

## 诱导子对黄芩毛状根生长及黄芩苷合成的影响

齐香君, 郭乐康, 陈微娜\*

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西 西安 710021)

**摘要:**目的 考察诱导子对黄芩毛状根生长和黄芩苷生物合成的影响。方法 用非生物诱导子( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Co}^{2+}$ )和从黑曲霉 *Aspergillus niger*、米曲霉 *A. oryzae*、蜜环菌 *Armillaria mellea* 中提取的真菌诱导子,与黄芩毛状根共培养;HPLC法测黄芩苷的量。结果 各诱导子对黄芩毛状根生长和黄芩苷合成有不同影响:黑曲霉诱导子和米曲霉诱导子质量浓度为40和20 mg/L时, $\text{Co}^{2+}$ 浓度为 $1.53 \times 10^{-4}$  mmol/L时,黄芩苷的量从7.64%分别增至9.18%、8.81%和8.62%。结论 诱导子对黄芩毛状根次生代谢产物具有特异性,可选择性地促进某一类次生代谢产物的合成。试验证实黑曲霉诱导子、米曲霉诱导子和 $\text{Co}^{2+}$ 是适合黄芩毛状根代谢黄芩苷调控的诱导子。

关键词:黄芩;诱导子;毛状根;黄芩苷

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)05-0801-03

Influence of elicitors on growth and baicalin biosynthesis in hairy root of *Scutellaria baicalensis*

QI Xiang-jun, GUO Le-kang, CHEN Wei-na

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** **Objective** To study the influence of elicitors on growth and baicalin biosynthesis in hairy root of *Scutellaria baicalensis* (HRSB). **Methods** The elicitors from the solution of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and fungal elicitors extracted from *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, and *Armillaria mellea* were cocultivated with HRSB and the content of baicalin was determined by HPLC. **Results** Every elicitor has different influences on the growth and baicalin biosynthesis. When the concentration of *A. niger* was 40 mg/L, *A. oryzae* was 20 mg/L, and the  $\text{Co}^{2+}$  is  $1.53 \times 10^{-4}$  mmol/L, the content of baicalin increased respectively to 9.18%, 8.81%, and 8.62%. **Conclusion** Elicitors could improve some specific secondary metabolic synthesis. The test implies that the elicitors of *A. niger*, *A. oryzae*, and  $\text{Co}^{2+}$  could effectively improve the synthesis of baicalin.

**Key words:** *Scutellaria baicalensis* Georgi; elicitor; hairy root; baicalin

利用发根农杆菌侵染宿主黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的无菌苗,诱导出的黄芩毛状根<sup>[1]</sup>,直接用作食品、药品等加工原料,与传统的细胞培养技术相比,具有生长迅速、遗传性状稳定及激素自养等特点,并能有效积累原植物中的次生代谢产物黄芩苷。在植物次生代谢过程中,诱导子能作为一种特定的生化信号,快速、专一和选择性地诱导特定基因的表达,从而调节植物细胞次生代谢产物的合成<sup>[2~4]</sup>。本研究选取3种真菌提取物和3种金属离子作为调控因子,按不同浓度加入到培养基中与黄芩毛状根共培养,为研究诱导子对黄芩毛状根生长及黄芩苷合成的影响提供定量的方法。

## 1 材料与方法

1.1 材料:黄芩毛状根(本研究室诱导并鉴定):真菌诱导子为黑曲霉 *Aspergillus niger* Van Tieghem、米曲霉 *Aspergillus oryzae* Cohn 和蜜环菌 *Armillaria mellea* Karst. 的多糖提取物;非生物诱导子为  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$  和  $\text{CoCl}_2$  溶液。

1.2 试剂与仪器:高效液相色谱仪(SY-4000K);HAQ-F160 振荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);UV-9100 紫外可见分光光度计(北京瑞利仪器分析公司);甲醇为色谱纯(上海陆忠工贸有限公司),水(重蒸馏水),黄芩苷对照品(自制,HPLC 归一化法计算其质量分数 97.56%),其

\* 收稿日期:2008-09-18

作者简介:齐香君(1957—),女,河南省博爱县人,陕西科技大学生命科学与工程学院院长,教授、硕士生导师,从事生物制药和天然药物活性成分研究等方面的教学和科研工作。Tel:(029)86168590 E-mail:qixj@sust.edu.cn

余试剂均为 AR 级。

1.3 真菌诱导子的制备:真菌接种于 PDA 液体培养基中置摇床上 110 r/min, 25 °C 暗培养 4 d 收获。悬浮培养的菌球抽滤,加入 10 倍体积的蒸馏水,匀浆后于高压灭菌锅(121 °C)中处理 20 min,抽滤,滤液即为真菌诱导子。真菌诱导子的质量浓度均以糖的质量浓度标定,糖的质量浓度用蒽酮比色法测定<sup>[5]</sup>,测得黑曲霉诱导子、米曲霉诱导子和蜜环菌诱导子的糖质量浓度分别为 1 810.8、1 006.7 和 1 052.5 mg/L。

1.4 黄芩毛状根培养方法及取样方法:将生长旺盛的毛状根转接于 1/2MS 培养液中,接种量控制在 0.50 g,每 250 mL 三角瓶中装培养液 100 mL,110 r/min、28 °C、黑暗培养 20 d 后分别加入各种剂量的诱导子,继续培养 20 d 取出,抽滤,60 °C 烘箱干燥,精确称量后备用。对照组为同样方法培养,不添加任何诱导子。每个样品均培养 3 瓶。

1.5 黄芩苷的定量测定

1.5.1 色谱条件:SCiC<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 4.6 mm,大连科瑞科技有限公司),流动相:水-甲醇-磷酸(53 : 47 : 0.3),检测波长:274 nm,柱温:室温,进样量 10 μL,体积流量:1 mL/min。

1.5.2 供试品溶液的制备:精确称取黄芩毛状根干粉(过 60 目筛)0.30 g,加 70 %乙醇 40 mL,加热回流 3 h,定容至 100 mL。精确吸取上清液 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,甲醇定容,微孔滤膜滤过即得供试品溶液。

1.5.3 对照品溶液的制备:精密称取黄芩苷对照品适量,用甲醇配制成含黄芩苷 0.6 mg/mL 的对照品溶液。

1.5.4 标准曲线制备:取 5 个不同质量浓度的对照品溶液分别进样 10 μL,按上述色谱条件测定峰面积,得回归方程及线性范围为:Y = 33 473 X - 246 898, r = 0.999 2, 12~72 μg/mL。

1.5.5 样品测定:按外标法以峰面积计算供试品溶液中黄芩苷的量。

## 2 结果

诱导子对黄芩毛状根生长和黄芩苷合成的影响:从结果中可以发现,黑曲霉诱导子能明显促进黄芩苷的合成,在培养液中质量浓度为 40 mg/L 时黄芩苷的量最高,但随着质量浓度的增加,对毛状根的生长呈抑制状态(表 1)。米曲霉诱导子质量浓度为 20 mg/L 有利于黄芩苷的积累,在 40~100 mg/L 时,毛状根的生长及黄芩苷合成均呈抑制状态(表

2)。蜜环菌诱导子对黄芩苷的合成呈促进作用,但在 20~100 mg/L 时抑制毛状根的生长(表 3)。Ca<sup>2+</sup> 浓度在 1.0 mmol/L 时促进黄芩苷合成,在 1.0~3.0 mmol/L 对毛状根的生长呈抑制作用(表 4)。Mg<sup>2+</sup> 在 0.5~1.5 mmol/L 时均能促进黄芩苷合成,但在 0.5 mmol/L 和 1.5 mmol/L 时抑制毛状根生长(表 5)。Co<sup>2+</sup> 浓度在 (0.53 × 10<sup>-4</sup> ~ 1.53 × 10<sup>-4</sup>) mmol/L 时同时促进毛状根的生长和黄芩苷的合成(表 6)。

表 1 黑曲霉诱导子对黄芩毛状根生长(干质量)及黄芩苷量的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

Table 1 Influence of *A. niger* elicitor on growth and baicalin content in *S. baicalensis* hairy root ( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

| 诱导子/<br>(mg · L <sup>-1</sup> ) | 干质量/g       | 黄芩苷/ %      | 黄芩苷产量/<br>(g · L <sup>-1</sup> ) | 增长率/ % |
|---------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------|--------|
| 20                              | 1.28 ± 0.03 | 8.21 ± 0.39 | 1.05                             | 20.33  |
| 40                              | 1.16 ± 0.07 | 9.18 ± 0.19 | 1.07                             | 18.33  |
| 100                             | 1.15 ± 0.03 | 9.08 ± 0.31 | 1.04                             | 18.17  |
| 对照                              | 1.28 ± 0.04 | 7.64 ± 0.19 | 0.98                             | 20.33  |

表 2 米曲霉诱导子对黄芩毛状根生长(干质量)及黄芩苷量的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

Table 2 Influence of *A. oryzae* elicitor on growth and baicalin content in *S. baicalensis* hairy root ( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

| 诱导子/<br>(mg · L <sup>-1</sup> ) | 干质量/g       | 黄芩苷/ %      | 黄芩苷产量/<br>(g · L <sup>-1</sup> ) | 增长率/ % |
|---------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------|--------|
| 20                              | 1.23 ± 0.05 | 8.81 ± 0.22 | 1.08                             | 19.50  |
| 40                              | 1.18 ± 0.04 | 7.34 ± 0.38 | 0.86                             | 18.67  |
| 100                             | 1.11 ± 0.03 | 6.46 ± 0.17 | 0.71                             | 17.50  |
| 对照                              | 1.28 ± 0.04 | 7.64 ± 0.19 | 0.98                             | 20.33  |

表 3 蜜环菌诱导子对黄芩毛状根生长(干质量)及黄芩苷量的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

Table 3 Influence of *A. mellea* elicitor on growth and baicalin content in *S. baicalensis* hairy root ( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

| 诱导子/<br>(mg · L <sup>-1</sup> ) | 干质量/g       | 黄芩苷/ %      | 黄芩苷产量/<br>(g · L <sup>-1</sup> ) | 增长率/ % |
|---------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------|--------|
| 20                              | 1.14 ± 0.05 | 7.85 ± 0.18 | 0.90                             | 18.00  |
| 40                              | 1.18 ± 0.03 | 7.99 ± 0.23 | 0.94                             | 18.67  |
| 100                             | 1.27 ± 0.05 | 8.04 ± 0.27 | 1.02                             | 20.17  |
| 对照                              | 1.28 ± 0.04 | 7.64 ± 0.19 | 0.98                             | 20.33  |

表 4 Ca<sup>2+</sup> 对黄芩毛状根生长(干质量)及黄芩苷量的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

Table 4 Influence of Ca<sup>2+</sup> on growth and baicalin content in *S. baicalensis* hairy root ( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

| 诱导子/<br>(mmol · L <sup>-1</sup> ) | 干质量/g       | 黄芩苷/ %      | 黄芩苷产量/<br>(g · L <sup>-1</sup> ) | 增长率/ % |
|-----------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------|--------|
| 1.0                               | 1.07 ± 0.03 | 7.90 ± 0.20 | 0.85                             | 16.83  |
| 2.0                               | 1.21 ± 0.03 | 6.76 ± 0.18 | 0.82                             | 19.17  |
| 3.0                               | 1.19 ± 0.03 | 6.76 ± 0.29 | 0.81                             | 18.83  |
| 对照                                | 1.28 ± 0.04 | 7.64 ± 0.19 | 0.98                             | 20.33  |

表 5  $Mg^{2+}$  对黄芩毛状根生长(干质量)及黄芩苷量的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

| Table 5 Influence of $Mg^{2+}$ on growth and baicalin content in <i>S. baicalensis</i> hairy root ( $\bar{x} \pm s$ , $n = 3$ ) |            |            |                                  |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|----------------------------------|--------|
| 诱导子/<br>(mmol · L <sup>-1</sup> )                                                                                               | 干质量/g      | 黄芩苷/ %     | 黄芩苷产量/<br>(g · L <sup>-1</sup> ) | 增长率/ % |
| 0.5                                                                                                                             | 1.23 ±0.07 | 7.91 ±0.34 | 0.97                             | 19.50  |
| 1.0                                                                                                                             | 1.32 ±0.02 | 7.68 ±0.24 | 1.02                             | 21.00  |
| 1.5                                                                                                                             | 1.09 ±0.03 | 8.33 ±0.14 | 0.91                             | 17.17  |
| 对照                                                                                                                              | 1.28 ±0.04 | 7.64 ±0.19 | 0.98                             | 20.33  |

表 6  $Co^{2+}$  对黄芩毛状根生长(干质量)及黄芩苷量的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

| Table 6 Influence of $Co^{2+}$ on growth and baicalin content in <i>S. baicalensis</i> hairy root ( $\bar{x} \pm s$ , $n = 3$ ) |            |            |                                  |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|----------------------------------|--------|
| 诱导子/<br>(mmol · L <sup>-1</sup> )                                                                                               | 干质量/g      | 黄芩苷/ %     | 黄芩苷产量/<br>(g · L <sup>-1</sup> ) | 增长率/ % |
| $5.3 \times 10^{-5}$                                                                                                            | 1.27 ±0.01 | 8.09 ±0.29 | 1.02                             | 20.17  |
| $1.03 \times 10^{-4}$                                                                                                           | 1.31 ±0.05 | 8.43 ±0.18 | 1.10                             | 20.83  |
| $1.53 \times 10^{-4}$                                                                                                           | 1.29 ±0.04 | 8.62 ±0.31 | 1.11                             | 20.50  |
| 对照                                                                                                                              | 1.28 ±0.04 | 7.64 ±0.19 | 0.98                             | 20.33  |

统计结果<sup>[6]</sup>表明,在培养液中添加黑曲霉、米曲霉和  $Ca^{2+}$  诱导子,对黄芩毛状根的干质量和黄芩苷的量均有极显著性影响( $P < 0.01$ );蜜环菌诱导对黄芩毛状根的干质量有极显著性影响( $P < 0.01$ ),但对黄芩苷的量无显著性影响; $Mg^{2+}$  同时显著影响黄芩毛状根的干质量和黄芩苷的量( $P < 0.01$ ); $Co^{2+}$  对黄芩毛状根的干质量无显著性影响,但可极显著影响黄芩苷量( $P < 0.01$ )。见表 7、8。

表 7 不同诱导子对黄芩毛状根干质量的影响

| Table 7 Influence of different elicitors on dry weight in <i>S. baicalensis</i> hairy root |    |       |       |        |                   |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------|-------|--------|-------------------|------------|
| 来 源                                                                                        |    | SS    | MS    | F      | F <sub>cirt</sub> | 显著性        |
| 黑曲霉诱导子                                                                                     | 组间 | 0.047 | 0.016 | 7.993  | 7.591             | $P < 0.01$ |
|                                                                                            | 组内 | 0.016 | 0.002 |        |                   |            |
| 米曲霉诱导子                                                                                     | 组间 | 0.049 | 0.016 | 11.270 | 7.591             | $P < 0.01$ |
|                                                                                            | 组内 | 0.012 | 0.001 |        |                   |            |
| 蜜环菌诱导子                                                                                     | 组间 | 0.041 | 0.014 | 7.827  | 7.591             | $P < 0.01$ |
|                                                                                            | 组内 | 0.014 | 0.002 |        |                   |            |
| $Ca^{2+}$                                                                                  | 组间 | 0.066 | 0.022 | 22.148 | 7.591             | $P < 0.01$ |
|                                                                                            | 组内 | 0.008 | 0.001 |        |                   |            |
| $Mg^{2+}$                                                                                  | 组间 | 0.092 | 0.031 | 16.144 | 7.591             | $P < 0.01$ |
|                                                                                            | 组内 | 0.015 | 0.002 |        |                   |            |
| $Co^{2+}$                                                                                  | 组间 | 0.003 | 0.001 | 0.667  | 4.066             |            |
|                                                                                            | 组内 | 0.010 | 0.001 |        |                   |            |

$F_{0.05}(3,8) = 4.006$ ,  $F_{0.01}(3,8) = 7.591$

表 8 不同诱导子对黄芩毛状根中黄芩苷量的影响

| Table 8 Influence of different elicitors on baicalin content in <i>S. baicalensis</i> hairy root |    |       |       |        |                   |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------|-------|--------|-------------------|------------|
| 来 源                                                                                              |    | SS    | MS    | F      | F <sub>cirt</sub> | 显著性        |
| 黑曲霉诱导子                                                                                           | 组间 | 4.839 | 1.613 | 20.117 | 7.591             | $P < 0.01$ |
|                                                                                                  | 组内 | 0.642 | 0.080 |        |                   |            |
| 米曲霉诱导子                                                                                           | 组间 | 8.533 | 2.844 | 43.543 | 7.591             | $P < 0.01$ |
|                                                                                                  | 组内 | 0.523 | 0.065 |        |                   |            |
| 蜜环菌诱导子                                                                                           | 组间 | 0.292 | 0.097 | 2.025  | 4.066             |            |
|                                                                                                  | 组内 | 0.384 | 0.048 |        |                   |            |
| $Ca^{2+}$                                                                                        | 组间 | 3.051 | 1.017 | 20.897 | 7.591             | $P < 0.01$ |
|                                                                                                  | 组内 | 0.39  | 0.05  |        |                   |            |
| $Mg^{2+}$                                                                                        | 组间 | 0.906 | 0.302 | 5.306  | 4.066             | $P < 0.05$ |
|                                                                                                  | 组内 | 0.455 | 0.057 |        |                   |            |
| $Co^{2+}$                                                                                        | 组间 | 1.666 | 0.555 | 8.935  | 7.591             | $P < 0.01$ |
|                                                                                                  | 组内 | 0.497 | 0.062 |        |                   |            |

$F_{0.05}(3,8) = 4.066$ ,  $F_{0.01}(3,8) = 7.591$

3 讨论

诱导子对次生代谢产物的合成具有特异性,可选择性地促进某一类次生代谢产物的合成<sup>[7]</sup>。本实验结果表明黑曲霉诱导子和米曲霉诱导子质量浓度为 40 和 20 mg/L 时, $Co^{2+}$  浓度为  $1.53 \times 10^{-4}$  mmol/L 时,黄芩苷的量从 7.64 % 分别增加到 9.18 %、8.81 % 和 8.62 %,对黄芩苷的合成影响比较显著,是有利于调控黄芩毛状根中黄芩苷代谢的诱导子。由于诱导产生的抗毒素对细胞自身大多具有毒性,诱导子对细胞生长有抑制作用,因而添加诱导子时其浓度需严格控制,使之既能在一定程度上刺激细胞发生过敏反应,合成次生代谢物,又不严重影响细胞的生长。通过对诱导子的筛选,研究黄芩毛状根次生代谢产物的积累和调控,有利于黄芩毛状根培养系统走向工业化。

参考文献:

[1] 齐香君,陈秀清,何恩铭. 发根农杆菌诱导黄芩毛状根的研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(5): 244-247.  
[2] 晏 琼,胡宗定,吴建勇. 生物和非生物诱导子对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响[J]. 中草药, 2006, 37(2): 262-265.  
[3] Verpoorte R, Memelink A J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites[J]. Phytochem Rev, 2002, 1: 13.  
[4] Zhao J, Zhu W H, Hu Q. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture[J]. Enzyme Microbial Technol, 2001, 28: 666-672.  
[5] 袁玉荪,朱婉华,陈钧辉. 生物化学实验[M]. 北京:高等教育出版社, 1988.  
[6] 茆诗松,周纪芈,陈 颖. 试验设计[M]. 北京:中国统计出版社, 2005.  
[7] Zhao J, Zhu W H, Hu Q. Enhanced catharanthine production in *Catharanthus roseus* cell culture by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors[J]. Enzyme Microbial Technol, 2001, 28: 673-681.