

诱导子对长春花生物碱生物合成的诱导与调控

贺丽虹*, 赵淑娟**, 胡之璧**

上海中医药大学中药研究所, 上海 201203

Induction and Manipulation of Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus* by Elicitors

HE Li-Hong*, ZHAO Shu-Juan**, HU Zhi-Bi**

Institute of Traditional Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

摘要: 真菌诱导子、信号分子、植物生长调节物质等诱导子对长春花生物碱的生物合成具有调控作用。文章介绍了诱导子种类、诱导效果与调控机理等方面的研究进展。

关键词: 长春花; 次生代谢; 诱导子

长春花(*Catharanthus roseus*)是夹竹桃科长春花属的一种重要药用植物, 含长春碱、长春新碱、阿玛碱、蛇根碱等100多种生物碱, 大多具有很高的药用价值。其中长春碱和长春新碱可用于治疗何杰金氏病、恶性淋巴瘤、急性淋巴细胞型白血病、绒毛上皮细胞癌等癌症, 是目前应用最广泛的天然植物抗肿瘤药物; 阿玛碱可治疗高血压、心率不齐等心血管疾病; 蛇根碱具有镇定作用; 长春质碱有抗菌止血、利尿、降血糖等作用。但在植物体中这些有效成分的含量较低, 远远不能满足市场需求。因此, 从20世纪60年代人们开始利用植物组织和细胞培养技术生产长春花生物碱。如何提高长春花组织和细胞培养物中药用生物碱的含量是国内外专家广泛关注的问题。运用诱导子, 如真菌提取物、茉莉酸(jasmonate, JA)、水杨酸、乙烯、光照等促进生物碱合成可能是一条可行的途径。

诱导子(elicitor)是指能够引起目标生物体发生生理变化的各种生物与非生物因子。对植物来说, 广义的诱导子是指能够引起植物发生生理学和形态学反应并积累抗毒素的各种生物与非生物因子。其中非生物诱导子包括金属离子和无机化合物, 生物诱导子包括来源于真菌、细菌、病毒、食草动物和植物细胞壁的成分以及植物受到病菌或食草动物伤害时在受伤部位释放的化学物质。狭义的诱导子专指生物来源的诱导子和人工合成的生物诱导子类似物(Zhao等2005)。外源施加的诱导子能够通过信号分子转导途径, 促进长春花生物碱合成途径中相关基因(图1)的表达, 以诱导特定

的次生代谢产物形成和积累。本文介绍外源诱导子诱导和调控长春花生物碱合成的研究进展。

1 真菌诱导子

真菌诱导子是来源于真菌的一类确定的化学信号, 包括真菌的表面结构性成分和分泌的代谢产物, 如真菌孢子、菌丝体、匀浆、真菌细胞壁成分、真菌培养物滤液等。从化学结构上分主要包括: 甲壳素、*N*-乙酰基葡萄糖低聚物、多糖、 β -葡聚糖、乙酰葡萄糖醛酸、糖蛋白、蛋白质、短肽、麦角固醇、不饱和脂肪酸等(Boller 1995)。自然情况下真菌等病害侵染植物后能诱发植物体在感染区域建立局部过敏反应, 产生抗毒素等次生代谢产物。将真菌匀浆后高温灭菌制备成的真菌诱导子同样具有诱导植物细胞中防御基因表达、诱发植物过敏反应和促进植物细胞中特定次生代谢产物合成等多种功能。采用真菌诱导子激活植物细胞中的次生代谢途径已成为提高植物细胞培养物中目标产物产量的有效手段之一(Roberts和Shuler 1997)。真菌诱导子虽能抑制长春花细胞或毛状根的生长, 但对其生物碱合成却有促进作用(Moreno等1996)。

真菌诱导子对长春花生物碱合成的诱导效果与真菌种类、诱导剂量、诱导时间长短及诱导时细胞或毛状根的日龄等具有密切关系。不同种类

收稿 2008-01-16 修定 2008-03-21

资助 国家自然科学基金(30200358)。

* 现在地址: 苏州大学生命科学学院(江苏苏州215006)。

** 通讯作者(E-mail: zhaoshujuan@126.com; Tel: 021-51322576)。

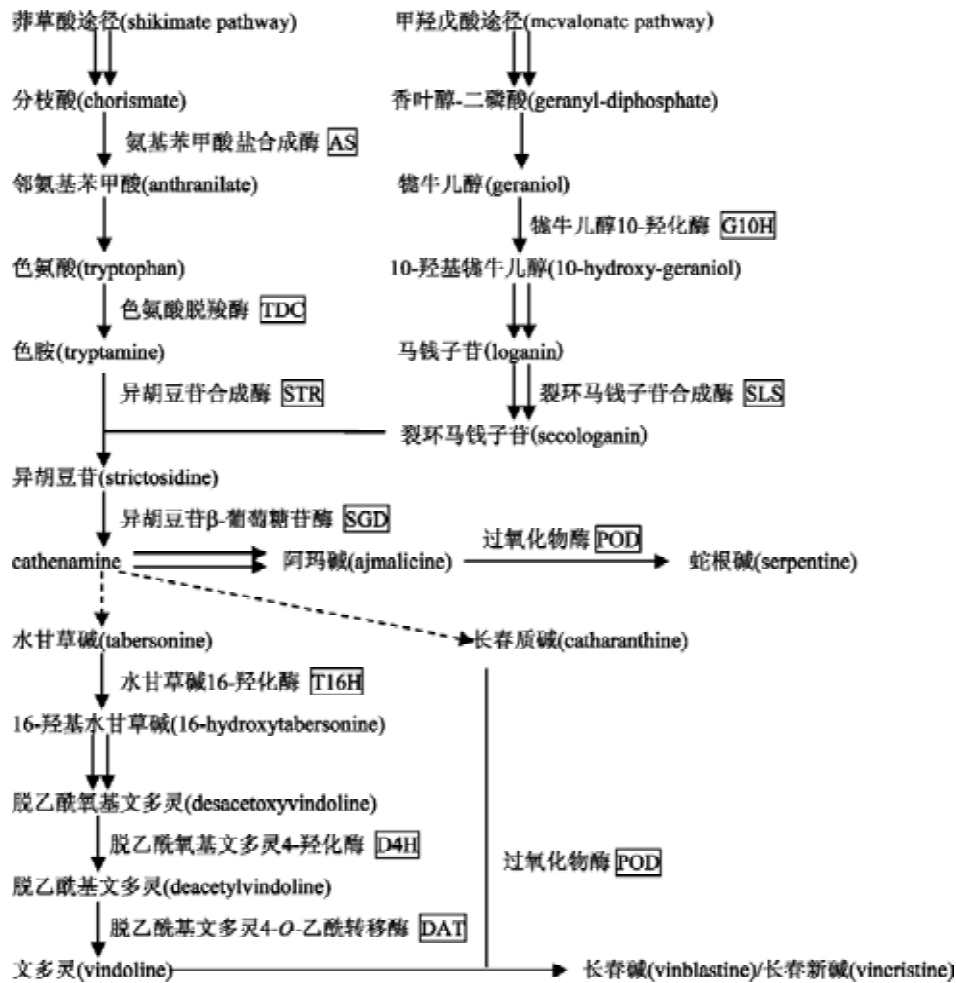


图1 长春花碱类生物碱的生物合成途径

单箭头表示单一酶催化, 双箭头表示多步反应, 虚线箭头表示步骤不清楚。

的真菌对长春花生物碱合成的影响不同。一般能够导致植物产生过敏反应和细胞程序化死亡的病原性真菌的促进作用更明显。腐霉菌属的真菌对生物碱合成具有强烈的刺激作用, 如瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)。而非致病性真菌的作用不明显, 如毛霉菌属(*Mucor*)的种类诱导作用就很弱(Zhao等2001b)。钟器腐霉(*Pythium vexans*)诱导子 $0.87\sim 8.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Nef等1991), 稻曲霉(*Ustilaginoidea virens*)诱导子 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Zhao等2001b), 黑曲霉(*Aspergillus niger*)诱导子 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Zhao等2001b)的诱导效果最好。可见, 不同种类真菌诱导子的最适诱导剂量是不同的。诱导子浓度过高(约 $26\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的钟器腐霉诱导子会抑制细胞生长并导致其死亡, 甚至使生物碱产量大幅下降(Nef等1991)。不同日龄的长春花悬浮培养细

胞对诱导子的敏感性和反应不同。培养20 d的长春花悬浮细胞对绿色木霉(*Trichoderma viride*)诱导子较敏感, 能够显著刺激阿玛碱的产生(Namdeo等2002)。在指数前期(5 d)用稻曲霉诱导子处理长春花细胞CR8C能促进色胺的积累, 而在指数期(7 d)处理则能显著促进阿玛碱和长春质碱的积累(Zhao等2001b)。诱导子处理天数通常以2~4 d为宜, 时间过长会抑制生物碱合成并导致细胞死亡(Zhao等2001b; Nef等1991; Namdeo等2002)。

真菌诱导子通过多糖或信号物质与植物细胞表面的特异受体结合, 激发胞内的信号传递, 诱导生物碱合成相关基因(图1)的表达, 进而诱导生物碱的合成与积累。瓜果腐霉诱导子处理后, 长春花悬浮培养细胞中色氨酸脱羧酶(tryptophan decarboxylase, TDC)、氨基苯甲酸盐合成酶

(anthranilate synthase, AS)、异胡豆萜合成酶(strictosidine synthase, STR)的活性立即得到诱导, 异胡豆萜 β -葡萄糖苷酶(strictosidine β -glucosidase, SGD)的活性没有明显变化, 而牻牛儿醇10-羟化酶(geraniol 10-hydroxylase, G10H)的活性则受到抑制(Moreno等1996)。研究证实, 诱导后色氨酸脱羧酶和异胡豆萜合成酶两种酶活性的增强是由于在转录水平上发生了强烈的瞬时积累, 而在未作诱导处理的材料中色氨酸脱羧酶的转录刚刚能检测到, 异胡豆萜合成酶的转录则检测不到(Pasquali等1992)。酵母激发子(yeast elicitor, YE)诱导包括TDC和STR在内的多种吲哚生物碱合成酶基因的表达, 其诱导作用由蛋白质磷酸化、 Ca^{2+} 内流和JA所介导(Menke等1999a, b; Memelink等2001; Pauw等2004)。不同种类真菌诱导子所含的多糖或信号物质的差异导致其对长春花生物碱合成的促进效果不同, 而不同细胞系细胞表面受体的差异导致其对同一诱导子的敏感性和反应不同(Zhao等2001b)。

2 信号分子

2.1 茉莉酸类化合物(jasmonates, JAs) 茉莉酸类物质是一类特殊的环戊烷衍生物, 具有促进衰老和抑制生长的作用, 并作为一种重要的内源信号分子参与植物伤反应, 诱导植物产生生物碱、酚酸等次生代谢物质。在长春花中茉莉酸类物质通常能够促进所有目标生物碱的产生。

茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MJ)能够激活长春花幼苗中水甘草碱、文多灵、长春质碱等单萜吲哚类生物碱的合成(Aerts等1994), 促进长春花悬浮细胞、毛状根培养物中阿玛碱、蛇根碱等生物碱的合成与积累(Gantet等1998; Lee-Parsons等2004; Rijhwani和Shanks 1998)。生物碱的产量与JA的浓度、细胞和毛状根的日龄有关。培养4 d处于活跃生长期的细胞对MJ比较敏感, 但生物碱的积累则发生在培养6~10 d的平台期细胞中(Gantet等1998)。在毛状根培养物的指数后期添加JA, 阿玛碱产量提高了80%, 蛇根碱提高了60%, 洛克新碱提高了150%, hörhammericine提高了500% (Rijhwani和Shanks 1998)。生物碱产量与添加的MJ浓度呈相关性, 10~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MJ对阿玛碱合成的诱导效果较好(Lee-Parsons等2004), 水甘草碱的产量随着MJ浓度的增加而

增加(Aerts等1994)。

外源施加JA或MJ能促使生长素抑制的长春花细胞恢复产生生物碱的能力。在无生长素的培养基中长春花细胞能超量合成阿玛碱, 这可能是由于生长素缺失这一应急信号引起细胞内源性JA大量合成, 进而引起阿玛碱超量合成(Gantet等1998)。

用十八烷酸途径抑制剂处理长春花细胞, 其生物碱合成大大降低, 如同时外源施加MJ则细胞能够恢复产生生物碱的能力。因此可以推测长春花的生物碱合成依赖于十八烷酸途径合成的JA来传导信号(Menke等1999b; Gantet等1998)。外源施加JAs一方面可以直接诱导相关基因的表达, 促进酶活性, 另一方面可以刺激内源JA的合成, 通过内源JA介导的信号途径诱导相关基因的转录、翻译等。在长春花中多种生物碱合成关键酶基因, 如G10H、TDC、SGD、STR、D4H等, 均在转录水平上受MJ诱导与调控(Moreno等1996; Gantet等1998; Pasquali等1999; Ouwerkerk和Memelink 1999; Menke等1999a, b; Geerlings等2000; Collu等2001)。JA在长春花的诱导子响应过程中起重要作用(Memelink等2001)。真菌诱导子对STR基因表达的诱导需要JA作为第二信使(Menke等1999a, b)。

2.2 Ca^{2+} Ca^{2+} 信号通路是已确认的植物信号转导的主要途径, Ca^{2+} 作为第二信使在其中发挥重要作用。在诱导因子诱导的长春花信号转导中 Ca^{2+} 也发挥着重要作用。

在长春花细胞培养物中, Ca^{2+} 内流增加促进生物碱的合成。在真菌诱导子、MJ和激素诱导的生物碱合成中 Ca^{2+} 内流起着关键的调节作用。真菌诱导子能够促进生物碱的合成, 但在没有 Ca^{2+} 的培养基中, 此种效应受到明显影响。如果在真菌诱导的长春花悬浮细胞中加入 Ca^{2+} 螯合剂(EGTA)和 Ca^{2+} 通道阻断剂(verapamil)以减少 Ca^{2+} 内流, 也会降低蛇根碱、阿玛碱和长春质碱等生物碱产量。而将真菌诱导子和200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $CaCl_2$ 一起加入则能更强地诱导生物碱的合成。说明真菌诱导子诱导的生物碱合成在一定程度上依赖于 Ca^{2+} 的存在(Zhao等2001a)。真菌诱导子刺激后, 由于一些膜蛋白的磷酸化和去磷酸化, 钙通道开放, 引起 Ca^{2+} 、 H^+ 内流, K^+ 、 Cl^- 外流, 细胞

膜发生短暂的去极化。胞内 Ca^{2+} 浓度的升高引起与钙信使耦联的胞内信号转导和级联放大, 最后引起细胞内大量抗性相关基因的表达, 并合成与抗性相关的结构蛋白、细胞壁多糖及次生代谢物质。加入 Ca^{2+} 螯合剂或钙通道阻断剂后, 细胞内过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶、苯丙氨酸氨基裂解酶等酶活性降低, 而加入 CaCl_2 则几种酶活性也急剧升高(Zhao 等 2005)。可见, 钙离子在传导真菌诱导子的刺激信号中起作用。

JA 和 Ca^{2+} 都是参与长春花生物碱合成调控的信号分子, 二者在介导反应过程中相互影响(Gantet 等 1998; Lee-Parsons 等 2004; Lee-Parsons 和 Ertürk 2005)。 Ca^{2+} 能够调节植物内源 JA 的生物合成(van der Fits 等 2000)。 Ca^{2+} 抑制剂能够抑制墨西哥柏细胞培养物中的脂氧合酶活性, 该酶参与 JA 的生物合成(Zhao 和 Sakai 2003)。在长春花悬浮培养细胞中添加 10 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MJ 的同时添加 CaCl_2 , 随着外源 Ca^{2+} 浓度的增加(23 、 $43 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), MJ 诱导的阿玛碱合成受到抑制。在添加 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MJ 的同时加入 EGTA 和 verapamil, 对 MJ 诱导的阿玛碱合成同样有抑制作用。这说明在 MJ 诱导的信号转导途径中必须有适宜浓度的 Ca^{2+} 参与才能促进生物碱的生成。胞内 Ca^{2+} 浓度过高或过低都会抑制 MJ 的作用。在外源添加 $3 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ca^{2+} 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MJ 时阿玛碱产量达到最高(Lee-Parsons 和 Ertürk 2005)。

钙和钙调素介导细胞分裂素诱导的吲哚生物碱合成。如果培养基中没有 Ca^{2+} 存在, 则细胞分裂素诱导的阿玛碱和蛇根碱合成会受到抑制(Mérillon 等 1991)。单独向培养基中添加细胞分裂素或 Ca^{2+} 都能促进长春花细胞 C20 合成阿玛碱, 二者同时添加则阿玛碱产量可得到更大提高, 比不添加的提高 5~17 倍(Decendit 等 1992)。

但长春花毛状根对 Ca^{2+} 内流的反应则相反, 减少 Ca^{2+} 内流能够提高总生物碱和蛇根碱的产量。verapamil 和 CdCl_2 能够阻止胞外 Ca^{2+} 通过质膜流入细胞内。在长春花毛状根培养物中加入 verapamil 和 CdCl_2 , 总生物碱产量提高 25%, 其中培养液中的产量提高 10 倍。而经 EGTA 处理的毛状根可促进 90% 的总生物碱向培养液中分泌。用细胞内 Ca^{2+} 流动抑制剂如 TMB-8 [8,8-(diethylamino)

octyl-3,4,5-trimethoxy-benzoate]和 thapsigargin 处理后, 总生物碱产量提高 74%, 培养液中的分泌量提高 4~6 倍(Moreno-Valenzuela 等 2003)。

2.3 NO NO 是一种水溶性和脂溶性兼具的小分子物质, 是动物和植物体内常见的信号分子。NO 参与植物的抗病作用, 能够诱发大豆和烟草细胞中植保素合成基因的表达, 并能够诱发长春花细胞中次生代谢产物合成与积累, 其诱导作用与 MJ 和真菌诱导子存在交互作用(Xu 等 2005; Xu 和 Dong 2005)。

Xu 等(2005)将不同浓度的 NO 供体亚硝基铁氰化钠(sodium nitroprusside, SNP)添加到长春花悬浮培养细胞中, 测定细胞的生长和长春质碱的合成。结果显示, 高浓度(10 和 $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 SNP 促进长春质碱的形成但抑制细胞的生长; 低浓度(0.1 和 $0.5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 SNP 则促进细胞的生长, 但对长春质碱的合成没有影响。在培养起始(0 d)和 10 d 加入 0.5 和 $10.0 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP, 总长春质碱产量提高 2 倍。NO 诱导的长春质碱合成受 MJ 生物合成抑制剂布洛芬(ibuprofen, IBU)和去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic, NDGA)的抑制。说明 NO 诱导的长春质碱合成部分地依赖于 JA。用桔青霉细胞壁制备的诱导子处理长春花悬浮细胞会引起培养液中 NO 迅速产生, 并伴随长春质碱产量升高, 这一诱导作用能够被 NO 清除剂[2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide, cPTIO]和 NO 合成酶抑制剂[S,S'-1,3-phenylene-bis(1,2-ethanediy)-bis-isothiourea, PBITU]所抑制。PBITU 抑制真菌诱导子诱导的长春质碱合成, 这种抑制作用能被外源施加 NO 供体 SNP 所恢复, 这表明真菌诱导子诱导的长春质碱合成可能部分地依赖于 NO 介导的信号转导(Xu 和 Dong 2005)。

2.4 水杨酸 水杨酸是一种能够激发植物细胞产生系统抗性的信号物质。低浓度的水杨酸能够诱导长春花幼苗中蛇根碱和水甘草碱的积累, 而高浓度的则诱导文多灵的积累(El-Sayed 和 Verpoorte 2004)。水杨酸对长春花悬浮培养细胞的阿玛碱、蛇根碱合成也有促进作用(Zhao 等 2000b)。

3 植物生长调节物质

植物生长调节物质能够显著影响悬浮培养细胞的次级代谢。其中生长素和赤霉素是强烈的抑

制剂, 而细胞分裂素、脱落酸和乙烯起促进作用。

3.1 生长素类似物(auxins) 生长素类化合物能够抑制吲哚生物碱合成相关基因的表达, 抑制上游合成途径或代谢流, 影响生物碱前体供应, 进而抑制生物碱的合成(El-Sayed 和 Verpoorte 2002)。NAA 和 2,4-D 能够下调 *STR* 和 *TDC* 基因的表达(Pasquali 等 1992)。长春花细胞 C20 在维持培养基中只积累痕量的生物碱, 当把 2,4-D 从培养基中移除则能够促进生物碱产生, 向无 2,4-D 的培养基中添加细胞分裂素、6-苄氨基嘌呤和反玉米素能进一步提高这种促进作用。而将长春花细胞从含有 2,4-D 的培养基中转移到不含 2,4-D 的培养基中也能诱导生物碱的合成。证明 2,4-D 对生物碱的合成和积累有抑制作用。生长素对生物碱合成的抑制作用主要发生在培养的前 3 d (Arvy 等 1994)。

3.2 细胞分裂素(cytokinin) 如苄基腺嘌呤, 能够促进细胞分化并刺激生物碱的产生。在长春花悬浮细胞和愈伤组织培养物中添加细胞分裂素可提高阿玛碱和蛇根碱的产量。而内源产生的细胞分裂素则不能模拟添加的外源细胞分裂素对长春花生物碱合成的促进作用(Garnier 等 1996)。关于细胞分裂素影响次生代谢的机制目前知之甚少, 推测它可能是通过与其他植物生长调节物质的相互影响而发挥作用的。

在长春花细胞 C20D 培养基中添加细胞分裂素和乙烯都能强烈促进阿玛碱生成。但外源细胞分裂素对生物碱的促进作用与内源乙烯含量的增高没有相关性, 说明乙烯不能介导细胞分裂素对生物碱合成的促进作用, 添加的外源细胞分裂素和乙烯是通过不同途径促进长春花生物碱合成的(Yahia 等 1998)。

添加外源乙烯和脱落酸能够促进长春花幼苗合成阿玛碱、蛇根碱、水甘草碱、长春质碱和文多灵(El-Sayed 和 Verpoorte 2004)。

4 其他小分子物质

Rijhwani 和 Shanks (1998) 用 72 个单位的果胶酶添加到指数期后的毛状根中, 48 h 后检测发现水甘草碱提高 2.5 倍, 但对其他生物碱无影响。纤维素酶和果胶酶诱导长春花细胞系 A11 后, 裂环马钱子苷降解酶类受到激活, 异胡豆苷- β -葡萄糖苷酶活性没有变化, 细胞对马钱子苷的吸收受

阻, 细胞内裂环马钱子苷和异胡豆苷的含量降低而色胺含量增加, 阿玛碱含量没有变化(Contin 等 1999)。

5 光照

光照是影响长春花细胞中酶活性进而影响其生物碱合成与积累的重要因素。文多灵合成途径中的 3 个酶, 包括水甘草碱 16-羟化酶(tabersonine 16-hydroxylase, T16H)、脱乙酰氧基文多灵 4-羟化酶(desacetoxyvindoline 4-hydroxylase, D4H)、脱乙酰基文多灵 4-O-乙酰转移酶(deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase, DAT)都需要在光照条件下才能表达。在长春花受光幼苗中, *D4H* 表达量是黄化幼苗中的 8~9 倍, 而暗室培养的长春花幼苗进行光照培养后其 DAT 的表达也逐渐增加。光适应的长春花毛状根培养较暗室培养的生长速率高, 蛇根碱合成增加而水甘草碱减少, 但没有检测到文多灵和脱乙酰文多灵, 而洛柯因和 hörhammericine 则有所增加, 说明水甘草碱流向了其他支路。长春花生物碱的光依赖合成可能是由一些细胞色素或光敏色素介导的(Vazquez-Flota 和 De Luca 1998)。

6 金属离子

金属离子作为胁迫因子也可促进长春花积累生物碱。硫酸氧钒可强烈促进长春花细胞合成吲哚生物碱。稀土元素铈、钇、钆能促进长春花悬浮培养细胞积累阿玛碱和长春质碱, 而镧、钆、铈、钇、钆、铈等则对生物碱合成无影响(Zhao 等 2000a)。重金属离子镉可促进指数中期细胞合成阿玛碱, 并促进阿玛碱向培养基中释放(Zheng 和 Wu 2004)。

7 结语

综上所述, 施用外源理化诱导因子能够有力地促进长春花幼苗、悬浮培养细胞和毛状根的生物碱积累, 是提高药用生物碱产量的有效途径。目前采用长春花细胞和毛状根培养只能生产用于降压和镇痛的阿玛碱、蛇根碱和长春质碱, 而长春碱、长春新碱则检测不到。这可能是由于长春花细胞和毛状根培养体系中不能或极少合成双吲哚生物碱的重要前体物文多灵。长春花细胞中文多灵的合成在转录水平上受抑制时, 即检测不到 *D4H* 和 *DAT* 基因的表达, 但两种基因并未丢失(Vázquez-Flota 等 2002)。因此, 诱导细胞和毛状根中 *D4H* 和 *DAT* 基因在转录与翻译水平上的表

达, 以促进文多灵的生物合成, 将有可能突破长春花细胞和毛状根培养物不能合成双吲哚生物碱这一障碍, 从而为工业化生产长春花药用生物碱打开新局面。

参考文献

- Aerts RT, Gisi D, de Carolis E, de Luca V, Baumann TW (1994). Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *Plant J*, 5: 635~643
- Arvy MP, Imbault N, Naudascher F, Thiersault M, Doireae P (1994). 2,4-D and alkaloid accumulation in periwinkle cell suspensions. *Biochimie*, 76 (5): 410~416
- Boller T (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46: 189~214
- Collu G, Unver N, Peltenburg-Looman AMG, van der Heijden R, Verpoorte R, Memelink J (2001). Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett*, 508: 215~220
- Contin A, van der Heijden R, Verpoorte R (1999). Effects of alkaloid precursor feeding and elicitation on the accumulation of secologanin in a *Catharanthus roseus* cell suspension culture. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 56 (2): 111~119
- Decendit A, Liu D, Ouelhazi L, Doireau P, Méridon JM, Rideau M (1992). Cytokinin-enhanced accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell cultures — the factors affecting the cytokinin response. *Plant Cell Rep*, 11: 400~403
- El-Sayed M, Verpoorte R (2002). Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 68: 265~270
- El-Sayed M, Verpoorte R (2004). Growth, metabolic profiling and enzymes activities of *Catharanthus roseus* seedlings treated with plant growth regulators. *Plant Growth Regul*, 44: 53~58
- Gantet P, Imbault N, Thiersault M, Doireau P (1998). Necessity of a functional octadecanoic pathway for indole alkaloid synthesis by *Catharanthus roseus* cell suspensions cultured in an auxin-starved medium. *Plant Cell Physiol*, 39 (2): 220~225
- Garnier F, Carpin S, Label P, Crèche J, Rideau M, Hamdi S (1996). Effect of cytokinin on alkaloid accumulation in periwinkle callus cultures transformed with light-inducible *ipt* gene. *Plant Sci*, 120: 47~55
- Geerlings A, Ibañez MML, Memelink J, van der Heijden R, Verpoorte R (2000). Molecular cloning and analysis of strictosidine β -D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J Biol Chem*, 275 (5): 3051~3056
- Lee-Parsons CWT, Ertürk S (2005). Ajmalicine production in methyl jasmonate induced *Catharanthus roseus* cell cultures depends on Ca^{2+} level. *Plant Cell Rep*, 24: 677~682
- Lee-Parsons CWT, Ertürk S, Tengtrakool J (2004). Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation. *Biotechnol Lett*, 26: 1595~1599
- Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW (2001). ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci*, 6: 212~219
- Menke FLH, Champion A, Kijne JW, Memelink J (1999a). A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J*, 18 (16): 4455~4463
- Menke FLH, Parchmann S, Mueller MJ, Kijne JW, Memelink J (1999b). Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, 119: 1289~1296
- Méridon JM, Liu D, Huguet F, Chénieux JC, Rideau M (1991). Effects of calcium entry blockers and calmodulin inhibitors on cytokinin-enhanced alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Physiol Biochem*, 29 (3): 289~296
- Moreno PRH, Poulsen C, van der Heijden R, Verpoorte R (1996). Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell suspension cultures. *Enzyme Microb Technol*, 18: 99~107
- Moreno-Valenzuela OA, Minero-García Y, Chan W, Mayer-Geraldo E, Carbajal E, Loyola-Vargas VM (2003). Increase in the indole alkaloid production and its excretion into the culture medium by calcium antagonists in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Lett*, 25: 1345~1349
- Namdeo A, Patil S, Fulzele DP (2002). Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Prog*, 18 (1): 159~162
- Nef C, Rio B, Chrestin H (1991). Induction of catharanthine synthesis and stimulation of major indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* cells under non-growth-altering treatment with *Pythium vexans* extracts. *Plant Cell Rep*, 10: 26~29
- Ouwerkerk PBF, Memelink J (1999). Elicitor-responsive promoter regions in the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol*, 39: 129~136
- Pasquali G, Erven ASW, Ouwerkerk PBF, Menke FLH, Memelink J (1999). The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in

- transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF. *Plant Mol Biol*, 39: 1299~1310
- Pasquali G, Goddijn OJM, de Waal A, Verpoorte R, Schilperoort RA, Hoge JHC, Memelink J (1992). Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol Biol*, 18: 1121~1131
- Pauw B, van Duijn B, Kijne JW, Memelink J (2004). Activation of the oxidative burst by yeast elicitor in *Catharanthus roseus* cells occurs independently of the activation of genes involved in alkaloid biosynthesis. *Plant Mol Biol*, 55: 797~805
- Rijhwani SK, Shanks JV (1998). Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Biotechnol Prog*, 14 (3): 442~449
- Roberts SC, Shuler ML (1997). Large-scale plant cell culture. *Curr Opin Biotechnol*, 8: 154~159
- van der Fits L, Zhang H, Menke FLH, Deneka M, Memelink J (2000). *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive region of the secondary metabolite biosynthetic gene *Str* and is induced by elicitor via a jasmonate-independent signal transduction pathway. *Plant Mol Biol*, 44: 675~685
- Vázquez-Flota F, De Luca V, Carrillo-Pech M, Canto-Flick A, de Lourdes Miranda-Ham M (2002). Vindoline biosynthesis is transcriptionally blocked in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Mol Biotechnol*, 22 (1): 1~8
- Vázquez-Flota FA, De Luca V (1998). Developmental and light regulation of desacetoxylvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Evidence of a multilevel regulatory mechanism. *Plant Physiol*, 117: 1351~1361
- Xu MJ, Dong JF (2005). Elicitor-induced nitric oxide burst is essential for triggering catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67: 40~44
- Xu MJ, Dong JF, Zhu MY (2005). Effect of nitric oxide on catharanthine production and growth of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Biotechnol Bioeng*, 89 (3): 367~371
- Yahia A, Kevers C, Gaspar T, Chénieux J, Rideau M, Crèche J (1998). Cytokinins and ethylene stimulate indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by two distinct mechanisms. *Plant Sci*, 133: 9~15
- Zhao J, Hu Q, Guo YQ, Zhu WH (2001a). Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca^{2+} influx and the oxidative burst. *Plant Sci*, 161: 423~431
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 23: 283~333
- Zhao J, Sakai K (2003). Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced β -thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *J Exp Bot*, 54 (383): 647~656
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q (2000a). Promotion of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures by rare earth elements. *Biotechnol Lett*, 22: 825~828
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q (2001b). Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture. *Enzyme Microb Technol*, 28 (7): 666~672
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q, He XW (2000b). Improved alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnol Lett*, 22: 1221~1226
- Zheng ZG, Wu M (2004). Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. *Plant Sci*, 166: 507~514