

质量浓度水平未能达到预期结果,为了获得愈伤分化再生植株,设计将分化出的钉状根上诱导芽再生。或者对愈伤组织直接分化出丛生芽的培养基激素和浓度水平做进一步的筛选试验^[9]。

3 讨论

用采来的老瓜头植株的叶片和茎段做外植体,通过表面消毒,可以获得无菌材料,但再生芽的生长速度慢,丛生芽容易玻璃化,用无菌播种的方法获得的材料,植株生长快而旺盛,实生根发达,进行老瓜头愈伤组织的诱导可操作性强,而且不受污染的影响,大大提高了诱导率。本实验中以根和茎段作为外植体,加入适量的激素配比,很容易诱导出愈伤组织,且愈伤组织状态比较好,在诱导过程中无褐化现象发生,其增殖的生长量较大,在25 d后仍然呈现淡黄鲜亮疏松状态,增殖时间过长会有絮状老化、黄褐色的现象发生。在实验中发现,愈伤组织能够分化出钉状根,钉状根放到只有IBA的培养基上,伸长很快,呈盘曲状。从很多研究文献中发现老瓜头的根系发达,主要的有效成分来自于根部。通过以上实验结果及现象,认为可以从老瓜头的根入手,深入研究其根段产生的愈伤组织有效成分的量,而且可以设计用毛状根的培养方法进一步研究其发根的有效成

分组成及量,最终为开发利用野生老瓜头资源提供技术手段和理论基础。

References:

- [1] Qi L M, Yang J, Li K. Comparative analysis of alkaloid components in rhizoma and folium of *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski [J]. *J Ningxia Univ, Nat Sci* (宁夏大学学报:自然科学版), 2002(4): 359-360.
- [2] Qi L M, Yang J, Jia J R. Study on alkaloids of *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski widely grown in Ningxia [J]. *J Ningxia Med Coll* (宁夏医学院学报), 2002(5): 336-339.
- [3] Qu L, Chao Y L. Study on tissue culture and rapid propagation technology of *Cynanchum komarovii* Al [J]. *Gansu Agric Sci Technol* (甘肃农业科技), 2002(4): 42-45.
- [4] Zhou W Y. *Theory and Technology of Plant Cell Engineering* (植物细胞工程原理与技术) [M]. Beijing: China Agriculture University Press, 2002.
- [5] Li C X, Wang Z H, Wang W L. *Biometrics* (生物统计学) [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [6] Cheng R X, Zhang Y F. *Experiment Design and Data Processing* (实验设计与数据处理) [M]. Harbin: Northeast University Press, 2003: 59-130.
- [7] Kiceran P M, MacLoughlin P F, Malone D M. Plant cell suspension culture, some engineering consideration [J]. *Biotechnology*, 1997, 59: 5.
- [8] Lee W L, Chan L K. Establishment of *Orthosiphon stamineus* cell substation culture for cell growth [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2004, 78: 101-106.
- [9] Wang W, Cui S X, Zhang C L. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of dune reed [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2001, 67: 11-17.

长春花突变细胞生理特征的研究

张秀省¹, 聂莉莉², 向蓓蓓², 王淑芳², 朱晔荣^{2*}, 王 勇²

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

摘要:目的 研究以秋水仙碱处理的长春花突变细胞在继代培养过程中的生长规律、吲哚生物碱积累的规律及营养成分的适宜浓度等方面的特征,期望得到适于工业化细胞培养的理想材料。方法 将突变细胞培养于MS固体培养基上,定期称取其鲜质量,用有机溶剂萃取吲哚生物碱,应用RP-HPLC法检测药用成分阿玛碱和长春质碱。结果 突变细胞培养至第30代时,生长速度和吲哚总碱积累得最快,培养至第45代时,两者均明显下降。而药用成分的量于第20代达到最高;在培养基中添加适量的色氨酸能提高药用成分的量;培养基中Ca²⁺和Zn²⁺的质量浓度分别为1 760和12.6 mg/L时,明显促进了药用成分的积累。结论 长春花突变细胞可能是一种适于工业化细胞培养的理想材料。

关键词: 长春花; 突变细胞; 阿玛碱; 长春质碱

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)11-1719-04

Physiological characters of *Catharanthus roseus* mutant cells

ZHANG Xiu-sheng¹, NIE Li-li², XIANG Bei-bei², WANG Shu-fang², ZHU Ye-rong², WANG Yong²

(1. College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China; 2. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

收稿日期: 2007-03-10

基金项目: 山东省科技攻关项目(2005GG4402011); 南开大学科技创新基金

* 通讯作者 朱晔荣 E-mail: zhuyr@nankai.edu.cn Tel: (022)23504382

Abstract; Objective To investigate the characteristics of growth, accumulation of indole alkaloid, and the optical concentration of the nutrition components in the *Catharanthus roseus* mutant cells induced by the colchicine, looking forward to getting the ideal material producing alkaloids which was suited for industrialized cell cultivation. **Methods** Mutant cells cultivated on the MS medium were harvested according to experiment designs, and the fresh weight was got. The indole alkaloid as extracted by organic solvent. The ajmalicine and catharanthine extracted from the samples were analyzed by RP-HPLC. **Results** The growth rate was faster and the indole alkaloid accumulation was more when the mutant cells were cultivated generations 30 and the both were sharply decreased at generations 45, while the contents of medical compounds amounted to the peak at the generations 20. The content of medical components and alkaloid accumulation were evidently prompted by the tryptophan added in the media, especially at the concentration of Ca^{2+} 1 760 and Zn^{2+} 12.6 mg/L, respectively. **Conclusion** *C. roseus* mutant cells probably is an ideal material for industrialized cell cultivation.

Key words: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; mutant cells; ajmalicine; catharanthine

为满足对植物药物的需求量,利用细胞培养技术获取更多药用成分已被公认是一条最可行的途径。长春花细胞培养物中有很多药用成分,如长春质碱(catharanthine)和阿玛碱(ajmalicine)等^[1]。采用细胞培养技术生产长春花药物是当今人们迫切希望解决的问题,筛选出生长快且含药用成分量高的细胞株是国内外学者重点攻关课题之一。近年来,本课题组利用秋水仙碱诱变长春花普通细胞得到了突变细胞。经初步鉴定,其生长速率和药用成分积累均高于普通细胞。为更深入全面了解突变细胞特征,本实验对其生长规律、吲哚总碱和药用成分的积累规律及营养成分对生物碱积累水平的影响等方面进行了探讨,期望突变细胞是更适于工业化生产的理想材料,并为其将来的应用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料:长春花 *Catharanthus roseus* L. 普通细胞,由南开大学生命科学学院实验室诱导获得。长春花突变细胞,由本实验室通过 0.05% 秋水仙碱诱变获得。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:长春花普通细胞和突变细胞固体培养基为:MS + 1.0 mg/L KT + 2.2 mg/L NAA, pH 6.2, 光照度为 1 000~1 500 Lx, 光照时间 12 h/d。

1.2.2 吲哚总碱的测定:吲哚总碱的提取及定量测定参照王宁宁报道的方法^[2],所有数据均为 3 次平行重复测定的结果。

1.2.3 长春质碱和阿玛碱测定:参照文献方法^[3]。

2 结果分析

2.1 长春花突变细胞和普通细胞的一般特征:用 0.9% 生理盐水配制 0.5% 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普通细胞转入无菌瓶中悬浮培养 4 h,再转接到固体培养基中进行培养。将普通细胞和秋水仙碱处理的细胞培养至第 7 代时,30 d 收获。对其一般特征进行了观察检测,发现两种细胞差异明显。结果见表 1 和图 1。

表 1 长春花突变细胞和普通细胞的特征

Table 1 Characters of *C. roseus* mutant cells and normal cells

材料	颜色	质地	染色体数目	鲜质量/ (g·瓶 ⁻¹)	阿玛碱/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	长春质碱/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
普通细胞	黄白色	较硬	2 染色体(8 对)	7.30	3.43	0.86
突变细胞	乳白色	较松软	4 倍体为主的	9.33	7.05	3.50

嵌合体

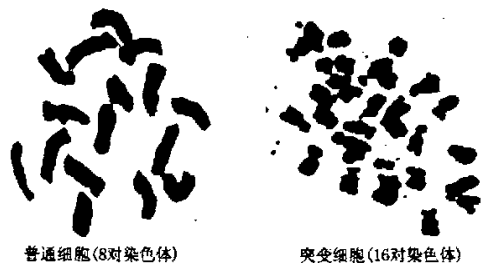


图 1 普通细胞和突变细胞的染色体

Fig. 1 Chromosomes of normal cells and mutant cells

2.2 继代培养的生长动力学特征:为了更加详细地研究突变细胞的生长动力学特征,将突变细胞进行多次继代培养,选取第 7、20、30、45 代进行生长速率以及含吲哚总碱、阿玛碱、长春质碱量的分析。结果见图 2、3。从图 2 可以看出,综合生物产量和吲哚总碱两方面分析,在第 7~30 代其动力学曲线变化幅度较小,尤其培养到 30 d 时,不同继代次数的鲜质量和吲哚总碱的量差异缩小,但是到了第 45 代时,两者均表现出较大幅度下降。从图 3 可以看出,长春

质碱和阿玛碱的量随着继代次数的增加也发生了变化,第 20 代阿玛碱和长春质碱的量达到最大,分别是 24.31、14.87 $\mu\text{g/g}$ 。第 30 代和第 45 代的药用成分的量变化不大,产量趋于稳定。也就是说,该细胞的生长和吲哚生物碱的积累在相当长的继代时期内(30 多代)是稳定的。总碱中的单个成分在不同继代次数中的积累是不同的。这一研究结果提示在实践中,选择适宜时间进行收获可得到更多的目的产物。

2.3 前体饲喂对突变细胞生长和药用成分积累的影响

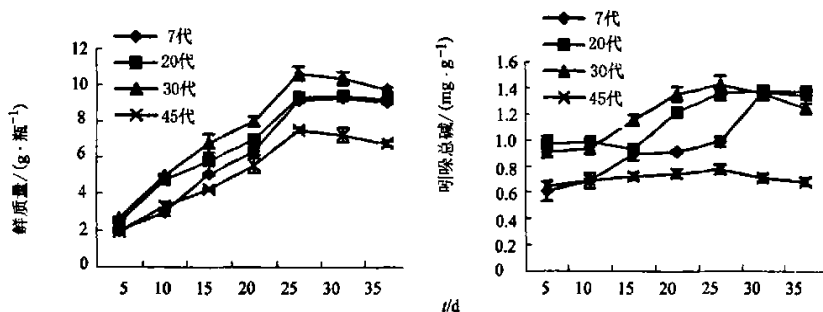


图 2 继代次数对突变细胞生长和吲哚总碱量的影响

Fig. 2 Effect of subculturing numbers on growth and total alkaloid content of mutant cells

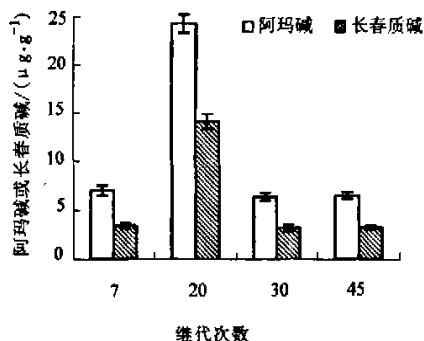


图 3 继代次数对突变细胞药用成分积累的影响

Fig. 3 Effect of subculturing numbers on accumulation of medicinal alkaloid of mutant cells

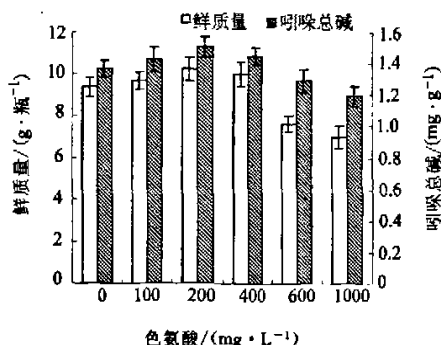


图 4 色氨酸对突变细胞生长和吲哚总碱量的影响

Fig. 4 Effect of tryptophan on growth and total alkaloid content of mutant cells

影响;在细胞培养技术中,前体饲喂是有效提高培养物中目的产物的重要措施,色氨酸是生物合成吲哚类化合物的原料之一。为研究色氨酸对突变细胞生长速率和吲哚生物碱积累的影响,用分别含有 0、100、200、400、600、1 000 mg/L 色氨酸的培养基培养第 24 代突变细胞,30 d 后收获,测定鲜质量、吲哚总碱的量以及长春质碱和阿玛碱的量。结果见图 4、5,色氨酸对突变细胞生长和吲哚总碱的积累无明显的促进作用,但对长春质碱和阿玛碱的量有较大影

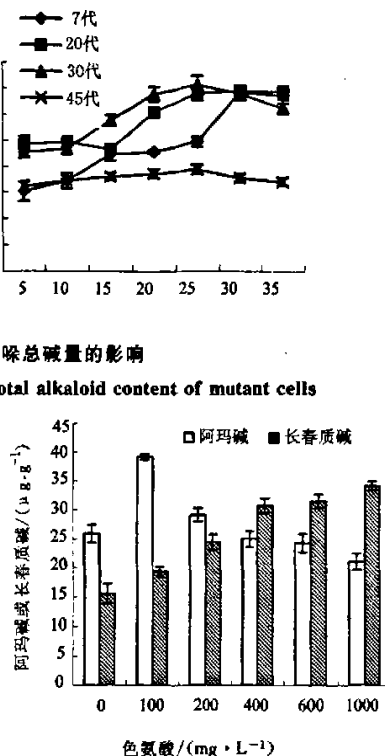


图 5 色氨酸对突变细胞药用成分积累的影响

Fig. 5 Effect of tryptophan on accumulation of medicinal alkaloid of mutant cells

响。其中 100 mg/L 的色氨酸可以使阿玛碱的量增加 78%,但随着色氨酸质量浓度的增加,阿玛碱的量下降。而长春质碱随着色氨酸质量浓度的增加而增加,最高点是对照的 2 倍。这一结果表明,突变细胞与普通细胞一样,吲哚生物碱的积累对色氨酸是不依赖的^[4]。色氨酸不能显著提高吲哚总碱的积累,但对单一成分的合成有重要的调节作用。随着色氨酸质量浓度的增加,吲哚生物碱生物合成代谢可能更有利于向合成长春质碱的途径转化。

2.4 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 对突变细胞生长和药用成分积累的影响; Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 都是植物生长发育过程中所必需的矿质元素。 Zn^{2+} 是许多重要酶(包括色氨酸合

成酶)的重要组分或活化剂, Ca^{2+} 在植物细胞中起着极其重要的信使作用,它介导细胞对外界刺激的应答反应。因此,培养基中 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 量的多少会对培养材料的代谢水平产生极大影响。将第33代突变细胞接种于含不同质量浓度 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 的MS培养基上,以普通MS培养基(Zn^{2+} 为8.6 mg/L, Ca^{2+} 为440 mg/L)上培养的突变细胞为对照,培养30 d后收获,测其生物产量和吲哚生物碱的量。

2.4.1 Ca^{2+} :由图6、7可知,随着 Ca^{2+} 质量浓度的增加,突变细胞的鲜质量明显下降,说明高质量浓度的 Ca^{2+} 抑制突变细胞的生长,但是有利于吲哚生物碱的积累,当 Ca^{2+} 为1 760 mg/L时,无论吲哚总碱还是长春质碱、阿玛碱的量都达到最高。阿玛碱的量是对照的4倍,长春质碱的量是对照的3.5倍。其生物产量降低不到50%, Ca^{2+} 质量浓度继续增加,吲哚生物碱的量下降,这可能是因为高质量浓度的 Ca^{2+} 更多地激活了蛋白质合成、基因复制等初生代谢相关酶的活性,而抑制了次生代谢的缘故。综合生物产量和药用成分的量来看,1 760 mg/L Ca^{2+} 对提高吲哚生物碱的量最有效。

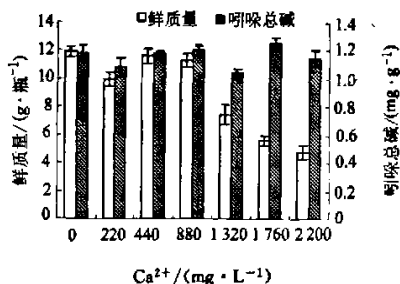


图6 Ca^{2+} 对突变细胞生长和吲哚总碱量的影响

Fig. 6 Effect of Ca^{2+} on growth and total alkaloid content of mutant cells

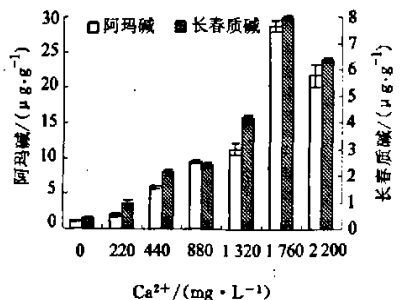


图7 Ca^{2+} 对突变细胞药用成分积累的影响

Fig. 7 Effect of Ca^{2+} on accumulation of medicinal alkaloid of mutant cells

2.4.2 Zn^{2+} :由图8、9可知,不同质量浓度的

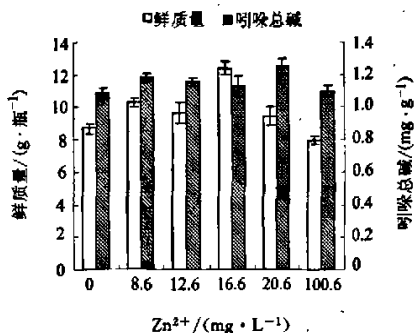


图8 Zn^{2+} 对突变细胞生长和吲哚总碱量的影响

Fig. 8 Effect of Zn^{2+} on growth and total alkaloid content of mutant cells

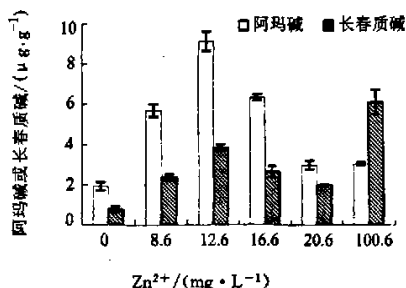


图9 Zn^{2+} 对突变细胞药用成分积累的影响

Fig. 9 Effect of Zn^{2+} on accumulation of medicinal alkaloid of mutant cells

Zn^{2+} 对突变细胞生长及吲哚总碱积累的影响不大。 Zn^{2+} 为12.6 mg/L时促进了阿玛碱的积累,但随着 Zn^{2+} 的质量浓度继续增加对阿玛碱、长春质碱的积累有一定的抑制作用,过高的 Zn^{2+} (100.6 mg/L)促进了长春质碱的积累,但抑制突变细胞生长及吲哚总碱积累。

3 小结

基于长春花突变细胞的生物产量和药用成分的积累均高于普通细胞,本实验对其生长动力学等多方面的生理特征进行了研究,表明该细胞在继代培养过程中遗传性比较稳定,生长速率和吲哚总碱的量变化不大。而且可以通过适时收获和改变培养基成分的手段来大幅度提高药用成分的量。研究结果对进一步深入研究和开发适合于规模化生产长春花药物的理想材料提供理论数据,该研究成果的应用将会带来可观的经济效应。

References:

- [1] Van Der Heijden, Rjacs D I, Snoeijer Wet al. The *Catharanthus* alkaloids, pharmacognosy and biotechnology [J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11(5): 607-628.
- [2] Wang N N, Wang S F, Tian J Y, et al. Study on cell suspension culture of *Catharanthus roseus* crown gall cell induced

- by Agrobacterium C58 [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1994, 10(3): 244-249.
- [3] Zhang X F, Zhang X X, Wang Y, et al. Effects of plant growth regulators on the accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* calli [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 2004, 40(3): 303-304.
- [4] Zhang X F, Zhang R T, Cao L, et al. Effects of different factors on accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* calli [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2004, 39(11): 817-819.

不同处理对绞股蓝种子萌发的影响

赵瑜¹, 肖娅萍^{1,2*}

(1. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 教育部药用植物资源及天然药物化学重点实验室, 陕西 西安 710062)

摘要:目的 研究绞股蓝种子发芽特性, 寻找行之有效的提高种子萌发率的方法, 为大田生产奠定基础。方法 对绞股蓝种子分别进行机械处理、超声处理以及不同植物生长调节剂浸泡等处理, 计算发芽率。结果 超声处理、揉搓、剥除种皮以及3种植物生长物质处理均可以显著提高绞股蓝种子发芽率。0.1 mg/L 6-BA 浸泡1 h效果最好, 其次为超声处理10 min时, 剥除种皮、揉搓, 处理种子萌发率分别为69%、54.6%、38.5%、35.3%。结论 实际操作中揉搓和剥除种皮两种方法操作性不强, 0.1 mg/L 6-BA 浸种处理对幼苗生长有负面影响, 而超声处理简单易行, 可作为大规模播种前处理应用于大田生产。

关键词: 绞股蓝; 机械处理; 种子萌发

中图分类号: R286.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2007)11-1723-03

Effects on germination and growth of seedling with different treatments for seeds of *Gynostemma pentaphyllum*

ZHAO Yu¹ XIAO Ya-ping^{1,2}

(1. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry, Xi'an 710062, China)

Key words: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; physical treatment; seed germination

绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 为葫芦科绞股蓝属多年生草质藤本植物, 经科学鉴定和临床验证, 绞股蓝具有扶正固本、增强体质、活化细胞、抗疲劳、抗溃疡、缓解衰老、降血压、降血脂、抗癌、健脑安神、改善肝功能、治疗脱发、滋润皮肤、美容减肥等多种功能^[1]。绞股蓝在我国分布广泛, 野生资源丰富。从20世纪80年代开始, 我国各地如广东、福建、陕西、浙江、湖北、江西、安徽、四川、山东、河北等省已引种栽培成功, 并开发出系列产品。近几年, 我国学者在绞股蓝的化学成分^[2]、提取工艺及分析方法^[3]、资源调查、生物学特性^[4]、药理作用^[5]、毒理、临床实验^[6]等方面, 取得了许多积极成果, 为开发利用绞股蓝提供了科学依据, 但有关绞股蓝种子生物学特性及发芽条件的研究和报道很少^[7]。

笔者曾经对绞股蓝种子进行不同温度、不同时

间的浸种处理, 研究其发芽率^[8]。本实验将进一步研究不同处理方式(包括机械处理、超声处理以及不同植物生长调节剂)对种子萌发的影响, 以期对绞股蓝规范化栽培提供理论依据和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料: 绞股蓝种子于2003年10月—2003年11月采收于陕西安康平利绞股蓝规范化种植基地, 为该基地近年来筛选的优良栽培种七叶绞股蓝。经陕西师范大学生命科学学院任毅教授鉴定为葫芦科(Cucurbitaceae)绞股蓝属植物绞股蓝 *G. pentaphyllum* (Thunb.) Makino。

1.2 种子分级方法: 用孔径为2.0 mm的铝筛分选, 去掉杂质和瘪粒, 筛面的种子为混级; 在混级种子中挑选籽粒饱满的作为一级, 剩余种子作为二级^[9]。测量混级种子大小(分5组, 每组30粒)、千粒

收稿日期: 2007-02-10

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA701A35)

作者简介: 赵瑜(1981—), 女, 陕西师范大学生命科学学院植物生物技术专业硕士。

* 通讯作者 肖娅萍 E-mail: yapingxiao@snnu.edu.cn

作者：[张秀省](#), [聂莉莉](#), [向蓓蓓](#), [王淑芳](#), [朱晔荣](#), [王勇](#), [ZHANG Xiu-sheng](#), [NIE Li-li](#),
[XIANG Bei-bei](#), [WANG Shu-fang](#), [ZHU Ye-rong](#), [WANG Yong](#)

作者单位：[张秀省, ZHANG Xiu-sheng\(聊城大学农学院, 山东, 聊城, 252000\)](#), [聂莉莉, 向蓓蓓, 王淑芳](#),
[朱晔荣, 王勇, NIE Li-li, XIANG Bei-bei, WANG Shu-fang, ZHU Ye-rong, WANG Yong\(南开大](#)
[学生命科学学院, 天津, 300071\)](#)

刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)

年, 卷(期)：2007, 38 (11)

被引用次数：1次

参考文献(4条)

1. [Van Der Heijden;Rjacobs D I;Snoeijer W](#) [The Catharanthus alkaloids:pharmacognosy and biotechnology](#) 2004 (05)
2. [Wang N N;Wang S F;Tian J Y](#) [Study on cell suspension culture of Catharanthus roseus crown gall cell induced by Agrobacterion C58](#) 1994 (03)
3. [Zhang X F;Zhang X X;Wang Y](#) [Effects of plant growth regulators on the accumulation of indole alkaloids in Catharanthus roseus calli](#)[期刊论文]-[植物生理学通讯](#) 2004 (03)
4. [Zhang X F;Zhang R T;Cao L](#) [Effects of different factors on accumulation of indole alkaloids in Catharanthus roseus calli](#)[期刊论文]-[中国药学杂志](#) 2004 (11)

引证文献(1条)

1. [向蓓蓓](#), [朱晔荣](#), [王勇](#) [长春花吲哚生物碱合成途径的基因工程研究进展](#)[期刊论文]-[生物学通报](#) 2010 (10)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200711042.aspx