

中麻黄离体培养及麻黄生物碱含量

I. 中麻黄离体培养及愈伤组织的生长

李毅* 赵绪兰 刘辉

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001)

摘要

本文对中麻黄 *Ephedra intermedia* 进行了茎段离体培养。在 MS+CH 300 毫克/升+Gln 200 毫克/升+Asp 150 毫克/升+2, 4-D 2 毫克/升+蔗糖 3% 培养基上愈伤组织诱导率达 406.3%, 添加氨基酸能极大地提高诱导率。继代培养中出现了 4 种颜色的愈伤组织, 改变营养成分可实现各颜色愈伤组织的互相转化。经筛选获得生长旺盛的愈伤组织无性系。合适的继代培养基 (MS+CH 300—500 毫克/升+Gln 200 毫克/升+Asp 150 毫克/升+2, 4-D 1.5 毫克/升+KT 0.2 毫克/升+木糖 250 毫克/升+蔗糖 3%—6%) 可使愈伤组织快速增殖。

关键词: 中麻黄; 组织培养; 愈伤组织

麻黄为常用中药, 是世界著名的我国特产药材 (张建生等, 1989)。麻黄中主要有效成分是麻黄碱。麻黄碱是拟肾上腺素药, 能促进人体内去甲肾上腺素的释放, 具有中枢神经兴奋作用 (北京医学院等, 1980)。

中麻黄 (*Ephedra intermedia*) 是麻黄属的一个种, 是我国分布最广的麻黄之一, 主要产于我国西北部海拔数百米到 2 000 米的干旱、荒漠、沙滩地区, 其强大的根系有固沙保土的作用 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1978), 在环境保护方面具有重要意义。近年来由于过度开垦和乱采滥挖, 其产量日趋减少 (武素功等, 1990)。利用组织和细胞培养技术大量繁殖麻黄培养物, 从中提取麻黄碱, 可以有效地开拓麻黄碱生产的新途径。

Ramawat 等从 1976 年起对 *Ephedra gerardiana* 和 *Ephedra foliata* 作了大量的培养工作 (Ramawat et al., 1976, 1979a; 1979b)。但对主要分布于我国的 *Ephedra intermedia* 的培养还未见报道。

* 本文始终都得到了陈集贤研究员的指导和支持并审阅了全文

** 联系人, TEL.: (0971) 6143610, FAX.: (0971) 6143282

本文 1994 年 7 月 2 日收到。

(1) 材料: 于1987年7月和1988年8月采自青海省海北州海晏县白佛寺乡, 采集地为海拔2600米的山前冲积平原。

(2) 方法: 开花前剪取直径在0.2厘米以下的嫩枝作接种材料, 经大量水冲洗后, 用0.2%的HgCl₂表面灭菌8分钟, 无菌水冲洗3—4遍, 将切段(长1厘米左右)培养在100毫升三角锥瓶中。诱导培养基为补加不同添加物的MS培养基(Murashige et al.; 1962), 补加成分见表1。培养在人工气候箱中进行, 温度25℃±1℃, 暗培养。待产生大量愈伤组织后, 从外植体上切取愈伤组织进行继代培养, 继代培养在每日16小时光照(2000lx)下进行, 继代培养基为补加不同添加物的MS培养基(表1)。以后每2个月挑选生长旺盛的愈伤组织进行继代培养。

表1 培养基成分表
Table 1 The composition of media

Unit: mg/L

成分 Constituent	诱导培养基 Media for inducing calli			继代培养基 Subcultural media	
	IIN	II	IIA	LC	LC+
2,4-D	2	2	2	1.5	1.5
KT	—	—	—	0.2	0.2
kinetin	—	—	—	—	—
Gln	—	200	200	200	200
Glutamine	—	—	—	—	—
Asp	—	—	150	150	150
Aspartic acid	—	—	—	—	—
木糖	—	—	—	—	250
Xylose	—	—	—	—	—
蔗糖	30 000	30 000	30 000	30 000—	30 000—
Sucrose	—	—	—	60 000	60 000

注: 所有培养基基本成分为MS培养基, 补加CH 300—500毫克/升。

Note: The basic medium is MS medium added casein hydrolysate 300—500mg/L.

二、结果与讨论

1. 愈伤组织发生形态

材料接种后10天左右, 在切段的1端或2端产生肉眼可见的愈伤组织, 35天后产生大量的淡黄色愈伤组织。一般愈伤组织在相应于材料的基部的一端先发生, 而后在相应于材料的顶部位置发生, 且产生的愈伤组织数量也不多(图版I: 1)。这种现象也许和植物材料中内源激素的不平衡分布有关。

诱导出的愈伤组织呈疏松状态, 其中分布着一些呈球形坚硬的胚性愈伤组织(EC,

embryonic-callus)。继代时只挑选 EC 进行转移。

2. 愈伤组织的诱导率与材料的大小

接种材料分为直径 0.1 厘米以下(包括 0.1 厘米)和直径 0.1 厘米以上 2 组(表 2)。

表 2 接种材料与愈伤组织诱导率

Table 2 Inoculated materials and their callus induction ratio

项目 Item	直径>0.1 厘米 Diameter>0.1cm	直径<0.1 厘米 Diameter<0.1cm	总和 Total
接种数 Number of inoculation	19	13	32
愈伤组织数 Number of inducing calli	80	50	130
诱导率 Ratio %	421.1	384.6	406.3

注: 培养基为 IIA。诱导率 = (产生 EC 数/接种材料切段数) × 100%。

Note: on IIA medium. Ratio = (Number of EC/number of inoculation) × 100%.

虽然大直径材料的愈伤组织诱导率较高, 但仅比小直径处理高 (421.1—384.6) / 421.1 = 8.7%, 并无明显优势。

3. 愈伤组织诱导率与氨基酸

诱导培养基以 IIN (不补加氨基酸) 为基础, 依次补加 Gln (I 培养基) 和补加 Gln + Asp (IIA 培养基) 的 3 种培养基, 比较其诱导效果(表 3)。

表 3 补加氨基酸与诱导率

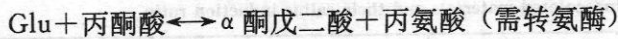
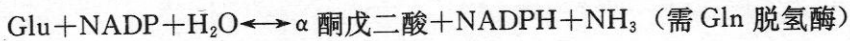
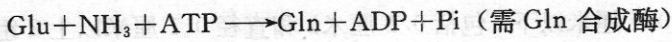
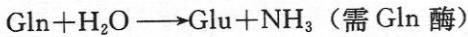
Table 3 Influence of adding amino acid on ratio of callus induction

项目 Item	IIN 培养基 IIN medium	II 培养基 II medium	IIA 培养基 IIA medium
接种数 Number of inoculation	31	13	32
愈伤组织数 Number of inducing calli	47	43	130
诱导率 Ratio %	151.6	330.8	406.3

从表 3 可以看出, II 比 IIN 培养基的诱导率提高 1.1 倍, IIA 培养基的诱导率得到了进一步的提高。其原因是高浓度的 NH_4^+ 对植物材料有毒害作用, 但是植物的代谢又与 NH_3 紧密相关, 因此在培养基中能够长时期地提供低浓度的 NH_4^+ 离子供植物代谢所利用是至为重要的。这样, 我们通过在培养基中形成 NH_4^+ 离子代谢库(简称“ NH_4^+ 库”)

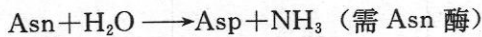
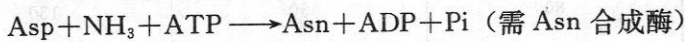
来实现低浓度 NH_4^+ 的供应。它分为基本的 Gln 途径和补充形式的 Gln-Asp 途径。

(1) Gln 途径-基本形式:



以上各种酶在植物中广泛存在(沈同等, 1980), 由于以上反应的动态过程, 在培养基中形成了 NH_4^+ 的缓冲, 即形成“ NH_4^+ 库”。这样既避免了 NH_4^+ 对植物的毒害, 又提高了植物代谢对 NH_3 的需求。

(2) Gln-Asp 途径-补充形式:



Gln-Asp 途径通过 Gln 途径起作用, 它进一步补充了“ NH_4^+ 库”的容量。

通过以上途径, 实现了“ NH_4^+ 库”的形成, 从而提高了诱导率。

4. 愈伤组织的生长

EC 初次转移后形成了 4 种颜色不同的愈伤组织: ①维持淡黄色不变(图版 I: 2); ②转变为绿色愈伤组织(图版 I: 3); ③转变为绿色和黄色的杂合色愈伤组织(图版 I: 4); ④转为褐色愈伤组织(图版 I: 5)。现将黄色愈伤组织和绿色愈伤组织的转化率列入表 4。

表 4 EC 初次转移后向黄色与绿色愈伤组织的转化

Table 4 The effect that embryogenic-callus kept yellow color and turned into green color in first subculture

项 目 Item	绿色愈伤组织 Green callus		黄色愈伤组织 Yellow callus	
	LC 培养基 LC medium	LC ⁺ 培养基 LC ⁺ medium	LC 培养基 LC medium	LC ⁺ 培养基 LC ⁺ medium
	接种愈伤组织数 Callus No. of inoculation	87	67	87
转化的愈伤组织数 No. of changed callus	2	16	23	24
转化率 % Ratio of changed	2.3	23.9	26.7	35.8

EC 初次转移后, 在 LC⁺ 培养基上其颜色得到了较好的保持。4 种愈伤组织的生长速度: 黄色 > 绿色 > 杂合色 > 褐色。黄色愈伤组织的生长速度极快, 转移前每瓶平均鲜重 0.7572 克, 40 天后增加到 16.2263 克, 平均日增重 0.3867 克(鲜重) · 日⁻¹ · 瓶⁻¹, 图

版 I : 6—8 分别为转移后 5 天、20 天和 40 天的情况。

以后每次继代均挑选淡黄色 EC 转移, 我们将从外植体上切下的 EC 称为 S_0 代, 从 S_0 代中选出的 EC 称为 S_1 代, 依次类推。从 S_2 代起, 在 LC^+ 培养基上愈伤组织基本保持淡黄色不变。而在 LC 培养基上愈伤组织仍出现了多种颜色, 愈伤组织在生长前期转为绿色 (图版 I : 9), 而在生长后期, 从绿色愈伤组织中又产生出一些黄色愈伤组织 (图版 I : 10), 将这些黄色愈伤组织转移到 LC^+ 培养基上, 仍可高速增长。

参 考 文 献

- 中国科学院中国植物志编辑委员会, 1978, 中国植物志 (第七卷), 第 1 版, 科学出版社, 468—475。
- 北京医学院、北京中医学院, 1980, 中草药成分化学, 第 1 版, 人民卫生出版社, 114—115。
- 沈 同、王镜芳、赵邦悌, 1980, 生物化学, 第 1 版, 人民教育出版社, 534—543。
- 张建生、李胜华、楼之岑, 1989, 国产麻黄的形态组织学研究, 药学报, 24: 937—948。
- 武素功、费 愚、夏 榆, 1990, 喀喇昆仑山-昆仑山植物区系的一般特征及植物资源的保护与开发利用, 自然资源学报, (5): 376—381。
- Murashige T, Skoog F, 1962, A revised for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture, *Physiologia Pl*, 15: 473—497。
- Ramawat K G, Arya H C, 1976, Growth and morphogenesis in callus of *Ephedra gerardiana*, *Phytomorphology*, 26: 395—403。
- Ramawat K G, Arya H C, 1979a, Alkaloid content of Ephedrin *in vivo* and *in vitro*, *Indian J Exp Biol*, 17: 106—107。
- Ramawat K G, Arya H C, 1979b, Effect of some growth regulators on ephedrine production in *Ephedra gerardiana* callus culture, *Indian J Exp Biol*, 17: 227—228。

EPHEDRA INTERMEDIA IN VITRO CULTURE AND ITS ALKALOID CONTENT

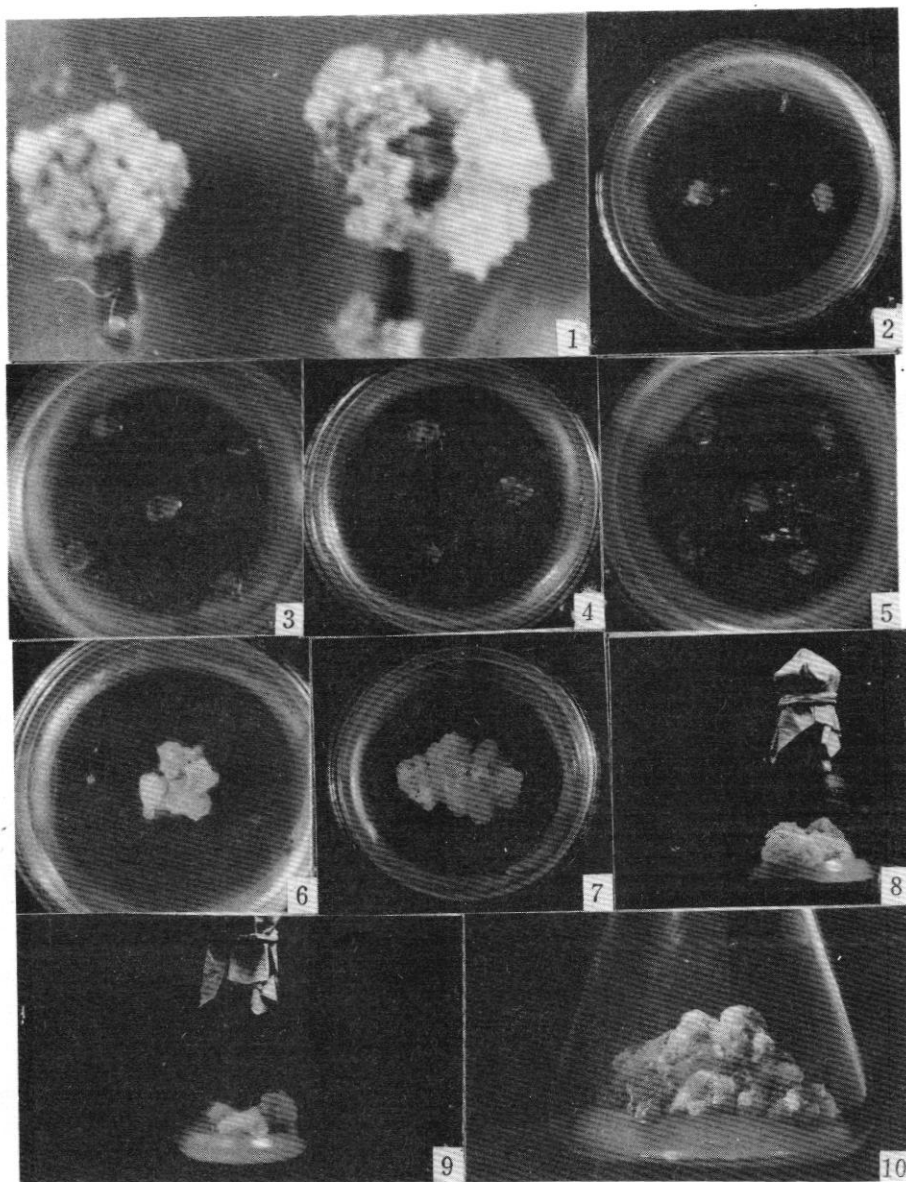
1. EPHEDRA INTERMEDIA IN VITRO CULTURE AND THE GROWTH OF CALLI

Li Yi, Zhao Xulan and Liu Hui

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001)

The young stem of *Ephedra intermedia* was in vitro cultured. The ratio of inducing calli was 406.3% on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with casein hydrolysate (CH) 300mg/L + Gln 200mg/L + Asp 150mg/L + 2, 4-D 2mg/L + Sucrose 3%. Addition amino acid showed good effect. In first subculture, the yellow callus turned into four kinds of callus with different color. The yellow callus grew fast so it was continued to subculture. A fit medium (MS + CH 300—500mg/L + Gln 200mg/L + Asp 150mg/L + 2, 4-D 1.5mg/L + KT0.2mg/L + Xylose 250mg/L + Sucrose 3—6%) makes the callus growing well.

Key words: *Ephedra intermedia*; Plant tissue culture; Callus



1. 茎切段愈伤组织的发生及部位。2. 淡黄色胚性愈伤组织 (EC)。3—5. 绿色、杂合色和褐色愈伤组织。6—8. 愈伤组织转移 5 天、20 天、40 天时的生长情况。9. 在 LC 培养基上, 淡黄色胚性愈伤组织转化为绿色愈伤组织。10. 生长后期在绿色愈伤组织中产生一些黄色愈伤组织。

1. Callus emergence and position. 2. The yellow embryogenic-callus (EC). 3—5. Green, motley and brown calli. 6—8. Calli having grown for 5 days, 20 days and 40 days. 9. On LC medium, EC turned into green calli and 10. the old green calli produced some yellow calli.