

## 秋水仙碱对长春花突变细胞生长速率和长春质碱积累的影响

张荣涛<sup>1</sup> 张秀省<sup>2</sup> 聂莉莉<sup>1</sup> 朱晔荣<sup>1,\*</sup> 王宁宁<sup>1</sup> 王勇<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南开大学生命科学学院, 天津 300071; <sup>2</sup>聊城大学农学院, 山东聊城 252000

**摘要** 用0.5%秋水仙碱处理长春花愈伤组织, 获得了多倍体突变细胞。初步的染色体检查显示, 大多数突变的细胞为4倍体。突变细胞与普通细胞在生长速率、吲哚生物碱和长春质碱积累方面的差异比较表明, 吲哚生物碱的积累并无大的差异, 但是突变细胞的生长速率和长春质碱的积累量可分别达到普通细胞的2.9倍和5.2倍。

**关键词** 秋水仙碱; 长春花; 吲哚生物碱; 长春质碱

## Effect of Colchicine on Growth Rate and Accumulation of Catharanthine in Mutant Cells of *Catharanthus roseus* L.

ZHANG Rong-Tao<sup>1</sup>, ZHANG Xiu-Sheng<sup>2</sup>, NIE Li-Li<sup>1</sup>, ZHU Ye-Rong<sup>1,\*</sup>, WANG Ning-Ning<sup>1</sup>, WANG Yong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; <sup>2</sup>College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252000, China

**Abstract** Mutated polyploid *Catharanthus roseus* L. cells were obtained by treatment of calli with 0.5% colchicine. Primary chromosome analysis showed that most of the mutated cells were tetraploids. The comparison of growth rate, accumulation of indole alkaloids and catharanthine demonstrated that there was no significant difference in the accumulation of indole alkaloids, but the growth rate and the accumulation of catharanthine in colchicine mutated cells reached 2.9- and 5.2-fold, respectively, of the normal cells.

**Key words** colchicine; *Catharanthus roseus* L.; indole alkaloids; catharanthine

长春花的次生代谢产物中含有药用成分长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、长春质碱(catharanthine)等。目前, 这些药物均从长春花植物体中获得, 它们在植物体内含量很低, 仅为十万分之一到百万分之一<sup>[1]</sup>。采用细胞培养方法代替从长春花植物体中提取药用成分的研究, 是多年来备受人们关注的课题之一, 并已取得了一定的进展<sup>[2~4]</sup>。但由于细胞系不稳定, 生物产量低, 药用成分含量低, 生物产量与药用成分的积累之间存在矛盾等, 至今未能实现工业化生产。本文用化学诱变方法获得长春花突变细胞, 并对其生长速率、吲哚生物碱及长春质碱进行了检测, 以期能为工业化生产提供一种生物碱高产而生长快的细胞工程品系。

### 材料与方法

长春花(*Catharanthus roseus* L.)愈伤组织由本院诱导获得(长春花取自本院温室)。秋水仙碱购自Sigma公司。

长春花愈伤组织固体培养基为: MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> KT+2.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA, pH 6.4, 光强为18~27

μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照时间12 h·d<sup>-1</sup>; 悬浮培养物液体培养基为: MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> KT+2.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA, pH 6.2, 暗培养, 液体培养摇床转速为80 r·min<sup>-1</sup>, 培养温度为25~26℃。

用0.9%生理盐水配制0.5%的秋水仙碱溶液, 用0.45 μm微滤膜将生理盐水和秋水仙碱溶液分别过滤于无菌瓶中, 将固体培养的长春花愈伤组织转接入无菌瓶中悬浮培养4 h, 再转接到固体培养基中培养, 待愈伤组织生长旺盛后进行液体培养。

细胞染色体数目的检查按文献5方法。吲哚生物碱的提取及含量测定参照文献6进行。长春质碱测定采用反相高压液相色谱法(RP-HPLC)。色谱条件: C<sub>18</sub>硅胶柱(250 mm×4.6 mm, 7 μm); 测定波长280 nm; 流动相是甲醇:0.005 mol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>=7:3 (V/V, pH 7.0); 柱温28℃, 流速

收稿 2005-05-11 修定 2005-11-29

资助 南开大学科技创新基金和山东省科技攻关计划项目(2005GG4402011)。

\*通讯作者(E-mail: zhuyr@nankai.edu.cn, Tel: 022-23504382)。

1.0 mL·min<sup>-1</sup>。长春质碱峰面积与其浓度呈线性关系, 回归方程为:  $Y=8560X-113.78$  ( $Y$ 为峰面积,  $X$ 为浓度,  $R=0.9991$ ,  $RSD=1.65\%$ )。所有数据均为3次平行重复的平均值。

## 结果与讨论

### 1 染色体的变化

在植物细胞有丝分裂过程中, 秋水仙碱可阻断纺锤体的形成, 因而复制后的染色体不能分向两极和分配到子细胞中, 从而导致染色体加倍。用0.5%秋水仙碱处理的材料经继代培养后, 以光学显微镜观察时, 其染色体数目发生变化, 获得了多倍体细胞, 其中四倍体的数目最多, 有少许八倍体。二倍体和四倍体染色体数目如图1所示。

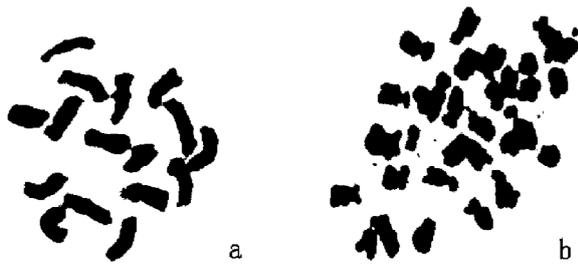


图1 二倍体和四倍体细胞的染色体

Fig. 1 Chromosomes of diploid and tetraploid cells

a: 未突变细胞的染色体(8对); b: 突变细胞的染色体(16对)。

### 2 突变细胞的生理性状

**2.1 生长动力学分析** 将秋水仙碱处理的细胞转接到固体和液体生长培养基中继代培养。选取第6、7代固体培养的愈伤组织与液体培养的细胞(固体初始接种量约0.45 g·瓶<sup>-1</sup>, 液体培养约为1.2 g·瓶<sup>-1</sup>)测定生长曲线。固体培养间隔5 d称重1次, 液体培养间隔2 d称重1次, 结果(图2和3)表明:(1)固体培养时, 普通细胞的鲜重随培养时间的增加而增加, 25 d达到最高值, 随后生长逐渐下降。突变细胞的生长快于普通细胞, 25 d后, 突变细胞的生长还在缓慢上升, 30 d达到最高值。其外观特征也发生变化: 生长后期, 普通细胞由原始淡黄色变成粘稠褐色, 逐渐衰老死亡; 而突变细胞由原始发白变成浅绿色, 细胞团粒松散, 衰老较缓慢。(2)与固体培养相比, 液体培养更有利于突变细胞的生长, 其鲜重增长明显加快。培养16 d后, 其增长速度迅速上升。20 d时生长量高达

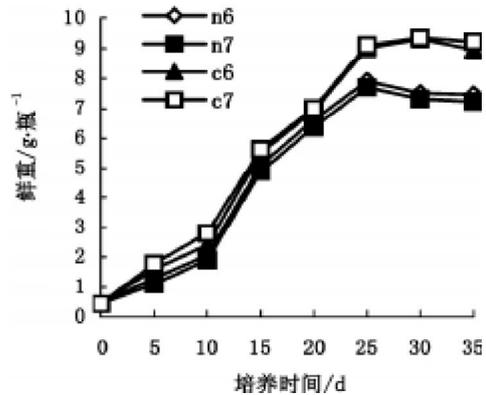


图2 秋水仙碱诱变的长春花突变细胞与普通细胞固体培养的生长动力学曲线

Fig. 2 The growth kinetics of mutant cells induced by colchicine and normal cells of *C. roseus* on solid medium  
n和c分别表示二倍体普通细胞和秋水仙碱诱变的长春花突变细胞, 6、7分别表示生长继代次数。图3~7 同此。

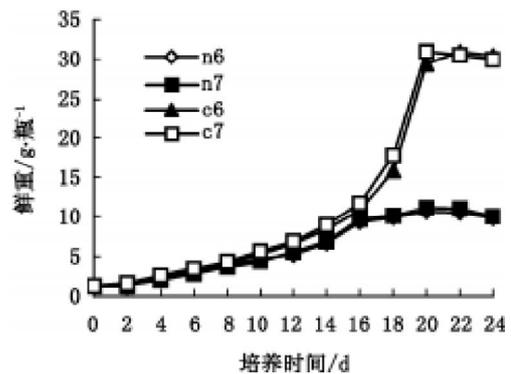


图3 秋水仙碱诱变的长春花突变细胞与普通细胞悬浮培养的生长动力学曲线

Fig. 3 The growth kinetics of mutant cells induced by colchicine and normal cells of *C. roseus* in suspension culture

32.0 g, 为普通细胞的2.9倍。液体培养为暗培养, 突变细胞的颜色虽然没有像固体培养那样呈现绿色, 但比普通细胞新鲜, 不出现褐色。

**2.2 吲哚生物碱积累量变化** 选用培养第6、7代突变细胞, 固体培养和液体培养分别每隔5 d和2 d称重, 测定吲哚生物碱的含量。结果(图4和5)表明:(1)固体培养时, 突变细胞的吲哚生物碱动态变化与普通细胞的差异不明显, 二者变化趋势相近, 30 d时含量达最高;(2)液体培养的突变细胞和固体培养及普通细胞吲哚生物碱的含量类似。但值得注意的是, 突变细胞在生长后期(24 d), 积累超过了普通细胞。

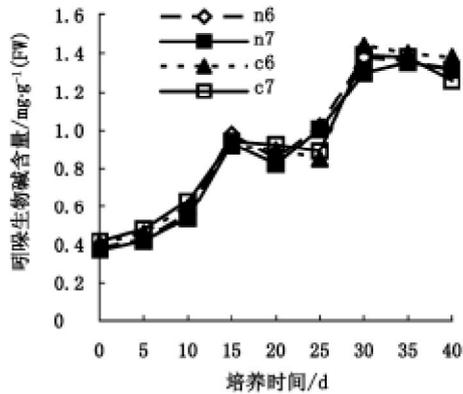


图4 秋水仙碱诱变的长春花突变细胞与普通细胞固体培养中吲哚生物碱含量的动态变化  
Fig. 4 The kinetics of indole alkaloid content in mutant cells induced by colchicine and normal cells of *C. roseus* on solid medium

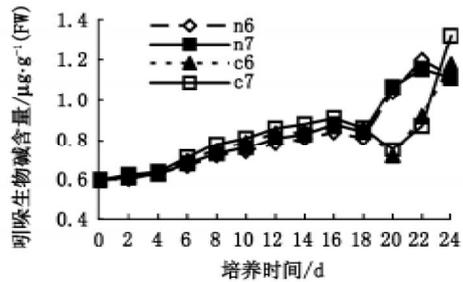


图5 秋水仙碱诱变的长春花突变细胞与普通细胞悬浮培养中吲哚生物碱含量的动态变化  
Fig. 5 The kinetics of indole alkaloid content in mutant cells induced by colchicine and normal cells of *C. roseus* in suspension culture

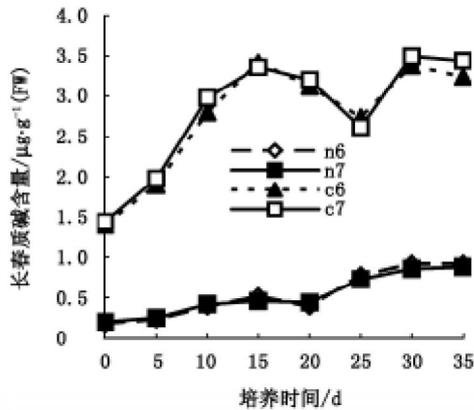


图6 秋水仙碱诱变的长春花突变细胞与普通细胞固体培养中长春质碱含量的积累  
Fig. 6 Accumulation of catharanthine content in mutant cells induced by colchicine and normal cells of *C. roseus* on solid medium

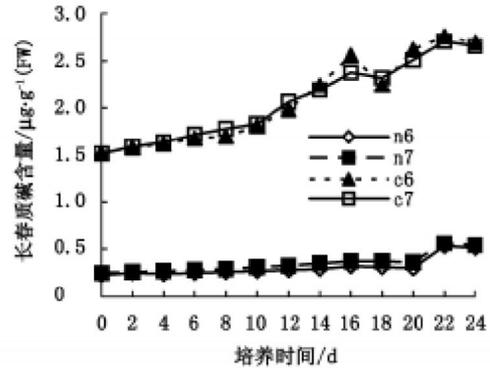


图7 秋水仙碱诱变的长春花突变细胞和普通细胞液体培养中长春质碱含量的积累  
Fig. 7 Accumulation of catharanthine content in mutant cells induced by colchicine and normal cells of *C. roseus* in suspension culture

**2.3 长春质碱含量的动态变化** 如图6和7所示,秋水仙碱诱变的细胞中长春质碱的含量远远超出普通细胞:固体培养时,前者是后者的4.1倍(最高点在30 d);液体培养时,前者是后者的5.2倍(最高点在22 d)。这说明突变细胞合成长春质碱的次生代谢活性比普通细胞高得多。

总之,经秋水仙碱处理的长春花细胞由二倍体变成了多倍体,其生长速率快于二倍体,长春质碱含量显著地提高。

### 参考文献

- Moreno-Valenzuela OA, Galaz RM, Minero-Garcia Y et al. Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Plant Cell Rep*, 1998, 18: 99~104
- Moreno-Valenzuela OA, Minero-Garcia Y, Chan W et al. Increase in the indole alkaloid production and its excretion into the culture medium by calcium antagonists in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(16): 1345~1349
- Hernandez-Dominguez E, Campos-Tamayo F, Vazquez-Flota F. Vindoline synthesis *in vitro* shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(8): 671~674
- Choi PS, Kim YD, Choi KM et al. Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep*, 2004, 22(11): 828~831
- 王勇, 陈源闯, 李敬起等. 胡萝卜染色体数镜检方法. 内蒙古农业科技, 1998, 4(4): 19~20
- 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. 生物工程学报, 1994, 10(3): 244~249