

于淀粉积累。

缺锌或过量锌胁迫均会降低硝酸还原酶的活性,硝酸还原酶是植物氮代谢的关键酶,催化 NO_3^- 到 NO_2^- 的还原反应,其活性大小反映了植物对环境中 NO_3^- 的吸收利用情况^[4,5]。植物氮代谢的调控主要是通过对硝酸还原酶的调控实现的,以硝酸还原酶为中心的调控系统是最原始、最基本的氮代谢调控系统。硝酸还原酶活性常用来表示氮代谢的强弱,硝酸还原酶活性高低对整个氮代谢的强弱起关键的调控作用^[9]。此外,锌又是影响蛋白质合成最为突出的微量元素^[4],锌通过 RNA 代谢影响蛋白质合成^[10],缺锌或过量锌胁迫会抑制蛋白质的合成,造成硝酸盐的积累,对植物产生毒害作用。

根据本研究结果,建议全苗期叶面喷施 600 mg/L 锌肥,以提高半夏产量。

参考文献:

[1] 潘瑞炽. 植物生理学 [M]. 第 5 版. 北京: 高等教育出版社,

2006.

- [2] Shrotri C K, Tewari M N, Rathore V S. Effects of zinc nutrition on sucrose biosynthesis in maize [J]. *Phytochemistry*, 1980, 19: 139-140.
- [3] Jyung W H, Ehmann A, Schlender K K. Zinc nutrition and starch metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. [J]. *Plant Physiol*, 1975, 55: 414-420.
- [4] 施木田, 陈如凯. 锌硼营养对苦瓜叶片碳氮代谢的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(2): 198-201.
- [5] 施木田. 苦瓜锌及其与钼硼不同配比的营养生理研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2004.
- [6] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [7] 胡桂娟, 张玉英. 淀粉的测定 (比色法) [J]. 落叶果树, 1980, 1(9): 40-41.
- [8] Horecker B L. *Methods in Enzymology* [J]. New York: Academic Press, 1975.
- [9] 刘丽, 甘志军, 王宪泽. 植物氮代谢硝酸还原酶水平调控机制的研究进展 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1355-1361.
- [10] 王晓云, 程炳嵩, 张国珍. 不同锌水平对姜苗氮代谢的影响 [J]. 山东农业大学学报, 1993, 24(2): 209.

白木香离体侧根中色酮类化合物的诱导形成

何梦玲¹, 戚树源², 胡兰娟^{2*}

(1. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510240; 2. 中国科学院华南植物园资源中心, 广东 广州 510650)

摘要:目的 研究白木香 *Aquilaria sinensis* 中次生代谢产物的生物合成。方法 采用组织培养的方法诱导沉香色酮类化合物的产生, 采用 HPLC 法进行诱导物的测定。结果 从白木香离体侧根中诱导出 2-(2-苯乙基)色酮化合物。结论 黄绿墨耳真菌提取物能诱导白木香中沉香特征化合物的产生。

关键词: 白木香; 离体侧根; 色酮化合物

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)02-0281-04

Induction of chromones in excised lateral roots culture of *Aquilaria sinensis*

HE Meng-ling¹, QI Shu-yuan², HU Lan-juan²

(1. College of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510240, China;

2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract : Objective To study the biosynthesis of the second metabolites in *Aquilaria sinensis*. **Methods** Chromones of agarwood were elicited by tissue culture and the inducer contents were determined by HPLC. **Results** 2-(2-Phenylethyl) chromones could be elicited in excised lateral roots suspension culture of *A. sinensis*. **Conclusion** Fungal extracts of *Menanotus flavolives* could induce the production of characteristic components of agarwood in *A. sinensis*.

Key words : *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg; excised lateral root; chromone

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 又名 土沉香, 为瑞香科沉香属植物, 是我国特有的珍贵树

* 收稿日期: 2009-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070066); 广东省自然科学基金资助项目 (000974); 广东药学院课题 (43548008)

作者简介: 何梦玲 (1975—), 广东梅州人, 女, 博士, 讲师, 从事植物组织培养和次生代谢研究。Tel: (020) 39352176; 13500005095

E-mail: hmlf@126.com

种,也是我国生产沉香的唯一植物资源,现已被列为国家濒危保护植物^[1]。沉香有降气温中、暖肾纳气的功能,主要用于治疗喘息、呕吐、呃逆、脘腹胀痛、腰膝虚冷、大肠虚秘、小便气淋、男子精冷等症^[2]。此外,沉香的香味独特,是东南亚国家及中东地区的名贵天然香料。商业上的巨大利润和非法贸易正导致世界各地的沉香资源越来越少,沉香属大部分植物已列入1994年日内瓦公约第二册名录,属于全球限制贸易的野生濒危树种。

沉香中的化学成分主要有两大类:倍半萜类化合物和色酮类化合物,且健康的白木香木材中是不含色酮类化合物,而2-(2-苯乙基)色酮类化合物被认为是沉香的活性成分之一^[3]。有学者认为沉香是由于白木香木材组织受伤或感染真菌形成的。早在20世纪60年代,华南植物研究所就分离出促进白木香结香的真菌黄绿墨耳真菌 *Menanotus flavovirens*^[4]。离体根培养包括毛状根的培养和天然离体根的培养。高等植物中某些次生代谢产物仅在特殊的组织和器官中合成和积累,因此器官分化常常有利于次生代谢产物的积累。研究发现,当根在分化时,一些药用植物的组织培养物中药用成分量就高^[5]。利用培养根系统产生次生代谢产物,将成为生产植物次生代谢物的一种新途径。本实验以白木香悬浮培养离体侧根为材料,考察了黄绿墨耳真菌提取物对其中色酮类化合物的诱导生成作用,为进一步研究色酮类化合物在白木香中的生物合成提供了一个实验系统。

1 材料与方法

1.1 试验材料:以继代培养的白木香无菌小苗为材料。

1.2 离体侧根生长曲线绘制及色酮化合物诱导实验
培养基:以MS为基本培养基,添加不同质量浓度的IAA和IBA,30%蔗糖,调节pH值至5.8,121℃下消毒20 min。观察培养侧根生长情况后添加IBA 1.5 mg/L,其余同前。

在无菌条件下,切下白木香无菌小苗的根,去掉根尖,切成2 cm长的小段,接入200 mL果酱瓶中,每瓶30 mL含IBA的培养基,每瓶接20条小根。接种后100 r/min摇床上黑暗培养,温度(26±1)℃。每20 d取出3瓶称质量(M),按公式 $(M - M_{\text{接种}}) / (M_{\text{接种}} \times \text{培养液体积})$ 计算出培养根增加的鲜质量,质量单位为克,培养液体积为升,绘出生长曲线。

在色酮化合物定性检出的试验中所用培养基再添加黄绿墨耳真菌提取液(fungal extracts of *M.*

flavovirens)。

1.3 真菌的培养及提取液的制备

1.3.1 黄绿墨耳真菌的培养:黄绿墨耳真菌 *M. flavovirens* 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏室。菌种于4℃冰箱中保存,每2~3个月继代一次。欲制备提取液的真菌在马铃薯培养液中静置黑暗培养3周,温度(26±1)℃。

1.3.2 马铃薯液体培养基:每1 000 mL 20%马铃薯汁中含葡萄糖20 g、磷酸二氢钾3 g、7水硫酸镁1.5 g、维生素B₁ 0.06 mg,调整pH值至6.0,每500 mL三角瓶中分装80 mL培养液,高压灭菌锅中121℃下消毒20 min。

1.3.3 黄绿墨耳真菌提取液的制备:收获的菌丝体经水洗后,在60℃烘干至恒重,打粉称质量,加5倍量的蒸馏水100℃回流1.5 h,抽滤收集上清液,渣再加3倍量的蒸馏水100℃回流1 h,抽滤,合并两次上清,在水浴上蒸发至干,得到浸膏状真菌提取物,称质量。

1.4 白木香悬浮培养离体侧根中色酮类化合物的检出:收获悬浮培养60 d的离体根,50℃烘干至恒重后称定质量,打粉后加入5倍量的二氯甲烷浸泡24 h,倾出上清液后,渣再用5倍量二氯甲烷浸泡一昼夜,合并两次滤液后用1/3体积的5%NaOH重复皂化3次,分液漏斗分离得到两个部分:NaOH部分和二氯甲烷部分。其中,NaOH部分用1/3体积的二氯甲烷重复洗涤3次,合并洗出的二氯甲烷部分与之前皂化后得到的二氯甲烷部分,再用1/3体积的蒸馏水重复洗涤3次,洗好后的二氯甲烷部分加无水硫酸钠干燥过夜,次日过滤后旋转蒸发回收溶剂至干,干品加0.5 mL甲醇溶解后进行HPLC检测^[6]。

HPLC测定条件:提取溶液均为分析纯;色谱用甲醇为色谱纯,色谱用水为双蒸水。

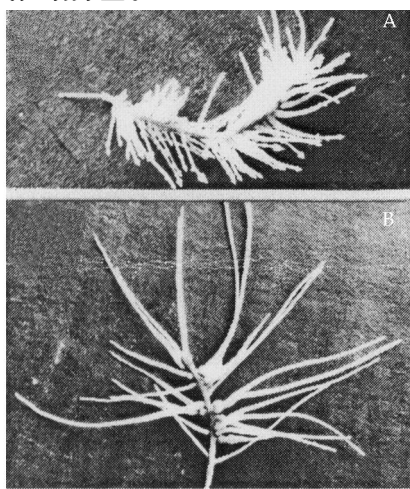
HPLC1100高效液相色谱仪,紫外检测器,色谱柱Kromasil-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)。柱温:室温,流动相:甲醇-四氢呋喃-水(50:5:55),体积流量:0.8 mL/min,检测波长:210 nm。

样品测定:将提取部分加入0.5 mL甲醇,漩涡混匀器混匀,用滤膜(孔径0.25 μm)滤过后备用。每次进样20 μL,记录峰高。4种色酮类化合物对照品由中国科学院华南植物园植物研究组提供并鉴定,质量分数达到99.8%以上。

2 结果与讨论

2.1 离体侧根的诱导:含有生长素的培养基能诱导白木香产生侧根,结果见图1。可见,两种生长激素

都能诱导白木香侧根的发生,但添加 IBA 后诱导出的侧根更多更适于侧根的培养。选取生长情况最好的培养基(添加 IBA 1.5)作为离体侧根诱导色酮产生的试验培养基。



A-IBA 诱导产生的一级侧根 B-IAA 诱导产生的一级侧根

A-first-order lateral roots induced by IBA

B-first-order lateral roots induced by IAA

图 1 生长素诱导出的离体侧根

Fig 1 Excised lateral roots induced by auxin

2.2 离体根的生长曲线:诱导出的离体根能进行继代培养,一个周期后的形态见图 2,生长曲线见图 3,此生长曲线大致呈“S”型,因培养检测时间间隔较长,使延迟期不明显,仅可明显见到两个生长阶段,即指数生长期(1~40 d)和静止期(40~60 d)。

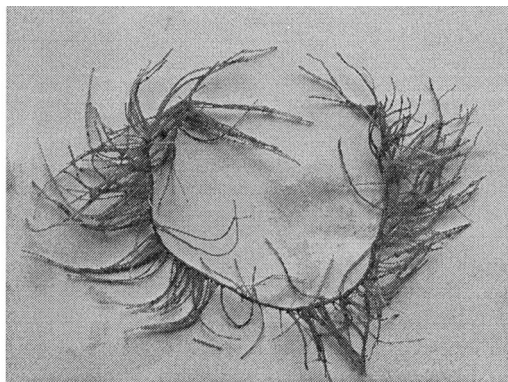


图 2 培养 60 d 后离体侧根形态

Fig 2 Morphology of excised lateral roots after 60 days' culture

一般意义上的离体根培养实际上是指离体根尖的培养,是以无菌胚根的根尖为材料,在液体培养基中进行静置恒温暗培养。一般培养 10~14 d 即可长出许多侧根,然后再选取生长旺盛的根为材料,在无菌条件下剪取侧根和主根的根尖移入新鲜培养液中继代培养。而本实验建立的离体根培养体系与之

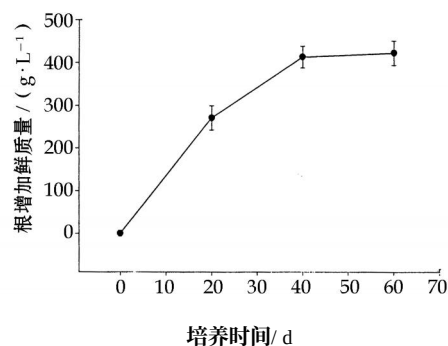


图 3 白木香离体侧根生长曲线

Fig 3 Growth curve of excised lateral roots of *A. sinensis* 则有很大的不同。主要是以侧根的大量发生和培养为目的。

近年来,也有一些学者对离体根做了一些研究。其主要的着眼点在于研究激素对根原基的形成和侧根发生的控制问题^[7~9]。目前尚无离体侧根培养体系应用于次生代谢物质研究的报道。

2.3 黄绿墨耳真菌提取液对离体侧根中色酮化合物产生的诱导:真菌诱导子(fungal elicitor)是来源于真菌的一种确定的化学信号,在植物与真菌的相互作用中,它们可以快速、高度专一和选择性地诱导植物细胞中特定次生代谢物的形成和积累。近 20 年来,国内外在植物组织和细胞培养中利用不同的真菌诱导子提高目的次生代谢产物产量的研究至今仍是一个热点,如真菌诱导物可促进异黄酮类、萜类和某些生物碱类次生代谢产物的合成^[10]。

由图 4 可以看出,未添加黄绿墨耳真菌提取液的白木香悬浮培养离体根中是没有色酮化合物的产生,这一点和在白木香植物上实验结果一致^[11,12]。

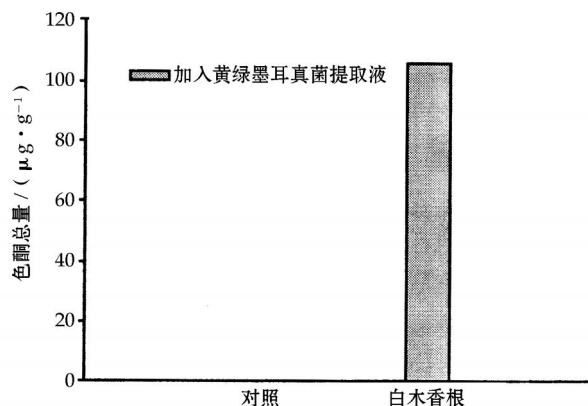


图 4 黄绿墨耳真菌提取液对离体侧根中色酮化合物产生的影响

Fig 4 Effect of fungal extracts of *M. flavoviridis* on production of chromones in excised lateral roots

2.4 悬浮培养离体根中色酮类化合物的检出:在培养的侧根中能诱导产生已知的 4 种色酮化合物^[6],

1#: 6,7-二甲氧基-2-[2-(4'-甲氧基苯)乙基]色酮;
2#: 6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮; 3#: 6-甲氧基-2-[2-(3'-甲氧基苯)乙基]色酮; 4#: 6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮。结果见图5。

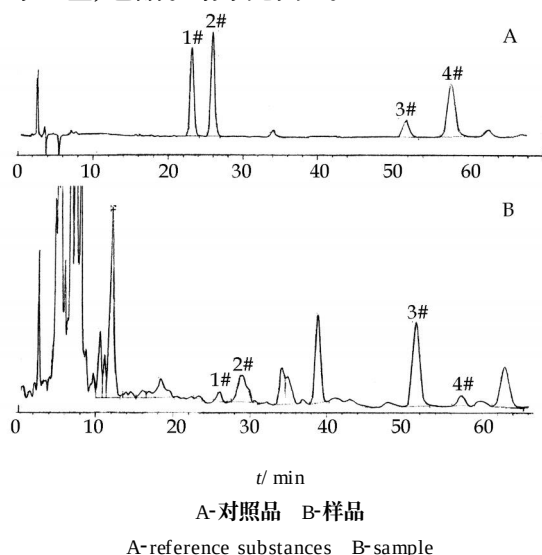


图5 悬浮培养离体侧根中4种色酮化合物的产生

Fig 5 Production of four chromones in excised lateral roots in suspension culture

药材沉香中存在两种主要的成分——倍半萜类化合物和2-(2-苯乙基)色酮化合物,沉香的品质主要由这两类化合物决定。黄绿墨耳真菌是诱导白木香植物产生沉香的真菌,感染真菌后的白木香植物最先产生的化合物就是此类色酮化合物^[11],而健康的白木香木材和未经诱导的离体根中都不能检测到色酮化合物,这些结果说明色酮化合物是白木香离体根在逆境状态下重新合成的次生代谢产物,而且白木香离体根的次生代谢物合成机制与白木香整体植株组织薄壁细胞的次生代谢物合成机制是相似的。

本研究中,黄绿墨耳真菌是从沉香木材中分离出来的,生产实践已经证明这种真菌能诱导沉香的生成,而且到目前为止,还没有任何其他文献报道此种真菌可以诱导其他代谢物的合成,也没有任何文献报道其他真菌可以诱导沉香的合成。因此就目前的实验结果来看,认为黄绿墨耳真菌可能是专一诱导白木香产生沉香的诱导物。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国植物红皮书——稀有濒危植物[M]. 第一册. 北京:科学出版社,1992.
- [2] 《中华本草》委员会编. 中华本草[M]. 14卷. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [3] 杨峻山. 沉香化学成分的研究概况[J]. 天然产物研究与发展,1998,10(1):99-103.
- [4] 广东省植物研究所. 初步揭示沉香结香的秘密[J]. 植物学报,1976,18(4):287-291.
- [5] Hashimoto T, Yamada Y. Scopolamine production in suspension cultures and redifferentiated roots of *Hyoscyamus niger* [J]. *Plant Med*, 1983, 47: 195-199.
- [6] 何梦玲,戚树源,胡兰娟. 白木香悬浮培养细胞中2-(2-苯乙基)色酮化合物的诱导形成[J]. 广西植物,2007,27(4):627-632.
- [7] Wickremesinha E R M, Arteca R N. Root of hydroponically grown *Taxus* plants as a source of taxol and related taxanes [J]. *Plant Sci*. 1994, 101: 125-135.
- [8] Pelosi A, Lee M C S, Chandler S F *et al*. Hormonal control of root primordial differentiation and root formation in cultured explants of *Eucalyptus globules* seedlings [J]. *Aust J Plant Physiol*. 1995, 22: 409-415.
- [9] Vuylsteker C, Dewaele E, Rambour S. Auxin induced lateral root formation in chicory [J]. *Ann Bot*, 1998, 81: 449-454.
- [10] Eilert U. *Elicitation Methodology and Aspects of Application*. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* [M]. New York: Academic Press, 1987.
- [11] 戚树源,林立东,叶勤法. 沉香中莽草基丙酮及其在黄绿墨耳真菌中的生物转化[J]. 生物工程学报,1998,14(4):464-467.
- [12] 戚树源,林立东,胡厚才. 白木香中色酮类化合物的形成[J]. 中草药,2000,31(9):658-659.

《中草药》、《中国药学杂志》及陈新谦、陈常青 荣获“新中国60年有影响力的期刊及期刊人”

为纪念新中国诞辰60周年,表彰和鼓励对期刊事业做出重要贡献的期刊和期刊工作者,总结经验,促进期刊行业健康发展,中国期刊协会、中国出版科学研究所联合举办了“新中国60年有影响力的期刊及期刊人”推选活动。经过各地、各行业期刊协会和专家评审委员会的严格评审,中国药学会主办期刊《中草药》、《中国药学杂志》及《中国药学杂志》副主编陈新谦、《中草药》杂志执行主编陈常青研究员分别荣获“新中国60年有影响力的期刊及期刊人”称号。

[本刊讯]