

一氧化氮和过氧化氢在内生真菌小克银汉霉属 AL4 诱导子促进茅苍术细胞挥发油积累中的作用

方芳^{1,2}, 戴传超¹, 王宇¹

1 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046

2 淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 淮安 223002

摘要: 一株属于小克银汉霉属(*Cunninghamella* sp.)的内生真菌(编号为 AL4)制成的粗诱导子可以诱发茅苍术悬浮细胞产生多种防卫反应, 包括一氧化氮(NO)、过氧化氢(H₂O₂)迸发和挥发油合成加强。NO 专一性淬灭剂 cPTIO 和 H₂O₂ 淬灭剂过氧化氢酶(CAT) 则不仅可以分别抑制 AL4 粗诱导子引起的茅苍术细胞的 NO 和 H₂O₂ 迸发, 还都能部分阻断 AL4 粗诱导子促进茅苍术细胞挥发油合成。添加 NO 供体硝普钠(SNP) 和 H₂O₂ 都可引起茅苍术细胞中挥发油积累增加, 但二者效果不同。因此暗示着 NO 和 H₂O₂ 都是介导内生真菌 AL4 粗诱导子促进茅苍术悬浮细胞挥发油合成的信号分子。同时添加 NO 的淬灭剂 cPTIO 和 H₂O₂ 的淬灭剂 CAT 并不能完全抑制 AL4 粗诱导子引起的茅苍术细胞挥发油积累增加, 这表明内生真菌 AL4 粗诱导子还可以通过其他方式促进茅苍术悬浮细胞挥发油合成。

关键词: 一氧化氮, 过氧化氢, 信号转导, 茅苍术细胞, 挥发油生物合成, 内生真菌诱导子

Role of nitric oxide and hydrogen peroxide in the essential oil increasing of suspension cells from *Atractylodes lancea* induced by endophytic fungal *Cunninghamella* sp. AL4 elicitor

Fang Fang^{1,2}, Chuanchao Dai¹, and Yu Wang¹

1 College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

2 College of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223002, China

Abstract: Crude elicitor of one endophytic fungi (belong to *Cunninghamella* sp., named AL4) induced multiple responses in *Atractylodes lancea* suspension cells, including rapid generation of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide(H₂O₂), sequentially followed by enhancement of essential oil production. Adding NO-specific scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxide-3-oxide (cPTIO) and H₂O₂ scavenger catalase (CAT) could block elicitor-induced NO and H₂O₂ generation respectively, but could all partly block elicitor-induced essential oil biosynthesis. Adding NO-donor sodium nitroprusside (SNP) and H₂O₂ could all promote essential oil accumulation in *A. lancea* cells, but the effect of both was different. These results strongly suggested that NO and H₂O₂ may all act as signaling molecule to mediate AL4 elicitor promoting essential oil accumulation in suspension cells of *A. lancea*. Furthermore, adding cPTIO and CAT contemporarily could not completely inhibit essential oil accumulation induced by AL4 elicitor. This result suggested that AL4 elicitor could also promote essential oil accumulation in

Received: July 9, 2009; **Accepted:** August 26, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30500066, 30770073, 30970523).

Corresponding author: Chuanchao Dai. Tel: +86-25-85891382; E-mail: daichuanchao@njnu.edu.cn

国家自然科学基金(Nos. 30500066, 30770073, 30970523)资助。

suspension cells of *A. lancea* by other means.

Keywords: nitric oxide, hydrogen peroxide, signal transduction, suspension cells from *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC., essential oil biosynthesis, endophytic fungal elicitor

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 是菊科苍术属多年生草本植物。其干燥的根茎为中药苍术, 是江苏省著名的道地药材, 具有燥湿健脾、祛风散寒、明目等功效^[1]。苍术主要活性部位是挥发油, 油中主要成分为聚乙炔类的苍术素以及倍半萜类的苍术醇、 β -桉叶醇和苍术酮等^[2]。近年来由于野生茅苍术资源被严重破坏^[3], 并且茅苍术的人工栽培有一定的难度, 因此利用细胞培养技术生产挥发油被视为解决茅苍术药源短缺问题的一条有效途径。然而培养细胞中挥发油的低产现象是制约该技术产业化的核心问题之一, 因此有必要深入研究茅苍术细胞中挥发油合成的高产调控方法和机理。

本实验室先前研究表明: 内生真菌 AL4 粗诱导子诱导可使茅苍术悬浮细胞生物量轻微增加, 挥发油含量大幅提高, 即达到双增长^[4]。这与许多研究中报道的黑曲霉、桔青霉等植物病原菌诱导子的效果(虽能促进植物细胞合成次生代谢产物, 但往往会导导致细胞早衰)显著不同^[5-7]。这可能是由于本研究所采用的 AL4 真菌是经过反复实验, 能促进茅苍术快繁苗的生长, 且证明和宿主植物茅苍术共生关系良好的内生真菌。此外 AL4 粗诱导子加入到茅苍术细胞培养体系后, 细胞的一些抗性相关酶(如苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶等)缓慢增高, 这和植物病原菌诱导子的快速高强度的刺激方式是不同的。这些结果暗示内生真菌诱导子与病原菌诱导子在促进植物次生代谢产物生产的作用机制方面可能有明显差别。

一氧化氮(NO)和过氧化氢(H₂O₂)是植物体内两种常见的信号分子, 在植物抗逆反应等过程中起重要作用^[8-12]。目前对于 NO 和 H₂O₂ 在病原菌诱导子促进植物细胞合成次生代谢产物中的作用及其相互关系已有一些报道^[7,13-14], 但用内生真菌诱导子做这方面的研究还很少。细胞内部的信号转导系统是介导外界因子影响植物次生代谢产物合成的纽带。因此了解与挥发油合成调控有关的信号分子和信号转导途径, 则有助于更好地了解茅苍术细胞中次生

代谢调控规律, 进一步找到调控茅苍术细胞高产挥发油的方法。因此, 本实验系统地研究了在内生真菌 AL4 粗诱导子促进茅苍术悬浮细胞挥发油生物合成过程中 NO 和 H₂O₂ 的作用, 从而分析 AL4 粗诱导子促进茅苍术细胞挥发油积累中的信号分子及其相互关系, 可为研究其他内生真菌诱导子或倍半萜类物质的信号转导机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 茅苍术悬浮细胞的培养

茅苍术悬浮细胞系由本实验室选育^[4]。悬浮细胞的培养基为 MS 附加 6-BA(1 mg/L)+NAA(0.5 mg/L) 以及 3%蔗糖, 灭菌前调 pH 为 6.0。培养温度(23 ± 1)°C, 摇床转速 120 r/min。悬浮细胞每隔 14 天继代 1 次, 每次继代时将培养物摇匀, 用无菌移液管吸取培养基中的培养物加入新鲜培养液中, 新鲜培养液与原细胞培养基比例为 3:1。实验中所用的茅苍术悬浮细胞已经过 30~40 次继代培养, 具有稳定的形态特征和生长速率。

1.2 AL4 粗诱导子的制备和其总糖含量的测定

内生真菌 AL4 分离自茅苍术叶片, 经南京师范大学中科院硕士研究生陈佳昕鉴定属于小克银汉霉属(*Cunninghamella* sp.)中的一个种^[15]。参照文献^[4]的方法制备内生真菌粗诱导子。采用苯酚-硫酸法^[16]测定其总糖含量。在第 14 天的茅苍术悬浮细胞培养基中加入 AL4 的粗提物时, 加入量按菌液中的含糖量计算。

1.3 茅苍术悬浮细胞中 NO 浓度的测定

按文献^[9]和^[13]的方法进行。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含量推算细胞中 NO 浓度。不同处理的茅苍术悬浮细胞经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后, 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, 根据吸光度值利用

NaNO₂ 标准曲线计算 NO 的含量。

1.4 茅苍术悬浮细胞 H₂O₂ 释放量的测定

采用化学发光法测定。测定方法如下: 吸取 100 μL 不同处理的茅苍术悬浮细胞培养液, 依次加入 750 μL 磷酸缓冲液(50 mmol/L 磷酸钾, pH 7.9)、200 μL 氨基苯二酰[一]肼(鲁米诺)(0.3 mmol/L 于磷酸缓冲液中)及 100 μL 高铁氰化钾(K₃[Fe(CN)₆], 14 mmol/L)。参照文献[17]的方法测定最大化学发光值。通过测定不同浓度 H₂O₂ 标准溶液的最大发光值, 绘制 H₂O₂ 浓度-最大发光值标准曲线。利用标准曲线确定不同茅苍术细胞培养液的 H₂O₂ 浓度。

1.5 茅苍术悬浮细胞中挥发油的提取和测定

参照文献[4]的方法进行。

1.6 外源 NO 和 H₂O₂ 的添加方法

取 14 d 龄的茅苍术细胞, 分别加入经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后的 NO 供体 SNP 和 H₂O₂ 溶液, 分别培养 15 h 和 7.5 h 后将细胞过滤并以新鲜培养基洗涤细胞去除 SNP 和 H₂O₂, 随后将细胞重悬于新鲜培养基中。

1.7 NO 淬灭剂 cPTIO 和 H₂O₂ 淬灭剂 CAT 的添加方法

NO 淬灭剂 cPTIO 及 H₂O₂ 淬灭剂 CAT 溶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 按照实验要求加到 14 d 茅苍术细胞培养液中。各种抑制剂的添加时间为 AL4 粗诱导子或 NO 供体 SNP 处理前 20 min。其中, 添加 NO 供体 SNP 的实验组细胞在培养 15 h 后将细胞过滤并以新鲜培养基洗涤细胞去除 SNP 和 cPTIO, 随后将细胞重悬于新鲜培养基中。

2 结果与分析

2.1 AL4 粗诱导子诱发茅苍术细胞 NO 和 H₂O₂ 迸发、挥发油积累

在茅苍术细胞培养到第 14 天时加入 30 mg/L 的诱导子, 以不加诱导子的作为对照。内生真菌 AL4 粗诱导子对茅苍术悬浮细胞 NO 浓度、H₂O₂ 释放量和挥发油含量的影响分别如图 1、图 2 和图 3 所示。图中所示结果为 3 次独立实验的平均值。NaNO₂ 标准曲线为 $Y = 0.0108X - 0.0005$, $R^2 = 0.9990$ 。H₂O₂ 浓度-最大发光值标准曲线为 $Y = 554.39X - 95.286$, $R^2 = 0.9970$ 。

从图 1 和图 2 可以看出, AL4 粗诱导子处理可以

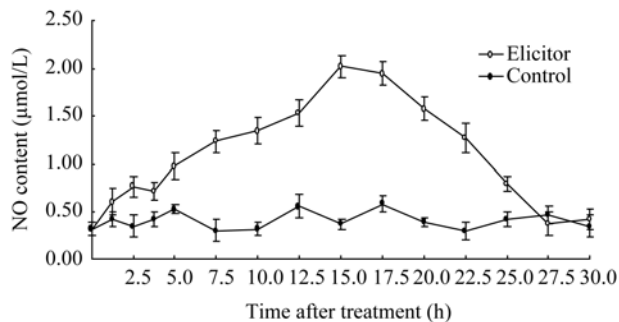


图 1 内生真菌 AL4 粗诱导子诱发茅苍术悬浮细胞 NO 迸发 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Time-course of NO release of *A. lancea* cells induced by crude elicitor of endophytic fungus AL4.

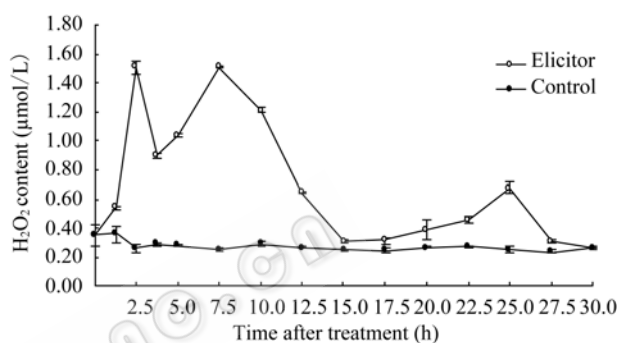


图 2 内生真菌 AL4 粗诱导子诱发茅苍术悬浮细胞 H₂O₂ 迸发 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Time-course of H₂O₂ release of *A. lancea* suspension cells induced by crude elicitor of endophytic fungus AL4.

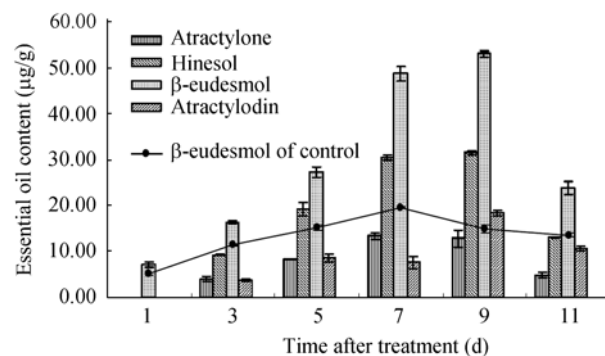


图 3 内生真菌 AL4 粗诱导子诱导时间对每克茅苍术悬浮细胞挥发油含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Time-course of essential oil content of every gram suspension cell from *A. lancea* induced by crude elicitor of endophytic fungus AL4. Notation: The results of treatment represent with column figure, while the results of control represent with line chart figure.

诱发茅苍术细胞产生 NO 和 H₂O₂, 但二者产生最高峰的时间不同。细胞中 NO 的浓度于 15 h 左右达到最高, 此时处理组细胞 NO 产生量比对照组高 5 倍左

右。而细胞中 H_2O_2 释放量则在 2.5 h 和 7.5 h 出现 2 个高峰, 在 7.5 h 时处理组细胞 H_2O_2 产生量比对照组高 6 倍左右。图 3 的结果显示: 未经诱导处理的茅苍术细胞中仅能检出 β -桉叶醇, 但它的含量则随细胞的生长而不断变化, 其在细胞生长的第 21 天 (即诱导子诱导的第 7 天) 达到最大, 为 19.62 $\mu\text{g/g}$ 。在诱导子诱导 1 d 的细胞中, 也仅能检出 β -桉叶醇, 其含量超出同期对照 41.68%, 表明诱导子刚开始促进茅苍术细胞挥发油积累。在诱导子诱导 3~11 d 的细胞中均能检测到苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇和苍术素的存在。9 d 是最佳的诱导子诱导时间, 此时苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇和苍术素的量分别为 12.85、31.46、53.02、18.35 $\mu\text{g/g}$ 。诱导时间过长也不利于茅苍术细胞挥发油的积累。

人们目前大致认为真菌诱导子诱发植物细胞中次生代谢产物合成的信号转导过程为: 真菌诱导子作为一种胞外刺激物先与植物细胞膜上的特定受体识别并结合, 进而促进细胞产生一些特定的胞内信使物质并通过相应的信号转导途径调控细胞核中相关基因的表达^[18], 最终激活细胞中的防御性次生代谢系统促进次生代谢产物合成。因此从以上的结果可以看出: 在内生真菌 AL4 粗诱导子处理后, 细胞出现的 NO 和 H_2O_2 迸发可能是前期反应。NO 和 H_2O_2 可能作为胞内信使物质, 随后再经历一系列的级联过程, 最终导致细胞的挥发油合成增加。

2.2 AL4 粗诱导子浓度对茅苍术细胞 NO、 H_2O_2 释放量和挥发油积累的影响

在茅苍术细胞培养到第 14 天时加入不同量的 AL4 粗诱导子, 培养 15 h、7.5 h、9 d 后分别测定茅苍术细胞中 NO 浓度、 H_2O_2 释放量和挥发油含量。不同的内生真菌 AL4 粗诱导子浓度(0、5、10、20、30、40 mg/L)对茅苍术悬浮细胞中 NO、 H_2O_2 释放量和挥发油含量的影响分别如图 4 和图 5 所示。图中所示结果为 3 次独立实验的平均值。

AL4 粗诱导子对茅苍术细胞中 NO 和 H_2O_2 产生呈现明显的浓度依赖性。当诱导子浓度在 0~30 mg/L 范围内, 茅苍术细胞中 NO 和 H_2O_2 释放量基本上随着诱导子的浓度增加而在增加。而当诱导子浓度为 40 mg/L 时, 茅苍术细胞中 NO 和 H_2O_2 释放量都出现了不同程度的下降。这与图 5 显示的内生真菌 AL4

粗诱导子对茅苍术悬浮细胞挥发油含量影响所呈现的浓度依赖性相类似, 这进一步暗示 NO 和 H_2O_2 可能是介导内生真菌 AL4 粗诱导子促进茅苍术悬浮细胞挥发油合成的信号分子。

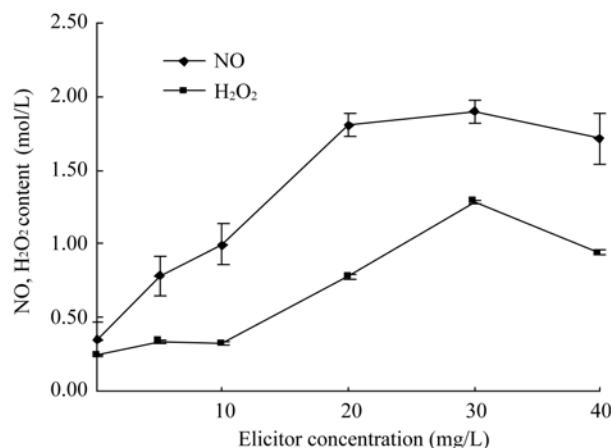


图 4 AL4 诱导子浓度对茅苍术悬浮细胞中 NO、 H_2O_2 释放量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of elicitor concentrations of endophytic fungus AL4 on NO and H_2O_2 release by *A. lancea* suspension cells.

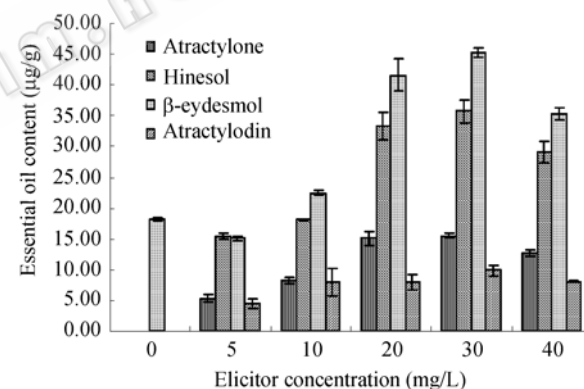


图 5 AL4 诱导子浓度对每克茅苍术悬浮细胞中挥发油含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of elicitor concentrations of endophytic fungus AL4 on essential oil content of every gram suspension cell from *A. lancea*.

2.3 NO 和 H_2O_2 在 AL4 粗诱导子促进茅苍术细胞挥发油合成中的作用

为了进一步研究 NO 和 H_2O_2 在内生真菌 AL4 粗诱导子促进茅苍术悬浮细胞挥发油生物合成中的作用, 设置 1 个对照组和 7 个实验组, 测试 8 个组中茅苍术悬浮细胞 NO 和 H_2O_2 的产生情况(图 6)以及挥发油含量情况(图 7)。8 个组中分别为: 1)未添加诱导子的对照组; 2)添加 AL4 粗诱导子; 3)添加 NO 的

供体 SNP; 4)添加 H₂O₂; 5)添加 SNP 和 NO 的淬灭剂 cPTIO; 6)添加 AL4 粗诱导子和 cPTIO; 7)添加 AL4 粗诱导子和 H₂O₂ 的淬灭剂 CAT; 8)添加 AL4 粗诱导子、cPTIO 和 CAT。AL4 粗诱导子、SNP、cPTIO、H₂O₂ 和 CAT 的添加浓度分别为 30 mg/L、2.5 mmol/L、15 μmol/L、4 μmol/L 和 1.75 mkat/L。在茅苍术细胞培养到第 14 天时进行处理, NO 和 H₂O₂ 释放量的测定时间分别为处理后 15 h 和 7.5 h, 挥发油含量的测定时间为处理后 9 d。

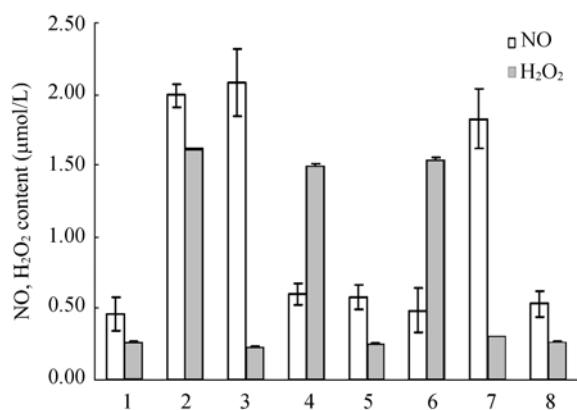


图 6 8 个组中 NO 和 H₂O₂ 的产生情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 NO and H₂O₂ release of eight treated groups.

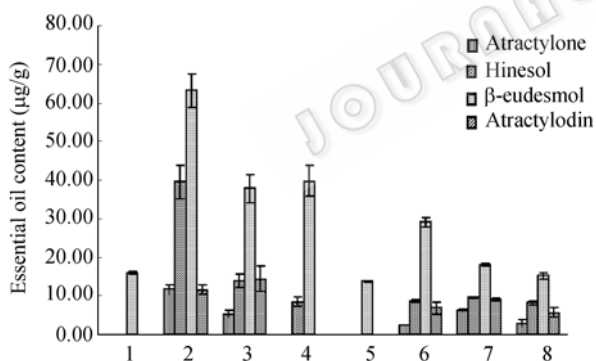


图 7 8 个组中挥发油的积累情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Essential oil accumulation of eight treated groups.

由图 6 和图 7 可以看出: 在对照组细胞中, NO 和 H₂O₂ 的释放量很低, 基本处于基底水平, 可检出 16.06 μg/g 的 β-桉叶醇。添加 AL4 粗诱导子可以诱发茅苍术细胞的 NO 和 H₂O₂ 迸发(图 6 中 1 和 2 比较); 同时可促进细胞挥发油的积累, 使苍术酮、苍术醇、β-桉叶醇和苍术素的量分别达到 11.68、39.49、63.17、11.59 μg/g, 其中 β-桉叶醇的量是对照的 3.93

倍(图 7 中 1 和 2 比较)。添加 NO 的供体 SNP 可引起茅苍术细胞中 NO 浓度增高, 但对细胞的 H₂O₂ 释放量并无影响(图 6 中 3 和 1 比较)。添加 SNP 也可促进茅苍术细胞的挥发油积累(图 7 中 3 和 1 比较), 但其促进效果不如添加 AL4 诱导子的实验组(图 7 中 3 和 2 比较)。添加 H₂O₂ 可引起茅苍术细胞的 H₂O₂ 浓度增高, 但对细胞的 NO 合成并无显著影响(图 6 中 4 和 1 比较)。添加 H₂O₂ 可引起茅苍术细胞的挥发油积累增加, 但只引起了苍术醇和 β-桉叶醇量的增加, 其中 β-桉叶醇的量是对照的 2.48 倍(图 7 中 4 和 1 比较)。在添加 SNP 和 NO 的淬灭剂 cPTIO 的实验组中, 茅苍术细胞中 NO、H₂O₂ 释放量和挥发油含量基本与对照持平(图 6 中 5 和 1 比较, 图 7 中 5 和 1 比较)。这表明 SNP 对挥发油合成的促进作用可以被 NO 专一性淬灭剂 cPTIO 抑制, 证明 SNP 是通过其分解产物 NO 诱发茅苍术细胞中挥发油合成的。添加 NO 的淬灭剂 cPTIO 可抑制 AL4 粗诱导子引起的 NO 迸发, 但不影响 AL4 粗诱导子引起的 H₂O₂ 迸发(图 6 中 6 和 2 比较)。添加 cPTIO 可部分抑制 AL4 粗诱导子引起的挥发油积累(图 7 中 6 和 2 比较)。添加 H₂O₂ 的淬灭剂 CAT 可抑制 AL4 粗诱导子引起的 H₂O₂ 迸发, 但不影响 AL4 粗诱导子引起的 NO 迸发(图 6 中 7 和 2 比较)。添加 CAT 也可部分抑制 AL4 粗诱导子引起的挥发油积累(图 7 中 7 和 2 比较), 其对 β-桉叶醇的抑制作用比实验组 6 更显著(图 7 中 7 和 6 比较)。添加 NO 的淬灭剂 cPTIO 和 H₂O₂ 的淬灭剂 CAT 则将 AL4 粗诱导子引起的 NO 和 H₂O₂ 迸发均抑制了(图 6 中 8 和 2 比较), 且对 AL4 粗诱导子引起的挥发油积累的抑制较实验组 6 和 7 更显著(图 7 中 8、7 和 6 比较), 但并不能完全抑制 AL4 粗诱导子引起的茅苍术细胞中挥发油的积累(图 7 中 8 和 1 比较)。

3 讨论

在诱导子等逆境胁迫下, 植物细胞可以通过多种信号分子和信号途径感受和转导外界逆境信号^[19]。NO 和 H₂O₂ 被认为是真菌诱导子诱发植物细胞防卫反应的主要胞内信使物质^[20-21]。本研究结果也表明, 在茅苍术悬浮细胞中可能存在着两条调控挥发油合

成的信号途径: 一条为 NO 途径, 另一条为 H₂O₂ 途径。且发现这两条信号调控途径在合成不同的挥发油组分方面作用是不同的。添加 H₂O₂ 只可引起茅苍术细胞中苍术醇和β-桉叶醇量的增加, 而添加 NO 的供体 SNP 可引起茅苍术细胞中挥发油的 4 种主要成分积累全面增加。并且添加 H₂O₂ 淬灭剂 CAT 可显著抑制 AL4 粗诱导子引起的β-桉叶醇积累, 较添加 NO 的淬灭剂 cPTIO 实验组更明显。这些结果暗示 H₂O₂ 介导的信号调控途径可能较 NO 途径对细胞中β-桉叶醇的积累更有作用。而 NO 介导的信号调控途径则较 H₂O₂ 途径能更全面地调控细胞中挥发油 4 种主要成分的积累。

徐茂军等^[7]曾报道由氧化迸发作用产生的 H₂O₂ 是介导桔青霉细胞壁诱导子和 NO 促进红豆杉细胞中紫杉醇合成的信号分子。而在本研究中, 未发现 NO 和 H₂O₂ 存在上下游关系, 它们都是介导内生真菌 AL4 粗诱导子促进茅苍术悬浮细胞挥发油合成的信号分子。造成二者结果不一致的原因可能有 3 个: 1) 本研究所采用的诱导子为内生真菌诱导子, 与植物病原菌诱导子诱导的信号转导反应存在差异; 2) 植物细胞对诱导子等逆境处理的信号转导反应具有明显的种属特异性^[22], 因此不同类型的植物细胞对逆境胁迫应答反应的信号转导机制是有差异的; 3) 茅苍术细胞中主要的挥发油成分属于倍半萜, 其代谢途径与二萜紫杉醇存在一定差别, 因此不同类型的次生代谢产物的信号转导机制也是有差异的。

此外, 本研究还需在以下两个方面深入研究。1) 本研究所采用的 AL4 粗诱导子为匀浆菌丝的滤液灭活物, 成分较为复杂, 但该诱导子在本实验室范围内重复性较好, 且经初步推测其起作用的成分为多糖。然而为了充分发挥诱导子的诱导活性, 有必要对 AL4 粗诱导子中起作用的成分进行进一步的分离纯化和结构鉴定, 并探索制备诱导子的好方法^[23]。2) 添加 NO 的淬灭剂 cPTIO 和 H₂O₂ 的淬灭剂 CAT 并不能完全抑制 AL4 粗诱导子引起的茅苍术细胞中挥发油的积累, 这表明内生真菌 AL4 粗诱导子还可以通过其他方式促进茅苍术悬浮细胞挥发油合成。因此植物次生代谢产物合成的调控机制是非常复杂的, 还需要进一步研究。

REFERENCES

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia, Volume I. Beijing: Chinese Industry Press, 2005: 111.
国家药典委员会. 中国药典, 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 111.
- [2] Wang LY, Duan JK, Qian SH, *et al.* Studies on the chemical constituents of *Atractylodes lancea*. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2007, **38**(4): 499–500.
汪六英, 段金康, 钱士辉, 等. 茅苍术化学成分的研究. *中草药*, 2007, **38**(4): 499–500.
- [3] Yuan Y, Lü DM, Huang LQ, *et al.* Studies on inducing adventitious root of *Atractylodes lancea*. *Chin J Chin Mater Med*, 2007, **32**(1): 65–66.
袁媛, 吕冬梅, 黄璐琦, 等. 苍术不定根诱导培养的研究. *中国中药杂志*, 2007, **32**(1): 65–66.
- [4] Fang F, Dai CC, Zhang B, *et al.* Establishment of suspension cell line of *Atractylodes lancea* and effect of endophytic fungal elicitors on its essential oil accumulation. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2009, **40**(3): 452–455.
方芳, 戴传超, 张波, 等. 茅苍术悬浮细胞系建立及内生真菌诱导子对其挥发油积累的影响. *中草药*, 2009, **40**(3): 452–455.
- [5] Lan WZ, Yu LJ, Li MY, *et al.* Cell death unlikely contributes to taxol production in fungal elicitor-induced cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(1): 47–49.
- [6] Cheng H, Zhang YQ, Yu LJ, *et al.* Enhancement of alkaloid biosynthesis by an elicitor of *Aspergillus niger* in cell suspension cultures of *Corydalis saxicola* bunting. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2007, **18**(9): 2190–2191.
程华, 张玉芹, 余龙江, 等. 黑曲霉诱导子促进岩黄连悬浮细胞中生物碱的合成. *时珍国医国药*, 2007, **18**(9): 2190–2191.
- [7] Xu MJ, Dong JF. Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced taxol biosynthesis of *Taxus chinensis* suspension cells through the reactive oxygen species-dependent and -independent signal pathways. *Chin Sci Bull*, 2006, **51**(14): 1675–1682.
徐茂军, 董菊芳. 一氧化氮分别通过依赖和不依赖活性氧的信号途径介导桔青霉细胞壁诱导子促进红豆杉悬浮细胞中紫杉醇生物合成. *科学通报*, 2006, **51**(14): 1675–1682.
- [8] Neill SJ, Desikan R, Hancock JT. Nitric oxide signaling in plants. *New Phytol*, 2003, **159**: 11–22.
- [9] Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, *et al.* Nitric oxide functions as a secondary signal in plant disease resistance. *Nature*, 1998, **394**: 585–588.
- [10] Delledonne M, Zeier J, Marocco A, *et al.* Signal interaction between nitric oxide and reactive oxygen

- intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 13454–13459.
- [11] Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, *et al.* Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 5818–5823.
- [12] Levine A, Tenhaken R, Dixon R. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 1994, **79**: 583–593.
- [13] Hu XY, Fang JY, Cai WM, *et al.* NO-mediated hypersensitive responses of rice suspension cultures induced by incompatible elicitor. *Chin Sci Bull*, 2003, **48**(2): 157–161.
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. *科学通报*, 2003, **48**(2): 157–161.
- [14] Xu MJ, Dong JF. Interaction between nitric oxide and hydrogen peroxide in the alkaloids biosynthesis of *Catharanthus roseus* cells. *Prog Nat Sci*, 2008, **18**(12): 1386–1397.
徐茂军, 董菊芳. 一氧化氮和过氧化氢在介导长春花细胞生物碱合成中的相互作用. *自然科学进展*, 2008, **18**(12): 1386–1397.
- [15] Chen JX, Dai CC, Li X, *et al.* Endophytic fungi screening from *Atractylis lancea* and inoculating into the host plantlet. *Guhua*, 2008, **28**(2): 256–260.
陈佳昕, 戴传超, 李霞, 等. 茅苍术内生真菌的分离鉴定及在组培苗中的回接. *广西植物*, 2008, **28**(2): 256–260.
- [16] Zou Q. *Experiment Guidance of Plant Physiology*. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 110–111.
邹琦. *植物生理学实验指导*. 北京: 中国农业出版社, 2000: 110–111.
- [17] Schwacke R, Hager A. Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that are dependent on Ca²⁺ and protein-kinase activity. *Planta*, 1992, **187**: 136–141.
- [18] Ligterink W, Kroj T, zur Nieden U. Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*, 1997, **276**(5321): 2054–2057.
- [19] Mehey MC. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*, 1994, **105**: 467–472.
- [20] Baker CJ, Orlandi EW. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol*, 1995, **33**: 299–321.
- [21] Neill SJ, Desikan R, Clarke A. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Botany*, 2002, **53**: 1237–1242.
- [22] Jabs T, Tschöpe M, Colling C, *et al.* Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(9): 4800–4805.
- [23] Wang JW, Zheng LP, Tan RX. The preparation of an elicitor from a fungal endophyte to enhance artemisinin production in hairy root cultures of *Artemisia annua* L.. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(5): 829–834.
王剑文, 郑丽屏, 谭仁祥. 促进黄花蒿发根青蒿素合成的内生真菌诱导子的制备. *生物工程学报*, 2006, **22**(5): 829–834.

快 讯

转基因植物可保障我国中药的可持续发展

转基因植物是指植物中同时拥有来自其他物种植物的基因,由于我国的中药材大多来自对植物的提炼,中投顾问医药行业研究员郭凡礼认为,发展转基因植物对提高中药材的产量,解决中药材资源短缺、安全等问题有很重要的意义。

中投顾问产业研究中心资料显示,如今转基因植物已在农作物上得到了广泛的研究与实践,经过多年的发展,我国在这一领域已跻身于世界的先进水平,而对于我国中药产业来说,转基因技术使得中药产业进入一场新的革命,它的研究与发展对我国中药产业有很大的作用。

中投顾问医药行业研究员郭凡礼指出,转基因药用植物主要涉及对抗病、抗虫药用植物的研究、抗逆性药用植物研究以及高品质药用植物的研究,对于中药产业来说,转基因技术可以提高药材的抗逆性,可以提高药材的产量特别是品质,这可以增加产量及收入,降低成本,提供高品质的药材。

郭凡礼同时指出,目前我国药用植物转基因技术的研究大多还处于实验阶段,但是,随着生物技术的发展,转基因植物会迎来一个发展的空间,我国应加大对转基因药用植物的研究投入并建立和完善转基因植物的安全性评价体系,以保证其健康发展。

中投顾问发布的《2009~2012年中国生物制药行业投资分析及前景预测报告》指出,虽然转基因药用植物在我国还处于起步阶段,还要对安全性进行评价,但发展转基因药用植物对解决我国中药材资源危机、保障我国中药产业的可持续发展都有无法替代的作用。

来源: 中投顾问