

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2011.06.022

巫山淫羊藿愈伤组织细胞的悬浮培养条件优化的初步研究

韩素菊¹, 黎云祥^{2*}

(1. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621000; 2. 西华师范大学, 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637002)

摘要: 通过研究接种量、激素配比、糖浓度、培养基种类对巫山淫羊藿悬浮培养细胞生长及其愈伤组织黄酮类含量的影响,建立了巫山淫羊藿细胞悬浮培养的技术体系。结果表明:巫山淫羊藿愈伤组织细胞悬浮培养在B₅基本培养基中并附加1.0 mg·L⁻¹2,4-D和0.2 mg·L⁻¹BA,蔗糖浓度40 g·L⁻¹,接种量每30 mL为鲜重2 g时,黄酮类化合物含量最高。说明用松脆的巫山淫羊藿胚性愈伤组织可容易建立理想的悬浮细胞培养体系。

关键词: 巫山淫羊藿; 细胞悬浮培养; 黄酮类化合物

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)06-0827-05

Primary study on suspension cell culture of *Epimedium wushanense*

HAN Su-Ju¹, LI Yun-Xiang^{2*}

(1. Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China; 2. China West Normal University, Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation, Nanchong 637002, China)

Abstract: The technological system of cell suspension culture by the flavonoids content of *E. wushanense* was established through studying the effect of inoculation concentration, hormone combination, sugar concentration and various medias. The result showed that the suspension culture optimum medium of *E. wushanense* was B₅ medium supplemented with 1.0 mg·L⁻¹2,4-D and 0.2 mg·L⁻¹6-BA, the sugar concentration was 4.0% and the optimum inoculation concentration was 2 g per 30 mL. The highest content of the total flavonoids appeared on the medium.

Key words: *Epimedium wushanense*; suspension cell culture; flavonoids

巫山淫羊藿(*Epimedium wushanense*),来源于小檗科(Berberidaceae)淫羊藿属(*Epimedium*)的多年生宿根性草本植物。李时珍《本草纲目》中称其有“益精气,坚筋骨,补腰膝,强心力”之功效。现代药理实验研究表明,淫羊藿能增加心脑血管血流量,促进造血功能、免疫功能及骨代谢,具有抗衰老、抗肿瘤,补肾阳,强筋骨,祛风湿等功效,临床应用十分广

阔(国家药典委员会,2000;李晶晶等,2002)。淫羊藿药用历史悠久,其有效成分为淫羊藿甙(Icariin)等黄酮类化合物次生代谢产物和多糖(郭宝林,1999)。随着现代中药产业化的进程,现代科学对淫羊藿的深入研究,新的疗效的不断发现,以淫羊藿为主要原料的中成药、民族药产品不断问世,市场对淫羊藿需求量愈来愈大,使其野生资源渐有不能满足

收稿日期: 2010-11-02 修回日期: 2011-07-20

基金项目: 四川省教育厅重点项目(09ZX011); 四川省科技厅应用基础研究项目(2008JY0158); 四川省重点实验室开放基金项目(XNYB09-04) [Supported by Key Project of Sichuan Education Department(09ZX011); Basic Research Project of Sichuan Science and Technology Department (2008JY0158); Open Fund for Key Laboratory of Sichuan Provincial(XNYB09-04)]

作者简介: 韩素菊(1976-),女,四川资中人,硕士,讲师,主要从事植物生理研究。

* 通讯作者: 黎云祥,教授,博士生导师,(E-mail:)yx_li@263.net.

需求之虞。国内外淫羊藿细胞悬浮培养及其黄酮含量的研究鲜见报道。

本项目通过研究接种量、激素配比、糖浓度、培养基种类对悬浮培养细胞生长及其愈伤组织总黄酮含量的影响,建立了巫山淫羊藿细胞悬浮培养的技术体系,以期为巫山淫羊藿野生资源保护以及建立高效的淫羊藿黄酮离体生产体系提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料培养

从淫羊藿(*E. wushanense*)幼嫩叶片诱导得到的愈伤组织,经过继代培养反复筛选后选取生长均一,质地疏松,分散性好的淡黄色的愈伤组织作接种材料。在愈伤组织接种继代16 d后,接种在培养液中进行振荡培养(120 rpm),光照12 h·d⁻¹。培养液采用同继代愈伤组织的培养基相同的激素和蔗糖浓度配比的LS培养基+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+0.5 mg·L⁻¹6-BA+Sugar 30 g·L⁻¹,只是不加琼脂(韩素菊,2007)。培养瓶采用100 mL的三角瓶。每瓶中加培养液30 mL。悬浮培养初期10 d后用120目的不锈钢筛网对培养物进行过滤,除去大细胞团,保留分散程度好的小细胞团及单细胞。培养初期每半个月换培养液1次,每次换液时将培养物静置,倒去上层2/3培养液,保留1/3原液,加入2/3新液。悬浮培养初期每半个月继代1次,2次后,逐步缩短为1周继代1次。这样通过4~5次继代培养,即可得

到只含单细胞或小细胞团的培养物。将这些细胞混匀,得到悬浮培养细胞。

1.2 培养方法

将得到的细胞悬浮培养物在培养6 d后,用400目不锈钢筛网过滤收集细胞。然后在超净工作台上用电子天平称量一定数量的细胞接种到分装有30 mL液体培养基的100 mL三角瓶中到进行培养。

1.3 悬浮培养细胞生长实验参数的测定

以悬浮培养细胞的鲜重,干重及总黄酮含量为生长指标,所得实验结果为4~5个平行试样的平均值。细胞鲜重测定:20 d悬浮培养结束,用400目不锈钢筛网过滤收集细胞,用蒸馏水洗去细胞表面的培养液,再用滤纸吸取多余水分,最后称量得到细胞鲜重。细胞干重的测定:把收获的细胞测其鲜重以后,置于60℃的烘箱中过夜烘干至恒重,称量得细胞干重。

细胞增长率=(收获细胞湿重-接种细胞湿重)/接种细胞湿重×100%。

培养物中总黄酮含量测定:总黄酮含量采用分光光度法(胡筱等,2004)。将悬浮培养细胞收集,洗涤,60℃烘干至恒重,研细,取0.05 g粉末至三角瓶中,加入85%乙醇10 mL浸泡,室温振荡48 h。过滤得到总黄酮提取液。取滤液1.0 mL于试管中,再加入10 mL 85%乙醇摇匀得到样品液,在269.56 nm处测吸光度。根据标准曲线计算相应样品中总黄酮的含量。用淫羊藿甙标准品以同样方法

表1 接种量对淫羊藿悬浮培养细胞生长的影响

Table 1 Effects of different inoculum densities on the growth of suspension cells of *E. wushanense*

每瓶接种量 Inoculation densities (g/bottle)	细胞生长量(鲜重) Cell fresh weight (g/bottle)	细胞干重 Cell dry weight (g/bottle)	细胞增长率(%) Rate of cell increment
1	2.6363±0.2495	0.26612±0.022	163.8±0.2980
2	6.008±0.4182	0.50142±0.033	200.4±0.0187
3	7.530±0.6863	0.45550±0.058	151.0±0.3478
4	8.080±0.1893	0.51361±0.042	102.0±0.0147

测得标准曲线为: $C = 25.349A - 0.2225$, $R^2 = 0.9990$,其中C为测量样品中总黄酮含量($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),然后再计算出每瓶培养出的悬浮细胞中的总黄酮含量与产量。

2 结果与分析

2.1 初始接种密度对悬浮培养细胞生长的影响

称1、2、3 g悬浮培养细胞接种到添加了2.0

mg·L⁻¹ 2,4-D,0.5 mg·L⁻¹BA、蔗糖30 mg·L⁻¹的30 mL的LS培养液中。20 d培养结束后收集细胞,测量细胞增长率。悬浮培养中,初始接种量的多少对细胞的生长有很大的影响,这与植物细胞具有群体生长特性有关,单个细胞难以生长、繁殖(Dornenburg and Seydel,2008)。由表1可以看出,初始接种量在1~2 g(每30 mL培养液)范围内,细胞增长率在2 g时达到最大值,而此时的悬浮培养细胞颗粒均匀,颜色鲜艳,分散性好(图1);如继续

增加接种量,细胞增殖倍数呈下降趋势,培养细胞所得的干重也没由于接种量的增倍而增倍,此时的悬浮培养液也变的混浊,镜检时发现有很多空细胞,瓶壁上也聚集了很多的衰败细胞或者巨型细胞(图 2),



图 1 悬浮培养细胞
Fig. 1 Suspension Cell

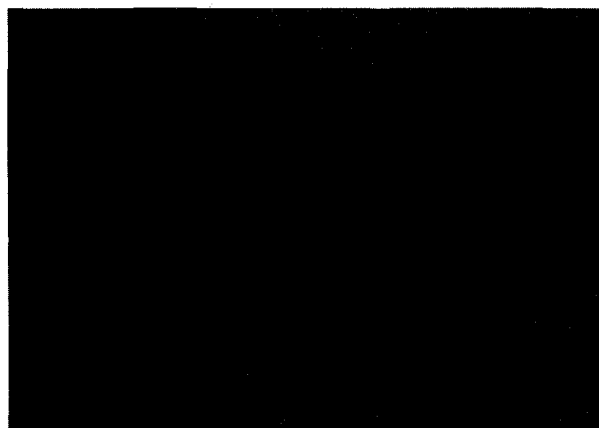


图 2 巨型细胞
Fig. 2 Giant cell

有利于悬浮细胞生长,适合淫羊藿悬浮细胞培养的最适宜密度为 30 mL 液体培养基加入 2 g 鲜重细胞。

2.2 激素对比对淫羊藿细胞生长的影响

以 LS 为基本培养基,蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值调至 5.8,接种量为每瓶 2 g。2,4-D 分别取 0、1.0、2.0、3.0($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)4 个水平,6-BA 分别取 0、0.2、0.4、0.5($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)4 个水平。进行 2 因素 4 水平 16 处理的试验。

所以悬浮细胞系在继代培养过程中,初始接种量以每 30 mL 的液体培养基加入 2 g 左右的培养物为宜。接种量过低时,细胞生长速率下降,过高反而抑制细胞生长。说明接种细胞密度需要达到一定量才

表 2 激素对比对细胞生长的影响

Table 2 Effects of 2,4-D and 6-BA on the growth of cells

处理号 No.	2,4-D 浓度 Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	6-BA 浓度 Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞收获干重(重复) Cell dry weight (g/bottle DW)			细胞收获干重平均值 Cell Mean dry weight(g/bottle DW)
			I	II	III	
1	0	0	0.4105	0.3645	0.3089	0.3613 ± 0.0508
2	0	0.2	0.3782	0.3247	0.3410	0.3479 ± 0.0274
3	0	0.4	0.3947	0.3877	0.3003	0.3609 ± 0.0525
4	0	0.5	0.3875	0.2976	0.2563	0.3138 ± 0.0670
5	1	0	0.3897	0.4000	0.3413	0.377 ± 0.0313
6	1	0.2	0.5090	0.4328	0.5416	0.4944 ± 0.0558
7	1	0.4	0.4811	0.4170	0.5392	0.4791 ± 0.0611
8	1	0.5	0.4187	0.4217	0.4987	0.4463 ± 0.0453
9	2	0	0.4685	0.4416	0.4007	0.4369 ± 0.0341
10	2	0.2	0.4090	0.4755	0.4015	0.4286 ± 0.0407
11	2	0.4	0.4918	0.4121	0.3998	0.4345 ± 0.0499
12	2	0.5	0.4120	0.3998	0.4351	0.4156 ± 0.0179
13	3	0	0.3970	0.3875	0.3798	0.3881 ± 0.0086
14	3	0.2	0.3879	0.3976	0.4512	0.4122 ± 0.0340
15	3	0.4	0.4008	0.4215	0.3648	0.3957 ± 0.0286
16	3	0.5	0.4512	0.4135	0.3978	0.4208 ± 0.0274
X1	0.3455 ± 0.0483	0.3908 ± 0.0417				
X2	0.4492 ± 0.0634	0.4208 ± 0.0646				
X3	0.4290 ± 0.0331	0.4170 ± 0.0624				
X4	0.4042 ± 0.0263	0.3992 ± 0.0646				

注:表中 X 为各种激素水平下细胞干重的平均值。

大多数细胞悬浮培养时,激素 2,4-D 一般有利于细胞的生长(杨帆等,2010)。因而巫山淫羊藿细胞悬浮培养时,采用的激素种类同于获得疏松愈伤组织时的激素,即 2,4-D 和 6-BA。

从表 2 可以看出,2,4-D 在取 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时收获细胞生物量最大,而 BA 在取 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时收获的细胞生物量最大。当浓度在 $1.0 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时悬浮培养细胞的鲜重和干重基本稳定。当 2,4-D 高于 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 镜检时,细胞内含物减少,空细胞和变形细胞增加,细胞干重下降。故较适合细胞悬浮生长的激素组合为 2,4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 3 不同蔗糖浓度对悬浮细胞培养的影响

Table 3 Effects of different sugar concentration on the growth of suspension of *E. wushanense* cells

处理 序号 No.	蔗糖浓度 Concentration of sugar ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞干重 Cell dry weight (g/bottle DW)			
		I	II	III	X
1	20	0.2675	0.3026	0.3345	0.3015 ± 0.0354
2	30	0.3847	0.3648	0.3718	0.3738 ± 0.0669
3	40	0.5049	0.4761	0.3488	0.4433 ± 0.0708
4	50	0.4950	0.4313	0.3177	0.4147 ± 0.0108

注:①I、II、III中数据为重复试验值;②X为I、II、III数据的平均值。

2.3 培养基中糖浓度对淫羊藿细胞生长的影响

在 LS 培养基中添加不同蔗糖浓度,确定在培

表 4 不同基本培养基对淫羊藿悬浮培养细胞生长和黄酮合成的影响

Table 4 Effects of different basic media on suspension cell of *E. wushanense*

培养基 Mediums	细胞增长率 (%) Rate of cell increment	细胞干重 (g) Cell dry weight	总黄酮含量 (%) Content of total flavonoids	总黄酮产量 (mg) Total flavonoids output
1/2MS	256.71 ± 0.0174	0.3996 ± 0.0235	5.163 ± 0.1820	2.0550 ± 0.0565
MS	213.2 ± 0.2546	0.3834 ± 0.0070	4.663 ± 0.2471	1.7769 ± 0.1024
B ₅	213.39 ± 0.1347	0.4936 ± 0.0586	5.471 ± 0.1742	2.6956 ± 0.1387
N ₆	215.75 ± 0.2145	0.3959 ± 0.0466	5.184 ± 0.5528	2.0696 ± 0.5322
LS	207.835 ± 0.3748	0.3882 ± 0.0592	5.032 ± 0.4933	1.9391 ± 0.2063

3 讨论

3.1 悬浮培养体系的建立

细胞悬浮培养的研究是植物细胞生产工业化必经的重要步骤(汤行春,2007),但要建立良好的细胞悬浮培养系统,必须先获得高脆性愈伤组织,获得松散的高脆愈伤组织常常是由固体培养过渡到悬浮培养的先决条件(李士生,1990;陈崇顺,1994)。在悬浮细胞系的建立过程中,植物细胞生长调节剂是影响细胞状态的重要因素(王海波,1991;张学英,

养液中的适合浓度。

当蔗糖浓度在 $20 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时,淫羊藿悬浮培养细胞的生长随浓度的升高而升高,当在 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞鲜重最大。蔗糖浓度过高,在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,淫羊藿细胞生长受到抑制。因此,蔗糖浓度以在培养基中添加蔗糖 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜,能使淫羊藿细胞生长良好,细胞鲜重和干重均能达最大值。

2.4 培养基对淫羊藿悬浮细胞生长和总黄酮含量的影响

用电子天平称量过滤收集到的 2 g 悬浮培养细胞,接种到附加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MS, LS, B₅, 1/2MS, N₆ 的培养液中。淫羊藿细胞在不同的液体培养基中生长和总黄酮的合成情况不同,在 1/2MS 培养基中,细胞生长较好,但所得细胞干重却较低,可能在 1/2MS 培养基里的细胞含水量多,进而干重偏低;而 MS, B₅, N₆ 培养液的细胞生长基本相同,但在 B₅ 培养基中的细胞干重最大,总黄酮含量也最高,达 5.47%,说明 B₅ 培养液有利于黄酮的合成;而在 LS 培养基中的细胞生长和总黄酮含量都较低。所以 B₅ 培养基有利于巫山淫羊藿细胞的生长及总黄酮的合成。而 N₆ 培养基有利于新疆雪莲细胞的生长和总黄酮的合成(朱朝德,1998),可能黄酮的合成需要的培养基种类与培养的物种有关。

2004)。本实验通过观察不同浓度 2,4-D、6-BA 对悬浮细胞生长的影响,在悬浮细胞培养过程中,2,4-D 浓度不宜过高,以 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜并附加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA,培养的悬浮细胞为小颗粒状、淡黄色、分散性好、细胞生长快,且细胞产量高(图 1)。在实验中,初始接种量对悬浮细胞生长影响很大,当细胞接种量为每 30 mL 液体 1.0 g 时,淫羊藿悬浮细胞生长缓慢,而且最后收获的细胞鲜重与干重产量低,接种量在 $3.0 \sim 4.0 \text{ g}$ 时,悬浮培养液在继代第 10 天左右就会变混浊,瓶壁上也会沉积一些衰败的死细胞。在悬浮培养细胞体系中,只有适宜的细胞密

度才有利于细胞的生长。

3.2 不同种类的液体培养基对淫羊藿悬浮体系建立的影响

不同种类的液体培养基对植物细胞的生长和次生产物的形成有很大的影响。目前, 比较适合多种植物的一般营养条件的培养基, 有多种配方可供选择, 如 MS, KC, White, B₅, N₆, LS 等, 有的研究表明降低培养基中氮源的总浓度能促进黄酮类化合物的合成(Yamakawa, 1983)。本实验结果也表明含低浓度铵的 B₅ 培养基有利于巫山淫羊藿细胞生长及黄酮类化合物的合成。

综上所述, 利用松脆的胚性愈伤组织, 可很容易地建立起理想的巫山淫羊藿悬浮细胞培养体系。悬浮体系保存在 B₅ 基本培养基中并附加 1.0 mg · L⁻¹ 2, 4-D 和 0.2 mg · L⁻¹ BA, 蔗糖浓度 40 g · L⁻¹, 接种量每 30 mL 为 2 g, 这样建立起的悬浮细胞培养体系能获得高产黄酮的含量可接近淫羊藿黄酮的含量。说明建立悬浮细胞培养体系研究细胞生长和次生产物积累规律对于植物细胞培养放大和提高次生产物得率具有重要意义, 也是未来植物细胞培养生产次生产物发展的主要方向。

参考文献:

王海波. 1994. 植物组织及细胞培养通用分析模式的探索[D]. 北京: 中国农业科学
王海波. 1991. 组织培养中的细胞状态调控[J]. 作物杂志, 3: 3-6
朱朝德, 张转平, 孙全明, 等. 1998. 箭叶淫羊藿叶中总黄酮及淫羊藿甙含量的动态变化研究[J]. 中国中药杂志, 23(1): 21-26
朱朝德, 胥道宝. 1993. 5种淫羊藿中淫羊藿甙含量的比较[J]. 中国中药杂志, 18(6): 332
李文魁, 林新, 罗崇念, 等. 1995. 近年来国内淫羊藿甙研究概况[J]. 西北药学杂志, 10(3): 138-140

国家药典委员会. 2000. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社: 267
胡筱, 魏毅, 沙玫. 2004. 淫羊藿中总黄酮的超声提取工艺的研究[J]. 海峡药学, 16(4): 88-89
韩素菊, 黎云祥, 胥晓, 等. 2007. 箭叶淫羊藿胚性愈伤组织诱导及其黄酮类化合物的总含量测定[J]. 中国中药杂志, 32(23): 2551-2553
颜秋生, 张雪琴, 腾胜, 等. 水稻原生质体培养技术体系的建立[A]. 华南农业大学, 农业科学集刊编辑委员会. 农业科学集刊第二集: 农作物原生质体培养
Chen CS(陈崇顺), Robert J. 1994. Acquisition of friable calli from stems and establishment of the cell suspension cultures of *Prunus armeniaca* cv. Canino and Luizet(杏茎脆散型愈伤组织的获取及细胞悬浮体培养的建立)[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境), 3(2): 22-26
Dornenburg H, Seydel P. 2008. Effect of irradiation intensity on cell growth and kalata B1 umulation in *Oldenlandia affinis* cultures[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 92: 93-99
Guo BL(郭宝林), Xiao PG(肖培根). 1999. The flavonoids in *Epimedium* and their taxonomic significance(淫羊藿属植物中的黄酮类成分及其分类学意义)[J]. *Acta Phytot Sin*(植物分类学报), 37(3): 228-243
Li SS(李士生), Zhang YL(张玉玲). 1990. Studies on tissue culture of wheat immature inflorescences and the differentiation of calli(小麦幼穗的组织培养及愈伤组织的分化研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), 8(4): 349-354
Li JJ(李晶晶), Yu SF(于世凤), Li TJ(李铁军), et al. 2002. In vitro study of the effects of *Epimedium* on osteoclastic bone resorption in various oral mineralized tissue(淫羊藿对口腔各矿化组织破骨细胞性骨吸收的体外实验研究)[J]. *China J Stomatol*(中国口腔医学杂志), 37(5): 391
Wu LQ(武利勤), Guo SX(郭顺星), Xiao PG(肖培根). 2005. Cell suspension culture and flavonoids production in *Saussurea involucre*(新疆雪莲细胞悬浮系的建立和黄酮类活性成分的产生)[J]. *Chin J Stomatol*(中国口腔医学杂志), 30(13): 965-968
Yamakawa T, Kato S, Ishida K, et al. 1983. Production of anthocyanins by vitis cells in suspension culture[J]. *Agric Biol Chem*, 47(10): 2185-2190
Yang F(杨帆), Zhao J(赵君), Zhang ZW(张之为), et al. 2010. Advances in plant suspension cells(植物悬浮细胞的研究进展)[J]. *Life Sci Res*(生命科学研究), 14(3): 257-262

(上接第 835 页 Continue from page 835)

Shu Z(舒震), Hou DY(侯登勇), Li J(李晶). 2010. Preparation and Identification of Anti-Human B7-H1 Monoclonal Antibody(抗人 B7-H1 单克隆抗体的制备和鉴定)[J]. *Lett Biotech*(生物技术通讯), 21(4): 531-534
Liu SL(刘树玲), Yang XX(杨秀旭), Li H(李浩), et al. 2011. Preparation and characterization of murine monoclonal antibodies against ESAT-6 antigen of mycobacterium tuberculosis(结核分枝杆菌 ESAT-6 抗原鼠单克隆抗体的制备及初步鉴定)[J]. *Lett Biotech*(生物技术通讯), 22(2): 258-260
Hiroyuki T, Noriko F, Yukihiro S, et al. 1999. Formation of mon-

oclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rb1 and its characterization[J]. *Cytotechnology*, 29: 115-120
Robns RJ. 1986. The Measurement of Low-Molecular-Weight, Non-Immunogenic Compounds by Immunoassay [M]//Lnskens HF(eds). *Immunology in Plant Sciences* Berlin: Springer-Verlag: 86-108
Jing Z, Gang L, Baomin W, et al. 2006. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of glycyrrhizic acid[J]. *Anal Bioanal Chem*, 386: 1735-1740