

廖斌, 徐小萍, 李珊珊, 梁梓豪, 李汉生, 林玉玲, 赖钟雄. 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯对龙眼胚性悬浮细胞柯里拉京积累的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26 (2): 287-293

Liao B, Xu XP, Li SS, Liang ZH, Li HS, Lin YL, Lai ZX. Effects of phenylalanine and methyl jasmonate on the growth and corilagin accumulation of embryogenic suspension cells in *Dimocarpus longan* Lour. [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2020, 26 (2): 287-293

苯丙氨酸和茉莉酸甲酯对龙眼胚性悬浮细胞柯里拉京积累的影响

廖斌 徐小萍 李珊珊 梁梓豪 李汉生 林玉玲 赖钟雄✉

福建农林大学园艺植物生物工程研究所 福州 35002

摘要 基于龙眼胚性悬浮细胞体系的建立, 研究苯丙氨酸(Phe)和茉莉酸甲酯(MeJA)不同添加浓度处理对龙眼胚性悬浮细胞生长和柯里拉京积累的影响. 在龙眼细胞培养第6天添加苯丙氨酸和茉莉酸甲酯不同浓度处理, 测定龙眼细胞干重、柯里拉京含量、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和多酚氧化酶(PPO)活性, 并利用qPCR技术分析柯里拉京合成相关基因*DIDFR*、*DILAR*和*DIANR*的表达模式. 结果显示, 适宜浓度的苯丙氨酸和茉莉酸甲酯能促进龙眼胚性悬浮细胞的生长和柯里拉京的积累, 最适添加浓度分别为20 mg/L和50 μ mol/L, 与对照组相比, 柯里拉京含量分别提高了1.9倍、2.9倍, 产量分别提高了4.9倍、6.8倍; 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯能诱导PAL和PPO活性提高, 并可能通过诱导柯里拉京生物合成途径上*DIDFR*、*DILAR*、*DIANR*基因表达下调, 进而调控龙眼胚性悬浮细胞中柯里拉京的合成与积累. 本研究表明适宜浓度的苯丙氨酸和茉莉酸甲酯可诱导PAL和PPO活性提高, 有效促进龙眼胚性悬浮细胞中柯里拉京含量的积累, 结果可为今后龙眼细胞大规模培养工业化生产柯里拉京提供科学依据和理论指导. (图4 表1 参46)

关键词 龙眼; 胚性悬浮细胞; 苯丙氨酸; 茉莉酸甲酯; 柯里拉京

Effects of phenylalanine and methyl jasmonate on the growth and corilagin accumulation of embryogenic suspension cells in *Dimocarpus longan* Lour.

LIAO Bin, XU Xiaoping, LI Shanshan, LIANG Zihao, LI Hansheng, LIN Yuling & LAI Zhongxiong✉

Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract The effects of different concentrations of phenylalanine (Phe) and methyl jasmonate (MeJA) on the growth and corilagin accumulation of embryogenic suspension cells in longan were examined in this study. Based on the establishment of an embryonic suspension culture system, the longan cells were treated with different concentrations of Phe and MeJA on the 6th day of the suspension culture, after which the dry weight of longan cells, corilagin content, and phenylalanine lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO) activity were determined. The expression patterns of the genes related to corilagin synthesis *DIDFR*, *DILAR*, and *DIANR* were analyzed using real-time polymerase chain reaction. The results showed that appropriate Phe and MeJA concentrations promoted the growth of embryogenic suspension cells of longan and corilagin accumulation, with the optimum concentrations being 20 mg/L and 50 μ mol/L, respectively. Compared with the control group, the corilagin content was increased by 1.9 times and 2.9 times, and production was increased by 4.9 times and 6.8 times, respectively. Furthermore, higher PAL and PPO activities were induced by Phe and MeJA, and the synthesis and accumulation of corilagin in longan cells were regulated by the downregulated expression of *DIDFR*, *DILAR*, and *DIANR* genes in the corilagin biosynthesis pathway. In conclusion, appropriate concentrations of Phe and MeJA increased PAL and PPO activities, and effectively promoted the accumulation of corilagin, which provide a scientific basis and theoretical guidance for the large-scale cultivation of longan cells and industrialized production of corilagin.

Keywords *Dimocarpus longan* Lour.; embryogenic suspension cell; phenylalanine; methyl jasmonate; corilagin

收稿日期 Received: 2019-06-02 接受日期 Accepted: 2019-07-29

国家自然科学基金项目(31572088)、国家级大学生创新创业训练项目(201710389019)、福建省重大科技专项专题(2015NZ0002-1)和科技创新专项基金(CXZX2017189)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31572088), the National College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (201710389019), the Key Science and Technology Special Project of Fujian Province (2015NZ0002-1), and the Science and Technology Innovation Special Fund (CXZX2017189)

✉通讯作者 Corresponding author (E-mail: Laizx01@163.com)

龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 又名桂圆、益智, 属无患子科 (*Sapindaceae*) 龙眼属 (*Dimocarpus*) 常绿乔木果树, 是我国华南四大珍果之一, 同时也是我国极为名贵的传统中药材, 素有“果中圣品”和“南方人参”之美誉。龙眼是药食兼用的滋补圣品, 《神农本草经》最早记载了龙眼益气养血、健脾补心的药用功效, 诸多研究也表明龙眼富含类黄酮、类胡萝卜素、柯里拉京、鞣花酸等多种药用成分^[1-3]。柯里拉京 (*Corilagin*, β -1-O-galloyl-3,6-R-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose) 是一种水溶性逆没食子酸鞣质, 属于天然多酚单宁酸类化合物^[4], 它主要存在于龙眼果核、果皮和花中^[5-6]。药理研究表明, 柯里拉京具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗菌、降血糖、保肝等多种生物活性^[7-9], 且毒副作用低^[10], 极具开发潜力和市场前景, 但传统以龙眼栽培资源提取柯里拉京存在生产周期长、大小年产量不稳、易受病虫害影响等因素限制^[11], 无法从根本上解决柯里拉京供需矛盾问题, 而龙眼胚性悬浮细胞具有增殖速率快、生长能力强、体胚发生频率高等优点^[12], 并可通过生物反应器进行大规模培养生产柯里拉京^[13]。

植物细胞培养技术为大量生产药用次生代谢产物开辟了新途径^[14], 前人通过筛选高产细胞系^[15]、优化培养条件^[16]和培养技术^[17]等方法来提高目标代谢产物的合成, 其中前体饲喂和诱导子是刺激目标代谢产物合成的最为有效的途径之一^[18]。苯丙氨酸 (*Phenylalanine*, Phe) 是一个代谢中间体, 它能为类黄酮、木质素、生物碱等次生代谢产物的生物合成提供重要前体, 同时还能作为碳源并通过参与蛋白质合成来调控植物的生长发育^[19]。Liu等研究发现在肉苁蓉悬浮细胞培养初期添加100 mg/L的苯丙氨酸能显著提高肉苁蓉中苯乙醇苷 *PeGs* 活性成分的合成与积累^[20], 同样在水母雪莲^[21]、银杏^[22]和甘草^[23]悬浮培养液中添加苯丙氨酸后黄酮产量均有明显提高。茉莉酸甲酯 (*Methyl jasmonate*, MeJA) 是一种外源非生物诱导子, 它可通过参与细胞信号转导高效作用于下游靶位点, 诱导植物体产生抵抗外界胁迫的防御反应, 改变细胞代谢过程中相关酶的活力并特定活化防御基因的表达进而促进次生代谢产物的合成^[24-25]。Wang在贯叶金丝桃悬浮细胞培养研究发现100 μ mol/L茉莉酸甲酯能通过降低过氧化氢酶 (CAT) 活性并提高苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 和多酚氧化酶 (PPO) 活性, 从而显著提高金丝桃苷和槲皮素的生物合成^[26]。刘冉研究发现茉莉酸甲酯能快速诱发红松产生抗氧化防御反应, 特定诱导红松多酚代谢合成途径中关键功能基因 *CHS*、*ANR*、*LAR* 上调表达, 进而促进多酚和原花青素的生物合成^[27]。

在单宁生物合成途径中, PAL是连接初级代谢和苯丙烷代谢的关键酶, 它能催化苯丙氨酸生成反式肉桂酸, 为苯丙烷代谢途径及下游分支途径提供更多的前体^[28]。柯里拉京作为单宁家族的新成员, 主要经过上游莽草酸途径、苯丙烷途径和类黄酮-花青素途径, 进入单宁代谢合成途径。其中, 二氢黄酮醇4-还原酶 (*Dihydroflavonol 4-reductase*, DFR) 是类黄酮代谢途径引向单宁代谢途径的第一个限速酶, 它能将二氢黄酮醇催化形成无色花色素^[29], 同时它将单宁下游代谢途径分为两条分支: 一条在无花色素还原酶 (*Leucoanthoeyanidin reductase*, LAR) 催化下无色花青素生成2,3-反式黄烷-3-醇, 另一条则是先在花色素合成酶 *ANS* 脱水作用形成各种花色素, 再由花色素还原酶 (*Anthocyanidin reductase*, ANR) 催化生成2,3-顺式黄烷-3-醇, 这两条分支生成的单体均可聚合形成单宁 (柯里拉京)^[30]。Lin首次破译龙眼基因组时研究发现龙眼果实富含酚类物质及抗性强机制, 这与 *F3'H*、*ANR*、*LAR* 等26个结构基因的组织特异性表达密切相关^[31]。目前国

内外研究大多集中于柯里拉京的分离纯化、含量测定及药理作用, 通过外源添加苯丙氨酸和茉莉酸甲酯来促进柯里拉京的合成与积累尚未研究报道。鉴于此, 本研究探讨了不同浓度的苯丙氨酸和茉莉酸甲酯处理对龙眼胚性悬浮细胞生长、柯里拉京积累以及代谢合成途径上相关酶PAL和PPO的影响, 并利用qPCR技术分析柯里拉京合成相关基因 *DIDFR*、*DILAR* 和 *DIANR* 的表达模式, 以期今后利用龙眼细胞大规模培养工业化生产柯里拉京提供科学依据和理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验以长期继代保存于福建农林大学园艺植物工程所的龙眼‘红核子’品种 *Dimocarpus longan* Lour. 胚性愈伤组织 (L2细胞系) 为起始材料, 选取生长良好的胚性愈伤组织接种于固体培养基 (MS + 20 g/L蔗糖 + 7 g/L琼脂 + 0.5 mg/L KT + 5 mg/L AgNO₃), 黑暗无菌培养20 d。

1.2 仪器与药剂

美国Water超高效液相质谱联用仪 (UPLC-MS); KQ-600KDE型高功率数控超声波清洗器; 紫外分光光度计; 微量分光光度计 (Thermo Electron Corp, 美国); 荧光定量PCR扩增仪罗氏LightCycler480; 高速冷冻离心机; 柯里拉京标准样品 (上海源叶公司, Lot 23094-69-1), 纯度 $\geq 98\%$; 苯丙氨酸 (Sigma公司)、茉莉酸甲酯 (Solarbio公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 龙眼胚性悬浮细胞的获得 参照赖钟雄等的方法^[12]获得龙眼胚性悬浮细胞: 龙眼胚性愈伤组织继代增殖培养20 d后, 称取2 g松散、浅黄的胚性愈伤组织转接到液体培养基 (MS + 20 g/L蔗糖 + 1.0 mg/L 2,4-D), 接种密度40 g/L FW, 培养温度 (25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 摇床转速设为120 r/min, 黑暗悬浮振荡培养10 d。试验所用到的培养基均在接种前pH先调至5.8, 121 $^{\circ}$ C高压蒸汽灭菌20 min。

1.3.2 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯处理 苯丙氨酸以无菌水加热溶解, 茉莉酸甲酯以无水乙醇溶解稀释, 经0.22 μ m无菌滤膜进行过滤除菌, 在龙眼细胞悬浮培养第6天 (即对数期晚期进入稳定期前) 向液体培养基添加不同浓度的苯丙氨酸 (0、5、10、20、40 mg/L) 和茉莉酸甲酯 (0、25、50、75、100 μ mol/L) 处理, 共培养4 d后 (即培养第10天) 收获龙眼胚性悬浮细胞。试验每个浓度处理均设4-6瓶重复, 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯均以添加浓度为0的处理组作为对照。

1.3.3 龙眼胚性悬浮细胞生长量测定 过滤收集龙眼胚性悬浮细胞, 双蒸水冲洗4-5次, 将残留在瓶内的龙眼细胞全部滤出, 再用滤纸吸干细胞表面的水分, 测定并记录为龙眼细胞鲜重 (FW), 真空冷冻干燥48 h后称其质量记为龙眼细胞干重 (DW)。

1.3.4 PAL和PPO活性测定 准确称取0.2 g龙眼细胞鲜重样品置于液氮提前预冷的研钵中, 随后立即加入1 mL提取液, 在冰浴环境下液氮迅速研磨匀浆, 转移至1.5 mL离心管, 于4 $^{\circ}$ C低温8 000 r/min离心10 min, 取出上清液, 按照PAL和PPO试剂盒说明书 (苏州科铭公司) 进行加样, 充分混匀后采用紫外分光光度计在290 nm和525 nm处测定吸光值 (A), PAL和PPO活性 ($U/g \text{ min}^{-1}$, FW) 计算公示如下:

$$\text{PAL活性} = A_{290} \times V_{\text{Tot}} \div (m \times V_1 \div V_2) \div 0.1 \div t$$

$$\text{PPO活性} = A_{525} \times V_{\text{Tot}} \div (m \times V_1 \div V_2) \div 0.1 \div t$$

其中 V_{Tot} 代表反应体系总体积 (mL), V_1 代表所加入的

样本液体积， V_2 代表所加入的提取液体积， m 代表样本鲜重(g)， t 代表反应时间(min)。

1.3.5 柯里拉京的提取与含量测定 参考前文^[32]并适当优化：称取龙眼细胞干重样品0.15 g，加入2.25 mL 70%乙醇，震荡30 s，室温浸泡30 min，45 ℃超声波辅助提取60 min，于7 000 r/min室温离心10 min，上清液取出后稀释10倍，过0.22 μm滤膜进样待测；准确称取2 mg柯里拉京标准样品，加50%色谱甲醇溶解定容于2 mL离心管，充分摇匀后即配成1 mg/mL的标准样品溶液，进样前采用色谱甲醇依次稀释成0.5、0.2、0.1、0.01、0.001 mg/mL，以标准样品浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线，计算出线性回归方程及相关系数($Y = 1E + 07x + 3590.2$, $R^2 = 0.9998$)；UPLC测定柯里拉京含量的色谱条件：以ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)为色谱分离柱，以0.1%甲酸水-乙腈为流动相进行梯度洗脱(乙腈：0-1 min, 0-5%；1-3 min, 5%-13%；3-6 min, 13%-25%；6-8 min, 14%；8-10, 5%)，流速0.2 mL/min，进样量2 μL，检测波长为265 nm，柱温30 ℃。

1.3.6 基因表达定量分析 利用DNAMAN 6.0软件进行引物设计(表1)，引物由上海尚亚生物技术有限公司合成。采用TriPure (Roche)试剂盒进行龙眼悬浮细胞总RNA提取，RNA浓度和纯度经超微量分光光度计检验合格后，采用Primerscript™ RT Reagent Kit (TaKaRa)将其逆转录合成cDNA用于qPCR分析。参考Lin的方法^[33]并适当改良，以UBQ、EF-1a和ACTB作为内参基因，将不同浓度处理的样品cDNA模板混样进行5倍梯度系列稀释制作标曲，通过Roche LightCycler480荧光定量PCR仪检测柯里拉京合成相关基因DIDFR、DIANR、DILAR的表达情况。qPCR反应体系(20 μL)：SYBR 10 μL，上下游引物各0.8 μL，cDNA 1 μL(稀释10倍)，加ddH₂O补足至20 μL。qPCR反应程序：95 ℃预变性30 s，95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，40个循环。采用2^{-ΔΔC_t}法计算出DIDFR、DILAR、DIANR基因的相对表达量。

1.4 数据处理与分析

每个处理均设3个生物学重复，采用Excel 2016和SPSS 22.0进行数理统计和显著性分析，运用GraphPad Prism 6.0

软件制作图表。

2 结果与分析

2.1 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯对龙眼胚性悬浮细胞生长的影响

随苯丙氨酸和茉莉酸甲酯添加浓度的升高，龙眼细胞干重均呈现先升后降的变化趋势(图1)。苯丙氨酸添加浓度为20 mg/L时，细胞干重达到最大值0.47 g，显著高于对照组($P < 0.05$)，当添加浓度增大至40 mg/L，细胞干重降低至0.24 g，与对照组差异不显著($P < 0.05$)；茉莉酸甲酯处理则在添加浓度为50 μmol/L，细胞干重达到最大值0.45 g，显著高于对照组($P < 0.05$)，当添加浓度增大至75 μmol/L，细胞干重开始出现下降，100 μmol/L降到最低，显著低于对照组($P < 0.05$)。由此可见，20 mg/L的苯丙氨酸和50 μmol/L的茉莉酸甲酯最有利于龙眼胚性悬浮细胞生长，添加浓度过高会抑制龙眼胚性悬浮细胞的生长。

2.2 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯对龙眼胚性悬浮细胞柯里拉京含量和产量的影响

龙眼胚性悬浮细胞在苯丙氨酸不同浓度诱导4 d后，柯里拉京含量随添加浓度的提高而逐步上升，产量却出现先升后降(图2)。苯丙氨酸低浓度5 mg/L处理对柯里拉京含量和产量均无明显促进作用，在中高浓度(10-40 mg/L)范围内显著促进柯里拉京含量的积累，添加浓度为20 mg/L柯里拉京含量尚未达到最大，但产量达到最大 5.29 ± 0.58 mg，是对照组的4.9倍；在茉莉酸甲酯处理中，柯里拉京含量随添加浓度的升高呈先升后降再升的变化趋势，产量则呈先升后降。茉莉酸甲酯不同浓度处理下柯里拉京含量和产量均显著高于对照组水平($P < 0.05$)，添加浓度为50 μmol/L柯里拉京含量和产量均达到最大，与对照组相比含量提高了2.9倍，产量比对照提高了6.9倍，由此可见，苯丙氨酸和茉莉酸甲酯均能显著促进柯里拉京的合成与积累，最适添加浓度分别为20 mg/L和50 μmol/L。

2.3 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯对龙眼胚性悬浮细胞PAL和PPO活性的影响

在苯丙氨酸不同添加浓度处理下，龙眼胚性悬浮细胞

表 1 柯里拉京合成相关基因qPCR引物序列
Table 1 Primers for qPCR analysis of corilagin synthesis-related genes

基因名称 Gene	上游序列 Upstream sequence	下游序列 Downstream sequence	退火温度 (θ/℃)
UBQ	GCCGACTACAACATCCAGAAG	GCTTGGTGTAGGTCTTCTTCTT	60
EF-1a	GATGATTCCCACCAAGCCCAT	GGGTCTTCTTCTCAACACTCT	60
ACTB	TGCTATCCTTCGTTTGGACC	CGGACGATTCCCGTTTCAG	60
DFR	CTTATTGAGAGAGGGATAGAGCG	TCTATCCTCTGGCTTGTGGTCA	60
LAR	CGAGCTTGCTTCTCTGTGG	CATCAGGGTACAGATTGGTCAC	60
ANR	ACCAACTACACACGCGGTC	ACGTGCCACCTTCTTCTT	60

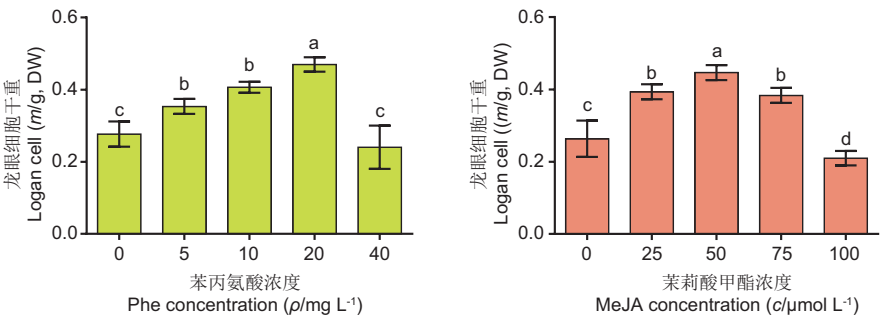


图1 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯不同浓度对龙眼细胞干重的影响。
Fig. 1 Effect of different Phe and MeJA concentrations on the DW of longan cells.

PAL活性先升后降变化, PPO则与PAL活性变化相反(图3)。苯丙氨酸低浓度处理下PAL活性迅速升高, 但与对照组差异不显著($P < 0.05$), 中高浓度处理下PAL活性继续升高并显著高于对照组($P < 0.05$)。PPO活性则在低浓度处理下最低, 若继续增大添加浓度, PPO活性也随之升高; 而在茉莉酸甲酯不同浓度处理下, PAL和PPO活性均显著高于对照组($P < 0.05$)。中低浓度(25-50 $\mu\text{mol/L}$)范围内茉莉酸甲酯诱导PAL活性快速上升, 当添加浓度达到50 $\mu\text{mol/L}$, PAL活性达到最大7.35 U/g FW , 是对照组的2.18倍, 高浓度诱导下PAL活性反而出现下降。PPO活性则在25-75 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈先降后升趋势, 若添加浓度增大至高浓度100 $\mu\text{mol/L}$ 时, PPO活性最强。由此可见, 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯能诱导PAL和PPO活性升高, 从而显著促进龙眼胚性悬浮细胞中柯里拉京含量的积累与合成。

2.4 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯对柯里拉京合成相关基因表达的影响

苯丙氨酸和茉莉酸甲酯不同浓度处理4 d后, 龙眼胚性悬浮细胞中柯里拉京合成相关基因表达情况如图4所示, 在苯丙氨酸不同浓度诱导下, *DIDFR*、*DILAR*、*DIANR*基因的表达量均呈先降后升的变化趋势, 在5-40 mg/L 浓度范围内*DIDFR*和*DIANR*基因均随着添加浓度的升高而表达上调, 当添加浓度达到40 mg/L 时, *DIDFR*基因的表达量升高至对照组水平, *DIANR*基因的表达量有所上升但仍显著低于对照组($P < 0.05$), *DILAR*基因表达量则在低浓度5 mg/L 时就达到较高水平, 但均显著低于对照组; 茉莉酸甲酯不同浓度诱导下, *DIDFR*和*DILAR*基因的表达量均呈先降后升再降的变化趋势, *DIANR*基因的表达量则呈先降后升变化, 在25-100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, *DIDFR*和*DILAR*基因的表达量在添加浓度为75 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大, *DIANR*则在添加浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大, 但*DIDFR*、*DILAR*、*DIANR* 3个基因的表达量均显著低于对照组($P < 0.05$)。由此可见, 在苯丙氨酸和茉莉酸甲酯不同浓度诱导下, *DIDFR*、*DILAR*和*DIANR*基因的相对表达量

基本都显著低于对照组($P < 0.05$), 推测苯丙氨酸和茉莉酸甲酯可能通过诱导*DIDFR*、*DILAR*、*DIANR*基因表达下调进而影响柯里拉京的合成与积累。

3 讨论与结论

3.1 适宜浓度的苯丙氨酸和茉莉酸甲酯利于龙眼胚性悬浮细胞生长及柯里拉京积累

植物细胞悬浮培养过程中, 前体和诱导子的添加已成为调节植物细胞生长发育及目标代谢产物合成与积累的重要有效手段, 但常因添加种类、添加浓度和添加时间产生不同的诱导效果^[34], 其中添加不同浓度的前体和诱导子的作用效果最为明显, Ali等研究表明茉莉酸甲酯浓度的升高会抑制对苦艾悬浮细胞的生长, 但却能显著提高苦艾悬浮细胞中酚类和黄酮类物质的积累^[35], 本研究结果表明添加适宜浓度的苯丙氨酸和茉莉酸甲酯对龙眼胚性悬浮细胞生长及柯里拉京的生物合成均有明显促进作用, 最佳添加浓度分别为20 mg/L 和50 $\mu\text{mol/L}$, 添加浓度过高会抑制龙眼胚性悬浮细胞的生长, 不利于柯里拉京产量的提高, 这与黄芩^[36]和胀果甘草^[37]悬浮细胞研究结果较为一致, 李晓东等研究认为苯丙氨酸是植物生长必需的氨基酸, 它能作为碳源并通过参与蛋白质的合成来影响植物的生长发育^[38], 本研究中外源添加苯丙氨酸能有效促进龙眼胚性悬浮细胞的生长, 同时它还能作为次生代谢产物柯里拉京的代谢合成提供重要前体, 有效提高柯里拉京的合成与积累。Rohan等研究发现茉莉酸甲酯会干扰红豆杉悬浮细胞的分裂周期, 抑制G1期向S期过渡^[39], 推测茉莉酸甲酯高浓度处理可能会对龙眼细胞产生毒害作用, 影响龙眼胚性悬浮细胞的正常分裂活动。与此同时, 茉莉酸甲酯作为植物防御系统的内源信号分子, 它能在转录水平上调节相关酶基因*DIDFR*、*DILAR*、*DIANR*的表达, 调节龙眼细胞内次生代谢产物合成途径中相关酶活性, 引起合成代谢途径中反应速率和代谢通量发生改变, 从而调控次生代谢产物柯里拉京的合成

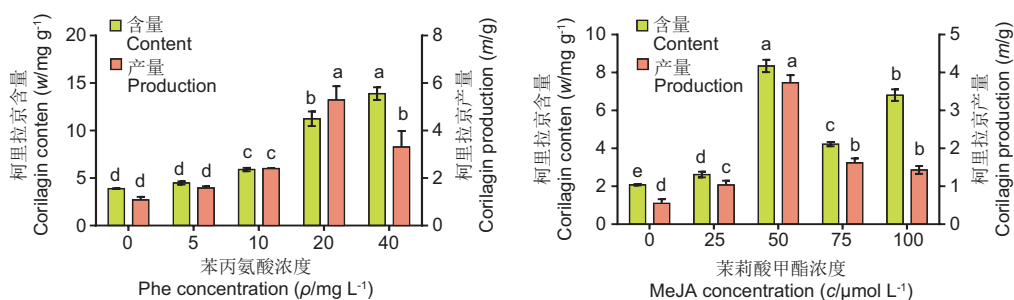


图2 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯不同浓度对龙眼胚性悬浮细胞柯里拉京含量和产量的影响。

Fig. 2 Effect of different Phe and MeJA concentrations on corilagin content and production in embryonic suspension cells of longan.

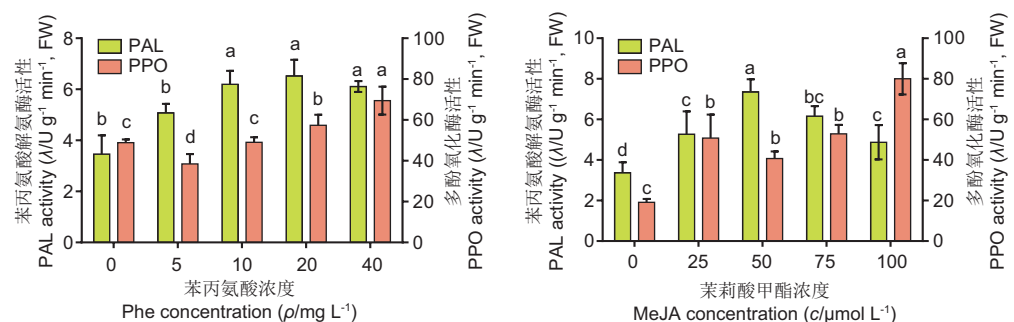


图3 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯不同浓度对龙眼胚性悬浮细胞PAL和PPO活性的影响。

Fig. 3 Effect of different Phe and MeJA concentrations on PAL and PPO activity in embryonic suspension cells of longan.

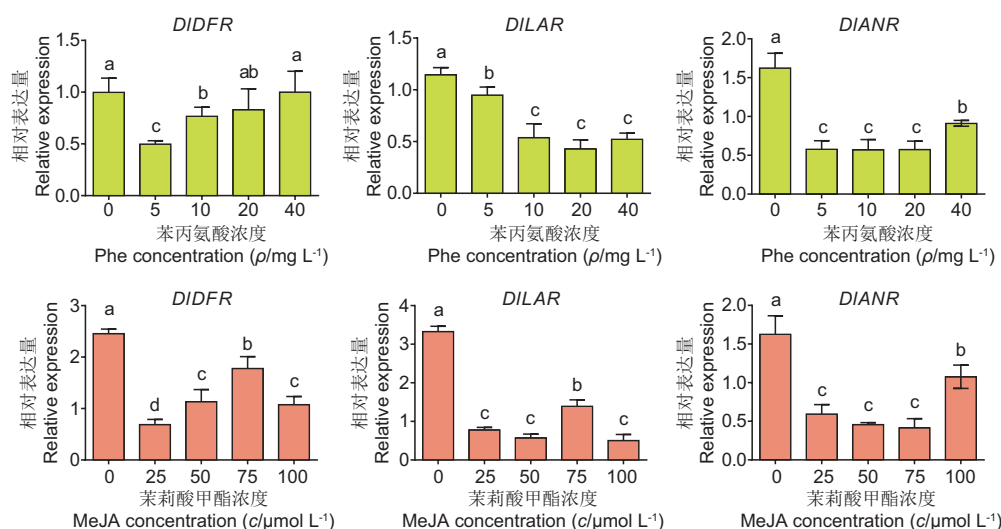


图4 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯不同浓度对柯里拉京合成相关基因表达的影响。

Fig. 4 Effect on different Phe and MeJA concentrations on the expression of corilagin synthesis related genes in embryonic suspension cells of longan.

与积累。植物细胞对前体和诱导子的反应灵敏度与其所处生阶段密切相关,杨静等研究认为黄芪悬浮细胞在对数生长期接受信号能力最强,此时添加前体与诱导子最有利于黄芪多糖代谢产物的合成^[19, 36],贺梦真等研究表明龙眼胚性细胞悬浮培养至第6天(即对数生长期)添加诱导子最有利于龙眼细胞生长及次级代谢产物的积累,诱导子过早加入会对处于生长初期的龙眼细胞产生代谢损伤,而过晚加入龙眼细胞进入生长末期,培养液中的营养物质大量消耗且有害物质大量积累致使细胞代谢活动减弱^[40],本研究仅在龙眼胚性悬浮细胞对数生长期即第6天添加苯丙氨酸和茉莉酸甲酯不同浓度处理,其他的最佳添加时间对龙眼胚性悬浮细胞生长及柯里拉京积累的影响还有待进一步深入研究。另外也有研究表明前体与诱导子之间还存在协同效应,曲均革等在葡萄细胞培养中研究认为发现茉莉酸甲酯与苯丙氨酸协同添加花青素含量提高了2.7倍,远高于单独加入时的生物合成量^[41],在肉苁蓉^[20]和红松^[27]细胞培养中均有类似发现,而本次试验仅仅考虑了苯丙氨酸和茉莉酸甲酯单独添加的效果,两者联合使用对龙眼胚性悬浮细胞生长及柯里拉京合成的诱导效果有待进一步深入研究。

3.2 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯能诱导柯里拉京合成相关酶PAL和PPO活性提高

在植物细胞培养过程中,加入特定的前体可作为底物或催化代谢途径上关键酶从而刺激目标代谢产物的合成^[14]。PAL是连接初级代谢和苯丙烷代谢的关键酶,同时也是柯里拉京进入苯丙烷代谢途径上的第一个限速酶,它能将苯丙氨酸催化生成反式肉桂酸,可为苯丙烷代谢途径及下游分支途径提供更多的前体^[42]。本研究发现在培养体系添加苯丙氨酸能诱导PAL活性升高,这表明苯丙氨酸是柯里拉京生物合成的重要前体,它能作为底物促进代谢途径上关键酶PAL活性提高,从而显著提高目标代谢产物柯里拉京的合成。同样,茉莉酸甲酯不同浓度诱导下PAL活性也有明显提高,不同点在于茉莉酸甲酯在低浓度诱导下PAL活性就明显高于对照组,刘冉等研究认为前体饲喂需达到一定浓度后才能发挥作用,而诱导子的响应速度比前体物质快,这可能是由于茉莉酸甲酯作为第二信使,它可将外界胁迫信号迅速传递给植物细胞,快速激活植物的防御反应,特定诱导代谢途径中相关酶活性提高,从而显著促进次级代谢产物柯里拉京的合成^[27]。PPO

与植物产生酶促褐变密切相关,当受到外界逆境胁迫或刺激时植物细胞PPO活性迅速升高,催化底物邻苯二酚生成醌类物质引起褐变产生^[42]。本研究中苯丙氨酸和茉莉酸甲酯添加浓度增大到40 mg/L和100 μmol/L时,PPO活性上升至最大,此时柯里拉京含量仍有呈上升趋势,但产量却大幅度降低,这是因为苯丙氨酸和茉莉酸甲酯的加入会造成大量有害物质累积,致使龙眼细胞产生褐变,影响细胞的生长与分化,严重时甚至导致死亡。

3.3 苯丙氨酸和茉莉酸甲酯可能通过诱导DIDFR、DILAR、DIANR基因表达下调影响柯里拉京积累

苯丙氨酸和茉莉酸甲酯可诱导目标产物代谢合成途径中关键基因的表达,从而调控植物的生长发育及次级代谢产物的合成,如刘生财等在苜蓿悬浮细胞中研究发现茉莉酸甲酯能诱导类黄酮合成相关基因(PAL、F3H、CHI、CHS)和类胡萝卜素合成相关基因(PDS、PSY、ZDS)表达上调,进而显著增加类黄酮和类胡萝卜素的生物合成量^[43],而本研究结果表明苯丙氨酸和茉莉酸甲酯不同浓度诱导下,柯里拉京含量基本显著高于对照组,但柯里拉京合成相关基因(DIDFR、DILAR、DIANR)的表达量基本都显著低于对照组,推测苯丙氨酸和茉莉酸甲酯可能通过诱导柯里拉京合成相关基因DIDFR、DILAR、DIANR表达下调,进而影响柯里拉京的合成与积累。柯里拉京作为龙眼单宁家族的新成员,其生物合成途径涉及莽草酸途径、苯丙烷途径、类黄酮-花青素途径、原花青素等途径,这些代谢途径相互重叠与交叉构成了柯里拉京代谢调控的复杂网络^[27]。前人研究表明终端产物可通过反馈抑制作用调节相关酶活性及酶基因的表达,从而调节细胞内代谢速率^[44],由此可推测柯里拉京的大量合成会对生物合成途径中DIDFR、DILAR、DIANR基因的表达产生反馈抑制作用;其次,崔彤彤等采用不同浓度SA处理龙眼胚性愈伤组织也研究发现类胡萝卜素合成相关基因GGPS、PSY、PDS、ZDS基因的表达量都低于对照组,进一步分析表明SA不同浓度处理虽尚未诱导类胡萝卜素合成相关基因表达上调,但它可通过诱导GGPS、PSY、PDS、ZDS基因家族内部成员表达上调,显著促进类胡萝卜素的合成与积累^[45],同样在龙眼胚性悬浮细胞中苯丙氨酸和茉莉酸甲酯也可能通过诱导柯里拉京生物合成途径中DIDFR、DILAR、DIANR基因家族内部某一成

员或多个成员表达上调,从而促进柯里拉京的合成与积累。此外,苯丙氨酸和茉莉酸甲酯的诱导效果与诱导时间的长短密切相关^[42],梁晓薇等研究发现用浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 的茉莉酸甲酯喷施甘草叶片,短时间2-6 h内甘草酸关键酶基因*GubAS*、*GubAO*表达上调,但随着诱导时间的延长,*GubAS*和*GubAO*基因表达逐步降低至诱导前水平^[46],而本试验是在苯丙氨酸和茉莉酸甲酯诱导4 d后进行基因表达分析,诱导时间过长也

可能导致*DIDFR*、*DILAR*、*DIANR*基因出现下调表达。

综上所述,本研究探讨了苯丙氨酸和茉莉酸甲酯不同浓度对龙眼胚性悬浮细胞生长、柯里拉京积累以及代谢合成途径中PAL和PPO的影响,并利用qPCR技术对柯里拉京合成相关基因*DIDFR*、*DILAR*、*DIANR*的表达模式进行分析,以期为今后利用龙眼胚性悬浮细胞大规模培养工业化生产柯里拉京提供科学依据和理论指导。

参考文献 [References]

- Sudjaroen Y, Hull WE, Erben G, Wuertele G, Changbumrung S, Ulrich CM, Owen, Robert W. Isolation and characterization of ellagitannins as the major polyphenolic components of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seeds [J]. *Phytochemistry*, 2012, **77**: 226-237
- Rangkadilok N, Worasuttayangkurn L, Bennett RN, Satayavivad J. Identification and quantification of polyphenolic compounds in longan (*Euphoria longana* Lam.) fruit [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, **53** (5): 1387-1392
- Li LY, Xu JL, Mu Y, Han L, Liu RH, Cai YP, Huang XS. Chemical characterization and anti-hyperglycaemic effects of polyphenol enriched longan (*Dimocarpus longan* Lour.) pericarp extracts [J]. *J Funct Food*, 2015, **13**: 314-322
- Zhang SF, Ming YL, Lin Y, Chen LH, Tong QX. Research progress on corilagin of *Phyllanthus* [J]. *Subtrop Plant Sci*, 2010, **39** (4): 79-83
- Bai XL, Pan R, Li MZ, Li XT, Zhang HW. HPLC profile of longan (cv. *Shixia*) pericarp-sourced phenolics and their antioxidant and cytotoxic effects [J]. *Molecules*, 2019, **24** (3): 619-627
- Li N, Lin ZC, Chen W, Zheng Y, Ming YL, Zheng ZZ, Huang W, Chen LH, Xiao JB, Lin HT. Corilagin from longan seed: identification, quantification, and synergistic cytotoxicity on SKOV3ip and hey cells with ginsenoside Rh2 and 5-fluorouracil [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, **119**: 133-140
- Chen YY, Chen CH. Advances in the pharmacological activity research on Corilagin [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2010, **27** (5): 390-394
- Jia LQ, Zhou JY, Zhao HB, Jin HY, Lu MZ, Zhao NQ. Corilagin sensitizes epithelial ovarian cancer to chemotherapy by inhibiting Snail-glycolysis pathways [J]. *Oncol Rep*, 2017, **38** (4): 2464
- Nandini HS, Naik PR. Action of corilagin on hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Chem-BiolInteract*, 2019, **299**: 186-193
- Xu JJ, Zhang GY, Tong YP, Yuan JH, Li YY, Gang S. Corilagin induces apoptosis, autophagy and ROS generation in gastric cancer cells *in vitro* [J]. *Int J Mol Med*, 2019, **43** (2): 967-979
- Zhang S, Lin HT, Lin MS, Lin YF, Chen YH, Wang H, Lin YX, Shi J. *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. reduced energy status and ATPase activity and its relation to disease development and pericarp browning of harvested longan fruit [J]. *Food Chem*, 2018, **275**: 239-245
- 赖钟雄, 陈振光. 龙眼胚性细胞悬浮培养再生植株[J]. 应用与环境生物学报, 2002, **8** (5): 485-491 [Lai ZX, Chen ZG. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions VIA somatic embryogenesis of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2002, **8** (5): 485-491]
- 廖斌, 李汉生, 徐小萍, 董浩, 吴宇函, 梁梓豪, 李珊珊, 屈蒙蒙, 林玉玲, 赖钟雄. 不同光照条件对龙眼胚性悬浮细胞培养及柯里拉京合成的影响[J]. 福建农业学报, 2019, **34** (1): 27-34 [Liao B, Li HS, Xu XP, Dong H, Wu YH, Liang ZH, Li SS, Qu MM, Lin YL, Lai ZX. Effects of light exposure on cell culture and corilagin synthesis of longan [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2019, **34** (1): 27-34]
- Chen YH, Zhu Y, Zhang X, Qin MJ. Research progress in plant cell suspension culture for production of secondary metabolites [J]. *Chin Wild Plant Resour*, 2016, **35** (3): 41-47
- Pasqua G, Avato P, Monacelli B, Santamaria AR, Argentieri MP. Metabolites in cell suspension cultures, calli and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas [J]. *Plant Sci*, 2003, **165** (5): 977-982
- Li HS, Yao DH, Chen XH, Liu WH, Chen YK, Lin YL, Wang Y, Lai ZX. Effects of blue light on the cultivation of longan cells and flavonoid metabolism [J]. *Chin J Trop Crops*, 2018, **39** (4): 694-701
- Yue X, Zhang W, Deng M. Hyper-production of C-13-labeled trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cell culture by elicitation and in situ adsorption [J]. *Biochem Eng J*, 2011, **53** (3): 292-296
- 谷荣辉, 洪利亚, 龙春林. 植物细胞培养生产次生代谢物的途径[J]. 植物生理学报, 2013, **49** (9): 869-881 [Gu RH, Hong LY, Long CL. The ways of producing secondary metabolites via plant cell culture [J]. *Plant Physiol J*, 2013, **49** (9): 869-881]
- 杨静. 不同前体对黄芪悬浮培养细胞中黄芪多糖积累的影响[J]. 安徽农业科学, 2014, **1** (27): 8954-8956 [Yang J. Effect of different precursors on accumulation of astragalus polysaccharides in the suspension culture cell of *Astragalus membranaceus* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2014, **1** (27): 8954-8956]
- Liu JY, Guo ZG, Zeng ZL. Improved accumulation of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to suspension culture of *Cistanche salsa* [J]. *Biochem Eng J*, 2007, **33** (1): 88-93
- 刘永刚. 雪莲细胞培养及其次生代谢产物黄酮的代谢调控[D]. 北京: 中国农业大学, 2005 [Liu YG. *Saussurea involucreta* cell culture and secondary metabolic regulation of flavonoids [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005]
- 胡燕梅, 韩晓红, 周全. 银杏液体悬浮细胞培养产生黄酮的研究[J]. 江西农业大学学报, 2011, **33** (2): 360-363 [Hu YM, Han XH, Zhou Q. A study on the flavonoids production by *Ginkgo biloba* suspension cell culture [J]. *Acta Agric Univ Jiangxiensis*, 2011, **33** (2): 360-363]
- Guo S, Man S, Gao WY, Liu H, Zhang LM, Xiao PG. Production of flavonoids and polysaccharide by adding elicitor in different

- cellular cultivation processes of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, **35** (3): 679-686
- 24 焦蒙丽. 水杨酸和茉莉酸甲酯对丹参培养细胞迷迭香酸生物合成的诱导作用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012 [Jiao ML. Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on synthesis of rosmarinic acid in the suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza* bung [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012]
- 25 薛璐莎. 前体和真菌诱导子对雷公藤悬浮细胞次生代谢产物合成的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013 [Xue LS. The effects of precursors and fungal elicitors for the secondary metabolites production in *Tripterygium wilfordii* Hook.f. suspension cell cultures [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2013]
- 26 Jing W, Jie Q, Ling YY, Liu YH. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum* [J]. *Bioresour Bioprocess*, 2015, **2** (1): 5-13
- 27 刘冉. 诱导子调控红松细胞合成松多酚机制的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015 [Liu R. The mechanism of pine polyphenols synthesis in *Pinus koraiensis* cell regulated by elicitor [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2015]
- 28 袁丽. 杨树单宁合成关键酶基因LARs和ANR的功能分析[D]. 重庆: 西南大学, 2012 [Yuan L. Functional characterization of key enzyme genes LARs and ANR in *Populus* proanthocyanidin biosynthesis [D]. Chongqing: Southwest University, 2012]
- 29 宿福园. 参与柿单宁代谢的MYB、bHLH及WD40转录因子基因的克隆及分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012 [Su FY. Isolation and characterization of MYB, basic Helix-loop-Helix and WD40 transcription factors genes involve in *Persimmon* proanthocyanidin metabolism [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012]
- 30 贾之春. 外源抗病基因和单宁代谢合成关键酶基因LAR3在毛白杨中协同抗病机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011 [Jia ZC. Collaborative mechanism of genes and endogenous genes LAR3 resistance in *Populus* [D]. Chongqing: Southwest University, 2012]
- 31 Lin YL, Min JM, Lai RL, Wu ZY, Chen YK, Yu LL, Cheng CZ, Lai ZX. Genome-wide sequencing of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) provides insights into molecular basis of its polyphenol-rich characteristics [J]. *Giga Sci*, 2017, **6** (5): 1-14
- 32 廖斌, 李珊珊, 梁梓豪, 徐小萍, 李汉生, 林玉玲, 赖钟雄. 光质对龙眼胚性愈伤组织柯里拉京含量的影响[J]. 亚热带农业研究, 2018, **14** (2): 128-133 [Liao B, Li SS, Liang ZH, Xu XP, Li HS, Lin YL, Lai ZX. Effect of light quality on corilagin content of embryogenic *Dimocarpus longan* Lour. callus tissue [J]. *Subtrop Agric Res*, 2018, **14** (2): 128-133]
- 33 Lin YL, Lai ZX. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree [J]. *Plant Sci*, 2010, **178** (4): 359-365
- 34 Abinaya M, Prabhakaran S, Yoo P, Jeong, BR. Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, **17** (3): 399
- 35 Ali M, Abbasi BH, Ali GS. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2015, **120** (3): 1099-1106
- 36 杨静, 孙皓. 不同诱导子对黄芪悬浮培养细胞中黄芪多糖积累的影响[J]. 安徽农业科学, 2014, **42** (26): 8954-8956 [Yang J, Sun H. Effect of different elicitors on accumulation of astragalus polysaccharides in the suspension culture cell of *Astragalus membranaceus* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2014, **42** (26): 8954-8956]
- 37 杨英, 何峰, 季家兴, 雷晶, 陈雪红, 余龙江. 四种前体对胀果甘草细胞悬浮培养生产甘草黄酮的调控效果评价[J]. 植物科学学报, 2007, **25** (5): 484-489 [Yang Y, He F, Ji JX, Lei J, Chen XH, Yu LJ. The effect of precursor feeding on flavonoids biosynthesis in cell suspension cultures of *Glycyrrhiza inflata* bat [J]. *Plant Sci J*, 2007, **25** (5): 484-489]
- 38 李晓东, 徐世千, 张建国, 鲁朝辉, 于燕. 苯丙氨酸、茉莉酸甲酯对百里香不定芽基础代谢及精油提取率的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, **44** (4): 245-249 [Li XD, Xu SQ, Zhang JG, Lu CH, Yu Y. Effects of phenylalanine and methyl jasmonate on the basic metabolism of *Thymus vulgaris* L. and the extraction rate of essential oil [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2016, **44** (4): 245-249]
- 39 Patil RA, Lenka SK, Normanly J, Walker EL, Roberts SC. Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured *Taxus* cells [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, **33** (9): 1479-1492
- 40 贺梦真, 徐小萍, 张梓浩, 林玉玲, 赖钟雄. 真菌诱导子对龙眼胚性悬浮细胞类黄酮积累的影响[J]. 园艺与种苗, 2017 (5): 29-33 [He MZ, Xu XP, Zhang ZH, Lin YL, Lai ZX. Effects of fungal elicitor on the accumulation of flavonoids of embryogenic suspension cell in *Dimocarpus longan* Lour. [J] *Hortic Seed*, 2017 (5): 29-33]
- 41 曲均革, 虞星炬, 张卫, 金美芳. 前体饲喂、诱导子和光照联合使用对葡萄细胞培养合成花青素的影响[J]. 生物工程学报, 2006, **22** (2): 299-305 [Qu JG, Yu XJ, Zhang W, Jin MF. Significant improved anthocyanins biosynthesis in suspension cultures of *Vitis vinifera* by process intensification [J]. *Chin J Biotechnol*, 2006, **22** (2): 299-305]
- 42 魏欣方, 周斌, 贾景明. 3种前体饲喂对高山红景天悬浮培养细胞中红景天苷的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, **16** (15): 83-86 [Wei XF, Zhou B, Jia JM. Effects of three kinds of precursors on cell growth and salidroside content of *Rhodiola sachafinensis* in cell suspension culture [J]. *Chin J Exp Trad Med Form*, 2010, **16** (15): 83-86]
- 43 刘生财, 潘君飞, 王晓, 赵春丽, 赖钟雄, 张梓浩. MeJA对苋菜悬浮细胞类黄酮和类胡萝卜素累积及其代谢相关基因表达的影响[J]. 应用与生物环境学报, 2019, **25** (5): 1168-1175 [Liu SC, Pan JF, Wang X, Zhao CL, Lai ZX, Zhang ZH. Effects of methyl jasmonate on the contents and related metabolic genes of flavonoids and carotenoids in suspension cells of *Amaranthus tricolor* L. [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2019, **25** (5): 1168-1175]
- 44 Eriksson S, Munchpetersen B, Johansson K, Ecklund H. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, **59** (8): 1327-1346
- 45 崔彤彤. 温度与SA对龙眼培养细胞类黄酮和类胡萝卜素的积累影响[D]. 福州: 福建农林大学, 2017 [Cui TT. Effects of temperature and SA on flavonoids and carotenoids accumulation in cultured cells of *Dimocarpus longan* Lour. [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017]
- 46 梁晓薇, 杨全, 李丹, 程轩轩, 唐晓敏, 潘利明, 张春荣. 茉莉酸甲酯对甘草根次生代谢的调控[J]. 广东农业科学, 2017, **44** (6): 57-62 [Liang XW, Yang Q, Li D, Cheng XX, Tang XM, Pan LM, Zhang CR. Regulation of methyl jasmonate on secondary metabolism of *Glycyrrhiza uralensis* root [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2017, **44** (6): 57-62]