

诱导子对颠茄毛状根生长及托品烷类生物碱质量分数的影响^①

刘 佳, 卢克欢, 郭 双, 张翠平, 韦 悦, 吴能表

西南大学 生命科学学院/三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要: 目的: 研究不同浓度茉莉酸甲酯(MJ)、硝酸银(AgNO_3)、水杨酸(SA)、酵母提取物(YE) 4 种诱导子对颠茄毛状根生长及托品烷类生物碱合成的影响. 方法: 将 0.5 g 新鲜颠茄毛状根接种于 B5 液体培养基中, 黑暗培养 12 d 后, 将原有培养基换成加有不同浓度诱导子的 4 种新培养基, 同样条件下再培养 2 d, 收集颠茄毛状根材料, 测定其鲜质量与干质量及托品烷类生物碱的含量. 结果: MJ 抑制了毛状根生长与托品烷类生物碱的积累, 而 AgNO_3 虽然抑制了颠茄毛状根的生长, 但却显著提高了托品烷类生物碱的积累, 托品烷类生物碱的产量在 $100 \mu\text{mol/L}$ AgNO_3 处理下达到 26.191 mg, 是对照的 219.9%. 在 SA 处理下, 较小程度地抑制了毛状根的生长, 对东莨菪碱的积累有促进作用. 在 YE 处理下, 随试验浓度升高, 对毛状根生长及托品烷类生物碱的积累的促进作用也逐渐增强. 结论: AgNO_3 是提高毛状根中托品烷类生物碱的最佳诱导子, 而 YE 是对颠茄毛状根生长的最佳诱导子.

关 键 词: 颠茄; 诱导子; 托品烷类生物碱; 毛状根

中图分类号: Q949.777.7

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)05-0075-06

颠茄 *Atropa belladonna* L., 俗名野山茄, 是茄科颠茄属多年生草本植物, 全草可入药, 全株富含托品烷类生物碱(Tropane Alkaloids, TAs), 如东莨菪碱(Hyoscyamine), 莨菪碱(Scopolamine)及阿托品(Atropine)^[1]. 在临床上, 东莨菪碱可以使中枢神经抑制和副交感神经阻滞, 故用于麻醉、镇痛、治疗帕金森症、抗晕动症、改善微循环、治疗农药中毒、戒毒脱瘾等. 但是, 药用植物的药用成分含量低一直是困扰人们的一大难题, 而添加诱导子是目前提高有效成分常用且有效的方法^[2].

已有研究表明, 在植物生长期间添加诱导子是提高多种植物次生代谢产物含量的有效途径. 目前, 对颠茄的研究主要集中在代谢途径中关键酶基因的研究, 而未见使用添加诱导子来提高次生代谢产物合成与积累的研究. 毛状根技术利用发根农杆菌 Ri 质粒上的 DNA 片段整合到植物细胞的 DNA 上, 从而使许多双子叶植物从感染部位长出大量毛状根^[3]. 毛状根合成的活性物质要比野生植物高出数倍, 甚至可以合成原植物不含有的成分^[4]. 因此, 本文以颠茄毛状根为材料, 通过添加 MJ, AgNO_3 , SA, YE 4 种诱导子以探究诱导子对颠茄毛状根的生长及托品烷类生物碱含量的影响, 旨在为托品烷类生物碱的工业化生产提供参考.

1 材料与方法

1.1 材 料

本实验室保存在固体 B5 培养基的颠茄毛状根.

① 收稿日期: 2017-04-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500041); 重庆市科技攻关项目(CSTC2012gg-yyjs80013).

作者简介: 刘 佳(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事药用植物生化工程研究.

通信作者: 吴能表, 教授.

1.2 诱导子的制备

MJ, SA 溶液的配制: 将 MJ, SA 分别用无水乙醇助溶溶解后, 再用蒸馏水定容, 配制成 $20\ \mu\text{mol/L}$ 的母液, 过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜除菌备用; AgNO_3 溶液的配制: 将 AgNO_3 用蒸馏水溶解定容, 配制成 $100\ \mu\text{mol/L}$ 的母液, 过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜除菌备用; YE 溶液的配制: 将 YE 用蒸馏水溶解定容后, 配制成 $200\ \text{mg/mL}$ 的母液, 高压灭菌锅灭菌备用。

1.3 诱导子的添加及培养

将长势一致的新鲜颠茄毛状根 $0.5\ \text{g}$ 接于 $150\ \text{mL}$ 无激素的 B5 液体培养基的 $250\ \text{mL}$ 三角瓶中, 置于恒温振荡培养箱 $110\ \text{r/min}$, $(25\pm 1)\ ^\circ\text{C}$ 避光培养 $12\ \text{d}$ 后, 将原有液体培养基倒掉, 换成添加诱导子的新鲜液体培养基。诱导子所用的浓度在预实验所得出的较为合适的浓度范围, 使 MJ, AgNO_3 , SA 终浓度均分别为 $25, 50, 100, 150, 200\ \mu\text{mol/L}$, YE 终质量浓度为 $100, 200, 300, 400, 500\ \text{mg/mL}$ 。在相同条件下培养 $2\ \text{d}$, 采样后测定颠茄毛状根的鲜质量、干质量及东莨菪碱、莨菪碱的质量分数。

1.4 颠茄毛状根鲜质量、干质量的测定及 TAs 产量的计算

收获用不同诱导子处理过的颠茄毛状根后, 用蒸馏水冲洗残留的液体培养基, 并用吸水纸吸干水分后称重, 进行毛状根鲜质量的测量。将称量过鲜质量的毛状根于 $60\ ^\circ\text{C}$ 烘箱中烘干至恒质量, 称量颠茄毛状根干质量, 并计算单瓶毛状根 TAs 产量, 计算公式^[5]如下:

$$Y_1 = c_1 \times m, Y_2 = c_2 \times m, Y = Y_1 + Y_2$$

式中: Y 表示单瓶毛状根 TAs 产量(mg), Y_1 表示东莨菪碱产量(mg), c_1 表示东莨菪碱质量分数(mg/g), Y_2 表示莨菪碱产量(mg), c_2 莨菪碱质量分数(mg/g), m 表示单瓶毛状根干质量(g)。

1.5 莨菪碱与东莨菪碱标准曲线绘制

精密称取莨菪碱、东莨菪碱标准品分别配制成浓度为 $100\ \mu\text{g/mL}$, $200\ \mu\text{g/mL}$, $300\ \mu\text{g/mL}$, $400\ \mu\text{g/mL}$, $500\ \mu\text{g/mL}$ 的标准品, 按照 HPLC 检测条件测定, 以峰面积为 Y 轴、标准品浓度为 X 轴绘制标准曲线, 并分别计算线性回归方程。

1.6 颠茄毛状根中生物碱的提取

参照 ZÁRATE R 等^[6]的提取方法, 略有改动。将颠茄毛状根于烘箱中 $60\ ^\circ\text{C}$ 烘干至恒质量, 充分研磨后过 50 目筛; 称取 $0.1000\ \text{g}$ 干粉加入 $10\ \text{mL}$ 提取液($\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_4\text{OH}(15:5:1)$), 超声提取 $30\ \text{min}$ 后室温放置 $10\ \text{h}$ 过夜, 滤纸过滤, 用 $2\ \text{mL CHCl}_3$ 冲洗残渣, 合并所有过滤的滤液; 将滤液 $40\ ^\circ\text{C}$ 真空浓缩至干, 残留物用 $2\ \text{mL}\ 1\ \text{mol/L H}_2\text{SO}_4$ 和 $5\ \text{mL CHCl}_3$ 溶解, 静置分层后收集硫酸相于冰浴中并用浓氨水调 pH 值至 10 , 再分 2 次加入 $4\ \text{mL CHCl}_3$ 提取, 静置; 静置分层后取下层于 $40\ ^\circ\text{C}$ 真空浓缩至干, 残留物用 $1\ \text{mL}$ 甲醇溶解, 为样品液。样品液 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, $-4\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.7 颠茄毛状根中生物碱 HPLC 质量分数测定的色谱条件

色谱柱: Ultimate XB-C18 色谱柱($5\ \mu\text{m}$, $4.6\times 250\ \text{mm}$); 流动相: 甲醇: $0.05\ \text{mol/L}$ 醋酸铵(pH 值为 4.6) = $58:42$, $0.0025\ \text{mol/L SDS}$; 流速: $1.0\ \text{mL/min}$; 检测波长: $215\ \text{nm}$; 柱温: $40\ ^\circ\text{C}$; 进样量: $10\ \mu\text{L}$ 。

1.8 数据处理

所有指标均重复测定 3 次, 采用 Microsoft Excel 2007 和 SPSS 22.0 对数据进行统计分析和方差检验, 数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 MJ 对颠茄毛状根生长及托品烷类生物碱的影响

由表 1 可以看出, 与对照组相比, 在不同浓度 MJ 处理下, 颠茄毛状根的鲜质量与干质量均受到了显

著性抑制,并在试验浓度范围内随着浓度增加抑制程度也增加,而且在浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时均略有回升,但干质量对浓度的响应并不具有显著性.东莨菪碱与莨菪碱质量分数的抑制程度均随试验浓度增加呈现出先上升后降低的趋势,且在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时出现了转折点,质量分数分别为 0.129 mg/g, 0.111 mg/g;对于托品烷类生物碱的产量,随着诱导子实验浓度增加,托品烷类生物碱的产量均先降低后上升,整体呈下降趋势,且与对照具有显著性.

表 1 MJ 对毛状根生长及托品烷类生物碱的影响

浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	鲜质量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	干质量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	东莨菪碱质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	莨菪碱质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	东莨菪碱产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	莨菪碱产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	TAs 产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)
0	11.724 $\pm$ 0.734a	0.886 $\pm$ 0.023a	0.754 $\pm$ 0.006a	0.592 $\pm$ 0.005a	6.689 $\pm$ 0.024a	5.243 $\pm$ 0.106a	11.933 $\pm$ 0.344a
25	10.531 $\pm$ 0.279bc	0.816 $\pm$ 0.007b	0.224 $\pm$ 0.007c	0.501 $\pm$ 0.013b	1.831 $\pm$ 0.062c	4.089 $\pm$ 0.133b	5.920 $\pm$ 0.102c
50	10.863 $\pm$ 0.602bc	0.783 $\pm$ 0.019b	0.135 $\pm$ 0.007d	0.167 $\pm$ 0.005e	1.063 $\pm$ 0.076d	1.311 $\pm$ 0.058e	2.373 $\pm$ 0.133e
100	11.345 $\pm$ 0.177b	0.788 $\pm$ 0.014b	0.129 $\pm$ 0.009d	0.111 $\pm$ 0.002f	1.023 $\pm$ 0.089d	0.878 $\pm$ 0.028f	1.901 $\pm$ 0.115e
150	9.764 $\pm$ 0.235c	0.768 $\pm$ 0.024b	0.206 $\pm$ 0.005c	0.223 $\pm$ 0.004d	1.589 $\pm$ 0.095c	1.712 $\pm$ 0.071d	3.230 $\pm$ 0.164d
200	10.606 $\pm$ 0.269bc	0.824 $\pm$ 0.022b	0.459 $\pm$ 0.007b	0.390 $\pm$ 0.013c	3.791 $\pm$ 0.156b	3.220 $\pm$ 0.194c	7.010 $\pm$ 0.349b

注:表 1 中数据为平均值 $\pm$ 标准误差,同列数据中不同字母表示差异在 5%水平具有统计学意义(下同).

2.2 AgNO₃ 对颠茄毛状根生长及托品烷类生物碱的影响

从表 2 可以得出,AgNO₃ 作为诱导子抑制了颠茄毛状根的生长,毛状根鲜质量随试验浓度增加逐渐减少,且在 100 $\mu\text{mol/L}$ 后抑制作用与对照相比具有显著性.同时,毛状根的干质量也受到了抑制且各浓度均具有显著性,最高浓度时抑制效果最明显,仅为对照的 73.64%.虽然颠茄毛状根的生长受到了抑制,但其托品烷类生物碱的质量分数却提高,东莨菪碱的质量分数在中间浓度(50,100,150 $\mu\text{mol/L}$)时与对照相比有显著性增加,在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时质量分数达到 1.912 mg/g,是对照的 2.5 倍.与对照组相比,试验浓度内莨菪碱的质量分数均增加且均具有显著性,其在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时与其他处理组均具有显著性,质量分数达到 0.925 mg/g.对于托品烷类生物碱的产量来说,虽然 AgNO₃ 对颠茄毛状根的生长产生了抑制作用,但却促进了托品烷类生物碱的积累.中间浓度(50,100,150 $\mu\text{mol/L}$)处理与对照相比依然提高了托品烷类生物碱的产量,且均具有显著性,其中 100 $\mu\text{mol/L}$ 的处理效果最好,比对照增加了 119.94%.

表 2 AgNO₃ 对毛状根生长及托品烷类生物碱的影响

浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	鲜质量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	干质量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	东莨菪碱质量分数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	莨菪碱质量分数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	东莨菪碱产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	莨菪碱产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	TAs 产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)
0	11.433 $\pm$ 0.525a	0.884 $\pm$ 0.025a	0.755 $\pm$ 0.007d	0.592 $\pm$ 0.007d	6.673 $\pm$ 0.167cd	5.235 $\pm$ 0.152d	11.908 $\pm$ 0.307d
25	10.458 $\pm$ 0.234a	0.829 $\pm$ 0.017bc	0.803 $\pm$ 0.013cd	0.803 $\pm$ 0.021c	6.665 $\pm$ 0.254cd	6.661 $\pm$ 0.235cd	13.327 $\pm$ 0.488cd
50	10.233 $\pm$ 0.349a	0.792 $\pm$ 0.058c	1.272 $\pm$ 0.025b	0.925 $\pm$ 0.012a	10.295 $\pm$ 0.445b	9.350 $\pm$ 1.254b	19.645 $\pm$ 1.628b
100	8.765 $\pm$ 0.680b	0.684 $\pm$ 0.012cd	1.912 $\pm$ 0.052a	0.861 $\pm$ 0.013b	13.095 $\pm$ 0.579a	13.095 $\pm$ 0.579a	26.191 $\pm$ 1.158a
150	8.703 $\pm$ 0.390b	0.748 $\pm$ 0.006bc	1.008 $\pm$ 0.011c	0.842 $\pm$ 0.006b	7.548 $\pm$ 0.115c	7.548 $\pm$ 0.115c	15.097 $\pm$ 0.230c
200	7.404 $\pm$ 0.433b	0.651 $\pm$ 0.018d	0.862 $\pm$ 0.007d	0.801 $\pm$ 0.012c	5.614 $\pm$ 0.182d	5.614 $\pm$ 0.182d	11.229 $\pm$ 0.365d

2.3 SA 对颠茄毛状根生长及托品烷类生物碱的影响

由表 3 可以看出,在不同浓度 SA 处理下,各试验浓度对颠茄毛状根的生长虽然有影响,但均无显著性差异.但是,各处理组的干质量较对照都有显著性降低;诱导子的添加使东莨菪碱的质量分数增加,且在低浓度处理下(25,50 $\mu\text{mol/L}$)东莨菪碱的质量分数较对照有显著性增加,50 $\mu\text{mol/L}$ 时是对照的 1.58 倍.对于莨菪碱的质量分数,各处理组较对照均显著地抑制了其质量分数的积累,其质量分数整体下降,且随试验浓度增加抑制程度呈先下降后上升的趋势.

表 3 SA 对毛状根生长及托品烷类生物碱的影响

浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	鲜质量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	干质量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	东莨菪碱质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	莨菪碱质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	东莨菪碱产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	莨菪碱产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	TAs 产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)
0	11.923±0.596a	0.927±0.079a	0.754±0.006c	0.591±0.004a	7.745±0.530b	6.089±0.512a	13.835±1.041a
25	10.908±0.420ab	0.898±0.012b	1.007±0.009ab	0.387±0.006de	9.058±0.124ab	3.477±0.022d	12.536±0.105a
50	11.044±0.674ab	0.825±0.034b	1.194±0.177a	0.463±0.008d	9.767±1.165a	3.820±0.092cd	13.588±1.129a
100	12.001±0.412a	0.855±0.010b	0.983±0.004abc	0.561±0.009b	8.412±0.101ab	4.806±0.137b	13.218±0.238a
150	10.887±0.146ab	0.836±0.022b	0.963±0.006abc	0.535±0.007c	8.058±0.207ab	4.477±0.060bc	12.536±0.266a
200	10.794±0.355ab	0.852±0.015b	0.899±0.033abc	0.475±0.008d	7.668±0.329b	4.046±0.019cd	11.715±0.346a

2.4 YE 对颠茄毛状根生长及托品烷类生物碱的影响

从表 4 可以看出,与对照组相比,各试验浓度处理均显著性提高了毛状根的鲜质量,同时高浓度(300,400,500 mg/L)处理也显著提高了颠茄毛状根的干质量.随着 YE 浓度升高,托品烷类生物碱质量分数也逐渐升高,其中各实验组与对照组莨菪碱质量分数均具有显著性差异,500 mg/L 处理时莨菪碱质量分数达到 0.781 mg/g,是对照组的 1.35 倍.托品烷类生物碱的产量与对照相比均有提高,且除低浓度(100 mg/L)外,其他各浓度对托品烷类生物碱的提高均具有显著性.托品烷类生物碱的提高与 YE 浓度呈正相关性,说明 YE 在一定浓度梯度范围内,YE 浓度越高,越有利于颠茄毛状根中 TAs 的积累.

表 4 YE 对毛状根生长及托品烷类生物碱的影响

浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	鲜质量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	干质量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	东莨菪碱质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	莨菪碱质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	东莨菪碱产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	莨菪碱产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)	TAs 产量/ ($\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)
0	11.693±0.244e	0.866±0.020d	0.738±0.006b	0.579±0.013d	6.400±0.135e	5.025±0.146d	11.425±0.279d
100	12.767±0.119d	0.900±0.001d	0.764±0.005ab	0.612±0.032c	6.884±0.051de	5.517±0.031d	12.401±0.027d
200	13.029±0.049cd	0.964±0.023cd	0.777±0.010a	0.750±0.004b	7.496±0.147cd	7.24±0.243c	14.737±0.371c
300	13.382±0.203bc	1.090±0.004bc	0.763±0.019ab	0.763±0.018ab	8.322±0.185c	8.323±0.081b	16.645±0.258c
400	13.676±0.09b	1.203±0.090b	0.798±0.009a	0.765±0.025ab	9.587±0.597b	9.216±0.747b	18.804±1.341b
500	15.246±0.269a	1.480±0.040a	0.796±0.007a	0.781±0.034a	11.802±0.406a	11.567±0.294a	23.370±0.699a

3 讨论与结论

诱导子通常可以作为一种信号而被植物细胞膜上的受体所识别并与其结合,结合后引起细胞膜及细胞内发生一系列级联反应,合成与植物素有关的酶或使其活性发生变化,使植物基因表达发生变化从而导致植物素的合成与积累^[7].诱导子在与植物相互作用时,能够选择性、快速、高度专一地诱导植物特定基因的表达,从而积累特定的次生代谢产物^[8].因此,可以使用相对应诱导子来提高所需的植物次生代谢产物质量分数.

茉莉酸及衍生物(如 MJ)被认为在植物次生代谢过程中可以起诱导信号转导的作用.研究发现,外源茉莉酸类化合物可以有效刺激植物次生代谢产物的合成并可引起植物次生代谢产物(萜类、黄酮类、生物碱类等)有效成分的迅速积累.本实验研究发现,与对照组相比,颠茄毛状根的鲜干质量均受到了抑制.这与孙陈薇^[9]对曼陀罗毛状根的研究相同.究其原因可能是因为 MJ 作为一种非生物诱导子,刺激了植物细胞的多种逆境反应,引起细胞抗逆反应产物的表达,破坏了细胞结构从而抑制了毛状根的生长.同时,颠茄托品烷类生物碱质量分数也受到了抑制,这与 MJ 对丹参次生代谢产物的影响不同^[10],可能是因为颠茄与丹参次生代谢合成的途径不同,并且丹参合成途径中关键酶基因 *c4h*,*pal*,*tat* 等对 MJ 的敏感性较强.李琳琳^[5]研究发现 MJ 可以提高颠茄毛状根中托品烷类生物碱的积累,这与本实验的研究结果不同,可能是由于诱导子添加方式不同或者诱导时间的差异所导致.

重金属离子作为一种非生物诱导子,适量的重金属离子可以诱导植物体内的氧化胁迫,从而对植物的生长及代谢产生较大的影响^[11].本实验研究发现,AgNO₃ 可显著抑制毛状根的生长.原因可能是 AgNO₃

的添加破坏了植物细胞的结构,导致植物生长过程中所需的初级代谢产物不能正常合成,也有可能是对植物的呼吸作用、光合作用及营养吸收等生物学进程产生干扰^[12].虽然颠茄毛状根的生长受到了抑制,但其托品烷类生物碱的质量分数却有所提高,这可能是 AgNO_3 会诱导颠茄托品烷类生物碱代谢过程中关键酶基因的表达. Ying 等^[13]用 Ag^+ 处理丹参毛状根后,在 mRNA 水平上检测到第 6 d 时 *pal* 转录达到最高峰.

SA 作为一种常用的诱导子,不仅可诱导多种植物对病毒、细菌等产生抗性,还可诱导有关生物合成及次生代谢相关基因的表达. 本研究发现,诱导子 SA 对颠茄毛状根的生长情况影响并不显著. SA 是植物体内存在的一种信号分子,调节植物体内的代谢,而外源 SA 的添加可能存在浓度差异或者诱导时间太短,所以对毛状根的生长影响不是很明显. 也有研究发现 SA 对同一细胞系内不同化合物的影响也不相同,如有研究发现 SA 作为诱导子添加到东莨菪碱植物中,可以提高细胞培养体系中东莨菪碱的质量分数,但对莨菪碱的合成影响不是很大^[14],这与本文研究的结果相似. 本实验在低浓度处理下(25, 50 $\mu\text{mol/L}$)东莨菪碱质量分数较对照有显著性增加,但同时也有研究发现 SA 的添加可以显著提高红豆杉中紫杉醇的质量分数^[15]. 这可能是因为不同植物的次生代谢合成途径对诱导子 SA 的响应不同.

YE 可通过活化次生代谢产物相关酶的活性来提高植物特定次生代谢产物的产量积累^[16]. 本实验研究发现,不同浓度 YE 对颠茄毛状根的生长均有促进作用. YE 的添加使植物在初生代谢过程中 G6PDH 活性增加, G6PDH 是磷酸戊糖途径的第一个关键酶,该酶在诱导子对植物生长的影响作用方面表现为可以提供更多的 NADPH,促进植物初生代谢,从而使植物生长量增加^[17]. NADPH 也可以降解对细胞有伤害的活性氧或过氧化物,磷酸戊糖途径加快也可以促进活性氧的降解^[18]. 本实验结果表明, YE 添加促使颠茄毛状根托品烷类生物碱的积累,并且各处理组与对照组莨菪碱的质量分数均具有显著性差异. 另一方面, YE 本身就是一类含有氨基酸、核苷酸、B 族维生素、微量原子的化合物,这些物质对植物生长及次生代谢产物的积累都有益^[19].

通过添加上述 4 种不同的诱导子发现, AgNO_3 是提高颠茄毛状根中 TAs 质量分数的最佳诱导子,而 YE 是对颠茄毛状根生长的最佳诱导子,且在一定浓度范围内,颠茄毛状根中 TAs 质量分数的积累与 YE 浓度呈正相关. 不同的诱导子对颠茄毛状根的生长及托品烷类生物碱合成的影响均不相同,这可能是因为不同的诱导反应与植物细胞的自身结构或细胞膜上的受体种类、数量、分布及生长状态均有关系. 多种诱导子对颠茄毛状根复合处理的影响与作用机制,还有待进一步研究.

参考文献:

- [1] GRIFFIN W J, LIN G D. Chemotaxonomy and Geographical Distribution of Tropane Alkaloids [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(6): 623—637.
- [2] 张敏敏,陈玉梁,赵 瑛,等. 药用植物组织培养生产有效成分的影响因素研究进展 [J]. *甘肃农业科技*, 2013(7): 43—46.
- [3] 任志华,李 玲. 植物细胞培养技术提高次生代谢物产量的方法(综述) [J]. *亚热带植物科学*, 2003, 32(3): 64—67.
- [4] 曲伟红,赵建国. 毛状根培养在药用植物中的应用概况 [J]. *九江学院学报(自然科学版)*, 2006, 21(4): 85—87.
- [5] 李琳琳. 茉莉酸甲酯对颠茄毛状根的生长及次生代谢产物产生的影响 [D]. 重庆:西南大学, 2015.
- [6] ZÁRATE R, HERMOSIN B, CANTOS M, et al. Tropane Alkaloid Distribution in *Atropa baetica* Plants [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1997, 23(8): 2059—2066.
- [7] 肖春桥,高 洪,池汝安. 诱导子促进植物次生代谢产物生产的研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2004, 16(5): 473—476.
- [8] 任振兴. 黄芩愈伤组织培养及其次级代谢物合成调控的研究 [D]. 太原:山西大学, 2006.
- [9] 孙际薇. 茉莉酸甲酯对曼陀罗毛状根的生长及次生代谢产物产生的影响 [D]. 重庆:西南大学, 2014.
- [10] 肖 莹. 丹参酚酸类成分生源合成的调控研究 [D]. 上海:第二军医大学, 2009.
- [11] VASCONSUELO A, BOLAND R. Molecular Aspects of the Early Stages of Elicitation of Secondary Metabolites in Plants [J]. *Plant Science*, 2007, 172(5): 861—875.
- [12] CLEMENS S. Toxic Metal Accumulation, Responses to Exposure and Mechanisms of Tolerance in Plants [J]. *Biochimie*, 2006, 88(11): 1707—1718.
- [13] YING X, GAO S H, PENG D, et al. Lithospermic Acid B is More Responsive to Silver Ions (Ag^+) than Rosmarinic

- Acid in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Cultures [J]. Bioscience Reports, 2009, 30(1): 33—40.
- [14] 虞珍珍. 诱导子对水母薛莲次生代谢的影响及雪莲查尔酮合成酶基因克隆 [D]. 北京: 中国植物科学院, 2006.
- [15] 梅兴国, 张舟宁, 苏湘鄂, 等. 水杨酸对红豆杉细胞的诱导作用 [J]. 生物技术, 2000, 10(6): 18—20.
- [16] CHEN H, CHEN F. Effect of Yeast Elicitor on the Secondary Metabolism of Ti-Transformed *Salvia miltiorrhiza* Cell Suspension Cultures [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(7): 710—717.
- [17] 徐春明, 赵 兵, 欧 元. 酵母提取物对水母雪莲悬浮培养合成紫丁香苷的影响 [J]. 食品科学技术学报, 2009, 27(3): 1—4.
- [18] FAHRENDORF T, NI W, SHORROSH B S, et al. Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIX. Transcriptional Activation of Oxidative Pentose Phosphate Pathway Genes at the Onset of the Isoflavanoid Phytoalexin Response [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 28(5): 885—900.
- [19] NOVAIS J M, MAVITUNA F, PAIS M S S. Plant Cell Biotechnology [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1994.

Influences of Elicitors on the Growth and Tropane Alkaloid Contents in the Hairy Roots of *Atropa belladonna* L.

LIU Jia, LU Ke-huan, GUO Shuang,
ZHANG Cui-ping, WEI Yue, WU Neng-biao

Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education /
School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective: To study the influences of elicitors (MJ, AgNO₃, SA and YE) on the growth and tropane alkaloids in the hairy roots of *Atropa belladonna* L. Methods: Fresh hairy roots of *A. belladonna* L. 0.5 g in weight were inoculated into B5 liquid medium and cultured for 12 days in dark. Then the original media were poured out and replaced by four kinds of new media containing different concentrations of MJ, AgNO₃, SA or YE and cultured under the same conditions for 2 days. Finally, the hairy roots were gathered and their fresh weight, dry weight and contents of tropane alkaloids were determined. Results: MJ restrained the growth and alkaloid accumulation of the hairy roots. Though AgNO₃ inhibited the growth of the hairy roots, it significantly improved the accumulation of tropane alkaloids in them. With a concentration of 100 μmol/L, AgNO₃ treatment increased the contents of tropane alkaloids by 119.9% as compared with CK. SA had little influence on the growth of the hairy roots and stimulated the accumulation of scopolamine. In YE treatments, hairy root growth and contents of tropane alkaloids increased with the increasing of YE concentration; Conclusions: Elicitors have selective influence on the growth of the hairy roots of *A. belladonna* L., and AgNO₃ is the best elicitor for tropane alkaloid accumulation in the hairy roots, and YE is the best elicitor for improving hairy root growth of *A. belladonna* L..

Key words: *Atropa belladonna* L.; elicitor; tropane alkaloid; hairy root

责任编辑 夏 娟

