·药材与资源·

多胺介导真菌诱导子促进白桦三萜积累的初步研究

刘英甜，王晓东，周文洋，詹亚光，范桂枝*
东北林业大学生命科学学院，黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: 目的 明确内源多胺是否介导真菌诱导子诱导白桦三萜的合成。**方法** 将 40 μg/mL 真菌诱导子、1 mmol/L 腐胺（Put）和 2 mmol/L 多胺合成抑制剂 *D*-精氨酸（*D*-Arg）添加到培养 8 d 的白桦悬浮培养体系中，利用 HPLC 法和比色法分析多胺量和三萜量。采用药理学和恢复实验分析多胺在真菌诱导子诱导白桦三萜合成中的作用。**结果** 真菌诱导子或 Put 处理后，白桦悬浮细胞中的多胺量、三萜量和产量均呈增加趋势，其中处理 24 h 时，三萜量达最大值，分别增加了 68.54%和 30.34%。真菌诱导子和 Put 共同处理虽提高了三萜量，但其产量却低于真菌诱导子单独处理。真菌诱导子和 *D*-Arg 共同处理后三萜量低于真菌诱导子单独处理，处理 24 h 时降低程度最高，为 40.57%。恢复实验发现，随着恢复时间的延长，真菌诱导子、Put 以及真菌诱导子与 *D*-Arg 对白桦三萜合成的影响逐渐减弱，恢复到对照水平。**结论** 多胺介导了真菌诱导子促进白桦悬浮细胞中三萜的合成。

关键词：白桦；多胺；真菌诱导子；三萜；腐胺；*D*-精氨酸
中图分类号：R282.21 **文献标志码**：A **文章编号**：0253 - 2670(2014)05 - 0695 - 06
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.019

Polyamine-mediated triterpenoid synthesis in suspension cells of *Betula platyphylla* induced by fungal elicitor

LIU Ying-tian, WANG Xiao-dong, ZHOU Wen-yang, ZHAN Ya-guang, FAN Gui-zhi
College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To clarify whether polyamine-mediated triterpenoid synthesis in birch (*Betula platyphylla*) suspension cells induced by fungal elicitor. **Methods** Fungal elicitor (40 μg/mL), putrescine (Put, 1 mmol/L), and *D*-arginine (*D*-Arg, 2 mmol/L) were added to the eight-day-old suspension cell culture, the content changes of triterpenoid and free polyamines were analyzed by chemical colorimetry and HPLC. The effect of polyamine on triterpenoid synthesis in *B. platyphylla* suspension cells induced by fungal elicitor was analyzed by pharmacology and restoration experiment. **Results** After the treatment of fungal elicitor or Put, the contents and yields of free polyamines and triterpenoid were increased. Among of them, the triterpenoid content was the highest after 24 h treatment, the increasing rates were 68.54% and 30.34%, respectively. The triterpenoid content was increased by the cotreatment of fungal elicitor and Put, but the increasing degree of yield was lower than that by the treatment of fungal elicitor alone. Compared with the fungal elicitor alone, the cotreatment of fungal elicitor and *D*-Arg decreased the triterpenoid content by 40.57% in the highest degree of decreasing after 24 h treatment. In restoration experiment, with the treatment time prolonging, the effect of fungal elicitor, Put, or cotreatment of fungal elicitor and *D*-Arg on triterpenoid synthesis was decreasing to the control level finally. **Conclusion** Polyamine could mediate the triterpenoid synthesis in cells of *B. platyphylla* induced by fungal elicitor.

Key words: *Betula platyphylla* Suk.; polyamine; fungal elicitor; triterpenoid; putrescine; *D*-arginine

以细胞全能性为基础建立起来的植物细胞培养技术为植物有用物质的生产提供了一条新途径，由于利用细胞培养法生产植物天然活性物质具有不依赖和消耗自然植物资源的特点，被视为是从根本上

收稿日期：2013-11-13
基金项目：中央高效基本科研业务专项资金项目（DL13EA08-03）；国家自然科学基金资助项目（31100445，31070531）；黑龙江省博士后科研启动金（415288）
作者简介：刘英甜，硕士研究生，现从事植物细胞工程领域的研究。E-mail: 864857011@qq.com
*通信作者 范桂枝 Tel: (0451)82191752 E-mail: gzf325@126.com

解决植物天然活性物质生产可持续发展问题的一种新型生物技术。如产紫杉醇的红豆杉细胞生产已发展到中试和工业化规模[1]。但是植物细胞中次生代谢产物的低产现象也是制约其产业化应用的核心问题之一[2-3]。

在应用植物细胞培养生产药用植物次生代谢物的研究中，利用真菌诱导子处理植物培养细胞以促使细胞快速、大量合成有用次生物质已成为常用的提高植物组织培养中的次生代谢产物量的有效手段之一[4]。在植物细胞培养中，真菌诱导子能诱导生物碱、酚类、萜类、皂苷、黄酮类化合物、香豆素、迷迭香酸等多种次生代谢产物[1]，如真菌诱导子使亚麻细胞中足叶草毒素量增加了 7 倍[5]；黑曲霉真菌诱导子使红豆杉中的紫杉醇产量比对照提高了 7 倍[6]。然而植物次生代谢调控是一个十分复杂的信号转导系统，近年来真菌诱导子诱导次生代谢产物合成的信号机制研究虽然有一定的进展，但是目前离完全了解植物次生代谢信号转导机制还有很大距离。

多胺是一种广泛存在于自然界中具有生物活性的小分子化合物，常见的游离态多胺主要包括腐胺（putrescine, Put）、精胺（spermine, Spm）、亚精胺（spermidine, Spd）[7]。多胺对植物有着广泛的生理作用，特别是在植物抵抗生物/非生物胁迫过程中刺激植物发生防御反应。近期的研究发现多胺具有调控植物次生代谢产物合成的作用，如多胺能促进甜菜的毛状根中甜菜红碱的合成[8]；Margarita 等[9]研究发现，在钙缺乏的条件下多胺能调控水飞蓟细胞培养物中水飞蓟素的产生。

前期的研究表明，白桦酯醇和齐墩果酸等三萜物质可以在白桦 *Betula platyphylla* Suk. 愈伤组织中积累[10-12]，并且从多种白桦内生真菌中筛选到了有效提高三萜积累的真菌诱导子，并优化了其诱导条件[13]。同时，研究还发现，外源多胺促进了白桦悬浮细胞中三萜的合成，其中腐胺的诱导效果最好[14]。内源多胺是否介导真菌诱导白桦三萜的合成还未见报道。因此，本研究将分析真菌诱导的内源多胺对白桦三萜积累的调控作用，该研究对阐明真菌诱导子诱发植物次生代谢产物合成的信号转导机制具有重要意义。

1 材料与仪器

白桦 *Betula platyphylla* Suk. 母树取自东北林业大学白桦强化种子园 5～7 年生嫁接优树（接穗 30 年生），由詹亚光教授鉴定，外植体取自其诱导的组培苗。

HY—6A 双层振荡器，三萜量采用 UV—2800 紫外分光光度计比色测定，多胺量采用 Waters 公司的高效液相色谱仪分析。*D*-精氨酸（*D*-Arg）、Put、Spm 和 Spd、齐墩果酸均来自于 Sigma 试剂公司。

2 方法

2.1 白桦愈伤悬浮细胞的培养

将白桦愈伤组织接种于 B5 液体培养基中，附加 0.1 mg/L 6-BA＋0.01 mg/L TDZ，蔗糖浓度为 20 g/L，pH 5.5～6.0。250 mL 摇瓶中盛有 90 mL 培养液，每瓶接种鲜质量 4 g 的愈伤组织，每隔 15 d 继代 1 次，培养温度为 25～27 ℃，光照强度为 2 000 lx，光照 16 h/d，摇床转速为 120 r/min。

2.2 真菌诱导子的制备与添加

将本实验室分离的白桦内生真菌 *Phomopsis* sp. 在 PDA 液体培养基中发酵培养 10 d，121 ℃高压灭菌 20 min 后作为诱导子加入白桦悬浮培养液中，诱导子浓度以糖浓度表示，以葡萄糖为标准，用蒽酮比色法测定。

将 40 μg/mL 真菌诱导子添加培养 8 d 的白桦悬浮培养体系中，处理后 48 h 后更换到新鲜培养液中继续培养 48 h，取样测定白桦悬浮细胞的活力、干质量、多胺量和白桦三萜产量。对照加入等体积无菌水，每处理重复 3 次。

2.3 *D*-Arg 的添加

多胺抑制剂 *D*-Arg 的添加终浓度为 2 mmol/L。添加的 *D*-Arg 溶液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过除菌后，添加到培养 8 d 的白桦悬浮培养体系中，添加 *D*-Arg 20 min 后再添加真菌诱导子，对照（CK）加入等体积无菌水，每处理重复 3 次。

2.4 细胞活力的测定

取白桦悬浮细胞鲜样 0.20 g，加入 2.5 mL 现配的 0.4%氯化三苯四氮唑（TTC），再加入 2.5 mL PBS 缓冲液（pH 7.0），常温下暗处理 14 h。去除上清溶液，用 5 mL 蒸馏水清洗细胞，待细胞沉淀静止后，吸去上清再次洗涤细胞，共重复 3 次。用 5 mL 95% 乙醇脱色处理，于 60 ℃水浴 30 min，每隔 5 min 轻晃倒置试管摇匀。待细胞沉淀后用紫外分光光度计测定上清溶液的吸光度（*A*）值，即代表细胞活力，*A* 值大则细胞活力强[15]。

2.5 三萜量的测定

三萜的提取采用超声波醇提法，利用紫外分光光

度计法测定其量[16-17]。将白桦悬浮细胞烘干至恒质量后，研磨成粉末状，每样品称量 0.05 g，加入 2 mL 95%乙醇浸提过夜，重复提取 3 次，将提取液混合。于 70 ℃水浴 1 h，超声（10 kHz）提取 40 min，静置沉淀后滤过，取上清溶液 70 ℃水浴蒸干，加入 200 μL 5%香草醛-冰醋酸混合液（现用现配）和 800 μL 高氯酸，继续 70 ℃水浴反应 15 min，反应结束后迅速冷却，醋酸乙酯定容到 5 mL，混合均匀。空白对照加入同样试剂。以紫外分光光度计 551 nm 测定 *A* 值。

采用齐墩果酸对照品制作标准曲线，以 *A* 值为纵坐标（*Y*），齐墩果酸质量浓度为横坐标（*X*），得回归方程为 *Y*＝0.022 2 *X*＋0.000 9，在 0～0.030 mg/mL 内具有良好的线性关系，*r* 为 0.995 6。

2.6 多胺量的测定

多胺的量采用 HPLC 法测定[18]，取待测样品 2 g（鲜质量），利用 4 mL 现配制预冷的 5%高氯酸，在冰上研磨至黏稠状。置于冰上浸提 1 h，以 15 000×*g*，30 min，4 ℃离心。吸取上清溶液 500 μL，添加 7 μL 苯甲酰氯和 1 mL 2 mol/L NaOH，涡旋振荡 20～30 s。放置于 37 ℃水浴保持 20 min，水浴后加入 2 mL 饱和 NaCl 溶液，加入 2 mL 无水乙醚进行萃取，以 1 500×*g* 离心 5 min。吸取 1 mL 上层醚相将其真空干燥。用 1 mL 64%色谱甲醇溶解，膜（0.45 μm）滤过，取 20 μL 进样。

色谱条件：色谱柱 HiQ sil C_{18} （250 mm×4.6 mm ，5 μm）；流动相甲醇-水（64∶36）；检测波长 230 nm，体积流量 0.8 mL/min，柱温 30 ℃，进样体积 20 μL。

以 Put、Spd、Spm 各峰面积为纵坐标（*Y*），各对照品浓度为横坐标（*X*）制作标准曲线，回归方程为 Put：*Y*＝2 651 020 *X*＋7 155.5；Spd：*Y*＝2 928 494 *X*＋6 773；Spm：*Y*＝2 696 128 *X*－11 351.5，*r* 分别为 0.999 9、0.999 9、0.999 8，在 0.025～0.45 nmol/μL 线性关系良好。

3 结果与分析

3.1 真菌诱导子与 Put 对白桦悬浮细胞活力的影响

将 40 μg/L 真菌诱导子、1 mmol/L Put、真菌诱导子与 Put、真菌诱导子与多胺合成抑制剂 *D*-Arg 分别添加到培养 8 d 的白桦悬浮培养体系中，处理 48 h 后将细胞转移至新鲜培养液中恢复处理 48 h，TTC 法分析白桦悬浮细胞活力。由图 1 可知，Put 处理使白桦悬浮细胞活力提高了 0.31%～12.71%，其中 Put 处理 24 h 达到最大值

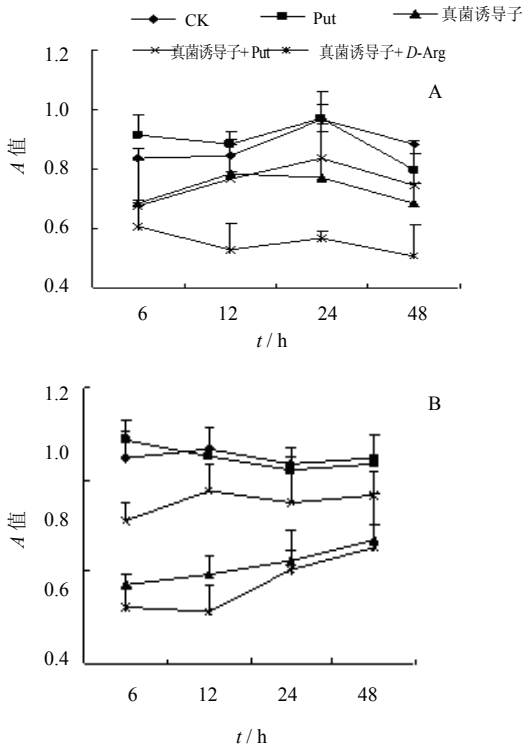

图 1 处理 (A) 和恢复处理 (B) 下白桦悬浮细胞活力的变化

Fig. 1 Changes of cell viability in birch (B) suspension cells under treatment (A) and restoration treatment

0.97；真菌诱导子处理后白桦悬浮细胞活力下降了 7.09%～22.34%，恢复处理后细胞活力有增加趋势，但未达到对照水平；在真菌诱导子处理的白桦细胞中添加 Put 后，细胞活力比真菌诱导子处理单独处理呈上升趋势，但未恢复到对照水平；在真诱导子处理的白桦细胞中添加 *D*-Arg 后，细胞活力下降了 25.71%～42.21%，恢复处理后细胞活力有增加趋势，但未达到对照水平。由上述结果可知，真菌诱导子抑制了细胞的生长，恢复处理或添加 Put 均能使细胞活力增加。

3.2 真菌诱导子与 Put 对白桦悬浮细胞干质量的影响

由图 2 可知，Put 处理使细胞的干质量提高了 2.15%～13.95%，在恢复处理后 Put 对细胞干质量积累的促进效应逐渐减弱，到恢复 24 h 时已接近对照水平；真菌诱导子处理后细胞干质量降低了 4.43%～25.67%，恢复处理后细胞干质量呈增加趋势，但未达到对照水平；在真菌诱导子处理的培养体系中添加 Put，在处理 24 h 后细胞干质量呈上升趋势，但未恢复到对照水平；在真菌诱导子处理的白桦细胞中添加 *D*-Arg，细胞干质量降低了 14.03%～24.69%，恢复处理后细胞干质量呈增加趋

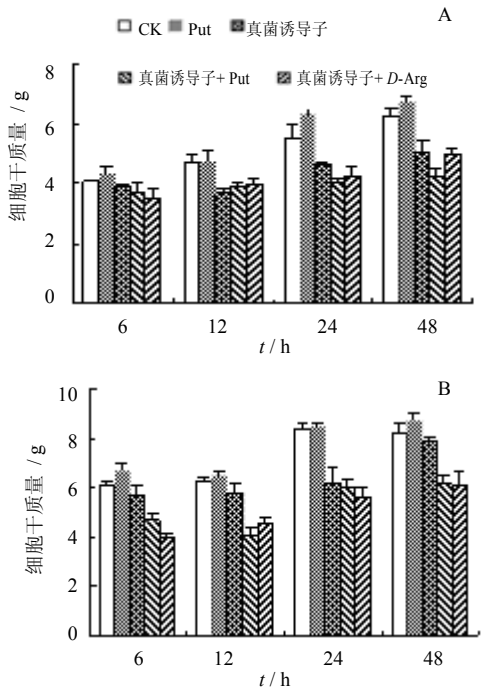

图 2 处理 (A) 和恢复处理 (B) 白桦悬浮细胞干质量的变化

Fig. 2 Changes of dry weight in birch suspension cells under treatment (A) and restoration treatment (B)

势，但未达到对照水平。由上述结果可知，真菌诱导子抑制了细胞的生长，恢复处理或添加 Put 均能使细胞干质量增加，该结果与细胞活力一致。

3.3 真菌诱导子与 Put 对白桦悬浮细胞中多胺量的影响

由表 1 可知，Put 处理后白桦悬浮细胞中 Put 量在 6～24 h 内迅速上升，比对照增加了 37～63 倍，而 Spd 量增幅较小，最大值为 48 h 时的 4.8 倍。真菌诱导子处理后，细胞中 Put 和 Spd 的量均有不同程度地增加，Put 在真菌诱导后 12 h 达最高值，比对照增加了 293%；Spd 在诱导后 12 h 达最大值，比对照增加了 12.70%，但随处理时间延长多胺量开始下降。Put 与真菌诱导子共同作用下，Put 的量相比单独 Put 处理低 25.7%（6 h）～4.49%（12 h），但从 24 h 开始，细胞中 Put 量显著上升，在 48 h 时比对照增加了 57.59%。细胞中 Spd 量的变化趋势同 Put，表明在真菌诱导子诱导下，多胺量在 24～48 h 有明显上升趋势。在真菌诱导的白桦悬浮体系中添加 *D*-Arg 后，白桦细胞中 Put 和 Spd 量均比单独真菌诱导子处理降低。

表 1 白桦悬浮细胞多胺量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Changes of polyamines content in birch suspension cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

处理时间 / h	处理方式	处理		恢复处理	
		Put / (nmol·g^{-1})	Spd / (nmol·g^{-1})	Put / (nmol·g^{-1})	Spd / (nmol·g^{-1})
6	CK	0.74±0.05	11.89±1.21	0.36±0.00	4.79±0.00
	Put	28.02±1.95	9.04±1.05	27.75±0.76	5.44±0.64
	真菌诱导子	1.11±0.08	13.40±0.00	0.21±0.01	4.06±0.33
	真菌诱导子＋Put	20.82±1.90	6.88±0.31	30.97±1.98	7.66±0.92
	真菌诱导子＋*D*-Arg	0.16±0.01	5.12±0.67	0.45±0.04	6.23±0.31
12	CK	0.87±0.08	13.69±0.50	1.17±0.01	3.57±0.04
	Put	44.95±1.76	8.13±0.60	20.96±1.82	5.24±0.48
	真菌诱导子	3.42±0.14	14.31±1.79	0.72±0.05	2.86±0.45
	真菌诱导子＋Put	42.93±1.17	11.81±0.20	13.09±1.82	4.89±0.64
	真菌诱导子＋*D*-Arg	1.07±0.04	5.39±0.40	2.70±0.08	7.24±0.52
24	CK	1.23±0.08	12.31±0.24	2.25±0.06	19.14±1.27
	Put	77.65±1.94	10.31±0.99	6.33±0.73	8.16±0.64
	真菌诱导子	2.45±0.06	6.60±0.33	1.39±0.03	8.68±0.63
	真菌诱导子＋Put	69.98±1.32	6.43±0.40	18.68±1.11	14.40±0.78
	真菌诱导子＋*D*-Arg	0.99±0.02	6.04±0.31	0.93±0.03	9.95±0.20
48	CK	1.46±0.03	10.08±0.35	2.86±0.06	6.89±0.89
	Put	44.05±1.01	48.30±0.18	6.73±0.65	18.69±0.92
	真菌诱导子	1.01±0.02	5.68±0.23	1.56±0.02	11.92±0.87
	真菌诱导子＋Put	69.42±1.60	9.30±0.05	16.08±1.00	8.84±0.22
	真菌诱导子＋*D*-Arg	1.15±0.03	4.55±0.03	0.46±0.02	8.66±0.32

Put 处理的细胞恢复培养后，Put 和 Spd 的量有所下降，但仍然高于对照水平。真菌诱导子处理的细胞在恢复后细胞内多胺量逐渐降低到对照水平。真菌诱导子与 *D*-Arg 处理的细胞经恢复培养后，多胺量呈先增加后降低趋势。

3.4 真菌诱导子与 Put 对白桦悬浮细胞中三萜产量的影响

由图 3 可知，Put 处理后三萜量和产量呈增加趋势，在 24 h 时增幅最大，三萜量和产量分别比对照提高了 30.34%和 48.52%，在恢复处理后 Put 对白桦三萜积累的促进效应逐渐减弱，到 48 h 时已接近对照水平；真菌诱导子处理后三萜量和产量也呈增加趋势，在 24 h 增幅最大，三萜量和产量分别比对照提高了 68.54%和 41.31%，在恢复处理 12 h 后这种促进效应明显降低，到 48 h 时已接近对照水平；真菌诱导子与 Put 同时处理下，三萜产量的增幅与单独真菌诱导处理相近，未进一步增加，而三萜产量却低于单独真菌诱导或 Put 处理。在恢复处理后这种促进效应降低，随着恢复时间的延长逐渐接近对照水平；在真菌诱导与 *D*-Arg 同时处理下，三萜量和产量的积累量明显降低，三萜量降低了 11.36%～40.57%，在恢复处理后这种抑制效应被逐渐缓解。从上述结果可知，真菌诱导子与 Put 处理均促进了三萜的合成，而在真菌诱导子的白桦悬浮体系中添加多胺合成抑制剂抑制 *D*-Arg 后，这种促进效应被部分抑制了。

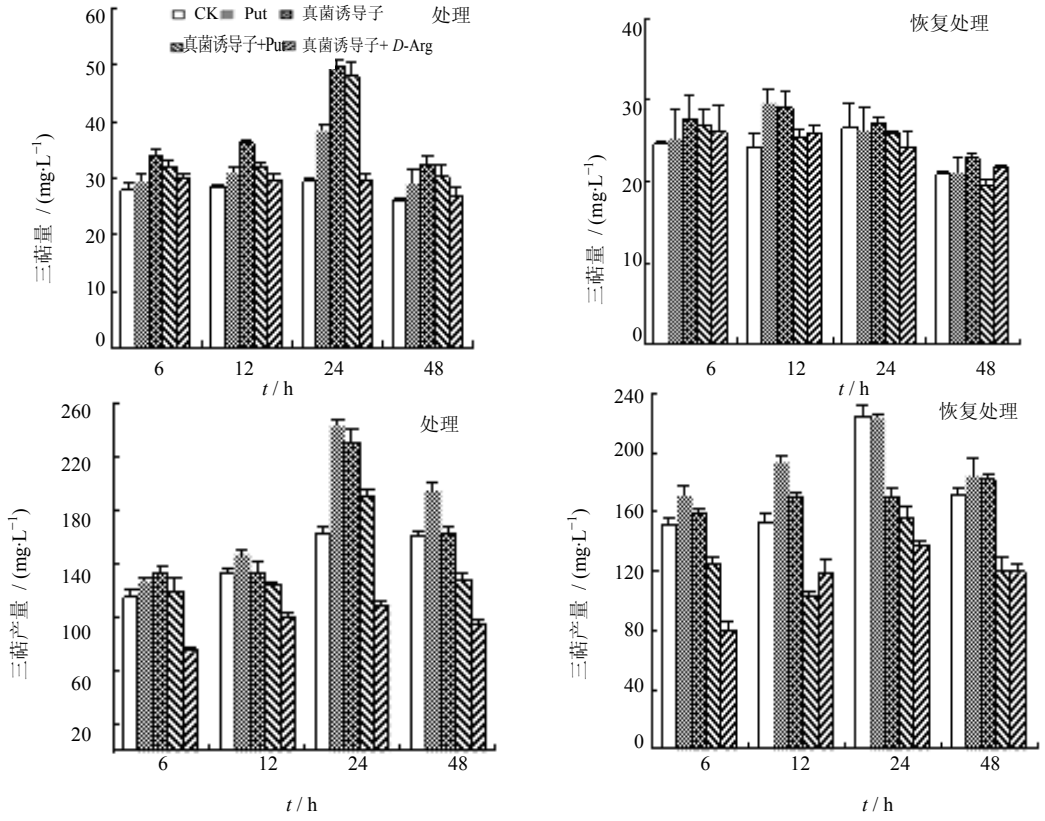

图 3 白桦悬浮细胞中三萜量和产量的变化

Fig. 3 Changes of triterpenoid content and yield in birch suspension cells

4 讨论

多胺量的增加和次生代谢产物合成积累是植物在病原微生物侵染等逆境胁迫下常见的 2 种主动防御反应。Qin 等[19]的研究发现，真菌诱导子可以引起植物细胞中多胺量的增加。而将多胺添加到培养的植物细胞中可以使黄酮、萜类等次生代谢产物量增加[20-23]。同样，本研究也发现真菌诱导子提高了白桦悬浮细胞中多胺量和三萜产量。由此可知，真菌诱导子促进了多胺量和次生代谢产物的增加。那么，多胺是否介导真菌诱导次生代谢物的合成，尤其是是否介导真菌诱导白桦三萜的积累还未见报道。

在前期的研究中，本课题组发现外源多胺促进了白桦三萜的合成，且 Put 促进效果最佳。将真菌

诱导子添加到白桦悬浮体系中发现，真菌诱导子促进了多胺量的增加，其中 Put 量的增加量大于 Spd 量，而另外一种多胺即 Spm，在本实验中未检测到，可能是量较低的原因。因此，本研究中外源多胺的添加种类为 Put。

本研究通过药理学实验发现，在真菌诱导子与多胺合成抑制剂 *D*-Arg 同时处理下，白桦悬浮细胞中的多胺量和三萜产量比真菌诱导子或 Put 单独处理下显著降低，但仍高于对照。进一步通过恢复实验发现，真菌诱导子和外源 Put 对白桦三萜的促进效应，随着恢复培养时间的延长而降低，最终恢复到对照水平；而真菌诱导子与多胺合成抑制剂 *D*-Arg 同时处理下，白桦悬浮细胞中降低的多胺量和三萜产量成呈上升趋势，随着恢复时间的延长逐渐达到对照水平。由此初步推测，多胺介导了真菌诱导白桦三萜的合成过程。

综上所述，真菌诱导的内源多胺介导了真菌诱导子诱导白桦三萜合成的过程，但是具体通过哪些信号之间的转导，通过哪些下游途径调控白桦三萜的合成仍需要进一步的研究和探讨。

参考文献

[1] 马 玺, 马 英, 刘 威, 等. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇 [J]. 药物生物技术, 2004, 11(6): 401-405.

[2] Nims E I, Dubois C P, Roberts S C, *et al*. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering [J]. *Metab Eng*, 2006, 8: 385-394.

[3] 肖文海. 东北红豆杉细胞培养过程中细胞分化与次生代谢间关系的系统分析 [D]. 天津: 天津大学, 2010.

[4] Xu M J, Dong J F, Zhu M Y. Nitric oxide mediates the fungal elicitor-Induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 991-998.

[5] Bahabadi S E, Sharifi M, Behmanesh M, *et al*. Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album* [J]. *J Plant Physiol*, 2012, 169(5): 487-491.

[6] Wang C, Wu J, Mei X. Enhancemet of Txaol Production and excre-tion in *Taxus chniensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(4): 404-410.

[7] Walden R, Cordeiro A, Tiburcio A F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development [J]. *J Plant Physiol*, 1997, 113: 1009-1013.

[8] Hwang S J, Kim K S, Pyo B S, *et al*. Saponin production by hairy root cultures of *Panax ginseng* CA Meyer: influence of PGR and polyamines [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 1999, 4: 309-312.

[9] Cacho M, Domínguez A T, Elena-Rosselló J A. Role of polyamines in regulating silymarin production in *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Asteraceae) cell cultures under conditions of calcium deficiency [J]. *J Plant Physiol*, 2013, 170(15): 1344-1348.

[10] Fan G Z, Li X C, Wang X D, *et al*. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk [J]. *Afr J Biotechnol*, 2010, 9(19): 2816-2820.

[11] 范桂枝, 翟俏丽, 于海娣, 等. 白桦细胞悬浮培养产三萜及其营养成分消耗的动态 [J]. 林业科学, 2011, 47(1): 62-67.

[12] 范桂枝, 王 博, 詹亚光, 等. 光处理对白桦愈伤组织生长及其三萜物质积累的影响 [J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(1): 1-3.

[13] 翟俏丽. 真菌诱导子促进白桦悬浮细胞中三萜合成机理的初步研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.

[14] 王晓东. PAs、NO 和 H_2O_2 在真菌促进白桦三萜合成中的对话研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.

[15] 刘 华, 梅兴国. TTC 法测定红豆杉细胞活力 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 537-539.

[16] 张 泽, 孙 宏. 高效液相色谱法测定白桦树皮中白桦酯醇的含量 [J]. 林产化学与工业, 2004, 24(l): 61-63.

[17] Shrishailappa B, Gapta M K, Salavanan R. Detection of betulin in *Grewia tiliaefolia* by HPLC [J]. *J Sep Sci*, 2004, 27: 129-131.

[18] 刘 俊, 吉晓佳, 刘友良, 等. 检测植物组织中多胺含量的高效液相色谱法 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 596-598.

[19] Qin W M, Lan W Z. Fungal elicitor-induced cell death in *Taxus chinensis* suspension cells is mediated by ethylene and polyamines [J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 989-995.

[20] Shinde A N, Malpathak N, Fulzele D P. Optimized production of isoflavones in cell cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor [J]. *Feeding Biotechnol Bioproc Eng*, 2009, 14: 612-618.

[21] Christen A A, Gibson D M, Bland J. Production of taxal or txaol-likecompounds in cell calture [J]. *US Patent*, 1991, 50: 190-193.

[22] Ozawa R, Bertea C M, Foti M, *et al*. Exogenous polyamines elicit herbivore-induced volatiles in lima bean leaves: involvement of calcium, H_2O_2 and jasmonic acid [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(12): 2183-2199.

[23] Suresh B, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, *et al*. Polyamine and methyl jasmonate influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments [J]. *Process Biochem*, 2004, 39: 2091-2096.