411-414
维普资讯 http://www.cqvip.com
3102(15)

云 南 植 物 研 究 1997; 19(4): 411~414
Acta Botanica Yunnanica

地不容毛状根的培养*

罗寿青** 胡虹*** 杨崇仁 段金玉 李存信
(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)

Q949.405

摘要 以 R_{1000}，15834，1855，8196 等 4 种发根农杆菌菌株，在不同条件下，感染地不容（*Stephania delavayi* Diels），结果在光照条件下，R_{1000} 诱导植物幼嫩组织产生毛状根。毛状根在 MS 液体培养基中生长 42 d 后，趋于稳定；异喹啉生物碱含量在第 28 d 时达到峰值 1104 μg / gFW。6 种培养基中，毛状根生长及异喹啉生物碱含量的差异很大，在 B_5 培养基中毛状根生长最快，Nitsch 培养基中毛状根的异喹啉生物碱含量最高。B_5 培养基中，苯丙氨酸抑制毛状根的生长及异喹啉生物碱合成。

关键词 地不容，毛状根，异喹啉生物碱，Ri 质粒，发根农杆菌

HAIRY ROOT CULTURE OF STEPHANIA DELAVAYI

Luo Shouqing, Hu Hong, Yang Chongren, Duan Jinyu, Li Cunxin
(*Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204)

Abstract On different conditions, *Stephania delavayi* was infected by four kinds of *Agrobacterium rhizogenes* strains R_{1000}, 15834, 1855, 8196, and hairy roots were induced by the strain R_{1000} in light from young plant tissues. In MS liquid medium, the growth of hairy roots tended to be stable after they had been cultured for 42 days. The content of isoquinoline alkaloid came up to the summit on the 28th day, which was 1104μg / gFW. Both growth and isoquinoline alkaloid content of hairy roots were very different in six kinds of media. Among different media, hairy roots grew fastest in B_5 medium, and the content of isoquinoline alkaloids was the highest in Nitsch medium. Phenylalanine inhibited both biosynthesis of isoquinoline alkaloids and growth of the hairy roots in B_5 medium.

Key words *Stephania delavayi*, Hairy roots, Isoquinoline alkaloids, PRi, *Agrobacterium rhizogenes*

地不容（*Stephania delavayi* Diels）是一种广泛分布于西南和华南的千金藤属植物，富含异喹啉生物碱。这类生物碱的生理活性不断得以阐明（李淑仪等，1989；阮德春等，1991）。人们已用愈伤组织培养的方法生产这类生物碱，但含量很低，且生长缓慢（朱蔚华等，1983）。本文报道以地不容为感染材料，诱导毛状根，并继代培养，以期寻找到有利于地不容毛状根诱导、生长和异喹啉生物碱合成的条件。

*云南省应用基础研究青年基金(930C38)

现为中国协和医科大学博士生，*通讯联系人

1996-09-10 收稿，1997-04-23 接受发表

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

地不容（*Stephania delavayi*）来源于昆明地区。

1.1 地不容的转化

以活化的菌株 15834，R_{1000}，1855 及 8196 针刺感染地不容的顶端茎、基部及叶；感染苗分别在光照和黑暗条件下培养；待毛状根长出，以 500 mg／L 羧卞青霉素灭菌。提取及检测冠瘿碱以 Petit 等（1983）的方法为基础，适当改进。

1.2 液体培养条件

通过毛状根继代培养，确立了毛状根培养物，毛状根于 500 mL 三角瓶（100 mL 培养基）中继代，在 25℃下，80r／min，接种量为 0.45～1.25 gFW，每个处理至少 3 次重复。

（1）在 MS，B_5，LS，Nitsch，T，Miller 等 6 种培养基中培养。

（2）在 B_5 培养基中，添加 0.001%，0.01%，0.1%的外源苯丙氨酸。

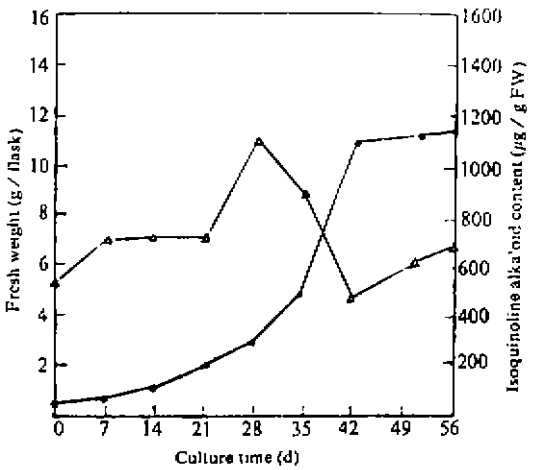

图 1 毛状根在 MS 培养基中生长及异喹啉生物碱含量的动态变化

Fig. 1 kinetics of isoquinoline alkaloid content and growth of *S. delavayi* hairy roots cultured in MS medium

—●—Fresh weight of hairy roots

—△—Isoquinoline alkaloid content of hairy roots

1.3 重量的测定方法

滤纸过滤培养基，以蒸馏水冲洗，用天平称取根鲜重，取 3 次重复的平均值。

1.4 生物碱分析

（1）提取。依阮德春等（1991）的方法。

（2）异喹啉生物碱的定量。云南产地不容根中含光千金藤碱（stepholidine）、汉防已甲素(tetradrine)、千金藤素(cepharanthine)等异喹啉生物碱，这类生物碱在 28 nm 下有吸收峰，光千金藤碱在根中含量及其在总碱中的比例已见报道（阮德春，1991）。用分光光度计在 282 nm 下测样品吸收峰，以光千金藤碱作标准曲线，确定毛状根中异喹啉生物碱的含量。标准曲线方程 $y=124.78x+0.7747$，相关系数 $r=0.9995$。

2 结果和讨论

2.1 地不容毛状根的诱导

只有 R_{1000} 感染植株顶端茎且在光照下才长出毛状根，其余均无毛状根形成。从本实验结果看，菌株 8196，1855，15834 没有诱导出毛状根。R_{1000} 只能诱导顶端茎形成毛状根，表明幼嫩部位农杆菌容易侵入附着，或者是幼嫩部位生长素含量高而易于形成毛状根之故。植物生理年龄对地不容毛状根诱导的影响已有报道（Yonemitsu *et al*, 1990）。本实验显示光对地不容毛状根的形成有利，许多实验中，毛状根都是在光下诱导形成的（Christen *et al*, 1992）。被检测的毛状根中，均有农杆碱的存在，表明毛状根确已被转化。

2.2 在 MS 培养基中，毛状根的生长及异喹啉生物碱含量的动态变化

毛状根生长及异喹啉生物碱含量的动态变化见图 1。

维普资讯 http://www.cqvip.com

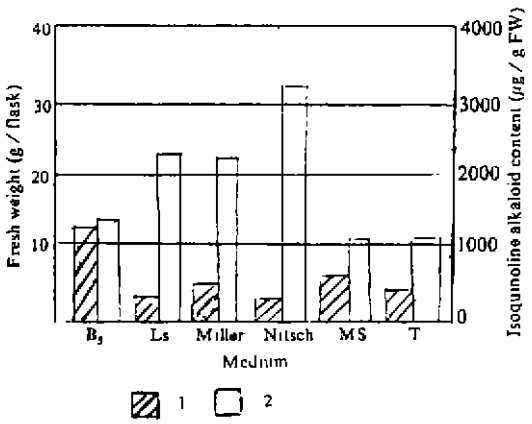

图 2 不同培养基中异喹啉生物碱含量及毛状根鲜重

Fig. 2 Fresh weight and isoquinoline alkaloid content of *S. delavayi* hairy roots in different media

1 Fresh weight of hairy roots

2 Isopuinoline alkaloid content of hairy roots

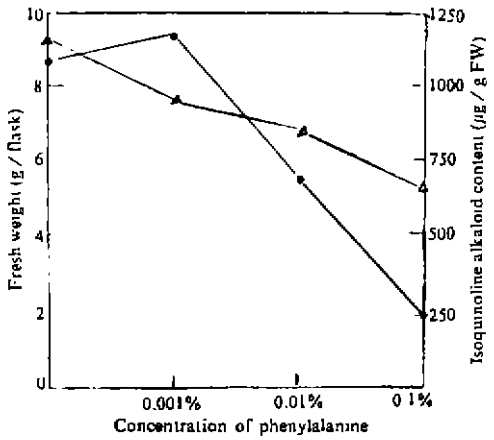

图 3 不同苯丙氨酸浓度对毛状根生长及异喹啉生物碱含量的影响

Fig. 3 Eeffects of different phenylalanine concentration on growth and isoquinoline alkaloid content of *S. delarayi* hairy roots

—●—Fresh weight of hairy roots

—△—Isoquinoline alkaloid content of hairy roots

在 MS 培养基中，毛状根生长到 42 d 后，由于生理年龄、氧气及营养等因素的制约，使得毛状根生长趋于停滞，经 56 d 生长，毛状根增重 26 倍，这与多数种的毛状根相比要显得慢一些。颠茄（*Atropa belladonna*）毛状根 3 周增重 60 倍（Kamado *et al*, 1989）；人参（*Panax ginseng*）毛状根 3 周却只增重到 3.07 倍（Yoshikawa *et al*, 1987）。地不容毛状根生长之所以相对较慢，一方面与感染植株的菌株有关，另一方面也和原植物的基因型有关。地不容毛状根的异喹啉生物碱含量在第 28 d 时达最高值，经过一个急剧下降的过程后又有所回升。对该结果可这样推测：从分生组织刚分化的部分不能合成异喹啉生物碱，第 28 d 前，生长量随分生组织分化而增加，尽管这些新分化的组织不能合成异喹啉生物碱，但先前分化的组织中合成异喹啉生物碱的有关酶活性不断增强，因而毛状根中异喹啉生物碱含量还是不断增加。第 28 d 后，由于酶活力不再增加，因而随着生长量的急剧增加，异喹啉生物碱含量显著下降。42 d 后，生长趋于稳定，没有或很少有分生组织的分化，而生物碱却能继续合成，因而其含量有所提高。

2.3 不同培养基对毛状根生长及异喹啉生物碱含量的影响

由图 2 可知，毛状根在不同培养基中生长至 35d 时，在 B_5 培养基中生长最好，在 Nitsch 培养基中生长最差，而生物碱含量却最多。B_5，Nitcsh 培养基中毛状根形态特别，B_5 培养基中毛状根生长迅速，分枝多，较长，成团；Nitsch 培养基中毛状根侧枝短，坚硬，不成团。

6 种培养基中，毛状根生长和异喹啉生物碱合成差异较大。LS 和 MS 培养基中生物碱含量差异较大，两种培养基中仅存在有机物的差别，MS 培养基比 LS 培养基多了甘氨酸、盐酸吡哆素、烟酸，这些有机物很可能对生长有利，而对合成不利。B_5 培养基中含铵少，可能正是这个原因导致 B_5 培养基对生长和合成的刺激。B_5 培养基的 pH 可能对生长有利，氢离子可通过影响细胞膜的透性，进一步影响细胞对内源代谢物流失的控制，从而影响生长。曼陀罗（*Datura*

维普资讯 http://www.cqvip.com

Stromonium）毛状根在 B_5 培养基中生长及生物碱合成均最好（Dupraz *et al*, 1994; Maldonado-Mandoza *et al*, 1993）。Nitsch 培养基中不含 N 和有机物，其中毛状根生物碱含量很高，可能因为不含对合成不利的有机物；Nitsch 培养基中毛状根生长最慢，也许是不含 N 的缘故。

2.4 苯丙氨酸对毛状根生长及异喹啉生物碱含量的影响

添加 0.001%，0.01%，0.1%苯丙氨酸后，图 3 显示毛状根异喹啉生物碱的合成均受到抑制，除 0.001%外，其余均抑制毛状根的生长。苯丙氨酸和酪氨酸是喹啉类生物碱合成途径的起点。本实验结果与苯丙氨酸对延胡索愈伤组织的异喹啉生物碱含量有促进作用的结果不同（王凤仙等，1983）。在金鸡纳树（*Cinchona ledgeriana*）冠瘿组织培养中，加入前体 L-酪氨酸后，喹啉生物碱的合成受到抑制，而在金鸡纳树的正常根培养物中，喹啉生物碱合成受其促进，这可能反映转化的培养有更好的生理状态（Panye，1987）。

参 考 文 献

王凤仙，严宵，1983. 延胡索愈伤组织细胞悬浮培养研究. 中草药，**14**(6): 278

李淑仪，杨秀英，王方材，1989. 克斑宁药理活性的初步研究. 中草药，**20**(9): 422

朱蔚华，朱兆仪，王艳春等，1983 三种千金藤药用植物愈伤组织的诱导和培养. 中草药，**14**(6): 275

阮德春，张雪梅，赵春景等，1991. 千金藤属植物生物碱的高效液相色谱定量分析. 云南植物研究，**13**(2): 225

Christen P, Aoki T, Shimomura K, 1992. Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyosyamus albus* hairy roots transformed with Agrobacterium rhizogenes A4. *Plant Cell Rep*, **11**: 597

Duptaz J M, Christen P, Kapetanidis I, 1993. Tropane Alkaloids in Transformed Roots of *Datura quercifolia*. *Planta Med*, **60**: 158

Kamada H, Okamura H, satake M, *et al*, 1986. Alkaloid production by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Plant Cell Rep*, **5**: 239

Maldonado-Mendoza I E, Ayora-Talavera T, Loyola-Vargas V M, 1993. Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissus and Organ Culture*, **33**: 321.

Panye J, Rhodes M J C, Robins R J, 1987. Quinoline Alkaloid Production by Transformed Cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant Med*, **53** 367.

Petit A, David C, Dahl G, *et al*, 1983. Further extension the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degration. *Mol Gen Genet*, **190**: 204

Yonemitsu H, Shimomura K, Satake M, *et al*, 1990. Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata* L. *Plant Cell Rep*, **9**: 307

Toshikawa T, Furaya T, 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep*, **6**: 449