

徐志荣,魏赛金.果糖补料与真菌诱导对南方红豆杉细胞悬浮培养的协同效应[J].江苏农业科学,2018,46(24):54-57.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.012

果糖补料与真菌诱导对南方红豆杉细胞悬浮培养的协同效应

徐志荣,魏赛金

(江西农业大学生物科学与工程学院/江西省农业微生物资源开发与利用工程实验室,江西南昌 330045)

摘要:采用 5 L 反应器悬浮培养南方红豆杉细胞,研究果糖补料和真菌诱导子协同作用对南方红豆杉细胞悬浮培养体系中生理状态变化的影响。结果表明:果糖补料和真菌诱导子协同作用,可以提高培养后期的细胞活力,减缓培养液 pH 值的下降,维持胞外蛋白含量的稳定,增加胞外总酚含量并提高多酚氧化酶(PPO)活性,提高紫杉醇含量。

关键词:南方红豆杉;悬浮培养;真菌诱导;果糖;紫杉醇

中图分类号: Q791.490.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0054-03

南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairer*)别称紫杉,为红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus*)植物,其树皮中含有的紫杉醇是一种二萜类物质,对治疗肺癌、卵巢癌等有特定效果^[1]。紫杉醇是一种植物次生代谢产物,以其高效、低毒及独特的抗癌机制得到了人们的青睐。紫杉醇主要是从红豆杉科红豆杉属植物的树皮中分离、纯化得到的,然而其天然资源极其有限,药源严重短缺^[2]。

红豆杉细胞悬浮培养法是解决紫杉醇药源紧缺的一种很有前途的方法。培养过程中利用生物或非生物诱导处理细胞株,可以有效地促进红豆杉细胞合成紫杉醇。目前,诱导已经成为植物细胞和组织培养中提高次生代谢产物生产量的最有效的方法之一^[3],不仅是植物细胞培养生产次生代谢物的重要手段,而且在缩短工艺时间、提高容器最大利用率方面的作用也非常明显^[4]。然而,细胞次生代谢强度受到多种环境因素的影响,其中碳源是重要的一方面。培养基中的蔗糖大部分被降解成葡萄糖和果糖,蔗糖、葡萄糖和果糖的消耗和吸收呈现波动性,其中葡萄糖有利于细胞的前期生长以获得大量的生物量,果糖有利于细胞培养后期紫杉烷类化合物的合成^[5]。前期研究表明,真菌诱导子在悬浮培养南方红豆杉细胞生产紫杉醇中具有良好的诱导效果。为了在反应器中提高外源真菌诱导子的诱导效应,本试验通过果糖补料对南方红豆杉细胞悬浮培养体系中生理状态变化的研究,探索红豆杉细胞放大培养的有效调控手段。

1 材料与方法

1.1 试验材料

红豆杉愈伤组织:以南方红豆杉一年生枝条为外植体诱

导获得,传至 5 代以上。真菌 DF:为笔者所在实验室自行分离保存的真菌。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞种子液的制备 将愈伤组织接种于含有新鲜 B₅ 液体培养基^[6]的三角瓶中,细胞接种量为 5 g/瓶,装液量为 50 mL/500 mL,接种量为 10% (质量分数),于(24 ± 1) °C、120 r/min、黑暗条件下振荡培养 7 d,作为细胞种子液。

1.2.2 真菌诱导子的制备 参照兰文智等的酸解法制备真菌诱导子^[7]。收集真菌 DF 菌体于研钵中,充分研磨,加适量水并调节 pH 值至 2.0,于 121 °C 高压灭菌 1 h,过滤收集滤液并调节 pH 值至 5.8,即为诱导子。诱导子浓度以总糖含量计算,总糖含量以葡萄糖为标准,采用蒽酮-硫酸比色法^[8]测定。

1.2.3 5 L 反应器培养体系 采用 5 L 机械搅拌气升式玻璃反应器(上海百仑生物科技有限公司),装 2.0 L B₅ 液体培养基(含 0.8 mL/L 泡敌),接入细胞种子液,接种量为 10% (体积分数),反应器培养温度条件为(24 ± 1) °C,搅拌转速为 60 r/min,通气量为 1 L/min。在细胞培养 8 d 时加入 10% 果糖培养基(体积分数,将蔗糖换成等质量果糖,其他成分与 B₅ 液体培养基相同)和质量浓度为 100 μg/mL 的真菌诱导子,以只添加质量浓度为 100 μg/mL 的真菌诱导子为对照,每天取样检测。

1.3 项目测定

1.3.1 细胞活力的测定 用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)法^[9]测定细胞活力。抽滤除去培养基,取 0.1 g 红豆杉细胞,加 5.0 mL 0.2% TTC 溶液(用 0.1 mol/L pH 值=7.0 的磷酸缓冲液配制),于 24 °C 黑暗放置 24 h,离心去上清,加入 5 mL 蒸馏水洗涤细胞 2 次后加入 5 mL 95% 乙醇,置于 60 °C 水浴中 30 min,静置于室温下至细胞完全无色。取上清液,于 485 nm 处测吸光度,用吸光度表示细胞活力。

1.3.2 培养液 pH 值的测定 取滤液,用 PHS-2 型精密酸度计测定 pH 值。

1.3.3 胞外蛋白含量的测定 采用考马斯亮蓝法^[10]测定。取 1 mL 滤液,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,混匀,放置

收稿日期:2017-07-20

基金项目:江西省科技计划(编号:20133BBG70090)。

作者简介:徐志荣(1991—),男,江西南昌人,硕士研究生,主要从事天然药物研究与开发工作。E-mail: xuzhirongjxnc@163.com。

通信作者:魏赛金,博士,教授,研究方向为微生物与植物相互作用。E-mail: weisaijin@126.com。

2 min 后,在 595 nm 下检测吸光度。以牛血清白蛋白为标准品绘制标准曲线: $y = 1.119 9x - 0.079 2, r^2 = 0.996 7$ 。

1.3.4 胞外总酚含量的检测 参照文献[11-12]测定胞外总酚含量。取 5 mL 滤液,加入 10 mL 乙酸乙酯萃取 2 h,烘干后加 1 mL 95% 乙醇重新溶解,与 1 mL Folin-Ciocalteu 试剂(使用时稀释 10 倍)混合,于 40 ℃ 下水浴 10 min,再加入 0.4 mL 7.5% Na_2CO_3 溶液和 5 mL 蒸馏水,充分混匀,于 765 nm 下检测吸光度。以没食子酸为标准品绘制标准曲线: $y = 0.087 6x + 0.000 6, r^2 = 0.997 1$

1.3.5 多酚氧化酶(PPO)样品制备及活性(鲜质量)测定 参照张月玲等的方法^[13],取 0.1 g 固体细胞于预冷的研钵中,加 5 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值为 6.8),在冰浴下研磨成匀浆,于 4 ℃、4 000 r/min 离心 5 min,上清液即为粗酶液。在反应管中加入 3.8 mL 0.05 mol/L pH 值为 6.8 的磷酸缓冲液、1 mL 0.1 mol/L 邻苯二酚、0.2 mL 粗酶液,于 35 ℃ 恒温水浴保温 20 min,迅速冰浴,以磷酸缓冲液作为对照,在 398 nm 处测定吸光度。以 1 min 内 398 nm 处的吸光度变化 0.01 定义为 1 个 PPO 活性单位(U)。

1.3.6 紫杉醇的提取及测定 紫杉醇的提取及测定参照赵继鹏等的方法^[6]。将固体细胞于 45 ℃ 烘干至恒质量,充分研磨。准确称取 100 mg 干燥后的细胞,加 2 mL 甲醇,超声提取 30 min,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,重复提取 2 次。合并上清液,于 45 ℃ 烘干,浸膏加入 4 mL 双蒸水后用 4 mL 二氯甲烷萃取 2 次,合并二氯甲烷层,于 25 ℃ 烘干,用 3 mL 甲醇溶解,在 228 nm 下测定样品吸光度。用紫杉醇标准品绘制标准曲线: $y = 20.83x + 1.06, r^2 = 0.997$ 。

1.4 数据分析

用 Excel 进行数据整理,用 Origin 8.5.1 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 细胞活力的变化

由图 1 可知,在细胞培养 8 d 后,加入真菌诱导子后的细胞活力下降得较快,在后续培养中,细胞活力上升平缓,且始终低于初始细胞活力;而在真菌诱导结合果糖补料的条件下,细胞活力下降较为平缓,在培养的 11 d 后,细胞活力开始逐步上升,在培养的 14 d 后,细胞活力高于初始细胞活力,增幅为 9.34%。

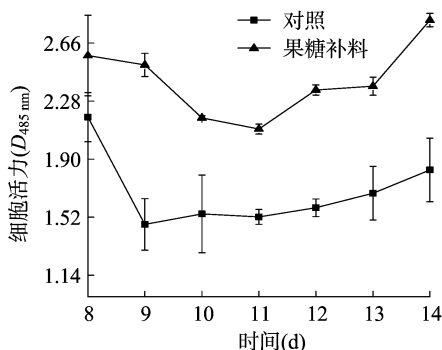


图1 细胞活力的变化

2.2 培养液 pH 值的变化

由图 2 可知,在培养的 8 d 后,加入真菌诱导子后,培养液 pH 值降低。其中,只添加真菌诱导子的处理,pH 值下降

得更快,最大降幅为 14.29%;加入真菌诱导子后进行果糖补料,pH 值的下降较平缓。

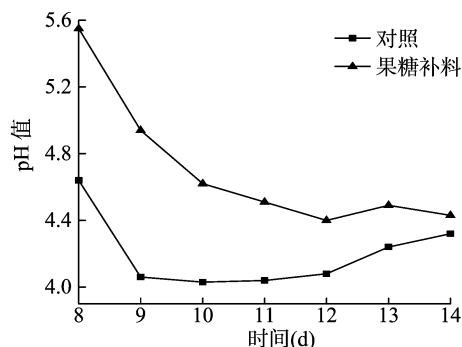


图2 培养液 pH 值的变化

2.3 胞外蛋白质含量的变化

在培养的 8 d 后,只添加真菌诱导子,胞外蛋白质含量呈上升趋势,由诱导初期的 11.98 $\mu\text{g/mL}$ 上升为培养后期的 18.17 $\mu\text{g/mL}$,增幅为 51.67%;在真菌诱导后进行果糖补料,胞外蛋白质含量培养在过程中基本保持不变(图 3)。

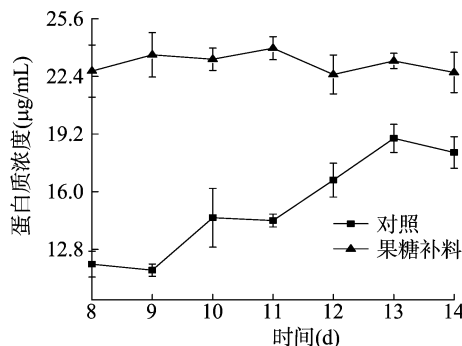


图3 胞外蛋白含量的变化

2.4 胞外总酚含量的变化

由图 4 可知,加入诱导子后,胞外总酚含量在培养的 9 d 后开始上升,在培养后的 11 d 含量到达峰值,为 17.92 $\mu\text{g/mL}$,随后下降,最后趋于平稳。添加真菌诱导和果糖补料后,胞外总酚含量上升,在培养后的 10 d 达到峰值,为 26.27 $\mu\text{g/mL}$,随后下降,最后趋于平稳。

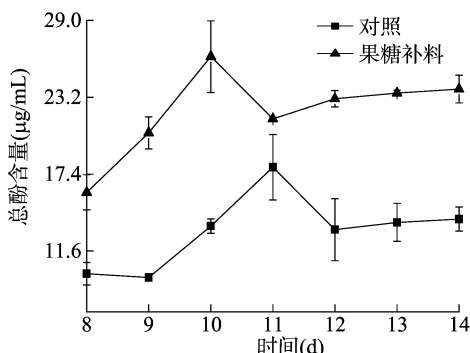


图4 胞外总酚含量的变化

2.5 多酚氧化酶活性的变化

加入诱导子后,PPO 活性在培养后的 9 d 达到峰值,为 62.50 U/g,随后酶活性下降,在培养的 13 d 开始,酶活性趋于平稳;真菌诱导和果糖补料后,酶活性同样在 9 d 达到峰值,为 106.17 U/g,随后酶活性下降,在培养的 10 d 后酶活性

趋于平稳(图 5)。

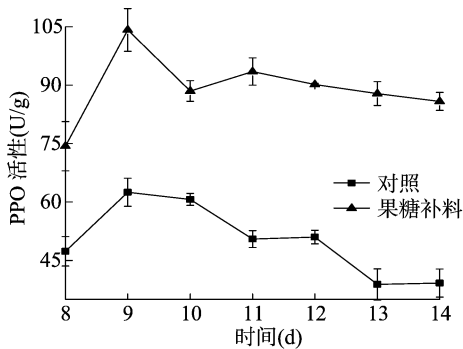


图5 PPO 活性的变化

表 1 紫杉醇含量(干质量)

处理	紫杉醇含量(μg/g)							最大增幅(%)
	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	
对照	21.13	15.49	14.16	18.96	26.38	21.66	19.71	24.85
果糖补料	7.54	13.53	14.99	15.15	20.40	19.37	17.37	170.56

下降,可能是由于诱导子对细胞的损伤使得细胞活力下降,细胞活力维持较低水平不变,而添加果糖后,细胞活力在后期逐步上升,说明悬浮培养后期果糖作为合适碳源,有利于保持细胞活力,提高代谢能力^[14]。

植物细胞对 pH 值具有较强的自我调控能力,而在本试验中加入诱导子,培养基 pH 值持续下降,这有可能是由于诱导子使胞内质子大量释放,从而导致培养基酸化;进行果糖补料后,可以减缓 pH 值的下降速率,这有可能是由于果糖可以减缓质子释放速率或者使质子内流而减缓 pH 值下降^[15]。

用真菌诱导后,胞外蛋白含量逐渐升高,原因可能有 2 个方面:一方面可能因为细胞代谢增强,蛋白分泌增加,另一方面,可能是细胞膜通透性改变,其胞内蛋白被释放出来^[16]。而细胞活力与代谢强度成正比,加入真菌诱导子后细胞活力持续下降,代谢强度较低,因此可见胞外蛋白含量上升不是由于分泌增加而是由细胞膜通透性改变引起的。细胞膜通透性改变可能是外源真菌诱导子处理的红豆杉细胞在显著提高紫杉醇产量的同时,也导致细胞中氧自由基含量的提高而发生细胞氧损伤,从而引起植物的过敏反应^[17]。而加入真菌诱导子后进行果糖补料,胞外蛋白含量基本保持不变,这有可能是由于果糖可以减弱这种过敏反应。

诱导红豆杉细胞时,维持适当浓度的酚类化合物有利于紫杉醇产量的提高^[18]。所以当培养体系中加入真菌诱导子后,胞外总酚含量上升,可能是细胞感受到真菌诱导子侵入而增加酚类化合物的合成以减少伤害;加入真菌诱导子后进行果糖补料能使酚类物质迅速积累,同时也能增加紫杉醇的含量。当酚类物质含量过高时,细胞通过提高 PPO 活性来降解酚类物质。

研究表明,在南方红豆杉细胞培养后期添加果糖能够解除细胞合成紫杉醇的碳源限制,从而有效地提高真菌诱导子的诱导效能^[18]。Ketchum 等研究发现,在培养周期的中期添加 1% 果糖,可以提高紫杉醇产量,缩短培养周期^[19-20]。在本试验中,加入诱导子后,紫杉醇含量先下降后上升,上升到

2.6 紫杉醇含量(干质量)

由表 1 可知,只加入诱导子时,紫杉醇含量首先逐渐下降,在培养 10 d 时为最低值,随后含量逐渐升高,在培养的 12 d 达到峰值 26.38 μg/g,与培养 8 d 的初始值相比,增幅为 24.85%,12 d 后,紫杉醇含量逐渐下降。而在加入诱导子的同时加果糖补料,紫杉醇的含量首先逐步升高,在培养 12 d 时到达峰值,为 20.40 μg/g,与初始值相比紫杉醇含量增幅为 170.56%,从培养 13 d 开始时紫杉醇含量逐渐下降。

3 结论与讨论

细胞活力与细胞线粒体活性成正比,线粒体活性越强,细胞代谢能力越强。在本试验中,加入真菌诱导子后,细胞活力

峰值后逐步下降,可能是诱导子在诱导初期对细胞的损伤而使紫杉醇合成受影响,细胞适应后,诱导子诱导细胞合成紫杉醇而使其含量上升。加入诱导子后进行果糖补料,紫杉醇含量上升没有受到诱导子的损伤而下降,可进一步说明果糖可以减弱诱导子对细胞的损伤或者可能是果糖在培养后期更适用于合成紫杉醇。

因此可见,在用真菌诱导子诱导红豆杉细胞时,加入一定量的果糖可以缓解真菌诱导子诱导所引起的红豆杉细胞膜脂过氧化等不良反应,从而有利于细胞的生长和紫杉醇产量的提高。

参考文献:

[1] 吴秀兰,贾 艳,朱 波,等. 天然抗癌药物紫杉醇的研究进展[J]. 中国野生植物资源,2014,33(5):42-45.

[2] 王红萍,段红梅. 红豆杉的价值与开发利用研究进展[J]. 北方园艺,2013(12):192-195.

[3] 晏 琼,胡宗定,吴建勇. 生物和非生物诱导子对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响[J]. 中草药,2006,37(2):262-265.

[4] 谷荣辉,洪利亚,龙春林. 植物细胞培养生产次生代谢物的途径[J]. 植物生理学报,2013,49(9):869-881.

[5] Li C, Yuan Y J, Hu Z D. Studies on relation between production of taxanes and fluctuation of sugar metabolism in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *maiirei* [J]. Journal of Shihezi University (Nature Science), 2001, 5(2): 109-112.

[6] 赵继鹏,杨淑慎. 曼地亚红豆杉细胞悬浮培养体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(1): 189-195.

[7] 兰文智,余龙江,李 为,等. 促进紫杉醇合成真菌诱导物制备方法的选择及组分的分离[J]. 武汉植物学研究, 2002, 20(1): 66-70.

[8] 李文砚,韦持章,孔方南,等. 萜酮法测定木奶果果实中可溶性糖含量的研究[J]. 中国园艺文摘, 2015(12): 7-8.

[9] 刘 华,梅兴国. TTC 法测定红豆杉细胞活力[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 537-539.

[10] 周 颖,樊 荣,张建逵. 人参中可溶性蛋白质含量测定[J].

李晓亮,张军云,张 钟,等.盆栽菊花的茎尖组织培养快繁技术[J].江苏农业科学,2018,46(24):57-62.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.013

盆栽菊花的茎尖组织培养快繁技术

李晓亮,张军云,张 钟,段永华,张健康,王文智,杨光焰,钱遵姚,张翠萍

(玉溪市农业科学院,云南玉溪 653100)

摘要:以盆栽菊花香草水晶的茎尖为外植体,通过正交、对比、附加等试验,研究 HgCl_2 浓度及其灭菌时间、基础培养基、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)等9种因素对盆栽菊花茎尖组织培养快繁的影响,建立完善的盆栽菊花茎尖组织培养快繁技术体系,为菊花脱毒复壮、工厂化快繁育苗、种质资源保存等提供重要的技术支撑。结果表明:茎尖的最佳灭菌方法是0.20% HgCl_2 灭菌4~5 min;初代的适合培养基为MS+6-BA 0.4~0.8 mg/L+萘乙酸(NAA)0.01 mg/L;增殖继代的最佳培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+白砂糖20 g/L,增殖系数为17.95;生根的最佳培养基为MS+活性炭(activated carbon,简称AC)0.1%或1/2MS+吲哚丁酸(IBA)0.5 mg/L+AC 0.1%,其成株率和生根率均>90%。该技术体系育出的种苗具有优良综合素质,可推广应用于盆栽菊花的工厂化快繁育苗等,也可为其他类型菊花(切花型菊花、造型菊花等)组织培养快繁技术等的研究提供重要参考。

关键词:盆栽菊花;茎尖;香草水晶;组织培养快繁;正交试验

中图分类号: S682.1⁺10.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0057-06

菊花[*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel.]为菊科多年生宿根草本植物,是我国的传统名花,也是世界四大切花之一,是一种被广泛栽培的重要花卉^[1-3]。菊花目前主要用于园林的绿化和观赏,如制作花束、花环、观赏盆花、秋季花坛、花台、盆花群等,深受人们喜爱^[3-4]。菊花传统的繁殖方法主要是扦插和嫁接,但存在很多缺点:需较多母株材料、植株病毒逐代积累加重、品质退化、繁殖速度不快、易受季节变化和外界环境条件的影响、病虫害发生频率高等^[5-8],为解决这些问题,目前最有效的技术措施之一是菊花的茎尖组织培

养快繁技术^[2,4-6,9]。

我国的菊花组织培养技术研究始于20世纪80年代^[10],截至目前的研究主要集中于菊花的花瓣^[11-13]、花蕾^[2,14]、叶片^[15-16]、茎段^[6,17]的组织培养,而有关菊花茎尖组织培养技术的研究报道较少^[7,9,18],且这些报道的研究内容简单,仅主要涉及激素与菊花增殖量、生根量的关系,更是几乎没有涉及种苗综合素质。因此,建立完善的菊花茎尖组织培养快繁技术体系,对菊花脱毒复壮、工厂化快繁育苗、种质资源保存等,进而更好地促进菊花的生产发展,具有重要意义。

为此,以盆栽菊花香草水晶的茎尖为材料,研究 HgCl_2 浓度及其灭菌时间、基础培养基、6-BA等9种主要因素对菊花茎尖组织培养快繁的影响,分析培养基与种苗综合素质的关系并据此筛选出适合的培养基,旨在建立一套完善的且能育出优良综合素质种苗的盆栽菊花茎尖组织培养快繁技术体系,为菊花脱毒复壮、工厂化快繁育苗、种质资源保存等提供重要的技术支撑。

收稿日期:2018-02-27

基金项目:玉溪市农业科学院科研项目(编号:YXNKY201601)。

作者简介:李晓亮(1982—),男,云南江川人,硕士,农艺师,主要从事植物组织培养、园艺作物育种及栽培等的研究与推广工作。

E-mail:lixiaoliangyn@qq.com。

通信作者:张军云,硕士,高级农艺师,主要从事植物组织培养、园艺作物育种及栽培等的研究与推广工作。E-mail:yuhebio@163.com。

辽宁中医药大学学报,2014,16(8):95-96。

[11]颜小捷,谷陟欣,卢凤来,等. FOLIN-酚比色法测定裸花紫珠中总酚含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(18):74-78。

[12]郑超,徐晟,夏冰,等. 三种抗氧化剂对曼地亚红豆杉愈伤组织褐化及相关物质含量的影响[J]. 植物生理学报,2013,49(3):259-263。

[13]张月玲,肖尊安,熊红. 红豆杉愈伤组织生长与PPO, POD比活性和多酚质量分数变化的研究[J]. 北京师范大学学报(自然科学版),2002,38(6):800-804。

[14] Kobayashi Y, Fukui H, Tabata M. Effect of carbon dioxide and ethylene on berberine production and cell browning in *Thalictrum minus* cell cultures[J]. Plant Cell Reports,1991,9(9):496-499。

[15]张长平,李春,元英进,等. 真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞态势及紫杉醇合成的影响[J]. 生物工程学报,2001,17

(4):436-440。

[16]李俊,彭正松. 刺激剂对植物细胞悬浮培养的影响[J]. 广西植物,2005,25(4):341-348。

[17]陈超,付春华,姜军民,等. 红豆杉细胞中的酚类化合物含量与紫杉醇产量之间的关系[J]. 华中农业大学学报,2005,24(1):83-87。

[18]晏琼,元英进,胡宗定. 果糖补料与真菌诱导对红豆杉细胞悬浮培养体系的协同效应[J]. 化学工程,2003,31(5):46-49。

[19] Ketchum R E B, Gibson D M. Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996,46(1):9-16。

[20] Kim, J H, Yun J H, Hwang Y S, et al. Production of taxol and related taxanes in *Taxus brevifolia* cell cultures: effect of sugar [J]. Biotechnology Letters,1995,17(1):101-106。