

真菌对铁皮石斛原球茎酶活性和胞外 pH 的影响*

侯丕勇 郭顺星**

(中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所 北京 100094)

摘要: 小菇属真菌制成诱导子处理铁皮石斛的原球茎, 引起原球茎胞外 pH 分两个阶段升高, 不同方法制作的诱导子对胞外 pH 的影响不同。诱导子还诱导原球茎苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化物酶 (POD) 和脂氧合酶 (LOX) 活性的升高。PAL 和 POD 活性伴随着胞外 pH 的升高, 也呈现两次升高的特点。经过诱导子两次处理的原球茎的 PAL 活性升高尤其明显。

关键词: 小菇属真菌, 诱导子, 铁皮石斛, 原球茎

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0026-04

INFLUENCES OF FUNGUS MYCENAE SP. ON ACTIVITIES OF SOME ENZYMES AND EXTRACELLULAR PH OF PROTOCORMS OF DENDROBIUM CANDIDUM

HOU Pi-Yong GUO Shun-Xing

(Institute of Medical Plant Development, Chinese Academy of Medicine

Science & Peking Union Medicine College, Beijing 100094)

Abstract: An elicitor from fungus *Mycenae* sp. enhanced the extracellular pH of protocorms of *Dendrobium candidum* in two stages and also inspired the activities of PAL, POD and LOX. The different elicitors were different in enhancing the pH. The activities of PAL and POD ascended twice after elicitors were applied. The protocorms treated twice by elicitor had the higher PAL activity.

Key word: *Mycenae* sp., Elicitor, *Dendrobium candidum*, Protocorm

铁皮石斛 (*Dendrobium candidum*) 是药用石斛中的珍品, 野生资源濒临枯竭, 而人工栽培的生长周期很长^[1]。通过组织培养的方法可以大量产生铁皮石斛的胚性发育组织——原球茎, 其生长周期短、适合大规模生产, 多糖含量和一些药理作用接近原药材^[2,3]。近年来关于用原球茎作为替代药材的研究逐渐为人们所重视。为了全面提高原球茎的药用品质, 我们选择与铁皮石斛共生的真菌作为诱导子与铁皮石斛原球茎共培养, 发现一种小菇属真菌对提高原球茎的免疫和抗肿瘤活性有促进作用, 并可以提高石斛总碱含量。有关真菌诱导植物悬浮细胞培养物和幼苗发生防卫反应的报道已有很多^[4,5]。为了探索小菇属真菌对原球茎这一胚性组织作用的生理机理, 本文研究了其对铁皮石斛原球茎几种酶活性和细胞外 pH 的影响, 现将结果报告如下。

* 国家自然科学基金资助项目 (No.30170023)

Project Granted by Chinese National science Fund (No.30170023)

全国优秀博士学位论文作者专项资金项目 (No.199950)

Doctor Degree Special Foundation for Author of Excellent Thesis in Colleges and Universities of China (No.199950)

** 联系人 Tel: 010-62899729, E-mail: sxguo@hotmail.com

收稿日期: 2003-06-05, 修回日期: 2003-09-25

1 材料与方法

1.1 材料

小菇属真菌从云南野生铁皮石斛中分离。原球茎由铁皮石斛种子诱导发生, 继代培养于固体基本培养基 (1/2MS + 20% 马铃薯提取液 + 3% 蔗糖 + 9% 琼脂, pH5.8) 上。另外, 还有 4 种不同培养基上培养的铁皮石斛原球茎也应用于实验, 其中, E 为培养于基本培养基 + 真菌菌丝 (4g 鲜重菌丝/L 培养基) 的原球茎; B 为培养于基本培养基 + BAP (0.2mg/L 培养基) 的原球茎; Hp6 为培养于改动的基本培养基 (pH6.0) 的原球茎; G 为培养于改动的基本培养基 (蔗糖为葡萄糖所替代) 的原球茎。

1.2 真菌诱导子的制备

菌种在 PDA 培养基上活化 1~2 周, 转接到液体麦麸培养基中, 23℃, 120r/min 震荡, 暗培养 2~3 周后收获。将发酵液和真菌菌丝抽滤分离。每 50g 菌丝, 兑入 1L 发酵液制成混合液。混合液匀浆后, 1×10^5 Pa 高压灭菌 30min, 制成诱导子。另外选用培养 5~6 周的菌丝同样制成诱导子; 一部分菌丝阴干后粉碎制成干菌丝诱导子。

1.3 原球茎的培养

固体培养基上的原球茎转接到 67-V 液体培养基中。在 23℃, 转速 120r/min, 散射光条件下培养 35d 后, 将原球茎取出分装到若干 100mL 三角瓶中, 每瓶 6g 原球茎, 再加上新鲜的 pH5.80 的 67-V 液体培养基 40mL, 遮光培养一昼夜后进行实验。

1.4 原球茎胞外 pH 的测量

先测量原球茎培养基的 pH, 选择好测试样本, 然后将制好的诱导子加入。以加入同样量的培养基的处理为对照, 进行实验。将无菌的 pH 电极插入培养基中, 120r/min, 23℃ 暗培养, 分别间隔 0、0.5、6、12、24、48 和 72h 测量并记录培养基的 pH。

1.5 原球茎的酶活测定

POD、PAL 活性测定参照李合生等^[6]的方法。LOX 活性测定参照杨洪强等^[7]的方法。蛋白含量测定用菲林-酚试剂法。POD 以 470nm 波长下, 吸光度增加 0.01 设为一个活性单位 (u), 酶活性用 $u \cdot mg^{-1} \text{ protein} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示; PAL 以 290nm 下, 吸光度增加 0.01 为一个活性单位, 酶活性用 $u \cdot mg^{-1} \text{ protein} \cdot h^{-1}$ 表示; LOX 活性用反应产物共轭双烯的 nmol 数表示为 $nmol \cdot mg^{-1} \text{ protein} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2 结果

2.1 真菌诱导子对原球茎胞外 pH 的影响

在加入真菌诱导子后, 原球茎胞外培养基的 pH 迅速上升, 在 30min 后达到第一个峰值, 每瓶培养基的 pH 大约上升了 0.20 左右, 然后保持稳定而稍微有所回落。处理 24h 后, 胞外 pH 继续上升, 在 48h 左右达到第二个峰值, 然后保持稳定。此阶段 pH 比最初大约升高 0.45 左右。此后, 经过长时间测量, 升高的 pH 不再回落 (图 1)。

2.2 不同真菌诱导子对原球茎胞外 pH 的影响

诱导子的加入量不同, 则原球茎胞外 pH 升高

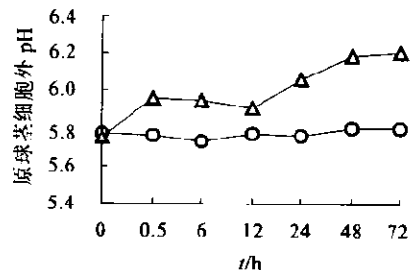


图 1 诱导子对铁皮石斛原球茎胞外 pH 的影响
○ 对照, ▲ 处理

幅度不同。每升培养基加入相当于 10g 鲜重菌丝的诱导子比加入相当于 5g 菌丝的诱导子，引起的诱导作用要强，而培养时间较长的菌丝作诱导子比培养时间较短的真菌作用要强；干菌丝诱导子（用量相当于 5g/L 鲜重的菌丝）的作用比其它诱导子都强（表 1）。

表 1 不同剂量和种类的诱导子处理后原球茎培养基 pH 的变化 (ΔpH)

诱导子处理 时间 (h)	不同的诱导子加入量 (g/L)			不同诱导子 (加入量为 5g/L)		
	CK	5	10	5~6 周的菌丝体	2~3 周的菌丝体	干菌丝 (0.1g/L)
0.5	0	0.18	0.21	0.18	0.18	0.18
24	0	0.24	0.34	0.51	0.24	0.62
48	0	0.33	0.54	0.78	0.33	1.23

2.3 真菌诱导子对原球茎脂氧合酶活性的影响

脂氧合酶 LOX 是合成茉莉酸、脱落酸和乙烯等植物生长和抗逆反应调节物质的酶，与诱导作用有着密切的关系。如图 2 所示，诱导子处理原球茎后，LOX 活性缓慢升高，在诱导作用发生 24h 后，达到高峰，然后缓慢回落。

2.4 真菌诱导子对原球茎过氧化物酶活性的影响

诱导子加入后，原球茎的 POD 活性随着时间变化的情况。诱导子处理原球茎 6h 左右，POD 活性就上升达到高点，但在诱导子处理 24h 后又回落到正常的水平，但随后又升高，在 36h 左右，达到更高的活性水平，然后又迅速回落到正常的水平（图 3）。

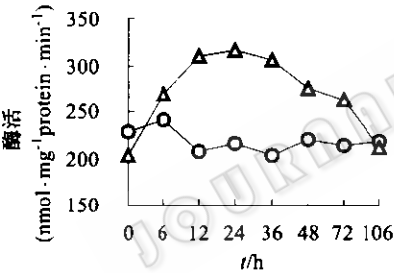


图 2 诱导子对铁皮有解原球茎胞外 LOX 的影响
○ 对照, ▲ 处理

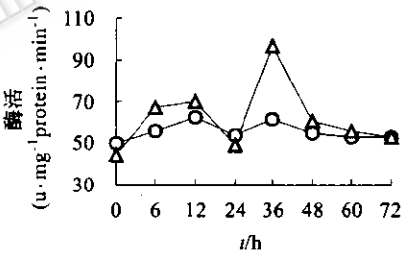


图 3 诱导子对铁皮有解原球茎胞外 POD 的影响
○ 对照, ▲ 处理

2.5 真菌诱导子对原球茎 PAL 活性的影响

PAL 是植物苯丙烷生物合成途径中的第一个酶，控制着多种与植物生长和代谢以及抗逆反应相关化合物的合成。原球茎的 PAL 活性在诱导子加入后先小幅上升，然后迅速回落，降低到比正常情况还要低的水平。在诱导作用发生 48h 左右，PAL 活性又迅速大幅度地上升，达到比正常水平高 1.5 倍的程度，比第一次的活性升高水平也要高 1 倍。但 PAL 的高活性不能够维持，经过短暂升高后，又迅速回落（图 4）。

2.6 真菌诱导子对不同来源的原球茎的 PAL 的影响

在同一反应条件下，不同固体培养基上取材的原球茎 PAL 活性表现不同。其中，在固体培养基上经过真菌诱导子诱导的原球茎 E，在液体培养基中再次诱导后，其 PAL 活性水平比对照（在基本培养基上取材的原球茎）和其它原球茎都高。而其它培养基上取材的原球茎（G、B 和 Hp 6）都比对照原球茎的 PAL 水平低（图 5）。

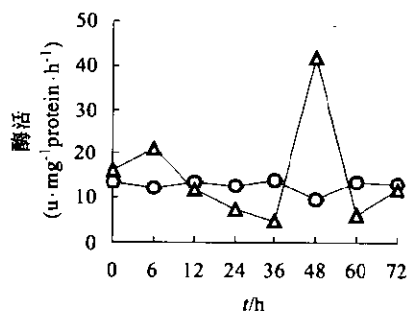


图 4 诱导子对铁皮石斛原球茎 PAL 的影响

○—对照, △—处理

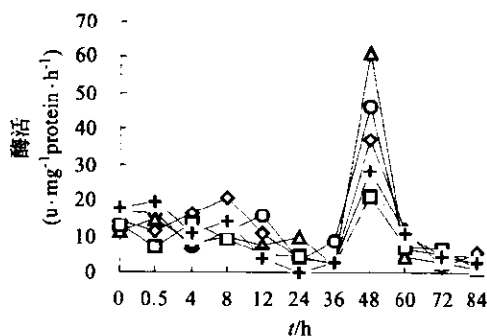


图 5 诱导子对不同原球茎的 PAL 的影响

○—对照, △—E, ◇—G, □—B, +—Hp6

3 讨论

小菇属真菌制成的诱导子加入液体培养的铁皮石斛原球茎的培养基后, 能够诱导培养基 pH 的分两个阶段升高, 也能够诱导 LOX、POD 和 PAL 活性的升高。

诱导子引起植物培养基的 pH 升高是细胞内质子外流的结果^[5]。细胞通过改变细胞内外环境的 pH 来激活的酶, 在体内合成植保素等物质来增强植物抵抗病害的能力^[8]。在诱导子作用初期, LOX、PAL 和 POD 的激活与胞外 pH 的上升是同步的。但随着 pH 停止上升, POD 和 PAL 也不再活跃, 而呈现下降的趋势。当胞外 pH 恢复上升后, POD 和 PAL 活性又再次上升。POD 在植物中合成细胞壁物质的过程中起着重要的作用^[9], 而 PAL 是调控合成植保素和木质素重要的酶^[4]。显然, 本研究中出现原球茎胞外 pH 与 POD 和 PAL 的关联现象表明: 诱导作用中的质子流动与细胞壁物质以及植保素的合成密切相关; 细胞的环境中的 pH 变化越大, 诱导产生的 POD 和 PAL 的活性也越大。环境中的 pH 可能是调节细胞合成抵抗病害物质的关键因素。Lox 与信号分子茉莉酸的合成有关。Lox 与原球茎环境 pH 变化的协同性较差, 当环境 pH 升到最高, Lox 活性反而开始下降。

因此, 可以将诱导子对原球茎的作用过程作如下的假设: 诱导子作用初期, 原球茎的表面细胞受诱导的激发产生防卫反应, 调节体内外的 pH, 激活合成酶, 合成体内系统抗性信号茉莉酸等物质; 随着诱导子信号的持续刺激, 茉莉酸等信号物质不断合成, 最终达到植物调控的阈值, 从而引发原球茎体内全体细胞的防卫反应, 使原球茎产生系统性抗性, 调控胞外 pH 的继续升高, 最终导致 POD 和 PAL 活性大幅度提高, 抗性物质被大量合成。

参考文献

- [1] 傅立国, 金鉴明. 中国植物红皮书——稀有濒危植物. 北京: 科学出版社, 1992. 492~493.
- [2] 黄民权, 黄步汉, 蔡体育, 等. 中草药, 1994, 25 (3): 128~129.
- [3] 高建平, 金若敏, 吴耀平, 等. 中药材, 2002, 25 (7): 487~489.
- [4] 王均. 植物抗病反应的分子机理. 见余叔文等主编. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1998. 784~804.
- [5] Mathieu Y. Planta, 1996, 199: 416~424.
- [6] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000. 164, 213.
- [7] 杨洪强, 贾文锁, 张大鹏. 植物学报, 2000, 42 (3): 244~248.
- [8] Hagendoom M J M. Plant Physiol, 1994, 106: 723~730.
- [9] Grisebach H. In: Conn E E. The Biochemistry of Plant. New York: Academic Press, 1985. 451.