

## 乙酸对杜仲愈伤组织胶含量的影响

何 泼, 任红媛, 申 延

(陕西科技大学 生命科学与工程学院, 陕西 咸阳 712081)

**摘 要:**对培养基中影响杜仲愈伤组织胶合成的前体物质乙酸浓度进行了研究。结果表明,以  $S_4$  代杜仲愈伤组织为原料,随着培养基中乙酸浓度的增加,杜仲愈伤组织中胶含量不断提高,但过高浓度的乙酸会抑制愈伤组织的生长;最适乙酸添加浓度为 1.0~1.5 mmol/L,此时,不会影响愈伤组织的生长,且其平均增长率为 1 977.97%,其平均含胶量达原植株的 81.20%,从而提高了杜仲愈伤组织的含胶量。

**关键词:**杜仲; 杜仲胶; 乙酸; 愈伤组织

**中图分类号:**S722.37

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-7461(2007)02-0149-03

### Effects of Adding Acetic Acid on the Rubber Content in the Callus of *Eucommia ulmoides*

HE Po, REN Hong-yuan, SHEN Yan

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xianyang, Shaanxi 712081, China)

**Abstract:** Effects of acetic acid on the rubber content in the callus of *Eucommia ulmoides* by adding different amounts of the acid. The optimized concentrations of acetic acid were 1.0~1.5 mmol/L, which could not only enhance the growth of callus, but also increase the rubber content. Under this condition, the average growth rate of callus was 1 977.97% and the average rubber content of callus reached 81.20% of the original plant. Therefore, acetic acid can be added into the medium as a precursor to biosynthesize the rubber, so as to greatly increase the rubber content in callus.

**Key words:** *Eucommia ulmoides*; rubber; acetic acid; callus

杜仲(*Eucommia ulmoides*)是我国十分宝贵的天然橡胶资源,其果皮、树皮、叶片等都含有杜仲胶<sup>[1-4]</sup>。目前杜仲胶主要是通过从植株中提取来获得,受到原料少、生长周期长、成分含量低等条件的限制,提取量不高,使其生产成本很高,从而影响工业化大规模生产。采用植物组织和细胞培养技术具有繁殖速度快、繁殖系数高,且不受地理环境及气候等自然条件影响,是解决原料资源不足的最佳途径<sup>[5]</sup>。目前有关杜仲组织培养所得的愈伤组织,其胶含量较原植株均有所降低。本试验主要研究在不影响杜仲愈伤组织生长的前提下,在其继代培养过程中,添加前体物质乙酸来增加杜仲胶在愈伤组织中的含胶量。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

用于诱导愈伤组织的外植体材料为实验室培养的 2 个月左右的杜仲无菌苗。

### 1.2 方 法

1.2.1 愈伤组织的诱导和继代培养 有关文献报道:杜仲不同来源的外植体诱导产生的愈伤组织含胶量无明显差异,而幼茎作为外植体时愈伤组织的出愈时间短,愈伤组织的增长率大,故本试验采用杜仲的茎段诱导愈伤。具体做法为:将无菌苗的幼茎切成 0.5 cm 小段,叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 的方块接种于 MS 培养基上并且附加 NAA 2.0 mg/L +

收稿日期:2006-06-23 修回日期:2006-09-05

基金项目:陕西科技大学博士基金(BJ04-03)

作者简介:何泼(1970-),女,陕西眉县人,博士,主要从事杜仲组织培养与次生代谢物生产的研究。

6-BA 0.5 mg/L,进行愈伤组织的诱导。控制培养温度 25 ℃左右,光照时间 12 h/d,光照强度 1 500~2 000 lx。诱导的愈伤组织选择生长旺盛和颜色、质地及形态都相似者,切成均匀一致的小块,接种于 B<sub>5</sub> 培养基上并附加 NAA 1.0 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L进行继代培养<sup>[6,7]</sup>,每 25 d 继代 1 次,并计算增长率。

增长率=  $\frac{W_2-W_1}{W_1} \times 100\%$

式中:W<sub>1</sub> 为愈伤组织的初始重量,W<sub>2</sub> 为收获重量。

1.2.2 乙酸对愈伤组织含胶量的影响 B<sub>5</sub> 培养基中分别加入不同浓度的乙酸(0.3、0.5、0.7、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mol/L),并调节培养基 pH 值为 6.5,其他培养条件与继代培养完全相同。接种第四代(S<sub>4</sub>)愈伤组织,25 d 后收获,测量各组愈伤组织的增长率和含胶量。

表 1 乙酸对愈伤组织增长率和含胶量的影响

Table 1 Effects of acetic acid on the growth ratio of callus and the quantities of rubber

乙酸浓度/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	愈伤组织增长量(鲜重) (g·瓶 <sup>-1</sup> )	愈伤组织 增长率/%	含胶量/%	含胶量占原植株 的百分比/%	愈伤组织 生长状况
万方数据	6.07±0.32	1 871.57	6.53	68.02	*****
0.3	8.12±0.44	2 920.92	7.35	76.56	*****
0.5	7.29±0.28	2 735.47	7.16	74.58	*****
0.7	5.52±0.04	2 216.58	7.44	77.50	*****
1.0	5.61±0.12	2 255.26	7.59	79.06	*****
1.5	5.96±0.36	1 700.67	8.00	83.33	*****
2.0	3.54±0.18	984.55	8.53	88.85	***
3.0	2.47±0.25	650.05	9.44	98.33	**
4.0	—	—	—	—	*
对比(幼茎)			9.60	100	

注: \* 生长差; \*\* 生长一般; \*\*\* 生长较好; \*\*\*\* 生长好; \*\*\*\*\* 生长最好; — 不生长或有抑制作用。

从试验结果看,培养基中加入适量的乙酸可以促进愈伤中杜仲胶的合成,且随着乙酸浓度的增加愈伤组织的含胶量总体呈上升趋势。当乙酸浓度为 0.0 mmol/L 时,愈伤组织中杜仲胶含量仅为 6.53%,乙酸浓度上升到 3.0 mmol/L 时,胶含量为 9.44%,达到原植株胶含量的 98.33%。另一方面,乙酸的加入也会影响愈伤组织的生长,低浓度的乙酸可以促进愈伤组织的生长。乙酸浓度保持在 0~1.0 mmol/L 时愈伤生长旺盛,增长率均在 2 000% 以上,特别是乙酸浓度为 0.3 mmol/L 时,愈伤组织的增长率高达 2 920.92%。而当乙酸浓度>2.0 mmol/L 后,对愈伤的生长有明显的抑制作用,乙酸浓度达到 4.0 mmol/L 时愈伤基本停止生长,而且

1.2.3 杜仲胶含量的测定 参照杨振堂等人的方法<sup>[8]</sup>,略有改动。将愈伤组织自然凉干、粉碎。称取样品 0.5 g(精确到 0.000 1 g),用 50 mL 10% 铬酸沸水浴中氧化 1 h,然后通蒸汽蒸出氧化产物醋酸。蒸馏至馏出液达 500 mL。用真空泵抽气 30 min,排除馏出液中的 CO<sub>2</sub>。用标定的 0.1 mmol/L NaOH 滴定,记录 NaOH 溶液用量。每一样品重复做 3 组测定,并取其平均值。同时做不加愈伤组织样品的空白对照实验,其他操作方法相同。

橡胶烃含量=  $(V \times N \times 0.0908 / W) \times 100\%$ 。

式中 V:NaOH 用量(mL),N:NaOH 当量浓度(mmol/L),W:样品重量(g),0.0908 换算常数。

2 结果与分析

B<sub>5</sub> 培养基上分别添加系列浓度的乙酸,并用碱调节培养基 pH 为 6.5,继代培养 S<sub>4</sub> 代愈伤组织,测定其增长率和含胶量(表 1)。

发生严重褐化。

3 结论与讨论

据相关文献报道<sup>[10,11]</sup>,从杜仲不同外植体(幼茎、叶片、子叶)诱导出的愈伤组织,其含胶量并无明显差异,均在 5.20%~5.42%(指 S<sub>0</sub> 代)。表明在杜仲的组织培养中,使用不同部位的外植体进行培养对杜仲胶的积累影响不显著。在进行前期愈伤组织的诱导和继代培养试验时,发现幼茎作为外植体时愈伤组织的出愈时间短,愈伤组织的增长率大,所以在进行杜仲胶的生产时,建议使用幼茎为外植体诱导愈伤组织。

在愈伤组织的继代培养时发现,随着继代次数

的增多,含胶量呈上升趋势,在 $S_5 \sim S_8$ 代出现一个含胶量的高峰值, $S_8$ 代愈伤组织的含胶量为9.06%,已达原植株杜仲胶含量的94.38%。 $S_8$ 代以后含胶量又迅速下降,出现这种变化趋势的可能原因是愈伤组织的分化程度随继代次数的增加而升高,培养到一定时间后,分化过程基本稳定,而次生代谢物的合成与分化程度是正相关的。至于高峰区以后出现下降,可能是因为愈伤组织又开始增殖,要进入更高分化程度的形态构建,因而减少了次生代谢物杜仲胶的合成。杨振堂等人报道<sup>[10]</sup>,在杜仲愈伤组织的继代培养时, $S_4 \sim S_7$ 代杜仲胶的含量最高, $S_8$ 代以后又迅速下降,本试验结果与之基本相同。由于目前实验进展原因,本试验选用 $S_4$ 愈伤组织为原材料进行研究。在实际生产时,考虑到胶含量与生产效率方面的因素,可以选取 $S_5 \sim S_8$ 代的愈伤组织进行杜仲胶的提取。

乙酸作为杜仲胶合成的前体,它通过羟甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGCR)的作用生成另外一个前体甲瓦隆酸后再生成杜仲胶<sup>[9]</sup>。在杜仲的组织培养过程中向培养基中添加适量的乙酸,提高杜仲胶合成的前体物质的量,可以提高愈伤组织中杜仲胶的产量。本试验结果证明培养基中乙酸浓度的高低会明显影响愈伤组织中杜仲胶的含量,其两者呈正相关性,即随着浓度的上升,杜仲胶含量也呈上升趋势<sup>[9]</sup>。乙酸浓度为3.0 mmol/L时,愈伤组织中杜仲胶含量为9.44%,占原植株中杜仲胶含量的98.33%。但是,另一方面随着乙酸浓度的升高,愈伤组织的增长率在出现一个最高值后会迅速下降,这可能的原因是适量的前体物质对愈伤组织的生长起到促进作用,一旦前体物质含量过高,则会打破愈伤组织原有的生长环境(pH值等),从而抑制愈伤组织的生长,虽然杜仲胶还在不断合成,但对整体来说,愈伤组织的含胶量降低的趋势。因此,在实际生产时为了使含胶量尽量提高而又不影响愈伤组织的生长,以 $S_4$ 杜仲愈伤组织为原料,培养基中可添加适量浓度的乙酸。从本试验结果看,选用 $S_4$ 代愈伤

组织为原料,培养基中添加1.0~1.5 mmol/L的乙酸浓度最为合适。

本试验也考察了其他理化因子对愈伤组织的增殖的影响,例如采用不同培养基对愈伤组织进行培养,光照条件对愈伤组织增殖的影响,培养基pH值对愈伤组织增殖的影响等。结论基本上与其他研究者的结论相同<sup>[4,6,7]</sup>。

在研究乙酸与杜仲胶含量的关系时,由于现有实验进展关系,目前仅做了 $S_4$ 代愈伤组织培养中,乙酸对杜仲胶含量的影响试验。目前为止,还未见有利用添加乙酸来改变杜仲愈伤组织胶含量的报道,我们还对杜仲愈伤组织胶含量的变化进行了考察,在没有添加乙酸的前提下,证明 $S_5 \sim S_8$ 代为杜仲胶含量高峰值,乙酸是否能进一步提高高峰区其他继代次数愈伤组织中杜仲胶的含量,尚需进一步实验研究。

## 参考文献

- [1] 方世璧. 杜仲胶的研究与开发[J]. 中外科技信息, 1998, (8): 10-11.
- [2] 杜红岩, 王俊鸿, 杜兰英. 杜仲高技术产品产业化的研究与开发[J]. 经济林研究, 2001, 19(2): 18-22.
- [3] Hayman E. Stimulation of plant growth and gutta content in *Eucommia ulmoides* by 2-diethylaminaethyl-3, 4-dichlorophenylether[J]. Plant Growth Regulation, 1994, 14: 78-82.
- [4] 冉懋雄. 杜仲[M]. 北京: 科学技术出版社, 2002.
- [5] 臧埔. 组织和细胞培养生产杜仲胶的前景[J]. 特产研究, 1996, (3): 42-44.
- [6] 黄勇. 杜仲组织培养的初步研究[D]. 华中师范大学学位论文, 2002.
- [7] 李琰. 杜仲愈伤组织培养及次生代谢产物含量的研究[D]. 西北农林科技大学学位论文, 2003.
- [8] 金春爱, 杨振堂, 赵景辉, 等. 杜仲叶片及愈伤组织无性系中杜仲胶含量测定[J]. 特产研究, 1997, (3): 20-21.
- [9] 何浚, 申延, 秦俊哲, 等. 杜仲组织培养的研究[J]. 林业科技开发, 2006, (3): 27-30.
- [10] 申延. 利用组织培养技术提高杜仲胶产量[D]. 陕西科技大学学位论文. 2006.
- [11] 申延, 何浚, 秦俊哲, 等. 杜仲愈伤组织诱导与增殖效应[J]. 陕西科技大学学报, 2006, (2): 21-25.