

## 一氧化氮和水杨酸依次介导内生真菌诱导子促进苍术细胞中苍术素生物合成的信号转导

陶金华<sup>1</sup>, 汪冬庚<sup>1</sup>, 濮雪莲<sup>1</sup>, 黄金华<sup>1</sup>, 赵喜<sup>1</sup>, 仇雯倩<sup>1</sup>, 江曙<sup>2</sup>

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** 研究介导内生真菌诱导子促进苍术悬浮细胞中苍术素生物合成的信号分子及信号转导途径, 并探讨诱导子对苍术素合成途径关键酶活性的影响。**方法** 采用植物细胞悬浮培养法, 考察内生真菌诱导子处理下苍术细胞中一氧化氮(NO)、水杨酸(SA)及苍术素量的变化。**结果** 内生真菌诱导子通过诱导苍术细胞中一氧化氮合酶(NOS)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)以及乙酰辅酶A羧化酶(ACC)的活性, 显著促进苍术细胞的NO迸发、SA和苍术素的合成。NOS抑制剂PBITU可以阻断诱导子对NO、SA和苍术素合成的促进作用, 外源NO供体SNP及外源SA单独处理也能促进苍术素的合成, 说明NO和SA是参与苍术素合成的信号分子, 且NOS是参与诱导子诱发苍术细胞NO迸发的主要途径。NO猝灭剂cPITO可以有效清除诱导子诱发苍术细胞的NO迸发, 显著阻断诱导子对苍术细胞中SA和苍术素合成的促进作用, 外源SNP可以逆转cPITO对PAL、ACC活性以及SA、苍术素合成的抑制作用, 表明NO是介导内生真菌诱导子诱发苍术细胞中苍术素和SA生物合成所必需的上游信号分子。**结论** NO主要通过SA信号途径介导内生真菌诱导子激活ACC, 显著促进苍术细胞中苍术素的生物合成。

**关键词:** 内生真菌诱导子; 苍术; 一氧化氮; 水杨酸; 苍术素; 一氧化氮合酶; 苯丙氨酸解氨酶; 乙酰辅酶A羧化酶

**中图分类号:** R282.13

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2014)05-0701-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.020

## Signal transduction of atractylodin biosynthesis in *Atractylodes lancea* cell induced by endophytic fungal elicitor mediated with nitric oxide followed by salicylic acid

TAO Jin-hua<sup>1</sup>, WANG Dong-geng<sup>1</sup>, PU Xue-lian<sup>1</sup>, HUANG Jin-hua<sup>1</sup>, ZHAO Xi<sup>1</sup>, QIU Wen-qian<sup>1</sup>, JIANG Shu<sup>2</sup>

1. Nantong University, Nantong 226019, China

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

**Abstract:** **Objective** To investigate the signal molecules and signal transduction involved in endophytic fungal elicitor-induced atractylodin biosynthesis and the effect of an endophytic fungal elicitor on the key enzyme activity in *Atractylodes lancea*. **Methods** Content changes of nitric oxide (NO), salicylic acid (SA), and atractylodin were detected under the endophytic fungal elicitor treatment by plant cell suspension culture technology. **Results** The endophytic fungal elicitor remarkably promoted NO burst and the biosynthesis of SA and atractylodin by activating nitric oxide synthase (NOS), phenylalanine ammonia lyase (PAL), and acetyl coenzyme A carboxylase (ACC), respectively. NOS inhibitor PBITU could inhibit the NO and SA accumulation and the atractylodin biosynthesis induced by the elicitor. And atractylodin biosynthesis could also be triggered by exogenous NO or SA. The results indicated that NO and SA were the necessary signal molecules and NO burst was mediated by NOS induced by endophytic fungal elicitor. NO quencher cPITO could effectively remove NO burst in *A. lancea* cell induced by endophytic fungal elicitor and notably inhibit the biosynthesis promotion of SA and atractylodin in *A. lancea* cell induced by endophytic fungal elicitor. Exogenous SNP could reverse the cPITO inhibition on the activity of PAL and ACC and the synthesis of SA and atractylodin. This suggested that NO was an upstream signal molecule mediated endophytic fungal elicitor to accelerate the biosynthesis of SA and atractylodin. **Conclusion** Endophytic fungal elicitor mediated through NO followed by SA could promote atractylodin biosynthesis by activating ACC in *A. lancea*.

**Key words:** endophytic fungal elicitor; *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; nitric oxide; salicylic acid; atractylodin; nitric oxide synthase; phenylalanine ammonia lyase; acetyl coenzyme A carboxylase

收稿日期: 2013-09-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102743)

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

药用植物细胞不仅具有形态建成全能性,同时还具有物质代谢全能性,根据“细胞全能性”原理发展起来的细胞培养技术被视为解决中药及天然药物资源可持续发展问题的一种新型生物技术。但到目前为止,能够采用细胞培养技术进行产业化生产的天然活性物质种类非常有限。制约该项技术产业化应用的核心问题之一是培养细胞中活性物质的低产现象。因此研究探讨药用植物细胞次生代谢产物合成的高产调控技术具有重要的理论和实践意义。现代研究表明,中药及天然药用植物次生代谢及次生代谢物的生物合成,受到自身和环境中各种生物和非生物因素的调控。干旱、高温、辐射等非生物逆境胁迫以及微生物侵染等生物胁迫均可以激活植物体内次生代谢物的生物合成途径,显著提高植物次生代谢物的合成代谢水平<sup>[1]</sup>。近年来,利用内生真菌诱导子激活药用植物细胞次生代谢途径,促进活性成分的合成与积累是国内外植物细胞培养领域中提高次生代谢物质产量的研究热点之一<sup>[2-3]</sup>。内生真菌是生长在植物体内,与宿主植物互惠进化的一类微生物,也是许多植物在自然生长条件下常见的一种生物胁迫因子,可以诱发植物细胞产生一系列与信号转导有关的生理生化效应,如离子跨膜运输、蛋白质磷酸化和脱磷酸化以及一氧化氮(nitric oxide, NO)和水杨酸(salicylic acid, SA)的合成等<sup>[4-6]</sup>。因此,利用内生真菌诱导子可促进药用植物细胞生物合成和积累次生代谢物,也为研究药用植物次生代谢的调控提供了新途径。

苍术素是我国大宗常用中药材苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的主要活性成分之一,具有保肝、抗缺氧、降血糖、抗炎等多种生物活性<sup>[7]</sup>。由于苍术自然植物资源有限,而且天然苍术植物中苍术素的量较低,因此利用苍术细胞培养法将为苍术素的生产提供一种新的途径。本实验以苍术悬浮细胞为材料,系统研究了内生真菌诱导子处理对苍术素合成与积累的影响,并探讨了内生真菌诱导子处理诱发苍术素合成的信号转导机制。研究结果对揭示内生真菌诱导子诱发药用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

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苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的新鲜植株。

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、柱温箱和二极阵列检测器DAD)。

## 2 方法

### 2.1 内生真菌诱导子的制备

将内生真菌 *Rhizoctonia* DC. ex Fr. 接入发酵培养液,28℃,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℃灭菌20 min,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<sup>[8]</sup>。

### 2.2 苍术悬浮细胞系及培养条件的建立

按文献方法<sup>[9]</sup>进行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℃,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 苍术细胞中苍术素量及乙酰辅酶A羧化酶(ACC)活性的测定

苍术素量按文献的方法<sup>[10]</sup>进行测定;ACC活性测定<sup>[11]</sup>:取10 μL 待测液,加入90 μL 反应液[60 mmol/L *N*-二羟乙基甘氨酸-NaOH (pH 9.0)、3 mmol/L ATP、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、9 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> (0.621 μCi/mmol)、0.7 mmol/L 丙二酰辅酶A],37℃反应12 min 后加6 mol/L HCl 25 μL 终止反应。用滤纸吸取100 μL 反应液,风干过夜。风干后的滤纸放入闪烁管中,加入2 mL 闪烁液浸泡过夜。最后将闪烁液置于液体闪烁计数仪下计数1 min。ACC酶活性以1 min 内每克蛋白质中丙二酰辅酶A的量来表示。

### 2.4 苍术细胞中SA量及苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定

**2.4.1 SA的测定**<sup>[12]</sup> 采用HPLC法测定SA量。取苍术细胞0.5 g,加液氮研磨成粉末,加入1.5 mL 90%甲醇,旋涡混匀1 min,超声波处理5 min,离心,上清液转入2 mL Ep 管中,残留物用0.5 mL 甲醇重提取,再次旋涡、超声波、离心处理,合并2次上清液,离心,上清液加入10 μL 0.2 mol/L 的NaOH溶液,浓缩至干,用300 μL 5%三氯醋酸旋涡混匀,用800 μL 醋酸乙酯-环己烷(1:1)萃取2次,合并有机相,加入60 μL 0.2 mol/L 乙酸钠缓冲

液 (pH 5.5), 离心, 浓缩至干, 残留物溶于 600  $\mu$ L HPLC 流动相中, 即为待测样品。采用 HPLC 法测定 SA 量, 色谱条件: 色谱柱为 Thermo- $C_{18}$  柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为 0.2 mol/L 乙酸钠缓冲液-甲醇 (9:1), pH 5.5, 体积流量 1.0 mL/min。

**2.4.2 PAL 活性测定** 取 5.0 g 滤过收集的苍术细胞, 按 1:2 的比例加入提取液 (50.0 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液, 10.0 mmol/L 巯基乙醇, 4.0 mmol/L EDTA, 1.0  $\mu$ mol/L 亮抑蛋白酶肽), 冰浴中研细, -4  $^{\circ}$ C, 10 000 $\times g$  离心 15 min。取上清液 1 mL 按文献的方法<sup>[13]</sup>测定 PAL 酶活性。PAL 酶活性以 1 h 内每毫克蛋白质中反式肉桂酸的量来表示。

## 2.5 苍术细胞中 NO 量及一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活性的测定

**2.5.1 NO 的测定**<sup>[14]</sup> 在酸性条件下将 NO 氧化成亚硝酸盐, 利用 Greiss 试剂 (1%对氨基苯磺酸, 0.1% *N*-萘基-乙二胺, 5%磷酸) 测定所生成的亚硝酸盐量, 推算细胞中 NO 浓度。不同处理的苍术悬浮细胞经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过后, 取 1 mL 滤液加入 1 mL Greiss 试剂振荡混匀, 室温下放置 30 min 后, 在 550 nm 处测定吸光度值, 利用 NaNO<sub>2</sub> 标准曲线计算 NO 的量。

**2.5.2 NOS 活性的测定**<sup>[15]</sup> 采用瓜氨酸分析法测定。取 1.0 g 新鲜苍术细胞, 加入 50 mg 聚乙烯吡咯烷酮, 1.0 mL 冷冻的提取缓冲液 (50 mmol/L Tris, pH 7.4, 含有 320 mmol/L 蔗糖, 10  $\mu$ g/mL 亮抑蛋白酶肽, 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 10 mmol/L 二硫苏糖醇和 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟), 研细后在 4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min。以 L-[U-<sup>14</sup>C] Arg 为底物, 通过测定 L-[U-<sup>14</sup>C] 瓜氨酸的生成量表示 NOS 活性。取 40  $\mu$ L 上述离心上清液, 加入 100  $\mu$ L 测定缓冲液 [40 mmol/L HEPES, pH 7.2, 含有 10  $\mu$ mol/L FFA, 10  $\mu$ mol/L FMN, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 1.25 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ mol/L 6(R)-5, 6, 7, 8-tetrahydrobiopterin, 10  $\mu$ g/mL 钙调蛋白, 1 mmol/L NADPH 和 1  $\mu$ mol/L (1 580 Bq) L-[U-<sup>14</sup>C] Arg]。室温下放置 30 min 后, 加入 1 mmol/L Dowex-Ag 50 W[以含 10 mmol/L EDTA (1:1.5) 的 100 nmol/L HEPES 溶解], 15  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 40  $\mu$ L 反应液用 LS 6000(Beckman, Fullerton CA) 测定仪测定。采用考马氏亮蓝法测定蛋白质量, 以每小时内 1 mg 瓜氨酸中含有 L-[U-<sup>14</sup>C]瓜氨酸的量

表示 NOS 活性。

## 2.6 外源硝普钠 (SNP)、cPTIO 和 PBITU 对苍术细胞的处理方法

选用培养 12 d 的苍术细胞, 添加 NO 专一性淬灭剂 cPTIO (2, 4-carboxyphenyl-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide) 和 NOS 抑制剂 PBITU [1, 3-phenylene-bis (1, 2-ethanediyl)-bis-isothiourea], 添加时间为内生真菌诱导子或 SNP 处理前 20 min, NO 和 SA 量测定时间分别为处理后 9 h 和 15 h, 苍术素的测定时间为处理后的第 9 天; NOS、PAL 及 ACC 酶活性测定时间分别为处理后 9、12、24 h。所测数值为 5 次实验的平均值, 诱导子质量浓度为 40  $\mu$ g/mL, 对照组细胞加入等体积的水。

## 2.7 SA 合成抑制剂对 PAL、NOS、ACC 酶活性及苍术素积累的影响

在培养 12 d 的苍术悬浮细胞培养液中加入 SA 合成抑制剂 AOPP (*L*- $\alpha$ -aminooxy- $\beta$ -phenylpropionic acid) 20 min 后, 再加入终质量浓度为 40  $\mu$ g/mL 的内生真菌诱导子, 处理后 9、12、24 h 分别测定 NOS、PAL 及 ACC 酶活性, 苍术素的测定时间为处理后的第 9 天; 所测数值为 5 次实验的平均值, 对照组细胞加入等体积的水。

## 3 结果与分析

### 3.1 内生真菌诱导子诱发苍术细胞 NO 迸发、SA 积累和苍术素合成及对 NOS、PAL、ACC 活性的影响

苍术活性成分苍术素属于一种聚炔类化合物, 从生源途径来看, 聚炔类化合物的生物合成与脂肪酸类似, 都是由乙酸、乙酰辅酶 A 及丙二酰辅酶 A、多酮类化合物而合成的。一般认为聚炔类合成途径是油酸通过代谢中间体还阳参油酸, 再经过连续脱氢等变化, 产生一系列聚炔类化合物。其中 ACC 是脂肪酸及聚炔类化合物生物合成途径中的关键酶和限速酶<sup>[16]</sup>。ACC 的表达容易受到外界因子 (微生物感染、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、茉莉酸等) 的诱导, 如真菌诱导子可使 ACC 的表达显著增强<sup>[17]</sup>。本课题组前期从茅苍术新鲜植株中分离到一株内生真菌 *Rhizoctonia* SP1, 以其菌体制备的诱导子显著促进苍术素的生物合成<sup>[10]</sup>。

本实验主要研究介导 *Rhizoctonia* SP1 诱导子促进苍术素合成的苍术细胞内信号分子及信号转导途径。在苍术细胞培养至第 12 天时, 添加 40 mg/L 的 *Rhizoctonia* SP1 诱导子, 以不加诱导子的实验组作为对照。结果表明, *Rhizoctonia* SP1 诱导子不仅可以诱发苍术细胞中的 NO 迸发, 同时还可以促进细

胞中 SA 和苍术素量的增加。细胞中 NO 量在诱导子处理后迅速增加, 约在 9 h 时达到最高; SA 量的增加滞后于 NO 量的变化, 在诱导子处理 9 h 后开始增加, 并在 15 h 左右达到最高峰; 苍术素量增加是苍术细胞在诱导子处理下最晚出现的反应, 在处理 12 h 后才开始增加 (图 1)。已有研究报道, NO 迸发是多种植物细胞在真菌诱导子处理下出现的早期反应之一<sup>[18-19]</sup>。此外, 在经过内生真菌诱导子处理后, 苍术细胞中 NO、SA、苍术素合成关键酶 NOS、PAL 以及 ACC 的活性均出现了相应的动态变化 (图 2), 未经诱导子处理的对照, NOS、PAL 以及 ACC

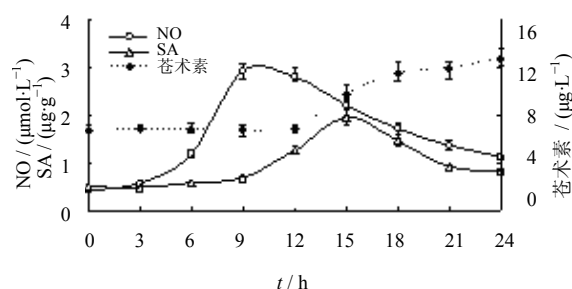


图1 内生真菌诱导子对 NO、SA 以及苍术素合成的影响

Fig. 1 Effects of endophytic fungal elicitor on biosynthesis of NO, SA, and atractylodin

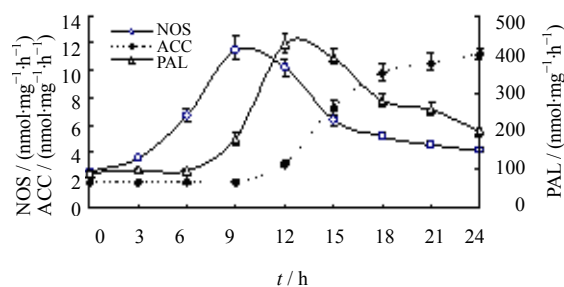


图2 内生真菌诱导子对 NOS、PAL 以及 ACC 酶活性的影响

Fig. 2 Effects of endophytic fungal elicitor on activities of NOS, PAL, and ACC

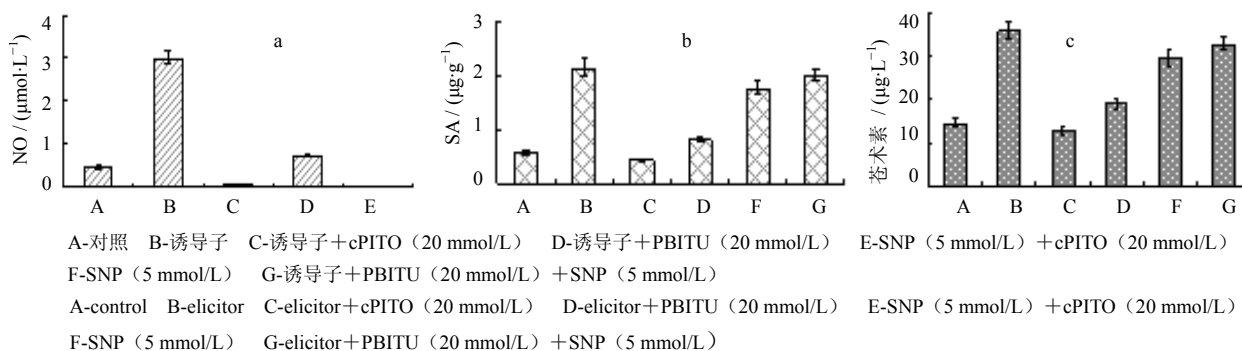


图3 cPITO 和 PBITU 对苍术细胞中 NO 迸发 (a)、SA 积累 (b) 及苍术素 (c) 合成的影响

Fig. 3 Effects of cPITO and PBITU on biosynthesis of NO (a), SA (b), and atractylodin (c) in *A. lancea* cells

活性分别在  $(2.6 \pm 0.2)$ 、 $(90.5 \pm 6.2)$ 、 $(1.8 \pm 0.2)$  /  $[\text{nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}]$  波动。NOS 和 PAL 活性在 *Rhizoctonia* SP1 诱导子处理 3、6 h 后开始增加, 分别在第 9 小时和第 12 小时达到最高值, 分别是对照的 4.4 和 4.7 倍。随着处理时间的延长, NOS、PAL 活性逐步减弱。ACC 活性的动态变化落后于 NOS 和 PAL 活性的变化, 在诱导子处理 9 h 后开始逐步增强, 且在相对较长的时间内维持了较高的活性, 显著高于对照组 ACC 的活性, 从而有利于促进苍术素的大量合成。

上述结果表明, 内生真菌 *Rhizoctonia* SP1 诱导子能够诱发苍术细胞 NO 迸发, SA 积累和苍术素的合成, 从诱发的时间顺序来看, SA 和苍术素的合成滞后于 NO 迸发, 且诱导子诱发的相应关键酶活性变化和 NO、SA、苍术素量的变化一致。

### 3.2 NO 介导内生真菌诱导子诱发苍术细胞中 SA 和苍术素的合成及对 NOS、PAL、ACC 活性的影响

上述实验结果虽然证实 NO 和 SA 是介导内生真菌诱导子诱发苍术细胞苍术素合成的 2 种信号分子, 然而对于 NO 和 SA 在介导过程中的相互关系尚不清楚。为了进一步探讨信号分子 NO 和 SA 在介导内生真菌诱导子促进苍术素合成中的相互作用, 考察了 NO 专一性猝灭剂 cPITO 以及 NOS 专一性酶抑制剂 PBITU 对 NO 迸发、SA 积累和苍术素合成的影响。在对苍术细胞进行诱导子处理前 20 min 分别加入 cPITO 和 PBITU, 结果表明, cPITO 能够有效地清除苍术细胞中的 NO, PBITU 对诱导子诱发苍术细胞中 NO 合成具有显著的抑制作用, 抑制率达到 75.7% (图 3-a)。cPITO 和 PBITU 处理也对诱导子诱发细胞中 SA 的产生具有显著的抑制作用, 通过添加一种常用的 NO 供体 SNP 提供外源 NO, 可以逆转 PBITU 对细胞中 SA 合成的抑制作用 (图 3-b)。NO 猝灭剂以及 NOS 抑制剂均能够显

著抑制诱导子诱发苍术素的合成(图3-c)。由此证实 cPITO 和 PBITU 是通过抑制细胞中 NO 的产生,进而影响诱导子诱发 SA 的合成,导致苍术素产量的降低。结果提示 NO 对诱导子诱发苍术细胞 SA 的产生具有较强的促进作用。此外,由于 cPITO 对 NO 的猝灭作用以及 PBITU 对 NOS 酶活性的抑制作用,显著降低细胞中 NO 量,结果导致细胞中 PAL、ACC 酶活性大幅度降低,SA 和苍术素的合成显著减少。NO 单独处理也能够触发苍术细胞中

PAL、ACC 的活化,SNP+cPITO 处理组苍术细胞中 PAL、ACC 活性与对照组无明显差异,PBITU 处理对诱导子诱发的 NOS 活性抑制率达到 96.1%(图4)。上述结果表明,NOS 是苍术细胞在内生真菌诱导子处理下产生 NO 的主要途径,外源 NO 单独处理以及内生真菌诱导子处理,均可诱发苍术细胞中 PAL、ACC 的活化,显著促进 SA 和苍术素的生物合成。由此可见,NO 是 SA 和苍术素生物合成所必需的上游信号分子。

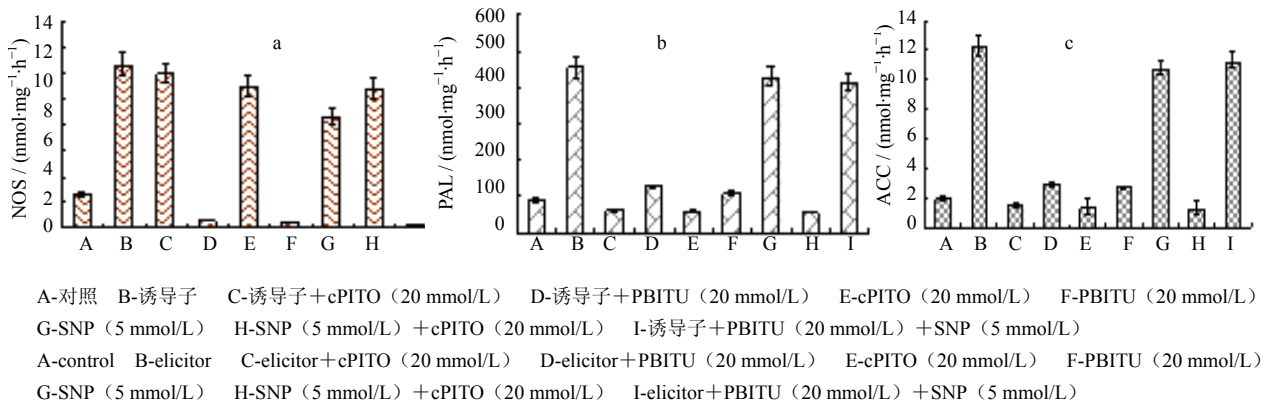


图4 cPITO 和 PBITU 对苍术细胞中 NOS (a)、PAL (b) 及 ACC 酶 (c) 活性的影响

Fig. 4 Effects of cPITO and PBITU on activities of NOS (a), PAL (b), and ACC (c) in *A. lancea* cells

### 3.3 SA 合成抑制剂对 NOS、PAL、ACC 酶活性及 SA、苍术素积累的影响

PAL 广泛存在于高等植物、部分微生物(真菌等)以及某些藻类细胞中,是植物细胞合成 SA 的关键酶之一,调控 SA 的合成<sup>[20]</sup>。PAL 是一种胞内诱导酶,各种类型的低温、机械损伤、微生物感染等都可以诱导 PAL 基因的表达<sup>[21]</sup>。在考察 PAL 抑制剂 AOPP 对苍术细胞 NO、SA 和苍术素量及关键酶活性的影响实验中,发现 AOPP 对 NOS 活性及 NO 的合成没有明显的影响,但显著抑制 PAL 的活性和 SA 的合成,部分抑制 ACC 的活性和苍术素的积累。相对于诱导子处理组,AOPP+诱导子处理组中 PAL 活性和 SA 量分别下降了 96.4%和 97.0%;ACC 活性和苍术素量分别减少了 70.4%和 60.5%(图5、6)。而添加外源 SA 可以解除 AOPP 对诱导子诱发 ACC 活化和苍术素合成的抑制作用(图5-b、图6-b)。因此进一步证实了 SA 处于信号分子 NO 的下游,且 NO 通过 SA 的转导作用是介导内生真菌诱导子促进苍术细胞合成苍术素的主要信号转导途径。

## 4 讨论

药用植物次生代谢物的生物合成是受细胞内部

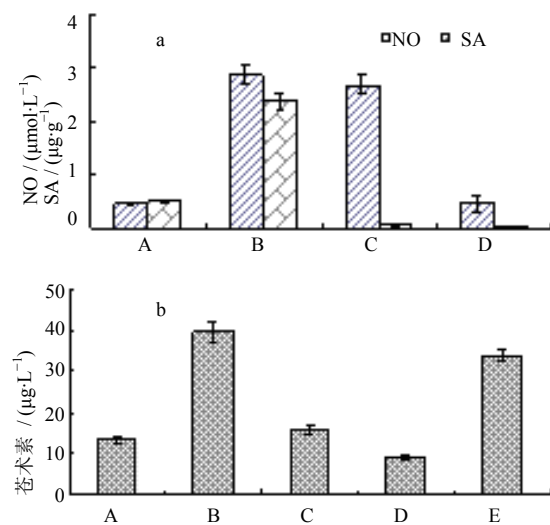


图5 SA 合成抑制剂 AOPP 对 NO、SA 积累 (a) 及苍术素合成 (b) 的影响

Fig. 5 Effect of SA biosynthesis inhibitor AOPP on accumulation of NO and SA (a) and biosynthesis of atractylodin (b)



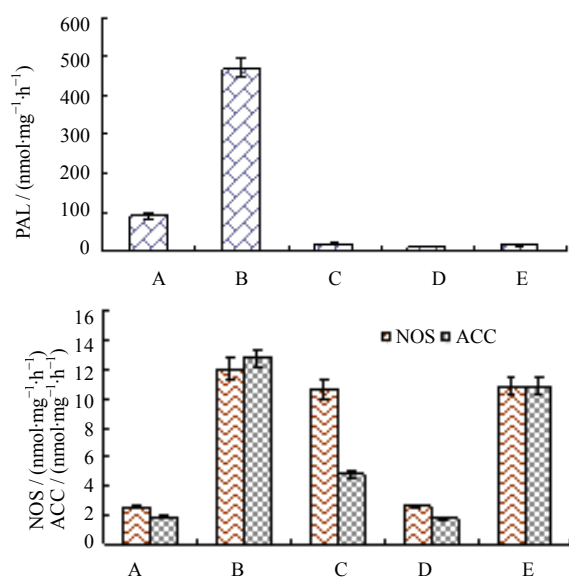


图6 SA合成抑制剂对PAL、NOS及ACC酶活性的影响

Fig. 6 Effect of SA biosynthesis inhibitor on activities of NOS, PAL, and ACC

相关基因调控的一系列复杂生化反应过程,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着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,调控药用植物次生代谢物的生物合成<sup>[22-23]</sup>。研究探讨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物生物合成的机制,为生产实践中提高药用植物培养细胞的次生物质产量提供理论基础。

信号转导是植物体内一种常见的生理生化现象,细胞内部的信号转导系统是介导内生真菌诱导子等外界因子诱发药用植物次生代谢物生物合成的桥梁和纽带,在植物生长发育、抗病、抗逆等过程中发挥着重要作用。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<sup>[19]</sup>。内生真菌诱导子调控植物次生代谢物的生物合成目前已形成一个初步的假说,即诱导子首先与细胞膜上受体结合,引起膜的通透性、膜内离子分布等变化,最终导致胞内基因启动、酶活性的改变,这一系列反应是一个级联过程,需要有物质充当胞内信使,也即第二信使,主要包括NO、SA、以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为中心的活性氧(reactive oxygen species, ROS)、Ca<sup>2+</sup>等信号分子。信号被传递到细胞内以后,通过控

制次生代谢途径中关键酶的基因表达来调节次生代谢物的生物合成<sup>[20,24]</sup>。其中NO是近年来发现的一种脂溶性可扩散小分子新型植物信号分子,在植物生长发育及抗病防御反应等过程中发挥着重要作用<sup>[25]</sup>。在植物细胞中存在着与哺乳动物类似的NOS酶,由NOS催化形成的NO在植物体内具有促进种子萌发、植株根和叶的生长发育以及诱发植物防卫反应和防御基因活化等多种功能<sup>[26-28]</sup>。虽然目前大量的研究表明,NO是植物细胞在诱导子等处理下普遍产生的一种生化反应,是介导病原物和微生物诱导子诱发植物防卫反应所必需的信号分子之一,但是目前对内生真菌诱导子处理下植物细胞合成NO的机制还不是十分清楚<sup>[29]</sup>。研究表明,NOS是动物细胞中NO产生的主要途径。虽然到目前为止还没有在植物中发现NOS基因,但是在大豆、烟草等植物细胞中已经检测到与动物NOS类似的酶活性,利用动物NOS抑制剂也可以抑制真菌诱导子对红豆杉等植物细胞NO产生的诱发作用,从而进一步揭示NOS可能是植物产生NO的途径之一<sup>[30-32]</sup>。本实验结果表明,在内生真菌诱导子胁迫下,通过诱发苍术细胞NOS活性,进而产生NO,所产生的NO是介导诱导子触发苍术中ACC活化和苍术素合成加强所必需的信号分子。此外,内生真菌诱导子对苍术细胞中NO迸发的诱发作用可以被哺乳动物NOS抑制剂PBITU抑制,说明苍术细胞中可能也存在与动物类似的NOS,而且该酶参与了内生真菌诱导子对细胞中NO迸发的诱导作用。虽然BPTIU能够完全抑制NOS酶活性,然而却不能完全消除NO的形成,这说明NOS不是内生真菌诱导子诱发苍术细胞中NO产生的唯一途径,除了NOS途径外,诱导子还可能通过非NOS途径诱发苍术细胞中NO的合成与积累。已有研究报道表明,烟草等植物除了可以通过NOS途径合成NO外,还可以利用硝酸还原酶(NR)等非NOS酶促途径产生NO<sup>[33]</sup>,植物组织中也存在光介导的非酶促NO的产生形式<sup>[34-35]</sup>。内生真菌诱导子是否也可以通过NR等非NOS酶促途径或者通过非酶促方式诱发苍术细胞中NO产生仍需进一步研究。

各种信号分子在参与介导外界因子诱发植物次生代谢物生物合成的过程中并不是完全独立,而是通过特定的应答(cross-talk)机制,形成复杂的相互关系,最终以特定的信号转导通道或信号转导网

络形式介导外界因子诱发次生代谢物的生物合成。如 JA 和 SA 具有协同作用,共同促进银杏细胞中银杏黄酮苷的积累<sup>[36]</sup>。在苍术细胞中,内生真菌诱导子可以诱发 NO 迸发,SA 积累和苍术素的合成,且 NO 的迸发早于 SA 和苍术素的增加。NO 猝灭剂 cPITO 可以完全抑制内生真菌诱导子诱发 SA 的合成,外源 SA 单独处理也可以促进苍术细胞中苍术素的合成,这表明 NO 是对 SA 和苍术素生物合成具有调控作用的上游信号分子,NO 依赖 SA 诱发苍术素的生物合成,且在苍术细胞中 NO 可能通过 SA 信号途径介导了内生真菌诱导子对苍术细胞中苍术素合成的促进作用。SA 合成酶抑制剂 AOPP 可完全抑制 PAL 的活性,完全阻断 NO 诱发 SA 的合成,但其不能抑制诱导子诱发 NO 的迸发,也不能完全抑制 ACC 的活性和苍术素的合成,这说明在信号分子 NO 和苍术素合成酶之间,苍术细胞中还存在着其他信号分子或其他信号途径共同参与介导 NO 诱导苍术素的合成与积累。显然,后续研究需要进一步考察其他信号分子是否参与了介导苍术素的生物合成以及与 NO 和 SA 的相关应答机制,从而有助于全面揭示内生真菌诱导子促进苍术素合成的信号转导机制。

#### 参考文献

- [1] 阎秀峰,王 洋,李一蒙.植物次生代谢及其与环境的关系[J].生态学报,2007,27(6):2554-2562.
- [2] Li P Q, Mou Y, 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.
- [3] 谭 燕,贾 茹,陶金华,等.内生真菌诱导子调控药用植物活性成分的生物合成[J].中草药,2013,44(14):2004-2008.
- [4] Mishra A, Gond S K, Kumar A, *et al.* Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location [J]. *Microb Ecol*, 2012, 64(2): 388-398.
- [5] Aly A H, Debbab A, Proksch P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(6): 1829-1845.
- [6] 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.
- [7] 谢友良,李卓明,黄鸣清,等. GC 法测定苍术药材中苍术素及苍术酮 [J]. 中草药,2008,39(4): 614-615.
- [8] 陶金华,汪冬庚,濮雪莲,等. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 介导内生真菌诱导子促进茅苍术细胞 HMGR 的活化和  $\beta$ -桉叶醇的生物合成 [J]. 中草药,2013,44(19): 2740-2744.
- [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] 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.
- [11] Altaf A, Ishrat K, Abdin M Z. Effect of sulfur fertilization on oil accumulation, acetyl-CoA concentration and acetyl-CoA carboxylase activity in the developing seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.) [J]. *Aust J Agric Res*, 2000, 51(8): 1023-1029.
- [12] 魏广金,石 磊,张鹏英,等. 拟康氏木霉胞外多糖对黄瓜内源水杨酸的诱导作用 [J]. 曲阜师范大学学报,2009,35(2): 94-97.
- [13] Grant J J, Loake G J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124(1): 21-29.
- [14] 胡向阳,方建颖,蔡伟明,等. 一氧化氮介导非亲和性激发子诱发水稻悬浮细胞过敏反应 [J]. 科学通报,2003,48(2): 157-161.
- [15] Rees D D, Cunha F Q, Assreuy J, *et al.* Sequential induction of nitric-oxide synthase by *Corynebacterium parvum* in different organs of the mouse [J]. *Br J Pharmacol*, 1995, 114(3): 689-693.
- [16] 周荣汉,段金彪. 植物化学分类学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社,2005.
- [17] Figueroa-Balderas R E, Garcia-Ponce B, Rocha-Sosa M. Hormonal and stress induction of the gene encoding common bean acetyl-coenzyme A carboxylase [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(2): 609-619.
- [18] Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, *et al.* Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Environ*, 2012, 35(8): 483-1499.
- [19] Samalova M, Johnson J, Illes M, *et al.* Nitric oxide generated by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* drives plant infection [J]. *New Phytol*, 2013, 197(1): 207-222.
- [20] Zhang R Q, Zhu H H, Zhao H Q, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation increases phenolic synthesis in clover roots via hydrogen peroxide, salicylic

- acid and nitric oxide signaling pathways [J]. *J Plant Physiol*, 2013, 170(1): 74-79.
- [21] 李莉, 赵越, 马君兰. 苯丙氨酸代谢途径关键酶: PAL、C4H、4CL 研究新进展 [J]. *生物信息学*, 2007, 5(4): 187-189.
- [22] Hahlbrock K, Bednarek P, Ciolkowski I, *et al.* Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant / pathogen interactions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(Suppl 2): 14569-14576.
- [23] Zhang B, Zheng L P, Wang J W. Nitric oxide elicitation for secondary metabolite production in cultured plant cells [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(2): 455-466.
- [24] 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* J. cells [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49(2): 151-158.
- [25] Koen E, Lamotte O, Besson-Bard A, *et al.* Nitric oxide is a major player in plant immune system [J]. *Med Sci*, 2013, 29(3): 309-316.
- [26] Faria A M, Papadimitriou A, Silva K C, *et al.* Uncoupling endothelial nitric oxide synthase is ameliorated by green tea in experimental diabetes by re-establishing tetrahydrobiopterin levels [J]. *Diabetes*, 2012, 61(7): 1838-1847.
- [27] Kong W, Huang C, Chen Q, *et al.* Nitric oxide alleviates heat stress-induced oxidative damage in *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* [J]. *Fungal Genet Biol*, 2012, 49(1): 15-20.
- [28] Tewari R K, Prommer J, Watanabe M. Endogenous nitric oxide generation in protoplast chloroplasts [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(1): 31-44.
- [29] Romero-Puertas M C, Perazzolli M, Zago E D, *et al.* Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions [J]. *Cell Microbiol*, 2004, 6(9): 795-803.
- [30] Chun H J, Park H C, Koo S C, *et al.* Constitutive expression of mammalian nitric oxide synthase in tobacco plants triggers disease resistance to pathogens [J]. *Mol Cells*, 2012, 34(5): 463-471.
- [31] Leach J, Keyster M, Du Plessis M, *et al.* Nitric oxide synthase activity is required for development of functional nodules in soybean [J]. *J Plant Physiol*, 2010, 167(18): 1584-1591.
- [32] Xu M J, Dong J. Nitric oxide stimulates indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures through a protein kinase-dependent signal pathway [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 37(1): 49-53.
- [33] Vitor S C, Duarte G T, Saviani E E, *et al.* Nitrate reductase is required for the transcriptional modulation and bactericidal activity of nitric oxide during the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* [J]. *Planta*, 2013, 238(3): 475-486.
- [34] Tossi V, Lombardo C, Cassia R, *et al.* Nitric oxide and flavonoids are systemically induced by UV-B in maize leaves [J]. *Plant Sci*, 2012, 193/194: 103-109.
- [35] Lipovsky A, Oron U, Gedanken A, *et al.* Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymal stem cells [J]. *Lasers Med Sci*, 2013, 28(4): 1113-1117.
- [36] 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.