热带亚热带植物学报　1998, 6(3):267－270
Journal of Tropical and Subtropical Botany

印楝愈伤组织形成及其印楝素含量测定

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）

摘要　取印楝（*Azadirachta indica* A. Juss.）不同器官作外植体，研究培养基和继代次数对愈伤组织生长及其印楝素（Azadirachtin）生物合成的影响．印楝的不同器官（根、叶、茎及皮）均能诱导出愈伤组织，这些愈伤组织均有合成印楝素的能力．其中以叶诱导的愈伤组织生长速率及印楝素含量为最高．含有较低铵盐的 B_5 培养基有利于细胞生长，含有较高铵盐的 MS 培养基有利于印楝素积累，不含铵盐的 White 培养基对两者均不利．愈伤组织继代 2－3 代，有利于愈伤组织生长和印楝素合成．

关键词　印楝；愈伤组织；印楝素
中图分类号　Q946.8

CALLUS FORMATION IN EXPLANTS OF *AZADIRACHTA INDICA* AND THE AZADIRACHTIN CONTENT

Lei Guangfu　Zhu Xiru　Zhang Yunkai　Zhang Haibao　Liu Wei
(*South China Institute of Botany, Academia Sinica,* Guangzhou 510650)

Abstract　The influences of different explants from organs of *Azadirachta indica*, culture media and subculture times on callus growth and azadirachtin content in cultures were studied. The results showed that all of the calli induced from root, leaf, stem and bark had the capability of synthesizing azadirachtin, among which callus growth rate and azadirachtin from leaf explants were the highest. B_5 medium with low ammonium salt had good result for callus growth, while MS medium with high ammonium salt was beneficial for azadirachtin accumulation, but White medium without ammonium salt was satisfactory for neither of them. The best callus growth and azadirachtin formation occurred at the second or third subculture.

Key words　*Azadirachta indica;* Callus; Azadirachtin

印楝（*Azadirachta indica* A. Juss.）又名印度丁香，为楝科热带乔木。印楝中的印楝素及印楝提取物，至少对 70 多种农业、仓库和卫生害虫具有显著的拒食、抑制生长发育、忌避、毒杀、内吸和不育等活性[1]，并且有高效，低毒，不污染环境，不易引起昆虫产生抗药性的优点，倍受人们关注[2]。印楝在我国没有自然分布，在 80 年代成功引种于海南省，但为数甚

华南生物工程中心基金资助
1997－07－31 收稿；1998－02－20 修回

少，远不能满足现实需要。印楝素的活性成分结构复杂，难以人工合成。这对印楝素的商业化生产和使用带来严重阻碍[3]。

植物次级代谢产物的合成，具有“全能性和代谢多条途径[4,5]”。通过对培养条件的控制，可增强代谢终产物朝所需方向发展，达到提高次级产物含量的目的[2]。本文研究了几种影响印楝愈伤组织生长及其印楝素含量的因素。现为部分试验结果，其它内容另文报道。

1 材料和方法

材料 印楝外植体均采自华南农业大学昆虫毒理研究室温室。愈伤组织生长和印楝素产生的各种因子的试验材料均采用叶片诱导的第二代的愈伤组织，培养20 d后统计实验结果。

愈伤组织诱导 取印楝的叶、茎、根及树皮为外植体，洗涤干净。经75%酒精浸泡10 s，0.1% $HgCl_2$消毒7－8 min，无菌水洗5－6次。再将茎、根切成1 cm小段，树皮、叶片(沿叶脉方向)切成1×0.5 cm的长方形，平放在培养基上。采用的培养基(M_1)为MS＋2,4-D 2 mg L^{-1}＋6-BA 0.5 mg L^{-1}，pH5.8，蔗糖30 g L^{-1}，琼脂7 g L^{-1}，在1.5 kg cm^{-2}压力灭菌20 min。每20 d继代培养一次，每次每瓶为0.5 g鲜重，100 ml的三角瓶中装25 ml的培养基。培养条件为温度28±2 ℃，光照时间为16 h d^{-1}，光照度1 200 lx，相对湿度70－80%。每个试验处理重复3－5次，结果取其平均值。

收获干重测定 取10个0.5 g鲜重的叶片诱导的愈伤组织，于50 ℃下烘至恒重，其平均值为0.03 g干重，作为继代培养时的接种干重。收获干重(g DW)＝最终收获干重－接种干重。

细胞生长速率测定 细胞生长速率(g DW $L^{-1}d^{-1}$) $= \dfrac{\text{收获干重(g DW)}}{\text{培养天数(d)} \times \text{培养基体积(L)}}$

印楝素含量测定 用“双抗体夹心法”酶联免疫吸附试验(DAS-ELISA)测定[6]。兔抗印楝素IgG和辣根过氧化物酶标记抗体均由本实验制备。建立的标准曲线为：$y=1.5x+1/50$，y为$O.D_{450}$值，x为印楝素浓度(mg g^{-1}DW)。根据此标准曲线可以测定愈伤组织印楝素含量，每次取0.2 g鲜重愈伤组织，加2 ml包被缓冲液研磨，使用时再稀释10倍。测定印楝素$O.D_{450}$值，并以此值计算出印楝素含量。

印楝素产率测定 印楝素产率(mg L^{-1}) $= \dfrac{\text{收获干重(g DW)} \times \text{印楝素含量}}{\text{培养基体积(L)}}$

2 结果分析

2.1 不同器官诱导的愈伤组织及其印楝素含量

印楝的叶、茎、树皮、根的愈伤组织的诱导都不难，但需要较长时间。大约培养20多天，切口呈浅绿色膨大，并开始产生小块愈伤组织，其诱导率均达95%以上。从表1可看出，叶的愈伤组织在生长速率和产物产率上均优于其它器官，分别达到0.28 g DW $L^{-1}d^{-1}$和3.53 mg L^{-1}，其次是茎和根。树皮表现最差，愈伤组织生长速率以及产物产率分别仅为0.1 g DW $L^{-1}d^{-1}$和0.80 mg L^{-1}。叶比树皮的愈伤组织的印楝素产率高四倍多。同时，不同的器官诱导的愈伤组

织都具有合成印楝素的能力。这就证明了植物培养细胞次级代谢的全能性。

2.2 不同培养基对愈伤组织生长及其印楝素含量的影响

试验选用了 MS, B_5, White 三种培养基，结果如表 2。B_5 培养基对愈伤组织的生长最有效，生长速率达 0.32 g DW $L^{-1}d^{-1}$，其次是 MS 培养基，而 White 培养基中细胞生长最慢，仅有 0.12 g DW $L^{-1}d^{-1}$。MS 培养基上愈伤组织印楝素含量和印楝素产率都较高，分别达到 0.63 mg g^{-1}和3.53 mg L^{-1}，其次是 B_5 培养基。White 培养基中两者最差，分别仅有0.33 mg g^{-1} 和 0.79 mg L^{-1}。B_5 培养基中愈伤组织生长速率是 White 培养基中的 2－3 倍，MS 培养基中印楝素产率是 White 培养基中的 4－5 倍。可见，White 培养基中的营养成分对愈伤组织生长和印楝素的积累都不利。MS 培养基有利于印楝素的积累，B_5 培养基有利于愈伤组织生长。

2.3 继代培养代数对愈伤组织生长和印楝素含量的影响

细胞培养继代代数是维持长时间高产能力的重要因素之一。因此，本研究将以继代次数为 1－5 代进行试验，比较其对愈伤组织的形成及其印楝素含量的影响(表 3)。继代培养次数越少，则生长速率越高，印楝素产率随继代次数的增加而降低，并且根据以后的实践，到第 6 代，愈伤组织开始由黄变褐，局部出现死亡细胞；印楝素含量却随继代代数增加而提高，但从印楝素产率和细胞生长速率两方面考虑，在目前试验条件下，印楝愈伤组织一般以 2－3 代较为理想。

表 1　不同外植体对愈伤组织形成和印楝素含量的影响

Table 1 The influence of calli induced from different organs on callus growth and azadirachtin content

外植体 Explants	收获干重 Harvest dry weight (g /flask)	生长速率 Growth rate (g DW $L^{-1}d^{-1}$)	印楝素含量 Azadirachtin content (mg g^{-1}DW)	印楝素产率 Azadirachtin yield (mg L^{-1})
茎 Stem	0.08	0.16	0.50	1.60
根 Root	0.06	0.12	0.57	1.40
叶 Leaf	0.14	0.28	0.63	3.53
树皮 Bark	0.05	0.10	0.40	0.80

表 2　培养基对愈伤组织生长和印楝素含量的影响

Table 2 The influence of media on callus growth and azadirachtin content

培养基 Media	收获干重 Harvest dry weight (g /flask)	生长速率 Growth rate (g DW $L^{-1}d^{-1}$)	印楝素含量 Azadirachtin content (mg g^{-1}DW)	印楝素产率 Azadirachtin yield (mg L^{-1})
MS	0.14	0.28	0.63	3.53
B_5	0.16	0.32	0.54	3.46
White	0.06	0.12	0.33	0.79

表 3　继代培养对愈伤组织形成和印楝素含量的影响

Table 3 The influence of subculture generations on callus growth and azadirachtin content

继代代数 Subculture generations	收获干重 Harvest dry weight (g /flask)	生长速率 Growth rate (g DW $L^{-1}d^{-1}$)	印楝素含量 Azadirachtin content (mg g^{-1}DW)	印楝素产率 Azadirachtin yield (mg L^{-1})
1	0.20	0.40	0.31	2.48
2	0.16	0.32	0.50	3.20
3	0.14	0.28	0.63	3.53
4	0.06	0.12	0.68	1.63
5	0.07	0.14	0.66	1.85

3 讨论

一般认为，由次级产物含量高的外植体诱导的愈伤组织，这种物质含量也高[7,8]。但情况也并非都是如此。印楝素在植株中含量次序是: 种子 > 树皮 > 叶子 > 茎、根[9]。按一般情况，起源于树皮的愈伤组织中的印楝素含量最高。但试验结果表明，叶比树皮的愈伤组织的印楝素产率高四倍多。

因此，高含量的外植体诱导的愈伤组织其产物含量不一定高，这与前人其它植物的报道结果不同。但同甘烦远[10,11]和Cheng[5]报道诱导红花不同器官愈伤组织的结果相一致。Roller[12]应用长春花植物进行试验，发现蛇根碱产量与母体中含量的高低没有一致关系。出现这种情况的机理还有待进一步研究。

三种培养基中，MS培养基的一个显著特点是有高的硝酸盐和钾铵的含量；B_5的主要特点是含有较低的铵；White培养基不含铵盐，并且各离子浓度都较低。由试验结果可知，B_5培养基有利于愈伤组织生长，MS培养基有利于印楝素积累，White培养基对两者均不利。由此可以推断：适当降低铵盐浓度，对愈伤组织生长有利，但对印楝素的积累不利。这与张治国等[13]对条叶龙胆愈伤组织培养和龙胆苦甙形成的研究结果相似。

如何提高细胞培养中次生代谢产物的含量是一个关键问题，本试验表明：(1)通过培养基选择可以较大幅度提高愈伤组织生长速度和印楝素含量。三种培养基印楝素的产率的高低可相差4－5倍，愈伤组织生产速率高低相差2－3倍。(2)印楝愈伤组织的生长和印楝素的积累对培养基的要求不一致。促进细胞生长的B_5培养基，不利于印楝素的积累。因此，用细胞培养方法生产印楝素，宜用二步培养法，即先在生长培养基上增加细胞的生物量，第二步在生产培养基上促进印楝素产生。(3)愈伤组织中的次生代谢产物含量往往较低，必须通过细胞株筛选等措施，才能较大幅度提高其次生代谢产物含量。

参考文献

1 Schmutterer H, Ascher K R S, Rembold H eds. Proc 1st Int Neem Conf W Germany. Jun 1980

2 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，1996, 17(1):118－122

3 赵善欢，张业光，蔡智德等．印楝引种试验初报．华南农业大学学报，1989, 10(2):34－39

4 梁峥等．高等植物的次级代谢．植物生理学通讯，1981, (1):14－21

5 Cheng K-C, Liang C. Callus cultures of the three well-known Chinese herbs and their medicinal contents. Proc Symp Plant Tissue Culture, Beijing, 1978, 469－479

6 张海保等．香蕉花叶病的酶联免疫检测技术研究．植物病理学报，1994, 24(4):323－327

7 Kurz W G M. The several factors which influence secondary metabolites biosynthesis and biotransformation on plant cell culture. Critical Rev Biotech, 1985, 2:105－121

8 Rokem J S, Goldberg Z. Secondary metabolites from plant cell suspension cultures: methods for yield improvement. In: Mizrahi A, Wezel van A L eds. Advances in Biotechnological Processes 4. Alan R Liss, New York, 1985, 247－274

9 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

10 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):516－522

11 甘烦远．红花愈伤组织诱导、生长及α-生育酚的产生．云南植物研究，1991, 13(2):189－195

12 Roller U. Alfermann A W, Reihard E eds. Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods. Munich: Gesellschaft fur Strahler & Umweltforschung mbH, 1978, 95－108

13 张治国，韩献忠，蔡志光等．条叶龙胆愈伤组织培养及龙胆苦甙形成．植物学报，1992, 34(2):96－100