



# 龙脑樟愈伤组织的诱导及龙脑的产生

陈美兰<sup>1</sup>, 叶正良<sup>2</sup>, 欧阳少林<sup>3</sup>, 林淑芳<sup>1</sup>, 邵爱娟<sup>1</sup>, 黄璐琦<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 天士力集团药物研究院, 天津 300402;  
3. 江西省吉安林科所 天然冰片厂, 江西 吉安 343011)

**[摘要]** 目的:优化龙脑樟愈伤组织的诱导条件。方法:采用植物组织培养方法和气相色谱方法进行。结果:MS 培养基中添加不同浓度配比的激素,愈伤组织的诱导效果不同,愈伤细胞生长状况也不一样,其中在培养基上添加 2,4-D  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  愈伤组织的诱导率最高,细胞生长旺盛。同时,发现采用嫩叶为外植体诱导出的愈伤组织中含有龙脑,而采用茎为外植体诱导出的愈伤组织中不含龙脑。结论:龙脑樟愈伤组织诱导适宜的培养基为 MS + 2,4-D  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,龙脑的生成则以嫩叶为外植体。

**[关键词]** 龙脑樟;愈伤组织诱导;龙脑

龙脑樟是从樟属植物樟 *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl 中发现的一种新的化学类型,其枝叶精油富含天然冰片(天然右旋龙脑),因此是提取天然冰片的理想原料<sup>[1]</sup>,并新增加到 2005 年版《中国药典》中<sup>[2]</sup>。天然龙脑是一种名贵中药材和高级香料,也是重要的化工原料,是国际市场紧俏商品,同时龙脑樟资源稀少,种源奇缺<sup>[3]</sup>。因此,为改变其天然资源枯竭状况,利用细胞培养批量生产天然龙脑是解决这一问题的有效途径之一。本实验对龙脑樟愈伤组织诱导条件进行了优化,同时采用 GC 的方法对愈伤组织中的有效成分龙脑进行了定性分析。

## 1 材料

龙脑樟 2003 年 8 月 22 日采自湖南新晃县天士力龙脑樟基地,并将采来的植株移栽到花盆里,待生长恢复时取植物的嫩叶作为组织培养实验的外植体。

乙酸乙酯,龙脑对照品购于中国药品生物制品检定所(批号 110881-200202)。

Thermo Finnigan TRACE GC 2000 气相色谱仪, Thermo Finnigan TRACE GC-MS 气相色谱之谱联用仪, NIST 谱图库检索

## 2 方法

### 2.1 龙脑樟愈伤组织的诱导

取龙脑樟植物的嫩

枝,清水洗净,再用蒸馏水冲洗,吸干,用 75% 的乙醇浸泡 30 s,取出后用 0.1% HgCl 表面消毒 2 min,然后以无菌水冲洗 4~5 次,分别将嫩枝上的嫩叶剪成 1~2 cm 的小片,将其置于 MS + 蔗糖 3% + 水解酪蛋白 0.5% + 3% PVP 培养基上,并加上不同配比的激素(121 °C, 30 min 灭菌)进行培养,在 25 °C 暗培养条件下进行培养,培养 30 d 进行观察,并记录愈伤组织的形成及生长状况。

$$\text{愈伤组织诱导率} = \frac{\text{愈伤组织块数}}{\text{接种外植体数}} \times 100\%$$

### 2.2 龙脑樟愈伤组织中龙脑的定性分析

色谱条件:色谱柱为 SE-54 毛细管色谱柱(0.32 mm × 25 m, 25 μm),柱温采用程序升温 80~220 °C, 3 °C · min<sup>-1</sup>,进样口的温度和检测器的温度都为 240 °C,柱压为 109,检测器为 FID,载气为 N<sub>2</sub>,流量为 1 mL · min<sup>-1</sup>。

供试品溶液的制备:取培养的愈伤组织 30 g,采用组织捣碎机将愈伤组织捣碎,加入蒸馏水 2 000 mL,放置 1 h,在挥发油提取器中加入 2 mL 的乙酸乙酯,采用挥发油提取器提取 30 min,取乙酸乙酯层,加入无水硫酸钠适量干燥,精密吸取乙酸乙酯溶液 0.2 mL 进样。

## 3 结果

### 3.1 龙脑樟愈伤组织的诱导

通过实验发现不同激素配比的培养基对于龙脑樟叶愈伤组织的诱导率以及愈伤细胞的生长状况有很大的影响,见表 1。

### 3.2 愈伤组织中龙脑的定性分析结果

采用龙脑樟叶诱导出的愈伤组织,经过 GC 分析发现样品在

**[收稿日期]** 2009-07-27

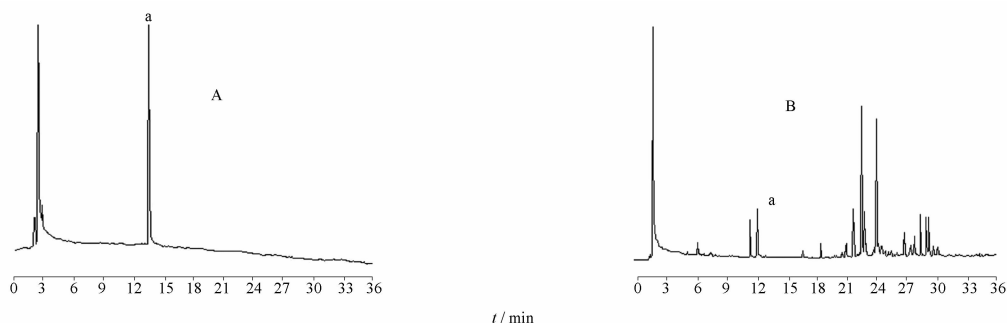
**[基金项目]** 国家自然科学基金青年科学基金项目(30901963);中国中医科学院院自选课题(Z9)

**[通信作者]** \*黄璐琦, Tel: (010) 64014411-2955, E-mail: huangluqi@263.net

表 1 不同激素对比对龙脑樟愈伤组织诱导的影响

激素配比	诱导率/%	生长状况
2,4-D 4 mg · L <sup>-1</sup> + 6-BA 0.2 mg · L <sup>-1</sup>	96.03	细胞生长旺盛
2,4-D 4 mg · L <sup>-1</sup> + 6-BA 0.4 mg · L <sup>-1</sup>	68.36	细胞生长较差,少量细胞出现了的褐化
2,4-D 4 mg · L <sup>-1</sup> + 6-BA 1 mg · L <sup>-1</sup>	65.94	细胞生长较差,少量细胞出现了的褐化
2,4-D 2 mg · L <sup>-1</sup> + 6-BA 0.2 mg · L <sup>-1</sup>	82.16	细胞生长较好
2,4-D 8 mg · L <sup>-1</sup> + 6-BA 0.2 mg · L <sup>-1</sup>	40.02	细胞生长差,大量细胞出现了的褐化

龙脑对照品的位置上出现相应的色谱峰,见图 1。采用 GC-MS 对其进一步鉴定,确定为龙脑,见表 2。



A. 龙脑对照品; B. 愈伤组织样品; a. 龙脑。

图 1 龙脑对照品和愈伤组织样品的 GC 图谱

表 2 愈伤组织的挥发油 GC-MS 分析

No.	t <sub>R</sub> /min	化合物	相对质量分数/%
1	3.36	α-pinene α-蒎烯	1.46
2	3.58	camphene 菝稀	0.44
3	3.92	2(10)-pinene 2(10)-蒎烯	1.69
4	4.63	limonene 1,8-蒎二烯	0.22
5	4.72	cineole 桉树脑	0.24
6	5.93	nonanal 壬醛	0.19
7	7.07	camphor(1R,4R)-[+]-樟脑	1.28
8	7.63	borneol 龙脑	1.87
9	8.14	p-menth-1-en-8-OH 对-孟-1-烯-8-醇	0.13
10	8.32	decanal 癸醛	0.15
11	10.20	[E]-cinnamaldehyde (E)-肉桂醛	0.88
12	10.69	benzene,4-allyl-1,2-[menthenedioxy] 苯,4-烯丙基-1,2-[薄荷稀二氧]	0.43
13	11.88	p-mentha-1,4[8]-diene 对-1,4(8)-薄荷二稀	0.18
14	11.98	p-menth-3-ene 2-isopropenyl-1-vinyl-(1S,2R)-(-)-对-孟-3-烯-2-异丙稀基-1-乙烯基	2.98
15	13.00	ylangene 依兰稀	0.26
16	13.19	α-cubebene α-荜澄茄稀	0.18
17	13.55	cyclohexane,2,4-diisopropenyl-1-methyl-1-vinyl-[1S,2R,4R]-(+)-环己烷,2,4-二异丙稀基-1-甲基-乙烯基	1.41
18	13.75	benzene,4-allyl-1,2-dimethoxy 苯,4-烯丙基-1,2-二甲氧基	0.53
19	14.07	dodecanal 十二烷醛	1.23
20	14.49	caryophyllene 石竹烯	6.79
21	14.72	t-elemene t-榄香烯	1.14
22	15.07	aristolene 马兜铃烯	19.02
23	15.33	farnesene 金合欢稀	3.81
24	16.27	t-cadinene t-松杜烯	11.82
25	16.50	guaia-1(5)11-diene 1(5)11-愈创木二烯	1.35
26	16.88	gadina-1(10)4-diene 1(10)4-愈创木二烯	1
27	17.30	gadina-3,9-diene 3,9-愈创木二烯	1.18
28	19.37	isoledehe 异喇叭烯	1.87
29	19.98	tetradecanal 十四烷	2



#### 4 讨论

本实验结果表明培养基中添加不同浓度配比的激素,愈伤组织的诱导效果不同,愈伤细胞生长状况也不一样,其中在培养基上添加 $2,4\text{-D } 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 6\text{-BA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 愈伤组织的诱导率最高,细胞生长旺盛。

龙脑樟愈伤组织在继代培养过程中易产生褐化现象而使细胞死亡。目前减少组织褐化的措施主要有减少继代培养基中无机盐的浓度,继代培养基中添加抗褐化物质如 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP(聚乙烯吡咯酮)及 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、水解酪蛋白等物质,缩短继代的时间,改变培养基激素的浓度等<sup>[4-6]</sup>。本实验通过摸索发现在愈伤组织的继代过程中将MS基本培养基改为1/2MS基本培养基,并在培养基中分别添加了水解酪蛋白和PVPP等物质,同时每隔15 d继代1次,经过1年时间的继代培养,基本上能解决愈伤组织的褐化问题。

本实验对愈伤组织的挥发性物质进行了GC分析,发现龙脑樟愈伤组织具有产生龙脑的能力,因为任何植物的离体细胞在人工培养下,都具有它们

“母体”植物的那种合成药用成分的能力——培养细胞的药物生物合成的全能性<sup>[7]</sup>。但是随着继代时间的延长,其产生龙脑的能力下降,因此在今后的继代培养过程中需要优化培养基的条件来提高愈伤组织中龙脑的含量。

本实验同时对采用茎为外植体诱导出的愈伤组织进行GC分析,发现其不含有龙脑,表明采用不同器官为外植体诱导的愈伤组织合成次生代谢产物的能力不同,建议今后如果以产生龙脑为目的的愈伤组织诱导宜以龙脑樟的嫩叶为外植体。

#### [参考文献]

- [1] 龙光远,彭招兰,郭德选,等. 龙脑樟矮林基地施肥试验研究[J]. 江西林业科技, 2000,1:14.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2005:40
- [3] 龙光远,彭招兰,郭德选,等. 龙脑樟矮林作业技术和效益分析[J]. 林业科技开发, 2000,14(6):30.
- [4] 张明文,陈力耕. 银杏组织培养中控制褐化的研究[J]. 中国南方果树, 2003,32(3):51.
- [5] 刘兰英. “薄壳香”核桃组培中的褐化及防止[J]. 园艺学报, 2002, 29(2):171.
- [6] 王关林,方宏筠,胡风庆,等. 东北矮紫杉组织、细胞培养及其紫杉醇生成的研究[J]. 中国农业科学, 2001,34(4):373.
- [7] 徐中东. 植物组织培养生产药物研究进展[J]. 生物学杂志, 2001,18(6):13.

## Callus induction of *Cinnamomum camphora* and formation of borneol

CHEN Meilan<sup>1</sup>, YE Zhengliang<sup>2</sup>, OUYANG Shaolin<sup>3</sup>, LIN Shufang<sup>1</sup>, SHAO Aijuan<sup>1</sup>, HUANG Luqi<sup>1\*</sup>

(1. Institut of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Pharmaceutical Analysis, Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China;

3. Natural Borneol Company, Jian Institute of Forestry Sciences, Ji'an 343011, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the condition of callus of *Cinnamomum camphora* induced. **Method:** GC and plant tissue culture method were applied in the study. **Result:** The effect of callus induced and the growth of callus were different in MS medium with different proportion of hormone. The ration of callus induced was the highest and the growth of callus was the most prosperous in the MS medium with  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D}$  and  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ . It is found that callus induced by young leaf contained borneol, but callus induced by young stem not. **Conclusion:** The optimization of callus of *C. camphora* induced is using the MS medium with  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ . Callus induced by young leaf can generate borneol.

[Key words] *Cinnamomum camphora*; callus induction; borneol

doi: 10.4268/cjcmm20100503

[责任编辑 吕冬梅]