

印楝愈伤组织的培养条件及对印楝素含量的影响*

雷光富 朱西儒 张云开 张海保 刘 卫

(中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

INFLUENCE OF THE CULTURAL CONDITIONS TO CALLUS FORMATION OF *AZADIRACHTA INDICA* AND ITS AZADIRACHTIN CONTENT

Lei Guangfu Zhu Xiru Zhang Yunkai Zhang Haibao Liu Wei

(South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences Guangzhou 510650)

关键词 印楝, 愈伤组织, 印楝素

Key words *Azadirachta indica* A. Luss, Callus, Azadirachtin

由于印楝(*Azadirachta indica* A. Luss)提取物对农业、仓库和卫生害虫具有明显的拒食、抑制生长发育、忌避、毒杀、内吸和不育等活性, 并有高效、低毒、无环境污染、不易引起昆虫抗药性等优点^[1], 受到人们的关注。但是, 它的自然分布有限, 我国尚无此种。在 80 年代虽引种成功, 而它的活性成分结构复杂, 难以进行人工合成, 使其应用受到限制^[2]。

因此, 根据植物次生代谢产物的合成^[3,4], 具有“全能性和代谢多途径”^[4]的基本理论, 研究影响印楝愈伤组织生长及其印楝素含量测定的因素很有必要^[2]。本文进一步报道培养条件的作用, 以便达到人工调控, 使代谢朝所需终产物方向进行, 提高次生产物的产量; 从而为深入开展印楝细胞的大规模培养, 生产天然活性成分奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

外植体取自华南农业大学资源环境学院昆虫毒理研究室的温室。使用第 2 代叶片愈伤组织, 培养 20 d 后做不同处理试验。

1.2 方法

(1) 愈伤组织诱导及细胞生长速度和印楝素测定: 见前文^[5]。

(2) 试验处理: 进行不同温度、光照、pH 的处理, 观察对愈伤组织的生长和印楝素含量的影响。试验重复 3~5 次; 温度处理用光照培养箱(广东省医疗器械厂生产)控制; 用 30 或 40 W 日光灯提供光源。

收稿日: 1998-04-21, 修回日: 1998-09-19。第一作者: 男, 1969 年 6 月出生, 工程师(硕士), 从事园林工程设计工作。

* 承蒙华南生物工程研究开发基金资助。

2 结果与讨论

2.1 温度对印楝愈伤组织及印楝素含量的影响

经过不同温度试验,了解对印楝愈伤组织及印楝素含量影响的最佳条件,结果见表1。

表1 温度对印楝愈伤组织及印楝素含量的影响

Table 1 Effect of temperature to the callus of
A zadirachta indica and the content of A zadirachtin

温度(℃) Temperature	收获干重 /flask (g)	生长速率 Ratio of growth (g DW · L⁻¹ · d⁻¹)	印楝素含量 Content of A zadirachtin (mg DW · g⁻¹)	印楝素产率 Ratio of A zadirachtin (mg · L⁻¹)
20	0.08	0.16	0.40	1.28
25	0.13	0.26	0.63	3.28
30	0.16	0.32	0.45	2.88
35	0.12	0.24	0.28	1.25

究骆驼蓬细胞培养及其生物碱产率的温度分别是32及27较一致^[6]。

2.2 光照条件对印楝愈伤组织及印楝素含量的影响

光是植物生长的基本条件之一,印楝愈伤组织的培养同样需要最佳光照条件。本研究作了光照和黑暗条件的对比,光强度为1500~2000 lx,光照时间14 h,观察了印楝愈伤组织的生长及其印楝素含量的变化,结果见表2。

在光照条件下,印楝愈伤组织的生长虽比黑暗时略快,但差异不显著,其愈伤组织中的印楝素含量却

有明显的差异。光照下比黑暗中的含量增加50%。从愈伤组织的表现来看,前一种呈黄绿色,后者则为浅黄白色。所以,在用于工业生产和工艺改良方面,必须考虑光照因素。这一点与对某些植物的研究结果不同^[2,7],在长春花^[8]、茶树、保罗氏鲜红玫瑰等植物中,光有促进植物合成次生物的作用,但光对日本莨菪、黄连及紫草^[2]等植物中的生物碱合成则有抑制作用。

2.3 pH 对印楝愈伤组织及印楝素含量的影响

培养基的pH对印楝愈伤组织及印楝素含量有一定影响。本研究选用了4.5、5.0、5.5、6.0、6.5共5个处理。结果表明:在pH5~6时,印楝愈伤组织生长比较理想。过高或者太低,都会抑制其生长,当达到6.5时则更为严重。印楝素含量在pH5.5~6.0时较好,pH低于5.5时,其含量明显下降(图1)。这可能是由于植物生长的环境要求偏酸性,但

试验表明:在30条件下,有利于印楝愈伤组织的生长,其生长速率最高,可达到0.32 g DW · L⁻¹ · d⁻¹。然而,在25时,印楝素积累量最高,为0.63 mg DW · g⁻¹(见图1)。因此,考虑两者要求,控制在25~30比较理想,这与Nettleship, L & M. Slaytor研

表2 光照条件对印楝愈伤组织生长及印楝素含量的影响

Table 2 Influence of temperature to the callus of
A zadirachta indica and the content of A zadirachtin

试验处理 Treatment	收获干重 /flask (g)	生长速率 Ratio of growth (g DW · L⁻¹ · d⁻¹)	印楝素含量 Content of A zadirachtin (mg DW · g⁻¹)	印楝素产率 Ratio of A zadirachtin (mg · L⁻¹)
白光 White light	0.14	0.28	0.63	3.53
黑暗 Dark	0.13	0.26	0.40	2.08

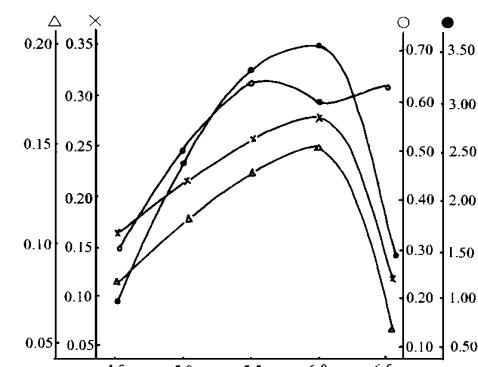


图1 pH值对印楝愈伤组织生长和印楝素含量的影响
Fig. 1 Effects of pH value on callus growth and A. zadirachtin derivative formation

严重酸性会影响植物细胞内生物碱合成受到抑制或被降解之故。

2.4 印楝细胞大量培养与印楝素提取的前景

通过不同培养条件对愈伤组织形成的影响试验,以及用ELISA技术^[9]测定印楝素含量,结果表明:人工进行大量细胞培养是可行的,其中控制温度、光照和培养基的pH是关键因子。至于工厂化生产工艺在其他植物次生代谢物提取方面亦有不少成功经验^[10]可借鉴,雷光富等^[5]在印楝培养基配方上有比较成熟的技术。进一步放大生产,有待深入试验和完善。

参 考 文 献

- 1 李晓东,赵善欢 印楝素对昆虫的毒理作用机制 华南农业大学学报, 1995, **17**(1): 118~ 122
- 2 赵善欢,张业光,蔡智德 印楝引种试验初报 华南农业大学学报, 1989, **10**(2): 34~ 39
- 3 叶和春 不同理化因子对新疆紫草愈伤组织生长及紫草衍生物合成的影响 植物学报, 1991, **33**(12): 927~ 931
- 4 梁峥,郑光植 高等植物的次生代谢 植物生理学通讯, 1981(1): 14~ 21
- 5 雷光富,朱西儒,张云开等. 添加剂和激素对印楝脱分化及印楝素含量的影响 中国科学院研究生院学报, 1997, **15**(1): 79~ 85
- 6 Nettleship L, Slaytor M. A daptation of *Peganum harmala* callus to alkloid production J Exp Botany, 1974, **25**: 1114~ 1123
- 7 周立刚 长春花细胞培养与吲哚生物碱的生产 天然产物研究与开发 1991, **3**(2): 67~ 73
- 8 甘烦远,郑光植 各种因素对红花培养物中细胞生长及其α-生育酚含量的影响 植物学报, 1991, **33**(7): 516~ 622
- 9 张海保,朱西儒,张云开等. 香蕉花叶病的酶联免役检测技术的研究 植物病理学报, 1994, **24**(4): 323~ 327
- 10 Tabata M, Fujita Y. Production of shikonin by plant cell cultures, In: Zaitlin M et al eds Biotechnology in Plant Science New York: Academic Press, 1985 207~ 218