

6-苄氨基腺嘌呤和萘乙酸对三裂叶野葛毛状根生长和异黄酮含量的影响

何含杰^{1,2}, 施和平²

1 中南林业科技大学生命科学与技术学院 林业生物技术湖南省重点实验室/生物发育工程及新产品研发协同创新中心, 湖南 长沙 410004

2 华南师范大学生命科学学院 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631

何含杰, 施和平. 6-苄氨基腺嘌呤和萘乙酸对三裂叶野葛毛状根生长和异黄酮含量的影响. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1573–1585.

He HJ, Shi HP. Effects of 6-benzylaminopurine and α -naphthaleneacetic acid on growth and isoflavone contents of *Pueraria phaseoloides* hairy roots. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1573–1585.

摘 要: 为了探讨植物激素对三裂叶野葛毛状根生长和异黄酮化合物含量的影响, 采用不同浓度的 6-苄氨基腺嘌呤 (6-Benzylaminopurine, 6-BA) 或 6-BA 和萘乙酸 (α -Naphthaleneacetic, NAA) 结合处理三裂叶野葛毛状根, 观察其对毛状根生长的影响, 然后利用分光光度计测定毛状根中异黄酮化合物含量及抗氧化酶活性。结果表明: 6-BA 抑制三裂叶野葛毛状根的生长, 降低三裂叶野葛毛状根的生物量, 且随着 6-BA 浓度的增加, 其抑制效果愈明显; 同时降低其总异黄酮化合物的含量。与对照相比, 不同浓度 6-BA 和 NAA 2.0 mg/L 结合抑制毛状根的生长, 降低毛状根中总异黄酮化合物含量。6-BA 和 NAA 结合能显著提高毛状根可溶性蛋白质含量和过氧化物酶活性, 但降低其超氧化物歧化酶活性; 单独 6-BA 处理的毛状根培养至 30 d 时, 可以检测到典型的 DNA ladder 带, 而 6-BA 和 NAA 结合处理的毛状根培养至 20 d 时就可以检测到 DNA ladder 带, 表明 6-BA 或 6-BA 和 NAA 结合都可以促进细胞程序性死亡的发生, 且 NAA 具有协同作用。

关键词: 三裂叶野葛, 毛状根, 异黄酮化合物, 6-苄氨基腺嘌呤, 萘乙酸, 超氧化物歧化酶, 过氧化物酶, 细胞程序性死亡

Received: January 2, 2014; Accepted: April 1, 2014

Corresponding author: Heping Shi. Tel/Fax: +86-20-85214793; E-mail: shihp@scnu.edu.cn

Effects of 6-benzylaminopurine and α -naphthaleneacetic acid on growth and isoflavone contents of *Pueraria phaseoloides* hairy roots

Hanjie He^{1,2}, and Heping Shi²

¹ Hunan Provincial Key Laboratory of Forestry Biotechnology/ Cooperative Innovation Center of Engineering and New Products for Developmental Biology, College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China

² Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China

Abstract: In order to study the effect of phytohormone on growth and isoflavones contents of *Pueraria phaseoloides* hairy roots, we cultured the hairy roots with different concentrations of 6-benzylaminopurine (6-BA) alone or in combination with α -naphthaleneacetic acid (NAA). Then we determined the effects of 6-BA alone or in combination with NAA on the growth and the contents of isoflavones compounds and levels of antioxidase activities of hairy roots by spectrophotometry. The results show that 6-BA inhibited the growth, and decreased biomass and total isoflavones compounds of *P. phaseoloides* hairy roots. Furthermore, the inhibition was increased with the concentrations of 6-BA. Compared with the controls, different concentrations of 6-BA in combination with NAA 2.0 mg/L could inhibit the growth of hairy roots and decrease the content of total isoflavone compounds, and also significantly enhanced the contents of soluble protein and levels of peroxidase (POD) activities, but decreased the activities of superoxide dismutase (SOD). DNA ladders detected by agarose gel electrophoresis can be observed after hairy roots of *P. phaseoloides* were cultured with 6-BA alone for 30 days, but can appear on the 20th day after culture with 6-BA in combination with NAA 2.0 mg/L. This result indicates that 6-BA or 6-BA in combination with NAA can both stimulate appearance of programmed cell death (PCD), and NAA may play a synergistic role on PCD.

Keywords: *Pueraria phaseoloides*, hairy roots, isoflavones compounds, 6-benzylaminopurine, α -naphthaleneacetic acid, superoxide dismutase, peroxidase, programmed cell death

三裂叶野葛 *Pueraria phaseoloides*，系豆科多年生藤本植物，其根含有葛根素、大豆苷等异黄酮类化合物，具有改善心脑血管、降低血脂与血糖、增强免疫力等功能及具有类似雌性激素的功效，广泛用于治疗高血压、冠心病、心绞痛等病症^[1-2]。但由于其野生资源的匮乏以及人工栽培的时效性差而无法满足医药工业的巨大需求。为此，我们曾利用含野生型 Ri 质粒的发根农杆菌 ATCC15834 对三裂叶野葛叶片进行遗传转化，获得了能在无激素 MS 培养基上

自主快速生长及能产生较高含量葛根素的毛状根^[3]。已有的研究表明，植物毛状根的生长和次生代谢物质的合成与积累易受到培养基类型、植物激素等诸多因素的影响^[4-7]。细胞分裂素和生长素参与和调控了植物许多重要的生理过程，如器官的发育与衰老、药用植物的生长和次生代谢以及基因的表达调控等^[8-11]。如在供试的培养基中添加不同的外源植物生长调节物质可以促进雪莲 *Saussurea involucreata* 毛状根和亚麻 *Linum album* 毛状根的生长和次生代谢物

的生物合成与积累^[4,12]。但迄今为止未见有关生长素和细胞分裂素对三裂叶野葛毛状根生长和异黄酮含量影响的报道。本文报道细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 对三裂叶野葛毛状根生长和异黄酮化合物含量的影响,旨在为运用植物激素来调节三裂叶野葛毛状根的生长和葛根素等异黄酮类物质的合成与积累奠定实验和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本文所采用的材料是由含野生农杆菌 Ri 质粒的发根农杆菌 ATCC15834 遗传转化三裂叶野葛叶片外植体所产生的毛状根,其诱导和继代培养方法见已发表方法^[3]。

1.2 培养基及培养条件

采用的培养基为添加不同浓度 6-BA 或 6-BA + 2.0 mg/L NAA 组合的固体 MS 培养基,其中 6-BA 浓度分别为 0、0.1、0.5、1.0、3.0 和 5.0 mg/L,每个 150 mL 锥形瓶中分装 40 mL 培养基。灭菌前 pH 值调至 5.8–6.0,经 121 °C、20 min 高温湿热灭菌后待用。接种后,毛状根置于培养架上,于 (25±2) °C 暗培养。

1.3 三裂叶野葛毛状根培养及其生物量测定

选取生长旺盛的三裂叶野葛毛状根,用无菌水洗去培养基后,剪切成 4–5 cm 且具根尖的根段,按约 0.5 g/瓶接入含植物激素的 MS 固体培养基中进行培养。在培养过程中,每隔 5 d 随机抽取毛状根培养物各 3 瓶,用自来水洗去培养物上的培养基,并用吸水纸吸干水分后测定毛状根的鲜重和干重。一部分毛状根培养物于 -80 °C 超低温冰箱中保存,供测定其可溶性蛋白含量和保护酶活性及提取植物基因组 DNA;另

一部分毛状根在恒温烘箱中 60 °C 烘干后,供测定其异黄酮化合物含量。

1.4 三裂叶野葛毛状根培养物中异黄酮化合物含量的测定

三裂叶野葛毛状根中异黄酮化合物含量的测定,参照我们已发表的方法^[3]。

1.5 毛状根培养物中可溶性蛋白含量、SOD 和 POD 活性的测定

三裂叶野葛毛状根培养物中可溶性蛋白含量的测定参照 Bradford 的方法。用考马斯亮蓝 G-250 对制备好的酶液进行染色,摇匀后于岛津 UV-1206 型紫外光/可见光分光光度仪上 (595 nm) 测定其光吸收值 (OD),同时以制备提取液所用的磷酸缓冲液作为空白对照^[13]。SOD 活性的测定参照 Beauchamp 和 Fridovich 的方法进行操作,以抑制 NBT 光还原 50% 所需要的酶量为一个酶活性单位,酶活性以 U/mg 蛋白表示^[14]。POD 活性的测定参照已发表的方法^[15]。

1.6 毛状根基因组 DNA 的提取和琼脂糖凝胶电泳检测

三裂叶野葛毛状根基因组 DNA 的提取,参照文献^[3]。琼脂糖凝胶电泳检测条件是:1% 琼脂糖,1×50 TEB,50 V,1.5 h。

2 结果与分析

2.1 6-BA 对三裂叶野葛毛状根生长的影响

无激素 MS 培养基 (对照) 培养的三裂叶野葛毛状根生长最快,培养至 25 d 时其干重达到最大,约为 1.47 g DW/瓶;随着培养时间的延长,毛状根逐渐褐化,其生物量也开始下降 (图 1 A)。与对照相比,细胞分裂素 6-BA 明显抑制三裂叶野葛毛状根的生长,降低其生物量,且此抑制作用与 6-BA 浓度呈正相关;培养至 30 d

时,添加 6-BA 培养基培养的三裂叶野葛毛状根的干重虽达到最大值,但仅为同期对照生物量的 26.3%–47.8% (图 1 A); 其中低浓度 0.1 mg/L 6-BA 可以抑制毛状根侧根的产生,促进老根的褐化与衰老;而 5.0 mg/L 6-BA 则完全抑制毛状根的生长,老根逐渐变成黑色或逐渐膨大且似愈伤化 (图 1 B、C、D), 表明 6-BA 可抑制三裂叶野葛毛状根的生长,降低毛状根的生物量。

2.2 6-BA 对三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物含量的影响

图 2 为 6-BA 浓度对三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物含量的影响。从图 2 可见,对照毛状根培养物中异黄酮化合物呈先上升后下降的变化趋势,培养至 10 d 时,毛状根每克干物质中异黄酮化合物含量达到最高,约为 32.22 mg/g DW (图 2 A)。与对照相比,培养至 25 d 时,细胞分裂素 6-BA 0.1 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、3.0 mg/L

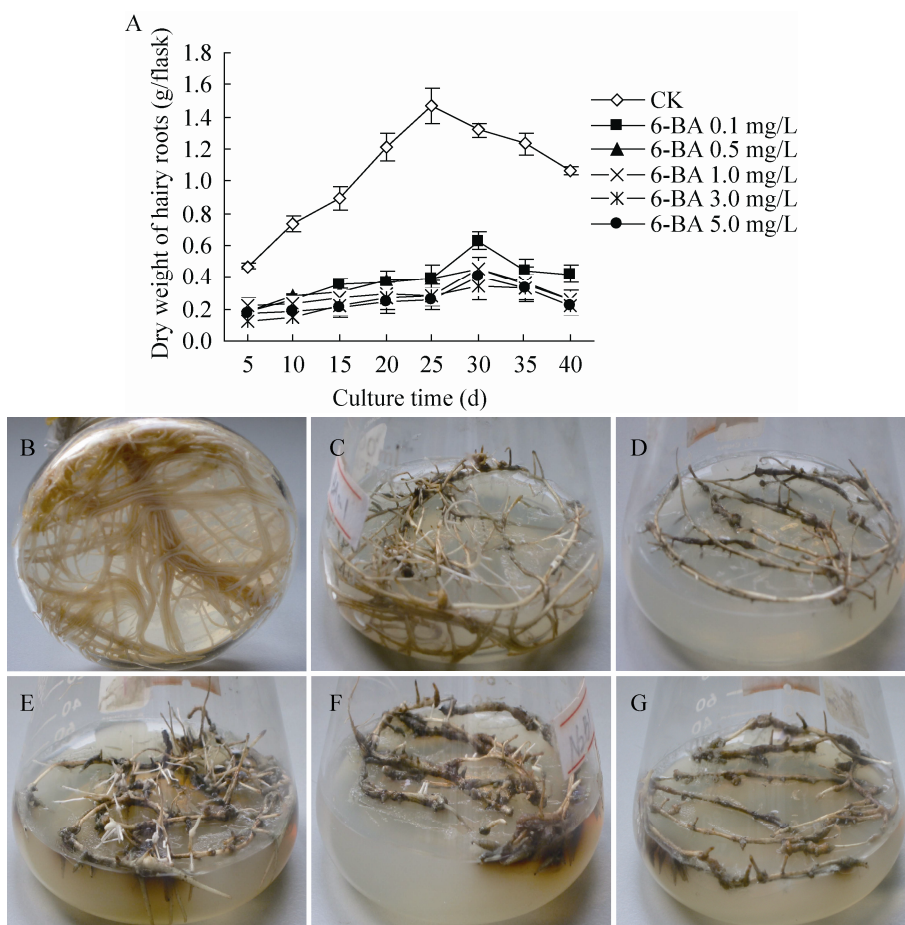


图 1 6-BA 或 6-BA 和 NAA 结合对三裂叶野葛毛状根生长的影响

Fig. 1 Effects of 6-BA or in combination with NAA on the growth of *P. phaseoloides* hairy roots. (A) Effect of 6-BA on the biomass of *P. phaseoloides* hairy roots. (B), (C), (D) Treatment with 6-BA. (E), (F), (G) Treatment with 6-BA and NAA 2.0 mg/L combination, the 6-BA concentrations was 0 mg/L in (B), 0.1 mg/L in (C) and (E), 1.0 mg/L in (F), 5.0 mg/L in (D) and (G) (15 d).

和 5.0 mg/L 处理的毛状根每克干物质中异黄酮化合物含量分别是对照含量的 1.2、1.7、1.8、1.7 和 1.7 倍 (图 2 A)。然而, 细胞分裂素 6-BA 却降低每个培养瓶中毛状根的总异黄酮化合物的含量; 培养至 30 d 时, 培养瓶中总异黄酮化合物的含量是同期对照含量的 47.8%–68.6% (图 2 B)。这表明 6-BA 可降低每个培养瓶中毛状根的总异黄酮化合物含量。

2.3 6-BA 和 NAA 结合对三裂叶野葛毛状根生长的影响

从图 3 可见, 对照三裂叶野葛毛状根生长最快, 培养至 20 d 时其干物质质量达到最大值, 约为 1.0 g DW/瓶, 是培养初期的 10.1 倍 (图 3A)。而 6-BA 0.1 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、3.0 mg/L、5.0 mg/L 和 NAA 2.0 mg/L 结合培养的毛状根则

生长缓慢, 培养至 25 d 时其干物质质量达到最大值, 其干重分别比起始培养时增加了 6.1、5.6、5.3、4.8 和 4.6 倍, 但仅为同期对照毛状根生物量的 83.7%、78.0%、74.5%、68.4% 和 66.4% (图 3)。培养 5 d 后, 低浓度 6-BA (0.1 mg/L 和 1.0 mg/L) 和 NAA 2.0 mg/L 结合培养的三裂叶野葛毛状根的老根 (起始根端) 上长出许多粗短的侧根, 且随着培养时间的延长而逐渐增多; 培养 20 d 后毛状根从白色变为黄色 (图 1E、F)。相反, 高浓度的 6-BA 5.0 mg/L 和 NAA 2.0 mg/L 结合则抑制毛状根的生长, 其起始根段逐渐褐化和膨大 (图 1G)。与对照相比, 6-BA 和 NAA 2.0 mg/L 结合抑制三裂叶野葛毛状根的生长, 且其抑制作用与 6-BA 的浓度成正比 (图 3)。表明细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 结合抑制三裂叶野葛毛状根的生长, 且 NAA 具有协同作用。

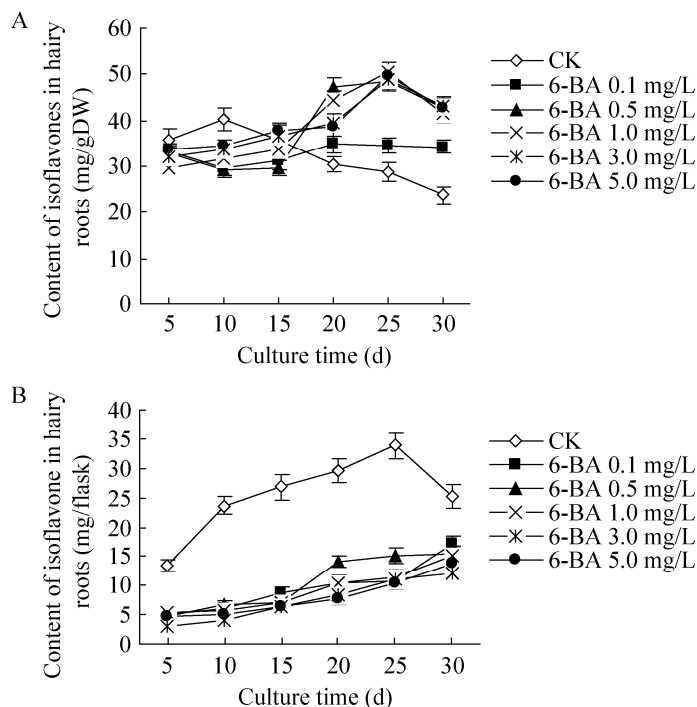


图 2 6-BA 对三裂叶野葛毛状根异黄酮含量的影响

Fig. 2 Effects of 6-BA on the contents of isoflavones in *P. phaseoloides* hairy roots. (A) Isoflavones contents per gram in dry cultures of *P. phaseoloides* hairy roots. (B) Total isoflavones contents per flask in dry cultures of *P. phaseoloides* hairy roots.

2.4 6-BA 和 NAA 结合对毛状根中异黄酮化合物含量的影响

图 4 为 6-BA 和 NAA 结合对三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物含量的影响。从图 4 可见, 培养至 25 d 时, 对照毛状根培养物的异黄酮化合

物含量达到最大值, 约 19.76 mg/g DW (图 4 A)。与对照相比, 不同浓度 6-BA 和 NAA 2.0 mg/L 结合则可促进毛状根每克干物质中异黄酮化合物的积累, 且其促进作用随着 6-BA 浓度的增加而愈加显著; 培养至 20 d 时, 6-BA 和 NAA 组

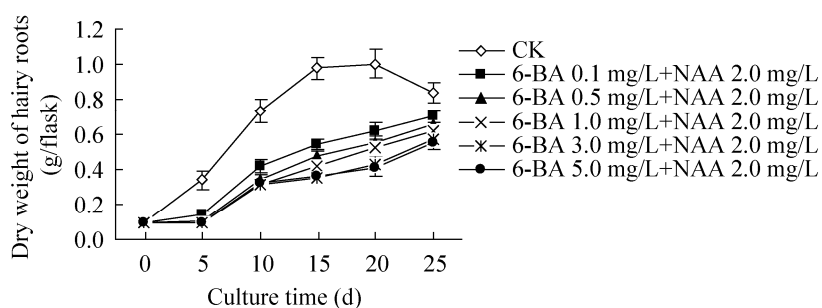


图 3 6-BA 和 NAA 对三裂叶野葛毛状根生长的影响

Fig. 3 Effects of 6-BA and NAA on the growth of *P. phaseoloides* hairy roots.

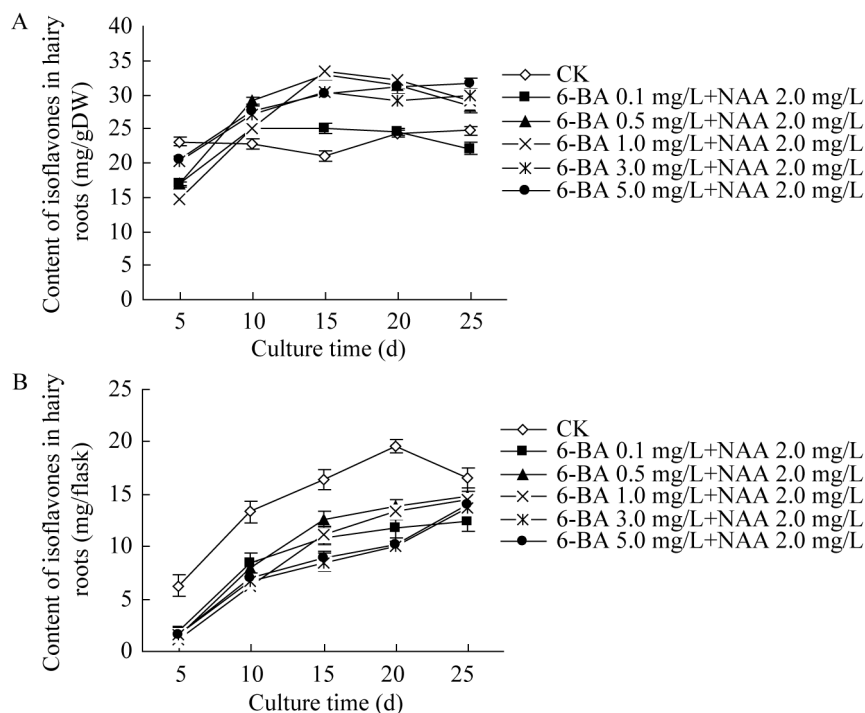


图 4 6-BA 和 NAA 对三裂叶野葛毛状根异黄酮化合物含量的影响

Fig. 4 Effects of 6-BA and NAA on the contents of isoflavones in *P. phaseoloides* hairy roots. (A) Isoflavones contents per gram in dry cultures of *P. phaseoloides* hairy roots. (B) Total isoflavones contents per flask in dry cultures of *P. phaseoloides* hairy roots.

合处理的毛状根异黄酮化合物含量是同期对照含量的 96.9%–131.7% (图 4 A)。但若以每瓶异黄酮含量计, 6-BA 和 NAA 组合处理则降低每个培养瓶的毛状根总异黄酮化合物的含量, 培养至 25 d 时, 其总异黄酮化合物含量约为同期对照含量的 74.8%–89.6% (图 4 B)。这表明, 6-BA 和 NAA 组合不仅抑制三裂叶野葛毛状根的生长, 而且降低每个培养瓶中毛状根的总异黄酮化合物含量。

2.5 6-BA 和 NAA 结合对三裂叶野葛毛状根的可溶性蛋白含量的影响

图 5 为 6-BA 和 NAA 结合对毛状根中可溶性蛋白含量的影响。从图 5 可见, 对照三裂叶野葛毛状根的可溶性蛋白含量随着培养时间的延长而逐渐下降, 培养至 25 d 时其含量比起始水平下降约 37.9%。与对照相比, 6-BA 0.1、0.5、1.0、3.0 或 5.0 mg/L 和 NAA 2.0 mg/L 组合处理的毛状根培养物的可溶性蛋白含量在培养至 15 d 时到达最大值, 且分别比对照提高 49.5%、47.5%、30.2%、52.6% 和 46.5%; 随后其可溶性蛋白含量开始逐渐下降; 培养至 25 d 时达到最

低值, 但其含量均比同期对照高 (图 5)。该结果表明, 6-BA 和 NAA 可以提高三裂叶野葛毛状根的可溶性蛋白的含量, 推测其可能与毛状根的生长受到抑制有关。

2.6 6-BA 和 NAA 对三裂叶野葛毛状根 SOD 活性的影响

图 6 为 6-BA 和 NAA 对三裂叶野葛毛状根 SOD 活性的影响。从图 6 可见, 对照三裂叶野葛毛状根中 SOD 的活性随着培养时间的延长而逐渐升高, 培养至 25 d 时达到最大值, 是培养初期 SOD 活性的 1.6 倍。与对照相比, 培养 15 d 时, 6-BA 和 NAA 结合处理的毛状根 SOD 活性达到最低值 ($P < 0.01$), 随后又开始逐渐升高; 培养至 25 d 时, 不同浓度 6-BA 和 NAA 2.0 mg/L 结合处理的毛状根 SOD 活性分别是其培养初期的 1.5、1.9、1.9、1.5 和 1.8 倍, 但仅是同期对照 SOD 活性的 82.9%、89.5%、82.0%、69.0% 和 78.6% (图 6)。可见在 0–25 d 培养期间, 6-BA 和 NAA 结合处理的毛状根 SOD 活性都低于同期对照, 这表明, 6-BA 和 NAA 结合可以降低三裂叶野葛毛状根培养物的 SOD 活性。

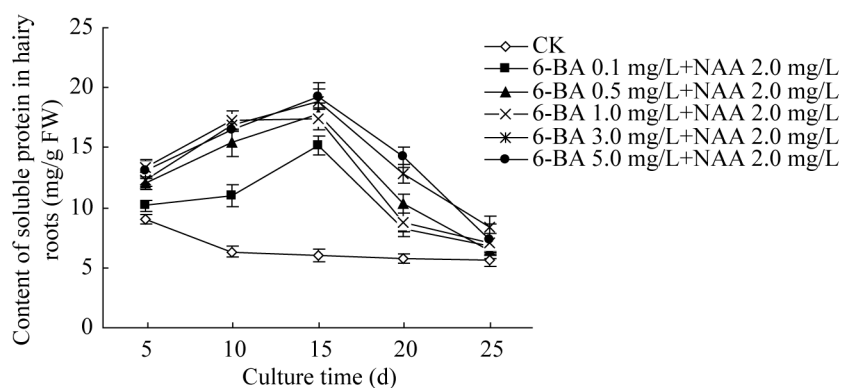


图 5 6-BA 和 NAA 对三裂叶野葛毛状根中可溶性蛋白含量的影响

Fig. 5 Effects of 6-BA and NAA on the contents of soluble protein in *P. phaseoloides* hairy roots.

2.7 6-BA 和 NAA 对三裂叶野葛毛状根 POD 活性的影响

图 7 为 6-BA 和 NAA 结合对三裂叶野葛毛状根 POD 活性的影响。从图 7 可见,不同浓度 6-BA 和 NAA 2.0 mg/L 结合培养的三裂叶野葛毛状根 POD 活性,随着培养时间的延长而逐渐升高,且均高于对照活性水平。培养至 25 d 时,其 POD 活性达到最大值,6-BA 0.1、0.5、1.0、3.0、5.0 和 NAA 2.0 mg/L 组合培养的毛状根培养物 POD 活性比培养 5 d 时分别增加了 2.8、4.6、3.0、4.5 和 3.2 倍,分别是同期对照活性水平的

1.3、1.9、1.6、1.7 和 1.3 倍 ($P < 0.05$) (图 7)。这说明 6-BA 和 NAA 可以提高三裂叶野葛毛状根的 POD 活性,且其活性水平与毛状根生长受抑制程度和培养时间成正比。

2.8 6-BA 和 NAA 对三裂叶野葛毛状根 PCD 的影响

图 8 为 6-BA 或 6-BA 和 NAA 结合处理对三裂叶野葛毛状根 PCD 发生的影响。由图 8 可见,6-BA 处理的三裂叶野葛毛状根培养至 30 d 时,通过琼脂糖凝胶电泳可以检测到 140–200 bp 大小的 DNA ladder,说明 6-BA 可以诱导三裂

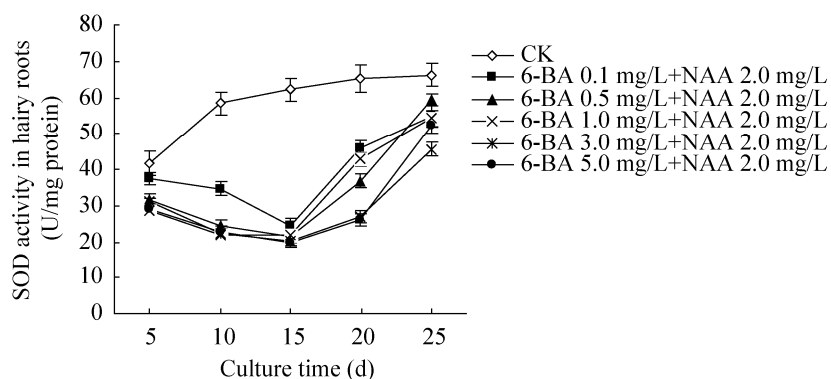


图 6 6-BA 和 NAA 对三裂叶野葛毛状根中 SOD 活性的影响

Fig. 6 Effects of 6-BA and NAA on the activities of SOD in *P. phaseoloides* hairy roots.

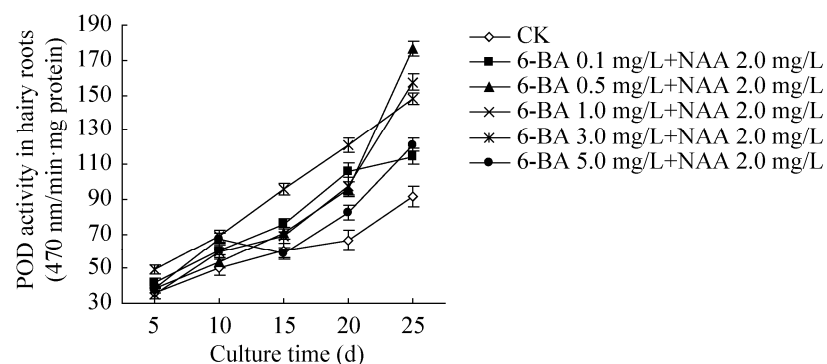


图 7 6-BA 和 NAA 对三裂叶野葛毛状根 POD 活性的影响

Fig. 7 Effects of 6-BA and NAA on the activities of POD in *P. phaseoloides* hairy roots.

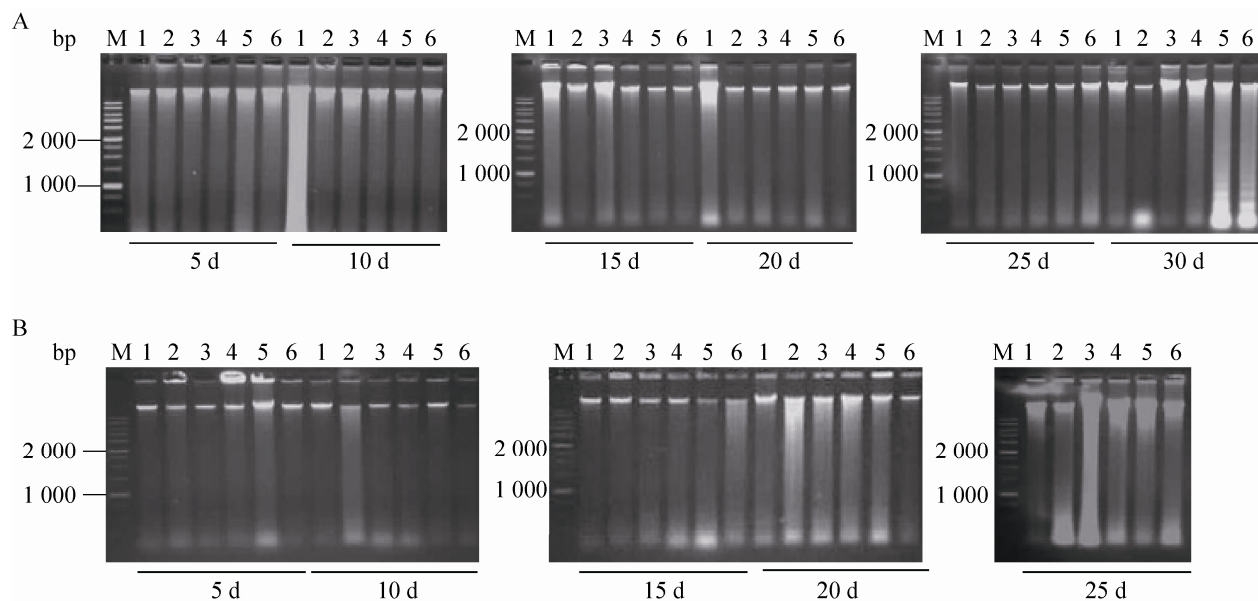


图 8 6-BA 和 NAA 处理后三裂叶野葛毛状根中 DNA 片段的电泳检测

Fig. 8 Electrophoresis detection of DNA fragments in *P. phaseoloides* hairy roots under 6-BA and NAA treatment. (A) Detection of DNA fragments in *P. phaseoloides* hairy roots under 6-BA treatment alone. (B) Treatment with 6-BA and NAA 2.0 mg/L combination, the 6-BA concentrations was same in (A) and (B). M: marker; 1: 6-BA 0 mg/L; 2: 6-BA 0.1 mg/L; 3: 6-BA 0.5 mg/L; 4: 6-BA 1.0 mg/L; 5: 6-BA 3.0 mg/L; 6: 6-BA 5.0 mg/L.

叶野葛毛状根 PCD 的发生 (图 8 A)。而 6-BA 和 NAA 结合处理的三裂叶野葛毛状根培养至 20 d 时,可以检测到 DNA ladder,而培养至 25 d 时,其 DNA ladder 更加明显,这说明 6-BA 和 NAA 可以诱导三裂叶野葛毛状根 PCD 的发生,且 NAA 具有协同作用 (图 8 B)。

3 讨论

已有的研究表明,毛状根的生长及其次生代谢物质的合成受到植物激素等因素的影响,但其影响程度因植物激素种类的不同而异^[16]。NAA 和 IAA 可显著地促进人参 *Panax ginseng* 毛状根的生长,而低浓度 6-BA 则可促进人参皂苷的合成和积累^[17]。而 NAA 1.0 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L 结合则抑制酸浆果 *Physalis minima* 毛

状根的生长,促进其毛状根培养物中澳洲茄胺的合成与积累,其含量约是对照含量的 3.6 倍^[18]。2,4-D 可以强烈抑制何首乌 *Polygonum multiflorum* 毛状根的生长和蒽醌类化合物的合成,而适量浓度的 NAA 和 6-BA 结合则可促进毛状根的生长以及蒽醌类化合物的生物合成^[8]。然而,在培养黄芩 *Scutellaria baicalensis* 毛状根时观察到,NAA 可同时促进黄芩毛状根的生长和黄芩苷的合成;而 6-BA 则只抑制黄芩毛状根的生长,但有利于黄芩苷的合成和积累^[19]。同时发现,NAA 0.5 mg/L 则可以明显提高紫雪花 *Plumbago indica* 毛状根培养物中砒松素的含量,但 2,4-D 则明显抑制紫雪花毛状根的生长和砒松素的合成与积累^[20]。此外,KT 0.5 mg/L 可以促进茺菁 *Brassica rapa* 毛状根中芥子油苷的积累,而对

白芥 *Sinapis alba* 毛状根次生代谢物的含量无明显影响;但是, 2,4-D (0.4 mg/L)不仅促进上述两种毛状根的生长, 而且降低毛状根培养物中芥子油苷的含量^[21]。这表明植物生长调节剂对毛状根的生长及其药用成分合成与积累的调控作用可因植物种类和植物激素种类的不同而有所差异。在本实验中, 不同浓度的 6-BA 或 6-BA 和 NAA 结合均抑制三裂叶野葛毛状根的生长, 此抑制作用与 6-BA 的浓度成正相关, 且 NAA 具有协同作用 (图 1、3)。虽然 6-BA 或 6-BA 和 NAA 结合可以促进三裂叶野葛毛状根每克干物质中异黄酮化合物的合成与积累, 但是降低每个培养瓶中毛状根的总异黄酮化合物含量 (10%–26%) (图 2、4)。这表明 6-BA 或 6-BA 和 NAA 结合抑制三裂叶野葛毛状根的生长, 降低其毛状根干物质质量和总异黄酮化合物含量, 这与 Putalun 等的实验结果基本一致^[18]。

植物在受到伤害和逆境胁迫后, 将开启自身的防御机制, 如提高 SOD、POD 等保护酶的活性水平, 同时将体内产生的大量活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 成分转化为 H_2O_2 和 H_2O , 调整体内 ROS 含量至基准水平而发挥保护作用^[22]。在培养黄瓜 *Cucumis sativus* 毛状根时发现, 6-BA 可以延缓毛状根中可溶性蛋白含量的下降, 降低毛状根 SOD 和 POD 活性水平, 减少其内源性乙烯的释放量, 从而调节毛状根的生长和衰老^[23]。外施 6-BA 能有效阻止棉花 *Gossypium* spp. 叶片内可溶性蛋白含量的迅速下降, 提高叶片内 SOD 活性水平, 并延缓棉花幼苗的衰老^[24]。与对照相比, 6-BA 和 NAA 结合提高三裂叶野葛毛状根的可溶性蛋白的含量和 POD 活性水平, 降低其体内的 SOD 活性水平, 这与 Shi 等的实验结果不一致 (图 5、6、7)^[23]。

我们推测, 这种差异可能与植物种类及毛状根类型有关。

PCD 是植物生长过程中一种重要的生理现象, 并可受到许多因素的诱导和影响, 如植物激素等^[25-26]。高浓度激动素 KT (2.0 mg/L 或 4.0 mg/L KT) 处理棉花悬浮细胞 4 d 后, 不仅出现大量细胞死亡, 而且可以检测到 140–180 bp 及其倍增的 DNA ladder^[27]。外施 6-BA 可以促进烟草 *Nicotiana tabacum* 和胡萝卜 *Daucus carota* 细胞的衰老, 诱导细胞 PCD 的发生, 提高衰老相关基因 (Senescence-associated genes, SAG) SAG-12 基因的表达水平, 促进 DNA ladder 的形成^[28]。实验结果显示, 外源 6-BA 或 6-BA 和 NAA 结合不仅抑制三裂叶野葛毛状根的生长, 而且促进毛状根的衰老 (图 1、3)。外源 6-BA 或 6-BA 和 NAA 结合处理三裂叶野葛毛状根 20–30 d 后, 在毛状根基因组 DNA 中均可以检测到 140–200 bp 或倍增的 DNA ladder, 其中 6-BA 和 NAA 结合诱导的 DNA ladder 出现时间比 6-BA 单独诱导的出现时间提前约 10 d (图 8)。上述实验结果说明, 6-BA 或 6-BA 和 NAA 均可以促进三裂叶野葛毛状根 PCD 的发生, 而且 NAA 在 6-BA 诱导的 PCD 过程中具有协同作用。

细胞分裂素和生长素对植物生长发育过程的调控, 最终是对靶基因和功能蛋白质表达水平的调控^[29]。利用植物激素处理大豆 *Glycine max* 细胞时发现, 生长素或细胞分裂素均抑制饥饿相关基因 (Starvation-associated messages, SAMs) SAM22/26/46 的表达, 诱导 S-腺苷高半胱氨酸水解酶基因的上调表达, 但二者结合使用时则无诱导效果^[30]。细胞分裂素可通过受体蛋白 CRE1/AHK4 感知和应答其信号, 然后通过多级磷酸化作用向下游传递信号, 并最终诱导拟

南芥培养细胞 PCD 的发生^[26,31]。而在烟草细胞培养过程中,外源生长素可诱导激素响应基因 *pLS216* 在转录水平的短暂积累,而细胞分裂素的诱导效果则较生长素迟缓,这与本实验结果不一致^[32]。实验结果表明,6-BA 或 6-BA 和 NAA 结合不仅诱导三裂叶野葛毛状根 PCD 的发生,而且 NAA 具有协同作用,但二者调控毛状根的生长、异黄酮化合物的代谢、PCD 发生及相关基因表达的机制则尚不清楚,待今后进一步研究。

REFERENCES

- [1] Wu DL, Chen ZY, Huang XX. A study of Chinese *Pueraria*. J Trop Subtrop Bot, 1994, 2(3): 12–21 (in Chinese).
吴德邻, 陈忠毅, 黄向旭. 中国葛属的研究. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(3): 12–21.
- [2] Guo JP, Sun QR, Zhou Q. Advances of pharmacological research of gegen. Chin Tradit Herb Drugs, 1995, 26(3): 163–165 (in Chinese).
郭建平, 孙其荣, 周全. 葛根药理作用研究进展. 中草药, 1995, 26(3): 163–165.
- [3] Shi HP, Quan H, Spiroskintzios. Induction of hairy roots *Pueraria phaseoloides* and its culture in liquid and solid medium. Chin J Biotech, 2003, 19(3): 307–311 (in Chinese).
施和平, 权宏, Spiroskintzios. 三裂叶野葛毛状根的诱导及其固体培养和液体培养. 生物工程学报, 2003, 19(3): 307–311.
- [4] Qiao XL, Jiang SG, Lü XF, et al. Effects of phytohormones on plant regeneration and production of flavonoids in transgenic *Saussurea involucre* hairy roots. Chin J Biotech, 2011, 27(1): 69–75 (in Chinese).
乔献丽, 蒋曙光, 吕晓芬, 等. 激素对转基因雪莲毛状根植株再生及类黄酮产生的影响. 生物工程学报, 2011, 27(1): 69–75.
- [5] Yang R, Fu CX, Jin ZP, et al. Effects of physical and chemical factors on hairy root growth and flavonoids biosynthesis in the cultures of *Saussurea medusa* maxim hairy root. Chin J Biotech, 2005, 21(2): 233–238 (in Chinese).
杨睿, 付春祥, 金治平, 等. 不同理化因子对雪莲毛状根生长和总黄酮生物合成的影响. 生物工程学报, 2005, 21(2): 233–238.
- [6] He HJ, Liang P, Shi HP. Effects of sucrose and light on the growth and production of secondary metabolites in *Pueraria phaseoloids* hairy roots. Chin J Biotech, 2005, 21(6): 1003–1008 (in Chinese).
何含杰, 梁朋, 施和平. 蔗糖和光对三裂叶野葛毛状根生长及次生物质产生的影响. 生物工程学报, 2005, 21(6): 1003–1008.
- [7] Condori J, Sivakumar G, Hubstenberger J, et al. Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: effects of culture medium and growth stage. Plant Physiol Biochem, 2010, 48(5): 310–318.
- [8] Yu RM, Ma N, Yan CY, et al. Effects of exogenous phytohormones on hairy root growth and biosynthesis of Anthraquinones in the hairy root culture of *Polygonum multiflorum*. Chin J Biotech, 2006, 22(4): 619–623 (in Chinese).
于荣敏, 马娜, 严春艳, 等. 外源激素对何首乌毛状根生长及蒽醌类成分生物合成的影响. 生物工程学报, 2006, 22(4): 619–623.
- [9] Wu T, Zhang HT, Wang Y, et al. Induction of root Fe() reductase activity and proton extrusion by iron deficiency is mediated by auxin-based systemic signaling in *Malus xiaojinensis*. J Exp Bot, 2012, 63(2): 859–870.
- [10] Hentrich M, Bottcher C, Duchting P, et al. The jasmonic acid signaling pathway is linked to anxin homeostasis through the modulation of *YUCCA8* and *YUCCA9* gene expression. Plant J, 2013, 74(4): 626–637.
- [11] Xu F, Yang Z, Chen X, et al. 6-Benzylaminopurine delays senescence and enhances health-promoting compounds of harvested roccoli. J Agric Food Chem, 2012, 60(1): 234–240.
- [12] Farkya S, Bisaria VS. Exogenous hormones

- affecting morphology and biosynthetic potential of hairy root line (LYR2i) of *Linum album*. J Biosci Bioeng, 2008, 105(2): 140–146.
- [13] Bradfoud MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248–252.
- [14] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem, 1979, 44(1): 276–287.
- [15] Shi HP, Eric PT, Wang YL, et al. Effect of cadmium, alone or in combination with CaCl_2 , on the growth, antioxidative enzyme activity and cadmium absorption of *Solanum nigrum* L. var *pauciflorum* hairy roots. Chin J Biotech, 2010, 26(2): 147–158 (in Chinese).
施和平, 曾宝强, 王云灵, 等. 镉及其与钙组合对褐脉少花龙葵毛状根生长、抗氧化酶活性和吸收镉的影响. 生物工程学报, 2010, 26(2): 147–158.
- [16] Fang CP, Wang WT, Wang ZF, et al. Effects of phytohormones on hairy root growth and tanshinone biosynthesis of *Salvia miltiorrhiza*. J Chin Med Mater, 2011, 34(5): 661–664 (in Chinese).
房翠萍, 王维婷, 王志芬, 等. 植物激素对丹参毛状根生长和丹参酮生物合成的影响. 中药材, 2011, 34(5): 661–664.
- [17] Zhou QY, Ding JY, Liu J, et al. Effects of different phytohormones on the growth and ginsenoside content of *Panax ginseng* hairy root. J Plant Resource Environ, 2003, 12(1): 26–28 (in Chinese).
周倩耘, 丁家宜, 刘峻, 等. 植物激素对人参毛状根生长和皂甙含量的影响. 植物资源与环境学报, 2003, 12(1): 26–28.
- [18] Putalun W, Prasamsiwamai P, Tanaka H, et al. Solasodine glycoside production by hairy root cultures of *Physalis minima* Linn. Biotechnol Lett, 2004, 26(7): 545–548.
- [19] Qi XJ, Guo LK. Effects of exogenous phytohormones on hairy root of *Scutellaria baicalensis* and biomass baicalin. J Shaanxi Univ Sci Technol, 2009, 27(2): 48–50 (in Chinese).
齐香君, 郭乐康. 外源激素对黄芩毛状根生长及黄芩苷合成的影响. 陕西科技大学学报, 2009, 27(2): 48–50.
- [20] Gangopadhyay M, Dewanjee S, Bhattacharya S. Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago indica* hairy root cultures. J Biosci Bioeng, 2011, 111(6): 706–710.
- [21] Kastell A, Smetanska I, Ulrichs C, et al. Effects of phytohormones and jasmonic acid on glucosinolate content in hairy root cultures of *Sinapis alba* and *Brassica rapa*. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 169(2): 624–635.
- [22] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, et al. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci, 2004, 9(10): 490–498.
- [23] Shi HP, Qi Y, Zhang Y, et al. Induction of cucumber hairy roots and effect of cytokinin 6-BA on its growth and morphology. Chin J Biotech, 2006, 22(3): 514–520 (in Chinese).
施和平, 齐莹, 张悦, 等. 黄瓜毛状根的诱导及细胞分裂素 6-BA 对其生长和形态的影响. 生物工程学报, 2006, 22(3): 514–520.
- [24] Shen FF, Yu SX, Fan SL, et al. The relationship between hormone and membrane lipid peroxidation in cotton leaf during senescence. J Plant Physiol Mol Biol, 2003, 29(6): 589–592 (in Chinese).
沈法富, 喻树迅, 范术丽, 等. 棉花叶片衰老过程中激素和膜脂过氧化的关系. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(6): 589–592.
- [25] Coll NS, Eppe P, Dangl JL. Programmed cell death in the plant immune system. Cell Death Differ, 2011, 18(8): 1247–1256.
- [26] Kunikowska A, Byczkowska A, Doniak M, et al. Cytokinins resume: their signaling and role in programmed cell death in plants. Plant Cell Rep, 2013, 32(6): 771–780.
- [27] Xia QZ, Zhang MJ, Zhang XL. High concentration of cytokinin induces programmed

- cell death of cotton suspension cultures. Southwest China J Agri Sci, 2005, 18(5): 579–583 (in Chinese).
- 夏启中, 张明菊, 张献龙. 高浓度细胞分裂素诱导棉花悬浮细胞程序性死亡的发生. 西南农业学报, 2005, 18(5): 579–583.
- [28] Carmi F, Terzi M, Michele R, et al. High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. Plant Sci, 2004, 4(166): 963–969.
- [29] Ye ZH, Varner JE. Expression of an auxin- and cytokinin-regulated gene in cambial region in Zinnia. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(14): 6539–6543.
- [30] Crowell DN, Amasino RM. Induction of specific mRNAs in cultured soybean cells during cytokinin or auxin starvation. Plant Physiol, 1991, 95(3): 711–715.
- [31] Vescovi M, Riefler M, Gessuti M, et al. Programmed cell death induced by high levels of cytokinin in *Arabidopsis* cultured cells is mediated by the cytokinin receptor CRE1/AHK4. J Exp Bot, 2012, 63(7): 2825–2832.
- [32] Dominov JA, Stenzler L, Lee S, et al. Cytokinins and auxins control the expression of a gene in *Nicotiana plumbaginifolia* cells by feedback regulation. Plant Cell, 1992, 4(4): 451–461.

(本文责编 陈宏宇)

《生物工程学报》入选“中国精品科技期刊”

2014年9月26日,中国科学技术信息研究所发布了《2014年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,《生物工程学报》入选300种“第3届中国精品科技期刊”,为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

《2014年中国科技期刊引证报告(核心版)》,涵盖了1989种中国科技核心期刊2013年的评价指标。通过对影响因子和总被引频次等指标进行综合评价,《生物工程学报》综合评分列生物工程类核心期刊第一名。

