维普资讯 http://www.cqvip.com

几种生理因子对印楝细胞悬浮培养生长的影响

张娟芳，戚树源，何梦玲，胡兰娟

（中国科学院华南植物研究所，广东广州 510650）

摘 要：通过研究不同生理因子对印楝悬浮细胞生长的影响，建立了一种快速生长的印楝细胞悬浮培养体系。结果表明，在添加了 6-BA 0.8 mg/L、NAA 0.8 mg/L、蔗糖 30 g/L 且初始 pH 值为 5.8 的 MS 培养液中，以 60 g/L 的接种量进行印楝细胞的悬浮培养，细胞生长速率可达 4.49 g/L·d。

关键词：印楝；细胞悬浮培养

中图分类号：Q945.5 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-3142(2003)06-0549-04

Effects of several physiological factors on the growth of cell suspension culture of *Azadirachta indica*

ZHANG Juan-fang, QI Shu-yuan, HE Meng-ling, HU Lan-juan

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

Abstract: Effects of several physiological factors on the growth of cell suspension culture of *Azadirachta indica* was studied and a fast growing cell suspension culture system of *Azadirachta indica* was established. The result showed that the cell growth rate of *Azadirachta indica* could reach 4.49 g/L·d under the following physiological conditions: the cell cultured on a Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 6-BA 0.8 mg/L, NAA 0.8 mg/L and sucrose 30 g/L, with the initial pH 5.8 in the medium and the cell amount of inoculation 60 g/L of fresh cells.

Key words: *Azadirachta indica*; cell suspension culture

印楝(*Azadirachta indica* A. Juss)是楝科楝属的热带乔木，原产于缅甸和印度，在亚洲南部、非洲和南美洲的许多地区都有分布和栽培，但以印度等亚洲国家产量最大，我国没有印楝的自然分布(徐汉虹，2001)。印楝叶、树皮和种子的提取物一直是印度等南亚国家农业上的抗虫材料，1968 年 Butterworth 和 Morgan 成功地分离出印楝素(azadirachtin)后，印楝作为杀虫剂的研究在世界范围内广泛开展起来(Saleem 和 Michael，1986)。研究表明，印楝素对 200 多种农业害虫有其他植物性杀虫剂无法比拟的高生物活性，且因其不影响胆碱脂酶活性并能生物降解，从而对人畜及环境无任何毒性(Saleem 和 Michael，1986；李晓东等，1995；Shirish 等，1995)。

印楝是近代制备无公害农药的重要植物资源，但印楝中的杀虫有效成分结构复杂，难以人工合成(赵善欢等，1989)，采用天然产物生产印楝杀虫剂又受到印楝分布及印楝素含量的不稳定性等因素的影响(Shirish 等，1995)，不能满足生产的需求，所以早在二十世纪 70 年代各国学者就开始进行印楝组织培养的研究(Rangaswamy 和 Promila，1972)。到目前为止，国内外学者在印楝器官培养、组织分化、植株再生和培养物中次生代谢物质形成等方面做了许多工作(Manisha 等，1981，1988；Virenda 等，1993；Murthy 等，1998；Wawetzer，1998；戚树源等，1998)，但有关印楝细胞悬浮培养的专门研究尚未见报道。采用植物细胞悬浮培养技术生产天然产物已在许多植物上获得成功，如采用紫草(*Lithosper-*

收稿日期：2002-04-04 **修订日期**：2002-10-28

基金项目：广东省科委农村科技处星火计划储备项目

作者简介：张娟芳(1977-)，女，湖北荆州人，硕士生，植物学专业，主要从事印楝组织培养与次生物质代谢生理等研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

mum erythrorhizon)细胞培养生产紫草素(戚树源等,1997),采用红豆杉(*Taxus chinensis*)细胞培养生产紫杉醇等(余龙江等,2002)。本文研究几种不同生理因子对印楝悬浮细胞生长的影响,旨在建立一种快速生长的印楝细胞悬浮培养体系,为采用细胞悬浮培养技术生产印楝次生代谢产物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与培养条件

印楝叶片诱导的愈伤组织(戚树源等,1998),已在本实验室继代培养 2～3 年。本实验采用该愈伤组织作为实验材料,建立印楝细胞悬浮培养体系。所有实验如无特殊说明,均采用 150 mL 三角瓶,装液量 50 mL,摇床转速 120 rpm,培养温度 25±2 ℃,光照培养(以日光灯为光源,每天连续光照 12 h,光照强度为 15～25 μmol $m^{-2}s^{-1}$)。

1.2 细胞生长测定

在添加了 6-BA 0.4 mg/L、NAA 0.8 mg/L、蔗糖 30 g/L 且初始 pH 值为 5.8～6.0 的 MS 培养液中,分别接入不同接种量的印楝细胞。每两天收集 1 次,每一接种量每次 3 瓶,40～50 ℃干燥至恒重,取 3 瓶细胞干重的平均值,绘成细胞生长曲线。每一接种量下的细胞生长速率=(该接种量下第 12 d 收获的细胞干重－接种时的细胞干重)/(每瓶培养液体积×12),单位 g/L·d。

1.3 不同生理因子对印楝悬浮细胞生长的影响

分别调节 MS 基本培养液中添加的植物激素的种类和浓度、碳源的种类和浓度以及培养液的初始 pH 值,印楝细胞的接种量均为 60 g/L,培养 12 d 后收集,40～50 ℃干燥称重。实验重复 3 次,结果取平均值。pH 值用 Corning pH meter 120 测定。

2 实验结果与讨论

2.1 不同接种量对印楝悬浮细胞生长的影响

分别将 20、40、60、80 g/L 的新鲜印楝细胞接入添加了 6-BA 0.1 mg/L、NAA 0.8 mg/L、蔗糖 30 g/L 的 MS 培养液中,印楝悬浮细胞的生长曲线如图 1(A、B)所示。

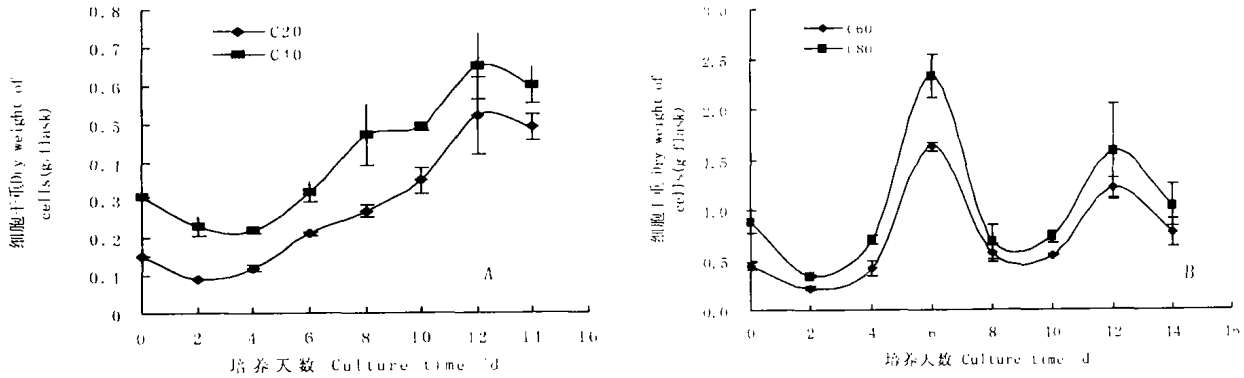

图 1 (A、B)不同接种量对印楝悬浮细胞生长的影响

Fig. 1 (A、B) Effects of cell amount of inoculation on the cell growth in the cell suspension culture of *Azadirachta indica*

C20、C40、C60 和 C80 分别是接种量为 20、40、60、80 g/L 时的细胞培养 C20, C40, C60 and C80 are the cell suspension cultures of *Azadirachta indica* with the cell amounts of inoculation of 20, 40, 60 and 80 g/L

由图 1(A)可以看出,当接种量为 20 g/L 和 40 g/L 时,印楝细胞的生长曲线呈"双 S"型,而由图 1(B)可以看出,当接种量为 60 g/L 和 80 g/L 时,印楝细胞的生长曲线则呈双峰型,这一结果说明,不同接种量对印楝细胞的生长具有明显的影响。在四种接种量下,印楝细胞均在接种后第 4 天进入第一对数生长期,第 10 天进入第二对数生长期;不同之处在于:接种量为 20～40 g/L 时,印楝细胞的第一对数期为 4 天,且第一对数期结束后细胞生长不下降,而接种量为 60～80 g/L 时,第一对数期仅为 2 d,且第一对数期结束后细胞生长下降,第二个生长峰值低于第一个生长峰。在植物细胞悬浮培养中,采用高密度培养的方法来增加培养物中次生代谢产物的形成,已经有许多成功的例子(Zhong 和 Yoshida, 1995),印楝细胞在高密度培养与低密度培养时表现出不同的生长状态,可以考虑采用高密度培养的方法来促进印楝悬浮细胞中次生代谢产物的形成。

戚树源等(1998)在进行印楝愈伤组织培养和植株再生的研究中发现,印楝愈伤组织在添加了不同 6-BA 和 NAA 组合的 MS 培养基中继代培养时均

维普资讯 http://www.cqvip.com

出现两个生长峰，接种的愈伤组织所处的生长期和培养基中的激素组成影响双峰出现的时间，但并不改变印楝愈伤组织生长的双峰性质。而在本实验中，印楝悬浮细胞在接种量为 60～80 g/L 时生长曲线也有双峰现象。印楝细胞生长出现两个生长峰的特征是否与印楝细胞的代谢分化有关，有待于进一步研究。

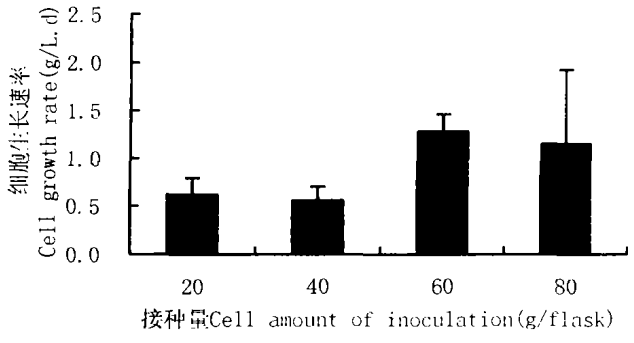

图 2　不同接种量下印楝细胞生长速率

Fig. 2　The cell growth rate of *Azadirachta indica* from different cell amounts of inoculation

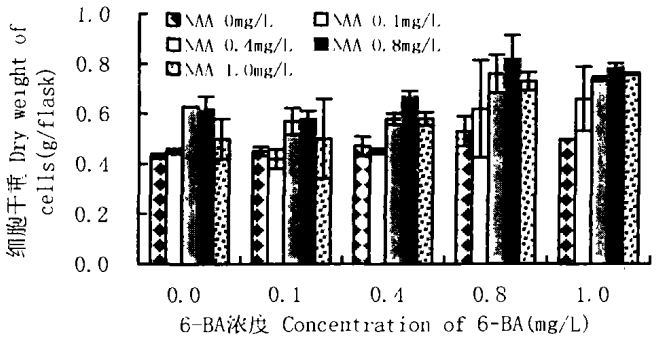

图 3　6-BA 与 NAA 的不同浓度组合对印楝悬浮细胞生长的影响

Fig. 3　The effects of different concentrations of 6-BA and NAA on the cell growth of *Azadirachta indica*

不同接种量下印楝悬浮细胞的生长速率如图 2 所示。在接种量为 60 g/L 时，印楝细胞的生长速率大于其他接种量，可考虑采用 60 g/L 作为印楝细胞悬浮培养生长的最适接种量。

2.2 激素对印楝细胞生长的影响

在添加了 6-BA 0～1 mg/L 和 NAA 0～1 mg/L 不同浓度组合的 MS 基本培养基中，以 60 g/L 的接种量接入印楝细胞，光照培养 12 d 后收集，干燥称重。当培养基中不含 6-BA 或 6-BA 浓度一定时，随着 NAA 浓度的增大，收获的细胞干重的变化趋势如图 3 所示。

当培养基中不含 6-BA 或 6-BA 与 NAA 的浓度均小于或等于 0.4 mg/L 时，印楝细胞褐化严重，颗粒不均，长势略快者则粘度大，不易抽滤；当 6-BA 与 NAA 浓度均大于 0.4 mg/L 时，印楝细胞颜色浅黄或浅绿，颗粒细小均匀，抽滤容易。由图 3 可以看出，当 6-BA 浓度一定时，随着 NAA 浓度的增大，收获的细胞干重增加；当 NAA 浓度大于 0.8 mg/L 时，收获的细胞干重开始下降；而当 6-BA 与 NAA 浓度均为 0.8 mg/L 时，收获的细胞干重达到本实验条件下的最大值，可考虑选用此种浓度组合进行印楝细胞的悬浮培养，以获得理想的细胞生长速度。

2.3 不同碳源对印楝细胞生长的影响

在分别添加了 15、30、45 g/L 的蔗糖或葡萄糖，且 6-BA 与 NAA 浓度均为 0.8 mg/L 的 MS 基本培养基中，以 60 g/L 的接种量接入印楝悬浮细胞，光照培养，12 d 后收集，干燥称重。培养基中添加的蔗糖或葡萄糖的浓度与收获的细胞干重的关系如图 4 所示。由图 4 可以看出，添加浓度相同时，以蔗糖作为碳源的培养基中收获的细胞干重均大于以葡萄糖作为碳源的培养基，且蔗糖浓度为 30 g/L 的培养基中收获的细胞干重达到本实验条件下的最大值。由此可知，蔗糖比葡萄糖更适合作为印楝细胞悬浮培养生长的碳源，且以 30 g/L 为最适添加浓度。这一结果与 Wewetzer(1998)在研究不同碳源对印楝愈伤组织中印楝素生成的影响时所得到的结论一致。

有文献(Panda 等，1992)表明，培养基中蔗糖浓度的增大可能会导致细胞渗透压休克(Osmotic shock)或影响生物合成途径，从而抑制细胞的生长，促进次生代谢物的积累。在本实验中，蔗糖浓度大于 30 g/L 时，随着蔗糖浓度的增大，细胞的生长下降，蔗糖浓度对印楝细胞生长的影响是否也具有文献所述机制，且是否会促进印楝细胞中次生代谢产物的积累，还需要进一步的研究。

2.4 pH 值对细胞生长的影响

以 MS 为基本培养基，添加 6-BA 0.8 mg/L、NAA 0.8 mg/L、蔗糖 30 g/L，并分别调节培养液的初始 pH 值为 4.5、5.0、5.5、5.8、6.0、6.5，以 60 g/L 的接种量接入印楝细胞，光照培养 12 d 后收集，干燥称重。培养液的起始 pH 值对印楝悬浮细胞生长的影响如图 5 所示。在 pH 值位于 4.5～5.8 之间时，随着 pH 值的增加，收获的细胞干重增大；至

维普资讯 http://www.cqvip.com

pH值为5.8时达到最大值；在pH值位于5.8～6.5之间时，随着pH值的增加，收获的细胞干重下降。pH值为5.8时，印楝悬浮细胞的生长速率可达4.49 g/L·d。

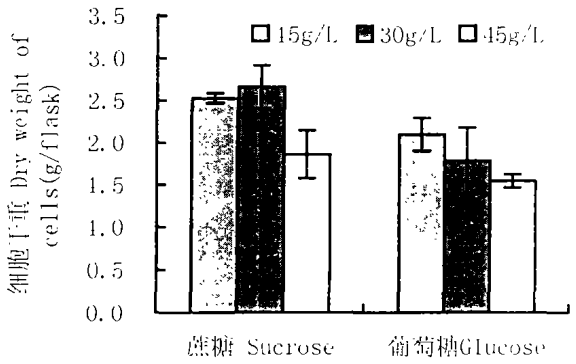

图4 蔗糖和葡萄糖对印楝细胞生长的影响
Fig. 4 The effects of sucrose and glucose on the cell growth of *Azadirachta indica*

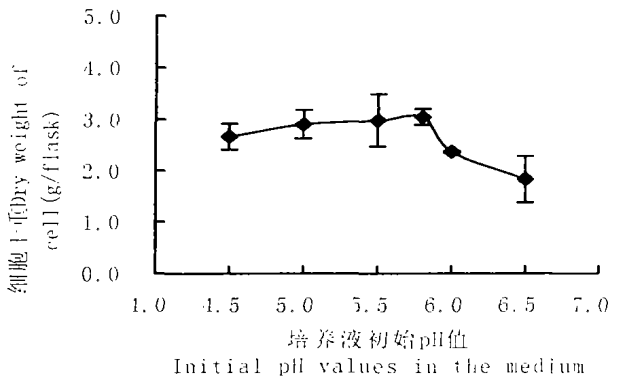

图5 培养基不同初始pH对印楝细胞生长的影响
Fig. 5 The effect of different initial pH values in the medium on the cell growth of *Azadirachta indica*

印楝细胞在悬浮培养过程中，培养液中的pH值随细胞生长而有规律的变化。图6反映了接种量为50 g/L、初始pH值为5.8时印楝细胞生长与培养液中pH值变化的关系。接种量为50 g/L时细胞生长曲线呈不太明显的双峰型。从悬浮培养开始到第8天，细胞生长曲线位于第一峰，培养液中pH值的变化与印楝细胞的生长同步；从第8天到第16天，细胞生长曲线位于第二峰，培养液中的pH值与印楝细胞的生长呈负相关。

在植物细胞培养过程中，培养液中pH值的变化通常是由于培养液中氮源的消耗产生的。当植物细胞在以NO_3^-为主要氮源的培养液中培养时，培养液的pH值随植物细胞的生长而上升(Treat和

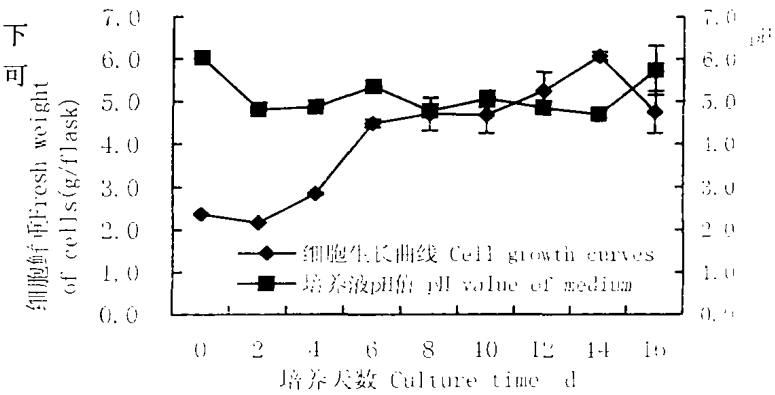

图6 印楝细胞生长过程中培养基pH值的变化
Fig. 6 The variation of medium pH values during the cell growth of *Azadirachta indica*

Engler，1989)。印楝细胞悬浮培养采用以NO_3^-为主要氮源的MS培养液，在培养过程的前8天，培养液中pH值与细胞生长同步，与该报道结论一致。

戚树源等(1997)在采用两步法进行紫草细胞培养时发现，细胞生长培养液的pH值与紫草细胞生长呈正相关，而紫草色素生产培养液的pH值却与紫草细胞色素增长呈负相关，这一结果可能是由于紫草色素生成过程伴随有酸性副产物生成以及紫草色素的萘醌环显酸性所致。印楝细胞悬浮培养过程中，印楝细胞生长与培养液pH值在第一峰范围内具有紫草细胞生长与其培养液pH值类似的正相关性，而在第二峰范围内，具有紫草色素生产与其培养液pH值类似的负相关性，这是否表明，印楝悬浮细胞生长曲线的第一峰反映了印楝细胞的增长规律，而第二峰反映了印楝细胞的代谢规律？实际情况如何，还有待于进一步的研究。

综上所述，在添加了6-BA 0.8 mg/L、NAA 0.8 mg/L、蔗糖30 g/L且初始pH值为5.8的MS培养液中，以60 g/L的接种量进行印楝细胞的悬浮培养，细胞生长速率可达4.49 g/L·d。印楝细胞悬浮培养快速生长体系的建立，为进一步研究印楝次生代谢产物的形成和调控奠定了基础，具有一定的实际价值和理论意义。

参考文献：

李晓东，赵善欢. 1995. 印楝素对昆虫的毒理作用机制[J]. 华南农业大学学报，**17**(1)：118－122.

徐汉虹. 2001. 杀虫植物与植物性杀虫剂(第一版)[M]. 北京：中国农业出版社，175－186.

Antje Wewetzer. 1998. Callus cutures of *Azadirachta indica*

(下转第567页 Continue on page 567)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 4　加样回收率实验结果

Table 4　Results of added recovery

编号 No.	加入量 Added amount(mg)	测得量 Found amount(mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery(%)
1	2.5	2.57	103	—
2	2.5	2.47	99	102
3	2.5	2.60	104	

2.2.5 方法重现性考察　对同一样品分别按样品处理方法和测定方法测定(表 5)。

3　小结

(1)以小檗碱为指标，对黄柏 3 种提取溶剂、3 种分离纯化方法的提取物中总生物碱含量的工艺路线的产品得率、含量及方法总提取率进行了综合评价，总的来说，醇提取、大孔树脂吸附方法明显优于其他方法。

(2)本测定方法相比以前经典方法操作更简便迅速，方法准确度好，稳定性、重现性好。适用于黄柏中总生物碱工业化生产中的含量控制。

表 5　重现性实验结果

Table 5　Results of reproducibility tests

编号 No.	含量 Content(%)	平均含量 Average content(%)	CV (%)
1	33.4	—	—
2	33.2	—	—
3	33.7	33.3	0.7
4	33.1	—	—
5	33.2	—	—

参考文献：

中华人民共和国药典. 2000. 一部. 化学工业出版社，548.

孔少仪. 2000. 黄柏胶囊中小檗碱的含量测定[J]. 中医药研究，**16**(3)：48－49.

吕　琳，王永奇. 1990. TLC 和 HPLC 法测定小檗碱在黄柏中的分布[J]. 中草药，**21**(5)：11－13.

彭艳梅. 1997. 两种方法对黄柏各部位小檗碱含量测定[J]. 中草药，**10**(28)：599－601.

(上接第 552 页 Continue from page 552)

and their potential for the production of Azadirachtin[J]. *Phytoparasitica*, **26**(1): 47－52.

Chen F, Zhang Y. 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on gulcose for phycocyanin production using a fed-batch system [J]. *Enzyme Microb Technol*, **20**: 221－224.

Manisha Sanyal, Asish Das, Mili Banerjee, *et al*. 1981. *In vitro* hormone induced chemical and histological differentiation in stem callus of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, **19**: 1 067－1 068.

Manisha Sanyal(Sarkar), Anuradha Mukherji, P. C. Datta. 1988. Glycine on *in vitro* biosynthesis of nimbin and β-sitosterol in tissues of *Azadirachta indica*[J]. *Current Science*, **57**(1): 40－41.

Murthy BNS, Praveen K. Saxena. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem(*Azadirachta indica* A. Juss)[J]. *Plant Cell Reports*, **17**: 469－475.

Panda AK, Mishira S, Bisaria VS. 1992. Alkaloid production by plant cell suspension of *Holarrhena antidysenterica*: Ⅰ. Effect of major nutrients[J]. *Biotechnlo Bioeng*, **39**: 627－630.

Qi SY(戚树源), Lin LD(林立东), Liang SZ(梁世中), *et al*. 1997. Cell suspension culture of *Lithospermum erythrorhizon* in a 10-litre airlift loop bioreactor(10 升气升环流式生物反应器培养紫草细胞)[J]. *Journal of Tropical and Suptropical Botany*(热带亚热带植物学报),**5**(2): 80－84.

Qi SY(戚树源), Ye QF(叶勤法), Lin LD(林立东). 1998. Plant regeneration of callus tissue derived from *Azadirachta indica*(印楝愈伤组织培养和植株再生)[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*(热带作物学报), **19**(1): 77－81.

Rangaswamy NS, Promila. 1972. Morphogenesis of the adult embryo of *Azadirachta indica* A. Juss [J]. *Z. Pflanzenphysiol*, **67**: 377－379.

Saleem Ahmed, Michael Grainge. 1986. Potential of the Neem Tree (*Azadirachta indica*)[J]. *Economic Botany*, **40**(2): 201－209.

Shirish R Yakkundi, R Thejavathi, B Ravindranath. *et al*. 1995. Variation of azadirachtin content during growth and storage of Neem *Azadirachta indica* seeds[J]. *J Agric Food Chem*, **43**: 2 517－2 519.

Treat WJ, Engler CR. 1989. Culture of photomixotrophic soybean and pineina modified fermentor using a novel impeller[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, **34**: 1 191－1 202.

Virenda K, Gautam, Kanan Nanda, shrish C. Gupta. 1993. Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. Juss—a medicinal tree[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **34**: 13－18.

Yu LJ(余龙江), Cai YJ(蔡永君), Lan WZ(兰文智). 2002. Research on the stability of taxol yield of *Taxus chinensis* suspension cultures(红豆杉细胞培养生产紫杉醇产量稳定性的探讨)[J]. *Guihaia*(广西植物), **22**(1): 85－88.

Zhao SH(赵善欢), Zhang YG(张业光), Cai DZ(蔡德智), *et al*. 1989. Preliminary report of neem tree introduction and cultivation in China(印楝引种试验初报)[J]. *Journal of South China Agricultural Unirersity*(华南农业大学学报), **10**(2): 34－39.

Zhong JJ, Yoshida T. 1995. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size[J]. *Enzyme Microb Technol*, **17**: 1 073－1 079.