

红三叶愈伤组织培养与异黄酮的产生

谷文英, 陈莹, 余飞

(扬州大学动物科技学院, 江苏 扬州 225009)

摘要:对红三叶 *Trifolium pratense* 下胚轴和子叶进行愈伤组织的培养, 结果表明: 添加 2.0 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L 6-BA 的 MS 培养基最适合诱导愈伤组织。采用紫外分光光度法对愈伤组织总异黄酮含量进行测定, 结果发现: 愈伤组织中异黄酮的含量明显高于实生苗, 子叶愈伤组织中异黄酮的含量比下胚轴愈伤组织中的高, 且差异显著 ($P < 0.05$)。

关键词: 红三叶; 愈伤组织; 紫外分光光度法; 异黄酮

中图分类号: S541⁺.901

文献标识码: A

文章编号: 1001-0629(2006)08-0045-05

红三叶 *Trifolium pratense* 为豆科车轴草属多年生草本植物, 在英国和新西兰为第二大豆科牧草^[1], 是我国长江流域以南地区优良的豆科牧草和蜜源植物, 是豆科植物中异黄酮含量最高(1.5%~2.5%)的植物, 具有抗肿瘤、治疗胃溃疡、胃癌、乳腺癌、肠癌和骨质疏松症等作用^[2,3]。1974 年首次被匈牙利科学家用作饲料添加剂后, 又逐渐引起动物学家的兴趣, 认为这类物质符合绿色饲料添加剂的基本条件, 即能够替代抗生素和相关激素等生长促进剂, 而成为养殖业研究的一个热点^[4]。

异黄酮可以直接从植物中提取, 但是这样会浪费大量植物材料, 而且生产周期长, 成品纯度较差。目前, Fedoreyev、Maria、罗建平、张春荣等^[5-8]利用怀槐 *Maackia amurensis*、葛根 *Pueraria lobata* 的组织或细胞, 尝试通过组织培养途径直接生产异黄酮。由于红三叶含有鹰嘴豆芽素 A (biochanin A)、B (formonetin)、染料木素 (genistein)、大豆素 (daidzein) 4 种具有植物雌激素样作用的异黄酮, 以红三叶为材料, 研究异黄酮的产生与积累更具有实际意义。故对红三叶愈伤组织诱导的影响因素以及愈伤组织异黄酮积累之间的关系进行了研究, 希望为进一步开发、利用异黄酮资源提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料 供试材料为红三叶种子, 由百绿公司驻北京办事处惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的处理 将用于诱导愈伤组织的种子

置于无菌台上经 2.6% 的次氯酸钠消毒 5 min, 然后用无菌水漂洗干净, 选择大小均一、整齐饱满的种子接种于无激素的 MS 基本培养基上, 放入 25℃ 恒温光照培养箱中令其萌发, 4~5 d 后切取无菌苗下胚轴和子叶作为诱导愈伤组织的外植体。

另取红三叶种子适量种植于花盆内, 此为实生苗, 2 个月后取地上部分测定异黄酮含量。

1.2.2 培养基和培养条件 试验中使用的基本培养基为 MB (由 MS 大量元素、B₅ 微量元素、铁盐及有机物质组成) 和 MS。所有培养基均附加 10 mg/L VC 和 30 g/L 蔗糖并以 7 g/L 琼脂固化, 在高压灭菌前将 pH 值调至 5.8。

培养箱温度为 25±2℃, 光照时间 12 h/d, 光照强度 1 500~3 000 lx。

1.2.3 愈伤组织的诱导、继代培养及其生长量的测定 将外植体分别接种于不同的诱导培养基中 (MB、MS)。选择 MS 培养基上红三叶下胚轴愈伤组织, 继代培养于原来相同的培养基上, 每处理设 3 次重复, 4 周后测定鲜质量并计算愈伤组织相对生长参数。

1.2.4 愈伤组织异黄酮含量的测定 将幼苗地上部分及各处理所得到的愈伤组织分别经真空冷冻干燥处理制成粉末。

准确称取各处理粉末 0.1 g 3 份, 并分别置于 10 mL 离心管中, 依次加入 6 mL 70% 乙醇溶

收稿日期: 2005-07-28

作者简介: 谷文英 (1969-), 女, 河南卫辉人, 讲师, 硕士, 主要从事牧草栽培与组织培养方面的教学与研究。E-mail: yligu@yahoo.com.cn

液,然后置于 35℃ 恒温箱中浸提 3 h,之后取出离心 3 min,转速 3 500 r/min。最后所得上清液即为供试样品。

各供试样品用 70% 乙醇稀释 30 倍后在 260 nm 波长处测定吸光度(OD)值,根据标准曲线 $Y=2.6991X+0.0885$ 计算其异黄酮的含量。其中 X 表示吸光值, Y 表示异黄酮含量($\mu\text{g/mL}$)。

表 1 2 种基本培养基上红三叶下胚轴愈伤组织的诱导和生长情况

培养基	接种数 (个)	出愈数 (个)	出愈率 (%)	褐化率 (%)	愈伤组织颜色及形态
MS	147	147	100	23.33	多呈颗粒状且紧密干松,颜色多为绿色、浅绿色、黄色、乳白色亦有但较少。
MB	92	92	100	46.48	不规则,多数较小且湿润,少数较大且紧密干松。

由表 1 可以看出,在 MS 和 MB 培养基上,红三叶下胚轴愈伤组织的诱导率均为 100%。在 MS 培养基上,愈伤组织的褐化率为 23.33%,而在 MB 培养基上,愈伤组织的褐化率则上升至 46.48%,因此 MS 培养基更适合愈伤组织的诱导和生长。

表 2 不同离子强度对红三叶下胚轴愈伤组织的诱导及生长的影响

离子强度	接种数 (个)	出愈数 (个)	出愈率 (%)	褐化率 (%)	愈伤组织颜色及形态
2MS	93	93	100	29.03	表面湿润,不规则,多为浅黄色,其次是黄绿色、绿色,少数为白色。
MS	97	97	100	22.68	多数湿润,不规则,少数颗粒状,颜色有浅黄色、浅绿色。
1/2MS	94	94	100	93.62	同上,未褐化的呈绿色、浅绿色。
1/4MS	89	76	85.39	95.51	同上,但愈伤组织较小。

从表 2 可以看出,在 2MS、MS 和 1/2MS 3 种离子强度下,红三叶下胚轴外植体的出愈率相同,均为 100%。但愈伤组织褐化情况却不同,1/2MS 培养基上的愈伤组织褐化最严重,褐化率达 93.62%,MS 培养基上的褐化程度最轻,仅占 22.68%。不难看出,MS 的离子强度最适合红三叶下胚轴愈伤组织的诱导与生长。

2.1.3 不同水平的激素组合对红三叶不同外植体愈伤组织诱导与生长的影响 在孟玉玲等人的研究基础上,以 MS 为基本培养基,着重考察了几种不同水平的激素组合对红三叶下胚轴和子叶愈伤组织的诱导及生长的影响,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,几种不同水平的激素组合下,下胚轴愈伤组织的诱导情况基本相同,红三叶下胚

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导、继代培养及生长量测定

2.1.1 基本培养基对愈伤组织诱导及生长的影响 MS 和 MB 均可用以诱导红三叶愈伤组织,在添加 1.5 mg/L 2,4-D,0.5 mg/L 6-BA 的激素水平下,比较 MS 培养和 MB 培养基诱导红三叶下胚轴愈伤组织的效果,其结果见表 1。

2.1.2 离子强度对愈伤组织诱导及生长的影响 为了进一步了解离子强度对红三叶下胚轴愈伤组织的诱导情况,将外植体分别接种于附加 1.5 mg/L 2,4-D,0.5 mg/L 6-BA 的 2MS、MS、1/2MS、1/4MS 培养基上,1 个月后统计其出愈率和褐化率,结果见表 2。

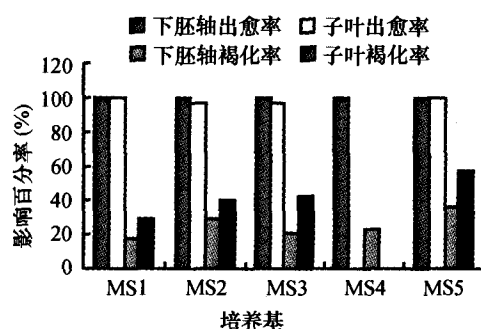


图 1 不同激素组合对外植体愈伤组织诱导和生长的影响

注:MS1 为 MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA; MS2 为 MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.4 mg/L 6-BA; MS3 为 MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.4 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IAA; MS4 为 MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA; MS5 为 MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA。下同。

轴的愈伤组织诱导率均为 100%。但是从褐化率来看,不同水平的激素组合对愈伤组织的生长情况有一定的影响。在添加 2.0 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L 6-BA 的培养基上,愈伤组织的褐化程度最轻,只有 17.44%,在添加 1.0 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L 6-BA 的培养基上,愈伤组织的褐化最严重,为 36.19%。其他 3 种激素组合上的褐化程度介于上述两者之间。

2.1.4 愈伤组织的继代培养及其生长量的测定

将 2.1.3 得到的愈伤组织继代培养,继代培养基与其诱导培养基成分相同。接种 4 周后,按公式计算愈伤组织的相对生长参数,即:

愈伤组织相对生长参数 = (愈伤组织收获量 - 接种量) / 接种量

从表 3 可以看出,在 MS1 上,愈伤组织的相对生长参数值最大,为 15.30,其次是在 MS3 上的,为 10.03,再次是 MS2 的,为 9.76。在 MS5 上的愈伤组织生长最差,其相对生长参数为 7.31,低于其他 3 种培养基的。由此可见,继代培养基的种类影响愈伤组织的生长,在第 1 种培养基上愈伤组织生长的最快。

表 3 不同继代培养基上愈伤组织的生长情况

继代培养基	接种量 (g)	收获量 (g)	相对生长 参数
MS1	0.32	4.96	15.30
MS2	0.71	6.94	9.76
MS3	0.51	5.09	10.03
MS4	0.65		
MS5	0.83	6.06	7.31

2.2 愈伤组织异黄酮含量的测定

2.2.1 基本培养基和离子强度对愈伤组织异黄酮积累的影响 对 MS、MB 上的愈伤组织及幼苗中的异黄酮进行测定,结果发现:3 种所测样品中均含有异黄酮,其中 MS 和 MB 培养基上的愈伤组织含异黄酮分别为 4.43 和 4.06 $\mu\text{g}/\text{mg}$,对照组(幼苗)中的为 1.97 $\mu\text{g}/\text{mg}$,2 种愈伤组织中的异黄酮含量差异不显著,但都明显高于对照组中的,且差异显著($P < 0.05$)。

从图 2 可以看出,离子强度对异黄酮的积累有明显影响,MS、1/2MS 和 2MS 上诱导的愈伤组

织异黄酮含量不同,1/2MS 上的最高,为 5.67 $\mu\text{g}/\text{mg}$,其次为 MS 的,为 4.43 $\mu\text{g}/\text{mg}$,2MS 的最低,为 3.26 $\mu\text{g}/\text{mg}$,统计分析表明,3 种离子强度下的异黄酮含量间差异显著($P < 0.05$)。

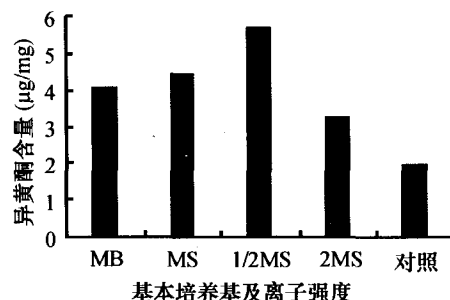


图 2 基本培养基及离子强度对愈伤组织异黄酮的影响

2.2.2 激素水平与组合对愈伤组织异黄酮积累的影响 MS1—MS5 考察了激素组合与水平对下胚轴愈伤组织异黄酮积累的影响,结果见图 3。

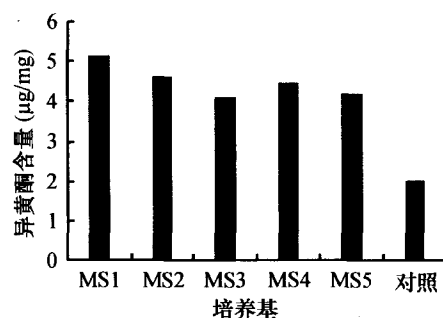


图 3 激素水平与组合对愈伤组织异黄酮积累的影响

从图 3 可以看出,MS1 诱导的愈伤组织异黄酮含量最高,为 5.12 $\mu\text{g}/\text{mg}$,MS3 上的最低,为 4.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$,其他的介于二者之间。统计分析表明,5 种处理下异黄酮的含量均比对照组高,且差异显著($P < 0.05$)。各处理之间,MS1 与 MS3,MS1 与 MS5 间差异显著($P < 0.05$),其余各处理之间差异不明显。

2.2.3 不同外植体对愈伤组织异黄酮积累的影响 在添加不同激素的培养基上诱导下胚轴和子叶的愈伤组织并测定愈伤组织异黄酮含量,结果发现,子叶愈伤组织异黄酮的含量均比下胚轴的高(如表 4 所示)。统计分析表明,MS2 和 MS5 上的子叶愈伤组织异黄酮明显高于下胚轴的,且差异显著($P < 0.05$),MS1 和 MS3 上的子叶愈伤组织异黄酮也比下胚轴的高,但差异不显著。

表4 下胚轴和子叶愈伤组织对异黄酮的积累

	MS1	MS2	MS3	MS5
下胚轴	5.12±0.14 ^a	4.57±0.378 ^a	4.08±0.052 ^a	4.16±0.40 ^a
子叶	5.14±0.115 ^a	5.86±0.018 ^b	4.86±0.60 ^a	7.57±0.31 ^b

注:相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 选择合适的诱导培养基 在对基本培养基、离子强度、激素的考察中发现:MS诱导的外植体出愈率高,愈伤组织生长较好,相比较而言,MB的愈伤组织诱导率虽也较高,但是愈伤组织的褐化率也高,且长势较差。这可能是因为MS培养基的无机盐浓度高,铵盐和硝酸盐比例适宜,外植体脱分化后生长迅速,酚类物质的分泌受到抑制,所以愈伤组织的褐化率低,生长状况较好。离子强度试验结果也进一步证明:无机盐浓度对诱导外植体脱分化及愈伤组织的生长是有一定影响的。

在几种激素组合中,2.0 mg/L 2,4-D和0.5 mg/L 6-BA的激素组合更适合诱导下胚轴产生愈伤组织和降低其褐化程度生长。孟玉玲等^[9]在红三叶的组织培养中发现,2,4-D在红三叶愈伤组织诱导中起重要作用,2,4-D浓度增加,愈伤组织诱导率提高,2.0 mg/L 2,4-D和0.5 mg/L 6-BA配合使用,愈伤组织诱导率可达89%以上。而在试验中发现,当2,4-D的浓度为1.0~2.0 mg/L,6-BA的浓度为0.4 mg/L或0.5 mg/L时,红三叶下胚轴的愈伤组织诱导率均为100%,只是激素水平不同,愈伤组织的褐化率有差别,2,4-D与6-BA/6-BA+NAA的浓度比为4:1时,愈伤组织的褐化程度较轻。

3.2 培养基和外植体类型会影响愈伤组织异黄酮的积累 在考察了基本培养基、离子强度、激素对下胚轴愈伤组织异黄酮积累的影响后可以断定:不同条件下诱导的愈伤组织中,异黄酮的含量均比实生苗中的高,且差异极显著($P<0.05$);最适合诱导愈伤组织的培养基并不一定适合积累异黄酮,例如在离子强度试验中,MS是下胚轴出愈率最高而褐化率最低的培养基,而异黄酮测定结果则表明1/2MS培养基最适合积累异黄酮,其原因尚待进一步研究。然而对于添加不同激素的培养基,愈伤组织诱导及生长良好的培养基也最适合积累异黄酮,如MS1上的下胚轴出

愈率高且褐化率低,愈伤组织相对生长参数也最高,达15.00。植物组织培养中次生代谢物质的合成与培养物的生长具有一定的负相关性^[10],而在红三叶组织培养中,生长快的愈伤组织积累的异黄酮也多,不存在负相关性。

试验结果表明:愈伤组织异黄酮含量的多少不仅与培养基成分有关,也与外植体类型有关。在下胚轴和子叶的培养发现,相同培养基上生长的子叶愈伤组织和下胚轴愈伤组织,前者的异黄酮含量总是比后者的高。而Fedoreyev等^[6]在对怀槐的不同部位进行愈伤组织培养时发现,叶柄、花序和顶端分生组织来源的愈伤组织中异黄酮的含量基本相同。这也许是因植物种类不同而导致试验结果的差异。

综上所述,红三叶愈伤组织可合成异黄酮且异黄酮含量明显比实生苗中的高,这为今后大规模开展细胞悬浮培养和生产异黄酮奠定了基础。

参考文献:

- [1] 樊江文. 红三叶再生草的生物学特性研究[J]. 草业科学, 2001, 18(4): 18-26.
- [2] 曾虹燕, 周朴华, 侯团章. 红车轴草有效成分的研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(2): 189-190.
- [3] 王志明, 岳民勤, 杜文华, 等. 集饲用和药用价值于一体的牧草新秀——岷山红三叶[J]. 草业科学, 2005, 22(4): 33-35.
- [4] 王妍琪, 单安山. 异黄酮类化合物的营养作用及其应用[J]. 中国饲料, 2003, 18: 18-20.
- [5] Fedoreyev S A, Pokushalova T V, Veselova M V, et al. Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis*[J]. Fitoterapia, 2000, 71: 365-372.
- [6] Maria Luczkiewicz, Daniel Glod. Callus cultures of Genista plants-in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity[J]. Plant Science, 2003, 165: 1101-1108.
- [7] 罗建平, 吴礼福, 江绍通. 怀槐愈伤组织形成与异黄酮积累[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1138-1141.
- [8] 张春荣, 李玲. 野葛幼叶细胞悬浮培养生产葛根素等异黄酮类化合物的研究[J]. 中草药, 2003, 34(7): 653-657.
- [9] 孟玉玲, 皓云鹏, 贾敬芬. 红三叶组织培养及再生植株[J]. 草业学报, 1994, 3(2): 51-54.
- [10] Banthorpe D V. Secondary Metabolism in Plant Tissue Culture: Scope and Limitations [J]. Nat. Prod. Rep., 1994, 11: 303.

Callus culture and isoflavones production of *Trifolium pratense*

GU Wen-ying, CHEN Ying, YU Fei

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Callus culture of hypocotyl and cytoledon of *Trifolium pratense* were established. The result showed that MS basal medium containing 2.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L 6 BA was the optimum inducing medium. The content of the isoflavones from callus was determined in this experiment by UL-vis spectrophotometry method. The results showed: the content of isoflavones from callus was significantly higher than seedling's. The callus with the higher isoflavones content was obtained from cytoledon. The difference of isoflavones content in hypocotyl and cytoledon was statistically obvious ($P < 0.05$).

Key words: *Trifolium pratense*; callus; isoflavones; UL-vis spectrophotometry

我国草原监理体系取得进展

近年来,草原监理体系建设取得突破性进展,草原保护制度稳步推进,草原执法监督工作进一步加强,草业可持续发展战略研究取得重大成果。目前全国已有县级以上草原监理机构 790 个,草原监理人员 7 400 多人,为进一步做好草原监理工作奠定了基础。

据新近召开的 2006 年草原监理工作会议介绍,目前全国已有县级以上草原监理机构 790 个,草原监理人员 7 400 多人,分别比 2003 年增加了 52% 和 17%,中央、省、地、县四级草原监理体系的构架进一步完善,力量得到了充实和加强,为进一步做好草原监理工作奠定了基础。几年来,草原禁牧休牧轮牧制度稳步推行,到 2005 年,内蒙古、陕西、甘肃等 7 省(区)禁牧休牧轮牧面积已达 293.33 万 hm^2 ,其中禁牧面积 173.33 万 hm^2 ,休牧面积 120 万 hm^2 。2003 年至 2005 年,全国共查处草原违法案件 2 万多起,对破坏草原的违法活动产生了强烈的震慑作用。2005 年农业部草原监理中心首次组织全国 17 个主要草原省区,开创性地开展了全国草原监测工作,调查样地 2 700 多个、样方 8 000 多个,涉及全国 91% 的草原面积,形成了全国草原监测报告,为研究制定草业可持续发展战略,编制草原保护建设利用总体规划,指导草原保护建设提供了重要的科学依据。

目前,片面追求眼前利益忽视生态保护的现象还很普遍,草原牧区落后的生产方式在短期内难以根本改变,草原监理力量薄弱手段落后的问题还很突出,开展草原监理工作的阻力、压力和难度还很大。农业部草原监理中心主任兼畜牧业司副司长宗锦耀说,要重新认识草原的作用,明确草业的战略地位,树立“大资源、大生态、大农业、大食物”的理念,要像重视海洋、矿产等资源一样高度重视草原资源的保护开发,像建设林业生态一样建设草原生态,像保护基本农田一样保护基本草原,像重视粮食安全一样重视草原安全。他说,加强草原监理工作是维护国家生态安全的战略举措,是依法维护农牧民合法权益的迫切需要,是推进草业可持续发展的重要保障。“十一五”期间将进一步加强草原监理体系建设,把依法行政贯穿于草原保护建设和监督管理工作的各个环节,加大对禁牧休牧的监管力度,依法打击各种破坏草原的违法行为,保证禁牧休牧的各项措施落到实处,切实做到严格执法、公正执法、文明执法。

(白锋哲)