

刺激剂 (elicitor) 在植物细胞培养次生代谢物生产中的应用

谢秋玲 郭勇

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510641)

摘要 刺激剂 (elicitor) 在植物细胞培养中被用来作为提高次生代谢物产量的手段。文中概括介绍了微生物、寡聚糖、蛋白质、第二信使及其他物质作为刺激剂在植物细胞培养中的应用及其研究成果。

关键词 刺激剂; 植物细胞培养; 次生代谢物

The application of elicitor in the production of second metabolites in plant cell cultures

Xie Qiuling Guo Youg

(The College of Food & Biology Engineering, South China Univ. of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract Elicitor is used to improve the productivity of second metabolites in plant cell cultures frequently. Several kinds of elicitors, including microbiological elicitor, oligosaccharides, peptides and intracellular messengers were introduced. The application of these elicitors in the production of secondary metabolites in plant cultures and some research results were summarized.

Key words Elicitor; plant cell culture; secondary metabolites

刺激剂 (elicitor) 从广义上来讲是一类诱导植物发生防卫反应的化合物, 从狭义上来讲是启动植保素合成的信号分子。因此在植物细胞培养中被用来作为提高次生代谢物产量的一种重要手段。至今刺激剂的作用机理还不是很清楚, 不过有一个初步的假说得到了大家的认可: 刺激剂作为一种外界信号被植物细胞膜上的受体识别并与之结合, 从而引起细胞膜上及膜内一系列反应。这已为试验所证实, 如可引起 parsley 细胞培养中植物抗毒素积累的一个寡聚肽, 通过放射性离子偶联和化学方法可与细胞膜结合, 从而分离出细胞膜上的受体⁽¹⁾。刺激剂可以使植物细胞膜上脂类发生变化或引起膜内质子梯度降低, 据推测这可能是刺激剂与受体的结合激活或抑制了膜上某些酶⁽²⁾, 而这些变化会刺激细胞内某些代谢途径中的酶的活性发生变化, 或者是现存的酶由非活性状态变为活性状态, 或者是酶的重新合成。事实上无论是酶活性的变化, 还是酶的转录物的积累都已得到了实验证实⁽³⁾。

目前所使用的刺激剂多种多样, 可概括为以下几大类:

1. **微生物刺激剂** 目前应用最多的刺激剂。真菌感染植物, 诱使植物发生防御反应, 其中包括植保素

1998-03-31 收稿

第一作者简介: 谢秋玲, 女, 1968 年出生, 在校博士生, 从事植物细胞培养研究工作。

的产生。因此在最初尝试用刺激剂刺激细胞产生次生代谢物时, 人们首先利用的就是真菌类物质。而诸多事实也证明了, 真菌 (包括菌丝体、细胞壁片断、培养液) 的确对培养细胞产生次生代谢物有刺激作用。例如在胡萝卜细胞培养液中加入真菌 *Aspergillus flavus* 的菌丝体可使花青素产量提高至原来的 2 倍、最大生产量达干重的 23.7%; 而其培养液效力略低, 可提高 1.25 倍, 最大生产量为干重的 20.6%^[4]。与次生代谢相关的酶的活性也会受到刺激剂的影响, 如松树细胞培养加入真菌刺激剂 6 h 后, 苯丙氨酸氨解酶 (PAL) 活力开始提高, 12 h 后提高至其原有水平的 10 倍^[5]。

酵母菌提取液 (YE) 是另一类应用较广的微生物刺激剂, 对许多种次生代谢物的生成都有刺激作用。番茄细胞在指数生长期合成乙烯量很少, 稳定期更少, 但经加入 YE 后, 指数期乙烯合成提高 10~20 倍, 稳定期提高更多, 可达 100 倍^[6]。胡萝卜细胞培养中, YE 的刺激效果最佳, 可使胡萝卜产量提高 1 倍。细菌类刺激剂作用相对较弱, 可分别使产量提高 41%~72%^[7]。本实验室试验 YE 和其他两种真菌、一种细菌刺激剂对黄花蒿细胞培养生产青蒿素刺激时发现, YE 刺激效果最明显。

2. 寡糖类刺激剂 研究表明, 无论是真菌胞壁中还是 YE 中具刺激活性的一类物质是寡聚糖。提纯的寡聚糖对次生代谢物产生具有刺激作用。如用壳多糖刺激 *Papaver somniferum* 细胞系, 可使血根碱由于重的 1% 上升到 4.5%^[8]。黄原胶、岩藻依聚糖可使 *Corthamus tinctorius* 红色素积累量提高 6 倍^[9]。而人参寡聚糖不仅能够刺激西洋参细胞中皂甙的积累, 还可以刺激细胞生长^[10]。试验还发现水溶性寡聚糖刺激效果比不溶性糖好。水溶性的壳多糖 50 在诱导 *Morinda citrifolia* 细胞中壳多糖酶和蒽醌时, 效果强于果胶和聚乙酰壳多糖^[11]。而聚乙酰壳多糖具有增加细胞膜透性的功能, 这样有利于次生代谢物的分泌。

寡聚糖刺激剂是目前研究较多的一类, 其结构也得到广泛的探讨。在刺激剂潜力试验中, 作为试验对象的壳多糖、聚乙酰壳多糖、葡聚糖及其相应单糖中, 聚乙酰壳多糖最具潜力, 而单糖没有刺激效果^[12]。试管内核逃逸转录试验发现, 只有聚合度大于 9 的果胶才能启动最大量的特异 mRNAs 的积累^[13]。还有试验表明, 具刺激作用的最小的葡聚糖含 7 个葡萄糖残基^[14]。可见寡聚糖的刺激活性同其结构有着密切的关系。

但是人工合成的 7- β -葡聚糖, 其刺激活性只是通过植物-1, 3-内源葡聚糖酶作用的真菌胞壁所获得的七聚糖活性的 1/100~1/1000^[15]。由此可以看出, 刺激剂的作用不是单方面的, 是与植物间相互作用的。

3. 蛋白质类刺激剂 微生物胞外酶, 如壳多糖酶、纤维素酶和果胶酶, 也是一类用来刺激次生代谢物产生的刺激剂。如在烟草细胞培养液中加入壳多糖酶, 可使紫杉醇产量提高 50%^[16]。本实验室的研究工作中, 曾在鼠尾草、黄花蒿细胞培养中加入果胶酶, 分别使迷迭香酸、青蒿素产量都得到不同程度的提高。在大蒜细胞培养基中添加一定量的果胶酶和纤维素酶, 不但利于超氧化物歧化酶 (SOD) 的积累, 而且可以减少悬浮培养中常出现的细胞凝聚现象, 增强了细胞分散度, 促进了细胞生长。

另一类蛋白质刺激剂为糖蛋白, 由酵母中通过酶作用获得的糖蛋白可以刺激番茄细胞悬浮培养中乙烯合成和 PAL 的活性提高。其结构分析发现, 该蛋白具有一个 Asp, 其 N 上连有一个高聚甘露糖, 其中残基数为 10~12 个的糖蛋白刺激活性最大, 有趣的是, 内源 β -N-乙酰葡萄糖胺酶作用于刺激剂会产生一个寡聚糖, 对其有阻遏作用, 而刺激活性最大的刺激剂, 会产生一个含 10~12 个甘露糖

糖的寡聚糖,其阻遏作用也最大^[17]。另有从真菌 *Verticillium dahliae* 277 中获得的糖蛋白,其蛋白部分刺激棉花和大豆细胞中植物抗毒素的合成,其糖部分刺激产生 H_2O_2 ^[18]。

4. 第二信使 刺激剂作为外界信号作用于细胞膜而引起膜上发生变化,到引起胞内基因启动和酶活性改变应该是一个级联过程,这中间需要有物质充当胞内信使,也即第二信使。事实上,由于不同的刺激剂可能引起同样的植物抗毒素的积累,也让人们推测一定有这样的第二信使存在,它将起着将外界信号逐级传递给细胞核中基因的作用。这些被推测担当第二信使的物质本身,对次生代谢物的产生也有着刺激作用。

Ca^{2+} 在胡萝卜细胞培养中,测试 Ca、Zn、Co、Fe 等离子对花青素的积累作用时发现, Ca^{2+} 的刺激作用最大^[9]; 同样在胡萝卜细胞培养中, Ca^{2+} 的离子载体 A23187 的加入,会刺激细胞合成 6-甲氧基蜂蜜曲菌素 (6-methoxymellein), 几种抑制胞内 Ca^{2+} 浓度增长的试剂都能抑制该物质的合成^[19]。本实验室在黄花蒿细胞培养试验中也发现,一定浓度范围内, Ca^{2+} 浓度上升,可以刺激细胞生长。因此,保证培养基中 Ca^{2+} 浓度对次生代谢物产生是很重要的。

cAMP 早在 70 年代就发现 cAMP 可以诱导红薯中呋喃类萜 (furanoterpenoid) 的产生,也可以引起大豆中植物抗毒素的合成和刺激敏感细胞坏死。胡萝卜细胞培养液中加入真菌刺激剂,可以检测到胞内 cAMP 浓度的提高; 而直接加入 cAMP 可以刺激 6-甲氧基蜂蜜曲菌素的合成。如果添加茶碱和霍乱毒素等可以引起胞内 cAMP 浓度上升的物质,可以起到同样的刺激效果^[19]。可见, cAMP 具有第二信使的功能,也是一个有效的刺激剂。

茉莉酮酸及其甲氧基酯 在加入真菌刺激剂之前,用茉莉酮酸的甲氧基酯 (methyl jasmonate) 对欧芹细胞悬浮培养进行预处理,会大大加强刺激剂的刺激效果,当刺激剂浓度低时效果更为明显^[20]。还有人在三十六种植物细胞悬浮培养中加入茉莉酮酸的甲氧基酯,都发现了 PAL 等涉及次生代谢的酶的重新转录^[21]。

作为第二信使的物质,在培养基中维持一定的浓度是十分重要的,而且它们可促进刺激剂的刺激效果,而其本身也可以作为有效的刺激剂,作用可能更直接、更省时,而且可以避免如糖蛋白刺激剂受到内源酶作用引起的阻遏剂产生这样的情况。

5. 其他刺激剂

有机酸 花生四烯酸可以刺激悬浮培养烟草细胞中紫杉醇和聚果赤霉素的产量提高^[16]。水杨酸被认为也具有第二信使的功能,从本实验室大蒜细胞悬浮培养物产生 SOD 的试验可以看出,它也可以做为刺激剂,刺激 SOD 产量,处理时间 3 d 为最佳,测得 SOD 活力上升 9 倍。

非生物性刺激剂 包括紫外线照射和金属离子等。有试验证明紫外线照射可以诱导胡萝卜细胞培养物中 PAL 的活性提高及花青素的积累^[22]。金属离子除 Ca^{2+} 外,其他一些离子对某些植物细胞也有刺激作用。本实验室玫瑰茄细胞培养生产花青素的试验发现, Mn^{2+} 对花青素产量有显著影响,产量可提高到对照组的 2.82 倍,可能是因为 Mn^{2+} 是多种氧化还原酶的激活剂。另外, Ca、Zn、Mn 对 SOD 的分泌都有促进作用。

另外可利用的刺激剂如植物细胞壁、除草剂、杀虫剂等都可以促进次生代谢物产生,一些更为经济的物质如液体石蜡、琼脂糖、纤维素等也有一定的刺激作用。

综上所述,目前用来促进植物细胞培养生产次生代谢物的刺激剂种类繁多,但由于其作用机理还不十分清楚,因而在选择刺激剂时还比较盲目,现在只能经过一系列的试验来确定其种类和剂量。如

果清楚刺激剂的作用机理, 将会更经济有效地利用刺激剂, 甚至还可以利用基因工程直接改造控制次生代谢的基因, 从根本上提高次生代谢物生产的产量。

参 考 文 献

- 1 Nurnberger T, *et al* Covalent cross-linking of the *Phytophthora megasperma* oligopeptide elicitor to its receptor in parsley membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**: 2338
- 2 Toyoda K, *et al* Regulation of polyphosphoinositide metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.*, 1992, **33** (4): 445
- 3 Endress R, In: *Plant cell biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994, 216
- 4 Rajendran L, *et al* Enhancement of anthocyanin prodn. in callus cultures of *Daucus carota* L. under the influence of fungal elicitor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, **42** (2-3): 227
- 5 Campbell M M, Ellis B E. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures (I) Induction of phenylpropanoid metabolism. *Plant*, 1992, **186** (3): 409
- 6 Felix G, *et al* Elicitor induced ethylene biosynthesis in tomato cells characterization and use as a bioassay for elicitor action. *Plant Physiol.*, 1991, **16** (1): 19
- 7 Suvarralatha G, *et al* Elicitation of anthocyanin prodn. in cell cultures of carrot by using elicitor and abiotic stress. *Biotechnol. Lett.*, 1994, **16** (12): 1275
- 8 Archambault J. Production of sanguinarine by elicited plant cell culture (I) Shake flask suspension cultures. *J. Biotechnol.*, 1996, **46** (12): 95
- 9 Hanagata N, *et al* Elicitor for red pigment formation in *Carthamus tinctorius* cultured cells. *J. Biotechnol.*, 1994, **34** (1): 71
- 10 方绮民等. 西洋参细胞悬浮培养中皂甙生物合成的代谢调节. *生物工程学报*, 1992, **8** (3): 261
- 11 Foernbrg H, Knorr F. Elicitation of chitinase and anthraquinones in *Morinda citrifolia* cell cultures. *Food Biotechnol.*, 1994, **8** (1): 57
- 12 Bordin A P A, *et al* Potential elicitors for avenalumin in oat leaves. *Nippon Shokubustu Byori Gakkaiho.* 1991, **57** (5): 688
- 13 Messiaen J, Van C P. Identification of defense genes activated by pectic elicitor in suspension-cultured carrot cells *in vitro* nuclear run-off transcription. *Bull. Rech. Agron. Genbloux*, 1994, **29** (2): 179
- 14 Sharp J K, Albersheim P. The primary structures of one elicitor-active and seven elicitorinactive hexza (β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. Sp. *glucinea*. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**: 11321
- 15 Yoshikawa M, Takouchi. In: *Molecular strategies of pathogens and host plants*, Springer-Verlag, New York 1991, 165
- 16 Ciddi V, *et al* Improvement of taxol production from cell cultures of *Taxus baccata* by elicitation. *Curr. Top Plant Physiol.*, 1995, **15**: 314
- 17 Basse C W, *et al* Elicitors and suppressors of the defense response in tomato cells. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267** (15): 10258
- 18 Davis D, *et al* Independent elicitation of the oxidative burst and phytoalexin formation in cultured plant cells. *Phytochem.*, 1993, **32** (3): 607
- 19 Kurosaki F, *et al* The elicitation of phytoalexins by C^{2+} and cyclic AMP in carrot cells. *Phytochem.*, 1987, **26** (7): 1919
- 20 Kauss H, *et al* Methyl jasmonate conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenylpropanoid defense response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **189** (1): 304
- 21 Grundlach H, *et al* Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**: 2389
- 22 Gleitz J, *et al* Metabolic changes in carrot cells in response to simultaneous treatment with ultraviolet light and a fungal elicitor. *Planta*, 1991, **184**: 362