

外源刺激物对长春花冠瘿细胞生长 和吲哚生物碱含量的影响

王宁宁 王淑芳 王勇 田俊英 朱亮基

(南开大学生物化学及分子生物学系 天津 300071)

所谓外源刺激物(elicitors)是指一些生物(多为真菌提取物)的或非生物分子,它们能够通过信号传导途径,刺激植物发生防御反应,诱导特定的次级代谢产物的形成和积累^[1,5]。目前,有关 elicitors 对植物细胞次级代谢的影响和机制的研究引起了人们的普遍关注。

我们曾经报道了以土壤农杆菌感染, Ti 质粒转化得到的长春花冠瘿细胞,无论在生长还是在具有药用价值的次级代谢产物吲哚生物碱含量方面,都优于一般细胞培养常用的愈伤细胞^[2]。本文研究了深红酵母匀浆物和果胶降解物作为外源刺激物,对长春花冠瘿细胞生长和吲哚生物碱含量的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞培养

长春花冠瘿细胞在加有 90ml MS 液体培养基的 250ml 三角瓶中摇床培养^[2],培养基中不加任何外源激素,培养温度 25℃。

1.2 Elicitor 的制备

1.2.1 果胶降解物的制备:取 10ml 1% 的果胶溶液,加 5ml 果胶酶溶液(0.56u/ml)和 5ml 蒸馏水,调 pH 至 3.5,在 50℃ 水浴保温 2h 后,加热煮沸,灭菌 20min 备用。

1.2.2 深红酵母提取物的制备:按照 Eliert 等介绍的方法^[3]。

1.3 实验方法

根据不同的研究目的,在冠瘿细胞继代^[2]的同时或培养一定时间以后,向培养基中加入一定量的外源刺激物,继续培养 18h 后,收集细胞,进行分析测定。

1.4 分析方法

1.4.1 生长的测定:以每瓶细胞的鲜重表示培养过程中细胞生长的变化。

1.4.2 吲哚生物碱的提取和含量的测定:同前文记述的方法^[2]。

2 结果与amp;讨论

2.1 果胶降解物的作用

将旺盛生长的长春花冠瘿细胞转入含 1ml 果胶降解物的 MS 液体培养基中培养,对冠瘿细胞的生长无明显的影响(图 1),但能提高细胞中吲哚生物碱的含量(图 2)。这说明果胶降解物可以作为刺激长春花冠瘿细胞次级代谢的 elicitor。

2.1.1 果胶降解物的剂量对其刺激效果的影响:分别以 0.05, 0.5, 1.0, 5.0ml 果胶降解物处理培养 9d 的长春花冠瘿细胞,发现只有 0.5~1.0ml 的果胶降解物才能显著提高细胞中次级代谢产物的积累,其中以 1ml 果胶降解物的作用最好,增加到 5ml 后略有抑制(图 3)。

2.1.2 细胞的培养时间对果胶降解物刺激作用的影响:分别取 1ml 果胶降解物处理在新鲜培养基中培

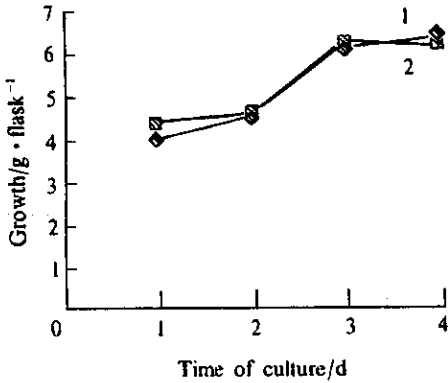


图1 果胶降解物对长春花冠瘿细胞生长的影响

Fig 1 Effect of pectin degradate on the growth of *C. roseus* crown gall cell cultures

1. Control, 2. Elicitor

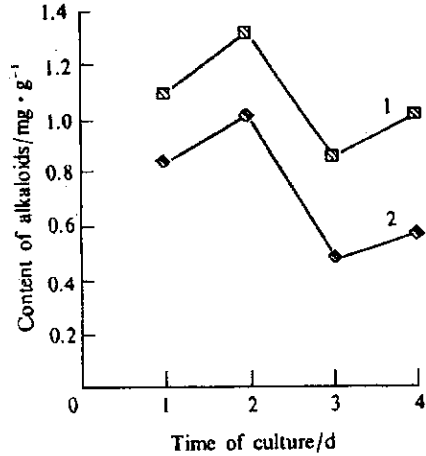


图2 果胶降解物对长春花冠瘿细胞吲哚生物碱含量的影响

Fig 2 Effect of pectin degradate on the alkaloid accumulation in the *C. roseus* crown gall cell culture

1. Elicitor, 2. Control

养 2, 5, 9, 10 和 15d 的长春花冠瘿细胞,发现培养时间不同的细胞对果胶降解物的刺激作用敏感程序不同(图 4)。培养 5~10d 的细胞中吲哚生物碱的含量明显高于培养 2d 和培养 15d 的细胞,其中以培养 5d 的冠瘿细胞对果胶降解物的刺激作用最敏感。

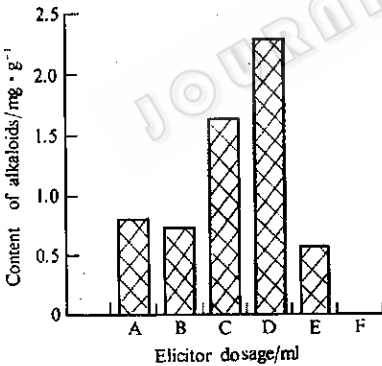


图3 不同剂量果胶降解物对长春花冠瘿细胞吲哚生物碱含量的影响

Fig.3 Effect of pectin degradate dosage on alkaloid accumulation in *C. roseus* crown gall cell culture

Elicitor dosage/ml: A:0.0; B:0.05; C:0.5; D:1.0; E:5.0

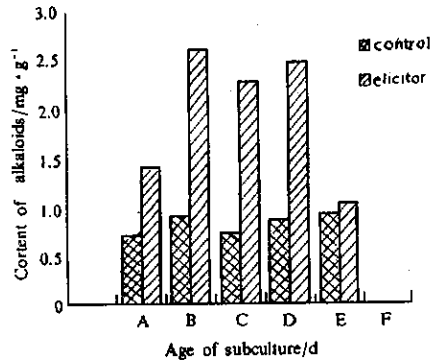


图4 细胞年龄对果胶降解物刺激作用的影响

Fig.4 Effect of cell age on alkaloid accumulation stimulated by pectin degradate in *C. roseus* crown gall cell culture.

Age of subculture/d: A:2; B:5; C:9; D:10; E:15.

2.2 深红酵母匀浆物的作用

分别取 0.05, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0ml 的深红酵母匀浆物处理培养 5d 的长春花冠瘿细胞,对细胞的生长均无显著影响(表 1),外加 0.0~1.0ml 深红酵母匀浆物对冠瘿细胞的吲哚生物碱含量也几乎没有影

参 考 文 献

- [1] Dixon R A. Annu. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1990, 41:339~367.
[2] 王宁宁,王淑芳,李霞等,生物工程学报,1994,10(3):244~249.
[3] Eilert U, Deluca V, Constabel F *et al.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1987, 254(2):491~497.
[4] Eilert U, Constabel F, Kurz W G W. J. Plant Physiol., 1986, 126:11~22.
[5] Kutchan T M. Phytochemistry, 1993, 32(3):493~506.
[6] Bolwell G P, Coulson V, Rodgers M W *et al.* Phytochemistry, 1991, 30(2):397~405.

Effect of Elicitors on the Growth and Indole Alkaloids Accumulation in Suspension Cultures of *Catharanthus roseus* Crown Gall Cell

Wang Ningning Wang Shufang Tian Junying Zhu Liangji

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Upon treatment with pectin degradate and *Rhodotorula rubra* homogenate as elicitors, the accumulation of indole alkaloids in the suspension cultures of *C. roseus* crown gall cell was improved, but no change in the growth of crown gall cell was found. Elicitor dosage and the crown gall cell age can affect the alkaloids accumulation stimulated by the elicitors in cells. 5 to 10 days' crown gall cells treated with 1% pectin degradate and 9 day's crown gall cells treated with 5% *Rhodotorula rubra* homogenate exhibited maximum in alkaloids accumulation.

Key words *Catharanthus roseus* crown gall cell, pectin degradate, *Rhodotorula rubra* homogenate, indole alkaloids.