看出,毛状根在 B5 培养基中的生长量最大,其次为 1/2MS 培养基,其干重中分别达到 0.52、0.41 g/瓶,而毛状根在 1/8MS 培养基上生长最差,其干重仅为 0.12 g/瓶。因此,此后的试验以 B5 和 1/2MS 为基本培养基进行毛状根的培养。

此第 6 周为毛状根的最佳收获时间。

2.3 不同培养基对代谢产物累积的影响

将等量的毛状根接种于 1/2MS 等 5 种培养基上,1 个月后测其干重及次生代谢产物含量。经测定(测定条件见 1.2.4)得知,老鹳草素(图 5)是乌柏毛状根主要代谢成分之一,除此之外还有另外几种未知成分 A、B、C(图 6),其结构性质有待进一步深入研究。

毛状根在不同培养基中其代谢产物的累积相差较大(图 7)。从图 7 可看出,毛状根在 1/4MS 培养基中酚性代谢产物的产量最高,其次是 WP、B5、1/2MS,最差是 1/8MS 培养基。从图 3 可看出,在 1/4MS 培养

基上的毛状根生长量不及 B5 和 1/2MS,但其生长状况良好,因此为了获得代谢产物含量高的毛状根,亦可采用 1/4MS 培养基培养;若需快速增殖毛状根材料并同时获得高含量的代谢产物,则可在培养前期用 B5 和 1/2MS,后期用 1/4MS 培养基相结合的途径进行毛状根的规模化培养。

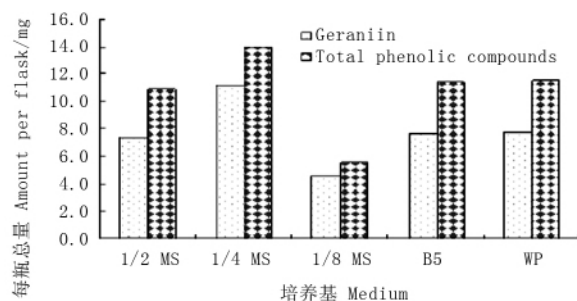


图 7 不同培养基中毛状根的酚性物质生产量

Fig. 7 Production of phenolic compounds in hairy root on different basal medium

3 结论

该研究成功建立了乌桕毛状根的诱导及培养体系,并对毛状根培养的条件及其代谢产物累积规律进行初步研究。该试验结果表明,在 1/4MS 培养基中乌桕毛状根酚性代谢产物的产量最高,而在 B5、1/2MS 培养基中毛状根的生长较快,生产量较大。

参考文献

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 44-57.
- [2] 陈玉, 杨光忠, 张世琰, 等. 乌桕化学成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(5): 114.
- [3] Huang S, Toshihiro F, Yoshida Miyako, et al. A new chalcone glycoside from *Sapium sebiferum* [J]. Journal of Natural Medicines, 2007, 61(3): 339-341.
- [4] Neera S, Ishimaru K. Tannin production in cell cultures of *Sapium sebiferum* [J]. Phytochemistry, 1992, 31(3): 833-836.
- [5] Neera S, Arakawa H, Ishimaru K. Tannin production in *Sapium sebiferum* callus cultures[J]. Phytochemistry, 1992, 31(12): 4143-4149.
- [6] Kouno I, Saishoji T, Sugiyama M, et al. A xylosylglucoside of xanthoxylin from *Sapium sebiferum* root bark [J]. Phytochemistry, 1983, 22(3): 790-791.
- [7] Hsu F L, Lee Y Y, Cheng T. Antihypertensive activity, of 6-galloyl-D-glucose, a phenolic glycoside from *Sapium sebiferum* [J]. Nat Prid, 1994, 57(2): 308-312.
- [8] Bajaj Y P S. Biotechnology in Agriculture and Forestry [M]. Vol. 28. New York: Medical and Aromatic Plants VII. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994: 426-444.
- [9] 彭小列, 易能, 程天印. 乌桕的药用成分与药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(3): 1-2.
- [10] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 279-281.
- [11] 姜伊娜, 武天龙. 毛状根的研究进展及应用[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(1): 27-32.

Study on Cultivating the Hairy Roots of *Sapium sebiferum* and its Second Metabolites Accumulation

HUANG Su-mei^{1,2}, ISHIMARU Kanji²

(1. Institute of Biotechnology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007; 2. College of Agriculture, Saga University, Saga, Japan 840-8502)

Abstract: Hairy roots were induced from *Sapium sebiferum* by using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. Influence of cultural conditions on the growth of hairy roots and its second metabolites accumulation were studied. The results showed that the yield of hairy roots increased with the cultural time and reached the maximum (0.668 g/flask, dry weight) at the sixth week; the yield of hairy roots in B5 and 1/2MS was more than in 1/4MS, 1/8MS or WP basal medium; HPLC detection results showed that the polyphenols accumulation in 1/4MS was better than those in other medium.

Key words: *Sapium sebiferum*; hairy roots; culture; second metabolites; accumulation