

文章编号: 1000-3142(2000)02-0177-04

产生光活化杀虫剂 α -三连噻吩 发根培养体系的建立

5567.237
5482.39侯学文, 徐汉虹¹, 赵善欢

1 华南农业大学资源环境学院, 广东广州 510642

摘要: 以万寿菊 (*Tagetes erecta* L.) 幼嫩健壮无菌叶片为材料, 与发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) R1601 共培养, 成功地诱导并建立起了万寿菊发根离体培养体系。利用 HPLC C_{18} 反相柱分析万寿菊发根中 α -三连噻吩的含量, 发现其含量在 6.10~7.73 $\mu\text{g/g}$ (fw) 之间; 还研究了万寿菊发根低温种质保存试验, 发现发根可以在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 10 W 而不影响其生活力。

关键词: 万寿菊; α -三连噻吩; 发根培养体系; 植物性杀虫剂

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A

The foundation of *Tagetes erecta* L. hairy root culturing system producing photoactivated pesticide α -terthienyl

HOU Xue-wen, XU Han-hong, ZHAO Shan-huan

(College of Natural Resources and Environment, South-China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this research, the young and healthy leaves of *Tagetes erecta* L. were used to coculture with *Agrobacterium rhizogenes* R1601, and the hairy root culturing system was induced and founded through kanamycin resistance screening. The amount of α -terthienyl between 6.10 and 7.73 $\mu\text{g/g}$ (fw) in hairy root of *Tagetes erecta* L. was analyzed by HPLC C_{18} Reverse-phase column; The possibility of storing hairy root in low temperature was also discussed, mean while, the ability of hairy root was not reduced after 10 weeks storing in 4 $^{\circ}\text{C}$ refrigerator.

Key words: *Tagetes erecta* L.; α -terthienyl; hairy root

化学合成杀虫剂在控制农业害虫、卫生害虫、仓储害虫等方面已发挥着重要作用, 但由于长期使用而带来了抗药性 (Resistance)、害虫再猖獗 (Resurgence)、残留 (Residuc) 问题, 即著名的“3R”问题。为了解决这些问题, 需要高效、低毒、低抗性、低残留的安全农药, 为

收稿日期: 1999-05-25

作者简介: 侯学文, 1969-1, 男, 现为华南农业大学资源环境学院博士后研究人员, 主要从事植物次生代谢产物研究。
基金项目: 广东省自然科学基金 (960429) 和高校博士点基金 (970501) 资助项目

此人们逐渐将目光转向具杀虫活性的天然植物次生代谢物质,即植物性杀虫剂。华南农业大学昆虫毒理研究室在植物性杀虫剂领域作出了卓有成效的贡献,对鱼藤酮^[1]、印楝、川楝^[2]等进行了系统而深入的研究。但植物性杀虫剂的来源常受到地域、季节、土地资源、生态条件、气候等诸多因素的制约,将植物细胞培养技术引入到植物性杀虫剂的生产中来可望解决这一问题。植物细胞培养技术在生产具有重要医疗价值的药物(如长春新碱、紫杉醇^[3])、色素(如紫草宁)、保健品(如红景天、人参皂甙)等进行了许多研究,并取得了一定成功。因植物性杀虫剂产品的品质要求相对较上述产品宽松得多,即大大降低了下游工序成本,因此更具竞争潜力。

万寿菊(*Tagetes erecta* L.)中富含多聚炔类,这类化合物具有广泛的生物活性,如强烈的杀线虫活性,以及对细菌、真菌、杂草、害虫都有杀灭活性,甚至还具有抗HIV的活性;这一类化合物具有光活化特性,即在近紫外光(300~400 nm)光照条件下,其活性被大大提高;同时发生光降解,在阳光下其半衰期约为4 h^[4]。因此这类化合物符合作为安全、高效、低残留农药的基本特征,具有进一步开发应用的价值。 α -三连噻吩(α -terthienyl)主要存在于万寿菊的根部,其它部位仅有微量存在。鉴于上述情况,本研究拟采用发根农杆菌R1601转化万寿菊外植体,诱导建立发根培养体系,这是因为发根不仅生长速度快,次生代谢物含量也较高,遗传性质稳定,从而开辟一个植物性杀虫剂的新来源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 万寿菊(*Tagetes erecta* L.)取自本室杀虫植物标本园。

1.1.2 细菌菌株 发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) R1601是将具广宿主超致病能力的Ti质粒pTiBO 542的片段pTVK 291动员入发根农杆菌R1500而形成的工程菌株,具有宿主范围广,诱导发根能力强的特点^[5]。

1.1.3 试剂 胰蛋白酶和酵母粉为英国Unipath公司产品; α -三连噻吩为Sigma公司产品;羧苄青霉素为上海第三制药厂产品;卡那霉素为广东省利民制药厂产品,其余试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.2 方 法

1.2.1 发根农杆菌的培养 将保藏的发根农杆菌R1601在含卡那霉素100 μ g/mL的LB平板上进行活化培养,培养温度为28 $^{\circ}$ C,挑取单菌落于LB液体培养基中(含100 μ g/mL卡那霉素),于28 $^{\circ}$ C下振荡培养24~28 h,培养物经适当稀释后即可用于转化。

1.2.2 万寿菊的转化及发根的诱导 参照费厚满等^[6]的方法进行。取万寿菊幼嫩健壮叶片,用自来水洗净。此后操作均在无菌环境下进行,叶片用75%酒精表面灭菌30 s,立即转入0.1% HgCl₂中消毒10 min,再用无菌水反复冲洗5次以上,用无菌滤纸吸干,并将其剪至适当大小,置于不含植物生长调节剂的MS培养基上预培养;培养3 d后,挑选无杂菌污染的健壮叶片用于转化,发根农杆菌R1601的培养物用MS培养基稀释50倍,将待转化叶片浸入其中1 min,取出用无菌滤纸吸干,放回原培养基上继续培养2 d,然后转入含500 mg/L羧苄青霉素的MS基本培养基中进行杀菌培养,约1~2 W即可见有发根诱导。每隔一周转接发根于含羧苄青霉素500 mg/L、卡那霉素50 mg/L的杀菌、选择培养基中,直至10代后可杀菌完全。万寿菊的发根培养体系即宣告建立。

1.2.3 万寿菊发根的低温保存试验 将万寿菊发根剪成1 cm左右长短,接入不含任何植物生长调节剂的MS固体培养基中,每瓶约10条,放入1℃冰箱中,每两周取出三瓶置于25℃,光暗比为12:12的正常培养条件下培养,以此来考察其低温保存能力。

1.2.4 万寿菊发根中 α -三连噻吩含量的分析 取培养的发根用自来水洗去残留培养基,用滤纸吸干,称取200 mg鲜样,剪碎后再于匀浆器中匀浆,加入3 mL丙酮于具塞试管中浸提3 d,取浸提液经适当浓缩后,用HP-HPLC C_{18} 反相柱进行分析:柱为ODS hypersil, 5 μ m, 125 \cdot 4 mm,流动相为甲醇:水(80:20),流速为1.5 mL/min,检测波长为350 nm。

2 实验结果

2.1 万寿菊发根培养体系的建立

万寿菊叶片经预培养排除杂菌污染后,3 d即发现有伸长迹象,在创伤切口处有愈伤组织出现,1周以后,逐渐从这些部位生长出发根,待其生长至2 cm长度后,剪下放入杀菌、选择培养基中继续培养。随着时间的推移,万寿菊叶片能诱导出发根的数目逐渐增多,3周后诱导率达到100%;出根数目从几条至十数条不等,诱导出的发根生长活力也有较大差异,有的发根生长迅速,有的发根在继代培养过程中渐趋死亡,挑选长势良好的发根进行继代培养,经10次继代后,一个稳定的发根体系即建立成功。

2.2 万寿菊发根的低温保存试验

在建立万寿菊发根体系过程中,发现万寿菊发根生长迅速,若长时间不进行继代培养,则不仅发根乃至整个培养基均变为黑色,导致培养物的死亡。为了避免将大量时间与材料浪费于以种质保存为目的的继代培养上,特设计了此低温种质保存试验。实验中发现,在4℃条件下,发根并非完全停止生长,只是生长速度极慢,从冰箱中取出时,均发现有新的分枝点出现,在第2、4、6、8、10周时,发根保存的存活率均达到100%。这说明用冰箱保存万寿菊发根是可行的。

2.3 万寿菊发根的 α -三连噻吩的含量分析

先用 α -三连噻吩标准品求出其含量与峰面积的相关性,得二者的线性关系为: $Y = 1.4868 \times 10^{-5} + 2.746 \times 10^{-4}X$, $r = 0.99998$, X 代表峰面积, Y 代表 α -三连噻吩含量(μ g),峰面积与 α -三连噻吩含量高度相关,说明这一分析方法是完全可行的。在同样的分析测试条件下,经 α -三连噻吩标准品以外标法确认,图谱1中保留时间为4.286 min的峰即为万寿菊发根中 α -三连噻吩,经换算培养发根的 α -三连噻吩含量在6.10~7.73 μ g/g.fw之间。

3 讨论

我们可以初步确定所获得的为发根,而非离体根培养物,这主要基于以下2点理由:一是我们采用的是无激素培养基,在这个条件下万寿菊是不可能诱导出根培养物的;二是万寿菊根培养物在无激素的培养基中是不能继代成活的,这两点都经我们的相应实验所证实。

表1 万寿菊发根诱导率与时间的关系

Table 1 The relationship between hairy root inducing rate of *Tugetes erecta* L. and culturing time.

时间(d) Time	7	14	21
外植体总数 (Total No. of explants)	30	30	30
产生发根外植体 (No. of explants induced hairy roots)	3	18	30
诱导率(%) (Inducing rate of hairy roots)	10	60	100

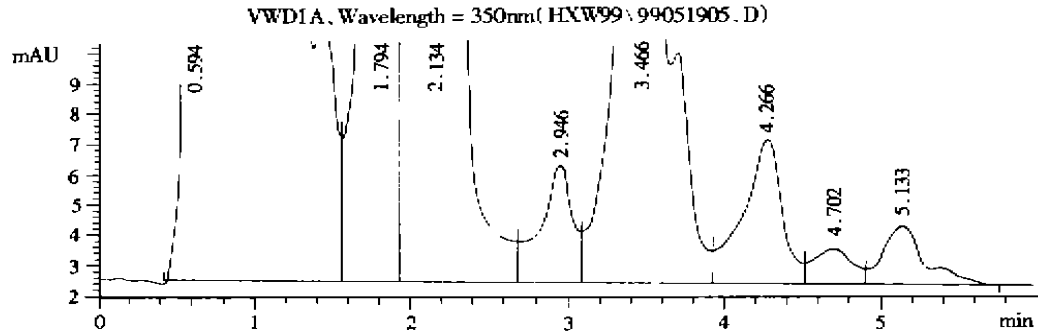


图 1 万寿菊发根内酮抽提物的 HPLC 图谱
Fig. 1 The HPLC elution profile of α -terthienyl extracted by acetone from hairy roots of *Tagetes erecta* L.

Croes^[8]发现,在万寿菊愈伤组织培养过程中,伴随着根的产生, α -三噻吩的含量急剧上升;万寿菊发根的含量分析表明,其 α -三噻吩含量高于万寿菊与孔雀草愈伤组织的含量,说明 α -三噻吩的合成是需要一定的组织结构的。由于发根的生长速度快,再辅以相应的代谢调控手段及培养工艺,万寿菊发根培养体系有可能成为 α -三噻吩的新来源,这方面的研究正在进行中。

参考文献:

- [1] 赵善欢, 黄彰欣. 安全高效的鱼藤杀虫剂 [J]. 植物保护, 1988, 14 (1): 44~45
- [2] 赵善欢, 黄炳球, 胡美英. 几种楝科植物种核油对褐稻虱的拒食作用试验 [J]. 昆虫学报, 1983, 26 (1): 1~9
- [3] Srinivasan V, Pestchanker L, Moser S, et al. Taxol production in bioreactor; kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake, and taxol production by cell suspensions of *Taxus baccata* [J]. *Biotech. & Bioengi.*, 1995, 47: 666~676
- [4] Phytogene B J R, Arnason J T, Berg C W, et al. Synthesis and evaluation of the naturally occurring phototoxin, α -terthienyl, as a control agent for larvae of *Aedes intrudens*, *Aedes atropalpus* (Diptera; Culicidae) and *Simulium verecundum* (Diptera; simuliidae) [J]. *J. Econ. Entomol.*, 1985, 78: 121~126
- [5] Pythoud F, Sinkar V P, Nester E W, et al. Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of pTiBO542: application to genetic engineering of poplar [J]. *Bio/techn.*, 1987, 5: 1 323~1 327
- [6] 费厚满, 梅康凤, 沈 昕等. 发根农杆菌对绞股蓝的转化及毛状根中皂甙的产生 [J]. 植物学报, 1993, 35 (8): 626~631
- [7] 邱德有, 朱 激, 朱至清. 利用桔梗发根生产天花粉蛋白的研究 [J]. 植物学报, 1996, 38 (5): 439~443
- [8] Croes A F, Aarts A M, Bosveld M, et al. Control of thiophene accumulation in calli of two *Tagetes* species [J]. *Physiologia Plantarum*, 1989, 76: 205~210