

杜仲愈伤组织培养过程中胶含量的动态变化

何 波 任红媛 申 延

(陕西科技大学生命科学与工程学院)

摘 要:培养杜仲愈伤组织并测定其含胶量,结果发现,杜仲胶的合成与愈伤组织的生长周期有一定的相关性。在继代培养中,随着继代次数的增加,含胶量呈增加趋势。外植体上愈伤组织一旦形成就有杜仲胶的积累,杜仲胶含量在 S5~S8 代出现一个高峰值,S8 代愈伤组织的含胶量已经达到原植株的 94.38%,S9 代后又迅速下降。

关键词:杜仲;杜仲胶;愈伤组织;胶含量

The Dynamic Change of Gutta-percha Content during Callus Culture of *Eucommia ulmoides* Oliv. // HE Po, REN Hong-yuan, SHEN Yan

Abstract: This paper reported the dynamic change of gutta-percha content during callus culture of *Eucommia ulmoides* Oliv. The results showed that there was a relative close relationship existing between the synthesis of gutta-percha and the growth period of calluses. In callus subculture, the gutta content increased with the times of callus subculture. Once callus was formed, the gutta-percha started to accumulate. The gutta-percha content has a peak value from subculture generation 5 to generation 8; it could reach 94.38% of the original plant in subculture generation 8. After generation 9, it declined dramatically.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; Gutta-percha; Callus; Gutta-percha content

First author's address: College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, 712081, Xi'an, Shaanxi, China

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)是我国宝贵的天然橡胶资源^[1-4]。杜仲胶以其良好的绝缘性、抗酸碱性、热塑性和形状记忆性等特点被广泛应用于交通、通讯、医疗、电力、国防、水利、建筑和人们的日常生活中,其产业化前景十分广阔^[5-8]。虽然杜仲胶可以通过从植株中提取来获得,但受到原料、季节、成分含量等条件的限制,提取量不高,使其生产成本很高,从而影响工业化大规模生产。采用人工组织和细胞培养具有繁殖速度快、繁殖系数高,且不受地理环境及气候等自然条件影响,是解决原料资源不足的最佳途径^[6]。本试验主要研究在杜仲愈伤组织的诱导和继代培养中,愈伤组织的生长周期以及继代次数等与杜仲胶积累间的关系。

1 材料与方法

1.1 材 料

用于诱导愈伤组织的外植体材料为本校实验室培养的 2 个月左右的杜仲无菌苗。

1.2 方 法

1.2.1 愈伤组织的诱导和继代培养

将无菌苗的幼茎切成 0.5 cm 小段,叶片切成

0.5 cm × 0.5 cm 的方片接种于 MS 培养基上,并且附加 NAA 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L,进行愈伤组织的诱导。控制培养温度 25℃ 左右,光照时间 12 h/d,光照强度 1 500 ~ 2 000 lx。诱导的愈伤组织选择生长旺盛和颜色、质地及形态都相似者,切成均匀一致的小块,接种于 B5 培养基上并附加 NAA 1.0 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L 进行继代培养,每 25 d 继代 1 次,并计算增长率。

$$\text{增长率} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100\%$$

在杜仲愈伤组织的继代培养中,从 S₂ 代愈伤组织继代后的第 1 天开始每隔 3 d 取样。观察式中:W₁ 为愈伤组织的初始重量,W₂ 为收获重量。

1.2.2 生长周期中杜仲胶含量的变化

观察愈伤组织的生长情况并测定杜仲胶的含量。

1.2.3 不同种类外植体及其愈伤组织含胶量比较

分别以无菌苗的幼茎、叶片、子叶等为外植体,接种于添加有相应植物激素的 MS 培养基上诱导愈伤组织,并测量各种愈伤组织的含胶量,以及不同外植体如幼茎、叶片、子叶等的含胶量。

1.2.4 继代次数与含胶量的关系

愈伤组织接种于 B5 培养基上进行继代培养,每 25 d 继代 1 次。S_n 代的愈伤组织选择一部分继代培

收稿日期:2006-06-20

修回日期:2006-06-30

基金项目:陕西科技大学博士基金(项目编号:BJ04-03)。

第一作者简介:何波(1970-),女,讲师,博士,主要从事杜仲组织培养与次生代谢物生产的研究。

应用研究

养,即为 S_{n+1} 代,其余的愈伤组织晾干保存,用于杜仲胶含量的测定。

1.2.5 杜仲胶含量的测定

参照杨振堂等人的方法,略有改动^[9]。将愈伤组织自然晾干、粉碎。用天平称取样品 0.5 g (精确到 0.000 1 g),在 50 mL 10% 铬酸沸水浴中氧化 1 h,然后通蒸汽蒸出氧化产物醋酸。蒸馏至溜出液达 500 mL。用真空泵抽气 30 min,排除溜出液中的 CO_2 。用标定的 0.1 N NaOH 滴定,对照样品同样处理,同时做空白对照实验。

橡胶烃含量 = $(V \times N \times 0.090\ 8 / W) \times 100\%$ 。

式中: V 为 NaOH 用量(mL), N 为 NaOH 当量浓度(mol/L), W 为样品重量(g), 0.090 8 为换算常数。

2 结果与分析

2.1 生长周期中杜仲胶含量的变化

从 S_2 代愈伤组织继代后的第 1 天开始每 3 d 取样,观察愈伤组织的生长情况并测定杜仲胶的含量,结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出,杜仲愈伤组织含胶量的变化与愈伤的生长周期有一定的相关性。在接种后第 1~9 天即培养初期含胶量略有下降。第 10~20 天杜仲胶含量迅速上升,愈伤组织培养到 20 d 后,杜仲胶的积累基本趋于稳定。考虑到愈伤组织的增殖,第 25 天左右为理想的收获期。

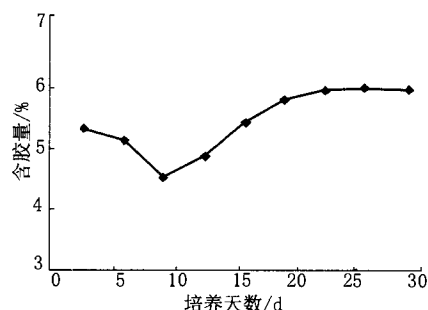


图 1 杜仲愈伤组织生长周期与含胶量关系

2.2 不同种类外植体及其愈伤组织含胶量比较

分别以无菌苗的幼茎、叶片、子叶等为外植体,接种于添加有相应植物激素的 MS 培养基上诱导出愈伤组织,并测量各种外植体及其愈伤组织(即 S_0 代)的含胶量。结果为:外植体中幼茎 9.60%、叶片 9.47%、子叶 11.61%;愈伤组织中茎 5.20%、叶片 5.24%、子叶 5.42%。

可以看出,从不同外植体诱导得到的愈伤组织中,均含有一定量的杜仲胶。但 S_0 代愈伤组织的含胶量比原植株中的含量低很多,大约只有原植株含量

的 50% 左右。幼茎、叶片和子叶 3 种不同外植体中,子叶中杜仲胶含量最高,幼茎与叶片相当;而由这 3 种外植体诱导出的 S_0 代愈伤组织中杜仲胶的含量无明显差异。

2.3 继代培养与含胶量的关系

杜仲愈伤组织每 25 d 继代 1 次,测定每代愈伤组织的生长率和杜仲胶含量,结果如表 1 所示。在外植体上愈伤组织一旦形成就有杜仲胶的合成,未经继代的愈伤组织(S_0 代)25 d 含胶量为 5.20%,只有原植株含胶量的 54.17%。随着继代次数的增多,含胶量基本上是逐渐增多的,在培养的 $S_5 \sim S_8$ 代出现 1 个杜仲胶含量的高峰值,特别是 S_8 代愈伤组织的含胶量已经达到了 9.06%,为原植株杜仲胶含量的 94.38%。 S_8 代后含胶量又开始迅速下降, $S_{10} \sim S_{12}$ 代的含胶量无显著差别,处于最低值。此种变化趋势从图 2 可以直观地看到。

表 1 继代次数与含胶量关系 /%

继代次数	胶含量	占原植株的百分比
S_0	5.20	54.17
S_1	5.41	56.35
S_2	5.77	60.10
S_3	5.98	62.29
S_4	5.81	60.52
S_5	8.24	85.83
S_6	8.11	84.48
S_7	8.33	86.77
S_8	9.06	94.38
S_{10}	5.59	58.23
S_{12}	5.54	56.35
对照(幼茎)	9.60	100

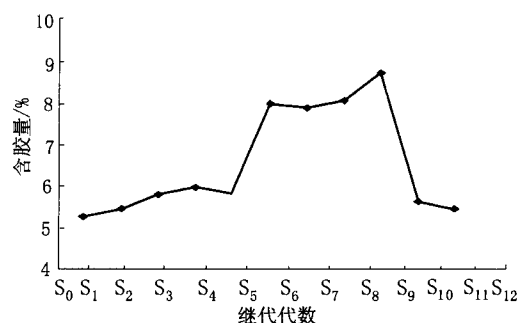


图 2 继代培养次数与含胶量关系

3 讨论

(1) 在杜仲的组织培养中,愈伤组织中含胶量的变化与其生长周期有一定的相关性。在愈伤组织培养初期杜仲胶含量略有下降,这可能是由于植物细胞尚处于新环境的适应期,生命活动受到抑制的缘故。但随着愈伤组织细胞生长稳定期的到来,杜仲胶的积

累也达到一个最高值,再次证明了次生代谢物主要在细胞生长的稳定期积累。

(2)本试验检测出杜仲幼茎、叶片以及子叶的含胶量分别为 9.60%、9.47%、11.61%,幼茎与叶片的杜仲胶含量相差不多。相关报道指出,杜仲叶含胶量为 2%~3%、皮为 6%~10%^[4]。这可能与本试验的检测方法有关。首先,利用铬酸氧化法测定杜仲胶含量会比实际值偏高。这是因为:橡胶烃是橡胶中的异戊二烯,而杜仲胶是聚异戊二烯,愈伤组织中尚未形成异戊二烯的异戊二烯也被铬酸氧化成了醋酸,因而测得的橡胶烃含量就比杜仲胶的含量要高些;实验室的空气不新鲜,CO₂ 含量较高,因而使溜出液中的 CO₂ 较多。其次,本试验所测幼茎含胶量是指幼茎的整体而言,而报道中专指皮层中的含胶量。最后,子叶的含胶量高于叶片,这说明杜仲胶在植物体内的积累是一个由少到多的过程,因为子叶比一般叶片的生长时间更长些。

(3)从不同外植体(幼茎、叶片、子叶)诱导出的愈伤组织,其含胶量并无明显差异,均在 5.20%~5.42%间(指 S₀ 代)。该结论与唐建军等人的研究结论有差异,其可能原因为唐建军等人所用的培养基中添加其他无机氮原及植物激素综合作用,对愈伤生长又更为明显的作用,此外主要是考虑绿原酸的积累^[11],而本实验着重于杜仲胶的含量研究。本实验表明在杜仲的组织培养中,使用不同部位的外植体进行培养对杜仲胶的积累影响不显著。在进行前期愈伤组织的诱导和继代培养试验时,我们发现幼茎作为外植体时愈伤组织的出愈时间短,愈伤组织的生长率大,所以在进行杜仲胶的生产时,建议使用幼茎为外植体诱导愈伤组织。在愈伤组织的继代培养时发现,随着继代次数的增多,含胶量呈上升趋势,在 S₅~S₈ 代出现 1 个含胶量的高峰值, S₈ 代愈伤组织的含胶量为 9.06%,已达原植株杜仲胶含量的 94.38%。S₈ 代以后含胶量又迅速下降,出现这种变化趋势的可能原因是愈伤组织的分化程度随继代次数的增加而升高,培养到一定时间后,分化过程基本稳定,而次生代谢物的合成与分化程度是正相关的。至于高峰区以后出现下降,可能是因为愈伤组织又开始增殖,要进入更高分化程度的形态构建,因而减少了次生代谢物杜仲胶的合成。杨振堂等人报道^[12],在杜仲愈伤组织的继代培养时, S₄~S₇ 代杜仲胶的含量最高, S₈ 代以后又迅速下降。本试验结果与之基本相同。在实际生产时,考虑到胶含量与生产效率方面的因素,可以

选取 S₅~S₈ 代的愈伤组织进行杜仲胶的提取。乙酸为杜仲胶合成的前体^[10,13],不同浓度的乙酸对杜仲植株内胶含量有影响。我们还做了有关不同浓度的乙酸在培养基中对杜仲愈伤组织中杜仲胶的含量影响试验,即在杜仲的组织培养中向培养基中添加适量的乙酸,提高杜仲胶合成的前体物质的量,从而提高愈伤组织中杜仲胶的产量。

参考文献

- [1]方世壁.杜仲胶的研究与开发[J].中外科技信息,1998(8):10-11.
- [2]杜红岩,王俊鸿,杜兰英.杜仲高技术产品产业化的研究与开发[J].经济林研究,2001,19(2):18-22.
- [3]Hayman E. Stimulation of plant growth and gutta content in *Eucommia ulmoides* by 2-diethylaminoethyl-3, 4-dichlorophenylether[J]. Plant Growth Regulation, 1994, 14: 78-82.
- [4]冉懋雄.杜仲[M].北京:科学技术出版社,2002.
- [5]朱峰,岳红,祖恩峰.新型功能材料杜仲胶的研究与应用[J].安徽大学学报(自然科学版),2005(3):92-97.
- [6]臧埔.组织和细胞培养生产杜仲胶的前景[J].特产研究,1996(3):42-44.
- [7]杜红岩,谢碧霞,邵松海.杜仲胶的研究进展与发展前景[J].中南林学院学报,2003,23(4):95-99.
- [8]Kwan C Y, Zhang W B, Deyama T, et al. Endothelium-dependent vascular relaxation induced by *Eucommia ulmoides* Oliv bark extract is mediated by NO and EDHF in small vessels[J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2004, 369(2): 206-211.
- [9]金春爱,杨振堂,赵景辉,等.杜仲叶片及愈伤组织无性系中杜仲胶含量测定[J].特产研究,1997(3):20-21.
- [10]黄勇.杜仲组织培养的初步研究[D].武汉:华中师范大学,2002.
- [11]唐建军,陈欣,志水胜好.培养条件对杜仲愈伤组织形成及次生代谢过程的影响[J].浙江大学学报,2002,36(2):193-198.
- [12]杨振堂,臧埔,马淑琴,等.杜仲组织培养中培养条件与含胶量关系的研究[J].特产研究,1999(2):6-9.
- [13]李琰.杜仲愈伤组织培养及次生代谢产物含量的研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2003.

(通讯地址:712081,陕西省咸阳市杨凌)

