

## 水杨酸、茉莉酸甲酯和乙烯利 对野葛细胞悬浮培养生产葛根素的影响

张春荣<sup>1,2</sup>, 李玲<sup>1,①</sup>

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631; 2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**Effects of salicylic acid, methyl jasmonate and ethrel on the production of puerarin in cell suspension cultures from leaves of *Pueraria lobata* seedlings** ZHANG Chun-rong<sup>1,2</sup>, LI Ling<sup>1,①</sup> (1. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(1): 56-57

**Abstract:** The cell suspension cultures in leaves of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi seedlings were treated with salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MJ) and ethrel respectively. SA and MJ could cause cell brown, while ethrel had a positive effect on cell vitality. 0.1 mg/L SA and 1.0 mg/L MJ could promote the synthesis of puerarin and hence improved the yield. Ethrel, SA and MJ at higher concentrations restrained the product of puerarin. All these three substances had no effects on increasing cell biomass and puerarin release.

**关键词:** 细胞悬浮培养; 野葛; 葛根素

**Key words:** cell suspension culture; *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; puerarin

**中图分类号:** S567.23.9; Q946.83 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2003)01-0056-02

野葛 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] 是我国及其他东亚国家传统的药用资源, 其主要药用成分为葛根素, 广泛用于治疗多种心血管疾病<sup>[1]</sup>。由于近年来生态环境的人为破坏, 野生野葛资源已不能满足人们对葛根素药物的需求, 通过细胞工程可以实现野葛资源的可持续性开发。本项目组已经建立了野葛组织培养和植株再生<sup>[2]</sup>及细胞悬浮培养体系<sup>[3]</sup>, 研究表明, 悬浮细胞培养物能够生产葛根素, 但产量仍有待于提高<sup>[3]</sup>。

已知水杨酸 (salicylic acid, SA)、乙烯和茉莉酸类化合物 (jasmonates, JAs) 能够在高等植物的抗病反应中诱导植物抗毒素 (主要是萜类和异黄酮类化合物) 的产生<sup>[4]</sup>, 在细胞工程中常作为诱导子促进植物细胞次生代谢物的产生<sup>[5]</sup>。本文研究了 SA、茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MJ) 和乙烯利 (ethrel) 对野葛悬浮细胞生长和葛根素生产的影响, 以期为提高野葛悬浮细胞中葛根素产量的提高提供途径。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料

野葛悬浮细胞系, 由幼叶来源的愈伤组织在含 1 mg/L 2,4-D、1 mg/L NAA、0.5 mg/L KT、0.2% 水解酪蛋白和 20 g/L 蔗糖的 B<sub>5</sub> 液体培养基中振荡培养获得。

#### 1.2 实验方法

在野葛细胞悬浮培养液中分别添加过滤灭菌的 SA (广东汕头新宇化工厂产品)、MJ (日本 ZEON 公司产品) 和乙烯利 (上海彭浦化工厂产品), 最终浓度分别为 0.1、1.0 和 5.0 mg/L。其中, SA 和 MJ 以最终浓度为 0.09% 的乙醇为溶剂,

以相同浓度的乙醇作 SA 和 MJ 的对照 (CK<sub>1</sub>); 乙烯利以蒸馏水为溶剂, 以蒸馏水作其对照 (CK<sub>2</sub>)。细胞培养至第 8 天时收获, 按刘慧丽的方法<sup>[3]</sup>测定细胞干重及细胞和培养液中葛根素的含量。

细胞培养物及培养液中葛根素总产量 ( $Y_{\text{总}}$ ) 的计算:  $Y_{\text{总}} = Y_{\text{胞}} \times C_x + Y_{\text{液}}$ 。其中,  $Y_{\text{胞}}$  为细胞中次生代谢物的产量, 单位为 mg/g (干重 DW);  $C_x$  为细胞培养物的生物量, 单位为 g/L;  $Y_{\text{液}}$  为培养液中次生代谢物的产量, 单位为 mg/L。

试验重复 3 次, 取平均值。

### 2 结果与分析

#### 2.1 SA、MJ 和乙烯利对野葛悬浮细胞生长的影响

分别与对照 (CK<sub>1</sub> 和 CK<sub>2</sub>) 相比, SA、MJ 和乙烯利对野葛悬浮细胞的生物量均无明显的促进作用 (表 1)。在培养过程中发现, 用 SA 和 MJ 处理的悬浮细胞逐渐发生褐化, 可能是由于 SA 和 MJ 比较容易诱导野葛细胞过敏反应或酚类化合物释放的缘故; 而用乙烯利处理的悬浮细胞仍保持接种时的淡黄色, 表明乙烯利不易诱导野葛细胞的过敏反应和酚类化合物的释放, 因而能够较好地保持细胞的活力。

收稿日期: 2002-09-13

基金项目: 1999 年教育部优秀青年教师项目 (003062), 广东省科技计划资助项目 (C11703)

作者简介: 张春荣 (1976-), 男, 山东淄博人, 中山大学在读博士研究生, 研究方向: 植物发育及分子生物学。

① 通讯作者 E-mail: bioliling@eyou.com

表 1 水杨酸、茉莉酸甲酯和乙烯利对野葛悬浮细胞的生物量及葛根素积累、释放和总产量的影响<sup>1)</sup>

Table 1 Effects of salicylic acid, methyl jasmonate and ethrel on the biomass of cell cultures, the accumulation, release and total yield of puerarin in *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi cell suspension culture system<sup>1)</sup>

处理 Treatment	浓度 Concentration (mg/L)	生物量 Biomass (g/L)(DW)	CPC	CPM	TYP
CK <sub>1</sub>	0	12.71	4.81	3.01	99.50
SA	0.1	13.44	5.60	2.87	112.06
	1.0	12.81	4.68	3.04	98.88
	5.0	12.59	3.65	3.12	85.79
MJ	0.1	13.94	3.83	2.22	81.43
	1.0	12.59	6.42	3.20	121.54
	5.0	10.90	1.49	1.89	40.54
CK <sub>2</sub>	0	12.58	7.98	3.46	103.85
Ethrel	0.1	12.43	6.18	1.99	100.24
	1.0	11.82	4.13	1.91	73.29
	5.0	10.13	3.56	1.77	59.39

<sup>1)</sup> 表中数据为 3 次重复实验的平均值。The data are average values of three replication experiments; CPC: 细胞中葛根素含量 Content of puerarin in cell cultures (mg/g, DW); CPM: 培养液中葛根素含量 Content of puerarin released in medium (mg/L); TYP: 葛根素的总产量 Total yield of puerarin (mg/L); SA: 水杨酸 salicylic acid; MJ: 茉莉酸甲酯 methyl jasmonate; Ethrel: 乙烯利。

## 2.2 SA、MJ 和乙烯利对野葛悬浮细胞葛根素积累与释放的影响

在 SA、MJ 和乙烯利的各种处理中, 仅 0.1 mg/L SA 和 1.0 mg/L MJ 能显著提高细胞培养物中葛根素的积累及其总产量(分别提高 12.61% 和 22.15%)(表 1)。培养液中葛根素的释放量一方面与细胞中葛根素的合成相关, 一方面与诱导子增强质膜渗透性相关。一般认为, 诱导子浓度越大, 质膜渗透性越强, 但高浓度的诱导子往往因抑制细胞生长而降低次生代谢物质的合成。在本实验中, 用 SA 处理的培养体系中, 随着 SA 浓度的增大, 葛根素的释放量逐渐增大, 但因细胞生物量的降低, 而使葛根素的总产量逐渐降低。用 MJ 处理的体系中, 以 1.0 mg/L 对葛根素释放的促进作用最大, 5.0 mg/L 的 MJ 因抑制细胞生长和葛根素的合成而大大降低了葛根素的释放量。同样, 随着乙烯利浓度的增大, 葛根素的释放量和总产量也逐渐降低。

## 3 讨论

诱导子对植物细胞的作用是多方面的, 包括诱导活性氧迸发和细胞过敏反应、诱导细胞壁组分的交联和各种抗微生物化合物的合成<sup>[4]</sup>。其中, 活性氧迸发和细胞过敏反应引起悬浮细胞活力下降甚至死亡, 不利于提高目的产物的产量; 细胞壁组分的交联和非目的产物的抗微生物化合物的合成与目的产物的合成竞争底物和能源而降低了目的产物的产量。因此诱导子对不同细胞或不同次生代谢物往往具有不同的效应。本文的实验结果表明, 适当浓度的 SA 和 MJ 能促进野葛幼叶悬浮细胞葛根素的积累, 如 0.1 mg/L SA 和 1.0 mg/L MJ 处理 8 d, 可使培养物葛根素产量分别提高 12.61% 和 22.15%。尽管如此, 各种浓度的 SA 和 MJ 对野葛细胞生物量的提高影响不大, 且易引起细胞褐化, 可能是由于诱导细胞过敏反应或酚类化合物释放的缘故。乙烯利对野葛细胞活力的维持可能具有良好的效果, 但不利于葛根素的生产。

SA、MJ 和乙烯利作用效果的不同可能是由于在不同植物中三者诱导的防御反应途径不同而造成的<sup>[5]</sup>。植物细胞次生代谢物的生物合成涉及多个反应步骤, 不同的诱导子作用的部位也可能不同, 因此, 进一步认识 0.1 mg/L SA 和 1.0 mg/L MJ 对培养物葛根素产生的促进作用和稳定诱导条件的建立, 寻找其他有效的诱导子, 将其进行合理配置, 是本实验尚需进一步解决的问题。

## 参考文献:

- [1] 彭靖里, 马敏象, 安华轩, 等. 论葛属植物的开发及综合利用前景[J]. 资源开发与市场, 2000, 16(2): 80-82.
- [2] 于树宏, 李玲. 野葛的组织培养和植株再生[J]. 植物资源与环境, 1999, 8(1): 63-64.
- [3] 刘慧丽. 野葛细胞培养及其异黄酮类物质的产生[D]. 广州: 华南师范大学, 2001.
- [4] Kunkel B N, Brooks D M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense[J]. Current Opinion Plant Biology, 2002, 5(4): 325-331.
- [5] Verpoorte R, van der Heijden R, Hoopen H J G, et al. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21: 467-479.