

不同因子对长春花突变愈伤组织生长和吲哚总碱积累的影响

聂莉莉¹, 朱晔荣¹, 李建华¹, 张秀省², 王 勇¹

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

摘 要: 研究光照、pH、碳源及初始糖浓度、生长素和色氨酸等因子对长春花突变愈伤组织生长和吲哚总碱积累的影响。结果表明: 对长春花突变愈伤组织生长和吲哚总碱积累有促进作用的因子是光培养、蔗糖、NAA、IAA 和色氨酸, 有抑制作用的是 2,4-D, pH 值的改变对吲哚总碱的积累没有显著影响; 2 mg/L 的 NAA 可使突变愈伤组织的生物产量最高, 1 mg/L NAA 和 1 mg/L IAA 共同作用有利于吲哚总碱积累; 加入 200 mg/L 的色氨酸对提高吲哚总碱的含量有促进作用。

关键词: 长春花; 突变愈伤组织; 吲哚总碱

中图分类号: S682.1⁺5; S603.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2006)05-0153-03

长春碱(*Vinblastine*) 和长春新碱(*Vincristine*) 是两种广泛用于临床的抗癌药物, 化学结构属于吲哚生物碱, 目前取自长春花(*Catharanthus roseus*) 植株。它们在植物体内含量很

低, 无法满足患者的需要, 价格也很昂贵^[1]。利用组织培养技术生产更多的抗癌药物或长春质碱等其他前体物质是人们多年来的迫切愿望, 筛选出适于组织培养的细胞株是热点研究

同处理中接种株数低于 4 棵时, 增殖系数低, 在 3 倍以下; 而接种株数在 6~8 棵时, 增殖系数在 4 倍以上; 接种株数增加到 10 棵时, 增殖系数开始降低。结果表明: 在单位面积上过量或少量接种, 由于营养成分和激素水平都相应降低或升高, 影响了增殖效果。而且在适宜的接种密度下, 有利于兰花增殖系数的提高。在最佳激素组合中, 一般适宜的接种密度为 6~8 棵, 繁殖系数为 4.14~4.58 倍。

2.3 不同温度对兰花增殖系数的影响

在上述最佳培养基中, 在 12 h 光照条件下, 在 3 种温度条件下, 对接种后的增殖情况进行统计, 结果表明: 温度过低时, 不利于蝴蝶兰增殖, 其原因可能是蝴蝶兰是热带植物, 生长发育所需要的温度较高, 低温影响生理活动的正常进行, 对无机离子的吸收不利, 致使细胞增殖分化速度受到抑制; 温度在 22~28℃有利于无机离子的吸收, 加速了生命活动的进行, 有利于增殖; 温度在 30~32℃时对增殖有不利影响, 高温使呼吸作用加强, 代谢活动旺盛, 但由于其不是完整植株, 主动吸收养分的能力还未能建立, 所以, 环境过度恶化后, 使生长发育受到抑制或停止。在增殖时, 温度应控制在 20℃以上, 30℃以下, 可提高增殖系数。从生理角度来看, 温度不仅影响无机离子的吸收, 同时也影响 CO₂ 的吸收速率和呼吸作用, 最终表现出对蝴蝶兰增殖的影响, 因此温度是影响蝴蝶兰增殖的一个重要性因素。

表 3 不同温度对兰花增殖系数的影响			
温度(℃)	接种株数(棵)	增殖株数(棵)	增殖系数
17~20	904	1 744	1.93
22~30	1 024	4 897	4.78
30~32	1 600	3 200	3.00

2.4 不同光照条件对兰花增殖系数及生长情况的影响

在温度为 25℃条件下, 采用 BA5+NAA0.5+Ad2+Vc5 的培养基, 每瓶接 8 棵苗, 接种后在不同光照条件下培养, 结果见表 4。

表 4 不同光照条件对生长发育的影响					
光照时间 (h/d)	培养天数 (d)	接种株数 (棵)	增殖株数 (棵)	增殖系数	苗色
0	50	160	368	2.30	黄
12	50	1 600	6 524	4.10	绿

由表 4 可知, 12 h/d 的光照比无光照条件下, 增殖系数高 1.8 倍, 在光照条件下形成绿色的分化苗, 而在无光照条件下形成黄化苗, 生长缓慢, 需从无光照条件转化成有光照的条件下再培养 30 d, 使其转化为绿苗后才能进行继代培养, 否则转接后导致死苗。在有光照条件下, 需要 50 d 就可转接一代, 而在无光照条件下需要 80 d 才能转接一代。由此可见, 光照对绿苗的形成及增殖是有利的。究其原因可能是: 光照促进叶绿体的形成; 光照对植物离体培养条件下养分吸收、形成及运输有促进作用; 对生理活性物质的激活可能有积极的作用; 促进了细胞增殖和器官分化发育的进程, 因此光照是影响增殖系数的另一要素。

3 结论

在植物的离体培养中, 个体增殖发育过程是一个全面的调节过程, 只有在综合因素的合理的搭配作用下, 才能达到最佳效果。本试验主要对激素组合, 离体种植下的密度、温度、光照时间等方面进行了详细的研究, 并量化了增殖因素的指标, 由此得出适宜兰花增殖的最佳条件: 培养基为: MS+BA5mg/L+NAA0.5mg/L+Ad5mg/L+Vc4mg/L, 适宜的接种密度 6~8 棵/35 ml 培养基、温度为 22~28℃、光照条件为 12 h, 增殖系数达 4 倍以上。

参考文献:

[1] 周家琪. 花卉学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988, 585.
[2] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003, 31-42.
[3] 黄鑫, 陈创国. 蝴蝶兰组织培养与快速繁殖技术研究进展[C]. 植物组织培养与试管育苗. 北京: 中国农业出版社, 2004, 261-266.

课题之一。近几年来,本研究小组利用化学诱变方法筛选出几种突变愈伤组织(染色体由二倍体变为多倍体),其中秋水仙碱诱变的突变愈伤组织的生长速率比对照快得多,药用成分长春质碱含量也很高,而且很适于液体培养^[2],这意味着它可能是细胞工程技术生长春花药物的理想材料。为确立突变愈伤组织的最适培养条件,现研究光照、pH、碳源及初始糖浓度、生长素和色氨酸等因子对长春花突变愈伤组织生长及吲哚总碱积累的影响,对长春花突变愈伤组织培养条件进行优化筛选,以期为以后工业化生产长春花药用成分提供理论和实践依据。

1 材料和方法

1.1 材料

长春花突变愈伤组织由本实验室通过秋水仙碱诱变得到的,置于MS培养基上进行培养。培养基中添加2 mg/L α-萘乙酸(NAA), 1 mg/L 激动素(KT)。pH6.2(灭菌前),培养温度26~28℃。

1.2 方法

1.2.1 突变愈伤组织生长的测定 将长春花突变愈伤组织从培养基上剥离,称鲜重(取3瓶组织鲜重平均值)。

1.2.2 吲哚生物碱的提取及含量测定 参照文献^[3]进行提取和测定,所有数据均为3次平行重复测定的结果。

2 结果与分析

2.1 光照

光照是影响长春花生物碱的积累种类和数量的重要因素,光照还可以抑制生物碱的胞外释放。为了研究光照对突变愈伤组织生长和吲哚生物碱积累的影响,我们将同一批生长一致的突变愈伤组织接种于50 ml(内装有20 ml的MS培养基)的三角烧瓶中,分为两组,一组进行光培养(12 h光照),一组进行暗培养,30 d后收获,分别测其鲜重和吲哚总碱含量,结果见表1。光培养既有利于突变愈伤组织生长,又有利于吲哚总碱的积累。

表1 光照对突变愈伤组织生长及吲哚总碱含量的影响

培养条件	鲜重(g/瓶)	吲哚总碱(mg/g FW)
光培养	12.21	1.43
暗培养	10.43	1.19

2.2 pH

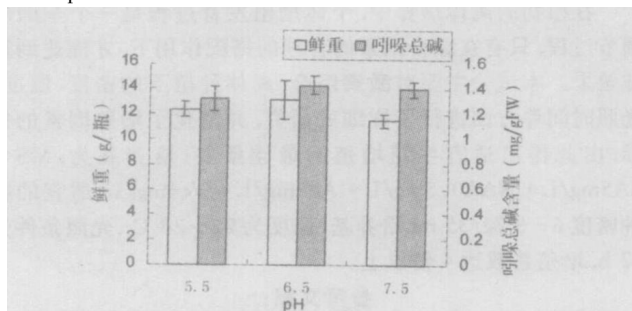


图1 pH对突变愈伤组织生长和吲哚总碱含量的影响

*基金项目: 山东省科技攻关计划项目(2005GG4402011)南开大学科技创新基金

收稿日期: 2006-03-10

pH值是影响细胞生理的重要因素,培养基的pH值能够改变培养基中营养物质的离子化程度,从而影响细胞对营养物质的吸收以及代谢反应中各种酶的活性和代谢途径。生物碱的合成和储存在液泡中进行,液泡和培养基之间的pH梯度能影响生物碱的合成和储存。改变培养基的pH值有利于生物碱的胞外释放, Jarden等通过短期改变培养基pH值使细胞中的生物碱100%释放到了培养基中^[4]。

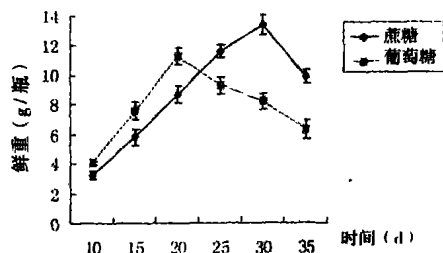


图2 (a)碳源对突变愈伤组织生长的影响

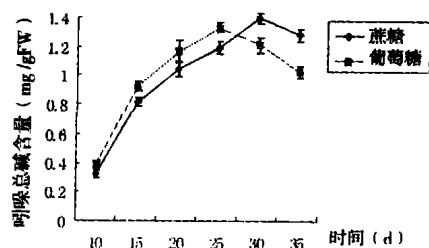


图2 (b)碳源对突变愈伤组织吲哚总碱含量的影响

从图3,可以看出:培养基初始pH在5.5~7.5范围内变动时,对突变愈伤组织生长及吲哚总碱的积累影响较小。这可能是因为长春花突变愈伤组织对生存环境有一个调节和适应的过程,最终可以克服不良生存环境,其结果就表现为对pH的不敏感。

2.3 碳源对突变愈伤组织生长和吲哚总碱积累的影响

分别以含有葡萄糖、蔗糖各30 g/L的MS培养基培养突变愈伤组织,培养10、15、20、25、30、35 d来研究这两种碳源对突变愈伤组织生长和吲哚总碱积累的影响。结果如图2所示。在生长初期,蔗糖和葡萄糖对突变愈伤组织生长和吲哚总碱积累的影响相似,20 d后,以葡萄糖为碳源培养的突变愈伤组织生长速度明显下降。而以蔗糖为碳源培养的突变愈伤组织其生长速度一直在增加,30 d后才下降。从吲哚总碱的积累看,生长在以蔗糖为碳源的培养基上的突变愈伤组织吲哚总碱从10~30 d一直在增加并达到最高峰,而且高于以葡萄糖为碳源的突变愈伤组织吲哚总碱的含量(如图2b)。碳源既是细胞生长所需又是次生代谢物合成所需,其含量的变化影响愈伤组织对其它活性成分的利用以及培养基的渗透势,改变次生代谢产物的积累。葡萄糖作为碳源能被突变愈伤组织迅速吸收因而初期生长较快,生物碱积累较高。但是到后期葡萄糖很快被消耗,生长缓慢,生物碱合成降低。综合考虑生物产量,吲哚总碱含量,本实验选择蔗糖作为碳源。

2.4 蔗糖浓度对突变愈伤组织生长和生物碱积累的影响

研究表明,增加初始蔗糖浓度可以提高长春花愈伤组织中生物碱含量^[5],但不同株系差别较大。为进一步研究不同

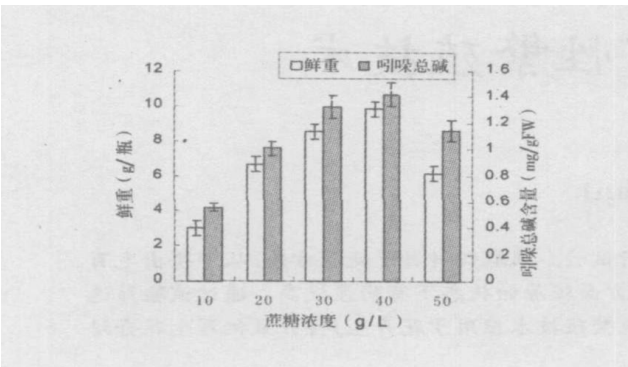


图3 不同浓度的蔗糖对突变愈伤组织生长和吲哚总碱含量的影响

蔗糖浓度对突变愈伤组织生长和吲哚总碱积累的影响,将在不同蔗糖浓度的培养基上培养30 d的突变愈伤组织取出,测量其鲜重和吲哚总碱含量,重复3次取平均值。其结果如图2所示,结果表明:突变愈伤组织在蔗糖浓度为40 g/L的培养基上生长较其他培养基好,这说明突变愈伤组织对于培养基蔗糖的量有着一定的要求,蔗糖浓度在40 g/L左右最适于突变愈伤组织的生长,蔗糖浓度过大或过小,都会影响突变愈伤组织的生长情况。

2.5 生长素

植物激素不仅影响细胞的生长、分化,还影响生物碱的合成,且激素的种类、浓度不同,影响差别很大,现主要研究生长素对突变愈伤组织的影响。

将突变愈伤组织均匀接种于6种含有不同种类和浓度的生长素(KT浓度不变)配比的培养基上,培养30 d收获,称鲜重并测定吲哚总碱含量,重复3次取平均值。试验结果(见表2)表明:2,4-D的存在对于突变愈伤组织的生长和吲哚总碱的积累有一定的抑制作用,并且此抑制作用随2,4-D浓度的增加而增强。用NAA或IAA替代2,4-D后,鲜重有所增加。仅含2 mg/L NAA可使组织鲜重达11.09 g/瓶。NAA和IAA共同作用最利于吲哚总碱积累,与单一的2,4-D作用相比,吲哚总碱含量可达1.48 mg/g FW。两种生长素组合比单一的生长素更利于吲哚总碱积累。

表2 生长素对突变愈伤组织生长及吲哚总碱含量的影响

组别	a	b	c	d	e	f
生长素配比	2mg/L NAA	2mg/L IAA	2mg/L 2,4-D	1mg/L NAA 1mg/L 2,4-D	1mg/L IAA 1mg/L NAA	1mg/L IAA 1mg/L 2,4-D
鲜重 (g/瓶)	11.09	7.01	5.04	5.48	10.78	7.79
吲哚总碱 (mg/g FW)	1.40	1.36	1.00	1.09	1.48	1.06

2.6 前体饲喂

添加合适的前体物质可以有效地提高植物细胞次级代谢产物的含量,Deus等^[6]报道,培养液中加入色胺和色氨酸,能不同程度的刺激生物碱的生产。Magdi El-Sayed等^[7]在一项研究中却发现,外源色胺和马钱子在一个细胞株系中使生物碱的产量增加6倍。

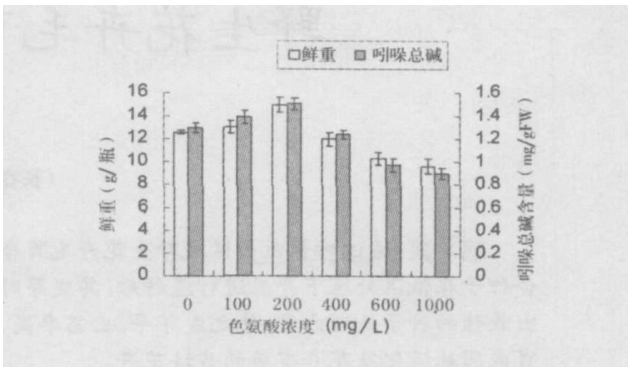


图4 不同浓度的色氨酸对突变愈伤组织生长和吲哚总碱含量的影响

色氨酸是吲哚总碱合成的重要前体之一,为研究色氨酸对突变愈伤组织生长和吲哚总碱的影响,用分别含有0 100 200 400 600 1 000 mg/L的培养基培养突变愈伤组织,30 d后收获,测定鲜重和吲哚总碱含量,结果如图4所示,色氨酸可使吲哚生物碱的合成增加,但浓度不易过大,否则可能会产生抑制作用,合成又降低,添加200 mg/L的色氨酸最有利于突变愈伤组织的生长和吲哚总碱的积累。

3 小结

以上研究结果表明,光培养较暗培养有利于吲哚总碱生成;pH的改变对吲哚总碱的积累几乎没有变化;碳源对突变愈伤组织的生长和吲哚总碱的积累有较大影响,一定范围内初始糖浓度的增加,有利于组织生长和吲哚总碱的积累;2,4-D的存在对于突变愈伤组织的生长和吲哚总碱的积累有抑制作用,2 mg/L的NAA可使突变愈伤组织的生物产量最高,NAA和IAA两种生长素共同作用最利于吲哚总碱的积累;加入200 mg/L的色氨酸对提高吲哚总碱的含量有促进作用。长春花组织培养中,色氨酸除了作为氨基酸来源合成蛋白质以外,还可用于合成吲哚乙酸以及作为吲哚生物碱的前体,因此对长春花组织培养有重要影响。

参考文献:

[1] S. Ramachandra Rao, G. A. Ravishankar. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites[J]. Biotechnology Advances, 2002, 101-103.

[2] 张荣涛,曹宇,顾锋旗,等.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[J].北方园艺,2005,1:65-66.

[3] 王宁宁,王淑芳,田俊英,等.土壤农杆菌转化的长春花冠瘿细胞培养[J].生物工程学报,1994,10(3):239-244.

[4] Jardin B, Tom R, et al.. Stimulated indole alkaloid release from Catharanthus roseus immobilized cultures[J]. Initial studies Biotechnol, 21: 43-62.

[5] Morris P. Regulation of product synthesis in cell cultures of Catharanthus roseus. II comparison of production media[J]. Planta med, 1986, 52: 121.

[6] Deus B, et al.. Biotechnol Bioeng, 1982, 24-28.

[7] Magdi El-Sayed, Rob Verpoorte. Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a Catharanthus roseus cell suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin[J]. Plant cell Tissue and Organ Culture, 2002, 28: 265-270.