

## 不同碳源对白桦愈伤组织生长和三萜积累的影响

王博, 范桂枝, 詹亚光\*, 李康

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

**提要:** 在一个继代周期中, 培养基中添加 10~50 g·L<sup>-1</sup> 的蔗糖、葡萄糖和果糖后, 白桦愈伤组织的鲜重均上升, 浓度为 20~30 g·L<sup>-1</sup> 的三种糖, 其鲜重积累量均较高。培养基中添加不同浓度葡萄糖和果糖的白桦愈伤组织中三萜物质含量先上升后下降, 而添加蔗糖的则呈直线上升。其中, 葡萄糖、果糖和蔗糖浓度为 30 g·L<sup>-1</sup> 的三萜类物质积累量最高。

**关键词:** 白桦; 生长; 三萜物质; 碳源

## Effects of Different Carbon Sources on Callus Growth and Accumulation of Triterpenoids in Birch (*Betula platyphylla* Suk.)

WANG Bo, FAN Gui-Zhi, ZHAN Ya-Guang\*, LI Kang

College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** The fresh weight of birch callus in callus induction media supplement with 10–50 g·L<sup>-1</sup> of sucrose, glucose and fructose showed an upward trend during the second subculture, 20–30 g·L<sup>-1</sup> sugar were optimum for increase of fresh weight in birch callus. The contents of triterpenoid increased during 0–15 or 20 d, and then decreased during 15 or 20–25 d in callus induction media supplement of 10–50 g·L<sup>-1</sup> glucose and fructose, but triterpenoid content showed increase trend when media were supplemented 10–50 g·L<sup>-1</sup> sucrose. 30 g·L<sup>-1</sup> glucose, fructose and sucrose were suitable for triterpenoid accumulation.

**Key words:** birch (*Betula platyphylla*); growth; triterpenoid; carbon source

白桦含有的三萜物质具有很强的抗炎、抗过敏、降血糖、抗病毒等作用(孟艳秋等 2004; 张云峰等 2006), 还具有抗肿瘤活性, 尤其是对人类黑色素瘤(Mel21、Mel22 和 Mel24)和神经外胚层肿瘤具有特异性活性(李岩等 2000)。最近又验证认为三萜类物质是 1-型艾滋病病毒(HIV-1)的特异抑制剂, 并且其作用高效而低毒(张庆云等 2006)。因此, 作为最有潜力的新型药物制剂源的白桦三萜类物质(如白桦酯醇及其衍生物), 有广阔的潜在应用前景而深受人们的注视。

大规模培养植物细胞技术因具有不受地区、季节、资源限制、不破坏环境、以及可通过自动化手段控制细胞生长和合理调节代谢过程生产植物药品也受到人们的关注。但我们前期的工作表明白桦愈伤组织中的三萜类物质含量较低, 仅为 1.442 g (DW)。为了提高白桦愈伤组织的三萜物质含量, 本文以蔗糖、果糖、葡萄糖为碳源, 以白桦茎段诱导的愈伤组织为材料, 研究不同碳源种类及浓度对白桦愈伤组织的生长和三萜类物质积累的影响, 从而筛选出有利于白桦愈伤组织中

三萜类物质积累的碳源种类和浓度, 以期能为规模化生产白桦三萜类物质提供参考。

### 材料与方法

白桦(*Betula platyphylla* Suk.)母树取自本校白桦强化种子园五至七年生嫁接优树(接穗 30 年生), 外植体取自其诱导的组培苗。选择生长状态良好的白桦组培苗, 在超净工作台上取其茎段切成 1 cm 左右, 去掉茎段上的叶片及侧芽, 接种于白桦愈伤组织诱导培养基上, 每瓶 3 个外植体, 进行白桦愈伤组织诱导。白桦愈伤组织诱导与继代培养基为 IS+0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.8 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA、20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖、5.3 g·L<sup>-1</sup> 琼脂粉, pH 值为 6.0~6.5。每 25 d 继代 1 次。每瓶 3 个外植体。培养基均以 121 °C 高压灭菌 20 min, 培养温度为 25~

收稿 2007-09-26 修定 2008-01-02

资助 黑龙江省科技攻关项目(GA06B301-4-3)和东北林业大学引进人才项目(010-602023)。

\* 通讯作者(E-mail: yaguangzhan@126.com; Tel: 0451-82191752)。

27 °C, 光照强度为  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 光照  $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ , 湿度为 40%~50%。

诱导出的愈伤组织在第2次继代时, 从中选择大小形态一致的愈伤组织进行不同碳源处理。蔗糖、果糖和葡萄糖的浓度梯度为 10、20、30、40、50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在愈伤组织培养 25 d 的过程中, 每 5 d 取一次样, 称其鲜重并检测三萜类物质含量。实验重复 3 次, 每个重复均为 10~20 个外植体。

测定三萜类化合物含量的标准曲线以齐墩果酸为标准样品绘制。精密称取 0.0200 g 齐墩果酸, 溶解于 95% 的乙醇中, 定容至 100 mL, 配制成浓度为  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  标准储备液。然后从中取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 分别置于玻璃试管中, 加热挥发去溶剂, 加入 0.2 mL 新配制的 5% 香草醛-冰醋酸和 0.8 mL 高氯酸, 置于 70 °C 恒温水浴中 15 min 后流水冷却至室温, 加入乙酸乙酯定容至 5 mL, 摇匀, 测定波长 551 nm 处的吸光值。以乙酸乙酯试剂为空白对照, 绘制标准曲线(弓晓峰等 2006)。在所测试的  $3.3\sim 24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度范围内具有良好的线性关系, 回归方程为  $y=21.115x-3.2967$ , 相关系数  $R^2=0.9944$ 。

制备三萜类化合物检测样品时, 取新鲜的愈伤组织于 80 °C 下烘干至恒重研磨后, 精确称取 0.1~0.2 g 样品放入 50 mL 离心管中, 加入 95% 乙醇 10 mL 浸泡过夜(3 次), 合并提取液后加入 0.5 g 活性炭于 40 °C 下超声(超声频率为 10 kHz) 40 min, 以  $7160\times\text{g}$  离心 10 min, 取上清液, 过滤纸、浓缩、蒸干, 以 2 mL 乙酸乙酯复溶后即是样品。

三萜类物质含量以紫外分光光度法测定(孙宏和张泽 2005)。精密移取 100~200  $\mu\text{L}$  待检测的样品, 放入试管中, 于 70 °C 水浴中蒸干。加入 200  $\mu\text{L}$  新配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液, 再加入 800  $\mu\text{L}$  高氯酸后摇匀, 置于 70 °C 的恒温水浴中 15 min, 流水冷却至室温, 加乙酸乙酯定容至 5 mL, 摇匀, 同时以试剂为空白对照, 用 1 cm 比色皿测定 551 nm 处的吸光值。

## 结果与讨论

### 1 不同种类和浓度的碳源对白桦愈伤组织鲜重的影响

图 1 显示, 培养基中分别添加 10~50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖、果糖、葡萄糖的白桦愈伤组织鲜重均呈增长趋势。不同浓度蔗糖对白桦愈伤组织鲜重积累有显著影响, 在 10~30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖浓度范围内, 白桦愈伤组织的生长与蔗糖浓度呈正相关关系, 40  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖中的白桦愈伤组织生长受到抑制。50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  中的白桦愈伤组织增长先上升后受到一定的抑制, 原因可能是高浓度蔗糖起初可以充分提供细胞生长所需营养物质, 而后随着培养的进程, 高浓度蔗糖可能影响了细胞渗透压, 以致细胞生长受抑。添加 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  果糖的白桦愈伤组织鲜重增长较快, 最终达到  $3.977 \text{ g (FW)}\cdot\text{瓶}^{-1}$ 。随着果糖浓度的增加, 白桦愈伤组织鲜重增长速度下降。添加 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  果糖的白桦愈伤组织鲜重增长在后期呈停滞状态。以添加 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  葡萄糖的白桦愈伤组织鲜重增长最快, 鲜重达到  $4.787 \text{ g (FW)}\cdot\text{瓶}^{-1}$ , 但高浓度葡萄糖对白桦愈伤组织鲜重增长有一定的

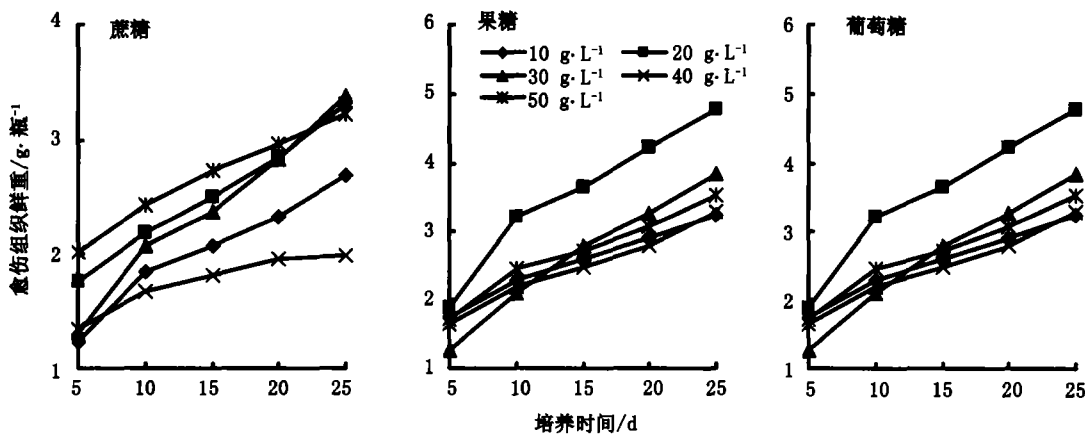


图 1 不同种类和浓度的碳源对白桦愈伤组织鲜重的影响

Fig.1 Effects of different kinds and concentrations of carbon sources on fresh weight accumulation in birch callus

抑制作用。

## 2 不同种类和浓度的碳源对白桦愈伤组织中三萜类物质含量的影响

愈伤组织中三萜类物质含量对培养基中添加的糖种类和浓度的响应趋势与鲜重不同。从图2可见,(1)培养基中分别添加10~50 g·L<sup>-1</sup>蔗糖、果

糖、葡萄糖后,白桦愈伤组织中三萜类物质的积累趋势皆不同。添加果糖和葡萄糖的白桦三萜类物质含量达到最高值的时间比在蔗糖中的早。这与侯学文和郭勇(2000)的结果相符。(2)含量以30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖的最高,白桦愈伤组织中三萜类物质积累量达到4.040 mg·g<sup>-1</sup>(DW)。

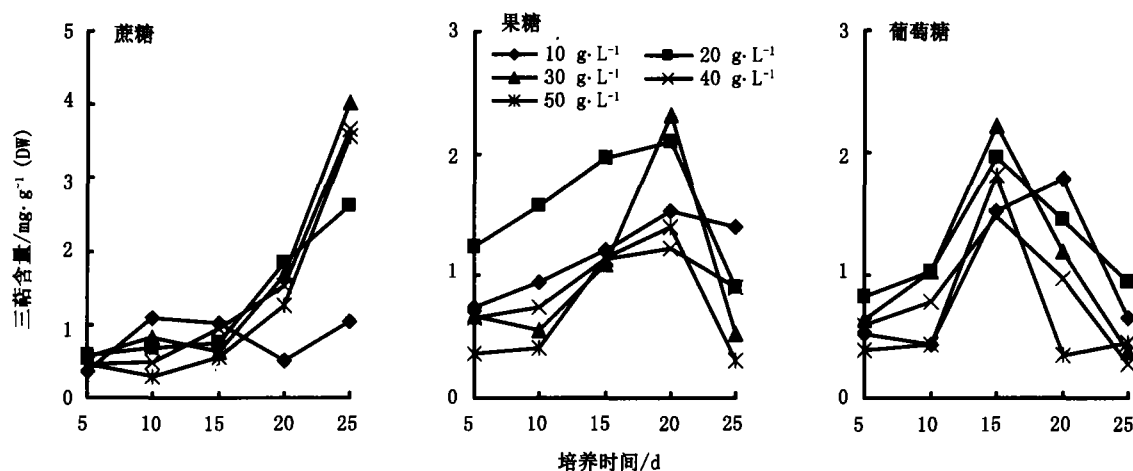


图2 不同种类和浓度的碳源对白桦愈伤组织中三萜类物质含量的影响

Fig.2 Effects of different kinds and concentrations of carbon sources on triterpenes content in birch callus

## 参考文献

- 弓晓峰, 谢明勇, 陈奕(2006). 黑灵芝中三萜及其皂苷类化合物总量的光度测定. 天然产物研究与开发, 18: 825~829
- 侯学文, 郭勇(2000). 接种量及蔗糖浓度对悬浮培养玫瑰茄细胞生长的影响. 华南农业大学学报, 21 (4): 51~54
- 李岩, 金雄杰, 谢湘林, 宗瑞义, 金永日(2000). 白桦三萜类物质抗黑色素瘤 B16、S180 肉瘤作用及其机制的实验研究. 中国药理学通报, 16 (3): 279~281

- 孟艳秋, 赵临襄, 王赆, 吕明心, 刘丹(2004). 五环三萜类化合物的构效关系. 中国新药杂志, 13 (12): 1098~1102
- 孙宏, 张泽(2005). 分光光度法测定白桦三萜类物质总量. 南京林业大学学报(自然科学版), 29 (1): 110~112
- 张云峰, 魏东, 邓雁如, 郭祀远, 陈峰(2006). 三萜皂苷的生物活性研究新进展. 28 (9): 1349~1353
- 张庆云, 宋丽杨, 胡迎庆, 李俊清(2004). 白桦皮和白桦叶体外抗真菌作用研究. 天津药学, 16 (3): 3~4