

真菌诱导子对白桦悬浮体系中 N 和 P 的吸收利用和三萜合成的影响

王晓东, 李晓灿, 翟俏丽, 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** 分析真菌诱导的白桦悬浮体系中 N、P 的吸收利用和三萜合成的关系。**方法** 在白桦悬浮细胞的生长末期添加 40 $\mu\text{g/mL}$ 真菌诱导子, 采用比色法分析真菌诱导后白桦悬浮体系中 N、P 和三萜量的变化。**结果** 白桦细胞的干质量、三萜量和产量随着真菌处理时间的延长表现为逐渐降低趋势。其中, 三萜量和产量均于真菌诱导后第 1 天达到最高, 分别为 21.98 mg/g 和 123.82 g/L, 约为对照的 2 倍; 白桦悬浮体系的 pH 值和电导率在真菌诱导后第 1 天达到高峰, pH 值增长了 6.10%, 电导率增加了 8.20%; 除细胞内磷酸根质量分数在诱导的第 1、2 天分别降低了 28.67%、15.68% 外, 真菌诱导使白桦悬浮培养体系中硝酸根、铵根、磷酸根量基本呈增加趋势。进一步相关性分析发现, 真菌诱导使胞外磷酸根、铵根和硝酸根质量分数与三萜量的相关性显著提高。**结论** 真菌诱导后白桦三萜合成的增加可能与磷酸根、硝酸根和铵根质量分数的变化相关。**关键词:** 白桦; 悬浮细胞; 三萜; 氮; 磷; 真菌诱导子

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)10-2119-06

Effect of fungal elicitors on N and P utilization and triterpene synthesis of *Betula platyphylla* suspension cell culture system

WANG Xiao-dong, LI Xiao-can, ZHAI Qiao-li, ZHAN Ya-guang, FAN Gui-zhi

College of Life Sciences; Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To analyze the relationship of N and P utilization and triterpene synthesis in birch (*Betula platyphylla*) suspension cell culture system induced by fungal elicitor. **Methods** Fungal elicitors (40 $\mu\text{g/mL}$) were added to the 8-day-old birch suspension cell culture, the change of N and P and triterpene content were analyzed by chemical colorimetry. **Results** The dry weight, triterpene content, and triterpene yield of birch cell decreased with the extension of fungal treatment time. Among them, triterpene content and yield were the highest after 1 d fungal induction, they were 21.98 mg/g and 123.82 g/L, respectively, about two times of the control. The pH value and conductivity of birch cell culture also reached a peak after 1 d fungal treatment with increase by 6.10% and 8.20%, respectively. The contents of nitrate, ammonium, and phosphate increased after fungal treatment, but the content of phosphate was reduced after day 1 and 2 induction by 28.67% and 15.68%. The correlations between phosphate, ammonium, nitrate and triterpenoid contents in birch cell medium were improved significantly after fungal treatment. **Conclusion** It is reasoned that increased synthesis of triterpenes after fungal elicitors inducement may be related to the concentration changes of phosphate, ammonium, and nitrate.

Key words: *Betula platyphylla* Suk., suspension cell, triterpenes, nitrogen and phosphorus, fungal elicitor

三萜类成分为白桦树皮的主要活性成分之一^[1-2], 研究表明, 白桦三萜具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、调脂、利胆和保肝等作用, 特别是白桦酯醇、白桦酯酸等三萜物质作为天然药物在抗肿瘤和抗 HIV 等活性上显示出了与以往药物不同的作用机制, 靶向作用性更强, 几乎无不良反应^[3-9]。因此, 白桦三萜作为药物化学中的先导化合物而逐渐受到

研究者的关注。

从白桦树皮中分离和提取白桦三萜不仅数量有限, 而且会造成白桦资源的损失, 破坏生态平衡。组织培养技术为林木无性繁殖提供了一种快速而高效的方法, 是解决植物资源可持续发展和有用次生产物生产的有效途径。本实验室的前期研究已经建立了白桦细胞的悬浮培养体系, 并证实白桦酯醇和

收稿日期: 2010-12-11

基金项目: 中央高校基本科研业务专项资金项目 (DL09BA05, DL12CA05); 黑龙江省自然科学基金重点项目 (ZD200918); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12513037)

作者简介: 王晓东, 在读硕士, 从事植物细胞工程领域的研究。E-mail: wxdyt3@163.com

*通讯作者 范桂枝 Tel: (0451)82191752 E-mail: gzf325@126.com

齐墩果酸等三萜物质可以在白桦愈伤组织中积累^[10],但其白桦三萜的量明显低于树皮中,成为制约白桦三萜生产的关键问题之一。三萜类化合物属于植物植保素的一种,在植物受到病原菌侵染时其合成会增加。真菌诱导子是来源于真菌的一种诱导物,能够促进植物细胞发生防御反应,激活特定基因的表达,促进次生代谢产物的合成,是目前提高细胞培养中次生产物积累的常用方法之一。在许多植物细胞培养中都已成功应用真菌诱导子来促进代谢产物的积累^[11]。

在植物组织培养中,氮源对调节植物培养物的生长发育和次生代谢物的生物合成具有显著作用^[12-13]。研究表明,改变培养液中氮的总量以及氨态氮和硝态氮的比例可显著改变培养物中的花青素、三萜皂苷等次生代谢物的量^[14-15]。真菌诱导子诱导次生代谢物的积累能否改变或加强培养细胞对培养液物质的吸收和利用,对此方面的报道却很少。因此,本实验将利用有利于白桦三萜积累的内生真菌为诱导子,研究真菌诱导子对白桦悬浮细胞pH值、电导率、硝酸盐、铵盐和磷酸盐的影响,并比较其与白桦三萜积累的关系,试图从生理方面揭示真菌诱导子刺激次生代谢物合成的机制。

1 材料与仪器

白桦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),外植体取自其诱导的组培苗。

HY—6A双层振荡器(金坛市精达仪器制造厂),PHS—3C pH酸度计(上海楚柏实验室设备有限公司),DDS—11 A型电导率测定仪(上海沪粤明科学仪器有限公司),UV—2800 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

2 方法

2.1 白桦组培苗茎段愈伤组织诱导

白桦组培苗茎段进行愈伤组织诱导,NT 固体培养基,其中包括0.1 mg/L 6-BA、0.01 mg/L TDZ,20 g/L 蔗糖、5.3 g/L 琼脂、pH 6.0~6.5。每20~25天继代1次,多次继代后将松散愈伤组织接入不加琼脂的NT 液体培养基中悬浮培养,250 mL 摇瓶中盛有90 mL 培养液,pH 5.5~6.0,每瓶接种4 g 鲜质量的愈伤组织,每隔15 d 继代1次,培养温度为25~27 ℃,光照强度为2 000 lx,每天光照16 h,摇床转速为120 r/min。

2.2 真菌诱导子的制备和添加

将白桦内生真菌的菌丝在PDA液体培养基中发酵培养10 d,将菌体匀浆,121 ℃高压灭菌20 min后作为真菌诱导子加入白桦悬浮培养液中,诱导子质量浓度以糖质量浓度表示,以葡萄糖为对照,用蒽酮比色法测定^[16]。

在细胞生长的指数末期添加40 μg/mL 真菌诱导子,分别培养1、2、4、6、8、10 d后收获细胞。对照加入等体积的无菌水,每种处理重复3次。

2.3 三萜类化合物的提取和测定

三萜类成分采用紫外分光光度法测定^[17]。将收获的白桦细胞烘干、研磨,称取0.1 g样品加入4 mL 95%乙醇浸泡过夜,70 ℃水浴提取1 h,10 kHz超声提取40 min,10 000 r/min离心10 min,移取100~200 μL上清,70 ℃水浴蒸干。加入200 μL新配制的5%香草醛-冰醋酸溶液和800 μL高氯酸,摇匀,70 ℃水浴15 min,流水冷却至室温,加醋酸乙酯定容至5 mL,551 nm处测定吸光度(A)值。

以白桦酯醇为对照品作标准曲线。以白桦酯醇质量浓度为纵坐标(Y),A值为横坐标(X),得回归方程为 $Y=0.0871X+0.0002$, $r=0.9995$,在3.3~24 mg/L内具有良好的线性关系。

2.4 硝酸根、铵根和磷酸根离子的测定^[18]

硝酸根离子采用水杨酸-浓硫酸法测定,在410 nm处测定A值。以硝酸钾质量为纵坐标(Y),A值为横坐标(X),得测定标准曲线为 $Y=158.42X+0.3495$, $r=0.9992$,表明硝酸根离子在0.01~1.2 μg/mL有良好的线性关系。

铵根离子的测定方法为苯酚-次氯酸盐法。在625 nm处测定A值。以硫酸铵质量为纵坐标(Y),A值为横坐标(X),得标准曲线 $Y=31.24X+0.0399$, $r=0.9997$,表明铵根离子在0.3~1.8 μg/mL具有良好的线性关系。

磷酸根离子采用磷钼蓝法测定。在660 nm处测定A值。以磷酸二氢钾质量为纵坐标(Y),A值为横坐标(X),得标准曲线 $Y=53.539X+0.4641$, $r=0.9995$,表明磷酸根离子在8.7~43.9 μg/mL具有良好的线性关系。

3 结果与分析

3.1 真菌诱导子对白桦悬浮细胞生长和三萜合成的影响

在真菌诱导子诱导处理的10 d内,白桦细胞的干质量随着处理时间的延长表现为逐渐降低趋势(图1-A)。其中,白桦细胞干质量的积累量从第2

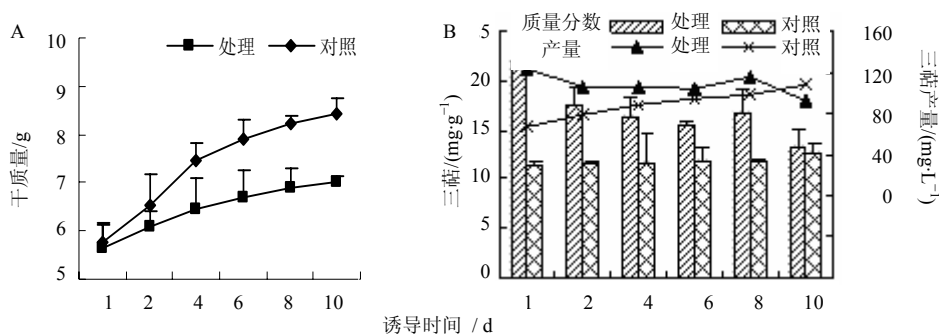


图 1 真菌诱导子对白桦悬浮细胞干质量 (A) 和三萜合成 (B) 的影响

Fig. 1 Effect of fungal elicitor on dry weight (A) and triterpene synthesis (B) of birch suspension cell culture

天开始明显低于对照, 到第 10 天降低幅度达到最大, 比对照细胞的干质量降低了 1.42 g, 降低率为 16.86%。

白桦细胞中三萜积累量对真菌诱导子的响应表现为随着诱导时间的延长真菌诱导子刺激三萜积累量呈逐渐降低趋势 (图 1-B)。其中, 白桦三萜的量和三萜产量均于真菌诱导子诱导 1 d 后达到最高, 分别为 21.98 mg/g 和 123.82 g/L, 约为对照的 2 倍。

3.2 真菌诱导子对白桦悬浮细胞培养液 pH 值和电导率的影响

在真菌诱导子处理的 10 d 内, 白桦细胞培养的

pH 值表现为逐渐降低趋势 (图 2-A)。其中, 在真菌诱导子与白桦细胞共培养的第 1 天, 真菌诱导使白桦细胞培养液的 pH 值由对照的 5.46 变为 5.80, 增长了 6.10%, 进一步分析表明, pH 值在真菌诱导处理与对照间的差异达到显著水平。在真菌诱导子诱导的 4、6、8、10 d 内, 白桦细胞培养液的 pH 值却比对照的分别降低了 2.86%、9.36%、0.11%、0.90%。

真菌诱导后电导率的变化趋势为先升高后降低再升高的趋势 (图 2-B)。与对照相比, 在真菌诱导后的 1 d 和 10 d, 培养液的电导率分别达到两个高峰, 第 1 天比对照增加了 8.20%, 第 10 天增加了 25.75%。

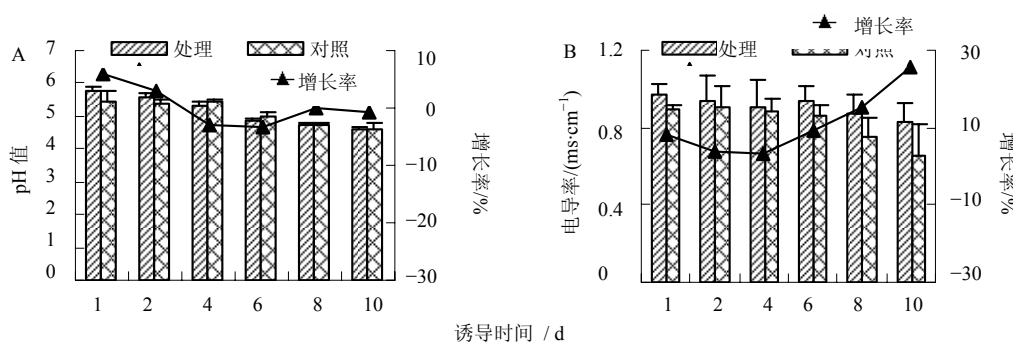


图 2 真菌诱导子对白桦悬浮细胞培养液 pH 值 (A) 和电导率 (B) 的影响

Fig. 2 Effect of fungal elicitor on pH value (A) and conductivity (B) of birch suspension cell culture

3.3 真菌诱导子对白桦细胞内外磷酸根、铵根、硝酸根质量分数的影响

与对照相比, 白桦细胞内的铵根量和硝酸根量随着真菌诱导时间的延长而增加 (图 3), 铵根量在第 8 天达到最大, 分别比对照增加了 26.27%, 硝酸根量在第 6 天增加了 49.06%; 而磷酸根质量分数在诱导的第 1、2 天, 分别比对照降低了 28.67%、15.68%, 在诱导的第 4~10 天, 却比对照增长了 0.72%~18.02%。

白桦细胞培养液中的硝酸根、铵根、磷酸根质

量分数对真菌诱导子的响应趋势基本呈增加趋势。其中, 在处理第 1 天, 培养液中硝酸根、铵根、磷酸根质量分数分别比对照增长了 30.67%、63.07%、26.39%。

3.4 白桦细胞内外磷酸根、铵根和硝酸根质量分数与三萜量的相关性分析

白桦细胞内外磷酸根、铵根和硝酸根质量分数与三萜量的相关性 (表 1) 发现, 胞内铵根和硝酸根质量分数与三萜量的相关性由对照组的显著水平变为真菌诱导后的不显著水平, 而胞外的磷酸根和硝

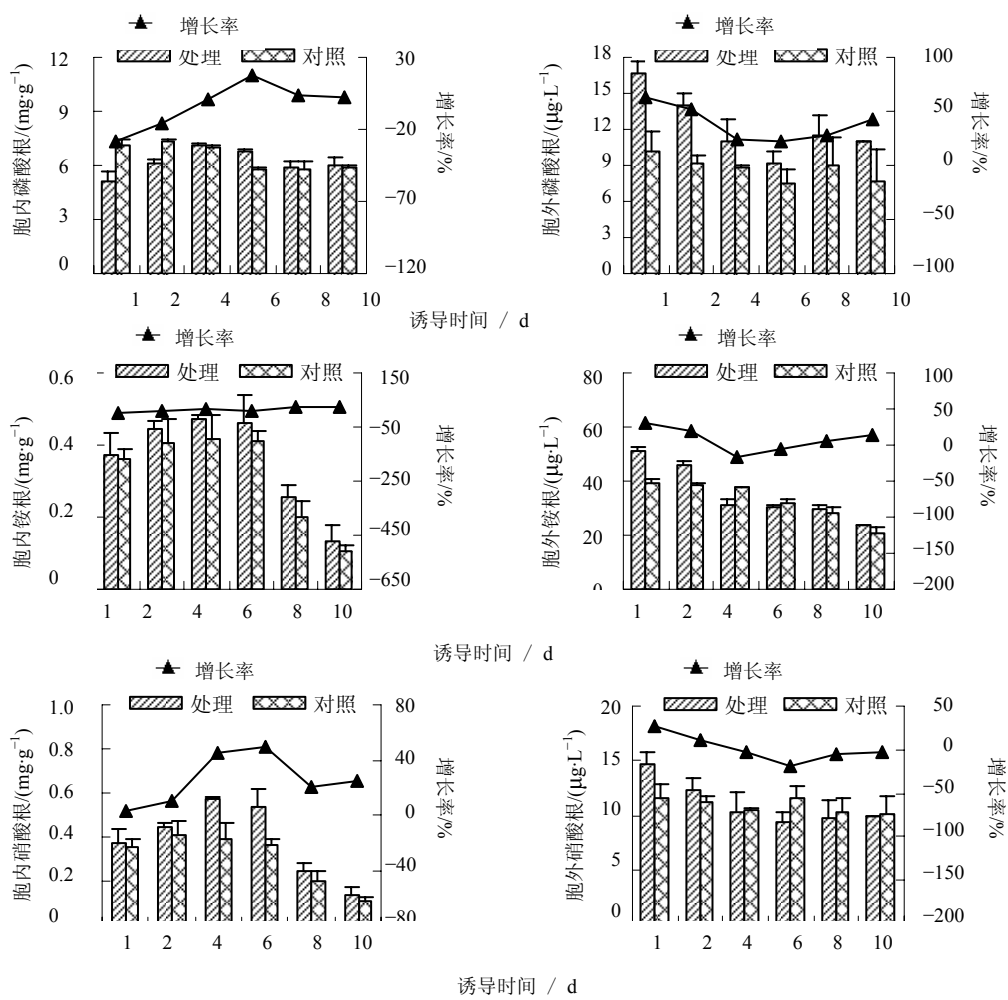


图 3 真菌诱导子对白桦细胞内和培养液中磷酸根、铵根和硝酸根质量分数的影响

Fig. 3 Effect of fungal elicitor on concentrations of PO_4^{3-} , NH_4^+ , and NO_3^- in cell and culture medium of birch suspension cell culture

表 1 磷酸根、铵根和硝酸根质量分数与三萜量的相关性分析
Table 1 Correlation between PO_4^{3-} , NH_4^+ , NO_3^- and triterpenoid content

生理指标		三萜量相关性	
		真菌诱导组	对照组
磷酸根	胞内	-0.61	-0.66
	胞外	0.87*	-0.70
铵根	胞内	0.37	-0.84*
	胞外	0.96*	0.90*
硝酸根	胞内	0.23	-0.89*
	胞外	0.89*	-0.65

*表示在 α 为 0.05 水平下相关性达到显著水平
* shows significant correlation at $\alpha = 0.05$

酸根质量分数与三萜量的相关性由对照组的不显著水平变为显著水平，并且真菌诱导使对照组中磷酸根和硝酸根与三萜积累的负相关关系变为正相关关系。由此推测，真菌诱导后白桦三萜的合成可能与

细胞内外磷酸根、铵根和硝酸根质量分数相关。

4 讨论

研究表明，添加真菌诱导子可以有效促进植物细胞中次生代谢物的积累，张长平等^[19]研究发现，在紫杉醇细胞生长的指数生长末期添加真菌诱导子（尖孢镰刀菌的胞壁组分粗提物），细胞中的紫杉醇产量比对照组增加了 5 倍左右。同样，本研究发现真菌诱导子促进了白桦悬浮细胞中三萜的合成，并且其诱导效应随着诱导时间的延长表现降低的趋势。近年来，人们对真菌诱导子的诱导机制进行了广泛的研究，一般认为，调节连接初生代谢和次生代谢、次生代谢分支途径的关键酶的活性和酶量与特定的代谢途径的活化及相关产物的积累呈正相关性。但上述反应最终受培养体系中营养物质的约束，而真菌诱导后营养物质的动态变化与次生代谢物产生的关系报道却极少，因此，本研究初步

分析了真菌诱导后培养液和细胞内硝酸根、铵根、磷酸根质量分数的变化情况,分析氮源和磷源与真菌诱导白桦三萜合成的关系。

研究发现,以硝酸钾(950 mg/L)、硝酸铵(825 mg/L)和磷酸二氢钾(680 mg/L)为氮源和磷源的白桦悬浮细胞,在真菌诱导后白桦细胞培养液中的硝酸根、铵根、磷酸根质量分数对真菌诱导子的响应基本呈增加趋势,同样,白桦细胞内的铵根量和硝酸根量随着真菌诱导时间的延长而增加,而细胞中的磷酸根在诱导后的1~2 d却降低了。究其原因,研究发现真菌诱导子主要以糖成分加入白桦悬浮培养体系,添加糖不仅给白桦细胞提供了碳源,更重要的是使细胞造成了渗透胁迫^[20],这种效应可以从真菌诱导后电导率的升高说明。造成渗透胁迫的细胞,由于细胞生长缓慢造成细胞对营养物质的吸收能力下降,从而表现为培养液中营养物质的过剩。

氮和磷在细胞内是构成核酸、蛋白质和ATP等的结构性物质,是细胞生长所必需的。磷在细胞中是核酸与磷脂的组成成分,其中磷脂是膜结构的重要组成部分,同时磷也用于合成高能磷酸化合物,对细胞的能量代谢进行调节。Balague等^[21]在利用恒化器研究长春花培养过程中细胞生长限制因子的实验中,发现生物碱的合成仅发生在磷限制生长时期,而不是蔗糖限制生长时期。Schiel等^[22]在烟草细胞培养过程中,运用分批流加技术使整个生长周期中细胞内的磷酸盐保持在较低的水平,从而大幅度地提高了产物桂皮烯醛基丁二胺的量。同样本研究也发现,白桦三萜的诱导合成发生在细胞内低磷阶段。

氮源对调节植物培养物的生长发育和次生代谢物的生物合成具有显著作用。Rasmussen等^[23]试验表明,内生真菌感染植物后不仅显著改变了寄主植物的初级和次级代谢物,而且改变了植物对有效养分的吸收和利用,特别是C/N比发生了改变。本实验中加入真菌诱导子之后,细胞内糖量增加,为了保持一定的C/N,因此细胞内不同程度的表现为铵根和硝酸根质量分数的增加。

由此可见,真菌诱导子诱导白桦细胞中三萜的积累可能还与培养液中的营养状态相关,此结论还需进一步研究加以证实。

参考文献

[1] 范桂枝,詹亚光.白桦酯醇的研究进展[J].中草药,2008,39(10):1591-1593.

- [2] 尹静,詹亚光,肖佳雷.白桦三萜的合成和调控[J].植物生理学通讯,2009,45(5):520-526.
- [3] Alakurti S, Taru M K, Salme K, et al. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin European [J]. *J Pharma Sci*, 2006, 29(1): 1-13.
- [4] Kessler J H, Mullauer F B, Roo G M, et al. Broad *in vitro* efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types [J]. *Cancer Lett*, 2007, 251(1): 132-145.
- [5] Jing Z, Li H, David L, et al. Inhibition of HIV-1 maturation via drug association with the viral gag protein in immature HIV-1 particles [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(51): 42149-42155.
- [6] 程晓华,熊玉卿.五环三萜皂苷的药理作用研究进展[J].中草药,2007,38(5):792-795.
- [7] Chintharlapalli S, Papinen S, Ramaiah S K, et al. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2816-2823.
- [8] 范云双,姚智,滕杰,等.绿升麻中具有抗肿瘤活性的三萜类化合物[J].中草药,2007,38(2):167-170.
- [9] Wen Z, Martin D E, Bullock P, et al. Glucuronidation of anti-HIV drug candidate bevirimat: identification of human UDP-glucuronosyltransferases and species differences [J]. *Drug Metabol Dispos*, 2007, 35(3): 440-448.
- [10] 尹静,詹亚光,李新宇,等.不同树龄白桦的不同器官及其组培苗诱导的愈伤组织中白桦酯醇和齐墩果酸的分布和含量变化[J].植物生理学通讯,2009,45(6):610-614.
- [11] Xu M J, Dong J F, Wang H Z, 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.
- [12] Goyal S, Ramawat K G. Effect of chemical factors on production of isoflavonoids in *Pueraria tuberosa* (Roxb. ex. Willd.) D C suspension cultures [J]. *Indian J Exp Biol*, 2007, 45(12): 1063-1067.
- [13] Komaraiah P, Kishor P B, Kavi C M, et al. Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures [J]. *Plant Sci*, 2005, 168(5): 1337-1344.
- [14] Zhong J J, Wang S J. Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium* [J]. *Process Biochem*, 1998, 33(6): 671-675.
- [15] Sato K, Nakayama M, Shigeta J I. Culturing conditions

- affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry [J]. *Plant Sci*, 1996, 113(1): 91-98.
- [16] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [17] 孙 宏, 张 泽. 分光光度法测定白桦三萜类物质总量 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(1): 110-112.
- [18] 魏 明. 霍山石斛类原球茎悬浮培养细胞生长和多糖合成的动力学研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.
- [19] 张长平, 李 春, 元英进, 等. 真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞态势及紫杉醇合成的影响 [J]. 生物工程学报, 2001, 17(4): 436-440.
- [20] Liu C Z, Cheng X Y. Enhancement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in cell cultures of *Cistanche deserticola* by osmotic stress [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(2): 357-362.
- [21] Balague C, Wilson G. Growth and alkaloid biosynthesis by cell suspension of *Catharanthus roseus* in a chemostat under sucrose and phosphate limiting conditions [J]. *Physiol Veg*, 1982, 20(1): 515-522.
- [22] Schiel O, Jarchow-Redecker K, Piehl G W, et al. Increased formation of cinnamoyl-putrescines by fedbatch fermentation of cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum* [J]. *Plant Cell Rep*, 1984, 3(1): 18-20.
- [23] Rasmussen S, Parsons A J, Fraser K, et al. Newman metabolic profiles of *lolium perenne* are differentially affected by nitrogen supply, carbohydrate content, and fungal endophyte infection [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146(3): 1440-1453.

《药物评价研究》征稿与征订启事

《药物评价研究》(原《中文科技资料目录·中草药》)杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级药学科技学术性期刊, 双月刊, 国内外公开发刊。桑国卫院士为名誉主编, 刘昌孝院士任编委会主任委员, 汤立达研究员为主编。

办刊宗旨: 报道药物评价工作实践, 推动药物评价方法研究, 开展药物评价标准或技术探讨, 促进药物评价与研究水平的提高, 为广大药物研究人员提供交流平台。

内容与栏目: 针对药物及其制剂的评价规范以及药理学评价、安全性评价、药效学评价、药物代谢动力学评价、临床评价、上市药物评价等评价研究的内容, 设置论坛、综述、方法学研究、试验研究(论著)、审评规范、国外信息、专题 7 个栏目。

读者对象: 药品管理、新药研发、药物临床应用、药理学教育等相关的高等院校、科研院所、CRO 组织、生产企业、药品管理与审评机构的研究人员、管理人员、临床医生和研究生等。

本刊的创办填补了药物评价领域期刊的空白, 将为我国广大药物研究人员提供一个交流的平台, 通过交流药物评价工作的实践经验, 发展和完善评价的方法学, 探讨评价相关的国际标准或指南, 提高我国的总体评价研究水平。

欢迎广大作者积极投稿, 广大读者踊跃订阅! 本刊自办发行, 订阅请直接与编辑部联系! 本刊热忱与中外制药企业合作, 宣传推广、刊登广告(包括处方药品广告)。

本刊已正式开通网上在线投稿、审稿、查询系统, 欢迎广大读者、作者、编委使用!

《药物评价研究》编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号 (300193)

电话/传真: 022-23006822

E-mail: der@tiprpress.com

帐号: 441140100100081504

网址: www.中草药杂志社.中国

www.tiprpress.com (在线投稿)

开户银行: 兴业银行天津南开支行

户名: 天津中草药杂志社