

真菌 B-39 与虎杖悬浮细胞的共培养*

唐永红^{1,2} 曹庸^{2,3**} 黄早成² 卢成英²

(吉首大学生物资源与环境科学学院 吉首 416000) (吉首大学,湖南省林产化工工程重点实验室 张家界 427000)
(华南农业大学食品学院 广州 510642)

摘要 :初步探讨了虎杖来源真菌 B-39 与虎杖悬浮细胞之间的共培养关系及其白藜芦醇的积累特征。通过肉眼和光学显微镜观察真菌 B-39 与虎杖悬浮细胞的形态结构及生长情况,并用 HPLC 检测其白藜芦醇的积累特征,结果表明,两者均能在共培养体系中正常生长,且生长量可达 4.908g,但白藜芦醇的含量下降了 50 μ g/mL,而真菌接种量的大小可与虎杖悬浮细胞共培养建立一种动态平衡体系,由此推测真菌 B-39 与虎杖悬浮细胞可能为共生状态。

关键词 :真菌,虎杖悬浮细胞,共培养,微生态,白藜芦醇

中图分类号:Q949.240.8 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0545-04

Dual Culture of Fungus and Suspension *Polygonum cuspidatum* Cell*

TANG Yong-Hong^{1,2} CAO Yong^{2,3**} HUANG Zao-Cheng² LU Cheng-Ying²

(College of Biological Resources and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000)
(Key Laboratory for Forest Products and Chemical Industry Engineering of Hunan, Zhangjiajie 427000)
(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract :To study the dual culture relationship of fungus B-39 from *Polygonum cuspidatum* and suspension *Polygonum cuspidatum* cell and their accumulated features of resveratrol, the morphology and growth status of fungus B-39 and suspension *P. cuspidatum* cell and the resveratrol accumulated features were investigated. The results showed that they could normally grow in the dual culture system, and the growth of the dual cultural group was 4.908 g, but the content of resveratrol was reduced to 50 μ g/mL. A dynamic balanced system was established through controlling the fungal inoculums. It is presumed that fungus B-39 and suspension *P. cuspidatum* cell could be a balanced antagonism.

Key words :Fungi, Suspension *Polygonum cuspidatum* cell, Dual culture, Micro-ecology, Resveratrol

关于共生状态的植物与微生物的研究,国内外学者主要集中在微生物在生物防治方面的作用以及微生物所产生的次生代谢物^[1,2],而对于微生物与植物在长期协同进化过程中彼此构成的稳定生态关系的认识上,则不同学者有不同的见解,有的将其描述为与植物互惠互利的共生关系;有的认为是特殊的寄生关系,这种寄生一般不引起植物的相关病症,而当植物衰老或受到环境胁迫时又会变成病原菌而引起植物病害,即微生物和植物之间是一种处于动态平衡的拮抗关系^[3]。根据微生物与植物的亲和关系,可将其分为专一性和非专一性^[4]。为进一步了解微生物与植物共生关系的生理特点、

发生机理与规律,寻找利用微生物与植物共培养来提高相关高价值次生代谢物质的工业化生产的可能性途径,对真菌 B-39 与虎杖悬浮细胞进行共同培养,并对共培养的生物量以及虎杖悬浮细胞中的白藜芦醇积累特征进行了研究。

1 材料

1.1 菌种

真菌 B-39(*Penicillium. chrysogenum*),分离于虎杖愈伤组织培养过程。菌种由湖南省林产化工工程重点实验室卢成英教授鉴定。

* 湖南省科技厅资助项目(No. 03JZY3020),福特基金项目(No. 07JDPHE028)

** 通讯作者 Tel: 020-85753983, E-mail: caoyong2181@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-11-20,修回日期:2007-01-31

1.2 主要培养基

MS 液体培养基,马铃薯培养基。

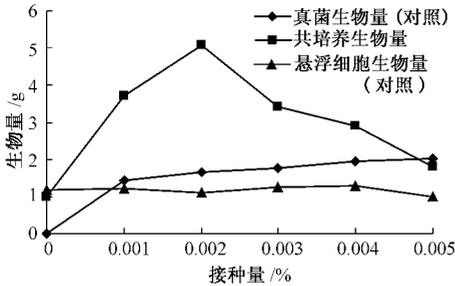


图1 共培养中不同接种量的生长代谢特征

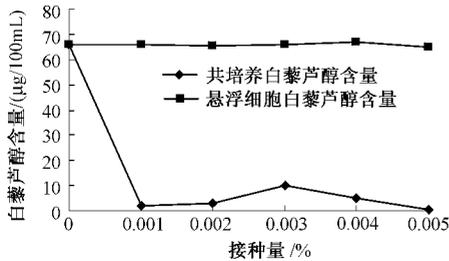


图2 共培养中不同接种量的白藜芦醇代谢特征

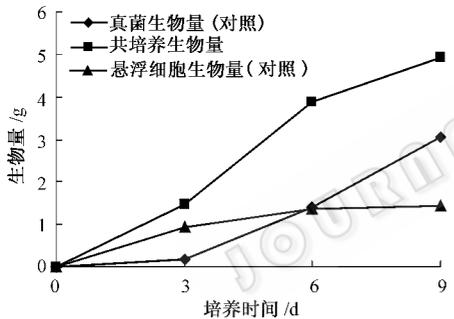


图3 共培养中不同培养时间的生长代谢特征

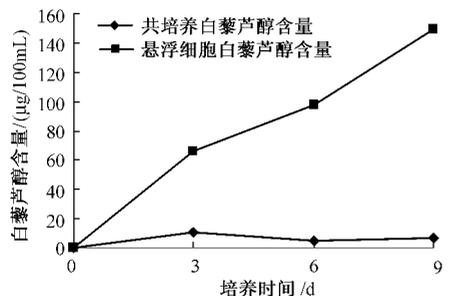


图4 共培养中不同培养时间的白藜芦醇代谢特征

1.3 主要试剂

乙腈,甲醇,乙酸乙酯, HgCl_2 (均为分析纯)。白藜芦醇标准对照品 (Sigma 公司 99%)。

1.4 主要仪器

高效液相色谱仪 (日本岛津 LC-90A), 往复式振荡培养箱 (IK41), 万分之一分析天平 (AEG-220), 人

工气候箱 (中国广东 LRH-250GS), 旋转蒸发仪 (RE540-AW 型), 倒置显微镜 (日本 IMT2-11)。

2 方法

2.1 虎杖悬浮细胞的准备^[5]

选取健壮无病的虎杖植株根茎芽,洗净、晾干表面水,75%酒精消毒 30s 冲洗 1 次,再用 0.1% HgCl_2 溶液消毒 10min 冲洗 7 次后晾干,切成 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 的小块,作为诱导愈伤组织的外植体,接入 MS 固体培养基,在 25°C , 1200 Lx 下进行培养,每 20 d 继代一次。将 45g/L 虎杖愈伤组织置于 MS 液体培养基后,于 25°C , 80r/min 往复式振荡式培养箱培养 12d 得悬浮培养细胞。以上操作均在超净工作台内进行,无菌生理盐水冲洗。

2.2 菌种的活化及孢子液的制备

取冰箱中冷藏的菌种接于马铃薯固体平板培养基上 28°C 下培养 5d,再经过数次平板转接活化。将接有菌种的平板培养 5d 后,孢子用灭菌生理盐水洗下,50000r/min 离心 5min,沉淀加灭菌生理盐水悬浮使孢子含量为 10^5 cells/mL ~ 10^6 cells/mL^[6]。

2.3 基本参数的检测

2.3.1 生长量的测定:采用定量滤纸抽滤后称重。

2.3.2 白藜芦醇的提取及检测:发酵液取出后,超声波处理 30min 以使其细胞壁破碎,再按照参考文献 [7] 白藜芦醇提取及检测。采用面积归一法计算样品的含量。

2.4 真菌 B-39 与虎杖悬浮细胞共培养生长状态的观察

装有虎杖悬浮细胞的培养皿^[8,9]中添加 0.1% 的真菌 B-39 孢子液,石蜡密封后于 26°C , 100r/min 下培养 7d,每隔 24h 取样观察。目测观察培养液、悬浮细胞、菌体颜色、悬浮细胞的分散程度等,再将培养物摇匀,用移液枪吸取 0.05mL,用 0.5% Trypan Blue 染色 1min 在光学显微镜下观察细胞团数、破裂细胞数、死亡细胞数 (染成蓝色)、畸形细胞数、正常细胞数 (不着色)、细胞颜色、碎片多少等情况。

2.5 真菌 B-39 接种量对共培养的影响

依次取 0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 的真菌 B-39 孢子液,分别接种到 MS 液体培养基中,每组均添加 1g 虎杖悬浮细胞,设相应接种量的真菌 B-39 虎杖悬浮细胞为空白对照组,于 26°C

100r/min 下培养 7d 取出样品,测出其生物量和白藜芦醇含量。

2.6 共培养中不同培养时期的代谢特征

将已配制好的 MS 培养液分为 9 组,3 组为真菌对照组,加入 0.2% 孢子液,3 组为虎杖悬浮细胞对照组,加入 1g 虎杖悬浮细胞,3 组为真菌 + 虎杖悬浮细胞实验组,加入 0.2% 孢子液和 1g 虎杖悬浮细胞,于 26℃,100r/min 下分别培养 3d、6d、9d 后取出样品,测出其生物量和白藜芦醇含量。

3 结果与分析

3.1 真菌 B-39 的不同接种量对共培养的影响

当孢子液接种量 $\geq 0.3\%$ 时,共培养组的总生物量下降;而当孢子液接种量为 $\leq 0.2\%$ 时,共培养组的总生物量上升,尤其是接种量为 0.2% 时,共培养组的生长最好,生物量最大(图 1)。但在共培养体系中,白藜芦醇的含量比对照组有明显下降,接种量为 0.3% 时,其含量比对照组下降了约 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 2)。由此推测,菌株接种量的大小能决定其在特定生存环境下是否能够迅速成为抢占空间与食物的优势种,是否能与虎杖悬浮细胞势均力敌,竞争力相当,同时还影响着虎杖悬浮细胞的生长、分裂与分化的速度及各自的新陈代谢,因此共培养微生物生态体系中充满了和谐与竞争。

3.2 共培养中不同培养时期的代谢特征

共培养组共同培养 3d、6d、9d 后发现,随着时间的延长,共培养组生长旺盛,生物量增加;共培养 9d 后,共培养体系还处于一种稳定状态(图 3)。虽单一培养虎杖悬浮细胞或真菌 B-39 的对照组生物量相对较小,但白藜芦醇的含量均是单一培养虎杖悬浮细胞的对照组最高(图 4)。

3.3 真菌 B-39 与虎杖悬浮细胞共培养的形态观察

根据肉眼直接观察和显微镜观察表明(表 1):随着时间的推移,无论是实验组还是对照组,虎杖悬浮细胞颜色逐渐由淡黄色变为黄褐色或棕褐色,细胞死亡率、细胞破裂率、细胞畸形率均呈上升趋势,而且在 $P < 0.05$ 水平上均无显著性,但正常活细胞率为 65% ~ 70% 左右,居主导地位。在培养初、中期,共培养组的细胞死亡率、细胞破裂率、细胞畸形率均呈上升趋势,但在培养后期,这三个因子的数值起伏不大,可能由于微生物的入侵起初对植物细胞的生存有一定抑制作用,后期两者则趋于稳定。和对照组相比,共培养组的细胞团数在培养过程中普遍较高,可能由于真菌菌丝体在培养过程中能够迅速生长,快速繁殖,且将虎杖悬浮细胞紧紧包裹,使得细胞团无法分开,并且 7d 后肉眼几乎看不见有游离状态的虎杖悬浮细胞。而对照组随着振荡时间的推移,细胞团平均数明显下降(图 5、6)。

表 1 真菌 B-39 与虎杖悬浮细胞共培养的悬浮细胞生长情况($\bar{x} \pm s, n = 7$)

试验组 Groups	细胞畸形率 Abnormality rate of cells	细胞破裂率 Breaking rate of cells	细胞死亡率 Death rate of cells	细胞团数 Number of cell mass
虎杖悬浮细胞 + 真菌 B-39 Suspension cell and B-39 fungus	9.34 ± 1.57	7.79 ± 3.22	10.04 ± 2.89	14.64 ± 0.35
虎杖悬浮细胞 Suspension <i>Polygonum cuspidatum</i> cell	7.93 ± 1.54	4.23 ± 2.52	9.98 ± 2.74	8.53 ± 4.88

注:以上 4 个因素在 $P < 0.05, P < 0.01$ 水平上均无显著性

4 讨论

通过实验研究发现,在真菌 B-39 与虎杖悬浮细胞共培养的过程中,两者均能正常生长且相互促进生长。此实验结果与 Sieber 等^[10]对大叶槭(*Acer macrophyllum*)愈伤组织与其内生菌双重培养的研究结果有些不同。他们发现,寄主愈伤组织的存在对内生菌的生长具有明显促进作用,相反,内生菌则对寄主愈伤组织的生长产生抑制作用。Peters 等^[8]研

究的 3 种内生菌与其寄主及非寄主植物愈伤组织共培养时的相互作用,也得出与他们同样的结果。虽本实验结果与之有所不同,但由此可以推测,在共培养期间由于植物细胞在生长时会分泌真菌生长所需要的物质,而真菌在利用植物细胞外分泌物的同时,相应地产生了 CO_2 、无机营养、以及生长因子等,从而改善了植物细胞的微环境,促进了植物细胞的生长,使其生物量增加。

根据 Schulz 等人通过对落叶松和大麦两种植物

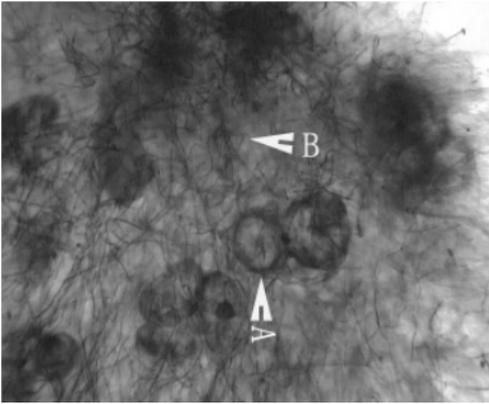


图5 共培养的显微图片(×100)

注:A 共培养中的虎杖悬浮细胞,B 被0.5% Trypan Blue 染成蓝色的真菌 B-39 菌丝体。

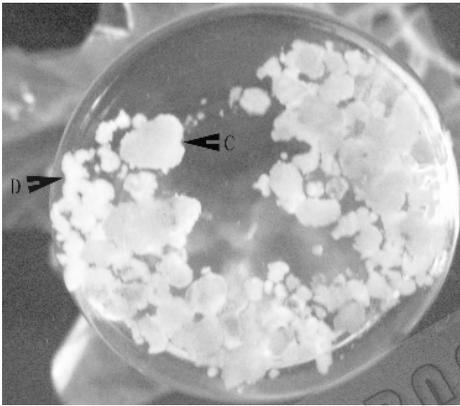


图6 共培养的生长图片

注:C 被真菌 B-39 菌丝体包裹的虎杖悬浮细胞,D 共培养中的真菌 B-39 菌丝体团

的内生菌及病原菌感染引起的寄主防卫性次生产物以及大量内生菌次生产物的分析,结合内生菌与寄主愈伤组织共培养等一系列研究结果的分析发现,内生菌能产生对寄主有毒害的次生产物,内生菌的侵染同样会引发宿主的防卫反应^[9]。本实验结果与之有相似之处,真菌 B-39 对虎杖次生代谢产物白藜芦醇也有一定的抑制作用,使其共培养中的白藜芦醇含量降低。在共培养过程中,真菌 B-39 可能通过自身的代谢产物或存在本身借助于信号

传导作用对虎杖悬浮细胞施加影响,使虎杖悬浮细胞产生了抑制虎杖次生代谢产物白藜芦醇产生的负面作用。

从植物和内生菌的生态系统来看,植物体本身可以看作是一个复杂的生态系统。在这个系统中,各种不同的内生菌之间能建立一种动态的平衡体系,并且植物体就可以看作是一个由自身的活体组织和定殖在体内的内生菌共同构成的生态体系,而且在植物生活史的整个过程中维持着动态平衡^[11]。由此初步推测,真菌 B-39 与虎杖悬浮细胞之间是处于一种平衡态的拮抗关系。

本研究为模拟植物和内生菌的生长环境来探索其复杂的微生态关系奠定了基础,为寻找利用微生物与植物共培养来提高相关高价值次生代谢物质的工业化生产的可能性途径提供了依据。

参考文献

- [1] Ahlholm J U, Helander M, Henriksson J, *et al.* Evolution Int J Org Evolution, 2002, Aug, **56**(8): 1566 ~ 1573.
- [2] 唐永红, 曹庸, 卢成英, 等. 微生物学通报. 2006, **33**(4): 164 ~ 167.
- [3] Siciliano S D, Fortin N, Mihoc A, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2001 Jun, **67**(6): 2469 ~ 2475.
- [4] Easton H S, Latch GC, Tapper BA, *et al.* Crop Sci, 2002, Jan, **42**(1): 51 ~ 57.
- [5] 周立刚, 郑光植. 生物工程进展. 1991, **11**(1): 29 ~ 34.
- [6] 张菊梅, 吴清平, 吴慧清, 等. 微生物学通报. 2006, **33**(4): 100 ~ 105.
- [7] 曹庸, 于华忠, 张敏, 等. 林产化学与工业. 2004, **24**(2): 61 ~ 64.
- [8] Peters S, Draeger S, Aust H J, *et al.* Mycologia, 1998, **90**: 360 ~ 367.
- [9] Schulz B, Rommert A K, Dammann U, *et al.* Mycol Res, 1999, **103**: 1275 ~ 1283.
- [10] Sieber T N, Sieber-Canavesi F, Dorworth C E. Mycologia, 1990, **82**: 569 ~ 575.
- [11] Curtin M E. Biol Tech, 1983, **1**: 649 ~ 657.