

文章编号:1674-7054(2012)01-0038-04

4种外源激素对长春花生物碱积累的影响

邹冬梅^{1,2}, 冯信平², 王建荣¹, 庞玉新¹, 蒋昌顺¹

(1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737;

2. 中国热带农业科学院 分析测试中心, 海南 海口 571101)

摘 要: 分别用茉莉酸、乙烯利、乙酰水杨酸、色氨酸等4种试剂的不同质量浓度的溶液, 处理温室盆栽的长春花成苗和幼苗。在处理2 d后, 测定长春花叶片中的吲哚生物总碱、长春碱、长春质碱和文多灵碱的含量。结果表明, 4种试剂对长春花植物中吲哚生物碱的积累有明显的促进作用。

关键词: 长春花; 外源激素; 茉莉酸; 吲哚生物碱

中图分类号: Q 949.776.5 **文献标志码:** A

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 是重要的药用植物, 属夹竹桃科 (Apocynaceae) 长春花属。长春花体内含有约130种生物碱, 其中的长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine)、阿吗碱 (ajmalicine)、蛇根碱 (serpentine)、长春质碱 (catharanthine)、文多灵碱 (vindoline) 等6种是重要的目的萜类生物碱。这6种生物碱具有较高的药用价值, 其中长春碱、长春质碱是目前被广泛应用的天然植物抗肿瘤药物, 用于治疗何杰金氏病、恶性淋巴瘤等肿瘤等疾病, 且其硫酸盐已被广泛用于临床。长春花生物碱合成途径的影响因素主要有3个方面, 一是酶催化的生物合成; 二是产物在细胞内或组织间进行分部运输和积累; 三是产物的生物和化学降解。吲哚生物碱的生物合成源于2个不同途径: 莽草酸途径和甲羟戊酸途径^[1]。近些年, 研究人员利用细胞工程及遗传工程的技术, 用化学方法将长春质碱和文多灵碱成功合成了长春碱和长春新碱^[2], 扩大和提高了长春花生物碱的来源和产量, 在一定程度上拓宽了长春花生物碱的源渠道。但目前, 细胞工程和遗传工程等生物技术在改良长春花品质和提高其生物碱含量上有如下不足: (1) 细胞培养的单位产出成本较高, 且高密度培养时生物碱含量会降低; (2) 细胞培养不能产生吲哚生物碱二聚体长春碱和长春质碱, 甚至不能产生它们的前体之一的文多灵碱; (3) 在利用遗传转化技术获得的转化体中, 尚未见用于工业生产的高产株系。为此, 笔者研究利用喷施茉莉酸、乙烯利、乙酰水杨酸、色氨酸等4种外源激素对长春花生物碱积累的影响, 旨在为长春花生物碱的生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 种子 长春花种子由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所提供。种子处理: 挑选大小一致、饱满的红色长春花种子, 用 $\varphi=0.1\%$ 的 HgCl_2 消毒10 min, 用清水充分冲洗消毒后的种子, 再用蒸馏水浸泡24 h。将处理后的种子播种于温室沙土 (沙: 土 = 2: 1) 中, 每天浇水, 待种子萌发后, 选取2对叶完全展开的幼苗移栽至花盆中, 每盆4株。

1.2 长春花幼苗 生长健壮的2个月苗龄的温室盆栽苗, 株高约10 cm。盆土为肥沃的沙壤土。

1.3 长春花成苗 苗龄5个月, 株高30~35 cm, 顶端陆续开花, 侧枝5~6个的生长健壮的长春花成苗。正常肥水供应。分别摘取位于长春花成苗上、中、下不同部位的叶片若干, 将从各部位摘取的叶片分别混

收稿日期: 2012-03-05

基金项目: 海南省自然科学基金 (808177); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (PZS033) 资助项目

作者简介: 邹冬梅 (1972-), 女, 湖南祁东人, 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所副研究员。

通信作者: 蒋昌顺 (1967-), 男, 广西全州人, 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所研究员。E-mail: changshunj@yahoo.com.cn

匀,按部位各取3份(每份5 g)样品用于测定长春花成苗总吲哚生物碱。

1.4 乙烯利处理长春花的方法 用蒸馏水配制 $\rho=0.5, 1, 2, 4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙烯利溶液,并用喷雾器分别将乙烯利溶液和蒸馏水(对照)均匀地喷在长春花成苗的叶片上。对照和各处理各喷10盆。处理2 d后取长春花的中部叶片,对照和各处理各3份,每份5 g,用于测定吲哚总碱、长春质碱、长春碱和文多灵碱的含量。

1.5 乙酰水杨酸处理长春花的方法 用蒸馏水配制 $\rho=0.5, 1, 2, 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酰水杨酸溶液,并用喷雾器分别将乙酰水杨酸溶液和蒸馏水(对照)均匀地喷在长春花成苗的叶片上。对照和各处理各喷10盆。处理2 d后取长春花的中部叶片,对照和各处理各3份,每份5 g,用于测定吲哚总碱、长春质碱、长春碱和文多灵碱的含量。

1.6 色氨酸处理长春花的方法 用蒸馏水配制 $\rho=500, 1\ 000, 1\ 500, 2\ 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 色氨酸溶液,并分别将蒸馏水(对照)和色氨酸溶液缓慢地浇施在花盆中,处理2 d后剪取长春花幼苗的叶片。对照和各处理各称取叶片3份,每份5 g,用于进行吲哚总碱测定。

1.7 茉莉酸处理长春花的方法 用蒸馏水配制 $c=0.01, 0.05, 0.25, 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的茉莉酸溶液,用喷雾器均匀地将茉莉酸溶液和蒸馏水(对照)喷在苗龄2个月的长春花叶片上。对照和各处理各10盆,处理2 d后取长春花幼苗中部叶片,对照和各处理各3份,每份5 g,用于测定吲哚总碱、长春质碱、长春碱和文多灵碱的含量。

1.8 吲哚生物碱的测定 吲哚总碱的提取及其含量的测定均按文献[3]的方法进行。

1.9 长春碱、长春质碱和文多灵碱的测定 长春碱、长春质碱和文多灵碱的测定按文献[4-6]的方法进行。

2 结果

2.1 不同部位的长春花叶片吲哚生物碱的分析 结果(见图1)表明,长春花不同部位叶片吲哚生物碱的含量有明显差异,上部含量较少,中部次之,下部含量较中部稍多些。这是因为长春花次生代谢活力随叶龄的增长而上升,所以其叶片中的吲哚生物碱含量也随之提高。

2.2 乙烯利对长春花成苗叶片中吲哚生物碱积累的影响 从图2可以看出,不同质量浓度的乙烯利对叶片中吲哚生物碱的积累均有明显的促进作用,但乙烯利处理的最适质量浓度在不同的吲哚生物碱之间存在较大差异,如乙烯利的 $\rho=1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,吲哚总碱含量显著提高,约为对照组的3.4倍;乙烯利的 $\rho=2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,长春质碱含量显著提高,约为对照的5.1倍;乙烯利的 $\rho=4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,长春碱的含量达最高,超过对照的3.5倍;乙烯利的 $\rho=2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,文多灵碱的含量达最高,超过对照的2倍。

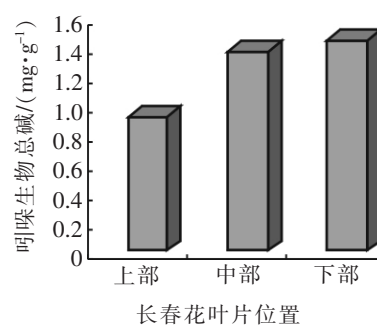


图1 不同部位长春花叶片吲哚总碱的含量

2.3 乙酰水杨酸对长春花叶片中吲哚生物碱积累的影响

从图3可以看出,在乙酰水杨酸 $\rho=2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,长春质碱的含量约为对照的4.6倍,文多灵碱含量约为对照的1.6倍;在乙酰水杨酸的 $\rho=4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,总吲哚生物碱含量超过对照的2.5倍,长春碱含量约为对照的2.2倍。

2.4 色氨酸对长春花幼苗吲哚生物碱积累的影响 长春花吲哚生物碱合成的前体物质是色氨酸。在植物体内,吲哚类化合物的含量与色氨酸的代谢密切相关。本实验用不同质量浓度的色氨酸溶液处理盆栽苗龄2个月的长春花幼苗,以期筛选出影响长春花药用成分积累的最适质量浓度。结果(见图4)表明,色氨酸可促进长春花幼苗叶片中吲哚生物碱的积累。吲哚总碱、长春质碱、长春碱和文多灵碱均有一定程度的提高,与对照相比,吲哚总碱约提高2.2倍,长春质碱约提高3.3倍,长春碱约提高2倍,文多灵碱约提高1.7倍。促进吲哚生物总碱、长春质碱和文多灵碱积累的最适处理为 $\rho(\text{色氨酸})=1\ 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;促进长春碱积累的最适处理为 $\rho(\text{色氨酸})=1\ 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

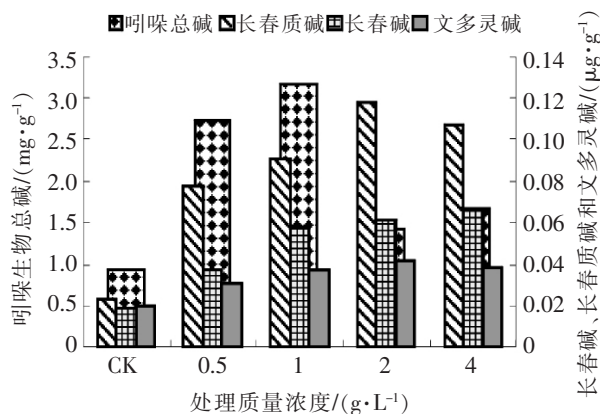


图2 乙烯利处理对长春花叶片中吲哚生物碱积累的影响

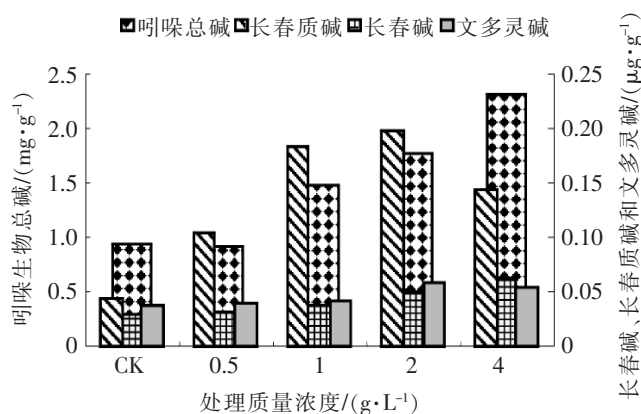


图3 乙烯水杨酸处理对长春花叶片中吲哚生物碱积累的影响

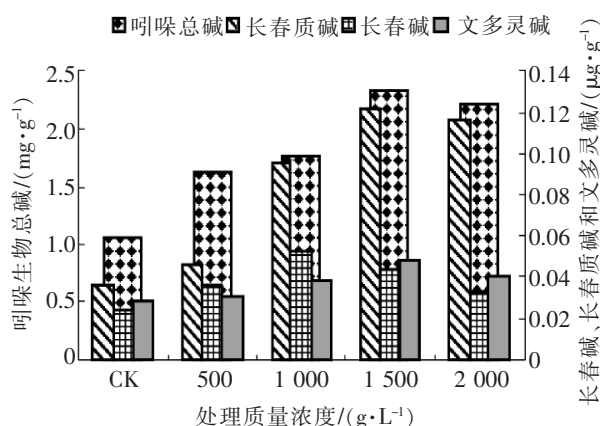


图4 色氨酸处理对长春花幼苗叶片中吲哚生物碱积累的影响

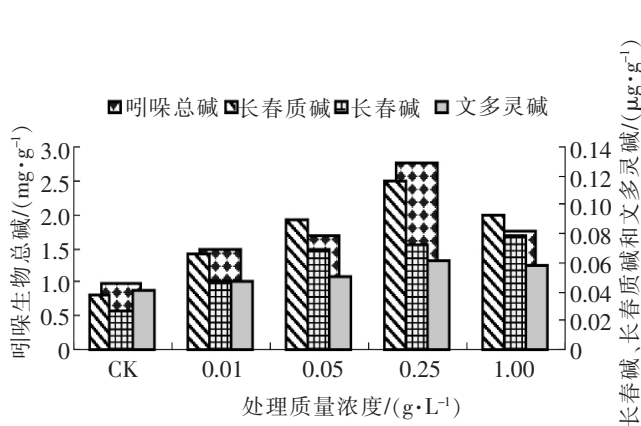


图5 茉莉酸处理对长春花幼苗叶片中吲哚生物碱积累的影响

2.5 茉莉酸对长春花幼苗吲哚生物碱积累的影响 从图5可以看出,在处理 $\rho(\text{茉莉酸}) = 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,长春质碱的含量最大,约为对照的3倍;总吲哚生物碱的含量超过对照的2.8倍;长春碱的含量超过对照的2倍;文多灵碱的含量超过对照的1.5倍。

3 结论

茉莉酸、乙烯利、乙酰水杨酸和色氨酸溶液对长春花叶片中吲哚总碱、长春碱、长春质碱和文多灵碱的积累均有促进作用。它们对长春质碱的影响尤为明显,长春质碱的最高含量是对照的5.1倍。本实验结果表明,在生产实践中,利用上述4种试剂处理长春花,有可能促进长春花生物碱的增产。

参考文献:

- [1] 陈敏,廖志华,孙敏,等. 生物技术在长春花研究中的应用[J]. 中草药,2001,32(1):78-81.
- [2] KETNEY J P,BOULET C A. Alkaloids production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell cultures. Synthesis of bisindole alkaloids by use of immobilized enzyme systems[J]. Heterocycle,1988,27:621-628.
- [3] 张向飞,张秀省,王勇,等. 植物生长调节物质对长春花细胞中吲哚生物碱积累的影响[J]. 植物生理学通讯,2004,40(3):303-304.
- [4] 杨蕾,唐中华,祖元刚. 高效液相色谱法同时测定长春花中的文多灵碱、长春质碱和脱水长春碱[J]. 色谱,2007,25(4):550-552.
- [5] 张秀省,张荣涛,聂莉莉,等. 长春花叶片中吲哚生物碱增产的研究[J]. 中草药,2005,36(2):265-267.
- [6] 孙小芬,陈雨,潘俊松,等. 长春花主要农艺性状与文多灵碱含量的相关及通径分析[J]. 植物学报,2009,44(1):96-102.

Effects of exogenous hormones on the accumulation of alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.)

ZOU Dong-mei¹, FENG Xin-ping², WANG Jian-rong¹, PANG Yu-xin¹, JIANG Chang-shun¹

(1. Tropical Crop Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, 571737, China;

2. Tropical Agricultural Products Quality Supervision and Testing Centre of Ministry of Agriculture, Haikou, 571101, China)

Abstract: Four chemical reagents, jasmonic acid (JA), ethrel, Aspirin and tryptophan, were used as exogenous hormones to treat pot plants of *Catharanthus roseus* grown in green house to determine the contents of medicinal components, alkaloids, in *C. roseus* leaves. The pot plants at the age of 2 and 5 months were treated with the reagents at different concentrations. Two days after treatment, the contents of catharanthine, vinblastine and vindoline in leaves were determined by using HPLC. All the reagents under trial obviously improved the accumulation of indole alkaloids including catharanthine and vinblastine in the leaves of *C. roseus*, and the optimum treatment concentrations of these reagents were determined. These reagents apparently promote the accumulation of total indole alkaloids in the leaves of *C. roseus*.

Key words: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; exogenous hormone; jasmonic acid (JA); indole alkaloids

(上接第 37 页)

Identification and evaluation of physiologically active root endophytic actinomycetes from mangrove plants in Hainan Province

TANG Yi-li¹, XIE Xiu-chao², HONG Kui^{1, 3}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723003, China;

3. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: A total of 138 root endophytic actinomycete strains were successfully isolated using 1/10ATCC 172 medium from the roots of 18 mangrove plants and 3 semi-mangrove plants in Hainan Province. Analysis of 16S rRNA gene sequences of these isolates showed that the isolates belonged to members of the genera *Jishengella*, *Micromonospora* and *Streptomyces*. Bioactivity tests were carried out on all the isolated endophytic actinomycete fermentation liquids. Of all the isolates forty strains showed cytotoxicities to hepatocarcinoma cell line SMMC-7721 cell, and twenty seven strains were active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 9551 (MRSA). The strains isolated from the mangroves showed no bioactivity against *Candida albicans* ATCC 10231. Sodium chloride tolerance test for 88 isolates indicated that 77 isolates were halo-tolerant or halophilic, 2 isolates of which exhibited the highest tolerance to $\rho(\text{NaCl}) = 150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and 54 isolates grew well on the medium containing $\rho(\text{NaCl}) = 33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: mangrove plant; endophytic actinomycetes; physiologically active