

腐胺与过氧化氢交互调控白桦三萜合成的初步研究

马明媚, 詹亚光, 王晓东, 孙美玲, 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** 分析腐胺和过氧化氢调控白桦三萜合成中是否存在交互作用。**方法** 在白桦悬浮细胞的生长末期添加 1 mmol/L 腐胺 (Put)、0.1 mmol/L 过氧化氢 (H_2O_2) 和 40 $\mu\text{g/mL}$ 真菌诱导子, 采用比色法、高效液相色谱法和荧光显微镜分析白桦悬浮细胞中三萜量、多胺量和 H_2O_2 荧光强度变化。**结果** 1 mmol/L Put 增加了细胞中 H_2O_2 的荧光强度和三萜量。0.1 mmol/L H_2O_2 促进了三萜合成, 却抑制了多胺中亚精胺 (Spd)、精胺 (Spm) 的合成, 而对 Put 无影响。Put 与 H_2O_2 同时处理组, 细胞中 H_2O_2 的荧光强度和多胺的量均介于 Put 与 H_2O_2 单独处理组之间, 而三萜量却显著高于其单独处理组; 进一步药理学实验分析发现, 真菌诱导子与 H_2O_2 清除剂过氧化氢酶 (CAT) 处理后, 细胞中的 Put 和 Spd 量比真菌诱导后增加了 0.62% 和 16.05%, 而对 Spm 无显著影响。真菌诱导子与多胺 (Pas) 合成抑制剂 *D*-精氨酸 (*D*-arg) 处理组, 细胞中的 H_2O_2 荧光强度比真菌诱导子处理组有所降低了; 在真菌诱导子、CAT 和 *D*-arg 同时处理下, 细胞中的 H_2O_2 荧光强度、PAs 量和三萜量均低于真菌诱导子与 CAT 或 *D*-arg 处理, 但三萜量仍高于对照组。**结论** Put 与 H_2O_2 在促进白桦三萜合成中存在交互作用。

关键词: 白桦; 三萜; 多胺; 过氧化氢; 真菌诱导子

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)20-2916-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.023

Interaction between putrescine and hydrogen peroxide on regulating triterpenoid production in *Betula platyphylla*

MA Ming-mei, ZHAN Ya-guang, WANG Xiao-dong, SUN Mei-ling, FAN Gui-zhi

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

Abstract: **Objective** To analyze the interaction between putrescine (Put) and hydrogen peroxide (H_2O_2) on the regulation of triterpenoid production in *Betula platyphylla* suspension cell culture. **Methods** Put (1 mmol/L), H_2O_2 (0.1 mmol/L), and fungal elicitors (40 $\mu\text{g/mL}$) were added into the eight-day-old *B. platyphylla* suspension cell culture, and the changes of triterpenoid content, polyamine content, and H_2O_2 fluorescence intensity were analyzed by chemical colorimetry, HPLC, and fluorescence microscopy, respectively. **Results** Put (1 mmol/L) increased the H_2O_2 fluorescence intensity and triterpenoid content in *B. platyphylla* suspension cell culture. H_2O_2 (0.1 mmol/L) promoted the triterpenoid production, inhibited the production of spermidine (Spd) and spermine (Spm), and had no effect on Put content. Under the treatment of 1 mmol/L Put and 0.1 mmol/L H_2O_2 , H_2O_2 fluorescence intensity and polyamine (PAs) content were between its separated treatment, and triterpenoid content was significantly higher than its separated treatment. Comparing with the fungal elicitor, fungal elicitor and H_2O_2 scavenger catalase (CAT) induced an increase of 0.62% and 16.05% in Put and Spd content, respectively, while no effect on Spm content. Fungal elicitor and PAs synthesis inhibitor *D*-arginine (*D*-arg) decreased the H_2O_2 fluorescence intensity. Under the treatment of fungal elicitor, the fluorescence intensity of CAT and *D*-arg, H_2O_2 and the contents of PAs and triterpenoid were lower than those of fungal elicitor and CAT or *D*-arg, but triterpenoid content was still higher than that of the control. **Conclusion** This can be inferred that the interaction between Put and H_2O_2 regulates the triterpenoid production in birch suspension cell culture.

Key words: *Betula platyphylla* Suk.; triterpenoid; polyamine; hydrogen peroxide; fungal elicitor

在应用植物组织培养生产药用次生代谢物的研究中, 次生代谢产物的低产现象是制约细胞培养植

物天然产物技术产业化应用的核心问题之一, 理解和掌握植物细胞次生代谢调控规律是解决这一问题

收稿日期: 2013-06-19

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基金 (LBH-Q11185)

作者简介: 马明媚, 硕士, 现从事植物细胞工程领域的研究。E-mail: 823626283@qq.com

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

的基础^[1-2]。在调控植物细胞次生代谢物合成的研究中发现,诱导子可以迅速、专一和选择性地诱导植物多种次生代谢物的合成^[3]。齐香君等^[4]发现真菌诱导子和 Co^{2+} 促进了黄芩毛状根中黄芩苷的合成;Onrubia等^[5]发现冠菌素和茉莉酸甲酯促进了紫杉烷的合成。可见,诱导子是提高植物次生代谢物产量的方法之一。

在诱导子促进次生代谢物合成的机制中,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^[6]。目前报道的参与植物次生代谢物合成调控的信号分子有水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)、钙离子(Ca^{2+})、一氧化氮(NO)、多胺(PAs)和活性氧(ROS)等^[7-10]。但植物细胞次生代谢信号调控是一个十分复杂的系统,虽然近年来有关植物细胞次生代谢产物合成信号调控方面的研究取得了一定的进展,但离完全了解植物次生代谢信号转导机制还有很大距离,如国内外学者研究发现,PAs的分解代谢产物之一为过氧化氢(H_2O_2)^[11],而 H_2O_2 是介导次生代谢产物合成的必须信号分子。那么,PAs是否介导其分解代谢物 H_2O_2 调控次生代谢物的合成,PAs与 H_2O_2 调控次生代谢物合成中是否存在交互作用,目前均未见报道。

为此,本实验在前期研究的基础上,以高产三萜的白桦悬浮细胞系为材料^[12],以*Phomopsis*为真菌诱导子^[13],分析外源PAs与 H_2O_2 以及真菌诱导的内源PAs与 H_2O_2 在调控白桦三萜中的相互作用,该研究将对理解PAs、 H_2O_2 以及真菌诱导子诱发植物次生代谢产物合成的信号转导机制提供理论基础。

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),外植体取自其诱导的组培苗,鉴定人为詹亚光教授。HY—6A 双层振荡器;UV—2800 紫外分光光度计;高效液相色谱仪(Waters公司);荧光显微镜(Sigma公司),Image-Pro Plus 专业图像分析软件。

2 方法

2.1 白桦悬浮细胞制备

用白桦组培苗茎段进行愈伤组织诱导,使用NT固体培养基,附加0.1 mg/L 6-苄基腺嘌呤(6-BA)和0.01 mg/L 苯基噻二唑脲(TDZ),蔗糖20 g/L,琼脂5.3 g/L, pH 6.0~6.5。每20~25 d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 °C,光照强度为2 000 lx,光照16 h/d,摇床转速为120 r/min。

2.2 外源腐胺和 H_2O_2 的添加

将0.1 mmol/L H_2O_2 和1 mmol/L 腐胺(Put)溶液分别添加到培养8 d的白桦悬浮培养体系中,在处理24 h取样测定白桦悬浮细胞的活力、PAs、 H_2O_2 和白桦三萜量。对照加入等体积无菌水,每处理重复3次。添加的 H_2O_2 和Put溶液采用无菌0.45 μm 微孔滤膜滤过除菌。

2.3 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 °C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 $\mu\text{g/mL}$ 真菌诱导子添加培养8 d的白桦悬浮培养体系中,在处理24 h取样测定白桦悬浮细胞的活力、PAs、 H_2O_2 和白桦三萜量。对照加入等体积无菌水,每处理重复3次。

2.4 过氧化氢酶(CAT)和D-精氨酸(D-arg)的添加

H_2O_2 清除剂CAT溶液添加的终浓度为2 mkat/L,多胺抑制剂D-Arg的添加终浓度为2 mmol/L。添加的CAT和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CAT或D-Arg 20 min后再添加真菌诱导子,对照加入等体积无菌水,每处理重复3次。

2.5 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 °C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^[14]。

2.6 H_2O_2 的荧光检测

H2DCF-DA(carboxy-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate)购自Sigma公司,将待测细胞用蒸

馏水清洗, 加入 H₂DCF-DA 使其终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 避光放置于 26 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h, 取出后使用 pH 7.4 的 Tris-HCl 洗掉细胞表面的荧光探针, 利用荧光显微镜激发滤光片波长 488 nm, 阻断滤光片波长 515 nm 观察, 每个实验重复 5~10 次^[15]。

2.7 PAs 的提取和测定

PAs 的量采用高效液相色谱法测定^[16], 取白桦悬浮细胞 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 1 h, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 000 $\times g$ 离心 30 min。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 $^{\circ}\text{C}$ 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 15 000 $\times g$ 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, 过滤膜 (0.45 μm), 取 20 μL 进样。

色谱条件: HiQ si1 C₁₈ V 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (64:36); 检测波长 230 nm, 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 20 μL 。

以 Put、Spd、Spm 对照品做标准曲线定量, 在 0.025~0.45 nmol/ μL 内线性关系良好, 回归方程为 Put: $Y=2\ 651\ 020 X+7\ 155.5$ ($r^2=0.999\ 1$); Spd: $Y=2\ 928\ 494 X+6\ 773$ ($r^2=0.999\ 6$); Spm: $Y=2\ 696\ 128 X-11\ 351$ ($r^2=0.998\ 6$)。

2.8 三萜类化合物的提取和测定

三萜类物质质量用紫外分光光度法测定^[12]。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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min, 流水冷却至室温, 加醋酸乙酯定容至 5 mL, 用 1 cm 比色皿测定 551 nm 处的 A 值。

以白桦酯醇为对照品作标准曲线定量。以三萜质量浓度为纵坐标 (Y), 以 A 值为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y=0.087\ 1 X+0.002$, 结果表明白桦酯醇在 0.02~0.10 mg/L 线性关系良好。

3 结果与分析

3.1 外源 Put 和 H₂O₂ 处理对白桦悬浮细胞中 H₂O₂ 荧光强度的影响

Put (1 mmol/L) 与 H₂O₂ (0.1 mmol/L) 处理 24 h 后白桦悬浮细胞中 H₂O₂ 的荧光强度见图 1。H₂O₂ 处理后白桦悬浮细胞中 H₂O₂ 荧光强度比对照增加了 204.59% (图 1-A), Put 处理后细胞中的 H₂O₂ 荧光强度比对照增加了 31.60% (图 1-B), Put 与 H₂O₂ 同时处理后细胞中的 H₂O₂ 荧光强度比对照增加了 117.11% (图 1-C)。上述结果表明, Put 可以促进 H₂O₂ 的产生, 同时 Put 可以部分清除细胞中的 H₂O₂。

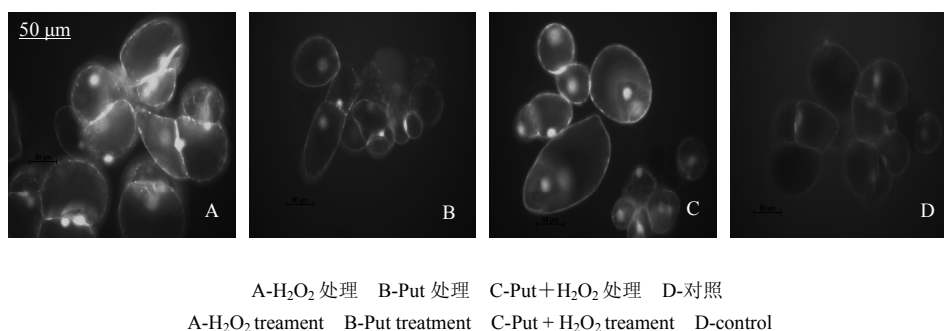


图1 Put 与 H₂O₂ 处理对白桦悬浮细胞中 H₂O₂ 荧光强度的影响

Fig. 1 Effects of Put and H₂O₂ on fluorescence intensity of H₂O₂ in suspension cells of *B. platyphylla*

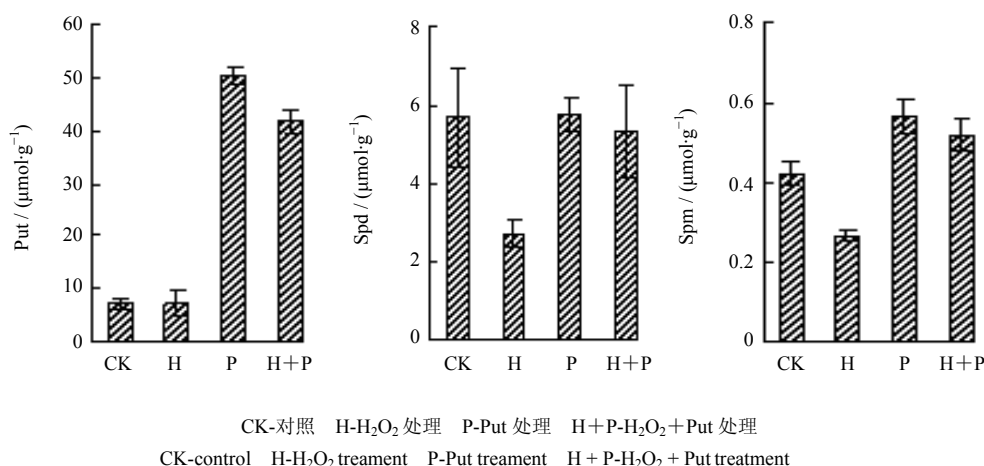
3.2 外源 Put 和 H₂O₂ 处理对白桦悬浮细胞中 PAs 量的影响

Put (1 mmol/L) 与 H₂O₂ (0.1 mmol/L) 处理 24 h 后白桦悬浮细胞中 PAs 量见图 2, Put 处理后白桦悬浮细胞中的 Put、Spd 和 Spm 分别比对照增加了 600.16%、1.41% 和 26.92%; H₂O₂ 处理后细胞中的 Spd 和 Spm 分别比对照降低了 14.98% 和 31.90%,

而 Put 却增加了 0.36%; Put 与 H₂O₂ 同时处理后, 细胞中的 3 种 PAs 量介于 Put 和 H₂O₂ 处理之间。上述结果表明, 0.1 mmol/L H₂O₂ 对 PAs 合成存在抑制作用, 而添加 Put 后此抑制作用可被解除。

3.3 外源 Put 和 H₂O₂ 对白桦悬浮细胞活力和三萜量的影响

Put (1 mmol/L) 与 H₂O₂ (0.1 mmol/L) 处理

图2 外源 Put 与 H₂O₂ 对白桦悬浮细胞中 Put、Spd 和 Spm 量的影响Fig. 2 Effects of Put and H₂O₂ on contents of Put, Spd, and Spm in cells of *B. platyphylla*

24 h 后白桦悬浮细胞的活力见图 3-A。Put、Put 与 H₂O₂ 处理下后白桦悬浮细胞活力分别比对照增加 19.45%和 3.67%，而 H₂O₂ 处理后白桦悬浮细胞活力比对照降低了 7.59%。

Put 和 H₂O₂ 处理后白桦悬浮细胞中的三萜量见图 3-B，Put 和 H₂O₂ 处理后悬浮细胞中的三萜量分别比对照增加了 153%和 122%，Put 与 H₂O₂ 共同处理后细胞中三萜量比 Put 和 H₂O₂ 处理下的三萜量分

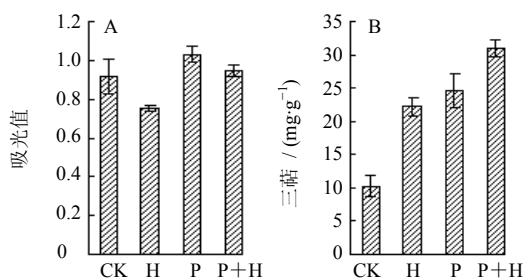


图3 外源 Put 与 H₂O₂ 对白桦悬浮细胞活力和三萜量的影响
Fig. 3 Effects of Put and H₂O₂ on cell viability and triterpenoid content in cells of *B. platyphylla*

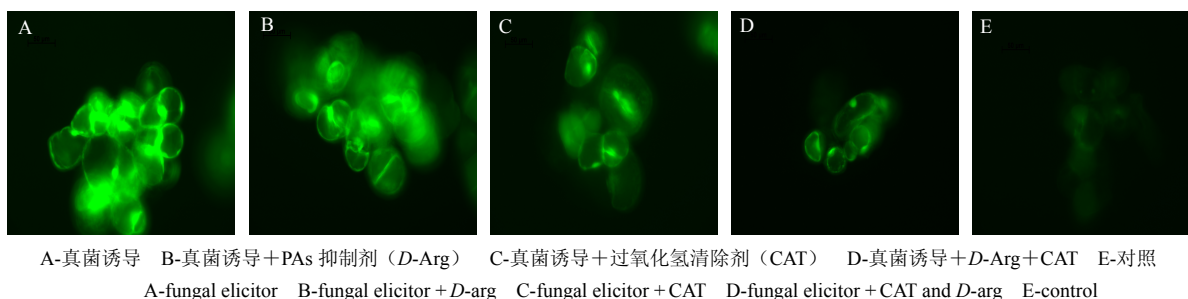
别增加了 44.32%和 64.29%。

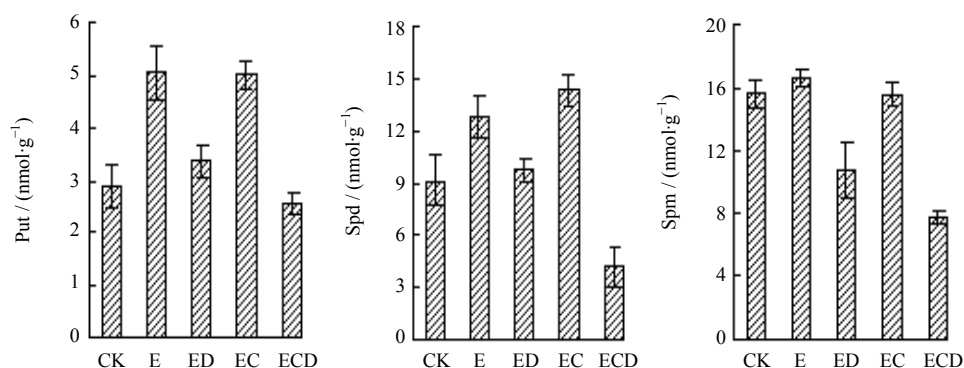
3.4 真菌诱导子对白桦悬浮细胞中 H₂O₂ 荧光强度的影响

真菌诱导子处理 24 h 后白桦悬浮细胞中 H₂O₂ 荧光强度见图 4，真菌诱导子处理后白桦悬浮细胞中 H₂O₂ 的荧光强度比对照增加了 370.53%；真菌诱导子与 PAs 合成抑制剂 *D*-Arg 处理后，悬浮细胞中的 H₂O₂ 荧光强度比真菌诱导子单独处理降低了 17.21%，但仍高于对照水平；真菌诱导子与 H₂O₂ 清除剂 CAT 处理后，细胞中 H₂O₂ 荧光强度比真菌处理后降低了 46.09%，但仍高于对照水平；在真菌诱导的白桦悬浮细胞体系中同时添加 *D*-arg 和 CAT 后，细胞中 H₂O₂ 荧光强度比真菌诱导处理降低了 51.58%，但仍高于对照水平。

3.5 真菌诱导子处理对白桦悬浮细胞中 PAs 量的影响

真菌诱导子处理后白桦悬浮细胞中的 Put、Spd 和 Spm 量分别比对照增加了 75.04%、40.48%和 6.62% (图 5)。在真菌诱导的白桦悬浮体系中添加

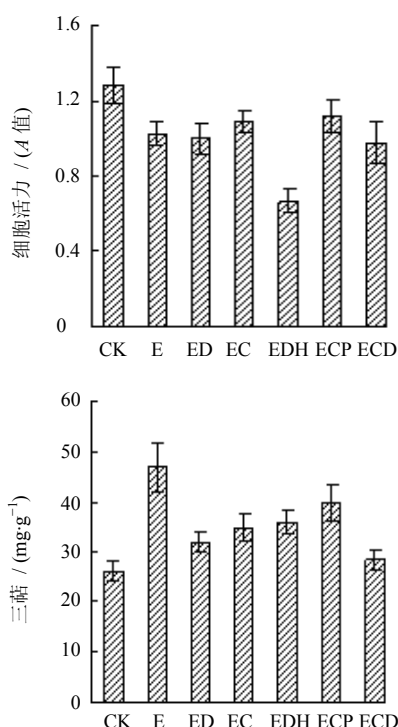
图4 真菌诱导子处理对白桦悬浮细胞中 H₂O₂ 荧光强度的影响Fig. 4 Effect of fungal elicitor on fluorescence intensity of H₂O₂ in cells of *B. platyphylla*



CK-对照 E-真菌诱导子 ED-真菌诱导子+D-Arg EC-真菌诱导子+CAT ECD-真菌诱导子+CAT+D-Arg
CK-control E-fungal elicitor ED-fungal elicitor + D-Arg EC-fungal elicitor + CAT ECD-fungal elicitor + CAT and D-Arg

图5 真菌诱导子处理对白桦悬浮细胞中 Put、Spd 和 Spm 量的影响

Fig. 5 Effect of fungal elicitor on contents of Put, Spd, and Spm in cells of *B. platyphylla*



CK-对照 E-真菌诱导子 ED-真菌诱导子+D-Arg EC-真菌诱导子+CAT EDH-真菌诱导子+D-Arg+H₂O₂ ECP-真菌诱导子+CAT+Put ECD-真菌诱导子+CAT+D-Arg

CK-control E-fungal elicitor ED-fungal elicitor + D-Arg EC-fungal elicitor + CAT EDH-fungal elicitor and D-Arg + H₂O₂ ECP-fungal elicitor + CAT and Put ECD-fungal elicitor + CAT and D-Arg

图6 真菌诱导子处理对白桦悬浮细胞活力和三萜量的影响

Fig. 6 Effect of fungal elicitor on cell viability and triterpenoid content in cells of *B. platyphylla*

PA_s 合成抑制剂 D-arg 后, 细胞中的 3 种 PA_s 量均降低, 其中 Put 和 Spd 接近于对照水平, 而 Spm 量却比对照降低了 31.16%; 在真菌的白桦悬浮体系中

添加 H₂O₂ 合成抑制剂 CAT 后, 除 Spm 量维持对照水平外, Put 和 Spd 量比单独真菌诱导的分别增加了 0.62% 和 16.05%; 在真菌诱导的白桦悬浮体系中同时添加 D-arg 与 CAT 后, Put、Spd 和 Spm 分别比对照降低了 12.66%、54.70% 和 50.73%

3.6 真菌诱导子处理对白桦悬浮细胞活力和三萜量的影响

真菌诱导子对白桦悬浮细胞活力的影响见图 6-A, 真菌诱导子处理白桦悬浮细胞的活力降低了 19.83%; 在真菌诱导的白桦悬浮体系中加入 PA_s 合成抑制剂 D-arg 后, 细胞活力比真菌诱导子单独处理的降低了 2.07%; 在真菌诱导的白桦悬浮体系中加入 H₂O₂ 合成抑制剂后, 细胞活力比真菌诱导子单独处理的增加了 4.89%; 在真菌诱导的白桦悬浮细胞体系中同时添加 D-Arg 和 CAT 后, 细胞活力比单独真菌诱导的降低了 3.85%。

真菌诱导子对白桦悬浮细胞中的三萜量的影响见图 6-B, 真菌诱导子处理后白桦悬浮细胞中的三萜量比对照增加了 81.52%。在真菌诱导的白桦悬浮体系中加入 PA_s 合成抑制剂 D-Arg 后, 三萜的量比真菌诱导子单独处理的降低了 46.66%; 在真菌诱导的白桦悬浮体系中加入 H₂O₂ 合成抑制剂 CAT 后, 细胞中的三萜量降低了 37.85%; 在真菌诱导的白桦悬浮细胞体系中同时添加 D-Arg 和 CAT 后, 细胞中三萜量比真菌诱导处理的降低了 64.65%。

4 讨论

PA_s 是生物代谢过程中产生的一类具有生物活性的低相对分子质量脂肪族含氮碱, 是 Put、Spd、Spm 和尸胺 (Cad) 的总称, 广泛存在于生物有机

体中。 H_2O_2 是生物代谢过程中产生的一种活性氧。研究表明, PAs 和 H_2O_2 作为一种生理活性物质, 被认为在生物体内信号传递过程中起“第二信使”作用, 与植物的生长发育、形态建成和胁迫响应关系密切^[17-18]。次生代谢物是植物长期演化中形成的一种对环境适应机制, 构成了植物防卫和抗逆系统的一个重要组成部分。目前, PAs 和 H_2O_2 在调控植物次生代谢产物中的信号功能已被证实^[7,10,19], 同样本课题组前期的研究发现, 外源 PAs 和 H_2O_2 均可以促进白桦悬浮细胞中三萜的合成, 其中 PAs 中 Put 的促进效应最大^[10]。那么, PAs 与 H_2O_2 调控白桦三萜合成中是否存在交互作用, 此方面的研究还未见报道。

为了揭示 PAs 与 H_2O_2 在白桦三萜合成中的调控关系, 本研究分析了外源 PAs 与 H_2O_2 的相互催化、互作对白桦三萜合成的影响。研究发现, 外源 Put 增加了白桦悬浮细胞中 H_2O_2 的荧光强度, 该结果与 Moschou 等^[11]的研究一致。外源 H_2O_2 的添加却使白桦悬浮细胞中的 Spd 和 Spm 分别降低了 14.98% 和 31.90%, Put 增加了 0.36%, 可见外源 H_2O_2 的添加在一定程度上抑制了 PAs 的合成。将 PAs 与 H_2O_2 同时添加到白桦悬浮体系中, 发现白桦悬浮细胞中的 H_2O_2 的荧光强度和 PAs 量均介于 PAs 与 H_2O_2 单独处理下的, 由此推测, Put 可以部分清除细胞中来自 H_2O_2 处理的 H_2O_2 , Put 可以部分解除来自 H_2O_2 处理对 PAs 合成的抑制。对白桦三萜量的分析发现, 外源 PAs 与 H_2O_2 单独处理均可促进三萜的合成, 这与本研究室前期的报道一致。而 PAs 与 H_2O_2 同时处理后白桦三萜量均高于其单独处理。上述结果表明, 外源 PAs 与 H_2O_2 在促进白桦三萜合成中存在交互作用。

进一步通过药理学实验发现, 真菌诱导子处理促进了白桦悬浮细胞中 H_2O_2 荧光强度的增加、PAs 和三萜含量的增加, 这与本研究室前期报道结果一致。在真菌诱导子与 H_2O_2 清除剂 CAT 同时处理下, 白桦细胞中的 H_2O_2 荧光强度和三萜量比真菌诱导子处理显著降低, 而细胞中的 PAs 量, 除 Spm 量维持对照水平外, Put 和 Spd 量比单独真菌诱导子处理的分别增加了 0.62% 和 16.05%; 在真菌诱导子与 PAs 合成抑制剂 D-Arg 同时处理下, 白桦细胞中的 PAs 量和三萜比真菌诱导子处理显著降低, 而细胞中的 H_2O_2 荧光强度介于真菌诱导子处理和真菌诱导子与 CAT 处理之间; 在真

菌诱导子、CAT 和 D-Arg 同时处理下, 白桦细胞中的三萜量均低于真菌诱导子与 CAT 或 D-arg 处理, 但仍高于对照。而细胞中的 H_2O_2 荧光强度和 PAs 量却均低于真菌诱导子与 CAT 或 D-arg 处理。由此推测, 真菌诱导子促进白桦三萜合成中 PAs 与 H_2O_2 存在交互作用。

综上所述, PAs 和 H_2O_2 两种信号分子在调控白桦悬浮细胞中三萜的合成过程中存在交互作用, 而 PAs 和 H_2O_2 是如何交互作用的, 下一步将进一步研究 PAs 和 H_2O_2 交互作用的机制。

参考文献

- [1] 王晓云, 夏循礼, 黄凤兰, 等. 植物次生代谢途径的遗传操作 [J]. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1151-1163.
- [2] 刘春朝, 王玉春, 欧阳藩. 植物组织培养生产有用次生代谢产物的研究进展 [J]. 生物技术通报, 1997(5): 1-3.
- [3] 齐凤慧, 詹亚光, 景天忠. 诱导子对植物细胞培养中次生代谢物的调控机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 568-573.
- [4] 齐香君, 郭乐康, 陈微娜. 诱导子对黄芩毛状根生长及黄芩苷合成的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 801-803.
- [5] Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, *et al.* Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate [J]. *J Plant Physiol*, 2013, 170(2): 211-219.
- [6] 徐茂军. 一氧化氮: 植物细胞次生代谢信号转导网络可能的关键节点 [J]. 自然科学进展, 2007, 17(12): 1622-1630.
- [7] 杨芳, 张宗申, 杨斌. 过氧化氢对丹参悬浮细胞生长及次生代谢物积累的影响 [J]. 西南农业学报, 2011(3): 901-904.
- [8] 李翠霞, 王兆丰, 张继, 等. 诱导子对百里香中次生代谢产物的影响差异 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(2): 96-100.
- [9] 刘连成, 董娟娥, 张婧一, 等. Ca^{2+} 对丹参培养细胞中迷迭香酸合成及其相关酶活性的影响 [J]. 生物工程学报, 2012, 28(11): 1359-1369.
- [10] 李晓灿, 詹亚光, 王晓东, 等. 多胺对白桦悬浮细胞生长和三萜积累的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(4): 463-467.
- [11] Moschou P N, Paschalidis K A, Delis I D, *et al.* Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H_2O_2 signatures that direct tolerance responses in tobacco [J]. *Plant Cell*, 2008, 20: 1708-1724.
- [12] 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.
- [13] 翟俏丽, 范桂枝, 詹亚光. 真菌诱导子促进白桦悬浮细胞三萜的积累 [J]. 林业科学, 2011, 47(6): 42-47.
- [14] 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.
- [15] 张小莉, 王鹏程, 宋纯鹏. 植物细胞过氧化氢的测定方法 [J]. 植物学报, 2009, 44(1): 103-106.
- [16] 刘怀攀, 朱自学, 刘天学, 等. 渗透胁迫对小麦胚芽鞘内多胺的种类、形态和含量的影响 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(3): 293-299.
- [17] 苏国兴. 精胺 (Spm) 在植物响应逆境中的特异性作用 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(5): 1007-1012.
- [18] 林植芳, 刘 楠. 活性氧调控植物生长发育的研究进展 [J]. 植物学报, 2012, 47(1): 74-86.
- [19] Ozawa R, Berteaux C M, Foti M, *et al.* Exogenous polyamines elicit herbivore-induced volatiles in lima bean leaves: involvement of calcium, H₂O₂ and jasmonic acid [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(12): 2183-2199.