

白豆杉细胞培养*

康强胜 卢大炎 李俊 李洪林 吴玉兰

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074)

Cell culture of *Pseudotaxus chinensis* (Cheng) Cheng Kang Qiangsheng, Lu Dayan, Li Jun, Li Honglin, Wu Yulan (Wuhan Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074), *J. Plant Resour. & Environ.* 1999, 8(4): 59~60

Callus cultures of *Pseudotaxus chinensis* (Cheng) Cheng were induced using different tissue explants including young stems and needles. The effects of different concentrations and ratios of auxin and cytokinin on callus growth were analyzed. Cell suspensions of stem callus were grown for 30 days in shake flasks containing MS medium supplemented with 5 mg/L NAA, 1 mg/L BA and 3% sucrose. Through the growth cycle, fresh and dry weight accumulation, pH variation in the medium, and the uptake of sucrose was examined. The dry weight of the cell cultures approached its maximum value on the 25th day or so. A biomass yield of 16.67 g/L was obtained. Total carbohydrate uptake was closely associated with the increase in dry biomass. The average sucrose consumption rate was 0.83 g/L·d. The amounts of taxol in the cell were determined by reversephase high performance liquid chromatography. The average amount of taxol in the dry biomass was 9×10^{-8} g/g.

关键词 白豆杉;细胞培养;紫杉醇

Key words *Pseudotaxus chinensis* (Cheng) Cheng; cell culture; taxol

紫杉醇是从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia* (Cheng) Cheng)树皮中分离出来的二萜类生物碱^[1],现已成为知名抗癌药物。紫杉醇主要来源于红豆杉属植物。白豆杉(*Pseudotaxus chinensis* (Cheng) Cheng)属红豆杉科白豆杉属,为我国特有植物^[2]。白豆杉中是否含有紫杉醇,目前结论不一^[3,4]。开展白豆杉细胞培养研究,可证明白豆杉细胞是否具有合成紫杉醇的能力,进而有可能扩大紫杉醇的来源并为白豆杉分类地位的确定提供依据。有关白豆杉细胞培养还未见报道。

1 材料与方 法

1.1 愈伤组织诱导及培养 白豆杉幼苗采自庐山植物园。用嫩茎及幼叶作外植体,常规方法消毒后接于不同培养基上,于22~25℃黑暗培养,每4周转代1次。

1.2 悬浮培养 选择生长旺盛,白色透明的茎来源愈伤组织接种到含有90 mL培养基的250 mL锥瓶中。接种量(鲜重)5 g/瓶。培养基MS+1 mg/L BA+5 mg/L NAA+3%蔗糖,pH 5.8。摇床转速120 r/min,温度22~25℃,黑暗培养,每3周转代1次。

1.3 培养物的产量、可溶性糖及pH的测量 愈伤组织直接测鲜质量。悬浮培养每3 d左右取样1次,用滤纸滤去培养基后立即测鲜质量,然后于60℃烘24 h,称干质量。用数显酸度计测滤液中pH值。滤液中可溶性总糖用蒽酮法测定,设培养基中可溶性总糖初始浓度为100%。

1.4 紫杉醇的检测 悬浮培养物于60℃烘干至恒重,粉碎后过60目筛。用95%乙醇热回流提取,回收乙醇

* 本文曾在第二届亚太植物组织与细胞培养会议上宣读。

本研究得到杨仁洲先生的指导与帮助,特此致谢!

康强胜:男,1965年1月生,大学,助研,主要研究植物细胞大量培养与次生代谢。

收稿日期:1999-07-18

后脱脂,再用 CHCl_3 萃取。参照文献[5]进行 HPLC 检测,检测前用普通柱层析进行初步分离。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织诱导 应用不同培养基及不同激素配比,发现 MS 培养基并单独添加 NAA 诱导效果较好,且在一定的范围内(0.1~10 mg/L),高浓度的 NAA 有利于愈伤组织的形成。用嫩茎及幼叶作外植体均诱导愈伤组织,诱导率较低(低于 10%),时间约需 40 d 左右。

2.2 愈伤组织培养 使用 MS 及减半的 MS 培养基,添加不同激素及其组合,结果见表 1。可以看出,较高浓度的生长素对愈伤组织生长有利,但高浓度的 2,4-D 易引起愈伤组织褐化并促进棕红色物质分泌,不利于继代培养。添加水解酪蛋白对白豆杉愈伤组织有较小幅度的促进作用。

2.3 悬浮培养 白豆杉细胞悬浮培养过程中,培养物大多为颗粒状聚合物。随着培养时间的延长,这些颗粒状聚合物逐步褐化,且不断向培养基中分泌棕红色物质。在接种前用消毒过的蒸馏水或培养基反复冲洗以去除大部分颜色变深的细胞及聚合体,同时缩短培养时间,可在很大程度上减缓褐化现象。细胞悬浮培养表明培养物的生物量在 25 d 左右达到最大值,最大生物产量(以干质量计)为 16.67 g/L。可溶性总糖浓度随生物量的增加而下降,pH 则在不同生长阶段有小幅变化。整个培养过程中,平均生物产率(以干质量计)为 0.47 g/g,平均蔗糖消耗速率为 0.83 g/L·d。

2.4 培养物中紫杉醇的检测 HPLC 分析结果表明,在白豆杉培养物中可检测到紫杉醇,含量为 0.09 $\mu\text{g/g}$ 。由于含量极微,检测样品又少,未对培养物中紫杉醇作进一步鉴定。白豆杉是否具有合成紫杉醇的能力,尚不能下结论,有待继续探讨。

表 1 不同培养基中白豆杉愈伤组织的生长倍数
Tab 1 Callus increased-times in different medium

培养条件 ¹⁾ Culture condition	增长倍数 ²⁾ Increased times
A MS+2 mg/L BA+10 mg/L 2,4-D	3.82
B MS+1 mg/L BA+5 mg/L NAA	4.72
C MS+2 mg/L KT+1 mg/L 2,4-D	2.57
D MS+2 mg/L BA+1 mg/L 2,4-D	2.47
E MS+2 mg/L BA+1 mg/L 2,4-D+ 1 g/L CH	2.74
F 1/2 MS+2 mg/L BA+1 mg/L 2,4-D+ 1 g/L CH	3.35
G 1/2 MS+0.05 mg/L KT+0.5 mg/L 2,4-D	3.65
H MS+5 mg/L NAA	1.55
I MS+10 mg/L NAA	1.95

¹⁾H 和 I 为诱导培养基。CH 为水解酪蛋白。培养时间 28 d。H, I; media for callus induction; CH: caseinhydrolysate; cultured 28 days. ²⁾4 次实验的平均值。Average value of 4 experiments

参 考 文 献

- 1 Wani M C, Taylor H L, Wall M E, *et al.* Plant antitumor agents, VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agents from *Taxus brevifolia*. J Am Soc. 1971, 93(9): 2325~2327.
- 2 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第七卷. 北京: 科学出版社, 1987. 448~450.
- 3 周荣汉, 朱丹妮, 高山林. 紫杉醇及短叶醇在白豆杉中的存在. 中国药科大学学报, 1994, 25(5): 259~261.
- 4 张君增, 方起程, 梁晓天. 中国特有植物白豆杉的化学成分研究. 植物学报, 1996, 38(5): 399~405.
- 5 Lu L X, Liu A R. Determination of taxol in *Taxus chinensis* by HPLC method. Acta Pharmaceutica Sinica, 1991, 26(7): 537~540.

(责任编辑: 许定发)