

植物生长调节物质对长春花细胞中吲哚生物碱积累的影响

张向飞^{1,*} 张秀省² 王勇¹ 王宁宁¹ 曹岚¹ 王淑芳¹

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

提要 适当浓度的脱落酸(ABA)、乙烯利和乙酰水杨酸(ASA)均对长春花悬浮细胞中吲哚生物碱的积累有较明显的促进作用。2 mg·L⁻¹ ABA对吲哚生物碱的诱导效果最好, 乙烯利的最适剂量为1 g·L⁻¹, 1 mg·L⁻¹ ASA有利于阿玛碱积累, 而2 mg·L⁻¹ ASA则有利于长春质碱积累。

关键词 长春花; 植物生长调节物质; 长春质碱; 阿玛碱

Effects of Plant Growth Regulators on the Accumulation of Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus* Cells

ZHANG Xiang-Fei^{1,*}, ZHANG Xiu-Xing², WANG Yong¹, WANG Ning-Ning¹, CAO Lan¹, WANG Shu-Fang¹

¹College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071; ²College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng 252000

Abstract Plant growth regulators abscisic acid(ABA), ethrel and acetosalicylic acid(ASA) with the suitable concentrations had obvious effects on the accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells. 2 mg·L⁻¹ ABA had the best effect on indole alkaloid production. The optimal concentration of ethrel was 1 g·L⁻¹. 1 mg·L⁻¹ ASA promoted the accumulation of ajmalicine. 2 mg·L⁻¹ ASA incited catharanthine accumulation.

Key words *Catharanthus roseus*; plant growth regulator; catharanthine; ajmalicine

长春花的次生代谢产物中含有100多种吲哚生物碱^[1], 并且多数具有很高的药用价值。如阿玛碱可治疗高血压、心率不齐等疾病; 长春质碱有抗菌止血、利尿、降低血糖等作用, 是抗癌药物长春碱、长春新碱等的合成前体^[2]。目前, 这些药用成分主要从天然植物中获取, 但在植物中的含量极少, 远远满足不了市场需求。因此, 采用细胞培养技术生产吲哚生物碱类药用成分可能是一条很有希望的替代途径。至于如何提高长春花细胞培养物中药用成分含量, 也是人们关注的问题。脱落酸、乙烯和水杨酸(及其衍生物)与植物的次生代谢密切相关, 可以调节许多次生代谢相关酶的活性, 进而影响次生代谢产物的合成^[3~5]。据此, 本文研究了脱落酸(ABA)、乙烯利和乙酰水杨酸(ASA)对长春花悬浮细胞中的吲哚总碱及其中的长春质碱、阿玛碱积累的影响, 以寻找促进吲哚生物碱积累的有效因子。

材料与方 法

长春花(*Catharanthus roseus*)愈伤组织细胞由我们实验室选育, 15 d继代1次, 置于含有50 mL MS培养液的250 mL三角瓶中, 摇床(80~100 r·min⁻¹)培养, 接种量为1.5~2 g·瓶⁻¹。培养液中含NAA、2, 4-D、KT各1 mg·L⁻¹, 3%蔗糖, pH 6.0(灭菌前), 于26~28℃和光强为120 μmol·m⁻²·s⁻¹的光下培养。

按文献6的方法提取和测定吲哚总碱, 然后

将所得吲哚总碱用甲醇定容至1 mL, 过0.22 μm滤膜, 采用RP-HPLC法对其中的长春质碱和阿玛碱进行色谱分析, 以峰面积外标法定量。色谱条件: Kromasil ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 7 μm)柱; 检测波长284 nm; 流动相为甲醇: 5 mmol·L⁻¹ NH₄H₂PO₄=7:3 (V/V, pH 7.0); 流速1.0 mL·min⁻¹; 柱温28℃; 进样量5 μL。长春质碱和阿玛碱的峰面积与浓度(0.05~15 mg·L⁻¹范围内)呈线性关系, 回归方程分别为: $Y=8560X-113.78$, $r=0.9992$, $RSD=1.65\%$; $Y=8031.3X-528.2$, $r=0.9993$, $RSD=1.83\%$ 。所有数据均为3次平行重复测定的结果, 标准偏差不超过10%。

采用的仪器是日本岛津的LC-4A高效液相色谱仪, SPD-2AS紫外检测仪和Anaster色谱数据工作站。RP-HPLC使用的甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为去离子水。RP-HPLC流动相经0.45 μm滤膜过滤, 超声脱气后使用。长春质碱标品购自上海康爱生物制品有限公司, 阿玛碱标品为Sigma产品。

结果与讨论

1 吲哚生物碱的积累动态

每4 d收获1次愈伤组织细胞, 测其阿玛碱

收稿 2003-06-30 修定 2003-12-24

资助 天津市自然科学基金项目(013609211)。

*E-mail: xiangfeizxf@eyu.com, Tel: 022-23504382

和长春质碱含量。结果表明: 培养过程中, 阿玛碱和长春质碱含量不断增加, 尤其在培养的后期阶段, 增加更显著。20 d时阿玛碱含量达到最大值[0.796 mg·g⁻¹(DW)], 长春质碱于24 d左右时才达到最大值[0.161 mg·g⁻¹(DW)](图1)。在培养前期, 吲哚生物碱含量增加之所以缓慢, 可能是这段时期愈伤组织细胞以增殖和生长为主, 次生代谢水平较低缘故。

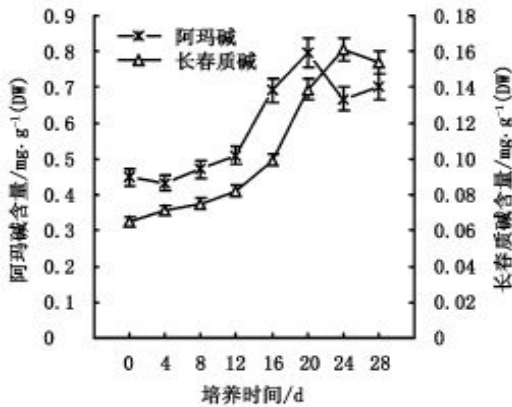


图1 愈伤组织细胞中吲哚生物碱的积累进程

Fig. 1 Course of accumulation of indole alkaloids in calli

2 植物生长调节物质影响下的吲哚生物碱含量变化

长春花细胞培养20 d后, 在其培养液中加入不同浓度的外源 ABA、乙烯利和 ASA, 继续培养24 h后收获, 测其生物量及吲哚生物碱含量。结果表明: 外源 ABA、乙烯利和 ASA 对长春花细胞的生物量影响不大, 但吲哚总碱及其中阿玛碱和长春质碱含量均有明显提高。

从图2~4可见: (1) 2 mg·L⁻¹ ABA对吲哚生物碱的诱导效果最好; ABA浓度过高, 不利于吲哚生物碱积累(图2)。(2) 随着乙烯利浓度的增加, 吲

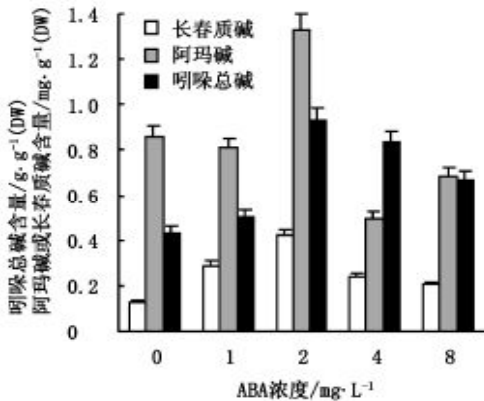


图2 ABA对吲哚生物碱积累的影响

Fig. 2 Effect of ABA on accumulation of indole alkaloids

哚总碱产量呈上升趋势, 1 g·L⁻¹的乙烯利最有利于长春质碱和阿玛碱的积累(图3)。(3)不同浓度ASA对吲哚总碱产量影响不大, 但1 mg·L⁻¹ ASA有利于阿玛碱积累, 而2 mg·L⁻¹ ASA使长春质碱含量增加70%(图4)。这可能是由于不同浓度ASA引起不同吲哚生物碱之间的相互转化所致。

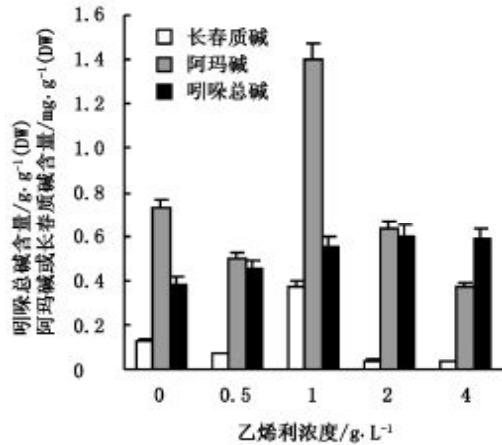


图3 乙烯利对吲哚生物碱积累的影响

Fig. 3 Effect of ethrel on accumulation of indole alkaloids

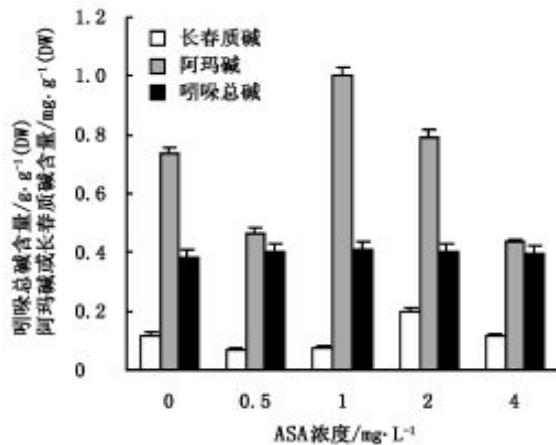


图4 ASA对吲哚生物碱含量的影响

Fig. 4 Effect of ASA on accumulation of indole alkaloids

参考文献

- 1 周立刚, 郑光植. 长春花细胞培养与吲哚生物碱的生产. 天然产物研究与开发, 1991, 3(2): 67~73
- 2 Kutney JP, Boulet CA. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) cell cultures. Heterocycle, 1988, 27: 621~637
- 3 Yamaguchi-Shinozaki T, Urao T, Shinozaki K. Regulation of genes that are induced by drought stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Res, 1995, 108(1): 127~136
- 4 El-Beltagy J. Epirasty promoted by salinity or ethylene is indicator of salt-sensitivity in tomatoes. Plant Cell Environ, 1996, (19): 93~100
- 5 Zhang CG, Jing HM, Zheng HL et al. Progress in plant resistance induced by salicylic acid. Life Sci Res, 2001, 5(3): 185~189
- 6 王宁宁, 王淑芳, 田俊英等. 土壤农杆菌转化的长春花冠瘿细胞培养. 生物工程学报, 1994, 10(3): 244~249