

· 技术方法 ·

氨基酸对蛇足石杉叶状体增殖及石杉碱甲积累的影响

陈曼, 涂艺声*, 叶丽楠, 杨碧芸

江西师范大学生命科学院, 南昌 330022

摘要 通过在培养基中添加不同浓度的天冬氨酸、赖氨酸和色氨酸, 探究其对蛇足石杉(*Huperzia serrata*)叶状体生长、石杉碱甲积累及SOD酶活性的影响。结果表明: 添加天冬氨酸后, 叶状体干重生物量比对照提高18.50%–25.75%, 石杉碱甲含量亦明显高于对照, 其最适天冬氨酸浓度为0.5 mmol·L⁻¹; 添加1 mmol·L⁻¹色氨酸后, 叶状体相对增殖率显著高于对照, 但其石杉碱甲积累量略低于对照; 添加赖氨酸后, 叶状体相对增殖量、干重生物量及石杉碱甲含量均低于对照。添加一定浓度的天冬氨酸使SOD酶活性适当提高, 同时叶状体石杉碱甲积累量增加, 而长期保持高水平的SOD酶活性对叶状体积累石杉碱甲不利。

关键词 蛇足石杉, 石杉碱甲, 前体物, SOD酶

陈曼, 涂艺声, 叶丽楠, 杨碧芸 (2017). 氨基酸对蛇足石杉叶状体增殖及石杉碱甲积累的影响. 植物学报 52, 218–224.

蛇足石杉(*Huperzia serrata*), 又名千层塔, 隶属石杉科(Huperziaceae)石杉属(*Huperzia*), 是一种矮小的多年生拟蕨类植物(王德立等, 2014)。研究表明, 蛇足石杉的次级代谢产物石杉碱甲(huperzine-A, HupA)具有高抗胆碱酯酶活性, 对改善记忆力、治疗阿尔茨海默症和重症肌无力等具有良好的疗效, 且毒副作用小(吴荭等, 2005)。自然状态下, 蛇足石杉生长缓慢, 其孢子需要15年才能萌发(马英姿等, 2015), 而长期掠夺式的采挖导致野生蛇足石杉锐减。由于人工栽培蛇足石杉难度大, 而化学合成石杉碱甲成本高, 导致石杉碱甲市场销售价格昂贵(郑书岩等, 2013)。近年的研究发现, 蛇足石杉中的石杉碱甲可分别通过自身代谢途径和内生真菌合成。研究人员已从蛇足石杉中筛选出多种可产HupA的内生菌, 包括胡之璧先生实验室从蛇足石杉内生真菌中筛选到的内生真菌2F09P03B和LQ2F01、*Shiraria* sp. Sif14 (Zhu et al., 2010)及胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) (Shu et al., 2014)等。通过对胶孢炭疽菌进行RNA测序, 发现其CAO (*copper amine oxidase*)基因可能在石杉碱甲合成过程中起重要调节作用(Zhang et al., 2015)。本实验室已成功建立蛇足石杉茎离体无菌培养技术(涂艺声和丁明华, 2012), 发

现离体叶状体具有积累石杉碱甲的能力(吉枝单等, 2014), 它是产生石杉碱甲的最佳培养物形态(徐贤柱等, 2015), 为这种稀缺资源的生产提供了新的可行途径。

在培养基中添加适宜的已知或假定的前体物可大大提高植物细胞次级代谢产物的产量(崔堂兵等, 2001)。如在MS培养基中添加0.2–1.0 mmol·L⁻¹苯丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸能显著提高东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)紫杉醇的含量(陈永勤和朱蔚华, 1997)。石杉碱甲为石松生物碱类, 其前体物由L-氨基酸经三羧酸循环转变而成(王莉等, 2007)。前人的研究认为, 石杉碱甲生物合成的起始物为L-赖氨酸(Hemscheidt, 2000), 经一系列酶促反应后形成石榴碱, 再经过一系列的氧化开环、脱甲基以及甲基化, 最终形成石杉碱甲(陈作毅和张君诚, 2013)。本研究以天冬氨酸(Asp)、赖氨酸(Lys)和色氨酸(Trp)作为石杉碱甲的假定前体物对叶状体进行培养, 以期提高蛇足石杉中的石杉碱甲含量。

植物次生代谢受体内活性氧(ROS)产生的影响(宋兴舜等, 2009), 其代谢的变化顺序是活性氧(ROS)→过氧化物酶(超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等)→影响次生代谢

收稿日期: 2016-02-24; 接受日期: 2016-09-04

基金项目: 国家自然科学基金(No.81360614, No.31370390, No.81660597)、江西省自然科学基金(No.20132BAB204023)和江西省科技支撑项目(No.20121BBG70016)

* 通讯作者。E-mail: ysttz2012@163.com

(孟祥才和王喜军, 2011), 从而提高次生代谢物的产量。因此, 本研究通过在培养基中添加不同种类及不同浓度梯度的L-氨基酸对蛇足石杉叶状体进行培养, 探究其对叶状体的增殖与石杉碱甲积累的影响, 并探讨SOD酶活性变化规律与次生代谢产物石杉碱甲含量变化之间的关系, 为研究蛇足石杉离体培养过程中石杉碱甲的生物合成提供依据, 亦为蛇足石杉大规模离体培养生产石杉碱甲提供技术基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

研究材料取自本实验室(涂艺声和丁明华, 2012)建立的蛇足石杉(*Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev.)离体培养22世代(经多次分割并连续继代培养)的无菌叶状体繁殖系。当代的叶状体培养至50天, 在无菌条件下取出后分割成小块, 作为实验接种材料。诱导和增殖按涂艺声和丁明华(2012)的方法进行。石杉碱甲标准品购自中国食品药品检定研究院(产品批号为100243-201202)。

1.2 方法

1.2.1 叶状体的培养与氨基酸的添加

叶状体培养按吉枝单(2015)的方法进行(有改进)。首先在无菌条件下将叶状体剪切成小块后接种于经高温高压灭菌的1/4MS固体培养基中, 密封并置于(22±1)°C培养箱, 光照强度377 mol·m⁻²·s⁻¹, 光周期为每天15小时光照, 9小时黑暗。培养40天后, 分别取浓度梯度为0.25、0.5、1和2 mmol·L⁻¹的Asp、Lys和Trp溶液, 用一次性注射器分别吸取5 mL各浓度溶液接种于1/4MS固体培养基上, 并轻轻摇匀使溶液在固体培养基上分布均匀并渗透入培养基中。每个浓度做4次重复, 以加相应体积的无菌水作为对照。

1.2.2 数据处理

1.2.2.1 叶状体鲜重生物量

相对增殖率=(收获量-接种量)/接种量×100%

1.2.2.2 数据统计分析

采用Duncan's新复极差法检测添加不同浓度氨基酸培养的叶状体相对鲜重间的差异显著性(显著性水平

为 $\alpha=0.05$)。本文中数据采用平均值±标准差表示, 数据分析用Excel 2013和SPSS Statistics 19.0软件完成。

1.2.3 石杉碱甲的提取与检测

1.2.3.1 叶状体石杉碱甲的提取

石杉碱甲提取参考吉枝单(2015)的方法(有改进)。将叶状体培养80天后收获, 用纯净水洗净称其鲜重后, 置于55°C烘箱烘干至恒重, 然后研磨成细粉末待用。精确称取0.5 g粉末于离心管中, 加10 mL 2%酒石酸密封浸泡24小时, 超声波浸提半小时后离心, 收集上清液于锥形瓶中; 取残渣加5 mL 2%酒石酸超声波浸提30分钟后, 离心收集上清液, 重复此操作2次, 合并滤液。加氨水调pH值至9.0-10.0后置于40°C烘箱烘干滤液至恒重, 用甲醇浸泡洗出石杉碱甲混合物定容至1 mL, 以0.22 μm滤膜过滤后用于高效液相色谱(high performance liquid chromatography fluorescence, HPLC)检测。

1.2.3.2 标准品溶液的配制

准确称取石杉碱甲粉末1 mg, 用1 mL甲醇溶解配制成1 mg·mL⁻¹石杉碱甲标准品母液。分别精确量取20、40、60、80和100 μL标准品母液于离心管中, 用甲醇定容至1 mL, 配制成浓度为20、40、60、80和100 μg·mL⁻¹石杉碱甲溶液。

1.2.3.3 色谱条件

高效液相色谱仪采用岛津(LC-20AT), 色谱柱为依利特C18柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm)。流动相为甲醇:醋酸铵溶液(0.08 mol·L⁻¹, pH6.0)=3:7 (v/v); 流速为1 mL·min⁻¹; 检测波长308 nm; 柱温25°C; 进样量为20 μL。

1.2.3.4 线性关系考察

按照1.2.3.3节所述的色谱条件, 将配制好的20、40、60、80和100 μg·mL⁻¹石杉碱甲溶液分别注入液相色谱仪, 记录峰面积积分值, 以质量浓度 ρ (μg·mL⁻¹)为横坐标, 峰面积积分值Y为纵坐标, 用外标法分析峰面积与浓度有较好的线性关系, 线性方程为Y=(2.174 90 e-005) ρ -1.804 49 (R=0.999 655 6)。

1.2.3.5 系统适用性实验

按照1.2.3.3节所述的色谱条件进样20 μL, 记录此条

件下石杉碱甲色谱图(图1)。从图1可见,标准品石杉碱甲的保留时间为8.222分钟,样品保留时间为8.243分钟,并且与其它成分分离良好,理论塔板数按石杉碱甲峰计不低于3 000。

1.2.3.6 精密度实验

取1.2.3.2节所配制的 $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 石杉碱甲标准品溶液,按1.2.3.3节所述色谱条件进行HPLC检测。重复进样6次,记录峰面积,相对标准偏差(RSD)为0.97%。

1.2.3.7 回收率实验

取1.3.3.1节所配制的已知石杉碱甲含量的蛇足石杉提取样品 $200 \mu\text{L}$,精确加入 $200 \mu\text{L}$ 浓度为 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准品溶液,按照1.2.3.3节所述的色谱条件进样 $20 \mu\text{L}$,计算得出回收率为 $(99.8\pm 1.76)\%$ 。

1.3 SOD酶活性检测

1.3.1 酶液提取与制备

分别取在培养基上生长50、60、70和80天的蛇足石杉叶状体 0.5 g ,用液氮冷冻。加入缓冲液(磷酸缓冲液(pH7.8)+1% pvp+3 mL $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT)冰浴研磨后,转入离心管中,在 4°C 、 $10\ 000 \text{ xg}$ 条件下离心10分钟,取上清液,于 -20°C 保存备用。

1.3.2 酶活性检测

使用NBT法(Beauchamp and Fridovich, 1971)依次加入试剂,混匀后将1支对照管置于暗处,其它各管置于 $35.36 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ 荧光灯下反应30分钟后,立即置于暗处终止反应。以避光管作为空白参比调零,分别测定其它各管在 560 nm 处的吸光度,并计算相应的SOD酶活性。

2 结果与讨论

2.1 添加3种氨基酸对蛇足石杉叶状体生长增殖及干物质质量的影响

表1为3种氨基酸对蛇足石杉叶状体增殖率及干物质质量的影响。在培养基中添加 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Trp后,叶状体增殖率较对照提高1.24倍,达显著水平;而添加 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Trp或 $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Lys的叶状体增殖率则明显低于对照;其它各浓度氨基酸处理的叶状体增殖

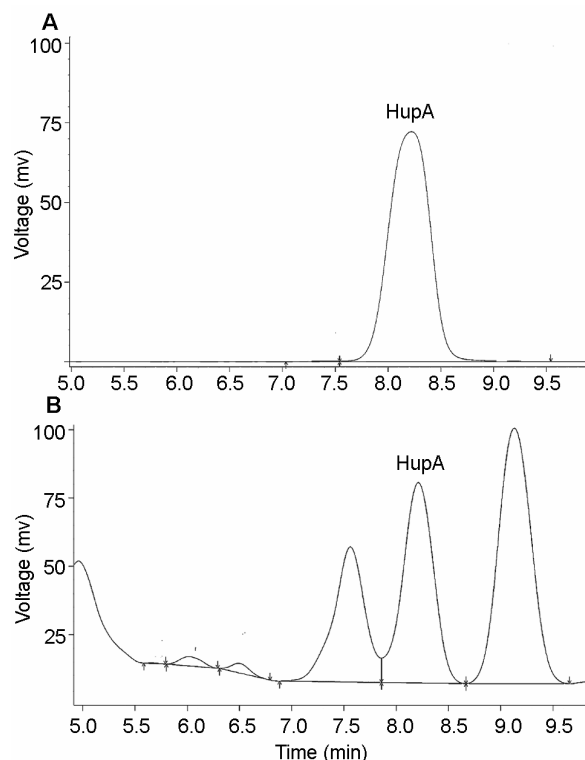


图1 石杉碱甲标准品(A)及蛇足石杉离体叶状体培养物提取物(B)的HPLC(高效液相色谱)色谱图

Figure 1 The HPLC (high performance liquid chromatography fluorescence) test of hyperzine A standard (A) and extract of *Huperzia serrata* thallus *in vitro* culture (B)

率与对照相比均未达到显著水平,说明它们对叶状体生长增殖(鲜重)的影响不大(表1;图2A-C)。

在培养基中添加不同种类的氨基酸对蛇足石杉叶状体干重影响也存在差异(表1)。添加不同浓度的Asp和Trp均能促进其叶状体的干物质积累,其中以 $0.25\text{--}1.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Asp的培养效果最好,其叶状体干物质积累量比对照提高 $18.50\%\text{--}25.75\%$;而添加不同浓度Lys培养的叶状体干物质积累量均低于对照。研究表明,供试的3种氨基酸中,以添加Asp促进叶状体干物质积累的效果较好。

2.2 添加3种氨基酸对蛇足石杉叶状体积累石杉碱甲的影响

采用HPLC检测不同浓度的3种氨基酸培养的蛇足石杉叶状体中的石杉碱甲含量(图3),不同浓度Asp处理的叶状体石杉碱甲含量均高于对照(对照为 $76.25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$),其中以 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Asp培养效果最佳,其

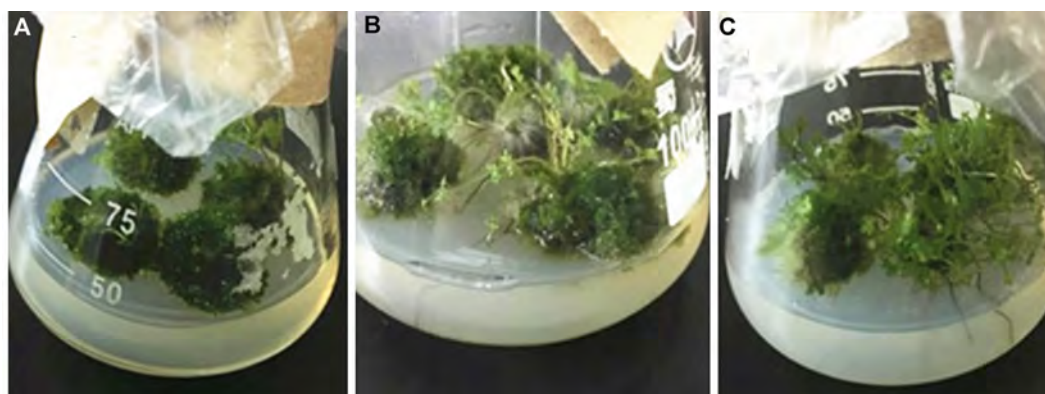


图2 添加不同氨基酸培养的蛇足石杉叶状体

(A) 添加天冬氨酸(Asp)培养的蛇足石杉叶状体; (B) 添加色氨酸(Trp)培养的蛇足石杉叶状体; (C) 添加赖氨酸(Lys)培养的蛇足石杉叶状体

Figure 2 The thallus of *Huperzia serrata* supplemented with different amino acids

(A) The thallus of *H. serrata* supplemented with Asp; (B) The thallus of *H. serrata* supplemented with Trp; (C) The thallus of *H. serrata* supplemented with Lys

表1 添加不同浓度的天冬氨酸(Asp)、赖氨酸(Lys)和色氨酸(Trp)的培养基对蛇足石杉叶状体生物量的影响

Table 1 Effect of different concentrations of Asp, Lys or Trp on the biomass of thallus in *Huperzia serrata*

Concentration of different amino acid (mmol·L ⁻¹)	Relative growth rate (%)	Dry weight (g·L ⁻¹)
Water/control	1313.05±21 bc	7.61680
Asp 0.25	1189.68±19 bc	9.30778
Asp 0.50	1337.76±29 bc	9.02623
Asp 1.00	1217.20±25 bc	9.57869
Asp 2.00	1211.28±32 bc	7.92295
Lys 0.25	1108.18±27 c	7.57992
Lys 0.50	1222.61±31 bc	7.40164
Lys 1.00	1328.25±30 bc	7.58278
Lys 2.00	1231.90±35 bc	7.32459
Trp 0.25	1311.53±33 bc	7.80328
Trp 0.50	1460.42±24 ab	8.01024
Trp 1.00	1647.51±37 a	9.35860
Trp 2.00	1050.53±17 c	6.66844

不同小写字母表示Duncan新复极差法在0.05水平上差异显著。Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level by Duncan's new multiple range test.

含量高达97.23 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 比对照提高1.28倍; 用不同浓度的Trp处理, 除1 mmol·L⁻¹ Trp培养叶状体石杉碱甲含量(70.801 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)与对照相近, 其余浓度处理的叶状体中石杉碱甲含量均低于对照; 不同浓度Lys处理的叶状体中石杉碱甲含量均明显低于对照, 仅为

(42.08–61.398) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 表明添加Lys抑制叶状体石杉碱甲的积累。

2.3 添加Asp与Lys对蛇足石杉叶状体中SOD酶活性的影响

为探索不同氨基酸促进或抑制叶状体积累石杉碱甲的生化差别, 我们选择添加0.5 mmol·L⁻¹ Asp及0.25 mmol·L⁻¹ Lys培养的叶状体与对照叶状体, 分别检测其生长过程中SOD酶活性的变化趋势(图4A), 自添加Asp至叶状体收获(即培养50–80天), SOD酶活呈先增强后减弱的趋势(与对照SOD酶活性变化特征相似, 但在培养50天时SOD酶活性较高于对照)。其中, 培养60天的SOD酶活性最高(171.99 U·g⁻¹)。添加0.25 mmol·L⁻¹ Lys培养的叶状体在50、60及70天SOD酶活性均明显高于对照, 培养80天其活性与对照接近。以上研究结果表明, 添加0.5 mmol·L⁻¹ Asp促进叶状体积累石杉碱甲与添加0.25 mmol·L⁻¹ Lys抑制叶状体积累石杉碱甲的SOD酶活性有明显差异。

为探明添加不同浓度Asp促进叶状体积累石杉碱甲的SOD酶活性特点, 我们检测了不同浓度Asp培养的蛇足石杉叶状体培养50天的SOD酶活性(图4B)。结果表明, 添加0.25 mmol·L⁻¹ Asp培养物SOD酶活性低于对照, 该处理积累石杉碱甲增效也不明显(图3), 其它处理的SOD酶活性均高于对照, 且培养物SOD

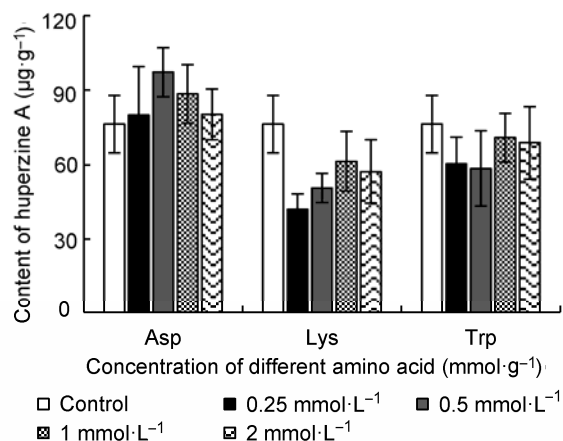


图3 添加不同浓度的天冬氨酸(Asp)、赖氨酸(Lys)和色氨酸(Trp)对蛇足石杉叶状体中石杉碱甲含量的影响

Figure 3 Effect of different concentrations of Asp, Lys and Trp on the content of huperzine A in thallus of *Huperzia serrata*

酶活性随Asp添加浓度的升高而增强。以 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Asp培养的叶状体SOD酶活性最高, 但该处理积累石杉碱甲含量相对于 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Asp趋于下降(图3)。该结果进一步表明, 培养蛇足石杉叶状体时添加一定浓度的Asp, 培养50天适当提高SOD酶活性与石杉碱甲积累增加有关, 而当叶状体中SOD酶活性继续升高, 石杉碱甲积累量会受影响。

2.4 讨论

在植物组织培养过程中添加适当前体物是调节次生代谢产物合成和积累的重要手段(谷荣辉等, 2013)。例如, 在培养基中添加D-苯丙氨酸能较大幅度提高红豆杉(*T. wallichiana*)愈伤组织中的紫杉醇含量(翟雪霞和李友勇, 2009)。本研究结果显示, 添加Asp培养的叶状体相对增殖率略低于对照, 但提高了叶状体的干重生物量, 其次生代谢物石杉碱甲含量明显高于对照及其它处理。有假说认为, 任何对植物生长有影响的因子, 都会导致次生代谢物质的变化, 对植物生长抑制作用更强的因素将增加次生代谢产物的积累(苏文华等, 2005)。本研究也证实了这一假说, 即添加Asp降低了叶状体的相对增殖量, 却促进了叶状体干物质和石杉碱甲的积累。

植物在代谢过程中会产生ROS, ROS可从细胞

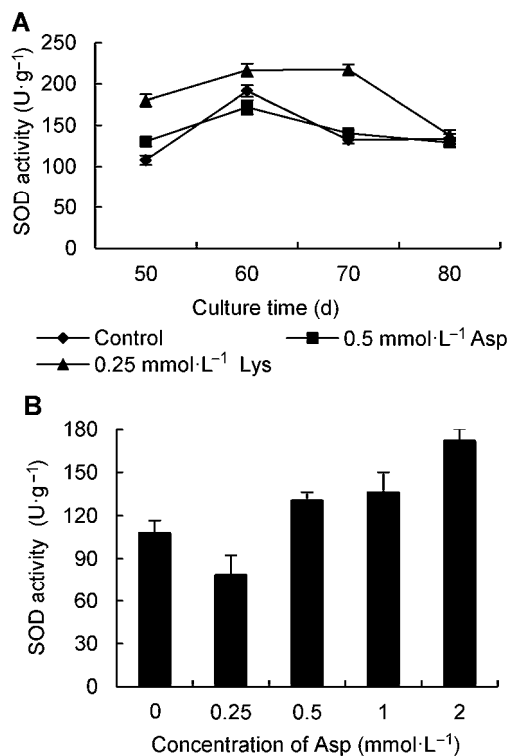


图4 添加不同氨基酸培养蛇足石杉叶状体的SOD酶活性特征 (A) 添加 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 天冬氨酸(Asp)和 $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 赖氨酸(Lys)培养叶状体SOD酶活性变化特征, (B) 添加不同浓度Asp培养50天叶状体SOD酶活性特征

Figure 4 The change features of SOD activity for *Huperzia serrata* thallus supplemented with different amino acids (A) The change features of SOD activity for *H. serrata* thallus supplemented with $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Asp and $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Lys, respectively; (B) The SOD activity of *H. serrata* thallus supplemented with different concentrations of Asp on 50 days

活动的基因表达、酶的生物合成和活性调节等不同层面影响次生代谢过程(简令成和王红, 2009)。抗氧化酶活性的变化可以反映ROS对次生代谢的影响, 低浓度的ROS可作为信号分子引发适应和次生代谢防御反应, 而高浓度的ROS则作为损伤因子加重对细胞和有机体的损害(孟祥才和王喜军, 2011)。例如, 在红豆杉细胞悬浮培养过程中, 低能量的超声波能迅速增加抗氧化酶的活性, 增强紫杉醇的合成(Wu and Ge, 2004)。本研究结果显示, 除 $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Asp以外, 添加其它浓度的Asp培养叶状体至50天, SOD酶活性均高于对照, SOD酶活性的增强说明ROS作为信号分子引发适应的抗氧化酶响应, 影响植物次生

代谢反应, 从而导致添加Asp培养的叶状体石杉碱甲含量高于对照。SOD酶活性随Asp浓度升高而增强, 石杉碱甲含量却随Asp浓度升高而降低, 此外, 添加 $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Lys培养叶状体SOD酶活性在50–70天均明显高于对照, 而其石杉碱甲含量远低于对照。这种SOD酶活性过高反映出高浓度ROS作为损伤因子加重了对细胞和有机体的损害, 从而降低叶状体石杉碱甲含量, 因此适当提高SOD酶活性才能保证次生代谢物的积累增高阈值。

本研究中外源氨基酸添加实验结果初步显示, 石杉碱甲的可能前体物是Asp而不是Lys, 与先前有关假说存在差异(Hemscheidt, 2000), 因本研究中采用的HPLC分析方法难以进行准确的定性分析, 故这种差异的具体机制尚待进一步研究。

参考文献

- 陈永勤, 朱蔚华 (1997). 红豆杉属植物的组织、细胞及胚培养. 植物生理学通讯 **33**, 213–219.
- 陈作毅, 张君诚 (2013). 石杉碱生物合成与代谢途径研究进展. 中华中医药杂志 **28**, 1815–1818.
- 崔堂兵, 郭勇, 林炜铁 (2001). 提高植物细胞培养法生产次级代谢物产量的方法. 植物生理学通讯 **37**, 479–482.
- 谷荣辉, 洪利亚, 龙春林 (2013). 植物细胞培养生产次生代谢物的途径. 植物生理学报 **49**, 869–881.
- 吉枝单 (2015). 蛇足石杉离体叶状体生产石杉碱甲的工艺条件研究. 硕士学位论文. 南昌: 江西师范大学. pp. 13–34.
- 吉枝单, 涂艺声, 丁明华, 陈雄, 蒋秀芳 (2014). 蛇足石杉离体培养产生有效成分的研究. 天然产物研究与开发 **5**, 645–649.
- 简令成, 王红 (2009). 逆境植物细胞生物学. 北京: 科学出版社. pp. 137–153.
- 马英姿, 刘江海, 许欢, 刘芬 (2015). 蛇足石杉的离体培养. 植物生理学报 **51**, 465–470.
- 孟祥才, 王喜军 (2011). 活性氧促进道地药材质量形成的假说及其探讨. 中草药 **42**, 799–804.
- 宋兴舜, 任静, 刘雪梅, 马双, 杨传平 (2009). 光合菌对黄瓜光合及抗氧化同工酶的影响. 植物学报 **44**, 587–593.
- 苏文华, 张光飞, 李秀华 (2005). 植物药材次生代谢产物的积累与环境的关系. 中草药 **36**, 1415–1418.
- 涂艺声, 丁明华 (2012). 产石杉碱甲的离体蛇足石杉叶状体诱导和增殖的培养方法. CN102550416A. 2012-07-11.
- 王德立, 甘炳春, 齐耀东, 赵祥升 (2014). 蛇足石杉不同生长阶段植株中石杉碱甲含量的地区差异及生境影响的比较观察. 中国新药杂志 **23**, 326–332.
- 王莉, 史玲玲, 张艳霞, 刘玉军 (2007). 植物次生代谢物途径及其研究进展. 植物科学学报 **25**, 500–508.
- 吴荭, 庄平, 冯正波, 张超, 靳昌伟 (2005). 中国蛇足石杉资源调查与评估. 自然资源学报 **20**, 59–67.
- 徐贤柱, 涂艺声, 吉枝单, 陈曼, 蔡险峰, 杨萍 (2015). 蛇足石杉离体培养物形态变化与石杉碱甲积累的研究. 植物学报 **50**, 733–738.
- 翟雪霞, 李友勇 (2009). 几种氨基酸前体物对红豆杉愈伤组织的生长和紫杉醇含量的影响. 湖北农业科学 **48**, 2494–2496.
- 郑书岩, 郁春辉, 沈征武 (2013). 石杉碱甲的合成研究进展. 有机化学 **33**, 2261–2270.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**, 276–287.
- Hemscheidt T (2000). Tropane and Related Alkaloids. *Bio-synthesis*. Vol. 209. Berlin: Springer. 175–206.
- Shu S, Zhao X, Wang W, Zhang G, Cosoveanu A (2014). Identification of a novel endophytic fungus from *Huperzia serrata*, which produces huperzine A. *World J Microb Biot* **30**, 3101–3109.
- Wu J, Ge X (2004). Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis*, cell suspension cultures. *Bio-technol Bioeng* **85**, 714–721.
- Zhang G, Wang W, Zhang X, Xia Q, Zhao X, Ahn Y (2015). *De novo* RNA sequencing and transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* es026 reveal genes related to biosynthesis of huperzine A. *PLoS One* **10**, e0120809.
- Zhu D, Wang J, Zeng Q, Zhang Z, Yan R (2010). A novel endophytic huperzine A-producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata*. *J Appl Microb* **109**, 1469–1478.

Effect of Amino Acids on Thallus Growth and Huperzine-A Accumulation in *Huperzia serrata*

Man Chen, YishengTu^{*}, Linan Ye, Biyun Yang

College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

Abstract We investigated the effects of amino acid supplements on thallus growth, superoxide dismutase (SOD) activity and huperzine-A accumulation in *Huperzia serrata* by adding aspartic acid, lysine, and tryptophan at different concentrations into the medium. With aspartic acid, the dry weight of the thallus increased by 18.50%–25.75% and the huperzine-A accumulation was significantly higher than in the control. The optimal concentration of aspartic acid was 0.5 mmol·L⁻¹. The relative growth of thallus was significantly higher with 1 mmol·L⁻¹ tryptophan than in the control, but the huperzine-A accumulation was slightly lower than for the control. The relative growth rate, dry weight and huperzine-A accumulation was lower for thallus cultured with lysine than the control. The SOD activity of the thallus cultured with aspartic acid was increased properly, and the huperzine-A accumulation of the thallus was increased. However, huperzine-A accumulation of the thallus was suppressed when SOD activity remained high in the long-term.

Key words *Huperzia serrata*, huperzine A, precursor, superoxide dismutase

Chen M, Tu YS, Ye LN, Yang BY (2017). Effect of amino acids on thallus growth and huperzine-A accumulation in *Huperzia serrata*. *Chin Bull Bot* **52**, 218–224.

* Author for correspondence. E-mail: ysttz2012@163.com

(责任编辑: 朱亚娜)