

不同培养方法对长春花愈伤组织生长及吲哚生物碱积累的影响

张荣涛¹, 曹 宇¹, 顾锋旗², 张秀省²

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 聊城大学农学院, 聊城 252000)

摘 要: 分别对4种不同愈伤组织采用固体培养和悬浮培养, 并对其生长鲜重和吲哚生物总碱的含量进行了分析测定, 实验结果表明, EMS诱变的长春花愈伤组织生长和吲哚生物总碱积累 适于固体培养, 而 对于秋水仙碱诱变的四倍体长春花愈伤组织、叶愈伤组织和子房愈伤组织 更适于悬浮培养, 但前者优势表现更为突出。

关键词: 长春花; 愈伤组织; 固体培养; 悬浮培养

中图分类号: S685. 99 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001— 0009(2005)01— 0065— 02

长春花(*catharanthus roseus*)是夹竹桃科长春花属植物, 不仅是一种备受人们喜爱的观赏花卉, 也是一种人们熟悉的中草药材。中医临床可全株入药, 有利尿止血、镇定安神、平肝降压等功效^[1]。20世纪50年代以来, 人们发现长春花的次生代谢产物对急性白血病、恶性淋巴瘤等具有很好的疗效^[2], 从而对其产生了浓厚的兴趣。迄今为止, 已经从长春花植物体中发现了多种具有生物活性的药用成分。它们大都是吲哚型生物碱。比如, 结构为双吲哚型生物碱的长春碱(vinblastine)和长春新碱(vincristine)是目前临床上广泛应用的能治疗多种肿瘤病的有效成分。而结构为单吲哚型生物碱的长春质碱具有抗菌利尿等治疗效果, 阿玛碱具有医治心血管病及高血压等疗效^[3]。目前, 这些药物均从长春花植物体中获得; 这类药用成分的化学结构均为吲哚类, 它们在植物体内含量很低, 仅为十万分之一~百万分之一^[4]。因而利用细胞培养方法替代从长春花植物体中提取药用成分的研究, 是多年来倍受关注的重要研究课题之一, 并被认为是很有希望的理想替代途径。本文以固体培养和悬浮培养的方法分别对不同愈伤组织细胞进行培养, 以期以后工业化生产长春花吲哚生物碱类药用有效成分提供理论依据和重要参数。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 不同长春花愈伤组织的诱导 取长春花鲜嫩的幼叶, 当日开花后的子房, 分别诱导出两种普通愈伤组织。将生长旺盛的16 d(天)长春花叶愈伤组织分别放入0.3% EMS(甲

基磺酸乙酯)溶液、0.5%秋水仙碱溶液中, 悬浮培养后获得两种诱变愈伤组织。

1.1.2 培养条件 长春花诱导培养基: MS+KT1.5 mg/L+NAA1.0 mg/L(毫克/升)+IAA1.0 mg/L(毫克/升), 3%蔗糖, 0.7%琼脂 pH 6.5。长春花愈伤组织生长固体培养基: MS+KT 1.0 mg/L(毫克/升)+NAA 2.0 mg/L(毫克/升), 3%蔗糖, 0.7%琼脂, pH6.4。光照强度1 000 Lx~1 500 Lx(勒克斯), 光照时间12 h/d(小时/天)。培养温度为26℃~28℃。长春花愈伤组织生长液体培养基: MS+KT 1 mg/L(毫克/升)+NAA2 mg/L(毫克/升), pH 6.2, 暗培养。液体培养摇床转速为80 r/min(分), 培养温度25℃~26℃。

1.2 实验方法

1.2.1 测定吲哚总碱 吲哚总碱的提取及含量测定: 按王宁宁的方法^[5]。数据均为3次平行重复所得。

1.2.2 培养方法 固体培养法和悬浮培养法^[6,7]。

2 结果和分析

2.1 不同愈伤组织细胞生长动态分析

表1 各代不同愈伤组织固体培养生长鲜重

	100/gFW.瓶 ⁻¹	150/gFW.瓶 ⁻¹	200/gFW.瓶 ⁻¹	250/gFW.瓶 ⁻¹	300/gFW.瓶 ⁻¹	350/gFW.瓶 ⁻¹
N6	3.62	5.13	6.67	7.92	7.51	7.67
E6	4.55	5.93	10.34	10.07	9.82	9.77
C6	3.06	5.54	6.93	8.83	9.12	8.96
O6	3.10	4.43	5.87	7.12	6.78	6.7
N7	3.80	5.15	6.64	8.13	7.70	7.62
E7	4.60	6.10	11.9	10.5	9.80	9.55
C7	3.45	5.62	6.99	9.1	9.36	9.22
O7	3.25	4.60	6.17	7.32	6.94	6.26
N8	3.92	5.95	6.76	8.23	7.87	7.55
E8	4.59	6.20	11.7	10.82	10.40	9.85
C8	3.34	5.52	6.88	8.74	9.20	9.05
O8	3.47	5.16	6.38	7.55	7.37	6.32

注: N—叶愈伤组织; E—EMS诱变愈伤组织; C—秋水仙碱诱变愈伤组织; O—子房愈伤组织。6、7、8—继龄, 以下相同。

2.1.1 各代不同愈伤组织固体培养生长动态变化 挑选第16 d(天)生长旺盛的不同长春花愈伤组织细胞转接到固体生长培养基中继代培养。分别选取第6、7、8代固体培养(初始接种量约0.5 g(克))和液体培养(初始接种量约1.2 g(克))



第一作者简介: 张荣涛, 1978年生, 硕士学位, 2004年7月毕业于南开大学生命科学学院, 专业为植物生理生化。读研期间主要从事于长春花、紫锥菊等药用植物细胞的培养及其生物碱、多糖等药用成份的鉴定、分析工作, 已在核心期刊上发表论文3篇。目前授聘于承德师专。

收稿日期: 2004—10—09

并进行生长鲜重的测定。固体培养每 5 d(天)称重一次, 液体培养每 4 d(天)称重一次, 液体细胞在称重前要真空抽滤至无液体为止(约 10 min)。结果如表 1、2 所示。

从表 1 中可以看出, 固体培养各愈伤组织生物量达到最高时的时间不一样, N 愈伤组织 6、7、8 三代生长, 大约在 25 d(天)时生物量达到最高, 约为每瓶 8.15 g(克)(FW); 而 E 愈伤组织其连续三代生长大约在 20 d(天)时达到最高生物产量, 约为每瓶 11.5 g(克)(FW); 对于 C 愈伤组织大约是在 30 d(天)时鲜重达最大, 约为每瓶 9.12 g(克)(FW); 子房愈伤组织, 大约在 25 d(天)时, 鲜重达最高值每瓶 7.4 g(克)(FW)。比较各种愈伤组织生物鲜重, 可以看出 E 愈伤组织不仅生长快而且生长周期也短。

2.1.2 各代不同愈伤组织悬浮培养生长动态变化 对照表 1 和表 2 的结果, 可以看出悬浮培养细胞生长鲜重明显高。对于 N 愈伤细胞, 悬浮培养在 20 d(天)时就达最大生物量, 高出固体培养约每瓶 3 g(克)(FW), 比同代固体培养提前了约 5 d(天)。对于 C 愈伤细胞, 其生长鲜重变化尤为明显, 约在 24 d(天)时达最高生物量每瓶 33.8 g(克)(FW), 此结果到目前为止还未曾有人报道过。而对于 E 愈伤细胞悬浮培养表现则不如固体培养, 最高鲜重几乎没有提高。子房愈伤细胞悬浮培养与 N 类似, 最高鲜重高出约每瓶 2.5 g(克)(FW), 到达最高时间也提前了约 5 d(天)。

以上结果表明, C 愈伤细胞更适于悬浮培养, N 和 O 愈伤组织悬浮培养亦有一定优势, 但 E 愈伤组织却更适于固体培养生长。

表 2 各代不同愈伤组织悬浮培养生长鲜重

	8D/gFW.瓶 ⁻¹	12D/gFW.瓶 ⁻¹	16D/gFW.瓶 ⁻¹	20D/gFW.瓶 ⁻¹	24D/gFW.瓶 ⁻¹	28D/gFW.瓶 ⁻¹
N6	3.66	5.60	10.67	11.23	10.20	8.90
E6	3.80	6.20	11.65	12.84	12.44	12.2
C6	7.33	12.26	18.29	30.53	33.26	31.82
O6	3.47	4.90	9.33	10.70	9.44	8.50
N7	4.26	6.67	11.63	12.29	11.22	9.92
E7	4.84	6.37	12.61	13.86	12.40	12.20
C7	7.73	12.64	20.25	31.54	33.86	30.52
O7	3.57	5.02	9.53	11.73	9.94	8.81
N8	4.26	6.64	11.67	12.23	11.25	9.97
E8	4.83	6.34	12.67	13.89	12.40	12.23
C8	7.73	12.67	20.29	31.54	33.83	30.55
O8	3.57	5.09	9.53	11.77	9.94	8.83

表 3 不同愈伤组织固体培养其吲哚生物总碱的含量

	10D/mg.g ⁻¹	15D/mg.g ⁻¹	20D/mg.g ⁻¹	25D/mg.g ⁻¹	30D/mg.g ⁻¹	35D/mg.g ⁻¹
N6	0.932	0.824	1.022	1.313	1.363	1.324
E6	1.183	1.431	1.445	1.38	1.807	2.113
C6	0.925	0.184	0.840	1.396	1.363	1.314
O6	1.106	1.447	1.652	1.620	1.255	0.938
N7	0.944	0.852	1.030	1.364	1.396	1.344
E7	1.172	1.444	1.460	1.370	1.906	1.977
C7	0.938	0.904	0.872	1.466	1.420	1.391
O7	1.122	1.452	1.682	1.672	1.314	1.054
N8	0.918	0.804	0.898	1.268	1.284	1.243
E8	1.106	1.384	1.398	1.307	1.824	1.774
C8	0.914	0.905	1.126	1.508	1.466	1.423
O8	1.124	1.452	1.682	1.672	1.330	1.072

2.2 不同长春花愈伤组织固体培养其吲哚生物碱含量分析
按王宁宁方法^[1]分别对固体培养和悬浮培养的各代不同长春花愈伤组织细胞提取吲哚生物总碱, 并称重。结果见表 3、表 4 所示。

比较表 3 中固体培养的不同愈伤组织各代吲哚生物总碱的积累特点, 不难发现不同愈伤组织在不同的生长时期其吲哚生物总碱的含量是不一样的: N 愈伤组织大约 30 d(天)时吲哚总碱积累达最高[约 1.31 mg/g(毫克/克)(FW)]; E 愈伤组织其吲哚总碱单位含量约在 35 d(天)达最高[约 1.8 mg/g(毫克/克)(FW)]; 而对于 C 愈伤组织约在 25 d(天)时其吲哚总碱的单位含量达最高约 1.46 mg/g(毫克/克)(FW); O 愈伤组织其吲哚生物总碱积累达最高时为 20 d(天), 其单位含量约为 1.63 mg/g(毫克/克)(FW)。显然在以上各愈伤组织中, E 愈伤组织吲哚总碱积累含量最高, 而 O 愈伤组织吲哚总碱含量到达最高点的时间最短。

对照表 3 中结果, 从表 4 中可以看出, 悬浮培养长春花愈伤细胞吲哚生物总碱单位含量普遍低于固体培养的含量。但就到达吲哚生物总碱积累最高的时间而言, 悬浮培养普遍有所提前, N 愈伤组织提前了约 6 d(天), C 愈伤组织提前了约 1 d(天), E 愈伤组织约 6 d(天), O 愈伤组织没有变化。

表 4 不同长春花愈伤组织悬浮培养其吲哚生物总碱含量

	8D/mg.g ⁻¹	12D/mg.g ⁻¹	16D/mg.g ⁻¹	20D/mg.g ⁻¹	24D/mg.g ⁻¹	28D/mg.g ⁻¹
N6	0.760	0.821	0.923	1.054	1.162	1.103
E6	1.090	1.114	1.127	1.446	1.570	1.094
C6	0.774	0.872	0.86	0.72	0.92	1.176
O6	0.743	0.931	1.276	1.283	0.67	0.554
N7	0.661	0.742	0.830	0.950	1.204	0.975
E7	1.126	1.163	1.230	1.430	1.653	1.142
C7	0.793	0.807	0.835	0.746	0.972	1.176
O7	0.758	0.941	1.330	1.450	0.771	0.620
N8	0.643	0.773	0.807	0.876	1.037	0.940
E8	1.091	1.114	1.120	1.446	1.573	1.093
C8	0.773	0.872	0.867	0.727	0.926	1.176
O8	0.755	0.906	1.206	1.344	0.747	0.580

3 小结

实验结果表明, EMS 诱变的长春花愈伤组织生长和吲哚生物碱的积累适于固体培养, 其悬浮培养生长与之相比变化不大, 但吲哚生物总碱却明显下降。而秋水仙碱诱变的长春花愈伤组织生长明显适于悬浮培养, 其鲜重大约为同代固体培养对照的 3 倍。并且其吲哚生物总碱在积累后期亦有所增加。对于普通叶愈伤组织细胞和子房愈伤组织细胞, 其生长和吲哚生物总碱积累悬浮培养具有一定优势。

参考文献:

[1] 张向飞, 张荣涛, 王宁宁等. 真菌诱导子对长春花愈伤组织中吲哚生物碱积累的影响[J]. 中草药, 2004, 2: 201~204.
[2] 曹阳, 侯军等. 长春花细胞大型生物反应器培养的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(2): 87~90.