

8-14

热带亚热带植物学报 1998, 6(1):8-14
Journal of Tropical and Subtropical Botany

甜菊愈伤组织生长、分化与甜菊糖苷积累的关系

谢绍萍 欧阳学智

(中山学院, 中山 528403)

洪维廉[△] 陈睦传 汪德耀

(厦门大学细胞生物学研究室, 厦门 361005)

摘要 甜菊 (*Stevia rebaudiana*) 愈伤组织中甜菊糖苷的积累与愈伤组织的生长呈负相关, 与愈伤组织细胞的组织化及转绿呈正相关。愈伤组织芽的分化并不是积累较高水平甜菊糖苷的必要前提, 绿色、质地致密、生长缓慢的愈伤组织, 不论有芽分化或无芽分化时, 其甜菊糖苷含量均较高。在电镜下观察到, 这两种愈伤组织细胞具有类似的超微结构特征: 细胞高度液泡化; 叶绿体发育成熟, 光合膜系统结构发达, 基质浓厚且含有质体小球; 微体具有典型的晶格结构, 常与叶绿体紧密相靠, 黄色, 质地致密、生长缓慢的愈伤组织中甜菊糖苷含量较低, 其细胞内质体富含淀粉粒, 只有少量分散的片层结构, 有的质体甚至完全被淀粉粒所充塞, 黄色、质地疏松、生长快速的愈伤组织中甜菊糖苷含量最低, 其细胞内质体结构简单, 片层稀少。质体的发育和液泡的分化与甜菊糖苷的积累密切相关, 愈伤组织具有较高的甜菊糖苷含量在于愈伤组织细胞的组织化以及细胞的高度液泡化并具有发育成熟的叶绿体。

关键词 甜菊; 组织培养; 甜菊糖苷; 超微结构

分类号 Q944.6

56.66.9035-3

THE GROWTH AND DIFFERENTIATION OF CALLUS CULTURES OF *STEVIA REBAUDIANA* IN RELATION TO THE STEVIOSIDE ACCUMULATION

Xie Shaoping Ouyang Xuezhi

(Zhongshan College, Zhongshan 528403)

Hong Weilian Chen Muchuan Wang Deyao

(Research Laboratory of Cell Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Stevioside accumulation in callus cultures derived from *Stevia rebaudiana* leaf explants was studied during callus growth and differentiation. Increase in stevioside content was positively related to the organization of cells and greening of the cultures, and inversely to the callus growth. Shoot formation in calli was not essential for the synthesis of stevioside. The content of stevioside was highest in slow-growing, compact and green calli either with or without shoot formation. Electron microscope observation showed that

国家自然科学基金资助项目

1997-03-27 收稿; 1997-11-11 修回

these two kinds of callus cells were highly vacuolated and contained fully developed chloroplasts which had dense stromata and plastoglobuli. The microbodies containing crystal lattices were closely associated with chloroplasts. Slow-growing, compact, but yellow calli accumulated lowest stevioside, the plastido in cells of which contained many starch grains with few dispersed lamellae, and some plastids were even filled with starch grains. However, lowest stevioside content was found in fast-growing, loose and yellow calli in which the cell plastids were simple in structure and having only few lamellae. The results showed that stevioside accumulation was closely related to plastid development and vacuole differentiation, suggesting that the organization of callus cells with well development of vacuoles and chloroplasts caused highest stevioside content in slow-growing, compact and green calli.

Key words *Stevia rebaudiana*; Tissue culture; Stevioside; Ultrastructure

植物细胞的大量培养是工业化生产植物次生代谢产物的有效途径之一,但在多数情况下,培养细胞合成某些次生代谢产物的能力下降甚至消失^[1,2]。影响培养细胞中次生代谢产物积累的因素很复杂^[3],对于多数植物来说,培养细胞的迅速生长和脱分化而导致次级代谢活性减弱甚至暂时丧失是其中的主要原因^[4,5]。尽管人们对培养细胞的生长、分化与次生代谢产物积累的关系进行过很多研究^[5-7],但对其机理至今仍不十分清楚,且培养细胞中次生代谢产物积累与细胞超微结构水平分化的关系研究尚少。甜菊糖苷主要是甜菊叶片中分离出来的二萜糖苷,具有高甜度、低热量、无毒性等特点,对糖尿病、肥胖病、高血压等疾病有一定的疗效,是一种大有前途的新糖源^[8]。本文报道甜菊组织培养中愈伤组织生长状况、不同水平的形态分化与甜菊糖苷积累的相关性,为进一步揭示植物培养物生长、分化与次生代谢产物积累相关性的机理和生产甜菊糖苷的实践提供资料。

1 材料和方法

愈伤组织的诱导和培养 供试材料为甜菊(*Stevia rebaudiana*)盆栽植株的幼叶。将组织用常规方法消毒后把叶片切成小块,接种到MS+2,4-D 1 mg L⁻¹(单位下同)+6-BA 0.5的培养基上诱导愈伤组织。3周后将愈伤组织从外植体上分离,转接到MS+NAA 2+KT 0.5培养基上进行继代培养,以后每4周继代1次,连续继代培养5次以上,建立较稳定的愈伤组织无性繁殖系。生长量用平均每块愈伤组织干重增加的mg数表示。各种培养基均附加蔗糖30 g L⁻¹,琼脂8 g L⁻¹,pH5.8,培养温度26±1℃,光照12 h d⁻¹,照度3 000 Lx。

愈伤组织的分化 将继代培养3周龄、生长旺盛的愈伤组织切成若干小块,转接到以下附加不同激素的分化培养基上培养:(1)MS+6-BA 0.5、2、10;(2)MS+KT 0.5、2、10;(3)MS+6-BA 2+NAA 0.5。培养条件同上。芽的分化率以产生芽的愈伤组织占总的愈伤组织(60块)的百分率表示。

甜菊糖苷含量的测定 待测材料于60℃烘干至恒重,然后研成细粉。甜菊糖苷的提取、

分离和含量测定基本上参照韦业成^[9]的方法, 但改用重蒸水提取。提取液经除杂质、萃取和浓缩后, 用重蒸水定容, 即得甜菊糖苷待测液。经硫酸萘酚显色后, 用 721 型分光光度计在 620 nm 处测其光密度值, 从标准曲线中查出样液的溶质重量, 计算甜菊糖苷占干重的百分含量。结果均为两次测定的平均值。

叶绿素含量的测定 按 DMSO 法^[10]以二甲亚砜提取叶绿素, 用 721 型分光光度计在 645 nm 和 663 nm 处测定光密度值, 计算总叶绿素含量, 以 $\text{mg g}^{-1}\text{FW}$ 表示。

透射电镜样品制备及观察 将待测的愈伤组织取出, 放入盛有戊二醛固定液的培养皿中, 切取小块, 迅速投入 pH7.2 磷酸缓冲液配制的 4% 戊二醛中, 抽气后在 4℃ 下固定 5 h 以上。用相同的缓冲液充分漂洗, 然后转入用上述缓冲液配制的 1% 锇酸中固定 2 h。用相同的缓冲液充分漂洗后, 系列酒精脱水, 经环氧丙烷过渡到环氧树脂 EPON 812 中渗透和包埋。在 LKB 11800 型超薄切片机上切片, 切片用醋酸铀和柠檬酸铅双染。在 JEM-100CX II 型透射电镜下观察和照相。

2 实验结果

2.1 愈伤组织干重、叶绿素和甜菊糖苷含量的变化

如图 1 所示, 甜菊愈伤组织的生长曲线呈 S 型。愈伤组织的干重, 在培养的第一、二周增加缓慢, 第三、四周迅速增加, 以后趋于稳定。在整个生长周期里, 愈伤组织中叶绿素含量和甜菊糖苷含量的变化趋势一致。培养三周的愈伤组织生长速率最大时, 叶绿素和甜菊糖苷的含量则下降至最低水平; 第六周, 愈伤组织生长缓慢但叶绿素和甜菊糖苷含量最高。这说明, 甜菊愈伤组织中甜菊糖苷的积累与愈伤组织的生长呈负相关, 与愈伤组织的转绿呈正相关。

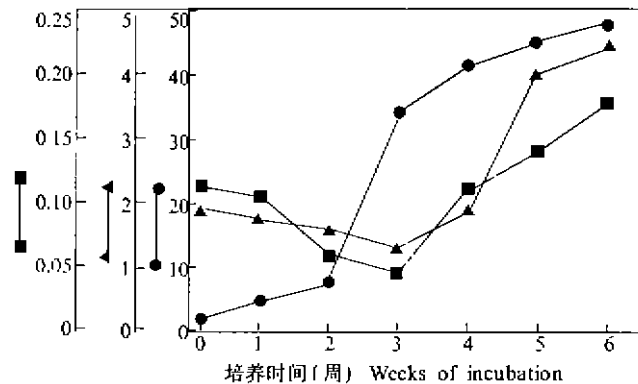


图 1 愈伤组织干重、叶绿素和甜菊糖苷含量的变化
(培养基: MS+NAA 2+KT 0.5 mg L⁻¹)

Fig. 1 Changes in the dry weight (●), chlorophyll content (■) and stevioside content (▲) of *S. rebaudiana* callus tissues cultured on MS medium +NAA 2 +KT 0.5 mg L⁻¹

●—● 干重 Dry weight (mg piece⁻¹)
▲—▲ 甜菊糖苷含量 Stevioside (%)
■—■ 叶绿素含量 Chlorophyll (mg g⁻¹FW)

2.2 愈伤组织的分化

甜菊愈伤组织在几种不同激素及配比的分化培养基上培养的结果表明, 6-BA 在 0.5–2 范围内, 芽分化率随 6-BA 浓度增大而增加, 6-BA 为 10 时, 则抑制芽的分化。KT 在 0.5–10 范围内作用不明显。用 6-BA 2 和 NAA 0.5 组合的分化培养基, 芽分化率最高, 达 62%。

2.3 不同形态特征愈伤组织中甜菊糖苷的含量

绿色、质地致密、生长缓慢的愈伤组织中, 不论有芽分化或无芽分化时, 其甜菊糖苷含量

接近,均较高(表1)。表明愈伤组织芽的分化并不是积累较高水平甜菊糖苷的必要前提。在电镜下观察到,这两种愈伤组织细胞具有类似的超微结构特征:细胞高度液泡化(图版I:1,5);叶绿体发育成熟,长椭圆形,外由双层被膜包围,光合膜系统发达,有许多与叶绿体长轴近似平行排列的基粒片层和基质片层,基质浓厚且含有质体小球(图版I:1,2,5,6);微体具有典型的晶格结构,常与叶绿体紧密相靠(图版I:1,2,6)。黄色,质地致密,生长缓慢的愈伤组织中甜菊糖苷含量较低,其细胞内质体富含淀粉粒,只有少量分散的片层(图版I:7),有的质体甚至完全被淀粉粒所堵塞(图版I:8)。黄色、质地疏松,生长快速的愈伤组织中甜菊糖苷含量最低,其细胞内的质体结构简单,片层稀少(图版I:4);质体数量较少,细胞核浓密,线粒体内嵴发达,还可观察到微体和脂肪体(图版I:3)。以上结果表明,甜菊愈伤组织细胞的聚集组织化,质体的发育和液泡的分化与甜菊糖苷的积累密切相关。

3 讨论

3.1 培养细胞生长与次生代谢产物积累的关系

在整体植物中,当植物迅速生长时,并不积累或只积累很少的次生产物,而在植物生长缓慢进入成熟甚至衰老阶段,才积累较多的次生产物。在植物组织培养中也观察到,大多数情况下,正在迅速生长的培养物中,次生代谢产物的含量也很低。Yeoman等^[6]认为代谢产物的积累与培养细胞的生长成负相关,大多数植物的培养细胞在生长周期的后期才开始大量合成次生代谢产物。我们的试验也观察到,在生长周期的后期,愈伤组织生长缓慢、趋于稳定但甜菊糖苷含量却达到最高;生长迅速、质地疏松的愈伤组织中甜菊糖苷含量比生长缓慢、质地致密的愈伤组织中的要低。这可能是由于当细胞处于迅速分裂和生长阶段,需要合成大量的核酸、蛋白质和糖类等物质,初级代谢占绝对优势。对植物细胞生长有利的成分,往往对其次生代谢产物的积累不利。因此,如何使代谢方向从初级代谢向次级代谢转换,是提高次生产物产量的重要问题。但次生产物的产量是建立在一定的生物量基础之上。所以,在培养中要尽可能使两者达到平衡,既要有足够的生物量,又不致于使次生产物的产量降低太多。Fujita等^[11]在紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)大量培养的研究中建立了二步培养体系:先在生长培养基上诱导细胞的快速生长,当达到一定的生物量之后再转移到生产培养基上培养,此时细胞生长缓慢甚至停止,从而进入合成紫草宁的次生代谢途径。

3.2 培养细胞的形态分化与次生代谢产物积累的关系

在离体培养条件下,一定程度上形态分化的外植体细胞或继代培养中静止期细胞又脱分化,使原有的形态结构发生很大变化^[12],细胞的生理生化特性也随之发生相应的变化,从而可

表1 不同表型特征愈伤组织中甜菊糖苷的含量

Table 1 Stevioside content in *S. rebaudiana* callus tissues with different appearances

表型特征 Appearance		生长情况 Growth	甜菊糖苷含量 Stevioside (%)
有芽分化 With shoot	绿色、质地致密 Green, compact	慢 Slow	5.78
无芽分化 Without shoot	绿色、质地致密 Green, compact	慢 Slow	5.37
	黄色、质地致密 Yellow, compact	慢 Slow	2.13
	黄色、质地疏松 Yellow, loose	快 Fast	0.96

培养基: MS+6-BA 2+NAA 0.5; 培养6周。

Cultured on MS medium +6-BA 2+NAA 0.5 for 6 weeks.

能使培养细胞合成某种次生代谢产物的合成能力下降或丧失。Yeoman等^[7]认为次生代谢产物的积累与培养细胞的分化程度成正相关。培养细胞的形态分化,包括细胞显微或超微结构和功能的变化、细胞的聚集组织化、器官发生和胚状体形成。

已有不少报道,次生代谢产物的形成或高水平的积累需要培养物经过器官发生^[3,14]或胚状体形成^[4]。本研究发现甜菊愈伤组织芽的分化不是积累甜菊糖苷的必要前提,但甜菊糖苷的积累与愈伤组织细胞的组织化及转绿成正相关。

细胞的组织化对正常细胞代谢的进行很重要。已有不少证据^[5,15]表明,致密的、聚集组织化的细胞培养物比松散的、无组织的细胞培养物积累更多的次生代谢产物。本实验结果也是如此。这可能是由于培养物细胞的组织化,使细胞与细胞彼此之间紧密接触,有利于细胞与细胞之间的联络,形成光照、营养物质、机械压力等物理、化学上的梯度,接近于整体植物细胞的代谢环境,从而有利于次生代谢产物的积累。

细胞的次级代谢是以一定结构为基础的,它受酶、底物、终产物在细胞内的区域化所调节。细胞内特异合成、贮藏空间的分化对次生代谢产物的形成和积累是必要的^[6]。已有实验证实^[7,18],质体是二萜化合物—赤霉素、蓖麻素(Casbene)生物合成的重要亚细胞场所。贝壳杉烯合成酶是二萜生物合成中的关键酶之一^[8]。Railton等^[17]在几种高等植物中发现,贝壳杉烯合成酶的活性主要存在于质体基质中,但其活性的发挥依赖于质体膜系的发育。甜菊糖苷是由一个四环二萜非糖配基和三个葡萄糖分子组成的,其非糖配基—甜菊醇(Steviol)是由乙酸和甲羟戊酸经异戊二烯途径合成贝壳杉烯和贝壳杉烯酸,然后在贝壳杉烯酸的C-13位发生羟基化而形成的^[9]。甜菊醇的生物合成途径与赤霉素类似,其合成部位可能也定位于质体。洪维廉等^[20]研究了甜菊不同叶龄细胞结构及其甜菊糖苷含量分布,表明在甜菊整体植株中,甜菊糖苷主要在叶片细胞中合成和积累,其含量与叶片的发育状态密切相关,成叶中甜菊糖苷含量达到最高,此时叶肉细胞内叶绿体片层结构发达,具有大的中央液泡,并初步认为液泡是甜菊糖苷主要的贮藏场所。我们用电镜观察结果表明,甜菊糖苷含量较高的绿色而致密的愈伤组织细胞高度液泡化,细胞内具有片层结构发达的叶绿体;而甜菊糖苷含量较低的黄色而疏松的愈伤组织细胞内质体只有少量的片层。可见,质体的发育和液泡的分化与甜菊糖苷的合成和积累密切相关。由此推测,生长缓慢、质地致密、绿色的愈伤组织甜菊糖苷含量较高,是由于愈伤组织细胞的组织化以及细胞的高度液泡化并具有发育成熟的叶绿体所致。

参考文献

- 1 Fowler M W. Plant cell biotechnology to produce desire substances. *Chemical and Industry*, 1981, 4:229-233
- 2 Tabata M. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In: Barz W, Reinhard E, Zenk M H eds. *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*. Berlin, Heidelberg and New York: Springer-Verlag, 1977, 3-16
- 3 Fowler M W. Plant cell culture: natural products and industrial application. *Genet Eng Rev*, 1984, 2:41-68
- 4 Ozeki Y, Komamine A. Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in carrot suspension culture: Correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. *Physiol Plant*, 1981, 53:570-577
- 5 Lindsey K, Yeoman M M. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell

- cultures J Exp Bot, 1983, 34(145):1055-1065
- 6 Yeoman M M, Miedzybrodzka M B, Lindsey K et al. The synthetic potential of cultured plant cells. In: Sala F, Parisi B, Cella R et al eds. *Plant Cell Cultures: Results and Perspectives*. Amsterdam: Elsevier-North Holland, 1980, 327-343
 - 7 Yeoman M M, Miedzybrodzka M B, Mclauchlan W R. Accumulation of secondary products as a facet of differentiation in plant cell and tissue cultures. In: Yeoman M M, Truman D E S eds. *Differentiation in vitro*. British Society for Cell Biology Symposium, Vol. 4. Cambridge: Chambridge University, 1982, 65-82
 - 8 Osamu T. Steviol-glycosides: New natural sweeteners. *Trend Anal Chem*, 1982, 1(11):246-248
 - 9 韦业成. 甜菊总苷定量测定的新方法. *食品科学*, 1983, (7):25-27
 - 10 张其德. 测定叶绿素的几种方法. *植物学通报*, 1985, 3(5):60-64
 - 11 Fujita Y, Hara Y, Suga C et al. Production of shikonin derivation by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports*, 1981, 1:61-64
 - 12 谢绍萍, 欧阳学智, 汪德耀. 甜菊组织培养物中叶绿体的超微结构与脱分化. *热带亚热带植物学报*, 1995, 3(1):41-48
 - 13 Hagimori M, Matsumoto T, Obi Y. Studies on the production of *Digitalis cardenolides* by plant tissue culture. II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L grown in liquid media. *Plant Physiol*, 1982, 69:653-656
 - 14 Kamo K K, Komoto W, Hsu A F et al. Morphinane alkaloids in cultured tissues and re-differentiated organs of *Papaver somniferum*. *Phytochem*, 1982, 21:219-222
 - 15 Takeda R, Katoh K. Growth and sesquiterpenoid production by *Culypogeia granulata* Inoue cells in suspension culture. *Planta*, 1981, 151:525-530
 - 16 Simola L K, Koskimies K. Comparison of glycolipids and plastids in callus cells and leaves of *Alnus* and *Betula*. *Plant & Cells Physiol*, 1984, 25(8):1329-1340
 - 17 Railton I D, Fellows B, Charles A W. Ent-kaurene synthesis in chloroplasts from higher plants. *Phytochem*, 1984, 23(6):1261-1267
 - 18 Simcox P O. Kaurene synthetase from plastids of developing plant tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 1975, 66:166-172
 - 19 Hanson J R, White A F. Studies in terpenoid biosynthesis. II. The biosynthesis of steviol. *Phytochem*, 1968, 7: 595-597
 - 20 洪维康, 陈陆传, 李里焜等. 甜菊不同叶龄细胞结构及其甜菊糖苷含量分布的研究. *武汉植物学研究*, 1987, 5(3): 211-218

图版说明

Ch—叶绿体; Cw—细胞壁; L—脂肪体; M—线粒体; Mb—微体; N—细胞核; P—质体; Pg—质体小球;
S—淀粉粒

1-2. 无芽分化、绿色、致密、生长缓慢的愈伤组织细胞的超微结构。

1. 细胞高度液泡化; 叶绿体光合膜系统结构发达, 基质浓厚。×37 700

2. 示叶绿体光合膜系统结构发达, 基质浓厚且含有质体小球; 微体具有典型的晶格结构, 常与叶绿体紧密相靠。×25 400

- 3-4. 黄色、疏松、生长快速的愈伤组织细胞的超微结构。
3. 示细胞核、线粒体、微体和脂肪体。×18 000
4. 示质体结构简单，光合片层稀少。×38 000
- 5-6. 有芽分化、绿色、致密、生长缓慢的愈伤组织细胞的超微结构。
5. 细胞高度液泡化；叶绿体光合膜系统结构发达，基质浓厚且含有质体小球。×42 800
6. 示叶绿体光合膜系统结构发达，基质浓厚且含有质体小球；微体具有典型的晶格结构，常与叶绿体紧密相靠。×29 000
- 7-8. 黄色、致密、生长缓慢的愈伤组织细胞内质体富含淀粉粒。
7. 示质体内有少量分散的片层结构。×13 000
8. 示质体完全被淀粉粒充塞。×17 800

Explanation of plate

Ch— Chloroplast; Cw— Cell wall, L— Liposome; M— Mitochondrion; Mb— microbody; N— Nucleus, P— Plastid;
Pg— Plastoglobulus; S— Starch grain

- 1-2. Ultrastructure of slow-growing, compact and green callus cells without shoot formation.
1. Highly vacuolated cells and the chloroplast with rather well developed photosynthetic lamellae and dense stromata. ×37 700
2. The chloroplast with rather well developed photosynthetic lamellae, dense stromata and plastoglobuli. Microbody containing crystal lattices closely associated with the chloroplast. ×25 400
- 3-4. Ultrastructure of fast-growing, loose and yellow callus cells.
3. Showing nucleus, mitochondria, microbody and liposome. ×18 000
4. The plastid was simple in structure with less lamellae. ×38 000
- 5-6. Ultrastructure of slow-growing, compact and green callus cells with shoot formation.
5. The highly vacuolated cell and the chloroplast with rather well developed photosynthetic lamellae, dense stromata and plastoglobuli. ×42 800
6. The chloroplast with rather well developed photosynthetic lamellae, dense stromata and plastoglobuli. Microbody containing crystal lattices closely associated with chloroplast. ×29 000
- 7-8. The plastid containing many starch grains in slow-growing, compact and yellow callus cells.
7. Showing a few dispersed lamellae in plastid. ×13 000
8. Showing the plastid filled with starch grains. ×17 800