

# 药用植物组织培养生产有效成分的影响因素研究进展

张敏敏, 陈玉梁, 赵瑛, 张运晖, 罗俊杰

(甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 综述了外植体、基本培养基、碳源、氮源、生长调节剂、光照、pH等基本培养条件及诱导子、前体物质及代谢酶等附加物的添加对药用植物组织培养合成次生代谢产物的影响。

**关键词:** 药用植物; 组织和细胞培养; 次生代谢产物; 影响因素; 研究进展

**中图分类号:** R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2013)07-0043-04

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1463.2013.07.018

## Research Progress on Effect Factors of Using Tissue Culture to Produce Active Components of Medical Plant

ZHANG Min-min, CHEN Yu-liang, ZHAO Ying, ZHANG Yun-hui, LUO Jun-jie

(1. College of Life Sciences of Northwest Normal University, Gansu Lanzhou 730070, China; 2. Biotechnology Research Institute of Gansu Academy of Agricultural Sciences, Gansu Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** The paper elaborated the influence of the basic culture conditions and the additives on using tissue culture to produce secondary metabolite of medical plant and research progress in this field was reviewed.

**Key words:** Medical plant; Tissue and cell culture; Secondary metabolite

植物是药物的重要来源之一, 人类利用药用植物的历史渊远流长。我国药用植物的种质资源

非常丰富, 达10 000种以上, 且大多为野生资源。由于传统中草药的获取方法是以采集和消耗大量

收稿日期: 2013-06-03

基金项目: 甘肃省农业生物技术研究与开发项目

作者简介: 张敏敏(1985—), 女, 甘肃武都人, 研究实习员, 主要从事天然产物开发方面的研究工作。联系电话: (0)18693112939。

### 2.4 最佳施肥量

以玉米新品种产量为目标函数, 根据试验结果得出产量(Y)与N、P、K肥之间的回归方程为:  $Y=432.44 + 14.95 N - 0.28 N^2 + 13.84 P - 0.32 P^2 + 0.88 K - 1.91 K^2 - 0.68 NP - 0.18 NK + 1.46 PK$ 。应用该回归方程, 按氮肥(N)4.89元/kg、磷肥(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)5.33元/kg、钾肥(K<sub>2</sub>O)3.77元/kg、玉米2.00元/kg计算, 得出静宁县玉米田最佳施氮肥量(N)209.40 kg/hm<sup>2</sup>、施磷量(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)94.65 kg/hm<sup>2</sup>、施钾量(K<sub>2</sub>O)23.70 kg/hm<sup>2</sup>, 此时玉米产量预报值为9 124.8 kg/hm<sup>2</sup>。

### 3 小结

1) 在静宁县黄绵土质梯田种植玉米新品种长城706时, 氮、磷、钾合理配施增产效果明显。以施尿素600.00 kg/hm<sup>2</sup>、普通过磷酸钙900.00 kg/hm<sup>2</sup>、硫酸钾49.50 kg/hm<sup>2</sup>的玉米折合产量最高, 为9 400.00 kg/hm<sup>2</sup>, 比不施肥处理增产44.56%; 其次为施尿素600.00 kg/hm<sup>2</sup>、普通过磷酸钙900.00 kg/hm<sup>2</sup>、硫酸钾99.00

kg/hm<sup>2</sup>处理, 折合产量为9 205.0 kg/hm<sup>2</sup>, 比不施肥处理增产41.56%; 施尿素600.00 kg/hm<sup>2</sup>、普通过磷酸钙1 350.00 kg/hm<sup>2</sup>、硫酸钾99.00 kg/hm<sup>2</sup>处理居第3位, 折合产量为9 165.0 kg/hm<sup>2</sup>, 比不施肥处理增产40.95%。

2) 建立的玉米产量(Y)与N、P、K肥之间的回归方程为:  $Y=432.44 + 14.95 N - 0.28 N^2 + 13.84 P - 0.32 P^2 + 0.88 K - 1.91 K^2 - 0.68 NP - 0.18 NK + 1.46 PK$ 。根据该回归方程选优, 得出静宁县玉米最佳施氮量为(N)209.40 kg/hm<sup>2</sup>、施磷量(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)94.65 kg/hm<sup>2</sup>、施钾量(K<sub>2</sub>O)23.70 kg/hm<sup>2</sup>, 此时玉米产量预报值为9 124.8 kg/hm<sup>2</sup>。建议在实际生产中侧重氮肥的补充, 合理调节磷、钾肥投入, N、P、K最佳施用量比例为2.21 : 1 : 0.25。

### 参考文献:

[1] 王敏霞, 常喜玲. 静宁县耕地土壤养分测定结果初报[J]. 甘肃农业科技, 2011(1): 43-45.

(本文责编: 陈珩)

的野生植物资源为代价,当采集和消耗量超过自然资源的再生能力时,必然会导致物种濒危甚至灭绝,因此,利用植物组织和细胞的大量培养合成中药有效成分成为实现中药现代化的一条重要途径<sup>[1]</sup>。适宜的离体培养条件下,植物组织和细胞培养物能像植物体一样进行次生代谢,并积累次生代谢产物<sup>[2]</sup>。药用植物的有效成分也属于植物细胞所产生的次生代谢产物,如生物碱、黄酮、萜类、皂甙等。由于这些化合物结构复杂,人工合成困难,因此植物组织和细胞培养方法则展现出无可比拟的优越性。而药用植物的组织和细胞培养价值如何,主要取决于其合成的有效成分与自然植株间的差异,而诱导成分的产生受到培养条件的多重影响。近年来国内外在基本培养条件和附加物的添加对药用植物组织和细胞培养合成次生代谢产物的影响方面进行了许多研究,我们对该领域的相关研究进行了归纳和总结。

## 1 研究进展

### 1.1 外植体对合成次生代谢产物的影响

植物细胞虽均有全能性,但在实验过程中,不同外植体的愈伤诱导率和愈伤生长状态各不相同,且不同外植体诱导的愈伤组织次生代谢产物的种类及产量也不尽相同。甘草以下胚轴为外植体时愈伤诱导率最高,且不同外植体诱导的愈伤组织中次生代谢产物含量不同,表现为下胚轴愈伤组织中总黄酮含量最高,子叶愈伤组织中甘草酸含量最高<sup>[3]</sup>;在对朱砂根愈伤组织的诱导中,各外植体的诱导率虽较为一致,但以胚根为外植体的愈伤组织中岩白菜素含量高于其它愈伤组织<sup>[4]</sup>。因此,外植体的选择是利用植物组织和细胞培养生产药用植物有效成分的前提。

### 1.2 培养基对合成次生代谢产物的影响

1.2.1 基本培养基 不同种类的基本培养基对植物组织培养及次生代谢产物的形成有很大的影响。如紫草在White培养基上能够合成紫草宁衍生物,而在LS等培养基上则不能合成<sup>[5]</sup>;又如B5培养基有利于杜仲愈伤组织中总黄酮的形成,而1/2MS培养基则有利于绿原酸的积累<sup>[6]</sup>;严海燕等对硬紫草的研究表明,改良的B5培养基有利于愈伤组织的生长,而M9培养基有利于紫草素的形成,于是选择了以B5培养基为生长培养基,而M9培养基为合成培养基的两阶段培养技术<sup>[7]</sup>。这种两步培养法较好的解决了细胞生物量增长与次生代谢产物积累之间的矛盾,大大提高了目标产物的产率,现已较广泛地应

用于黄连、黄花蒿等药用植物的培养中。

1.2.2 碳源 碳源不仅能为细胞生长提供能量,同时也是碳骨架的组成成分。在1987年,Smith等对长春花的研究即发现,以乳糖替代蔗糖可明显提高组织培养物的生物量和长春质碱的产量<sup>[8]</sup>;李琰等对雷公藤的研究表明,蔗糖有利于雷公藤愈伤组织的生长,麦芽糖有利于其内脂醇的合成,葡萄糖则有利于其总生物碱的积累<sup>[9]</sup>。可见选择适宜的碳源对药用植物次生代谢产物的积累具有促进作用。

1.2.3 氮源 不同植物对 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 的利用率不同,且单独以硝酸盐或铵盐为氮源,都不利于细胞的生长和次级代谢物的生成。因此,设置适宜的氮源及比例有助于细胞生长和次生代谢产物的生成。如在水母雪莲悬浮细胞培养中,氮源总量为60~120 mmol/L,且 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 比例为4:2时有利于细胞增长及黄酮的合成<sup>[10]</sup>;而玫瑰茄悬浮细胞培养中,氮源总量为13.5 mmol/L时即足够维持玫瑰茄细胞的生长和花青素的合成,且当 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 比例为25:2和25:4时细胞生长和花青素合成最佳<sup>[11]</sup>;甘草愈伤组织培养中,总氮浓度为60 mmol/L, $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 为2:1时,甘草愈伤组织中5种黄酮类化合物含量的总和达到最大值<sup>[12]</sup>。

1.2.4 生长调节剂 植物组织和细胞培养中最常用的生长调节剂是生长素和细胞分裂素。生长素主要包括2,4-D、IAA、IBA、NAA等,细胞分裂素包括BA、2ip、KT等。生长调节剂不仅对愈伤组织的生长和分化状态起着重要的调节作用,同时对次生代谢产物的生产也具有重要的影响。如在三分三愈伤组织培养中,低浓度2,4-D能刺激生物碱的合成,但延缓生长;高浓度2,4-D虽能刺激愈伤组织生长但抑制生物碱的合成。而NAA既能促进愈伤组织生长又能促进生物碱的合成<sup>[13-14]</sup>。雷公藤愈伤组织培养中,2,4-D有利于雷公藤愈伤组织生长和总生物碱的积累,6-BA抑制愈伤组织生长但明显促进内酯醇的形成<sup>[8]</sup>。可见植物生长调节剂是药用植物有效成分目的化生产的重要因素之一。

1.2.5 光照 光照对药用植物组织和细胞培养的影响主要体现在光强、光质及光照时间三个方面。如在不同光照强度下对虎杖愈伤组织进行培养,发现愈伤组织中白藜芦醇的含量从大到小依次为弱光、强光、暗光,且弱光下白藜芦醇的含量是同期所采野生品种的2倍<sup>[15]</sup>;又如以不同光质对朱砂根愈伤组织进行处理,发现绿光最利于岩白菜素的生成,蓝光和白光次之,红光最差<sup>[16]</sup>;在杜仲愈伤组织的培养中发现,12 h/d光照对愈伤组织

的生长及绿原酸和总黄酮的合成有明显的促进作用, 黑暗虽不影响愈伤组织的生长, 但却抑制绿原酸和总黄酮的形成<sup>[17]</sup>。

1.2.6 pH 盛长忠等的研究表明, 南方红豆杉的愈伤组织生长及紫杉醇含量受pH的影响较大, pH为5.5时对愈伤组织生长最为有利, 达接种量的3.84倍; 但紫杉醇的含量较低且pH为7.0时, 愈伤组织的生长量虽然相对较低, 但紫杉醇含量却是pH为5.5时的2倍多<sup>[18]</sup>。因此, 选择适宜的pH值对于植物组织的生长及次生代谢产物的合成也有一定的促进作用。

### 1.3 附加物对药用植物组织和细胞培养及有效成分生产的影响

植物次生代谢产物是一大类小分子化合物, 基础含量一般都很低。而在生物受到胁迫或出于一定的诱导条件下, 次生代谢产物的产量通常都有一定的提高<sup>[19]</sup>, 因此, 盐胁迫、旱胁迫等胁迫因子以及诱导子的特殊诱导作用受到广泛关注。同时, 随着次生代谢产物合成途径的进一步阐明, 前体物质和相关代谢酶的添加也成为提高目的产物的有效手段。

1.3.1 诱导子的应用 从植物病理学的角度讲, 诱导子是指在抗病生理过程中诱发植物产生植保素和引起植物过敏反应的因子, 从细胞培养的角度讲是指能促进植物细胞产生目的产物因子<sup>[20]</sup>。根据这个原理, 近年来该项研究已成为国内外研究的热点, 并取得了较大的进展。如Lu等发现, 诱导子的加入能使人参悬浮细胞中的皂甙含量达到细胞干重的2.07%, 是未加诱导子的28倍<sup>[21]</sup>。Wang等发现, 在红豆杉的细胞培养中加入100 μM的茉莉酸甲酯作为诱导子, 紫杉醇的含量能提高至对照的25.7倍<sup>[22]</sup>。文涛等以黑曲霉、啤酒酵母、青霉、灰葡萄孢的提取物为真菌诱导子对虎杖愈伤组织进行处理, 结果为黑曲霉、青霉、灰葡萄孢3种真菌诱导子均对白藜芦醇的合成有促进作用, 其中黑曲霉作用最显著, 比对照提高了50.2%, 而啤酒酵母提取物对白藜芦醇的合成具有抑制作用<sup>[23]</sup>。杨世海等以稀土元素作为新型诱导子, 也取得了喜人的结果, 即低浓度的稀土元素Eu<sup>3+</sup>对甘草愈伤组织中黄酮类化合物的合成具有明显的促进作用, 且当其浓度为0.1 mg/L时最有利于黄酮类化合物的积累, 总黄酮含量可为对照的2.7倍, 其中甘草素的含量是对照的4倍<sup>[24]</sup>。可见选择适宜的诱导子对药用植物组织和细胞培养及有效成分的积累具有积极的促进作用。

1.3.2 前体物质及代谢酶的影响 前体物质指某

一代谢中间体前一阶段的物质, 添加前体物质会影响植物组织和细胞的生长及次生代谢产物的合成。Zhao等在培养长春花细胞的系统中加入琥珀酸色氨酸和色氨酸等前体物质, 发现处理后细胞产生的长春花碱和西萝芙木碱是未经处理的4倍多<sup>[25]</sup>。Fett-Neto的实验发现, 在红豆杉细胞培养中加入前体物质苯丙氨酸能使紫杉醇含量提高5倍<sup>[26]</sup>。而代谢酶的研究目前主要是应用现代分子遗传学的方法分离和克隆出代谢途径中的关键酶基因, 并经过修饰和载体构建后转化到目的植物的基因组中, 从而构建目的代谢产物的转基因高产细胞系。如Canel和Geerlings对长春花的相关研究发现, 色氨酸合成酶和色氨酸脱羧酶与长春花细胞合成吲哚类和喹啉类生物碱相关, 采用分子遗传学方式超量表达这两种酶后, 生物碱产量达到200 mg/L的高水平, 说明这两种酶对长春花生物碱的合成具有明显促进作用<sup>[27-28]</sup>。Yamamura等和Yamamoto等分别研究了桂皮酸羟化酶和牻牛儿苗酸羟化酶对紫草细胞中紫草素合成的影响, 结果这两种酶在紫草细胞内的表达量与紫草素的合成速度明显相关, 并已将其基因克隆, 同时说明了通过外源基因调节紫草素的合成是可能的<sup>[29-30]</sup>。可见目的产物代谢途径的研究对提高其产量具有重要的意义。

## 2 展望

1952年Routien和Nickel首次提出用植物细胞培养技术能生产有用次级代谢产物的观点开始<sup>[31]</sup>, 利用植物组织和细胞培养方法合成天然产物的研究便迅速地发展起来。如今已能利用紫草细胞培养物生产紫草宁, 红豆杉细胞培养物生产紫杉醇等已达到工业化生产水平, 其他药用植物利用组织和细胞培养方式生产有效成分也取得了很大的成就, 但达到商业化生产水平的应用并不多, 很多药用植物组织和细胞的次生代谢产物含量不及原植物, 导致生产成本过高。因此控制和调节药用植物组织和细胞培养及有效成分合成中的相关可控条件, 进一步加强诱导子作用机制和目的产物代谢途径的研究, 对提高次生代谢产物的产量有着重要的现实意义, 同时也将进一步推进利用药用植物组织和细胞培养生产有效成分的工业化进程。

### 参考文献:

- [1] 张延红, 高素芳, 朱田田, 等. 基本培养基及温度和pH对黄芪组织培养的影响[J]. 甘肃农业科技, 2011(3): 7-9.
- [2] 傅经国, 吴鸣建, 赵天增, 等. 植物组织(细胞)培养在中药有效成分合成中的应用[J]. 世界最新医学信息

- 文摘, 2004, 43(2): 1056-1060.
- [3] 赵晶, 柳福智, 蔺海明. 不同外植体对甘草愈伤组织诱导的影响[J]. 广东农业科学, 2011, 38(19): 36-37.
- [4] 彭光天, 黄上志, 黄仲立, 等. 朱砂根愈伤组织诱导及其岩白菜素含量的测定[J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(1): 51-56.
- [5] FUJITA Y, HARA Y, SUGA C, *et al.* Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. Plant Cell Rep., 1981, 1: 61-63
- [6] 李琰, 王冬梅, 姜在民, 等. 培养基及培养条件对杜仲愈伤组织生长及次生代谢产物含量的影响[J]. 西北植物学报, 2004, 24(10): 1912-1916.
- [7] 严海燕, 曹日强. 紫草愈伤组织培养中紫草素形成的影响因素[J]. 华北农学报, 2002, 17(2): 116-120.
- [8] SMITH J I, SMART N J, KURZ W G W, *et al.* Stimulation of indole alkaloid production in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by abscisic acid [J]. Planta Medica, 1987, 53(5): 470-474.
- [9] 李琰, 杨广隶, 冯俊涛, 等. 碳源及植物生长调节剂对雷公藤愈伤组织生长和次生代谢产物含量的影响[J]. 林业科学, 2010, 46(9): 34-39.
- [10] 邢建民, 赵德修, 李茂寅, 等. 碳源和氮源对水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮合成的影响[J]. 生物工程学报, 1999, 12(2): 230-234.
- [11] 郑穗平, 郭勇. 主要营养成分对悬浮培养玫瑰茄细胞生长和花青素合成的影响[J]. 广西植物, 1998, 18(1): 70-74.
- [12] 杨世海, 陶静, 刘晓峰, 等. 培养基中碳源和氮源对甘草愈伤组织生长和黄酮类化合物合成的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(22): 1857-1859.
- [13] 郑光植, 梁崢. 三分三愈伤组织的生长、莨菪碱和东莨菪碱合成的化学调节[J]. 植物学报, 1977, 19(3): 9-14.
- [14] 郑光植, 何静波, 王世林. 三分三细胞悬浮培养中的激素调节[J]. 植物生理学报, 1982, 8(1): 53-58.
- [15] 文涛, 梁莉, 曾杨, 等. 不同光照强度对虎杖愈伤组织的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1277-1280.
- [16] 何雪娇, 赖钟雄. 光照和氮源对朱砂根愈伤组织生长及岩白菜素含量的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2012, 41(5): 486-490.
- [17] 李琰, 王冬梅, 姜在民, 等. 培养基及培养条件对杜仲愈伤组织生长及次生代谢产物含量的影响[J]. 西北植物学报, 2004, 24(10): 1912-1916.
- [18] 盛长忠, 王淑芳, 王勇, 等. pH对红豆杉愈伤组织生长PAL活性和紫杉醇含量的影响[J]. 中草药, 2001, 32(10): 929-931.
- [19] 蒋科技. 药用植物茉莉酸合成途径关键酶基因的克隆与研究[D]. 复旦大学, 2007.
- [20] 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): 3-7.
- [21] LU M B, WONG H L, TENG W L. Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng* [J]. Plant Cell Rep., 2001, 20: 674-677.
- [22] WANG Y D, YUAN Y J, WU J C. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 19: 259-265.
- [23] 文涛, 曾杨, 喻晓, 等. 真菌诱导子对虎杖愈伤组织中白藜芦醇合成的影响[J]. 核农学报, 2008, 22(4): 435-438.
- [24] 杨世海, 刘晓峰, 果德安, 等. 不同附加物对甘草愈伤组织培养中黄酮类化合物形成的影响[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(2): 96-99.
- [25] ZHAO J, HU Q, GUO Q-Y, *et al.* Effects of factors, and bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus culture of *Catharanthus roseus* [J]. Microbiol Biotechnol, 2001, 55(6): 693-698.
- [26] FETNETO A G, MELANSON S J, NICHOLSON S A. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino feed to cell cultures of *Taxus cuspidate* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44(8): 967-971
- [27] CANEL C, LOPES-CARDOSO M I, WHITMER S, *et al.* Effects of overexpression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus* [J]. Planta, 1998, 205(3): 414-419
- [28] GEERLINGSA, HALLARDD, MARTINEZCABALLERO A, *et al.* Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* 'Ledgeriana' hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus* [J]. Plant Cell Rep., 1999, 19: 191-196.
- [29] YAMAMURAY, OGIHARA, MIZUKAMIH. Cinnamic acid 4-hydroxylase from *Lithospermum erythrorhizon*: cDNA cloning and gene expression [J]. Plant Cell Rep, 2001, 20: 655-662.
- [30] YAMAMOTO H, INOUE K, LI S M, *et al.* Geranyl hydroquinone 3'-hydroxylase, a cytochrome P-450 monooxygenase from *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures [J]. Planta, 2000, 210: 312-317.
- [31] ROUTIEN J B, NICKEL L G. Culturation of plant tissue [P]. US, US Patent 2, 747, 334, 1952.

(本文责编: 陈珩)