

H₂O₂ 介导内生真菌诱导子促进茅苍术细胞 HMGR 的活化和 β-桉叶醇的生物合成

陶金华¹, 汪冬庚¹, 濮雪莲¹, 赵喜¹, 江曙²

1. 南通大学, 江苏 南通 226019

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 研究内生真菌诱导子对茅苍术悬浮细胞次生代谢途径关键酶活性的影响, 探讨茅苍术次生代谢产物的诱导途径和诱导机制。方法 将内生真菌诱导子添加到茅苍术悬浮细胞中, 测定 NADPH 氧化酶和 HMGR 酶活性以及 H₂O₂ 和 β-桉叶醇的量。结果 内生真菌 *Fusarium sp 5* 诱导子可提高 NADPH 氧化酶的活性, 诱导氧化迸发, 显著促进 H₂O₂ 的积累, 激活倍半萜类代谢途径中关键酶 HMGR 的活性, 促进 β-桉叶醇的生物合成, 处理组的产量达到 66.59 μg/g, 比对照组提高了 257.6%。H₂O₂ 淬灭剂 CAT 和 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 可以阻断 *Fusarium sp 5* 诱导子对茅苍术悬浮细胞中 HMGR 的活化和 β-桉叶醇合成的促进作用。外源 H₂O₂ 溶液单独处理也能够触发茅苍术细胞中 HMGR 活化和 β-桉叶醇的合成加强。结论 H₂O₂ 是参与内生真菌诱导子诱发茅苍术细胞中 β-桉叶醇合成所必需的信号分子, 通过激活 HMGR, 从而触发 β-桉叶醇的生物合成。

关键词: 内生真菌; 茅苍术; H₂O₂; HMGR; β-桉叶醇

中图分类号: R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)19-2740-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.021

Promotion of HMGR activation and β-eudesmol biosynthesis in *Atractylodes lancea* suspension cell culture by hydrogen peroxide-mediated endophytic fungal elicitor

TAO Jin-hua¹, WANG Dong-geng¹, PU Xue-lian¹, ZHAO Xi¹, JIANG Shu²

1. Nantong University, Nantong 226019, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the effect of endophytic fungal elicitor on key enzyme activity, inducing pathway and mechanism involved in the secondary metabolites of *Atractylodes lancea*. **Methods** NADPH oxidase, HMGR activities, the concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) and β-eudesmol were determined by the co-culture of endophytic fungal elicitor and *A. lancea* suspension cell. **Results** NADPH oxidase activity was notably enhanced by *Fusarium sp5* elicitor which could induce oxidative burst, significantly promote H₂O₂ accumulation, and activate HMGR in the sesquiterpenoids metabolic pathway. Compared with the control, the yield of β-eudesmol increased 257.6% and reached 66.59 μg/g. CAT and DPI could inhibit the HMGR activity and β-eudesmol biosynthesis in *A. lancea* cell induced by *Fusarium sp5* elicitor. Exogenous H₂O₂ also induced HMGR and promoted the β-eudesmol biosynthesis. **Conclusion** H₂O₂ is necessary to induce β-eudesmol synthetic signal molecule by activating the HMGR.

Key words: endophytic fungi; *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; hydrogen peroxide; HMGR; β-eudesmol

苍术为菊科苍术属多年生草本植物, 是我国大宗常用中药品种, 《中国药典》2010年版收载茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 和北苍术 *A. chinensis* (DC.) Koidz. 的干燥根茎作为苍术药材^[1]。苍术药用历史悠久, 具有健脾燥湿、祛风散寒的作

用, 在临床上主要应用于泄泻、风湿痹痛、风寒感冒、夜盲等病症的治疗。现代研究表明苍术药材中主要含挥发油, 其中挥发油中主要有效成分包括 β-桉叶醇 (β-eudesmol)、茅术醇 (hinesol)、苍术酮 (atractylone) 等倍半萜类和苍术素 (atractylodin)

收稿日期: 2013-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102743), 江苏省高校自然科学基金基础研究项目 (07KJD360164)

作者简介: 陶金华 (1984—), 女, 江苏南通人, 硕士, 从事微生物与药用植物品质的相关研究。E-mail: taojinhua2000@163.com

等聚炔类两大类成分,具有保肝、抗心律失常、降血糖、免疫调节等多种生物学活性^[2]。一般认为江苏茅山地区为其道地产区,故又称茅苍术,是苍术的道地药材。近年来,由于人为掠夺性采挖及生境的破坏,使茅苍术的分布区和个体数量日益减少,其种群呈现明显衰退倾向;此外,由于茅苍术野外繁殖能力低等自身原因,使得茅苍术已处于濒危状态。通过利用植物细胞全能性发展起来的细胞培养技术不仅成为解决茅苍术资源匮乏、实现活性成分生产的有效手段之一,而且也是研究各类外界因子对其生物合成调控机制的有用模型。

内生真菌是指在植物体内完成其生活史的部分或全部,生长于植物组织细胞间,分布于根、茎、叶和种子中,但又不引起任何病症的微生物^[3]。内生真菌是药用植物体内环境重要的组成部分,与植物长期共进化过程中形成了一种稳定的互利共生关系,可显著促进药用植物次生代谢产物的生物合成^[4-6]。近年来,研究发现内生真菌能够产生一类可诱导药用植物细胞生物合成次生代谢产物的物质,称之为内生真菌诱导子。作为一种特定的化学信号,在药用植物与内生真菌的相互作用中,它们可以快速、专一和选择性地诱导药用植物代谢过程中特定基因的表达,促进药用植物次生代谢物的生物合成^[7]。如青蒿内生真菌 *Fusarium oxysporum* 诱导子显著促进青蒿素的合成,处理组青蒿素产量比对照组提高了大约 2 倍^[8]。内生真菌诱导子作为外界刺激因子本身并不直接参与细胞内的次生代谢过程,因此在药用植物细胞内必然存在相关的胞内信号分子和相应的信号转导机制来感受并传递外界因子的刺激信号。研究药用植物细胞中与次生代谢物生物合成调控有关的信号分子及信号转导途径将有助于揭示内生真菌调控药用植物次生代谢产物生物合成的机制。通过探讨茅苍术活性成分的生源途径及内生真菌诱导子的调控机制,有望实现活性成分的高效表达,促进茅苍术资源的可持续发展和利用。

1 材料

实验材料采自江苏省茅山地区,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的新鲜植株。愈伤组织诱导培养基是在 MS 培养基中添加 0.4 mg/L NAA、4.0 mg/L 2, 4-D 和 0.4 mg/L KT; 细胞悬浮培养基除了不添加琼脂外,其他成分组成和愈伤组织诱导培养基相同,实验中所采用的化学试剂为分析纯。净化工作台

(SW-CJ-1FB, 苏州净化设备有限公司), HP1100 高效液相色谱仪(四元梯度泵、在线真空脱气机、柱温箱和二极管阵列检测器)。

2 方法

2.1 内生真菌诱导子的制备

将内生真菌接入发酵培养液, 28 °C, 200 r/min 振荡培养 7~10 d, 发酵结束后, 5 000 r/min 离心 10 min, 分离菌体和发酵液, 菌体匀浆后与发酵液混合, 抽滤, 将滤液减压浓缩后, 于 121 °C 灭菌 20 min 后, 即为内生真菌诱导子。用总糖标定其浓度, 采用蒽酮-硫酸法测定糖量^[4]。

2.2 茅苍术悬浮细胞系及培养条件的建立

按文献方法^[9]进行茅苍术愈伤组织的诱导及悬浮细胞系的建立。选取生长旺盛、质地疏松的愈伤组织约 2.0 g, 接种于装有 300 mL MS 液体培养基的 1 000 mL 三角瓶中, 25 °C、120 r/min 悬浮振荡培养。5 d 继代 1 次, 连续继代 3~5 次, 将细胞悬浮培养物用 80 目镍网滤过, 滤液分装后继续培养, 作为起始悬浮培养液。

2.3 茅苍术细胞中 H₂O₂ 量及 NADPH 氧化酶活性的测定

2.3.1 H₂O₂ 的测定 采用化学发光法^[10]测定。吸取 100 μL 不同处理的茅苍术细胞悬浮培养液, 依次加入磷酸缓冲液(50 mmol/L 磷酸钾, pH 7.9) 750 μL、0.3 mmol/L 氨基苯二酰肼(鲁米诺) 200 μL, 14 mmol/L 高铁氰化钾 100 μL, 测定最大化学发光值, 计算对照组及不同处理组茅苍术细胞培养液中 H₂O₂ 浓度。

2.3.2 NADPH 氧化酶活性测定^[11] 取 1.0 g 新鲜茅苍术细胞, 匀浆后离心 30 min (12 000 r/min), 取 0.2 mL 上清液加入到反应液中, 其中含有 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 250 mmol/L 蔗糖, 1 mmol/L DTT, 0.05 mmol/L NBT, 0.1 mmol/L NADPH 和 10~15 μg 膜蛋白, 反应 5 min 后置于冰浴中, 测定波长为 530 nm 的吸光度(A)值, 以反应液中加入 50 U SOD 时的 A 值作矫正。分子消光系数为 12.8 mmol/cm。

2.4 茅苍术细胞中 3-羟甲基戊二酰-CoA 还原酶(HMGR)活性测定

取 5 μL 待测液, 加入 65 μL 磷酸缓冲液(300 mmol/L KCl, 240 nmol/L K₂HPO₄, 6 nmol/L EDTA, 15 nmol/L DTT, pH 6.8) 和 50 μmol/L 牛羟甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 10 μL, 于 37 °C 温浴 5 min 后, 加入 10 g/L NADPH 溶液 10 μL 启动反

应, 37 °C 反应 8 min, 加入 0.5 mol/L NaOH 300 μL 终止反应, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 采用 HPLC 测定 NADPH。色谱条件: 色谱柱为 Hypersil C₁₈-ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为磷酸缓冲液-甲醇 (78:22), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 340 nm, 进样量 10 μL。以 1 mg 质膜蛋白每分钟转化的 NADPH 量计算酶活性。

2.5 β-桉叶醇的测定

茅苍术细胞中 β-桉叶醇的提取和测定参照文献报道的方法进行^[12]。将茅苍术悬浮细胞培养液于 5 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 在细胞沉淀物中加入 20 mL 三氯甲烷超声提取 2 次, 每次 30 min, 然后进行提取液的浓缩, 蒸干后用适量甲醇溶解, 即得样品溶液, 测定时稀释。

色谱条件: 色谱柱为 Polaris C₁₈-A (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Metachem); 柱温 30 °C; 进样体积 10 μL; 检测波长 203 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 流动相: 乙腈-水 (58:42)。此外, 精密称取 β-桉叶醇对照品适量, 用甲醇配成 0.486 g/L 的储备液。以峰面积为纵坐标, β-桉叶醇质量浓度 (mg/L) 为横坐标做图, 即得回归方程 $Y=1\ 762\ 815.7 X-479.5$, $r=0.999\ 8$, β-桉叶醇在 7.6~121.5 mg/L 呈良好的线性关系。

2.6 外源 H₂O₂、过氧化氢酶 (CAT) 和氯化二联苯碘 (DPI) 对茅苍术细胞的处理方法

将 H₂O₂、H₂O₂ 淬灭剂 CAT 或质膜 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 溶液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 按照实验要求在茅苍术悬浮细胞不同培养时期向培养液中加入上述溶液, 对照组加入等体积的蒸馏水, 考察不同处理组对 HMGR 活性、β-桉叶醇合成、H₂O₂ 释放的影响。

3 结果与分析

3.1 内生真菌诱导子对茅苍术悬浮细胞中、NADPH 氧化酶、HMGR 活性、β-桉叶醇合成及 H₂O₂ 释放的影响

从茅苍术中筛选到 1 株有益内生真菌 *Fusarium sp 5*, 可显著促进 β-桉叶醇的生物合成, 产量达到 66.59 μg/g, 比对照提高了 257.6%。根据前期研究结果, 在茅苍术悬浮细胞培养至 12 d 时, 加入不同浓度的 *Fusarium sp 5* 诱导子, 结果表明, 内生真菌诱导子在低质量浓度范围内, 其对茅苍术悬浮细胞的 HMGR 活性, β-桉叶醇量及 H₂O₂ 量的影响呈现明显的质量浓度依赖性。诱导子质量浓度在 0~40 mg/L, 茅苍术悬浮细胞的 HMGR 活性、β-桉叶醇

量及 H₂O₂ 浓度随着诱导子质量浓度的增加而增加, 当诱导子质量浓度超过 60 mg/L 时, 茅苍术悬浮细胞中 HMGR 活性、β-桉叶醇量及 H₂O₂ 浓度均出现明显的下降 (图 1、2)。

采用 40 mg/L 内生真菌诱导子处理茅苍术悬浮细胞 2 h 后, 质膜 NADPH 氧化酶的活性开始增强, 并伴随 H₂O₂ 的产生, 二者在 8 h 左右均达到最高; 而茅苍术细胞中 HMGR 活性在处理 5 h 后增加, 并在 12 h 左右达到最高 (图 3)。

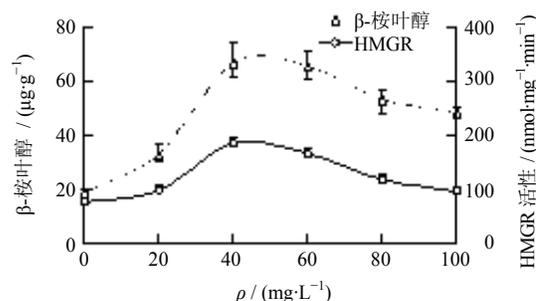


图 1 不同质量浓度诱导子对茅苍术细胞中 β-桉叶醇量及 HMGR 活性的影响

Fig. 1 Effect of elicitor at different concentration on β-eudesmol biosynthesis and HMGR activity

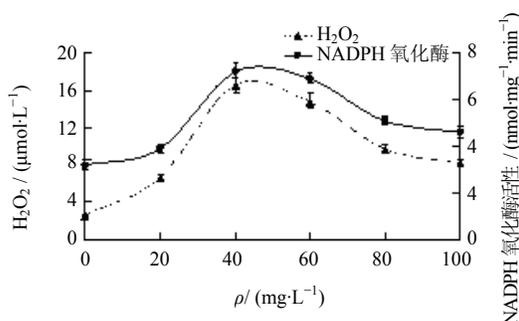


图 2 不同质量浓度诱导子对茅苍术细胞中 NADPH 氧化酶活性及 H₂O₂ 量的影响

Fig. 2 Effect of elicitor at different concentration on NADPH oxidase activity and H₂O₂ yield

3.2 外源 H₂O₂ 对茅苍术悬浮细胞中 HMGR 活化及 β-桉叶醇生物合成的诱导作用

以 H₂O₂ 单独处理茅苍术悬浮细胞, 结果表明 HMGR 活性显著增强, β-桉叶醇量明显提高。茅苍术悬浮细胞中 HMGR 活性、β-桉叶醇量的增加对外源 H₂O₂ 也具有浓度依赖性。H₂O₂ 浓度在 0~15 mmol/L, 茅苍术悬浮细胞中 HMGR 活性、β-桉叶醇量随着 H₂O₂ 浓度的增加而增加, 当 H₂O₂ 浓度高于 20 μmol/L 时, 细胞中 HMGR 活性、β-桉叶醇量

均出现不同程度的下降(图4)。但是在最适 H₂O₂ 浓度下, 茅苍术悬浮细胞中 HMGR 活性、β-桉叶醇量仍低于内生真菌诱导子处理。

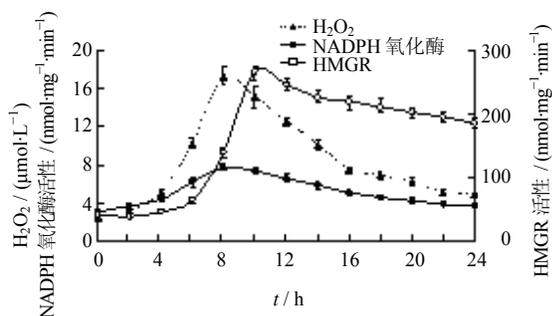


图3 诱导子处理时间对茅苍术细胞中 H₂O₂ 量、NADPH 氧化酶及 HMGR 活性的影响

Fig. 3 Effect of elicitor treating time on H₂O₂ amount, NADPH oxidase, and HMGR activities

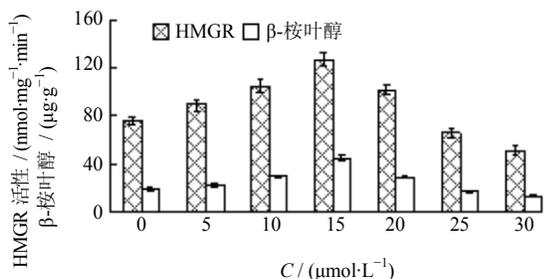


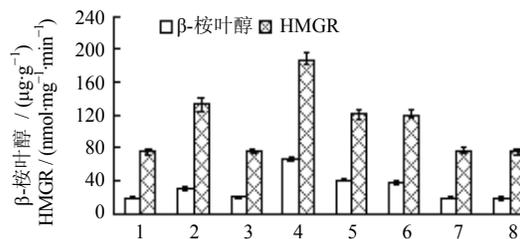
图4 外源 H₂O₂ 对 HMGR 活性和 β-桉叶醇合成的影响

Fig. 4 Effect of extraneous H₂O₂ on HMGR activity and β-eudesmol biosynthesis

3.3 DPI 和 CAT 对内生真菌诱导子的抑制作用

内生真菌 *Fusarium sp* 5 能够诱发茅苍术细胞氧化迸发, 显著提高细胞中 H₂O₂ 的浓度。H₂O₂ 浓度的急剧变化表明内生真菌诱导子作为外来胁迫, 激活了茅苍术细胞内信号传导网络。为了进一步证实 H₂O₂ 是内生真菌诱导子促进茅苍术细胞中 β-桉叶醇生物合成的必需信号分子, 分别考察了质膜 NADPH 氧化酶专一性抑制剂 DPI 和 H₂O₂ 淬灭剂 CAT 对内生真菌诱导子处理的茅苍术悬浮细胞中 HMGR 活性、β-桉叶醇合成的影响(图5)。结果表明, DPI 和 CAT 能够阻断内生真菌诱导子对茅苍术悬浮细胞中 HMGR 活性、β-桉叶醇合成的促进作用, DPI 能够抑制内生真菌诱导子诱发茅苍术细胞的氧化迸发。从图5可见, H₂O₂ 单独处理可以使茅苍术细胞中 HMGR 活性、β-桉叶醇量比对照分别提高了 75.6%和 60.4%, 说明 H₂O₂ 单独处理也足以触发茅苍术细胞中 HMGR 活性和 β-桉叶醇的合成。此外, H₂O₂+CAT 处理组中茅苍术细胞的 HMGR

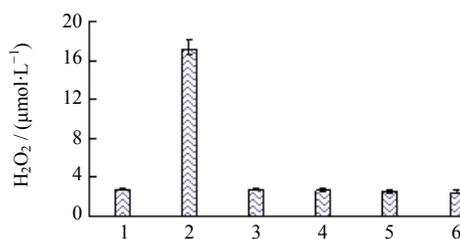
活性、β-桉叶醇量及 H₂O₂ 水平与对照组无明显差异(图5、6), 表明 CAT 能够有效清除 H₂O₂, 对茅苍术细胞中 HMGR 活性和 β-桉叶醇合成的影响确实是由 H₂O₂ 引起。



1-CK 2-H₂O₂ 3-H₂O₂+CAT 4-诱导子 5-诱导子+DPI 6-诱导子+CAT 7-DPI 8-CAT
1-CK 2-H₂O₂ 3-H₂O₂+CAT 4-elicitor 5-elicitor+DPI 6-elicitor+CAT 7-DPI 8-CAT

图5 DPI 和 CAT 对内生真菌诱导子诱发茅苍术细胞 HMGR 活性和 β-桉叶醇合成的影响

Fig. 5 Effect of DPI and CAT on HMGR activity and β-eudesmol biosynthesis in *A. lancea* cell induced by endophytic elicitor



1-CK 2-诱导子 3-诱导子+DPI 4-诱导子+CAT 5-DPI 6-CAT
1-CK 2-elicitor 3-elicitor+DPI 4-elicitor+CAT 5-DPI 6-CAT

图6 DPI 和 CAT 对内生真菌诱导子诱发茅苍术细胞氧化迸发的影响

Fig. 6 Effect of DPI and CAT on oxidative burst in *A. lancea* cell induced by endophytic elicitor

4 讨论

HMGR 被认为是异戊二烯代谢途径中第一个限速酶, 是萜类化合物代谢中的重要调控点。HMGR 的活性受到植物本身的生长发育和多种环境因子的调控, 受伤、花生四烯酸和感染微生物都能使植物 HMGR 酶活性和 mRNA 量上升^[13-14]。本研究表明内生真菌诱导子通过激活 NADPH 氧化酶, 产生大量的信号分子 H₂O₂, 从而诱导茅苍术悬浮细胞 HMGR 活性增强, 促进了 β-桉叶醇的生物合成。内生真菌诱导子诱发茅苍术细胞中 H₂O₂ 的产生先于 HMGR 活化, 说明茅苍术细胞中 H₂O₂ 的产生位于 HMGR 活化和 β-桉叶醇合成途径激活的上游。外源 H₂O₂ 直接处理也能提高茅苍术细胞中

HMGR 活性和 β -桉叶醇量, H_2O_2 淬灭剂 CAT 和质膜 NADPH 氧化酶专一性抑制剂 DPI 可以阻断内生真菌诱导子对茅苍术悬浮细胞中 HMGR 活化和 β -桉叶醇合成的促进作用, 表明 H_2O_2 是介导内生真菌诱导子促进茅苍术悬浮细胞中 HMGR 活化和 β -桉叶醇合成的信号转导途径中必需的信号分子。

通过添加外源 H_2O_2 溶液, 可以显著促进茅苍术细胞 β -桉叶醇的生物合成, 而 H_2O_2 对茅苍术细胞 β -桉叶醇生物合成的促进作用可以完全被 H_2O_2 淬灭剂 CAT 抑制; 此外, 质膜 NADPH 氧化酶专一性抑制剂 DPI 和 H_2O_2 淬灭剂 CAT 均可以完全抑制内生真菌诱导子诱发茅苍术细胞的氧化迸发, 但不能完全抑制内生真菌诱导子对茅苍术细胞 β -桉叶醇生物合成的促进作用, 而 DPI、CAT 本身对茅苍术细胞 β -桉叶醇的生物合成没有明显的影响, 这表明除了 H_2O_2 作为信号分子以外, 茅苍术细胞内可能存在其他信号分子或信号转导途径共同参与介导内生真菌诱导子对茅苍术细胞中 HMGR 活性和 β -桉叶醇生物合成的促进作用。目前, 植物抗病、防御反应等信号转导途径研究比较深入, 关于药用植物次生代谢信号转导机制的研究仍处在初步探索阶段^[15]。以往大量的研究报道通过各个独立的实验分别证明 H_2O_2 、NO、茉莉酸、 Ca^{2+} 等是参与介导外界因子诱发药用植物细胞次生代谢物生物合成必需的信号分子, 然而上述信号分子在介导外界因子诱发药用植物细胞次生代谢物生物合成过程中并不完全独立, 而是存在信号分子之间的相互应答 (cross-talk) 机制, 如茉莉酸和水杨酸具有协同作用, 共同促进银杏细胞中银杏黄酮苷的积累^[16]。因此, 通过对茅苍术次生代谢途径及其调控机制的系统研究, 阐明介导内生真菌影响茅苍术次生代谢物生物合成的信号分子及其应答机制, 探讨启动关键酶基因表达的信号转导途径, 将有助于揭示内生真菌促进茅苍术次生代谢物生物合成的机制。

参考文献

- [1] 中国药典 [M]. 一部. 2010.
- [2] 付梅红, 朱东海, 方 婧, 等. 苍术的化学、分子生物学和药理学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2669-2672.
- [3] Aly A H, Debbab A, Proksch P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(6): 1829-1845.
- [4] 陶金华, 濮雪莲, 江 曙. 内生真菌诱导子对茅苍术细胞生长及苍术素积累的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(1): 27-31.
- [5] Bhagat J, Kaur A, Sharma M, et al. Molecular and functional characterization of endophytic fungi from traditional medicinal plants [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(3): 963-971.
- [6] 江 曙, 钱大玮, 段金彪, 等. 植物内生菌与道地药材的相关性研究 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1268-1272.
- [7] Li P Q, Yan M, Shan T J, et al. Effects of polysaccharide elicitors from endophytic *Fusarium oxysporium* Dzf17 on growth and diosgenin production in cell suspension culture of *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Molecules*, 2011, 16(11): 9003-9016.
- [8] Zheng L P, Guo Y T, Wang J W, et al. Nitric oxide potentiates oligosaccharide-induced artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots [J]. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50(1): 49-55.
- [9] 陶金华, 濮雪莲, 江 曙. 茅苍术愈伤组织诱导及其细胞悬浮培养研究 [J]. 广西植物, 2012, 32(1): 118-123.
- [10] Schwacke R, Hager A. Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca^{2+} and protein-kinase activity [J]. *Planta*, 1992, 187: 136-141.
- [11] 杨颖丽, 安黎哲, 张立新. NaCl 对小麦根质膜 NADPH 氧化酶活性的影响 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(12): 2463-2467.
- [12] 张贝贝, 方 婧, 许海玉, 等. HPLC 测定道地产地和主产地茅苍术中 β -桉叶醇及其他成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 116-118.
- [13] Ha S H, Kim J B, Hwang Y S, et al. Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced Hmg2 from pepper (*Capsicum annum*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1625(3): 253-260.
- [14] Pateraki I, Kanellis A K. Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. creticus [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(6): 629-641.
- [15] Altuzar-Molina A R, Munoz-Sanchez J A, Vazquez-Flota F, et al. Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense* cells [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49(2): 151-158.
- [16] Xu M J, Dong J F, Wang H, et al. Complementary action of jasmonic acid on salicylic acid in mediating fungal elicitor-induced flavonol glycoside accumulation of *Ginkgo biloba* cells [J]. *Plant Cell Environ*, 2009, 32(8): 960-967.