

刺激剂对植物细胞悬浮培养的影响

李俊, 彭正松*

(西华师范大学生命科学学院, 四川南充 637002)

摘要: 对刺激剂对植物细胞悬浮培养的影响及如何提高刺激剂的诱导率进行了综述。刺激剂对细胞悬浮培养的影响主要表现为酶活化、蛋白质含量改变、氧迸发、细胞程序性死亡、pH值改变、次生代谢产物积累等防御反应。提高刺激剂对悬浮培养细胞的诱导效率必须优化刺激剂的种类, 刺激剂的浓度和加入时间, 创建更好的诱导模式。

关键词: 刺激剂; 细胞悬浮培养; 防御反应; 次生代谢产物

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)04-0341-08

Influence of elicitor on cell suspension cultures of plants

LI Jun, PENG Zheng-song*

(College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637002, China)

Abstract: Influence of elicitor and how to enhance inductivity on cell suspension cultures are summarized in this paper. Defense responses are manifested mainly on cell suspension cultures by elicitor influence, such as enzyme activation, changes of protein content and pH, oxidative burst, programmed cell death, accumulation of secondary metabolites, *et al.* Elicitor species, concentration and induction phase, and better induction model are very important to the improvement of inductivity on cell suspension cultures.

Key words: elicitor; cell suspension culture; defense response; secondary metabolites

植物细胞能合成许多具有重要价值的次生代谢产物,如皂苷、生物碱、糖苷、木质素等,这些次生产物可作为香料、毒物、防腐剂、调味剂、农药等。然而天然植物生长周期长,且生长受地域和环境因素的影响,因此直接提取次生代谢产物具有较大的局限性。植物细胞培养可大规模生产次生产物,已成为生产高价值产品的重要途径。随着植物组织和细胞培养技术的发展,细胞悬浮培养日益完善。如何利用植物细胞悬浮培养技术生产有用的次生代谢产物并且提高代谢物的产量是生物学家研究的热点。增加植物细胞培养物中次生代谢产物产量的方法可通过改变培养基成分及其浓度、生长调节剂的选择或基因克隆等手段来实现,此外,利用刺激剂处理植物

悬浮培养细胞以促进细胞快速、大量合成次生代谢产物已成为人们普遍关注的重要方法之一。

1 概述

植物在遭受外界不良因素,如生物、非生物入侵、创伤等胁迫时,植物细胞往往趋于向次生产物合成的方向转变,产生植物抗毒素,这种能引起植物产生植物抗毒素和引起植物过敏反应(hypersensitive reaction, HR, 亦称抗性反应或自身防御反应 self-defense reaction)的胁迫因子统称为刺激剂。刺激剂还能诱导其他的防卫反应(如产生水解酶类及可加厚细胞壁结构的特殊蛋白质,合成抑制病原菌降

收稿日期: 2004-03-22 修订日期: 2004-09-20

基金项目: 四川省重点学科建设项目资助(SZD0420)。

作者简介: 李俊(1979-),女,四川德阳市人,在读硕士,专业方向:资源植物遗传学。E-mail:lijunnanchong@tom.com

* 通讯作者 E-mail: zspeng@cwnu.edu.cn

解酶的蛋白)。

刺激剂一般分成生物刺激剂(biotic elicitor)和非生物刺激剂(abiotic elicitor)两类。生物刺激剂包括多糖类、多肽类、不饱和脂肪酸和糖蛋白等;非生物刺激剂包括紫外线、高温、低温、pH值、乙烯、重金属盐和高浓度盐等。生物刺激剂从起源来说又分为内源性刺激剂(endogenous elicitor)和外源性刺激剂(exogenous elicitor)(Akimoto等,1999)。内源刺激剂主要指来自植物细胞的分子,多为植物细胞壁在微生物作用下的降解产物(如复杂多糖、糖蛋白等)及沉积在细胞壁上的木质素;外源性刺激剂亦称真菌刺激剂(genuine elicitor),是指病原微生物在入侵植物时自身被降解的产物及其代谢产物。目前应用最多的是真菌刺激剂,根据其结构可分为4类:多糖类,糖蛋白类,蛋白质类,不饱和脂肪酸类。

近年来,根据植物对外界因素所产生的防御反应,人们尝试用刺激剂胁迫植物细胞合成和积累次生代谢物,取得了一定的成果。如悬钩子(*Rubus idaeus*)细胞悬浮培养中以茉莉酮甲酯诱导24h可使悬钩子酮含量增加2~3倍(Seshu等,2000)。Namdeo等(2002)在悬浮培养中用*A. niger*,*F. moniliforme*和*T. viride*处理*C. roseus*细胞,结果发现,阿马里新的积累量增加了大约三倍,最大量达到了166 mug/gDW。

2 刺激剂的作用机理

刺激剂作为一种外界信号被植物细胞膜上的受体所识别,并与之结合,从而引起细胞膜上及膜内一系列反应,刺激剂通常是激活植物体内产生过敏反应时合成代谢途径中关键酶的活性,并诱导活化这些酶的mRNA的转录,翻译和蛋白质的生物合成,最终导致植物抗毒素的合成和积累。刺激剂改变酶活性,引起基因启动是一个级联过程。这一过程可能包括3步。

2.1 信号识别

植物细胞膜上存在着识别信号分子的受体(原初靶位点),能识别并选择性地结合某种信号分子。刺激剂作为一种外界信号分子,加入细胞悬浮培养基后,能被细胞膜上的特异受体识别并与之结合。Yoshikawa等在1983年通过¹⁴C标记的真菌刺激剂和直接的膜结合测定的方法,发现¹⁴C-Mycolaminaran的结合位点主要位于质膜上,并且是单一的亲

和位点,说明它们可能参与了大豆毒素的合成的开始过程,大豆细胞质膜上存在着大豆毒素刺激剂的特异结合位点。大量实验表明,受体识别是刺激剂诱导植物防御反应产生的第一步。

2.2 信号转导

刺激剂与受体结合后,构型发生改变,从而激活细胞内有关酶的活性(如一些还原酶和脱氢酶被活化),并使蛋白质磷酸化。Dixon(1986)认为,细胞主要通过两条途径传递诱导信号:(1)刺激剂通过细胞内吞作用,直接作用于核特异基因。(2)诱导物与受体结合后激活第二信使系统,间接激活核特异基因。因此,可以推测大多植物是通过内吞或第二信使系统传递诱导信号的。大量研究表明,常见的第二信使有Ca²⁺、cAMP、G-蛋白、磷酸肌醇、水杨酸和茉莉酸及甲氧基酯、植物细胞壁组成成分。

2.3 防卫基因的表达调控

诱导信号被传递后,激活与抗性相关的基因,使特异基因转录和翻译,这些基因包括参与苯丙酸生物合成的酶的基因,编码病原相关蛋白酶及裂解酶的基因。同时,相应的mRNA积累及相应酶的增加,最后产生植物抗毒素类的抗性物质。Pauli等(1998)证明茉莉酸类物质是通过诱导细胞色素P450基因的表达,从而诱导细胞色素P450酶的活性来促进植物次生代谢物的合成。

目前,对刺激剂的作用机理研究还不是很清楚,但是生物研究者也提出了很多机理模型。如,Ca²⁺—信号传递机制模型:(1)刺激剂与其受体高度亲合,引起细胞膜活性的改变,即位于细胞膜上的离子通道改变,引起Ca²⁺,H⁺内流,K⁺,Cl⁻外流;(2)同时迅速发生H₂O₂胞内依赖Ca²⁺的蛋白质磷酸化作用,激活细胞内有关酶的活性;(3)启动核内的防御基因,引起防御反应,诱导合成植物抗毒素的酶合成植物抗毒素。这一机制概括起来包括三点:膜的变化、酶的变化、基因的启动。

3 刺激剂对植物细胞悬浮培养的影响

当刺激剂加入悬浮培养基中时,植物为了保护自身免受入侵病原体的感染而诱导防御反应,如:植物抗毒素的积累,细胞程序性死亡,活性氧的产生,pH值的改变等,从而使细胞的生理态势和次生代谢产物的积累量发生改变。

3.1 刺激剂对细胞生理态势的影响

李春等(2002)研究了寡聚糖对红豆杉细胞氧化还原生理态势的影响。结果表明,诱导前红豆杉细胞处于相对稳定的生长态势,细胞完整,细胞器发达;氧化还原电势较低,活性氧相关酶系统相对稳定,细胞初生代谢旺盛,紫杉醇合成速率很低。诱导后红豆杉细胞向产物合成态势转移,SOD 酶活性迅速提高;细胞出现活性氧迸发,4h 达最大值;细胞的氧化还原电势增高,细胞膜上离子通道被激活, H^+ 和 Ca^{2+} 内流, Cl^- 外流;液胞内出现大量含 Ca^{2+} 离子的高电子致密区并呈规律性变化,培养环境碱化;细胞生长被抑制,紫杉醇合成速率升高,其产量提高了 5.5 倍,达 76.1 mg/L。

3.1.1 膜的改变 刺激剂与细胞膜上的受体结合后,引起膜的通透性增加和流动性改变,并出现细胞浸润现象。如加入脱乙酰几丁质就可以使植物细胞膜的通透性得以改变,且其胶化也使植物细胞膜的流动性降低。

3.1.2 蛋白质含量的改变 刺激剂能引起细胞的代谢变化,它不仅使细胞积极合成了植物防卫的次生代谢物质,如植保素、木质素等,同时也启动或加强了特定的次生代谢途径,而这些过程的发生主要是通过酶类的调控来实现的,蛋白质的含量变化正反映了这些酶类的量变过程。张长平等(2001)对南方红豆杉悬浮培养时加入刺激剂真菌尖孢镰刀菌(*Fo*)后,蛋白质的量发生了明显的变化:诱导组胞内蛋白的含量出现了先高于后低于对照组的现象,这很可能是细胞膜通透性改变及蛋白质合成速率发生变化共同作用的结果。诱导初期,细胞生长速率相对还仍然较大,因此胞外蛋白质含量呈下降趋势;而刺激剂的加入一般都会导致细胞生长的停止甚至死亡,因此在加入刺激剂后 8 h 左右胞外蛋白含量达到低峰;当细胞逐渐进入平稳期时,与各种次生代谢相关酶相继合成,使胞外蛋白含量平稳上升;诱导末期,由于诱导作用使细胞的死亡率增大造成胞内蛋白的外泄,使这种趋势加剧,胞外蛋白含量诱导组始终高于对照组。

添加 $CuCl_2$ 诱导处理 5 d 后,红豆杉细胞中可溶性蛋白质含量为 1.70 mg/g,较对照 0.25 mg/g 增加 36%;10 d 后,诱导处理较对照降低 11%。比较诱导处理 10 d 与 5 d 时细胞中可溶性蛋白质含量,发现诱导处理 10 d 时细胞中可溶性蛋白质含量较 5 d 时下降 26%(李家儒等,1999)。

3.1.3 酶活性的改变 刺激剂处理细胞悬浮培养体系能增加原代谢途径中关键酶的活性,或活化次生代谢途径中特定酶基因,诱导新酶的形成,从而提高植物细胞中原来次生代谢物的含量,或合成新的次生产物,促进目的产物的合成。如紫杉醇的合成途径中苯丙氨酸解氨酶是桂皮酸途径的定速酶,苯丙氨酸经 PAL 氨解生成桂皮酸,桂皮酸经 β 氧化和氧化脱羧作用产生苯甲酸,苯甲酸是紫杉醇 C_{13} 侧链生物合成的前体。诱导处理增强红豆杉细胞内 PAL 活性,促进细胞内苯甲酸的合成,从而促进紫杉醇的合成(Eilert,1987)。

Stab 等(1987)研究表明葡聚糖刺激剂促使植物抗毒素生物合成酶,苯丙氨酸脱氨酶,苯基苯乙烯酮合成酶活性提高,并且诱导植物抗毒素,大豆抗毒素的产生。Francesca 等(2000)用酵母刺激剂,壳多糖刺激剂, β -葡聚糖刺激剂,N-乙酰葡糖氨寡聚体刺激剂,麦角甾醇刺激剂处理细胞分裂素活性蛋白激酶(MAPK)被不同程度活化,并有不同的动态。用酵母刺激剂处理的苜蓿细胞通过凝胶激酶实验揭示 44 和 46 Kda 的 MAPKS 被快速瞬时的诱导,并且表明酵母刺激剂主要活化 46Kda SIMK 和 44Kda MMK3,活化很少的 44Kda MMK2 和 SAMK。

Szabo 等(1999)用 10 μ M 的 MJ(Methyl jasmonate)处理悬浮培养的 *C. blumei* 细胞,发现 MJ 对 PAL, HPPR, RAS, TA 四种酶都有明显诱导作用。其中 PAL 和 HPPR 的活性都比对照组(未加 MJ 培养的细胞)增加了 3 倍,且 PAL 和 HPPR 的活性分别在处理后 12 h 和 8 h 达到了峰值,但这之后, PAL 和 HPPR 的活性都快速降低甚至低于对照组;TAT 的活性比对照组的 20.50% 还高。

3.1.4 pH 值的改变 刺激剂一般会诱导细胞培养体系碱化。植物细胞对 pH 具有较强的自我调控能力,而诱导作用引起了质子的内流,因此推测 pH 的改变很可能是刺激剂对植物细胞独特的诱导机制所致。刺激剂对细胞进行诱导时,作为一种信号分子,它本身不能进入细胞内部,只能依靠信号转导途径来调节细胞的生长、代谢和在环境中的生存能力,而其所需要的能量正是由质子的流动及电化学梯度所提供的。

Wu 等(2002)用低能 US 处理悬浮培养的人参细胞,发现培养基中的 pH 值随 US 的剂量增加而增加,培养基逐渐碱化,由于 H^+ 内流,胞内 pH 值降低。每一种酶活性均有其最适 pH 值范围,刺激剂处理导致培养基中 pH 值改变,可能改变胞内

某些生物合成相关酶的活性。

3.1.5 活性氧的改变 活性氧(active oxygen species-AOS)即 $O^{\cdot-}$ 、 OH^{\cdot} 和 H_2O_2 的产生是植物-病菌相互作用初期最显著的特征之一,是植物细胞受到刺激剂刺激后所发生的很重要的一个防御反应(Levine 等,1994)。所谓氧迸发是指细胞中反应性氧的快速、短时间大量释放的现象。当刺激剂加入悬浮培养中时,诱导信号可能经 G 蛋白介导,活化质膜氧化还原反应,从而在细胞表面迅速产生的。产生的活性氧通过脂氧合酶或非酶促方式发生脂质过氧化。脂质过氧化一方面将膜脂和其它脂类过氧化改变细胞膜的透性,另一方面也可以通过脂肪酸的氧化而衍生出许多次生信号,启动防卫反应和防卫基因表达。膜透性的增加,是细胞迈向过敏性死亡的第一步,而次生防卫信号的产生,则是某些寄主植物不亲和互作防卫反应的开始。实验证明, H_2O_2 可诱导 SA 的合成,启动细胞壁的交联反应,协调过敏性细胞死亡和启动多种防卫反应基因表达(Hammond-Kossack, 1996; Mehdy, 1994)。

ESR 测定活性氧结果显示,经寡聚糖处理 30 min 后红豆杉细胞内活性氧开始增加,明显高于对照组;4 h 后出现最大氧迸发,细胞出现了强烈的氧化生理信号;5 h 后氧迸发强度开始下降,而未处理的对照组基本上保持在同一水平(李春等,2002)。

过多的活性氧对细胞是有害的,自由基具有很强的氧化能力,很不稳定,能持续进行连锁反应,对许多功能分子有破坏作用。如,自由基能引发蛋白质、酶、核酸等功能分子的二聚作用和歧化反应而影响它们的结构和功能,而且二聚作用还能导致 DNA 的损伤。很多研究结果,刺激剂加入到细胞培养体系后,大量自由基的产生诱发了自由基防御体系中酶保护系统的显著变化以实现细胞自身的保护。SOD、CAT、POX 等是活性氧和自由基清除的酶系统,维生素 C、维生素 E、类胡萝卜素、不饱和脂肪酸等为非酶抗氧化剂。SOD 能清除超氧化物阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$),CAT 能清除过氧化氢(H_2O_2),POX 能清除过氧化氢和脂类氢过氧化物。非酶抗氧化物,有的可直接与 $O^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 或 OH^{\cdot} 反应;有的可以中断自由基在膜中的过氧化链而保护细胞膜(Salin, 1987; Wise, 1987)。

3.1.6 对细胞生长的影响 由于植物抗毒素多具有毒性,一般而言,刺激剂对悬浮培养中细胞的生长有抑制作用。如欧芹细胞悬浮培养,未加刺激剂的细

胞生长迅速,而加入刺激剂的细胞干重不变,随着刺激剂的增加,细胞逐渐死亡。细胞生长与刺激剂的剂量和培养时间有关,如用不同剂量的 US 对人参悬浮培养的细胞进行长短不同时间的处理,发现低剂量、短时间处理对细胞生长无明显影响;高剂量、长时间处理细胞活力降低,对细胞生长不利(Wu 等,2002)。不过也有报道,人参寡糖素同时诱导西洋参细胞生长和皂苷积累,延胡索培养物在蜜环菌诱导下,细胞生长和生物碱的积累是平行的。

3.2 刺激剂对次生代谢产物的影响

次生代谢物是植物体代谢的最终产物,由糖类、脂肪和氨基酸等有机物代谢衍生而来,储存在液泡或细胞壁中。吲哚乙酸、赤霉素等植物激素,胡萝卜素、花青素等色素,奎宁碱、小檗碱、皂甙等药物以及橡胶等工业原料,都是重要的次生代谢物质。

Lu 等(1987)用来自 *Fusarium solani* 的刺激剂诱导悬浮培养的 *cistanche deserticola* 细胞,结果表明海胆苷(echinacoside), acteoside 和 phenylethanoid glycosides(PeGs)三种次生代谢物的含量都显著提高,鲜重分别为 15、9、57 mg/g。

李家儒等(1999)用 $CuCl_2$ 处理红豆杉细胞,得出,培养基中添加的 $CuCl_2$ 浓度在 0.5~100 $\mu mol/L$ 之间时,均能诱导紫杉醇的合成;在 0.5~30 $\mu mol/L$ 浓度范围内,紫杉醇含量随 $CuCl_2$ 浓度增加而增加;而对照处理紫杉醇含量为 0,说明不加刺激剂,紫杉醇合成途径没有开启, Cu^{2+} 作用于红豆杉细胞后,活化紫杉醇合成途径,从而促进了紫杉醇的合成。

刺激剂对植物次生代谢的调节有两种方式,一是诱导新酶的合成,启动新的代谢支路,从而合成新的次生代谢产物。如曼陀罗(*Datura stramonium*)的根可以合成生物碱,经刺激剂处理后,生物碱的合成受到抑制,根中快速积累大量的倍半萜类次生产物,表明与生物碱合成有关的酶受到抑制,而与倍半萜类次生产物合成的新酶出现(Furze 等,1991)。二是增加原代谢途径中关键酶的量,从而提高该次生产物的产量,如悬浮培养的大阿米(*Ammi majus*)只能形成微量的伞花内酯(umbelliferone),经刺激剂处理后,细胞可以合成大量的伞花内酯(Hamerski 等 1990)。

4 提高刺激剂作用效果的优化策略

在一定细胞生长时期添加不同的刺激剂是提高

次生代谢产物产量的有效方法,然而,细胞生长和次生代谢物产量受到多种因素的影响,刺激剂不能发挥高效的作用,为了提高刺激剂的效率人们做了许多研究。

4.1 对不同植物品种使用不同的刺激剂

诱导不同植物的防御反应需要不同的刺激剂,如花生四烯酸能诱导马铃薯、胡椒产生防御反应,但对其他的植物无效。大雄疫霉(*Phytophthora megasperma*)的葡萄糖刺激剂能诱导大豆产生大豆抗毒素,但对欧芹无效。Heike(1994)认为果胶是橘叶巴戟中诱导花青素合成的最有效物质。

4.2 同一植物不同刺激剂处理效果不同

同一种植物细胞进行悬浮培养时可以运用多种刺激剂,但是每种刺激剂的诱导效果不同。为了高效地利用刺激剂,我们必须对同一植物的多种刺激剂进行选择。Akimoto 等(1999)用 CO、OGA 和 AO 分别对 *C. roseus* L 细胞(观察 5'-磷酸二酯酶的变化)和 *W. japonica* 细胞(观察壳多糖酶的变化)都进行处理,结果发现,加入 CO 后细胞生长受到抑制,但 5'-磷酸二酯酶和壳多糖酶的产量高于 AO 加入时;OGA 加入后细胞生长也被抑制,而两种酶的含量显著提高。Kim 等(2001)分别用酵母刺激剂和从 *B. cinerea* 培养液中的真菌刺激剂处理人参细胞,结果表明,两种刺激剂处理后,2,5-二甲氧-1,4 苯醌的含量都提高了。但是酵母刺激剂处理效果比真菌刺激剂处理好,酵母刺激剂处理后 2,5-二甲氧-1,4 苯醌的含量为 65.10 $\mu\text{g/g}$ (鲜重),平均浮动为 4.96,真菌刺激剂处理后 2,5-二甲氧-1,4 苯醌的含量为 46.13 $\mu\text{g/g}$ (鲜重),平均浮动为 10.42。

用 7 种真菌菌丝体作为诱导因子,其中 6 种能促进西洋参悬浮细胞的皂甙合成,尤以匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)作用更明显,皂甙含量可对照提高 2 倍,而浓度为 50 mg/L 的人参寡糖素能维持细胞较好的生长又能提高皂甙含量(谢秋玲等,1998)。

陈永勤等(1999)用不同真菌刺激剂对云南红豆杉细胞试验。在四种真菌刺激剂中,以含桔青霉菌丝的处理(Pen1)效果最好,其紫杉醇含量和产量分别比对照高 113.2% 和 104.0%,达 0.035 6%(干细胞)和 5.06 mg/L。其次是灰葡萄孢霉菌,处理后紫杉醇含量和产量分别比对照提高了 58.7% 和 51.2%。鲁氏毛霉和灰绿梨头霉对云南红豆杉悬浮培养细胞形成紫杉醇的促进作用不显著。虽然桔青霉菌的培养液也能提高细胞中紫杉醇的含量,但效

果不如有菌丝的显著。

4.3 不同细胞培养时期加入刺激剂

细胞培养时期一般包括延迟期,指数期和稳定期三个时期,在这不同的三个时期加入刺激剂诱导效果不同。悬浮培养细胞的生长与次生产物积累之间的相关性具有三种模式:(1)次生产物的积累在细胞生长的静止期;(2)次生产物的积累高峰在细胞生长的指数生长期;(3)次生产物的积累和细胞生长是平行关系。Ramos Valdivia 等(1997)研究了刺激剂处理后不同时期 IPP isomerase 活性的改变。诱导后 12 h,酶活性快速增加达到峰值;在诱导后 72 h 酶活性再次快速增加,达到第二个峰值。

用 Cu^{2+} 对红豆杉(*Taxus chinensis*)悬浮培养细胞中紫杉醇形成的影响进行了研究。在红豆杉细胞悬浮培养 20 d 即指数生长期末(红豆杉细胞悬浮培养 0~8 d 为延迟期,8~2 d 为指数生长期,稳定期为 20~32 d),加入浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 , Cu^{2+} 促进紫杉醇形成的作用最大,诱导效果最好,细胞中紫杉醇含量为 4.88 $\mu\text{g/g}$ 。这表明,在指数生长期末红豆杉培养细胞对 Cu^{2+} 诱导处理具有最强的反应能力。

苏湘鄂等(2000)研究了处于不同时相的红豆杉细胞经诱导后生活力、生物量、紫杉醇含量及几个与次生代谢有关的生理生化指标的差异,对细胞时相与次生代谢强度的关系进行了探讨。结果表明,在细胞培养的第 7 天(延迟期)进行诱导,细胞的活力、POD 活性、 H_2O_2 、生物量、紫杉醇单位含量均高于第 14 天(对数期)进行诱导,显著高于第 21 天(稳定期)开始诱导。说明在延迟期进行诱导时,细胞对刺激剂的反应灵敏度较高,次生代谢启动的强度更大,在延迟期进行诱导能获得较高的紫杉醇生产率。

4.4 适度的刺激剂浓度

刺激剂在诱导植物次生产物合成过程中,其活性与浓度有关。刺激剂浓度效应有两种类型:一种是反应饱和型,即次生产物的积累随刺激剂浓度增加而增加,达到最大后稳定;另一种是最适浓度型,即刺激剂表现出最佳效果具有最适浓度。在植物细胞悬浮培养中,后者比较常见。用 5 种不同浓度的琼脂糖来考察它对银杏悬浮培养细胞生长及黄酮类化合物产生的影响,结果表明,加入浓度为 0.01~0.5 g/L 的琼脂糖均能明显地促进细胞生长。琼脂糖浓度为 0.01 g/L 时,细胞生长最快,当琼脂糖浓度为 0.10 g/L 时,黄酮含量最高。当琼脂糖浓度达到 1.0 g/L,既不利于细胞的生长,也不利于黄酮的

累积。可见,在培养基中添加一定浓度的琼脂糖能够促进银杏悬浮培养细胞的生长及黄酮的累积(杨林等,2002)。

红豆杉细胞培养时加入 0.1 mg/L 水杨酸,紫杉醇含量最高可达 6.8 mg/L,而对照组仅为 1.2 mg/L。当水杨酸的浓度大于 0.1 mg/L 时,紫杉醇的含量又呈下降趋势(苗志奇等,2000)。Ketchum 等(1999)在不同培养时间加入不同浓度的茉莉酮酸甲酯(methyljasmonate),发现均能促进紫杉醇合成,只是增加量略有不同。其中,以继代培养 7 d 后加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 作用效果最为明显,产量可达 14.4 mg/L。Yukimune 等(1996)研究表明在培养基中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酮酸甲酯对提高红豆杉培养细胞紫杉醇的含量最有利。

实验证明在南方红豆杉细胞培养体系中分别加入 1.0 mmol/L 硝酸铯铵、0.01 mmol/L 硝酸银、0.1 mg/L 花生四烯酸、0.1 mg/L 水杨酸以及 10.0 mg/L 甲基茉莉酮酸最有利于紫杉醇产量的提高(施中东等,1999)。

4.5 刺激剂和其他物质的协同作用

刺激剂和其他物质(如糖类、前提物质、抑制剂等)的协同作用可充分发挥刺激剂的诱导潜力。晏琼等(2003)研究了果糖补料和真菌刺激剂对紫杉醇合成的协同作用,结果表明,果糖补料与真菌尖孢镰刀菌(F_0)协同作用对培养体系胞外 pH 的影响趋势与真菌刺激剂单独作用时相似,即培养基发生了明显的碱化。次生代谢产物一酚类物质在果糖补料与 F_0 协同作用下,酚积累量的增加比真菌单独诱导时更显著,高积累值持续时间更长,紫杉醇的质量浓度也明显增加,在第 2 天出现峰值,最高产量达 81.0 mg/L,膏腺真菌刺激剂单独作用时的最高产量 67.2 mg/L。

Hye 等(2001)用酵母刺激剂和 BTH(Benzothiadiazole)的协同作用处理 Parsley 细胞,发现协同作用时迷迭香叶宁酸(Rosmarinic acid 简称 RA)的含量比单独用酵母刺激剂和单独用 BTH 处理时含量提高了 11.4 倍。苗志奇等(2000)通过水杨酸和硝酸银的配伍诱导,实现了刺激剂之间的协同作用,获得了 39 mg/L 的紫杉醇含量,比两个刺激剂单独作用时的最高含量之和还高出 50%。

F_0 和 SA 单独处理红豆杉细胞均引起细胞膜脂过氧化。SA + F_0 联合处理可以减轻 F_0 单独处理细胞所引起的膜脂过氧化程度,较大地提高了过氧化物酶的活性,红豆杉细胞紫杉醇产量增加,达到

11.5 mg/L,分别为 F_0 , SA 单独处理和对照组的 1.5 倍、2.0 倍和 7.5 倍。说明协同作用可提高次生代谢物的产量,可能由于协同作用引起细胞膜脂过氧化,且与过氧化程度有关(兰文智等,2002)。

生物刺激剂和非生物刺激剂协同也能提高次生代谢物的产量。Wu 等(2003)用 US 单独处理红豆杉悬浮细胞,紫杉醇的含量提高了 1.5~108 倍;用 MJ 单独处理处理时紫杉醇含量提高了 5 倍。而用 US 和 MJ 共同处理时,紫杉醇含量比它们单独处理时提高 20%~50%。

4.6 小剂量连续诱导

刺激剂能促进植物细胞合成和积累特定的次生代谢产物。较低浓度的刺激剂虽对细胞生物量影响较小,但细胞中次生代谢物单位含量较低。较高浓度的刺激剂虽然可以增加次生产物的单位含量,但往往严重抑制细胞的生长。因此,在不影响甚至提高诱导效果的前提下,减轻刺激剂对细胞的毒害作用是刺激剂应用于植物细胞悬浮培养时一个必须考虑的重要问题。

为了解决这个问题,苏湘鄂等(2002)设计了小剂量诱导方案,并且比较了小剂量连续诱导与一次性大剂量加入刺激剂对 H_2O_2 含量、生物量及紫杉醇含量等方面影响的差异。结果表明:小剂量连续诱导组 H_2O_2 相对含量、生物量及紫杉醇含量都较一次性大剂量加入刺激剂组高。前者三个指标的值分别为:17.6 OD_{410}/g 、27.84 $\text{g}/100\text{mL}$ 、5.0(1/万 DW),后者三个指标的值分别为:120 OD_{410}/g 、24.51 $\text{g}/100\text{mL}$ 、1.2(1/万 DW)。

综上所述,刺激剂对植物细胞悬浮培养中蛋白质的改变,酶活性的改变,pH 改变,细胞的生长及次生代谢产物的改变具有很重要的诱导效应。刺激剂的诱导效应与刺激剂的种类,培养物的种类,植物材料,刺激剂的浓度,刺激剂加入的时间有很大的关系。但是,刺激剂的结构和诱导机理还不完善,为了更好发挥刺激剂的作用,我们还要进一步探讨刺激剂的结构,作用机理和作用位点,利用各种手段合成各种高效的刺激剂。如:选择良好的外植体和刺激剂;利用各种分子生物学方法从植物悬浮细胞中克隆出刺激剂诱导表达的基因,并对基因进行测序和功能鉴定;直接选用第二信使作为刺激剂,不仅经济,而且可以避免刺激剂受到植物内源酶作用引起的阻遏剂的产生;完善植物细胞悬浮培养条件,优化刺激剂与影响悬浮培养的其他因素之间的关系。随

着人们对刺激剂研究的深入,相信刺激剂将在细胞悬浮培养中发挥越来越大的作用。

参考文献:

- 苏湘鄂,梅兴国,龚伟. 2002. 小剂量连续诱导法提高红豆杉细胞中紫杉醇含量[J]. 生物技术,12(4):23-24.
- 谢秋玲,郭勇. 1998. 诱导剂对植物细胞生产次生代谢物的作用[J]. 食品科学,19(10):7-9.
- Akimoto CH, Aoyagi H, Tanaka. 1999. Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant cells[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 52(3): 429 - 436.
- Chen YQ(陈永勤), Zhu WH(朱蔚华), Wu YQ(吴蕴祺), et al. 1999. Effects of fungus elicitors on taxol production in suspension cells of *Taxus yunnanensis* (几种真菌诱导子对云南红豆杉细胞产生紫杉醇的影响)[J]. *Chinese J Biotechnology*(生物工程学报), 15(4):522-524.
- Dixon RA. 1986. The phytoalexin response, elicitation, signaling and control of host gene expression[J]. *Biol Rev*, 61(3):239-291.
- Eilert U. 1987. Elicitation: methodology and aspects of application[M]. In: Constabel F, Vasil IK(eds). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*[M]. New York: Academic Press, 4:153-188.
- Francesca C, Claudia J, Wilco L, et al. 2000. Thomas Boller, Heribert Hirt. Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors[J]. *J Biological Chemistry*, 275(47):36 734-36 740.
- Furze JM, Rhodes MJC, Parr AJ, et al. 1991. Abiotic factors elicit sesquiterpenoid phytoalexin production but not alkaloid production in transformed root cultures of *Datura stramonium*[J]. *Plant Cell Rep*, 10:111.
- Hamerski O, Beier RC, Kneusel RE, et al. 1990. Accumulation of coumarins in elicitor-treated cell suspension culture of *Ammi majus*[J]. *Phytochem*, 29:1 137.
- Hammond-Kossack KE, Jones JDG. 1996. Resistance gene dependent plant defense responses[J]. *Plant Cell*, 8(10):1 773-1 870.
- Heike D, Dietrich K. 1994. Polysaccharides as elicitors for anthraquinone synthesis in *Morinda citrifolia* cultures[J]. *J Agricultural and Food chemistry*, 42(4): 1 048-105.
- Hye Kyong Kim, Sei-Ryang Oh, Hyeong-Kyu Lee, et al. 2001. Benzothiadiazole enhances the elicitation of rosmarinic acid production in a suspension culture of *Agastache rugosa* O. Kuntze[J]. *Biotechnology Letters*, 23(1):55-60.
- Kim CY, Im HW, Kim HK, et al. 2001. Accumulation of 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone in suspension cultures of *Panax ginseng* by a fungal elicitor preparation and a yeast elicitor preparation[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56:239-242.
- Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB, et al. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of taxus following elicitation with methyl jasmonate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(1):97-105.
- Li JR(李家儒), Guan ZY(管志勇), Liu MX(刘曼西), et al. 1999. Effects of Cu²⁺ on taxol formation in cell cultures of *Taxus chinensis* (Cu²⁺ 对红豆杉培养细胞中紫杉醇形成的影响)[J]. *J Huazhong Agricul Univ*(华中农业大学学报), 18(2):117-120.
- Li C(李春), Yuan YJ(元英进), Ma ZH(马忠海), et al. 2002. Changes of physiological state of suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by oligosaccharide(寡聚糖诱导悬浮培养红豆杉细胞生理态势的改变)[J]. *J Chemical Industry and Engineering*(化工学报), 53(11): 1 134-1 138.
- Lan WZ(兰文智), Yu LJ(余龙江), Wu YX(吴元喜). 2002. Effects of salicylic acid on membrane-lipid peroxidation induced by fungal elicitor and taxol synthesis in *Taxus chinensis* suspension cell cultures(水杨酸对真菌诱导子诱导红豆杉悬浮细胞膜脂过氧化和紫杉醇生物合成的影响)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 22(1): 78-83.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, et al. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response[J]. *Cell*, 79(4):583-593.
- Lu CT, Mei XG. 1987. Improvement of phenylethanoid glycosides by a fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*[J]. *Biotechnology Letters*, 25(17): 1 437-1 439.
- Mehdy MC. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens[J]. *Plant Physiol*, 105(2):467-472.
- Miao ZQ(苗志奇), Wei ZJ(未作君), Yuan YJ(元英进). 2000. Study on the effects of salicylic acid on taxol biosynthesis(水杨酸在紫杉醇生物合成中诱导作用的研究)[J]. *Chinese J Biotechnology*(生物工程学报), 16(4):509-513.
- Namdeo A, Patil S, Fulzele DP. 2002. Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*[J]. *Biotechnology Progress*, 18(1):159-162.
- Pauli HH, Kutchan TM. 1998. Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding(S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate inducible cytochrome P450-dependent mono-oxygenase of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis[J]. *Plant J*, 13(6):793-801.
- Ramos Valdiria AC, Heijden R van der, Verpoorte R, et al. 1997. Elicitor-mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase activities in cell suspension cultures of *Cinchona robusta* How[J]. *Planta*, 203(2): 155-161.
- Salin ML. 1987. Toxic oxygen species and protective system soft the chloroplast[J]. *Physiol Plant*, 72:681-689.
- Seshu Pedapudi, Chee-Kok Chin, Henrik Pedersen. 2000. Production and elicitation of benzalacetone and the raspberry ketone in cell suspension cultures of *Rubus idaeus* [J]. *Biotechnol Prog*, 16(3):346-349.
- Shi ZD(施中东), Wei ZJ(未作君), Yuan YJ(元英进). 1999. Concentration optimization of elicitors on taxol production in plant cell culture of *Taxus chinensis* var. *mairei* (南方红豆杉细胞培养合成紫杉醇诱导子浓度的优化)[J]. *Nat Product Research and Development*(天然产物研究与开发), 12(4): 152-156.
- Su XE(苏湘鄂), Mei XG(梅兴国), Gong W(龚伟), et al.

2000. Relationships between the strength of secondary metabolite of *taxus* cell and cell phase in suspension culture system(红豆杉细胞时相与其次生代谢强度的关系)[J]. *Biotechnology*(生物技术), 10(4): 14-16.
- Stab MR, Ebel J. 1987. Effects of Ca^{2+} on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 257(2): 416-423.
- Szabo E, helen A, Petersen TM. 1999. Fungal elicitor preparation and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*[J]. *Plant Cell Report*, 18(6): 485-489.
- Wu J, Lin L. 2002. Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells; induction of plant defense responses and secondary metabolite production[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59(1): 51-57.
- Wu J, Lin L. 2003. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(2-3): 2-3.
- Wise RR, AW Naylor. 1987. Chilling-enhanced photo oxidation evidence for the role of single toxygen and superoxide in breakdown of pigments and endogenous antioxidants[J]. *Plant physiol*, 83: 278-282.
- Yang L(杨林), Zhou JY(周吉源). 2002. Cell suspension culture and flavonoids for mation of *Ginkgo biloba* L. (银杏细胞悬浮培养及黄酮的产生)[J]. *J the CUN(Nat Sci Edition)*(中央民族大学学报(自然科学版)), 11(1): 55-58.
- Yan Q(晏琼), Yuan YJ(元英进), Hu ZD(胡宗定). 2003. Synergistic effects of fructose feeding and fungal elicitor on *Taxus chinensis* var. *marrei* suspension cultures(果糖补料与真菌诱导对红豆杉细胞悬浮培养体系的协同效应)[J]. *Chemical engineering*(化学工程), 31(5): 46-49.
- Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, et al. 1996. methyl-jasmonate induced over production paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension culture[J]. *Nature Biotechnol*, 14(9): 1 129-1 132.
- Zhang CP(张长平), Li C(李春), Yuan YJ(元英进), et al. 2001. Effects of fungal elicitor on cell status and taxol production in cells suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *maireri*(真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞态势及紫杉醇合成的影响)[J]. *Chinese J Biotechnology*(生物工程学报), 17(4): 436-440.

欢迎订阅 ● 欢迎赐稿

《广西植物》(双月刊)

《广西植物》(Guihaia)创刊于1981年,是植物学综合性学术刊物,立足广西,面向全国,国内外公开发行。现已成为植物科学研究发表论文的主要学术性刊物,中国自然科学的核心期刊,我国生命科学的常用期刊。

本刊主要报道植物学各分支学科具有创新水平的原始研究论文和简报,植物科学领域的新发现及具有重大应用价值的科研成果快报;结合本人研究工作,反映国际最新研究水平的短篇综述等。以推动本学科基础理论和应用创新技术的发展,为经济建设服务。本刊除了通过中国国际书店向国外发行、全国各地邮局订阅外,还与世界上15个国家的33个研究单位、国内(含港澳台地区)90多个研究单位进行长期的期刊交换和学术交流。

《广西植物》:

- 中国自然科学核心期刊
- 中国期刊方阵“双效期刊”
- 中国科技核心期刊
- 广西十佳科技期刊
- 《国家中文核心期刊要目总览》收录期刊
- 《中国科学引文数据库核心库(CSCD)》源期刊
- 《中国核心期刊(遴选)数据库》核心期刊
- “中国科技论文统计”源期刊
- 《中国学术期刊综合评价数据库》(CAJCED)统计源期刊
- 《中文科技期刊数据库(SWIC)》全文收录
- 《中国生物文摘》、《中国生物学文献数据库》收录期刊
- 《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、“万方数据数——字化科技期刊群”全文收录
- 英国《邱园索引》(Index Kewensis)收录的源期刊
- 美国 CICS(Colby Information Center of Science & Culture)收录
- 英国“Kew Bulletin”引用期刊源
- SCI 核心刊物“Ann. Missouri Bot. Gard.”、“Biodiversity and Conservation”引用期刊源

《广西植物》为双月刊,每半月出版,2006年每期定价10元,需要的单位或个人请到当地邮局订阅,邮发代号:48-43,若错过订阅时间的,可将款直接汇至编辑部,我部将按期定时给您邮寄。热忱欢迎国内外的同行、专家、教授、学者赐稿,开展学术讨论,促进学术交流,欢迎广大读者订阅。

联系地址:广西桂林市雁山广西植物研究所《广西植物》编辑部 邮编:541006
电话:(0773)3550074 传真:(0773)3550067 E-mail:guihaia@gxib.cn