

离体条件下雷公藤不定根生长与营养成分消耗动态研究

李 琰^{a,b}, 杨钰琪^b, 冯俊涛^a, 王永宏^a, 张 兴^a

(西北农林科技大学 a 无公害农药研究服务中心 陕西省生物农药工程技术研究中心, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究悬浮培养条件下雷公藤不定根营养成分的消耗动态与不定根生长之间的关系,为雷公藤组织培养生产次生代谢产物中培养基的改良及无机元素的及时补充提供参考。【方法】以 NT 为基本培养基,将雷公藤不定根悬浮培养,每隔 5~10 d 对培养基中碳源、氮源、磷酸盐、钾盐、钙盐、镁盐等营养物质的消耗动态及不定根增长量进行测定。【结果】雷公藤不定根对碳、氮、磷酸盐以及钾、钙、镁等营养物质的消耗并不是均匀的。蔗糖、氮、磷酸盐和钾盐在培养后期几乎被耗尽,其中氮的消耗速率最快,在不定根生长进入对数期以前,氮元素已经开始大量消耗,进入对数生长期后,培养基中的氮源 90% 被消耗。蔗糖、磷酸盐、钾盐和钙盐的消耗表现为先快后慢,早期吸收迅速,而在快速生长期其消耗速度减慢。细胞停滞生长以后,蔗糖、氮、磷酸盐和钾盐仍有大量消耗。NT 培养基中碳、氮、磷、钾在培养的前期已经不能满足不定根生长的需要。雷公藤不定根培养过程中对钙和镁的消耗相对较少,培养结束后培养基中还有 48.3% 的钙离子和 34.2% 的镁离子存在。【结论】NT 培养基中,碳源、氮源、磷酸盐和钾盐不足是影响雷公藤不定根生长的主要因素。

【关键词】 雷公藤;组织培养;不定根;营养物质;消耗动态

【中图分类号】 S482.1;Q949.96

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)11-0134-05

Study on kinetic investigation of *Tripterygium wilfordii* adventitious root growth and nutrient consumption *in vitro*

LI Yan^{a,b}, YANG Yu-qi^b, FENG Jun-tao^a, WANG Yong-hong^a, ZHANG Xing^a

(a Research and Development Center of Biorational Pesticide, Shaanxi Province Technology and Engineering Center of Biopesticide, b College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The kinetics of nutrient consumption and adventitious root growth were investigated under adventitious root suspension cultures of *Tripterygium wilfordii*, to lay the foundation for the medium improvement of selective medium and supplied inorganic elements of production on the secondary metabolites. 【Method】Take NT as the basic medium, while in the suspension culture process, a determination on the nutrient consumption, such as carbon source, nitrogen source, PO_4^{3-} , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} and the adventitious root growth was needed in each 5—10 d. 【Result】The consumption of the *T. wilfordii* adventitious root on the carbon source, nitrogen, PO_4^{3-} as well as K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} was not uniform. Sucrose, nitrogen, PO_4^{3-} and K^+ were almost used up in the latter developing period, in which nitrogen was the fastest. Before entering the logarithmic phase, the nitrogen had already begun to consume; 90% of it could be consumed in the logarithmic phase. The consumption of sucrose, PO_4^{3-} , K^+ and Ca^{2+} was quick at first, and slow later. The early absorption was rapid, while in the fast growing period, consumption slowed

* [收稿日期] 2010-03-29

[基金项目] 公益性行业(农业)科研专项(200903052);陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2009ZDKG-01)

[作者简介] 李 琰(1971—),女,河南洛阳人,副教授,在读博士,主要从事植物学及药用植物学研究。E-mail: ly2659@163.com

[通信作者] 张 兴(1952—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事农药学研究。E-mail: zhxing1952@126.com

down. The sucrose, nitrogen source, PO_4^{3-} and K^+ still had the mass consumptions after the stagnation of the adventitious roots growth. In the NT medium, the carbon source, nitrogen, PO_4^{3-} and K^+ already could not meet the needs of the growth of the adventitious root in the early culture period. In the culture process of the adventitious root, the consumption of Ca^{2+} and Mg^{2+} was relatively few. After the culturing, there were still 48.3% Ca^{2+} and 34.2% Mg^{2+} existing in the medium. 【Conclusion】 In the NT medium, the insufficiency of the carbon source, nitrogen source, PO_4^{3-} and K^+ were the main factors affecting the growth of the *T. wilfordii* adventitious root.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; tissue culture; adventitious root; nutrient consumption; kinetic investigation

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)系卫矛科雷公藤属植物,又名黄藤根、水莽草、断肠草等,是著名的杀虫植物之一。我国在很早以前就将其用于医学及各种害虫防治,民间多用于防治蔬菜害虫,其对多种害虫有效^[1-3],故有“菜药”和“山砒霜”之称;传统中医上可用于治疗肿胀、水肿、黄白疽、痢疾等,具有明显的抗肿瘤、抗风湿作用^[4-6]。雷公藤属多年生木质藤本,生长缓慢,加上人类对自然资源的过度开发,使其资源受到破坏。利用化学方法合成雷公藤的有效成分时,由于反应路线较长,收率低,反应条件苛刻,至今尚不能实现工业化生产^[7-9]。植物细胞培养是利用现代生物技术开发植物资源的重要手段之一^[10-11]。因此,通过细胞培养技术生产雷公藤有效成分的次生代谢物质,具有重要的理论和现实意义。

关于雷公藤的组织培养,国内外有关专家已经进行了研究探索^[12-15],但由于细胞生长缓慢,悬浮细胞或愈伤组织中次生代谢产物含量低、稳定性差等原因,均未达到工业化生产的水平。在组织培养中,培养基的主要组成成分,如无机营养元素等的变化是影响植物细胞或不定根培养物及次生代谢产物的主要因素之一^[16-18],但有关这些组分在雷公藤组织培养中的消耗动态及其与不定根生长的关系等方面的研究尚未见报道。为了提高雷公藤不定根的增殖量及其次生代谢产物含量,必须了解雷公藤不定根在培养过程中对各种营养物质消耗的动态变化,以根据雷公藤不定根的生长和营养消耗特性,设计出适合于雷公藤不定根快速增殖的培养基配方,并为雷公藤细胞的大规模培养以及营养物质添加奠定理论基础。为此,本试验研究了雷公藤不定根在生长过程中对碳源、氮、磷、钾、钙和镁等营养物质的消耗动态,及其与不定根生长的关系,以期雷公藤不定根大规模培养中无机元素的及时补充提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用雷公藤植物采自福建省泰宁地区,取其1年生枝条,扦插于苗床上,新长出的根作为外植体进行愈伤组织诱导^[3],形成的愈伤组织在6,7-V+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT培养基上连续培养5代以上,利用该愈伤组织在NT+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT培养基上建立悬浮细胞系,利用该悬浮细胞在NT+4.0 mg/L NAA+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT培养基上诱导形成的不定根作为供试材料。

1.2 试验方法

试验采用NT培养基,加入1.0 mg/L 2,4-D+4.0 mg/L NAA+0.5 mg/L KT,然后加入30 g/L蔗糖,于高压灭菌前用PHS-2C型酸度计调pH至5.8。在250 mL的三角瓶中分别放入100 mL培养基,接种量为8~12 g/L。在转速为120 r/min的摇床上进行培养,培养温度(25±2)℃,自然光照,培养时间60 d。每间隔一定时间(5或10 d)将三角瓶移到超净工作台内,静置10 min左右,用无菌移液器从每瓶吸取10 mL上清液,用于分析培养基中的蔗糖、总氮、磷、钾、钙和镁等大量营养物质的消耗量,将收获的不定根用蒸馏水冲洗后冷冻干燥至恒质量,计算不定根增殖量及细胞在不同生长阶段对这些营养物质的需求量,每试验重复3次,结果取平均值。不定根增殖量按下式计算:

不定根增殖量=收获量-接种量。

1.3 样品分析

采用蒽酮比色法测定总糖质量浓度,用凯氏定氮法测定总氮质量浓度,利用磷钼蓝比色法测定磷质量浓度^[19],采用原子吸收火焰分光光度计法测定钾、钙和镁的质量浓度^[20]。

2 结果与分析

2.1 氮的消耗动态

由图 1 可见,雷公藤不定根的生长延滞期较短,接种后第 10 天进入对数生长期,在 10~35 d,生长速度明显加快,20~35 d 处于快速生长期,35~40 d 处于生长平稳期,第 40 天后不定根增长量开始逐渐下降,进入生长停滞期。氮素是雷公藤不定根生长和发育所需的大量营养元素之一,在不定根进入对数生长期快速生长以前,氮素已经开始大量消耗,进入对数生长期后,仅第 10~35 天就有 76% 的氮素被消耗。培养结束时,培养基中总氮质量浓度降到 14 mg/L,当进入对数生长期后,培养基中的总氮质量浓度快速下降,已不能满足细胞快速分裂的需要,

从而导致不定根生长趋于停滞。因此,要维持不定根的继续生长发育,需在培养第 35 天时,向培养基中添加一定量的氮源。

2.2 磷的消耗动态

磷作为一种细胞的重要组成部分,其消耗程度可以从一个侧面反映出细胞的生长情况。由图 2 可见,在雷公藤不定根进入对数生长期之前,细胞内已经吸收了大量的磷元素,每天消耗量达 15.3 mg/L。而在对数生长期,细胞对磷酸盐的消耗相对平稳,每天平均消耗 6.8 mg/L,不定根停滞生长以后,培养基中磷酸盐质量浓度仍在下降,每天平均消耗 3.7 mg/L。可见,磷不仅参与雷公藤不定根的初级代谢,而且在雷公藤不定根形成次生代谢产物时也是必需的。

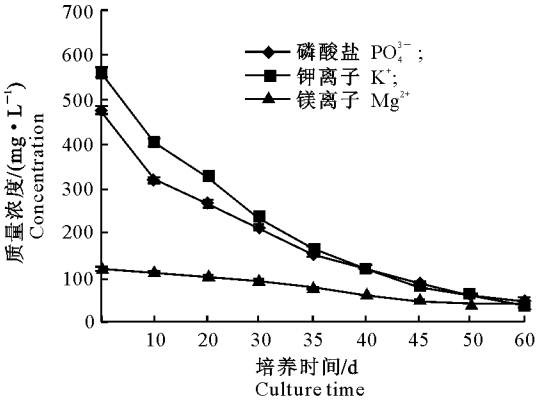
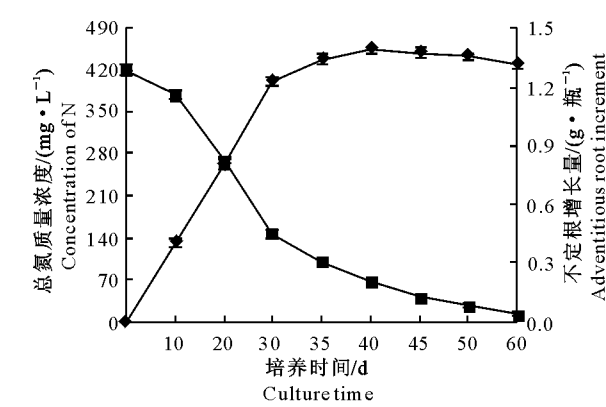


图 1 培养期间雷公藤不定根生长与氮源消耗的关系
—■—. 总氮质量浓度;—◆—. 不定根增长量
Fig. 1 Effect of culture time on adventitious root growth and nitrogen consumption of *T. wilfordii*
—■—. Concentration of N;—◆—. Adventitious root increment

图 2 雷公藤不定根培养期间磷酸盐、钾离子、镁离子的消耗动态
Fig. 2 The curve of the consumption of PO_4^{3-} , K^+ , Mg^{2+} in different periods of *T. wilfordii* adventitious root

2.3 钾的消耗动态

钾是代谢过程中很多重要酶的活化剂,其还可以调节阴阳离子和 pH 值的平衡,促进蛋白质代谢以及平衡酸性氨基酸的负电荷。从图 2 可以看出,钾在早期吸收迅速,接种前 10 d,钾的含量充足,细胞快速吸收钾离子,每天平均消耗 16 mg/L,而在对数生长期,钾的消耗较前 10 d 减慢,每天平均消耗 10 mg/L,雷公藤不定根停滞生长以后,钾仍有大量消耗,可见钾不仅参与不定根的生长,还参与其他代谢活动。随着培养时间的增加,不定根停滞生长以后,培养基中钾离子质量浓度仍在下降,每天平均消耗 4.2 mg/L,培养后期,钾离子含量不足成为不定根生长的一个限制因素。

对镁的吸收利用率不高,但其是植物生长所必需的一类营养元素,镁离子的消耗与细胞的增殖具有密切相关性。从图 2 可以看出,镁离子的消耗曲线比较平缓,从接种开始便均匀下降,在培养的第 30~40 天时,镁的消耗速度较快,这是因为此阶段不定根大量生长,需利用一定量的镁离子以满足生长的需要。整个培养过程中,培养基中仍有 34.2% 的镁离子存在,不会成为不定根生长的限制因素,说明 NT 培养基中镁离子质量浓度可以满足雷公藤不定根生长的需要。

2.4 镁的消耗动态

镁是植物生长所需的中量元素之一。虽然植物

2.5 钙的消耗动态

钙是植物维持正常生命活动所必需的营养元素之一。从图 3 可以看出,雷公藤不定根对钙离子的吸收表现为先快后慢,在细胞快速生长期过后,细胞延滞期大量吸收而未被利用的钙离子又被释放出

来,导致培养基中钙离子质量浓度短暂的升高,在后期雷公藤不定根对钙离子的吸收增强以后,培养基中钙离子质量浓度又逐渐下降。至培养 60 d 后,培养基中还有 48.3%的钙离子,且进入生长停滞期后钙离子几乎没有消耗。说明雷公藤不定根生长的 NT 培养基中钙离子质量浓度偏高。

2.6 蔗糖的消耗动态

作为碳源的蔗糖在细胞的增殖过程中起着非常重要的作用。糖在细胞中能被分解氧化释放出能量,是生命活动的主要能源,另外糖还是细胞壁的主要组成成分。由图 3 可以看出,接种培养的前 10 d,蔗糖的消耗速度相对较快,每天平均消耗 0.85 g/L,有接近 30%的蔗糖被利用,这可能是由于细胞从生长受抑制的状态转入营养物质丰富的环境中后,细胞分裂加速,需要消耗大量的能量。进入对数生长期后,蔗糖的需求仍然很大,每天平均消耗 0.65 g/L,到对数生长期结束时,已经有 81%的蔗糖被利用。细胞停止生长后,还需要消耗一定的碳源来维持次生代谢的进行,在培养结束时,培养基中蔗糖仅剩 0.23 g/L。显然,在培养的后期,蔗糖的量逐渐不能满足不定根生长的需要,成为其生长的一个限制因素。由此可见,在培养 35 d 左右时,应适当添加蔗糖以促进不定根的生长。

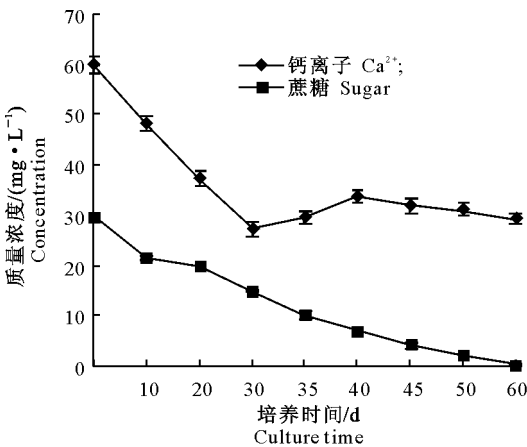


图 3 雷公藤不定根培养期间钙离子和蔗糖的消耗动态
Fig. 3 The curve of the consumption of Ca^{2+} and sugar in different periods of *T. wilfordii* adventitious root

3 讨论

在离体条件下,植物细胞需要从培养基中摄取必需的营养元素,即细胞的生长必须依赖培养基的营养,因此保持培养基中适当的营养元素含量有利于细胞的生长。通过对雷公藤不定根生长过程及其营养物质消耗的动态分析,初步了解了雷公藤不定

根在不同生长阶段对于各种营养物质的需求规律。蔗糖是细胞生长过程的重要能源物质,在培养后期蔗糖含量不足会严重影响不定根的生长。氮、磷和钾是影响不定根生长的最主要因素,本试验在雷公藤不定根培养前期,培养基中已经出现氮、磷和钾的不足,在培养后期均已趋于消耗殆尽。阮茜等^[21]对玫瑰茄细胞生长的研究发现,磷是细胞生长的限制性因素;邓光存等^[22]在对银柴胡细胞生长的研究中也得出了类似的结论。本试验发现,培养中期培养基中蔗糖、氮、磷、钾含量不足,是影响雷公藤不定根生长的主要因素。郭志刚等^[23]在紫杉细胞悬浮培养的研究中也得到了相似的结果。为了满足雷公藤不定根生长和次生代谢的需要,按对数生长期每天平均消耗氮、磷、钾、蔗糖的量计算,需在培养第 35 天时,向培养基中添加 100 mg/L 氮源、88 mg/L 磷酸盐、160 mg/L 钾离子和 12.6 g/L 蔗糖。钙和镁是植物生长所需的中量元素,植物对其的吸收相对较少,本研究培养基中的钙、镁离子比较充足,培养结束后,培养基中还有 48.3%的钙离子,34.2%的镁离子存在,说明对雷公藤不定根的生长而言,NT 培养基中钙、镁离子质量浓度偏高。考虑到钙、镁离子质量浓度过高会影响细胞对其他微量元素的吸收,宜将培养基中钙离子质量浓度降低 30%,镁离子质量浓度降低 25%。

[参考文献]

[1] Swingle W T, Haller H L, Siegler E H, et al. Chinese insecticidal plant *Tripterygium wilfordii* introduced into the United State [J]. Science, 1941, 93: 60-61.
[2] 周小慧, 康玉利, 郭金剑, 等. 雷公藤总生物碱的提取及对东亚飞蝗的生物活性检测 [J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29 (6): 79-81.
Zhou X H, Lian Y L, Guo J J, et al. Bioactivity detection of the total alkaloids extracted from *Tripterygium wilfordii* against *Locustas migratoria* [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2009, 29(6): 79-81. (in Chinese)
[3] 李 琰, 冯俊涛, 王永宏, 等. 雷公藤愈伤组织诱导及杀虫活性研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(5): 103-108.
Li Y, Feng J T, Wang Y H, et al. Study on callus induction and insecticidal activities of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2008, 36 (5): 103-108. (in Chinese)
[4] 仲 剑, 孙志华, 吴 强, 等. 雷公藤甲素对子宫内腺瘤抑制作用的裸鼠体内研究 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2009, 29(6): 775-778.
Zhong J, Sun Z H, Wu Q, et al. Growth inhibition effect of trip-

- tolide on human endometrial cancer cells *in vivo* [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing: Natural Science Edition, 2009, 29(6): 775-778. (in Chinese)
- [5] Ji S M, Wang Q W, Chen J S, et al. Clinical trial of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. in human kidney transplantation in China [J]. Transplantation Proceedings, 2006, 38(5): 1274-1279.
- [6] Zhou H F, Liu X Y, Niu D B, et al. Triptolide protects dopaminergic neurons from inflammation mediated damage induced by lipopolysaccharide intranigral injection [J]. Neurobiology of Disease, 2005, 18: 441-449.
- [7] 郭舜民, 夏志林. 雷公藤甲素的半合成研究 [J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(1): 13-15.
- Guo S M, Xia Z L. Studies on the semi synthesis of triptolide [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1999, 30(1): 13-15. (in Chinese)
- [8] Fu Y F, Zhu Y N, Ni J, et al. (5R)-5-hydroxytriptolide(LLDT-8), a novel triptolide derivative, prevents experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibiting T cell activation [J]. J Neuroimmunol, 2006, 175(1): 142-151.
- [9] Aoyagi Y, Hitotsuyanagi Y, Hasuda T, et al. Fluorination of triptolide and its analogues and their cytotoxicity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(7): 2459-2463.
- [10] 于树宏, 李 玲, 何晓明. 利用细胞培养技术提高次生代谢物的产量 [J]. 生物学通报, 1998, 33(7): 40-42.
- Yu S H, Li L, He X M. Enhance the production of secondary metabolites using plant cell culture [J]. Bulletin of Biology, 1998, 33(7): 40-42. (in Chinese)
- [11] Ramachandra R S, Ravishankar G A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites [J]. Biotechnology Advances, 2002, 20(2): 101-153.
- [12] Nakano K, Yoshida C, Furukawa W. Terpenoids in transformed root culture of *Tripterygium wilfordii* [J]. Phytochemistry, 1998, 49(6): 1821-1824.
- [13] Pépin M F, Chavarie C, Archambault J. Growth and immobilization of *Tripterygium wilfordii* cultured cells [J]. Biotechnol Bioeng, 2004, 38(11): 1285-1291.
- [14] 尹作鸿, 朱蔚华. 雷公藤愈伤组织悬浮培养的研究 [J]. 生物工程学报, 1992, 8(1): 95-98.
- Yin Z H, Zhu W H. The suspension culture of *Tripterygium wilfordii* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1992, 8(1): 95-98. (in Chinese)
- [15] 李耀维, 冯文新, 武增寿, 等. 激光诱变选育雷公藤次生物质高产细胞系 [J]. 激光生物学报, 2000, 9(4): 281-284.
- Li Y W, Feng W X, Wu Z S, et al. Breeding variety cells of secondary matter of *Tripterygium wilfordii* by laser induced [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2000, 9(4): 281-284. (in Chinese)
- nese)
- [16] 张 艳, 施和平, 罗刚跃. 三裂叶野葛毛状根的生长及其培养基营养物质的消耗变化 [J]. 生命科学研究, 2007, 11(1): 52-57.
- Zhang Y, Shi H P, Luo G Y. Relationship between growth and medium nutrient consumption during the culture of *Pueraria phaseoloides* hairy roots [J]. Life Science Research, 2007, 11(1): 52-57. (in Chinese)
- [17] Margarita C, Margarita M, Jorge F T, et al. Calcium restriction induces cardenolide accumulation in cell suspension cultures of *Digitalis thapsi* L. [J]. Plant Cell Rep, 1995, 14: 786-789.
- [18] Pitta-Alvarez S I, Spollansky T C, Giulietti A M. Scopolamine and hyoscyamine production by hairy root cultures of *Brugmansia candida*: Influence of calcium chloride, hemicellulase and theophylline [J]. Biotechnology Letters, 2000, 22: 1653-1656.
- [19] 邹 琦. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2000.
- Zou Q. Guideline for plant physiology [M]. Beijing: Beijing University Press, 2000. (in Chinese)
- [20] 韩雅珊. 食品化学试验指导 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996.
- Han Y S. Guideline for food chemistry experimentation [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. (in Chinese)
- [21] 阮 茜, 郭 勇. 磷限制培养中玫瑰茄细胞生长及花青素形成动力学 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 1999, 27(1): 86-90.
- Ruan Q, Guo Y. Kinetics on growth of roselle cells and anthocyanin formation in phosphorus limiting cultures [J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition, 1999, 27(1): 86-90. (in Chinese)
- [22] 邓光存, 彭 励, 杨彩荣, 等. 不同激素对银柴胡细胞生长及营养成分消耗的影响 [J]. 干旱地区农业研究, 2006, 24(6): 107-111.
- Deng G C, Peng L, Yang C R, et al. The effect of the different hormones on the growth and the consuming of nutrition elements of the starwort cell [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2006, 24(6): 107-111. (in Chinese)
- [23] 郭志刚, 都 军, 刘瑞芝. 紫杉细胞生长过程与营养物质消耗的动态研究 [J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2002, 42(5): 599-602.
- Guo Z G, Du J, Liu R Z. Kinetic investigation of Taxus cell growth and nutrient consumption [J]. Jour Tsinghua Univ: Sci & Tech, 2002, 42(5): 599-602. (in Chinese)