

林学基础研究系列



真菌诱导子促进 白桦三萜积累的研究

范桂枝 詹亚光◎著



科学出版社

林学基础研究系列

真菌诱导子促进白桦三萜 积累的研究

范桂枝 詹亚光 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书以编著者十多年的研究成果为基础,以相关研究的国内外报道为参考,论述了真菌诱导子诱导次生代谢物白桦三萜积累的研究现状。本书以白桦悬浮细胞系和白桦组培苗为研究材料,采用药理学、生理学、分子生物学、比较蛋白质组学及生物化学等方法,建立了产三萜的白桦悬浮细胞培养体系,筛选到了有效提高白桦三萜积累的真菌诱导子并建立了诱导体系;从营养生理、信号对话、白桦三萜合成关键酶基因表达、蛋白质组学水平等分析了真菌诱导子促进白桦三萜积累的过程。

本书可供从事植物细胞工程、药用植物次生代谢物调控等方面的科研人员参考,同时也适合综合性大学、农林院校相关专业的师生阅读。

图书在版编目(CIP)数据

真菌诱导子促进白桦三萜积累的研究/范桂枝,詹亚光著. —北京:科学出版社, 2017.1

ISBN 978-7-03-050491-3

I. ①真… II. ①范… ②詹… III. ①白桦—三萜—研究 IV. ①S792.153

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 272459 号

责任编辑:张会格 郝晨扬 / 责任校对:张怡君
责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 1 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2017 年 1 月第一次印刷 印张: 7 1/2

字数: 151 000

定价: 65.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

自从 1956 年, Routine 和 Nickel 首次成功运用植物细胞培养技术生产目的次生代谢产物以来, 研究过的药用植物有 400 多种, 分离到的次生代谢物有 600 多种。但是在应用植物细胞培养技术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植物细胞培养天然产物技术产业化应用的核心问题之一。研究发现, 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, 这方面研究已成为国内外的研究热点, 并取得了较多成果。但是, 诱导子的诱导效果与诱导子种类、浓度和添加时间等相关, 诱导子作用的机制还未完全揭示。因此, 理解和掌握诱导子调控植物细胞次生代谢积累的规律是解决这一问题的基础。针对上述问题, 我们认为有必要详细介绍如何建立植物细胞培养体系生产次生代谢物, 如何筛选有利于次生代谢物积累的诱导子种类、浓度和添加时间, 探索诱导子促进次生代谢物积累的过程, 供相关科研人员或感兴趣的读者参考使用。

白桦 (*Betula platyphylla* Suk.) 是桦木科 (Betulaceae) 桦木属 (*Betula* Linn.) 的一种落叶乔木, 白桦树皮的主要活性成分之一为三萜类物质, 该物质具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、降脂、利胆和保肝等作用, 特别是白桦脂醇、白桦脂酸等三萜类物质作为天然药物在抗肿瘤和抗人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, 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, 几乎无不良反应等。因此, 我们课题组对利用植物细胞培养技术生产白桦三萜进行了十多年的研究。本书主要从以下五个方面介绍我们的部分研究内容, 即产三萜白桦悬浮细胞培养体系的建立; 有效提高白桦三萜积累的真菌诱导子的筛选和诱导体系的建立; 真菌诱导子促进白桦三萜积累的营养生理研究; 真菌诱导子促进白桦三萜积累的信号对话研究; 真菌诱导子促进白桦三萜积累的分子机制研究。本书试图通过白桦三萜, 详述真菌诱导子促进白桦三萜积累的过程, 使初学者了解该过程的设计思路、实验方法和预见的问题等。

诚挚地感谢合作导师詹亚光教授的学术指导和经费支持; 衷心地感谢翟俏丽、王晓东、刘英甜、马明媚、孙美玲、孙菲菲和黄雅婷等硕士研究生的辛苦付出; 感谢本书参考资料的作者; 非常感谢国家自然科学基金项目 (31100445 和 31070531)、中国博士后科学基金项目 (20080440136) 和中央高效基本科研业务专项资金项目 (DL09BA05 和 DL12CA05) 的支持。

本书由范桂枝执笔，詹亚光教授主审。由于作者水平有限，书中不足之处敬请读者批评指正。

范桂枝
2016年7月

目 录

前言

1 白桦三萜的研究进展	1
1.1 白桦三萜的制备	1
1.2 白桦三萜的生物活性	2
1.3 白桦三萜的生物合成途径及其关键酶	4
1.4 白桦三萜的代谢调控	5
1.5 白桦三萜的细胞工程研究进展	6
参考文献	9
2 真菌诱导子诱导次生代谢物积累机制的研究进展	12
2.1 真菌诱导子诱导次生代谢物合成的研究概况	12
2.2 真菌诱导子诱导次生代谢物积累的机制	12
2.3 结论和展望	20
参考文献	20
3 白桦悬浮细胞培养体系的建立及其三萜含量的动态研究	23
3.1 白桦愈伤组织中三萜提取条件的初步优化	23
3.2 白桦悬浮细胞培养体系的建立及其三萜积累条件的优化	26
3.3 白桦悬浮细胞培养过程中细胞生长和三萜积累的动力学分析	34
参考文献	38
4 内生真菌诱导子对白桦悬浮细胞生长和三萜积累的影响	40
4.1 促进白桦悬浮细胞中三萜积累的真菌诱导子的筛选和鉴定	40
4.2 真菌诱导子与白桦悬浮细胞共培养体系的优化	44
4.3 结论	47
参考文献	47
5 真菌诱导白桦三萜合成的营养生理研究	49
5.1 真菌诱导子对白桦悬浮细胞培养体系中 N、P 的吸收利用和三萜合成的影响	49
5.2 真菌诱导白桦三萜合成与碳和氮关系的初步研究	53
5.3 结论	59
参考文献	60

6 真菌诱导子促进白桦三萜积累的信号对话研究61

6.1 NO 介导真菌诱导白桦悬浮细胞中三萜合成的研究61

6.2 多胺介导真菌诱导白桦悬浮细胞中三萜合成的研究69

6.3 H₂O₂ 介导真菌诱导子促进白桦三萜的积累77

6.4 PAs 与 NO 在真菌诱导白桦三萜合成中的对话研究81

6.5 多胺与过氧化氢在真菌诱导白桦三萜合成中的对话研究92

6.6 结论96

参考文献96

7 真菌诱导子促进白桦三萜积累的分子机制研究100

7.1 真菌诱导子对白桦悬浮细胞中三萜合成关键酶基因表达的影响100

7.2 真菌诱导下白桦悬浮细胞的蛋白质组学分析105

参考文献111

附图

1 白桦三萜的研究进展

白桦 (*Betula platyphylla* Suk.) 是桦木科 (Betulaceae) 桦木属 (*Betula* Linn.) 的一种落叶乔木。北温带广布种植, 主要分布于日本、朝鲜、俄罗斯和中国。在我国广泛分布于东北的大小兴安岭和长白山, 华北的燕山、太行山, 西北的秦岭、天山、阿尔泰山, 西南的横断山脉、青藏高原^[1]。白桦属强阳性树种, 喜光, 耐寒, 耐水湿, 生长迅速。它分布范围广, 具有耐瘠寒、生长快、材质优良等特点, 所以它是重要的工业用材树种。大径级白桦是单板、胶合板生产加工原料的首选材料, 是制作航空胶合板面板不可替代的树种; 同时又可做工艺材、家具材、纸浆材等, 在餐饮业和医药业中也广为利用^[2]。

对白桦的化学成分分析表明, 白桦树叶中含有多种类黄酮, 如杨梅酮-3-*O*- α -L-(乙酰基)-吡喃鼠李糖苷、槲皮素-3-*O*- α -L-(4''-3-*O*-乙酰基)-吡喃鼠李糖苷等; 此外还含有丰富的酚类物质, 如 1-*O*-倍酰- β -D-(2-*O*-乙酰基)-吡喃葡萄糖、1-(4''-羟基苯)-3'-丙烷基- β -D-吡喃葡萄糖、没食子酚、绿源酚、新绿源酚等。白桦树皮中含有丰富的三萜类物质和软木脂, 二者之和占干外皮的 60% 以上, 此外还含有多酚、黄酮类、三萜皂苷和酚酸类等物质。从树皮中分离出的物质有 9-羟基壬酸、阿魏酸、十六烷酸、9,12-二烯十八烷酸、9-烯十八烷酸、1,16-十六烷二酸、16-羟基十六烷酸、羽扇烯酮、白桦脂酸 (betulinic acid) 和白桦脂醇 (betulin) 等^[3-6]。由此可见, 白桦中富含三萜类物质, 主要包括白桦脂醇、白桦脂酸和羽扇醇 (lupeol) 等。其中, 白桦脂醇具有与白桦脂酸相同的五环三萜骨架, 是合成白桦脂酸的前体化合物。

三萜是由 30 个碳原子组成的萜类化合物, 分子中有 6 个异戊二烯单位, 通式 $(C_5H_8)_6$ 。三萜类化合物 (triterpenoid) 在自然界分布广泛, 有的游离存在于植物体中, 称为三萜皂苷元 (triterpenoid sapogenin); 有的以与糖结合成苷的形式存在, 称为三萜皂苷 (triterpenoid saponin)^[7]。近年来, 研究者关于白桦三萜类化合物的结构、制备和生物活性等方面的研究已积累了丰富的经验, 现对该类化合物制备、生物活性、生物合成途径及其代谢调控等方面进行综述。

1.1 白桦三萜的制备

白桦脂醇是具有羽扇豆烷型结构的五环三萜类化合物, 白色结晶, 在桦树皮中含量最高, 为 132.45~257.11mg/g^[8], 以白桦脂醇为原料可以通过两步方法直接

合成白桦脂酸及其多种衍生物^[4]。其分子式为 $C_{30}H_{50}O_2$ ，结构式见图 1-1。

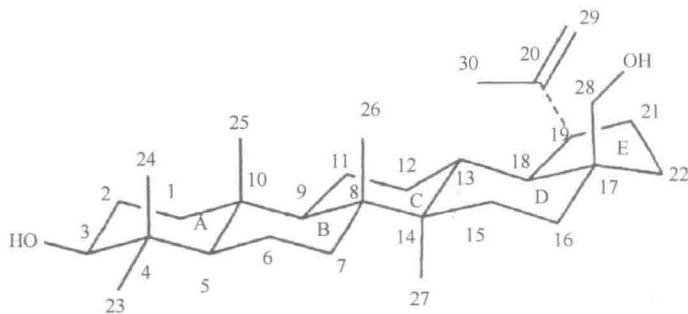


图 1-1 白桦脂醇的结构式^[9]

作为一种天然产物，白桦脂醇的提取分离面临许多困难，如类似物很多及实际应用的纯度要求高等。基于上述因素，开发新型的分离纯化工艺，以及寻找高效、经济的分离纯化技术，越来越成为研究者关注的焦点。目前，白桦脂醇的分离提取方法主要有 5 种，即水蒸气蒸馏法、溶剂提取法、液相分配萃取分离法、临界流体萃取法、超声波醇提法同时结合色谱纯化法等^[10-13]。另外，Yin 等利用高压脉冲电场提取的白桦脂醇产量较常规方法提取量增加了 20%^[14]。可见，提取方法的选择对于白桦脂醇的最终产量极为重要。

张泽和孙宏及 Shrishailappa 等应用高效液相色谱法测定了白桦树皮中白桦脂醇的含量，其线性范围为 15.0~300.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，平均回收率为 93.93%，精密度高，稳定性好^[13, 15]。另外，Zhao 等应用反相色谱 (RP-HPLC) 同时检测到白桦脂醇和白桦脂酸^[16]，与方玉栋等和杨晓静等报道的气相色谱法相比具有优越性，气相色谱法需要对样品衍生化后才能分析，使体系复杂，增加了定性定量的难度，且保留时间较长^[17, 18]。另外，比色法和薄层扫描也可以测定白桦脂醇含量，但薄层扫描法操作烦琐、费时，受仪器及显色剂的限制。

1.2 白桦三萜的生物活性

研究发现白桦脂醇、白桦脂酸具有分子质量小、药理活性强、作用机制特异、无不良反应等特点^[19, 20]，其主要生物活性如下。

1.2.1 抗肿瘤活性

叶银英等的研究结果发现，白桦脂酸及其衍生物 23-羟基白桦脂酸对黑色素瘤和其他 7 种恶性肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用，并呈现出一定的剂量依赖关系，细胞生长周期被阻滞，最终导致了大量细胞凋亡^[21]。白桦脂酸对黑色素瘤

(Mel-1、Mel-2 和 Mel-4) 具有专一的细胞毒性, 对神经外胚层肿瘤也具有特异性活性。但最近研究发现白桦脂醇及其衍生物对食管癌、前列腺癌、多种神经瘤细胞和肉瘤细胞等具有很强的抑制作用^[22-25]。

研究者对白桦脂醇及其衍生物的抗肿瘤机制研究认为, 白桦脂醇及其衍生物对肿瘤细胞具有直接杀伤作用, 诱导其凋亡, 抑制肿瘤血管生成, 调节与肿瘤相关因子的表达, 改变线粒体的特征, 影响细胞周期, 诱导分化肿瘤细胞, 改变肿瘤膜上的钙泵, 降低一些细胞生长所需酶的活性等来发挥其抑制肿瘤的作用^[26]。

1.2.2 抗 HIV 活性

1994 年, Fujioka 等首先提出白桦脂酸可抑制 H9 淋巴细胞中 HIV 的复制, 并且 C3、C17、C19 等位取代的衍生物也有同样的作用, 有的甚至更强^[17], 白桦脂酸抑制 H9 淋巴细胞中 HIV 复制的半数有效剂量 (ED_{50}) 值为 $1.4\mu\text{mol/L}$; 抑制未被感染的 H9 细胞生长的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值为 $13\mu\text{mol/L}$, 是 HIV 与细胞膜的融合抑制剂^[27]。随着研究的深入, 发现白桦脂醇及其衍生物能够在体外抑制 HIV 的复制, 并且发现 C3 上的羟基基团和氢化白桦脂酸均能增强抗 HIV 活性。此外, 研究还发现白桦脂醇及其衍生物可以作为 HIV 的成熟抑制剂^[28]。

1.2.3 抗炎性质

大多数五环三萜类化合物均具有抗炎性质, 其中包括白桦脂酸和白桦脂醇, 这两个化合物已在大量的体外和体内模型体系中得到验证。早在 1959 年, 白桦脂酸被发现具有抗炎的作用, 同时发现白桦脂酸和白桦脂醇都是在较高浓度下具有温和的抗炎性, 而且它们的抗炎性归因于对非神经基因路径的抑制。有研究表明白桦脂酸的活性是与糖皮质激素受体相互作用的结果, 同时在内源性抗炎蛋白的合成中也具有重要作用。近年来的相关报道指出白桦脂酸及其衍生物有抗革兰氏阳性菌 (G^+ 菌) 的活性, 如葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*), 而对革兰氏阴性菌 (G^- 菌), 如大肠杆菌属 (*Escherichia*) 未发现有抑制作用。此外, 白桦脂酸及其衍生物和白桦脂醇还有镇咳祛痰、清热利湿、消肿解毒、镇痛、驱虫、抗溃疡、提高机体免疫力、降血脂等作用^[29]。

1.2.4 毒性研究

对大鼠进行剂量分别为 200mg/kg 和 400mg/kg 的白桦脂醇、白桦脂酸及其一些衍生物的腹膜内注射的研究结果表明, 无明显的毒性。同时, Pisha 等报道了对鼠进行每 4d 一次的白桦脂酸腹膜内注射, 每次 500mg/kg , 共 6 次, 结

果也无毒性。类似的每 3d 一次，每次 250mg/kg，共 6 次，也无毒性^[22]。由此可知，白桦脂醇、白桦脂酸具有极小范围的细胞毒性，如果有，也是在相对高剂量下。

1.3 白桦三萜的生物合成途径及其关键酶

1.3.1 生物合成途径

植物萜类化合物的合成有甲羟戊酸途径（mevalonate pathway, MVA）和脱氧木酮糖-5-磷酸途径（1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway, DXP）两条合成途径^[30]（图 1-2）。虽然两条途径同时存在，但处于不同部位，为不同的萜类化合物提供异戊烯焦磷酸（isopentenyl diphosphate, IPP）。其中，MVA 途径存在于细胞质中，仅为倍半萜和三萜的生物合成提供 IPP，而 DXP 途径存在于质体中，为单萜、双萜和四倍萜的生物合成提供 IPP^[31]。由于白桦脂醇属于三萜物质，因此本研究主要针对 MVA 途径中合成白桦脂醇的关键酶进行研究。

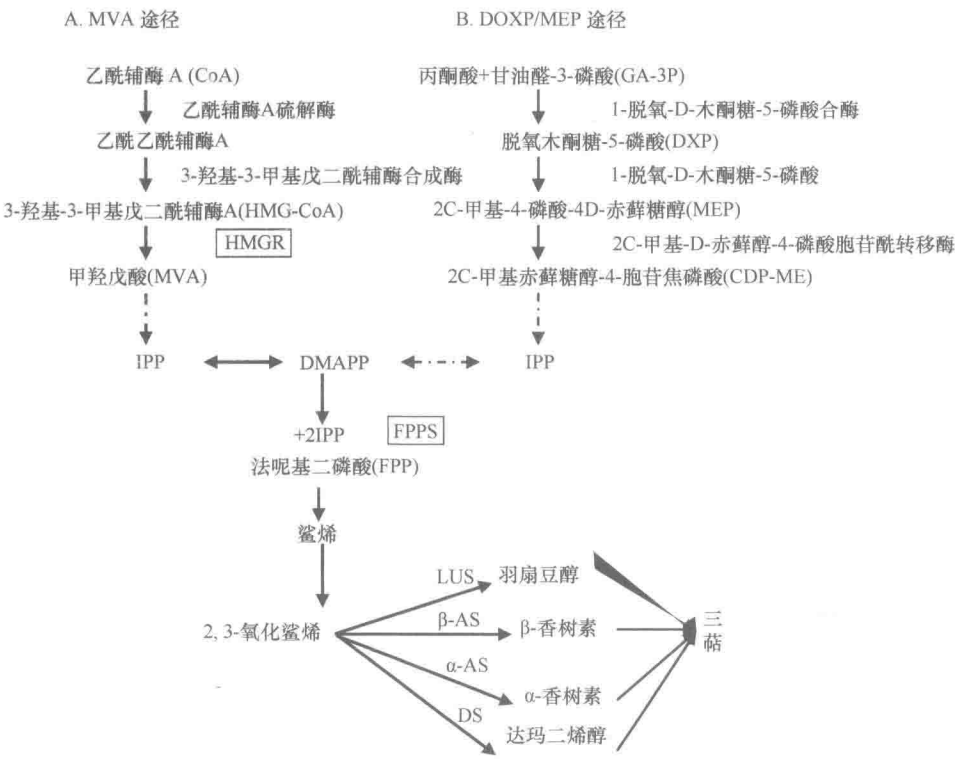


图 1-2 白桦脂醇的生物合成途径^[31]

1.3.2 关键酶

根据萜类物质生物合成的不同阶段, 可将参与萜类合成有关的酶分成前期、中期和后期。生成异戊烯焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 以前的酶属于前期酶, 其中 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR) 是 MVA 生物合成的关键酶 (图 1-2); 中期酶有烯丙基转移酶和萜类环化酶, 它们是在生成 IPP 和 DMAPP 之后, 催化形成分子质量大小不同和环式各异的萜类化合物中间体, 它们是萜类生物合成的关键酶, 如在三萜类化合物中为法呢基二磷酸合酶 (FPP synthase, FPPS) 和 2,3-氧化鲨烯环化酶 (2,3-oxidosqualene cyclase, OSC) (图 1-2)。目前, HMGR、FPS 和 OSC 基因已从白桦等不同的植物中被克隆出来, 并发现其具有较高的保守序列^[32]。

1.4 白桦三萜的代谢调控

植物次生代谢不像初生代谢那样相对稳定, 它受到多种因素的影响。白桦脂醇的合成也不例外。决定细胞中白桦脂醇产量高低的因素分为两个层次: 一为内在因素, 主要指细胞的基因型; 二为环境因素。其中虽然起决定作用的为细胞的基因型, 但有关萜类物质生物合成途径、合成部位等知识的应用为外界调控萜类物质生物合成提供了可能。目前, 萜类物质的合成调控可以通过筛选高产基因型、前体饲喂、设定营养条件、不同诱发因子的启动等因素来实现^[33]。例如, 在一个继代周期中, 培养基中添加 10~50g/L 蔗糖、葡萄糖和果糖后, 白桦愈伤组织中的三萜含量存在显著差异^[34]。

另外, 萜类化合物代谢调控还可从代谢工程调控方面进行, 其采用的策略主要有: ①增加萜类代谢途径中限速酶编码基因的拷贝数或灭活代谢途径中具有反馈抑制作用的编码基因; ②在不影响细胞基本生理状态的前提下, 阻断或抑制与目的途径相竞争的代谢流; ③利用已有的途径构建新的代谢旁路, 合成新的萜类化合物^[35, 36]。

但目前关于白桦脂醇的代谢工程调控研究还未报道。

尽管白桦脂醇类化合物代谢生物学方面的研究得到了越来越广泛的关注, 但现有的研究还不能完全揭示白桦脂醇类化合物生理活性的作用机制及其在细胞内的作用位置, 各种因子对白桦脂醇类化合物代谢关键酶的转录、表达及活性的影响研究尚待进行。调控白桦脂醇类化合物的信号分子及其调控途径、各转录因子及蛋白质的调控机制也未明确, 关于调控白桦脂醇类化合物合成的功能基因组学或蛋白质组学等领域还有待研究。这些问题的解决, 能够有助于运用基因工程学

开展白桦脂醇类化合物代谢的生态调控, 为白桦脂醇类化合物的产业化生产提供新的途径。同时, 随着细胞及分子生物学检测技术手段的不断发展, 将会有越来越多白桦脂醇的新的作用被认识。

1.5 白桦三萜的细胞工程研究进展

细胞工程为白桦无性繁殖提供了一种快速而高效的方法, 具有培养周期短、培养条件易于调整优化、受外界环境影响小、细胞均一性好等优点, 同时可以通过多种诱导途径提高细胞中次生代谢产物的含量。白桦细胞工程体系的建立为研究次生代谢产物的合成提供了很好的实验条件。目前对白桦的愈伤组织和器官培养、原生质体培养等方面的研究已取得了很大的进展。

1.5.1 愈伤组织和器官培养

国外桦树的组织培养研究是从 20 世纪 50 年代开始的, 其中, 芬兰和日本的研究较多。芬兰的 Huhtinen 等首次通过茎段培养获得了桦树的再生植株^[37]。随后, 以花药^[38]、茎段^[39, 40]、腋芽^[41]、顶芽^[42]、叶柄^[43]、根^[44]、休眠芽^[45]等为外植体获得桦树再生植株。这些研究中使用的培养基有 WPM、MS、IS、NT、N7、NT₄ 和 BTM (broad-leaved tree medium) 等, 添加的生长激素有吲哚乙酸 (IAA)、乙炔丁酸 (IBA) 和 2,4 二氯苯氧乙酸 (2,4-D), 细胞分裂素有 6-苄基腺嘌呤 (6-BA) 和激动素 (KT), 而适合不同外植体培养的培养基, 以及激素的种类是不同的。例如, Huhtinen 是在附加 2.32 $\mu\text{mol/L}$ KT 和 142.70 $\mu\text{mol/L}$ IAA 的 MS 培养基上通过白桦的茎段培养得到愈伤组织并再生植株的, 而 Ide 发现 WPM 培养基能支持日本白桦茎尖的伸长, MS 培养基上的茎尖则变褐死亡, 还发现单独使用 6-BA (1.6mg/L) 对嫩枝生长有效, 而 2,4-D 不利于其生长。还有研究报道在附加 0.88~4.44 $\mu\text{mol/L}$ BA 和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ IBA 的改良的 MS、WPM 和 BTM 培养基上都实现了白桦芽的快繁。

国内白桦组织培养和繁育机制的研究在“九五”期间也取得了突破性的进展, 已经成功建立了多途径的再生体系, 其中有休眠芽、种子、茎节等, 上述外植体再生途径与国外学者的报道相似^[46]。另外, 国内学者还建立了新的外植体途径, 如从下胚轴^[47]、叶盘^[48]、叶片^[49]等外植体诱导植株的再生, 其中下胚轴再生采用 IW (包括 WP 的盐成分和维生素 B₅) 培养基, 叶盘再生系统中芽的诱导采用 MSB5 (含有 MS 的无机盐和维生素 B₅) 培养基, 叶片直接出芽采用 IS 培养基, 激素多采用 6-BA (0.1~1mg/L), 叶盘再生还添加了 0.2mg/L 萘乙酸 (NAA), 叶片直接出芽使用了高达 10.0~15.0mg/L 6-BA 和 0.5mg/L KT, 愈伤组织诱导和分化多采用 IS 培养基, 分化时使用了较低浓度的 6-BA (0.4~0.5mg/L), 诱导时 6-BA 浓度较

高 (2~5mg/L), 并添加了 KT (茎段和叶柄诱导) 或 NAA (叶片诱导), 这些再生系统的愈伤组织诱导和器官分化率都很高。

综合国内外的研究发现, 白桦已经建立了多途径的再生系统, 不同的外植体再生最适的培养基和激素有所不同, 如在 NAA 的使用上国内报道较多, 而国外使用的报道较少, 但是培养基种类和其他激素种类相似。

在愈伤组织培养产白桦三萜方面, 作者前期的研究发现最适三萜物质生产的白桦愈伤组织固体培养体系为: IS 为基本培养基, 附加 0.8mg/L 6-BA +0.6mg/L NAA, 蔗糖浓度为 30g/L, 光处理条件为强光照, 蓝色光质。比较 MS、NT、IS、WPM、B₅ 5 种基本培养基, 发现 WPM 培养基最有利于白桦愈伤组织鲜重的积累, 收获时鲜重达到 6.6g FW/瓶; 而 IS 培养基有利于白桦愈伤组织中三萜物质的积累, 最高含量为 2.3670mg/g DW。在所有激素组合中 6-BA 与噻苯隆 (TDZ) 组合有利于愈伤组织鲜重的增长, 而 0.8mg/L 6-BA +0.6mg/L NAA 培养的愈伤组织中三萜物质含量最高, 达到 3.5319mg/g DW。不同碳源条件下, 蔗糖浓度为 30g/L 的白桦愈伤组织中三萜物质积累量最高, 达到 4.040mg/g DW。不同光处理条件下, 蓝光对白桦愈伤组织中三萜物质含量的积累最为有利, 最高达到 8.413mg/g DW^[50]。

1.5.2 体细胞胚胎发生途径

近年来, 桦树的体细胞胚胎 (体胚) 发生途径的研究也取得了很大的进展, 主要通过悬浮培养的桦树体胚发生体系。例如, 欧洲白桦的种胚和成熟的叶片, 在 N7 培养基上继代培养 3 代后, 转到含有 2,4-D 和 KT 的 N7 固体和液体培养基后形成了体胚, 体胚生长良好并萌发成苗, 白桦体胚发生需要的最佳总无机氮含量为 35mmol/L, 蔗糖浓度为 20.8g/L^[51]。Nuutila 等^[52]在含有 2,4-D (0.45μmol/L)、KT (0.09μmol/L)、水解酪蛋白 (0.05g/L) 的 N7 液体培养基上对垂枝桦 (*Betula pendula* Roth.) 细胞进行悬浮培养, 发现在同样的培养基中胚性细胞和非胚性细胞的生长不同, 对碳源的利用也有所差异。此外有研究发现桦树的家系对体胚发生的影响比外植体类型要大^[53], 但是目前没有利用白桦体胚生产白桦三萜的报道。

1.5.3 原生质体培养

原生质体在诱导条件下能发生融合, 在离体培养条件下可以再生植株, 并且原生质体除去细胞壁后, 容易摄取外源 DNA, 因此可作为植物生理学、分子遗传学、育种学等良好的实验体系。原生质体分离和培养的成功涉及多种影响因素, 桦树原生质体直到 1982 年才分离得到亚洲白桦 (*B. platyphylla* var. *szechuanica*) 叶肉原生质体^[54]。随着技术的逐渐发展和成熟, Ide 和 Yamamoto^[45]、Wakita 等^[55]不仅分离得到了日本白桦的叶肉原生质体, 并且在无细胞分裂素的 MS (1/2 MS)

培养基上生根,再生植株。同样的研究发现,4-PU,一种细胞分裂素,有利于白桦从叶肉原生质体途径再生植株;在硝酸铵存在的条件下添加高水平的细胞分裂素 BAP 有利于白桦原生质体的细胞分裂^[56];Sasamoto 等^[57]发现植物内源激素的水平对于培养基中外源生长调节剂的添加量很重要。

原生质体融合能创造新物种,并能通过无性繁殖途径将性状优良的个体保存下来。有些学者对白桦原生质体的融合进行了研究,如 Wakita 等^[58]应用电融合的方法在含 NAA、IBA、调吡脲(CPPU)和 BA 的培养基上,得到了 2 个白杨和白桦电融合后的嫩枝和 12 株白杨和桤木电融合后的再生植株。但是目前没有利用白桦原生质体生产白桦三萜的报道。

1.5.4 悬浮培养

植物细胞悬浮培养是指将植物细胞或小的细胞团悬浮于液体培养基中,并保持细胞良好分散状态下进行培养的技术,在液体状态下便于细胞和营养物质的充分接触和交换,细胞状态可以相对保持一致,可直接用于原生质体分离、培养与杂交、基因转移和生产次生代谢物等,还可在短期内在细胞水平筛选出预期突变体,同时为植物细胞的大规模培养提供前期技术基础,有重要的研究价值和广阔的研究前景。

早在 1988 年,加拿大的 Tremblay 对纸桦(*Betula papyrifera* Marsh.)进行了愈伤组织的悬浮培养^[59]。Wakita 等在附加 $1\mu\text{mol/L}$ NAA 的 MS 培养基上用 *B. platyphylla* var. *japonica* 的种子进行悬浮细胞培养^[60],悬浮培养物在固体培养基上再分化长出芽和根并发育成再生植株。国内对白桦悬浮培养的研究较少,目前仅有王博筛选出了适合白桦悬浮细胞培养的条件,即添加 6-BA (0.4mg/L)和 TDZ (0.2mg/L)的 B_5 培养基, $10\sim 20\text{g/L}$ 的接种量,光照培养;并且发现 B_5 培养基有利于细胞鲜重的积累,NT 培养基有利于细胞中三萜物质的积累^[50]。

白桦的细胞工程技术正在逐步完善,已经建立了多途径的再生体系,组织培养在白桦育种、次生代谢、基因工程等方面也有了越来越广泛的应用,但白桦的细胞工程研究仍面临着不少问题:①虽然已经建立了较为成熟的组培体系,但悬浮培养细胞系的建立、减少褐变、悬浮细胞的稳定性及提高细胞产量的方法还有待进一步研究;②白桦体胚发生和原生质体的培养及融合的研究还处于初始阶段,有关体胚发生的机制还不清楚,需要完善培养条件和培养技术,加大培养规模;③白桦愈伤组织中次生代谢产物的含量仍然较低,如何有效提高次生代谢产物的产量是目前很有价值的研究方向;④白桦基因工程中对有价值的目的基因,如次生代谢物合成的关键基因、抗性相关基因和材质基因等的研究较少,外源基因表达稳定性的相关机制也有待进一步研究。

关于细胞工程这一领域的研究,作者认为有以下几点可以考虑:①白桦单细

胞的培养、单细胞体系的建立对于组织培养体系的优化及单细胞转基因水平的研究都有重要的价值；②诱导子对于白桦三萜的积累有促进作用，其共培养条件和作用机制有待深入研究；③目前转基因研究中涉及的外源基因并不多，应加快有应用价值的新基因的分离和鉴定，并尽可能提高目的基因的表达强度和表达效率。

参 考 文 献

- [1] 关文彬. 中国东北地区白桦林植被生态学的研究——桦属植物与中国白桦林的地理分布. 北京林业大学学报, 1998, 20(4): 104-109
- [2] 张学科, 杨逢建, 于景华, 等. 中国白桦资源的工业利用与生态经营. 植物研究, 2002, 22(2): 252-256
- [3] 郝文辉, 孙志忠, 王洋, 等. 白桦树皮挥发油成分的研究. 中国现代应用药学, 1997, 14(5): 18-27
- [4] 崔艳霞, 郑志方. 白桦树皮化学组成的研究. 东北林业大学学报, 1994, 22(4): 53-60
- [5] Ossipov V, Nurmi K, Lojonen J, et al. HPLC isolation and identification of flavonoids from white birch *Betula pubescens* leaves. Biochemical Systematics and Ecology, 1995, 23(3): 213-222
- [6] Ossipova V, Nurmi K, Lojonen J, et al. High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. Journal of Chromatography, 1996, 721(1): 59-68
- [7] 许晓双, 张福生, 秦雪梅. 三萜皂苷生物合成途径及关键酶的研究进展. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 11: 2440-2448
- [8] 范桂枝, 詹亚光, 王博, 等. 白桦不同部位及种源间白桦脂醇含量的变异分析. 林产化学与工业, 2007, 4: 104-106
- [9] Wen Z M, Martin D E, Bullock P, et al. Glucuronidation of anti-HIV drug candidate bevirimat: identification of human UDP-glucuronosyltransferases and species differences. Drug Metabolism Disposition, 2007, 35: 440-448
- [10] 曹丹. 白桦脂醇的纯化及其衍生物的研究. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2007
- [11] 韩世岩, 方桂珍, 李珊珊, 等. 四氢呋喃-苯混合溶剂法分离纯化桦木醇. 林产化学与工业, 2005, 25(增刊): 129-132
- [12] 丁为民, 王洋, 阎秀峰, 等. 均匀设计法优化桦木醇的超临界二氧化碳萃取工艺. 林产化学与工业, 2007: 63-66
- [13] 张泽, 孙宏. 高效液相色谱法测定白桦树皮中白桦脂醇的含量. 林产化学与工业, 2004, 24(1): 61-63
- [14] Yin Y G, Cui Y R, Ding H W. Optimization of betulin extraction process from *Inonotus obliquus* with pulsed electric fields. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2008, 9(3): 306-310
- [15] Shrishailappa B, Gupta M K, Saravanan R, et al. Determination of betulin in *Grewia tiliaefolia* by HPLC. Journal of Separation Science, 2004, 27(1/2): 129-131
- [16] Zhao G L, Yan W D, Cao D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. Journal Pharmacology Bio-Medical Analysis, 2007, 43: 959-962
- [17] 方玉栋, 刘璐琪, 李和. 油茶种子油不皂化物中的五环三萜醇与四环三萜醇的研究. 中国粮油学报, 1999, 14(3): 18-26
- [18] 杨晓静, 王立众, 李和. 紫苏子油不皂化物的分离与分析. 中国油料作物学报, 2006, 28(2):

207-209

- [19] 范桂枝, 詹亚光. 白桦脂醇的研究进展. 中草药, 2008, 39(10): 1591-1594
- [20] Suresh C, Zhao H, Gumbs A, et al. New ionic derivatives of betulinic acid as highly potent anti-cancer agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22(4): 1734-1738
- [21] 叶银英, 何道伟, 叶文才, 等. 23-羟基桦木酸体外和体内抗黑色素瘤作用的研究. 中国肿瘤临床与康复, 2000, 7(1): 5
- [22] Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah S K, et al. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. Cancer Research, 2007, 67: 2816-2823
- [23] Alakurtti S, Taru M K, Salme K, et al. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 29: 1-13
- [24] 蔡唯佳, 祁逸梅, 牛永东, 等. 白桦脂醇对食管癌细胞 EC109 的抑制作用. 癌变·畸变·突变, 2006, 18(1): 16-18
- [25] 李岩, 雄杰, 谢湘林, 等. 白桦三萜类物质抗黑色素瘤 B16、S180 肉瘤作用及其机制的实验研究. 中国药理学通报, 2000, 16(3): 279-281
- [26] 张晶, 张秀娟, 凌莉莉. 桦木酸和 2, 3-羟基桦木酸抗肿瘤作用机制的研究进展. 亚太传统医药, 2008, 4(1): 62-64
- [27] Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie R E, et al. Anti-AIDs agents 11 betulinic acid and platanic acids as anti HIV principles from *Syzygium claviflorum* and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. Journal of Natural Products, 1994, 57(2): 243-247
- [28] 张秀娟, 凌莉莉, 季宇彬, 等. 桦木酸生物活性研究进展. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 508-513
- [29] 王建华, 黄文哲, 张增辉, 等. 桦树皮镇咳祛痰有效成分的研究. 中国药学杂志, 1994, 29(5): 268
- [30] 罗永明, 刘爱华, 李琴, 等. 植物萜类化合物的生物合成途径及其关键酶的研究进展. 江西中医学报, 2003, 15(1): 45-49
- [31] 陈莉. 三萜皂苷生物合成途径及相关酶. 国外医药·植物药分册, 2004, 19(4): 156-161
- [32] Zhang H, Shibuya M, Yokota S, et al. Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*: molecular evolution of oxidosqualene cyclases in higher plants. Biol Pharm Bull, 2003, 26(5): 642-650
- [33] 王莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508
- [34] 王博, 范桂枝, 詹亚光, 等. 不同碳源对白桦愈伤组织生长和三萜积累的影响. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 97-99
- [35] 陈晓亚. 植物次生代谢研究. 世界科技研究与发展, 2006, 5: 1-4
- [36] 阎秀峰, 王洋, 李一蒙. 植物次生代谢及其与环境的关系. 生态学报, 2007, 27(6): 2554-2562
- [37] Huhtinen O, Yahyaoglu Z. Das frühe Blühen von aus Kalluskulturen herangezogenen Pflänzchen bei der Birke (*Betula pendula* Roth.). Silvae Genetica, 1974, 23: 32-34
- [38] Huhtinen O. Callus and plantlet regeneration from anther culture of *Betula pendula* Roth. In: Thorpe T A(ed). Plant Tissue and Cell Culture. Univ of Calgary, Calgary, Alta, Canada, 1978: 169
- [39] McCown B, Amos R. Initial trials with commercial micropropagation of birch selections (*Betula platyphylla azechuanica*). Combined Proceedings-International Plant Propagators' Society (USA), 1979, 29: 387-393
- [40] Fu L M, Hogetsu T, Ide Y, et al. Effects of α -aminooxy- β -phenylpropionic acid and