

茅苍术悬浮细胞系建立及内生真菌诱导子对其挥发油积累的影响

方 芳¹, 戴传超^{1*}, 张 波¹, 梁侨丽²

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046)

摘要:目的 建立茅苍术悬浮细胞系, 研究 2 种内生真菌诱导子对茅苍术悬浮细胞产挥发油的影响。方法 用内生真菌诱导子对茅苍术悬浮细胞进行诱导处理后超声提取茅苍术细胞中的挥发油, 利用气相色谱法测定挥发油中苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇和苍术素的量。结果 获得的茅苍术悬浮细胞生长较快, 于第 21 天生物量达到最大, 为 6.95 g/L。未经诱导处理的茅苍术悬浮细胞中仅检出 β -桉叶醇, 其在培养 21 d 的细胞中的量达到最大, 为 17.469 μ g/g。添加 2 种内生真菌(分别属于小克银汉霉属和孔球孢霉属, 编号为 AL4 和 AL12)的粗诱导子对茅苍术悬浮细胞生物量及挥发油积累均有影响, 其中 AL4 粗诱导子综合效果更好。添加 AL4 粗诱导子到 14 d 的茅苍术悬浮细胞培养基中, 诱导子质量浓度为每升培养基含糖 20 mg, 诱导处理 7 d 后收集细胞, 发现其干质量比同期对照提高 3.31%, 且检出细胞中苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇和苍术素的干质量分别达到 14.715、28.395、38.794、8.310 μ g/g。其中 β -桉叶醇的量是对照的 2.22 倍。结论 添加内生真菌诱导子对茅苍术悬浮细胞的生长及挥发油积累均有促进作用。

关键词: 茅苍术; 悬浮细胞; 内生真菌诱导子; 生物量

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)03-0452-04

Establishment of suspension cell line of *Atractylodes lancea* and effect of endophytic fungal elicitors on its essential oil accumulation

FANG Fang¹, DAI Chuan-chao¹, ZHANG Bo¹, LIANG Qiao-li²

(1. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China; 2. School of Pharmaceutical Science, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract: **Objective** To establish the suspension cell line of *Atractylodes lancea* and to study the effect of two endophytic fungal elicitors on its essential oil production. **Methods** The essential oil was extracted by using ultrasonic wave after suspension cell was treated with endophytic fungal elicitors. Then, the determination of four compounds (atractylone, hinesol, β -eudesmol, and atractylodin) was carried out by gas chromatography. **Results** By testing in various conditions, the suspension cell line with a rapid growth rate was established. Its highest biomass (6.95 g/L) was obtained on day 21. β -Eudesmol was the only detection in the control suspension cell, and its highest content (17.469 μ g/g) was also reached on day 21. The effect of crude elicitors of two endophytic fungi (belong to *Cunninghamella* sp. and *Gilmanella* sp. respectively, named AL4 and AL12) on the cell growth and the production of essential oil were investigated. Overall AL4 elicitor got better effect. When suspension cell of 14-day-old cultures was exposed to AL4 elicitor (carbohydrate 20 mg/L medium) for 7 d, the biomass increased 3.31% over the control, and the four compounds (atractylone: 14.715 μ g/g, hinesol: 28.395 μ g/g, β -eudesmol: 38.794 μ g/g, and atractylodin: 8.310 μ g/g) were all detected. Among them, the content of β -eudesmol reached 2.22 times as much as the control. **Conclusion** The cell growth and the accumulation of essential oil of *A. lancea* could also be promoted by adding crude elicitors of the endophytic fungi AL4 and AL12.

Key words: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; suspension cell; endophytic fungal elicitor; biomass

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 为菊科苍术属多年生草本植物。其干燥的根茎为中药苍术, 是江苏省著名的道地药材。苍术主要活性部

位是挥发油, 主要功效为燥湿健脾, 祛风散寒, 明目^[1]。近年来由于野生茅苍术资源被严重破坏^[2], 并且茅苍术的人工栽培有一定的难度, 因此如何解

* 收稿日期: 2008-05-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30500066, 30770073)

作者简介: 方 芳(1981—), 女, 江苏淮安人, 硕士研究生, 主要从事微生物与植物相互关系研究。

Tel: 13861553356 E-mail: fangfang989898@126.com

* 通讯作者 戴传超 Tel: (025) 85891382 E-mail: daichuancho@njnu.edu.cn

决日益增长的市场需求成为了一个难题。细胞培养可大规模生产次生产物,故利用它来生产挥发油是解决供需矛盾的最佳途径。目前关于茅苍术愈伤组织培养已有报道^[3],但暂无人建立茅苍术悬浮细胞系。本研究建立茅苍术悬浮细胞系,分析了不同培养时间茅苍术悬浮细胞中挥发油的成分及量,并考察了2种内生真菌诱导子对茅苍术细胞生长及产挥发油的影响,为调控茅苍术细胞高产次生代谢产物提供基础。

1 材料与方法

1.1 茅苍术悬浮细胞系的建立:茅苍术于2004年5月采自宁镇山脉(汤山),经南京师范大学生命科学院植物教研室杨启银副教授鉴定。

以茅苍术无菌苗为试验材料,无菌苗培养基为MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.3 mg/L。取培养25 d的无菌苗根为外植体,进行愈伤组织诱导,培养基为MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L。上述培养基均为固体培养基(琼脂量为10 g/L),且分别附加蔗糖30 g/L,灭菌前调pH为6.0,培养条件均为:光照12 h/d,光照强度1 000 lx,温度白天(23±1),夜晚(18±1)。

取1.0 g左右生长旺盛的疏松愈伤组织,转入装有25 mL MS液体培养基的100 mL三角瓶中培养。培养基附加6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L以及3%蔗糖,灭菌前调pH为6.0。培养温度(23±1),摇床转速120 r/min。

悬浮细胞每隔14 d继代1次,每次继代时将培养物摇匀,用无菌移液管吸取培养基中的培养物加入新鲜培养液中,新鲜培养液与原细胞培养基比例为3:1。继代5次以上的培养细胞可达到稳定状态。

1.2 细胞生长曲线的测定:用继代培养6次后的悬浮细胞建立生长曲线。0~35 d每7天取样1次,测定细胞干质量、耗糖曲线及pH变化情况。细胞干质量的测定方法为:用烘干称质量的滤纸过滤茅苍术悬浮细胞,蒸馏水洗3次,真空冷冻干燥至恒质量(取3次测定结果平均值)。发酵液中残糖的测定采用苯酚-硫酸法^[4],pH值采用德国赛多利斯 Sartorius 酸度计测定。

1.3 苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇和苍术素的定性和定量

1.3.1 仪器条件与试剂:惠普上海分析仪器有限公司1890型气相色谱仪(HPSF-1890GC)。程序升

温:从60开始以10 /min上升至190并保持2 min,之后以5 /min上升至210保持2 min,再以10 /min上升至220保持8 min。数据处理用N2010型色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司)。其他仪器条件同文献方法^[5]。

苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇和苍术素对照品由南京中医院大学梁侨丽副教授提供,经气相色谱面积归一化法计算质量分数大于99%。正十五醇和 α -硝基萘为GC级,其他试剂均为分析纯。

1.3.2 保留时间法定性:苍术酮、苍术醇和 β -桉叶醇采用正十五醇为内标^[6]。苍术素则选用 α -硝基萘为内标^[7],采用保留时间法对苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇和苍术素进行定性。当存在保留时间推移时,则在每张指纹图谱上选择2个内标峰作为保留时间校正峰,采用二点校正法进行保留时间的校正^[8]。

1.3.3 标准曲线的绘制:精确称取4种对照品和2种内标各5 mg,分别加环己烷配制成5 mg/mL的溶液。然后精密吸取5个不同体积的对照品溶液(吸取苍术酮溶液的体积分别为25、50、75、100、150 μ L;吸取苍术醇、 β -桉叶醇和苍术素溶液的体积分别为25、50、100、150、200 μ L),分别置于1 mL量瓶中,各加入内标溶液100 μ L,用环己烷稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取1 μ L,注入气相色谱仪测定,由对照品浓度与对照品/内标峰面积的比值进行回归。

1.4 苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇和苍术素最低检测浓度的确定:将0.125 mg/mL的4种对照品溶液不断稀释后分别精密吸取1 μ L,注入气相色谱仪测定。当信噪比(SNR)为3:1时的进样质量浓度即为该化合物的最低检测质量浓度。

1.5 茅苍术悬浮细胞中挥发油的提取和测定:精确称取一定量的茅苍术干细胞,加4倍量(1~4)的环己烷过夜冷浸,之后超声15 min,5 000 r/min离心4 min后取上清液。真空旋转蒸发仪浓缩,最后在浓缩液中加入内标,定容到一定体积。用上述气相色谱法分析。

1.6 内生真菌粗诱导子的制备、总糖的测定及诱导细胞实验:内生真菌AL4和AL12分别分离自茅苍术叶片和茎,经南京师范大学生命科学院硕士研究生陈佳昕鉴定分别属于小克银汉霉属(*Cunninghamella* sp.)和孔球孢霉属(*Gilmaniella* sp.)中的一个种^[9]。两株内生真菌在马铃薯葡萄糖液体培养基(PD)28、150 r/min培养6 d,滤纸滤过得菌丝

体。充分洗涤过的菌丝体在 10 倍体积的重蒸馏水中匀浆,后滤过,滤液 121 处理 20 min,此即为内生真菌粗诱导子^[10]。采用苯酚-硫酸法^[4]测定其总糖的量。

在第 14 天的茅苍术悬浮细胞培养基中分别加入 AL4 和 AL12 的粗提物,加入量按菌液中的含糖量计算,本研究采用的诱导子质量浓度为每升培养基含糖 20 mg。取样时刻为加入诱导子后的第 7 天,测定细胞干质量、挥发油成分及量。以不加诱导子的作为对照。

2 结果与分析

2.1 细胞生长曲线的建立:茅苍术细胞在一个生长周期(35 d)中的生长情况见图 1。35 d 的培养周期中,茅苍术悬浮细胞的生长曲线基本上呈现“S”型。0~7 d 为延滞期,之后进入对数生长期,21 d 时细胞生物量达到最大,为 6.95 g/L。耗糖曲线也表明:在 21 d 时培养基中的糖大部分已被利用。此外,pH 在整个生长周期内维持在 5.01~5.89,变化趋势为 0~7 d 不断下降,之后逐渐升高。

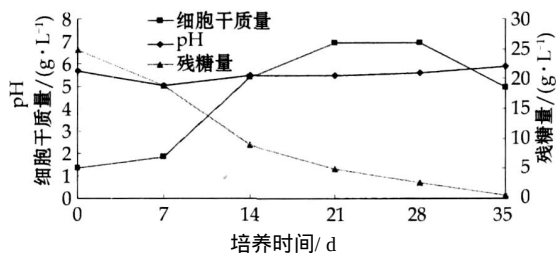


图 1 茅苍术悬浮细胞的生长

Fig. 1 Growth of suspension cell from *A. lancea*

2.2 苍术酮、苍术醇、β-桉叶醇和苍术素的定性和定量:4 种对照品及 2 种内标的混合进样图谱见图 2。4 种对照品的标准曲线为,苍术酮: $Y = 2.115 0 X + 0.035 3$, $R^2 = 0.999 2$,在 0.125~0.750 mg/mL 线性关系良好;苍术醇: $Y = 1.241 1 X - 0.020 8$, $R^2 = 0.998 9$,在 0.125~1.000 mg/mL 线性关系良好;β-桉叶醇: $Y = 1.318 6 X - 0.051 0$, $R^2 = 0.998 2$,在 0.125~1.000 mg/mL 线性关系良好;苍术素: $Y = 1.758 2 X - 0.013 2$, $R^2 = 0.999 4$,在 0.125~1.000 mg/mL 线性关系良好。

2.3 苍术酮、苍术醇、β-桉叶醇和苍术素的最低检测质量浓度:采用上述方法,测得苍术酮、苍术醇、β-桉叶醇、苍术素的最低检测质量浓度分别为 0.625 0、1.562 5、3.125 0、1.000 0 μg/mL。

2.4 不同培养时间茅苍术悬浮细胞中挥发油分析:对培养了 14、21、28、35 d 的茅苍术悬浮细胞中的挥

发油进行分析,结果仅检出 β-桉叶醇。原因可能为细胞在此培养条件下不产生苍术酮、苍术醇和苍术素,也可能是细胞产生这 3 种物质的量低于本研究的最低检出量。此外,不同培养时间的细胞中 β-桉叶醇的量也不一样。在 14 和 35 d 的茅苍术悬浮细胞中 β-桉叶醇的量很少(未能定量),而 21 d 的悬浮细胞中 β-桉叶醇的干质量最高,为 17.469 μg/g,其次为 28 d 的悬浮细胞中的量,为 12.962 μg/g。图 3 为 21 d 茅苍术悬浮细胞气相色谱图。

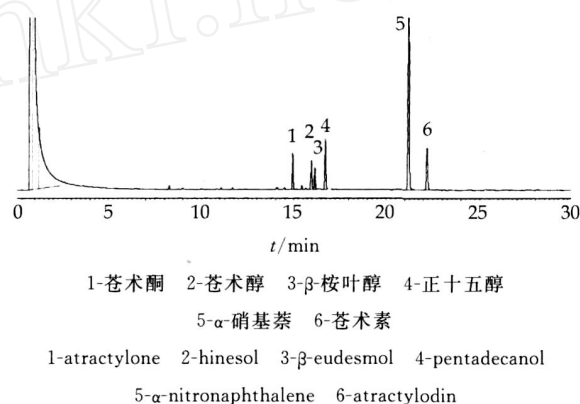


图 2 4 种对照品及 2 种内标气相色谱图

Fig. 2 GC Chromatogram of four reference substances and two internal standard substances

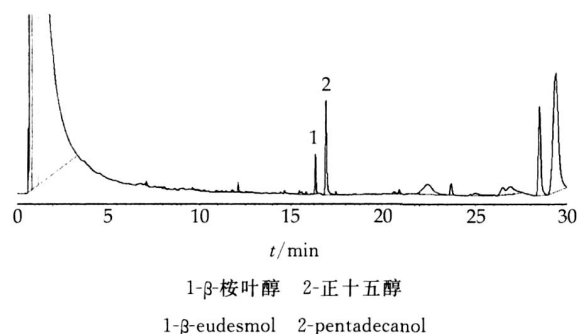


图 3 21 d 茅苍术悬浮细胞气相色谱图

Fig. 3 GC Chromatogram of suspension cell on day 21

2.5 内生真菌粗诱导子对茅苍术悬浮细胞生长及挥发油产量的影响:添加内生真菌 AL4 和 AL12 的粗诱导子对茅苍术悬浮细胞的生长具有微弱的促进作用,分别使诱导后第 7 天(即细胞培养的第 21 天)的细胞干质量达到对照的 103.31%和 104.03%;且经诱导后的细胞中均能检测到苍术酮、苍术醇、β-桉叶醇和苍术素的存在,同时 β-桉叶醇的量有了不同程度的提高(分别为对照的 2.22 倍和 1.05 倍)。结果见表 1。总体来看,AL4 粗诱导子的效果更好。图 4 为用 AL4 粗诱导子诱导 7 d 后的茅苍术悬浮细胞气相色谱图。

表 1 内生真菌粗诱导子对茅苍术悬浮细胞生长及挥发油产量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of endophytic fungi elicitors on growth and essential oil yield of suspension cell from *A. lancea* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

处理类别	生物量 / (g · L ⁻¹)	质量分数/(μg · g ⁻¹)			
		苍术酮	苍术醇	β-桉叶醇	苍术素
对照	6.95 ± 0.07	-	-	17.469 ± 1.346	-
AL4 粗诱导子	7.18 ± 0.08	14.715 ± 1.806	28.395 ± 1.799	38.794 ± 2.403	8.310 ± 0.808
AL12 粗诱导子	7.23 ± 0.05	11.217 ± 0.796	12.890 ± 0.634	18.346 ± 1.089	8.193 ± 0.206

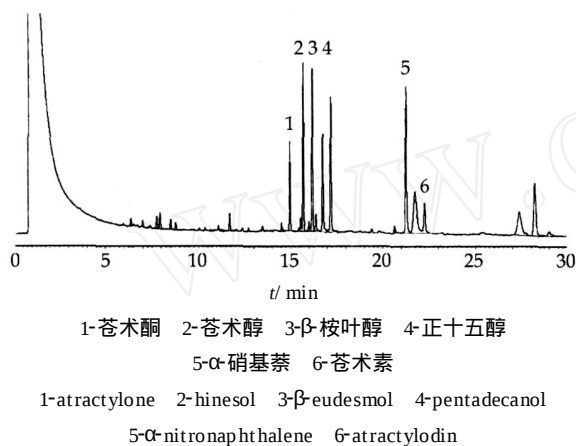


图 4 AL4 粗诱导子诱导 7 d 后的茅苍术悬浮细胞气相色谱图

Fig. 4 GC Chromatogram of suspension cell treated with AL4 crude elicitor for 7 d

3 讨论

3.1 悬浮细胞系的建立:利用植物细胞培养技术生产药用次生代谢产物,是目前生物技术重要的研究内容。与在固体培养基上培养相比,细胞悬浮培养能使细胞繁殖速度加快,提供大量均一的植物细胞。本研究首次建立茅苍术悬浮细胞系,这一体系生长较快,分散性好,稳定均一,可适用于生理、生化和细胞周期调控等方面的研究。

3.2 诱导子的利用:目前,制约细胞培养法产业化的关键问题之一是培养细胞中次生代谢产物的量偏低。因此,有必要进一步研究调控植物细胞高产次生代谢物的方法及相关机制。利用真菌诱导子促进植物细胞次生代谢物积累即为其中的一条重要途径。近年来,这方面的研究越来越多,也有很多研究成功地利用真菌诱导子刺激了悬浮细胞中萜类的合成^[11,12]。但目前对于真菌诱导子的研究,大多集中在植物病原菌诱导子,而利用植物内生真菌制成诱导子的例子不多。本实验则采用内生真菌粗诱导子,其优点是对细胞生长有促进作用,且能显著地提高茅苍术悬浮细胞中挥发油的量,即达到双增长。这与病原菌诱导子诱导产生的单增长(即抑制细胞生长,仅提高次生代谢物产量)显著不同^[13]。原因可能是内生真菌和病原菌都能影响细胞的代谢途

径,但二者的刺激强度和方式不同。在用内生真菌 AL4 和 AL12 粗诱导子处理过的 21 d 茅苍术悬浮细胞主要成分与野生茅苍术相近,虽然前者的挥发油的量远低于后者,但这显示出该方法产挥发油的潜能。真菌诱导子的作用效果与诱导子浓度、诱导子加入时间以及诱导的时间长短等多种因素密切相关^[14]。

在本实验中,也发现添加内生真菌 AL4 和 AL12 粗诱导子的处理组与对照组相比,茅苍术悬浮细胞培养基碱化;细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性增高。这些变化是否与诱导子提高茅苍术悬浮细胞中挥发油产量直接相关,还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部. 2005.
- [2] 袁媛,吕冬梅,黄璐琦,等. 苍术不定根诱导培养的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(1): 65-66.
- [3] 刘海萍,巢建国. 药用植物茅苍术的组织培养[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(5): 11-13.
- [4] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社, 2000.
- [5] 戴传超,袁生,刘吉华,等. 产二十二碳六烯酸等多不饱和脂肪酸真菌的筛选[J]. 菌物系统, 2000, 19(2): 261-267.
- [6] 闫雪生,刘青. 苍术挥发油中β-桉叶醇的含量测定[J]. 中成药, 2004, 26(5): 414-415.
- [7] 杨凌,欧阳臻,韩丽,等. 茅苍术挥发油提取方法的比较研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(5): 1078-1079.
- [8] 柴逸峰,罗国安,乔善磊. 中药色谱指纹图谱相似度计算中保留时间校正方法的研究[J]. 分析化学研究简报, 2005, 33: 1599-1602.
- [9] 陈佳昕,戴传超,李霞,等. 茅苍术内生真菌的分离鉴定及在组培苗中的回接[J]. 广西植物, 2008, 28(2): 256-260.
- [10] 宁文,徐红,曹日强. 米曲霉激发子刺激滇紫草细胞活性氧的产生及与紫草素形成的关系[J]. 南京大学学报:自然科学版, 1997, 33(2): 259-264.
- [11] 张莲莲,谈锋. 真菌诱导子在药用植物细胞培养中的作用机制和应用进展[J]. 中草药, 2006, 37(9): 1426-1430.
- [12] Yuan YJ, Li C, Hu ZD, et al. Signal transduction pathway for oxidative burst and taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxysprum* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 29: 372-379.
- [13] Lan WZ, Yu LJ, Li MY, et al. Cell death unlikely contributes to taxol production in fungal elicitor-induced cell suspension cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(1): 47-49.
- [14] 王和勇,罗恒,孙敏. 诱导子在药用植物细胞培养中的应用[J]. 中草药, 2004, 35(8): 附 3-附 7.