

长春花愈伤组织的诱变和长春质的增产

金屹 陶文沂

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡, 214036)

摘要 在长春花愈伤组织培养中获|白色细胞株系,对影响其生长及长春质产量的培养条件加以优化。以白色株系为原株进行紫外诱变,筛选得抗色氨酸乙酯盐酸盐突变株,其中|株长春质产量增加2.7倍。

关键词 长春花; 细胞培养; 诱变; 长春质

中图分类号 Q946.88

0 前言

长春花(*Catharanthus roseus*(L.) G. Don)中含有多种具生理活性的吲哚生物碱,其中长春质是一种重要的成分,它在二聚生物碱的生物合成途径中是一种重要前体,长春质产量的提高有助于二聚生物碱的产生和增加。长春质本身可作为药物,具有降血糖作用,国外民间用来治疗糖尿病,此外它还具有一定的抗菌作用及止血作用^[1]。由于它在植株中含量很低,加之直接从植物中提取纯化较复杂繁琐,许多研究人员便尝试采用细胞培养的方法进行生产。实验表明,长春质在长春花的分化及未分化细胞培养物中都存在^[2~5]。

诱变育种在工业微生物菌种选育中使用广泛。无性繁殖植物的诱变育种在改良作物性状工作中是一种有效手段,应用物理诱变也已获得多种观赏植物的花颜色突变体。作者在获得一细胞株系后,通过诱变的方法使长春质产量有所提高。

1 材料与方法

1.1 培养条件

使用MS培养基,添加1%琼脂、1.0mg/L的2,4-D(或萘乙酸)和0.1mg/L的激动素,26℃暗培养,每隔3周继代一次。

1.2 提取方法

将细胞培养物于-20℃速冻3~4h。再加入4mL pH2,浓度0.1mol/L的甘氨酸-盐酸缓冲液并冷冻研磨,抽滤。上清液用10mol/L的NaOH调pH至10,用乙酸乙酯萃取,有机相减压蒸干,加入少量甲醇溶解。

1.3 生物碱定量分析

采用 HPLC 法进行分析, 色谱条件: C_8 柱, 流动相组成比为甲醇·水·三乙胺= 750·450··
0.5, 检测波长为284nm, 流量1.0ml/min.

2 实验与结果

2.1 细胞株系的选择

株系的选择对细胞的生长及次生代谢产物的产生有很大的影响。植物细胞在人工培养状况下有一定的不稳定性, 在培养过程中会自发产生具有不同性状的株系。在愈伤组织的继代培养中, 得到不同颜色的组织块, 将它们分开接种, 继代培养, 3星期后比较其生长及产碱情况, 结果见表1.

由表可见, 白色细胞株系的生长速率最快。从长春质的生产来看, 白色株系和黑色株系相差不多, 而黄色株系的产量最低。

对不同株系的细胞生长过程的研究表明(见图1), 白色和黑色细胞株系的生长与大部分植物细胞的生长曲线相似, 有较为明显的指数期, 而黄色细胞生长极差, 原因可能是细胞较衰老, 生长能力下降。

表1 不同细胞株系的生长比较

细胞株系	平均相对生长速率	标准差 S	长春质 ($\mu\text{g/g}$)
白色	0.0808	0.00159	0.82
黑色	0.0407	0.00264	0.84
黄色	0.0160	0.00156	0.37

注: 相对生长速率= $(\ln(W/W_0))/T$, 其中 T 培养天数,
 W 细胞收获量(g), W_0 细胞接种量(g), 以下表同。

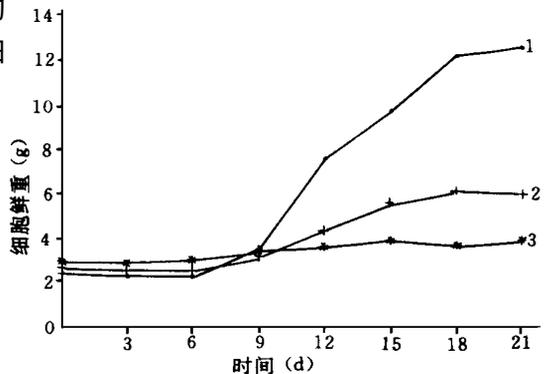


图1 不同株系细胞的生长

1 白色 2 黑色 3 黄色

2.2 影响细胞生长的主要因素

在培养基的各组份中, 对细胞生长和产碱最有影响的因素之一是植物激素。在长春花细胞培养中, 常用激素有2,4-D, 激动素(KT), 萘乙酸(NAA), 苄基腺嘌呤(6-BA)。对它们进行实验, 结果见表2和图2.

表2 不同浓度激素对细胞生长的影响

添加的激素	添加激素浓度	相对生长速率	添加的激素	添加激素浓度	相对生长速率
KT+ 2,4-D	0.1mg/L+ 1.0mg/L	0.081	BA	1.0mg/L	0.040
KT+ NAA	0.1mg/L+ 0.5mg/L	0.040	BA	2.0mg/L	0.049
KT+ NAA	0.5mg/L+ 0.5mg/L	0.038	BA+ NAA	0.5mg/L+ 0.5mg/L	0.033
KT+ NAA	1.0mg/L+ 0.5mg/L	0.042	BA+ NAA	1.0mg/L+ 0.5mg/L	0.039
KT+ NAA	0.1mg/L+ 1.0mg/L	0.041	BA+ NAA	2.0mg/L+ 0.5mg/L	0.049
KT+ NAA	0.5mg/L+ 1.0mg/L	0.074	BA+ NAA	0.5mg/L+ 1.0mg/L	0.041
KT+ NAA	1.0mg/L+ 1.0mg/L	0.053	BA+ NAA	1.0mg/L+ 1.0mg/L	0.027
KT+ NAA	0.1mg/L+ 2.0mg/L	0.047	BA+ NAA	2.0mg/L+ 1.0mg/L	0.048
KT+ NAA	0.5mg/L+ 2.0mg/L	0.071	BA+ NAA	0.5mg/L+ 2.0mg/L	0.051
KT+ NAA	1.0mg/L+ 2.0mg/L	0.055	BA+ NAA	1.0mg/L+ 2.0mg/L	0.049
BA	0.5mg/L	0.037	BA+ NAA	2.0mg/L+ 2.0mg/L	0.042

快。用相同浓度的 NAA 代替 2, 4-D 加入培养基, 可使长春质产量从 0.26 mg/L 增至 0.82mg/L, 有明显的提高, 但是相对生长速率有所降低, 因而在生长阶段采用加 2, 4-D 的培养基, 在产碱时采用加入 NAA 的培养基, 以利于次级代谢物的生产。

2.3 诱变

通过细胞株系筛选和改变培养条件, 长春质产量增加有限。为了进一步提高长春质的产量, 尝试采用诱变的方法。

2.3.1 半致死量的确定 用不同剂量的紫外线照射, 实验结果见图3。当照射时间达 60s 时, 细胞完全不能生长。通常用半致死量物理因素来诱变植物细胞, 使之产生突变体, 因而采用 40s 紫外线照射为诱变剂量。

2.3.2 选择压的确定 长春质和文朵灵合成的前体主要有色氨酸和甲瓦龙酸, 对于色氨酸结构类似物的研究较多, 使用方便。试验了 4 种色氨酸结构类似物对细胞生长的影响, 结果见表 3。

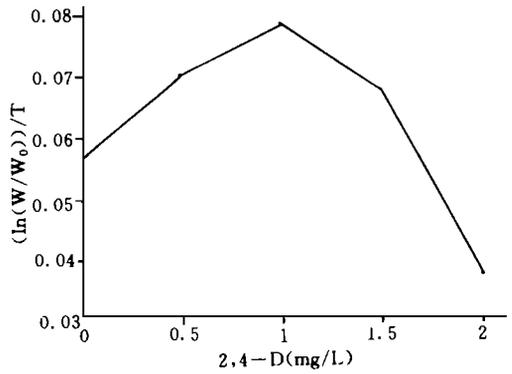


图2 不同浓度 2,4-D 对细胞生长的影响

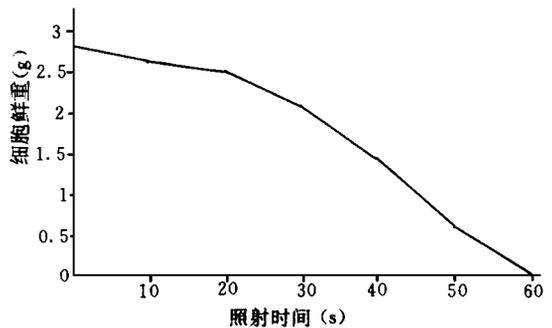


图3 UV 照射剂量对细胞生长的影响

表3 不同浓度结构类似物对细胞生长的影响

结构类似物	浓度 (mmol/L)	相对生长速率	结构类似物	浓度 (mmol/L)	相对生长速率
色氨酸 氨酸盐	0.1	0.080	盐酸色氨酸 乙酯盐	0.1	0.076
	0.5	0.057		0.5	0.046
	0.8	0.034		0.8	0.040
	1.0	0.038		1.0	0.021
	2.0	0.004		2.0	0.010
	4.0	0.003		4.0	0.004
	5.0	0.005		5.0	0.002
	8.0	0.002		8.0	0.003
酪氨酸 氨酸盐	0.1	0.077	盐酸苯丙氨酸 乙酯盐	0.1	0.076
	0.5	0.055		0.5	0.066
	0.8	0.051		0.8	0.028
	1.0	0.024		1.0	0.035
	2.0	0.003		2.0	0.042
	4.0	0.003		4.0	0.002
	5.0	0.006		5.0	0.002
	8.0	0.003		8.0	0.003

由表可见, 色氨酸氨酸盐和酪氨酸氨酸盐对细胞生长的抑制作用较为明显, 但由于条件的限制, 故选择盐酸色氨酸乙酯盐 (TEH) 作为选择压, 效果也很好。

2.3.3 诱变结果 以半致死量作为诱变剂量进行紫外诱变后, 细胞在含选择压的培养基上继代 3 次, 挑出 123 株, 转移到普通培养基上继代 3 次, 对长春质生产能力进行统计, 结果见

图4.

与出发株比较, 总体上突变株的长春质生产能力有所提高, 其中一支产量从 $0.82\mu\text{g/g}$ 提高到 $3.06\mu\text{g/g}$, 提高了2.7倍。同时测定文朵灵和长春新碱的含量, 但结果显示突变株中仍不存在此两种物质。作为长春新碱前体之一的长春质产量的提高对长春新碱的形成有促进作用, 但是由于另一前体文朵灵的缺乏而导致长春新碱不能形成。

2.3.4 突变株和原株的生长及产碱特性 对突变株和原株在不同浓度 TEH 下的生长情况进行实验, 结果见图5。由图可见, 当 TEH 浓度高于 4mmol/L 时, 原株基本不能生长; 而突变株生长正常, 甚至当 TEH 在一定浓度范围内存在时, 其生长比无 TEH 时还要好。

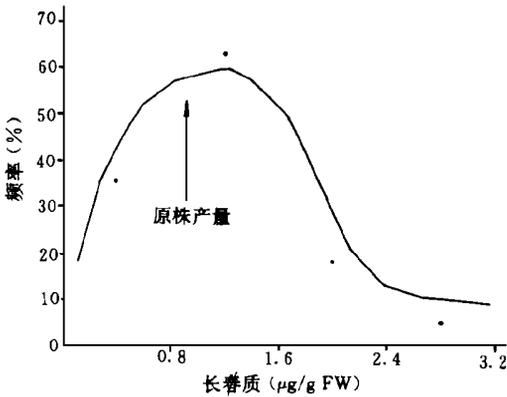


图4 不同突变体产长春质情况

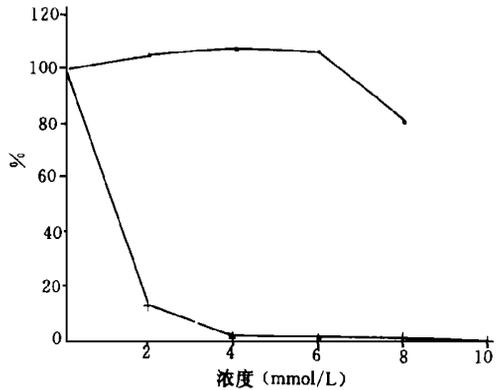


图5 突变体和原株对结构类似物的反应

—●— 突变株 —+— 原株

对突变株和原株的生长和产碱情况进行实验, 结果见图6和图7。与原株相比, 突变株的长春质生产能力确有增加。

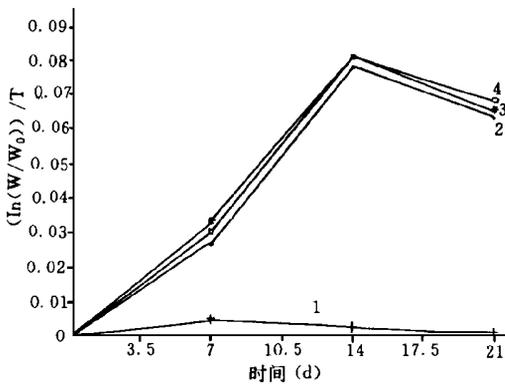


图6 突变体和原株的生长情况

1 原株, 0mmol/L TEH 2 原株, 4mmol/L TEH
3 突变体, 0mmol/L TEH 4 突变体, 4mmol/L TEH

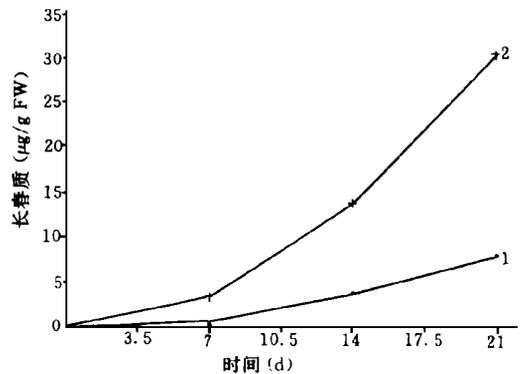


图7 突变体和原株生产长春质的对比

1 原株 2 突变体

3 讨 论

提高长春质的产量有多种方法,如改变培养基配方,添加诱发剂,添加前体,改变渗透压及进行细胞株筛选等。据本文中实验结果,诱变也能使长春质产量提高,从愈伤组织的生长来看,诱变并未引起培养物和培养基的褐变反应,这与真菌诱发剂对愈伤组织的作用有所不同,因而也不存在褐变反应和生物碱积累的关系。和原株相比,突变株积累长春质的时间有所提前,在整个培养周期中长春质的积累也是逐步增加的。

参 考 文 献

- 1 中草药有效成分研究. 一分册. 1972. 392
- 2 Hirata K, Yamanaka A, Kurano N, et al. Production of indole alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, 51: 1311 ~ 1317
- 3 Parr A J, Peerless A C J, Hamill J D, et al. Alkaloids production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.*, 1988, 7: 309 ~ 312
- 4 Kohl W, Wille B, Hoefle G. Alkaloids aus *Catharanthus roseus*-zellkulturen II. *Z. Naturforsch.*, 1981, 36b: 1153 ~ 1162
- 5 Drapeau D, Blanch H W, Wilke C R. Ajmalicine, serpentine and catharanthine accumulation in *Catharanthus roseus* bioreactoe cultures. *Planta Medica*, 1987, 53: 373 ~ 376

Enhancement of Catharanthine Productivity by *Catharanthus roseus* Callus after UV mutation

Jin Yi Tao Wenyi

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract A white cell line of *Catharanthus roseus* has been selected from a long-established cell line. The effects of culture conditions on the growth and catharanthine accumulation were studied and optimized. After the treatment of UV radiation, a cell line, which produced about 2.7 times catharanthine more than the original white cell line did, was selected from tryptophan-ester hydrochloride resistant mutants.

Key-words *catharanthus roseus* (L.) G. Don; cell culture; mutation; catharanthine

(责任编辑:秦和平)