

# 高产花色苷玫瑰茄细胞系的筛选

杜金华 郭勇

(华南理工大学生物工程研究所 广州 510641)

花色苷在植物中呈现粉红、红、紫红、紫等颜色,可以用作食品、药品及化妆品的着色剂,亦有药用价值。作为食品添加剂,颜色较合成色素自然,且安全无毒性。早在1987年, Mizukami<sup>[1]</sup>就建议用植物细胞培养物生产花色苷类代替合成色素。

所有的植物培养细胞都是异源性的,各细胞之间产花色苷的能力相差很大<sup>[2]</sup>。因为产花色苷的细胞系带有颜色标记,所以容易识别并通过肉眼选择即可获得高产花色苷的细胞系。筛选的方法很多,如平板饲喂法<sup>[3]</sup>、小细胞团法<sup>[4]</sup>、细胞块法<sup>[5]</sup>、肉眼观察直接挑选法及细胞分选器法<sup>[6]</sup>等。高产系花色苷的含量可增加几倍到几十倍,而且产量稳定。本文采用平板法及小细胞团法筛选高产花色苷的玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa* L.)细胞系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

第60代玫瑰茄愈伤组织。

### 1.2 培养基

采用B<sub>5</sub>培养基。内含(mg/L)KNO<sub>3</sub> 2500;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 250;(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 134;NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 150;CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 150;KI 0.75;H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 3.0;MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 10;ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0;Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25;CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.025;CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.025;Na<sub>2</sub>EDTA 37.31;FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 27.81;肌醇 100;烟酸 1.0;维生素B<sub>1</sub> 10.0;维生素B<sub>6</sub> 1.0;2,4-D 1.0;激动素(KT);固体培养时为0.2;悬浮培养时为0.1。蔗糖:20g/L;琼脂(固体培养基)5g/L。pH值5.8。培养基于0.1MPa灭菌20min。

### 1.3 愈伤组织培养及悬浮培养

采用B<sub>5</sub>培养基培养玫瑰茄愈伤组织。于25℃,27.3μmol/s·m<sup>2</sup>·16h/d光照培养,17d转代。悬浮培养采用B<sub>5</sub>培养液,106r/min旋转摇床培养,其它条件同愈伤组织培养。

### 1.4 平板培养

悬浮培养至对数生长期的玫瑰茄细胞过250μm铜网,单细胞得率为85.37%;2~3个细胞小团得率为8.95%;4~8个细胞小团占5.68%。调整细胞密度,取一定量的细胞悬液与冷却至35℃以下的B<sub>5</sub>固体培养基混匀,铺于φ9cm平板。培养条件同1.3。植板率(PE/%)以培养20d平板上出现的细胞克隆数占植板细胞总数的百分数来计算。

### 1.5 小细胞团培养

采用B<sub>5</sub>培养基,其中CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O为750mg/L,pH5.84,其余成分不变。于玫瑰茄愈伤组织的高色素区选择色深且颜色均一的小细胞团置于φ9cm平板上,每板放置16小团,密封。培养条件同前。20d后转接于50ml三角瓶中,进行继代培养。

### 1.6 花色苷含量、产量的测定

玫瑰茄愈伤组织的干重、花色苷产量以100ml三角瓶中装有50mlB<sub>5</sub>固体培养基时的干重、产量计。

培养细胞收获, 低于 40℃ 干燥至恒重, 称重。取湿细胞 1g, 用 1% HCl 甲醇溶液于 4℃ 浸提 24h, 花色苷含量测定同 Mizukami<sup>[1]</sup> 介绍的方法。将色素含量乘以培养物产量即得花色苷的产量, 单位为 mg。文中结果均为三次重复试验的平均值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞生长与植板率的关系

植板细胞的生长年龄与克隆的形成密切相关。处于对数生长期的细胞更容易诱导分裂, 植板率高。悬浮培养 8d 左右的玫瑰茄细胞植板率最高(图 1)。

### 2.2 pH 值与植板率的关系

培养基 pH 值影响细胞膜的通透性, 进一步影响到营养物质的运输及细胞对内源代谢物流失的控制, 从而影响到细胞克隆的形成与生长。玫瑰茄细胞克隆的最适 pH 值为 5.84(图 2)。

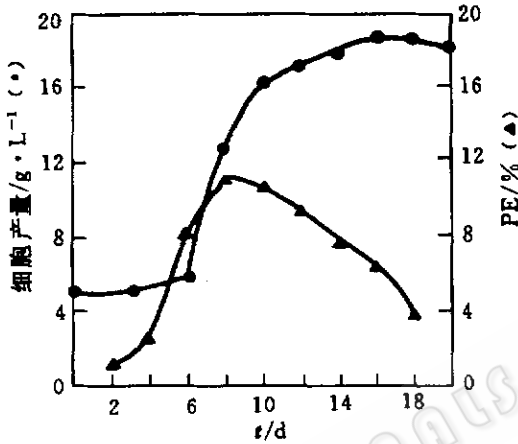


图 1 细胞生长与植板率的关系

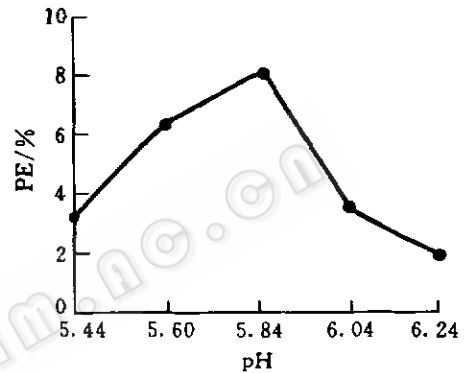


图 2 pH 值对植板率的影响

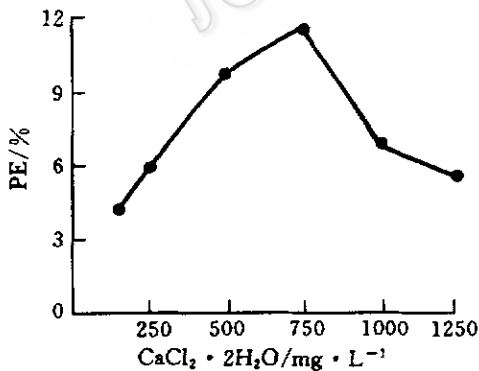


图 3 CaCl<sub>2</sub> 对植板率的影响

### 2.3 CaCl<sub>2</sub> 对植板率的影响

钙参与植物细胞壁的组成, 调节细胞膜的透性。并且调节细胞的生长和分裂<sup>[8]</sup>。当培养基中 CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 含量为 750mg/L 时, 玫瑰茄细胞植板率最高(图 3)。据报道, 高浓度的钙能提高人参细胞的植板率<sup>[11]</sup>, 并能有效地促进植物培养细胞生产花色苷<sup>[9,10]</sup>。

### 2.4 细胞密度对植板率的影响

细胞密度与植板率的关系列于表 1。植板细胞密度大, 植板率就高; 同时细胞系挑出困难, 细胞密度低于  $6 \times 10^3$ /ml 时, 植板率急剧下降。

用平板法共选出 50 株产花色苷的细胞系。

### 2.5 小细胞团法

用小细胞团法筛选产花色苷的玫瑰茄细胞系。小细胞团的再生率可达 80%。在挑出的 200 个小团中, 有 163 个成活, 与前面挑出的细胞系一同进行继代培养。此期间淘汰色浅及含有黄色愈伤组织的不纯细胞系, 继代培养 10 次。稳定的玫瑰茄细胞系中花色苷含量最高者为 2.33% (g/g, dw), 产量为 13.44mg, 分别比对照(筛选前)提高了 14.5 倍(0.15% (g/g, dw)) 与 16 倍(0.79mg)。通过筛选获得了

高产花色苷的玫瑰茄细胞系。而且这种筛选导致的花色苷积累并不是基因突变的结果<sup>[7]</sup>。

表 1 细胞密度与植板率的关系

细胞密度/ $\times 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$	1	2	4	6	8	10
PE/%	0	0	0.63	8.13	9.47	12.01

平板法与小细胞团法均能选出高产花色苷的玫瑰茄细胞系。作为一种筛选方法,后者比前者更直观,操作更简捷。

### 参 考 文 献

- [1] Mizukami H, Tomita K. *Plant Cell Rep*, 1988, 7:533~556.
- [2] Hall R D, Yeoman M M. *J Exp Bot*, 1987, 38(193):1391~1298.
- [3] Fujiwara A. *Plant Tissue Culture*, Marazeh, Toyko, 1982, p273.
- [4] Ozeki Y, Komamine A. *Physiol Plant*, 1981, 53:570~577.
- [5] Yamamoto Y, Mizuguchi R. *Theor Appl Genet*, 1982, 61:113~116.
- [6] Sakamoto K, Kumiko I. *Planta Med*, 1994, 60: 253~259.
- [7] Dougall D K. *Planta*, 1980, 149(3):292~297.
- [8] Bellini C. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, 23: 27~37.
- [9] Suvarnalatha G, Rajendran L. *Biotechnol Lett*, 1994, 16(12), 1275~1280.
- [10] Yamamoto Y. *Agric Bio Chem*, 1989, 53(2); 417~423.
- [11] 罗建平,郑光植. *生物工程学报*, 1993, 9(4):337~341.

## The Selection of Anthocyanins High Production Cell Lines from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Cell Cultures

Du Jinhua Guo Yong

(*Biotechnology Institute of South China Technology University, Guangzhou 510641*)

**Abstract** High production anthocyanins roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) cell lines were selected by both single cell clone plate culture and small cell aggregate culture. The cell suspension cultures for 8 days were most favourable for the formation of cell clones. When pH value was 5.84 as well as  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  concentration was 750mg/L of  $\text{B}_5$  medium, the plating efficiency (PE) could be intensively increased. There was a low PE when the cell plating density was no more than  $6 \times 10^3/\text{ml}$ . Homogenous and dark color samll cell aggregates were selected in high-conten pigment areas of roselle callus and cultivated in  $\text{B}_5$  medium (pH5.84;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :750mg/L). Both red cell lines and cell aggregates selected from cultures were subcultured succesfully for 10 generations. The anthocyanin content in high production cell line was 2.33% (g/g dw.), as high as 14.5 times of the control.

**Key words** Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), cultured cell, anthocyanin, selection