

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/04

A01H 4/00 C07D493/14



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00117506.8

[43] 授权公告日 2003 年 5 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1108373C

[22] 申请日 2000.10.18 [21] 申请号 00117506.8

[71] 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山

[72] 发明人 曾鑫年 谢建军

审查员 郭晓勇

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

代理人 伍宏达

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 鱼藤酮离体生物合成生产方法

[57] 摘要

本发明涉及植物离体组织培养生产有用次生代谢物的生物技术。发明包括愈伤组织诱导、愈伤组织生长培养、愈伤组织的分化合成和鱼藤酮的提取，并提出了适合离体培养细胞生长和鱼藤酮合成积累的培养基、培养条件(如光强、温度)和培养周期。发明还提出了鱼藤酮生物合成前体物在离体生物合成中的应用。通过离体培养生产鱼藤酮可以避免田间活体栽培生产途径所存在的不足，节省耕地、缩短生产时间、降低成本，而且可以不受外界环境条件的限制，达到可持续工业化生产的目的。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 鱼藤酮离体生物合成生产方法，其特征在于鱼藤酮离体生物合成，包括愈伤组织诱导、愈伤组织生长培养、愈伤组织的分化合成和鱼藤酮的提取；

(1)愈伤组织诱导：取能够产生鱼藤酮的植物，如豆科的鱼藤、山毛豆等的外植体，经灭菌消毒后，在无菌条件下，剪切成小块，置于添加有6-BA 2.253 μ g/ml + 2,4-D 2.210 μ g/ml，琼脂 0.8%，蔗糖 30 g/L，pH 值 5.8 的 MS 基本培养基上，在光照为光：暗=12：12 小时，光强约为 2000 勒克斯，相对湿度 80 \pm 5%，温度 28 \pm 2.5 $^{\circ}$ C的培养室内离体培养获得的愈伤组织块；

(2)愈伤组织生长培养：将愈伤组织块切分后，接入经改良后的 MS 培养基中，在光照为光：暗=12：12 小时，光强约为 4200 勒克斯，相对湿度 80 \pm 5%，温度 30 \pm 2.0 $^{\circ}$ C，和通气的条件下培养可获得最大的生物量；改良的 MS 培养基配方为：微量元素与大量元素的浓度与 MS 培养基一致，有机物为 MS 培养基中浓度的 2 倍，蔗糖为 50g/L，0.8%琼脂，激素组合为 6-BA 0.225 μ g/ml + 2,4-D 6.630 μ g/ml，pH 值为 6.0；

(3)愈伤组织分化合成培养：将按愈伤组织块，接入愈伤组织分化合成培养基中，在光照为光：暗=12：12 小时，光强约为 1100 勒克斯，相对湿度 80 \pm 5%，温度 30 \pm 2.0 $^{\circ}$ C，和通气的条件下培养，使愈伤组织分

化出根和合成鱼藤酮，此后转入黑暗条件下继续培养，使离体生物合成的鱼藤酮积累；用于愈伤组织分化合成的培养基配方，其各成分与(2)的改良 MS 培养基相同，但激素改为 $0.1 \mu\text{g/ml}$ NAA，pH 值改为 6.5；

(4) 离体生物合成的鱼藤酮的提取：采用有机溶剂索氏提取或浸渍提取，用一定量的有机溶剂对烘干磨碎后的离体培养物进行抽提，获得的抽提液，经过滤、浓缩，用色谱法精制获得鱼藤酮。

2. 根据权利要求 1 所说鱼藤酮离体生物合成生产方法，其特征在于在愈伤组织分化合成培养的培养基中添加鱼藤酮生物合成前体化合物苯丙氨酸，其加入量为 $100\text{--}150 \mu\text{g/ml}$ 。

3. 根据权利要求 1 所说鱼藤酮离体生物合成生产方法，其特征在于愈伤组织分化出根后，转入黑暗条件下继续培养 5-10 天。

鱼藤酮离体生物合成生产方法

本发明涉及生物技术，尤其是涉及植物离体组织培养生产有用次生代谢物技术。

鱼藤酮是著名的植物源杀虫活性成份，具有高效、低毒、低抗性和无环境污染的特点，可用作防治果树、蔬菜、茶叶、花卉和粮食作物上的数百种害虫及蚊蝇等卫生害虫的良好杀虫剂。目前，鱼藤酮的来源主要通过田间栽培鱼藤根获得，产量受地域和季节的限制，且含量不稳定，生产时间长，占用耕地，导致产量偏低和生产成本相对过大等问题。

本发明的目的在于提供一种鱼藤酮的离体生物合成生产方法，利用能够产生鱼藤酮的植物，如豆科的鱼藤、山毛豆等的外植体进行离体培养生物合成鱼藤酮，克服目前鱼藤酮只靠田间种植鱼藤根获得，占用耕地、受环境条件影响大和资源有限等不足。

本发明包括愈伤组织诱导、愈伤组织生长培养、愈伤组织分化合成和鱼藤酮的提取几个程序，具体的实现步骤如下：

1. 愈伤组织诱导：取能够产生鱼藤酮的植物，如豆科的鱼藤、山毛豆等的外植体，经灭菌消毒后，在无菌条件下，剪切成小块，置于添加有 6-BA 2.253 μ g/ml + 2,4-D 2.210 μ g/ml，琼脂 0.8%，蔗糖 30 g/L，pH 值 5.8 的 MS 基本培养基上，在光照为光：暗=12：12 小时，光强约为 2000 勒克斯，相对湿度 80 \pm 5%，温度 28 \pm 2.5 $^{\circ}$ C 的培养室内离体培养获得愈伤组

织块。

2. 愈伤组织生长培养：将上述的愈伤组织块经切分后，接入经改良后的 MS 培养基中，在光照为光：暗=12：12 小时，光强约为 4200 勒克斯，相对湿度 $80 \pm 5\%$ ，温度 30 ± 2.0 °C，和通气的条件下培养可获得最大的生物量。改良的 MS 培养基配方为：微量元素与大量元素的浓度与 MS 培养基一致，有机物为 MS 培养基中浓度的 2 倍，蔗糖为 50g/L，0.8%琼脂，激素组合为 6-BA $0.225 \mu\text{g/ml}$ + 2,4-D $6.630 \mu\text{g/ml}$ ，pH 值为 6.0。

3. 愈伤组织的分化合成培养：将生长培养增长后的愈伤组织转入愈伤组织分化合成用培养基中，在光照为光：暗=12：12 小时，光强约为 1100 勒克斯，相对湿度 $80 \pm 5\%$ ，温度 30 ± 2.0 °C，和通气的条件下培养，使愈伤组织分化出根和合成鱼藤酮，此后转入黑暗条件下继续培养 5-10 天，使离体生物合成的鱼藤酮积累。

用于愈伤组织分化合成的培养基配方，其各成分与步骤 2 的改良 MS 培养基相同，但激素改为 $0.1 \mu\text{g/ml}$ NAA，pH 值改为 6.5。为了促进鱼藤酮离体生物合成，在培养基中添加 $100-150 \mu\text{g/ml}$ 苯丙氨酸作为鱼藤酮生物合成的前体化合物。

4. 鱼藤酮的提取：采用有机溶剂索氏提取或浸渍提取。用一定量的有机溶剂对烘干磨碎后的离体培养物进行抽提，获得的抽提液，经过滤、浓缩，用色谱法精制获得鱼藤酮。

本发明中使用的主要设备有高压灭菌锅、无菌操作台。离体生物合成的鱼藤酮含量可用 HPLC 法分析。

利用离体培养的技术以生物合成的途径生产鱼藤酮具有独特的优势和意义：通过离体培养生产鱼藤酮可以避免田间栽培所带来的不利因素，节省耕地、缩短生产时间、降低成本，而且可以不受外界环境条件的限制，达到可持续工业化生产的目的。

实施例：

取鱼藤的健康幼嫩叶片为外植体，用 0.1%升汞溶液浸渍 8-10 分钟，经灭菌消毒后，在无菌条件下，剪切成小块，置于添加有 6-BA 2.253 $\mu\text{g/ml}$ + 2,4-D 2.210 $\mu\text{g/ml}$ ，琼脂 0.8%，蔗糖 30 g/L，pH 值 5.8 的 MS 基本培养基上，在光照为光：暗=12：12 小时，光强约为 2000 勒克斯，相对湿度 80 \pm 5%，温度 28 \pm 2.5 $^{\circ}\text{C}$ 的培养室内离体培养 25-30 天，获得细胞疏松、乳白色、生长良好的愈伤组织块。

取上述愈伤组织块，切分成小块后接入经改良的 MS 培养基中，在光照为光：暗=12：12 小时，光强约为 4200 勒克斯，相对湿度 80 \pm 5%，温度 30 \pm 2.0 $^{\circ}\text{C}$ ，和通气的条件下培养 30 天，可获得最大的生物量，平均干重增重 7.03 倍。改良的 MS 培养基配方为：微量元素与大量元素的浓度与 MS 培养基一致，有机物为 MS 培养基中浓度的 2 倍，蔗糖为 50g/L，0.8% 琼脂，激素组合为 6-BA 0.225 $\mu\text{g/ml}$ + 2,4-D 6.630 $\mu\text{g/ml}$ ，pH 值为 6.0。

将经生长培养增大后的愈伤组织块，转接入愈伤组织分化合成用的培养基中，其配方：各成分与上述改良 MS 培养基相同，但激素改为 0.1 $\mu\text{g/ml}$ NAA，pH 值改为 6.5，并添加 100-150 $\mu\text{g/ml}$ 苯丙氨酸作为鱼藤酮生物合成的前体化合物。在光照为光：暗=12：12 小时，光强约为 1100 勒克斯，

相对湿度 $80 \pm 5\%$ ，温度 30 ± 2.0 °C，和通气的条件下培养 25 天，使愈伤组织分化出根和合成鱼藤酮，此后转入黑暗条件下继续培养 5-10 天，使离体生物合成的鱼藤酮积累。

所得离体培养物经烘干磨碎后，放入容器中，加入 10 倍量的分析纯丙酮，然后置于摇床上进行浸渍提取 48 小时，过滤出提液，经浓缩，得浅褐色固体，提取率为 3.96%。将提取物溶于甲醇，用反相柱层析法精制得鱼藤酮产品。HPLC 测定结果，离体培养物鱼藤酮产率达每百克培养物产鱼藤酮 0.56 克。

愈伤组织在转接到生长培养基上后，在前 5 天为滞后期，生长速度缓慢；第 5 天到第 10 天之间为缓慢生长期；第 10 天进入对数生长期，愈伤组织生长速度很快；到了 20 天后，愈伤组织的生长速度开始减慢，细胞又进入缓慢增长期；30 天后，愈伤组织的生长几乎停止；第 35 天时愈伤组织的生长进入静止期。愈伤组织合成和积累鱼藤酮也呈现一定的规律性，愈伤组织从培养开始时积累鱼藤酮，从 5 天到 15 天之间，愈伤组织合成和积累鱼藤酮呈现递增的趋势，在培养到第 15 天时，愈伤组织中的鱼藤酮含量最高；15 天后鱼藤酮的含量呈现降低的趋势，培养到 35 天时几乎检测不到鱼藤酮的含量。

产品鱼藤酮的含量以 HPLC 法测定，仪器名称：美国惠普 1100 高效液相色谱仪（配置：四元梯度泵、紫外可见光波长检测器、手动进样器、惠普化学工作站）；柱子：HEWLTT PACKARD (ODS HYPERSIL, $5 \mu\text{m}$, $125 \times 4\text{mm}$) 测定条件：检测波长： $\lambda = 295\text{nm}$ ；流动相：75: 25=甲醇: 水；流速：1ml/min；检测灵敏度：AUFs=0.001；柱温：常温；进样量： $20 \mu\text{l}$ 。标样保留时间

为 5.661 分钟。根据已知浓度标样的鱼藤酮的吸收峰与所测试样的鱼藤酮吸收峰面积之比与它们各自的含量之比成正比的关系，可得出试样的鱼藤酮含量。

用丙酮提取物进行试验，发现离体生物合成的鱼藤酮对菜粉蝶幼虫的生物活性与田间种植获得的鱼藤酮相当，它对菜粉蝶 5 龄幼虫 24 小时的拒食中浓度 (AFC₅₀) 为 2.375 μ g/ml，24 小时的致死中量 (LD₅₀) 为 0.283 μ g/头，24 小时对体重增长的抑制作用有效中浓度 (EC₅₀) 为 2.050 μ g/ml；48 小时的 EC₅₀ 为 1.170 μ g/ml，卵孵化率为 14.56%，成虫的羽化率为 22.22%，幼虫化蛹畸形率为 87.50%。室内盆栽试验结果表明，在鱼藤酮浓度为 40 μ g/ml 试样处理下，能很好地防治菜粉蝶幼虫的为害。