文章编号:1000-7601(2019)03-0060-06 **doi**:10.7606/j.issn.1000-7601.2019.03.07

苦豆子内生真菌诱导子促进宿主生物碱合成积累的生理防卫反应

孙牧笛[1],胡丽杰[1],李文学[1],闫思远[1],张　众[2],顾沛雯[1]

(1.宁夏大学农学院,宁夏 银川 750021;2.宁夏大学葡萄酒学院,宁夏 银川 750021)

摘　要:分别以 4 株苦豆子内生真菌菌液浓缩物为诱导子,研究不同诱导时间下,各诱导子对苦豆子组培苗中氧化苦参碱(OMA)含量以及防御酶苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和过氧化氢酶(CAT)活性的影响。结果显示:4 种苦豆子内生真菌的菌液浓缩物均可提高宿主中 OMA 的积累,其中诱导效果最佳的是内生真菌诱导子 $XKYKDF_{40}$,在 0~15 d 诱导期间宿主中 OMA 含量持续增长且始终高于对照,在诱导第 15 d 达到最高,为 3.616 mg·g^{-1},是同时期对照组的 2.09 倍。4 种内生真菌诱导子还可诱发宿主中生物碱合成关键酶 PAL 和 3 种抗氧化酶(POD、APX 和 CAT)活性升高。诱导子 $XKYKDF_{40}$激发 PAL 活性的作用最佳,在诱导第 6 d PAL 活性达最大值,为 61.92 U·g^{-1},是同时期对照组的 1.42 倍;与其他诱导子相比,诱导子 $XKZKDF_{27}$能够明显诱发 POD 的活性,在诱导第 12 d 达到最大值,为 62.30 U·mg^{-1},是同时期对照组的 2.70 倍;诱导子 $XKZKDF_{11}$可诱导宿主中的 APX 和 CAT 活性大幅度提高,在诱导第 12 d 酶活性达到最高,分别为 0.5538 U·mg^{-1}和 19.82 U·mg^{-1},是同时期对照组的 4.97 倍和 3.00 倍。结果表明,苦豆子内生真菌诱导子的加入不仅激活了宿主组培苗的防御性应答反应,还促进了 OMA 的合成。

关键字:苦豆子;内生真菌诱导子;氧化苦参碱; 防御酶活性;组培苗

中图分类号:Q939.96;S567　　**文献标志码**:A

Physiological defense response of promoting synthesis and accumulation of host alkaloid by endophytic fungal elicitors in *Sophora alopecuroides* L.

SUN Mu-di[1], HU Li-jie[1], LI Wen-xue[1], YAN Si-yuan[1], ZHANG Zhong[2], GU Pei-wen[1]

(1.*Agricultural College*, *Ningxia University*, *Yinchuan*, *Ningxia* 750021, *China*;
2. *Wine College*, *Ningxia University*, *Yinchuan*, *Ningxia* 750021, *China*)

Abstract: Four species of endophytic fungi were isolated from *Sophora alopecuroides* L., and their concentrated filtrates were prepared as the fungal elicitors. The effects of different endophytic fungal elicitors at different induction time on the content of oxymatrine (OMA) and the activities of phenylalanine(PAL), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in the tissue culture seedlings of *S. alopecuroides* L. were investigated. The results showed that culture broth concentrates from 4 species of endophytic fungi of *S. alopecuroides* L. obviously improved the content of OMA in tissue culture seedlings of *S. alopecuroides* L. Among them, culture broth concentrates of the endophytic fungi $XKGKDF_{40}$ was most effective with 0~15 d of induction, OMA content in tissue culture seedlings of *S. alopecuroides* L. continuously increased, compared with the control, and reached the maximum of 3.616 mg·g^{-1} on the 15th day, which was 2.09 times that of the control group with the same induction time. Culture broth concentrates from 4 species of endophytic fungi of *S. alopecuroides* L. induced increase in activity of important PAL enzyme in alkaloid synthesis of tissue culture seedlings of *S. alopecuroides* L., and promoted the activities of antioxidant enzymes, such as POD, APX and CAT. The endophytic fungi $XKGKDF_{40}$ was the most efficient elicitor on PAL activation, the enzyme activity reached a peak of 61.92 U·g^{-1} at 6th day af-

收稿日期:2018-05-24　　**修回日期**:2019-04-18

基金项目:国家自然科学基金项目(31260452;31460484)

作者简介:孙牧笛(1991-),女,陕西榆林人,硕士研究生,研究方向为生物防治与菌物资源利用。E-mail:1169158591@qq.com

通信作者:顾沛雯(1969-),女,四川绵阳人,教授,主要从事生物防治与菌物资源利用研究。E-mail:gupeiwen2013@126.com

ter induction, which was 1.42 times that of the control group at the same induction time; Compared with other elicitors, the elicitor $XKZKDF_{27}$ could induce POD activity significantly, after the induction in 12th day, POD activity reached the maximum of 62.30 U · mg^{-1}, which is 2.70 times that of the control group at the same induction time; The elicitor $XKZKDF_{11}$ also greatly improved the activities of APX and CAT in tissue culture seedlings of *S. alopecuroides* L., the enzyme activities reached the highest activity at the 12th day of induction (0.5538 U · mg^{-1} and 19.82 U · mg^{-1}), which were 4.97 times and 3.00 times that of the control group at the same period respectively. The results indicated that the addition of endophytic fungal elicitors from *S. alopecuroides* L. not only activated the defensive response of the host tissue culture seedlings, but also promoted the synthesis of OMA of *S. alopecuroides* L..

Keywords: *Sophora alopecuroides* L.; endogenous fungal elicitors; oxymatrine; defense enzyme activity; tissue culture seedling

植物内生真菌是生长于植物体内,与宿主植物互利共生的一类微生物,内生真菌诱导子作为一种特殊的外源诱导子,可以通过信号传导途径,诱发植物自身的防御反应,调节次生代谢途径中某些关键酶活性,从而高效、快速、专一地调控某些次生代谢物的合成[1-3]。将真菌诱导子作用于植物培养物,通过激活植物防御而促进次生代谢物的合成是目前提高植物次生代谢物产率最有效的技术手段之一[4]。

植物次生代谢产物的合成与积累是植物应对外界胁迫所产生的防御反应的一个分支,因此植物的防御反应与植物次生代谢产物的合成关系密切[5]。防御酶活力的提高在一定程度上代表着植物细胞次级代谢的增强,酶活性的提高有利于植物中次生代谢产物的合成和积累[6]。李培琴等[7]利用盾叶薯蓣内生真菌 *Berkleasmium* sp. Dzf 12 寡糖诱导子,明显促进了盾叶薯蓣培养物中苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)的活性升高。王梦亮等[8]通过向红景天组培苗中添加内生真菌的提取物,不仅诱发红景天苷合成途径中关键酶 PAL、酪氨酸脱羧酶(TAL)和肉桂酸-4-羟化酶(CA4H)活性升高,还促进了红景天苷的合成积累。

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)系豆科(Leguminosae)槐属多年生草本植物,主要分布于我国的西北荒漠地区及中亚细亚一带,是我国干旱荒漠区具有保土固沙作用的重要自然植被,同时也是中医药领域中重要的沙生药用植物资源[9]。喹诺里西啶(Quinolizidine,QAs)类生物碱是其重要的生物活性成分,其中的氧化苦参碱(Oxymatrine,OMA)在保肝、抗炎抗敏、抗肿瘤及抗心律失常等方面有重要的药理活性,在杀虫抗菌等方面也有着重要的作用[10]。近年来,由于人们对苦豆子 OMA 等原料药的需求量逐渐增加,野生苦豆子资源乱采滥掘日益猖獗,苦豆子野生自然资源面临着逐渐枯竭的危险。本课题组在前期实验中从宁夏野生苦豆子中筛选获得了可产生 QAs 生物碱的内生真菌[11],并以苦豆子内生真菌产碱菌株、优势菌株和高活性抑菌菌株的灭活菌丝和菌液浓缩物为诱导子,发现菌液浓缩物能明显提高宿主培养物中 QAs 生物碱的合成积累[12],本研究在此基础上,以苦豆子组培苗为对象,以 4 株高活性苦豆子内生真菌的菌液浓缩物为诱导子,分析其对苦豆子组培苗中 OMA 合成和防御酶活性的影响,探究内生真菌促进生物碱合成积累的生理防卫反应机制。

1　材料与方法

1.1　材　料

植物材料:苦豆子豆荚采自宁夏白芨滩自然保护区,经宁夏大学农学院李小伟副教授鉴别证明为 *Sophora alopecuroides* L.。

苦豆子内生真菌菌株:本实验室筛选得到 4 株高活性苦豆子内生真菌(表 1),分别为菌株 $XKZKDF_{11}$,菌株 $XKZKDF_{27}$,菌株 $XKYKDF_{40}$ 和菌株 $NDZKDF_{13}$。

表 1　供试苦豆子内生真菌菌株

Table 1　Endophytic fungi of *S. alopecuroides* L. for trial

菌株号 Fungi number	鉴定种类 Species	功能 Function
$XKZKDF_{11}$	芬芳镰刀菌 *Fusarium redolens*	产喹诺里西啶生物碱菌株 Fungus producing quinolizidine alkaloids
$XKYKDF_{40}$	外瓶霉 *Exophiala sp.*	产喹诺里西啶生物碱菌株 Fungus producing quinolizidine alkaloids
$XKZKDF_{27}$	三线镰刀菌 *Fusarium tricinctum*	高抑菌活性菌株 Highly bacteriostatic fungus
$NDZKDF_{13}$	细极链格孢 *Alternaria tenuissima*	优势菌株 Dominant fungus

主要试剂:氧化苦参碱 OMA 标准品(批号:B21470)购自上海源叶生物技术有限公司,苯丙氨酸解氨酶(PAL)试剂盒、抗坏血酸过氧化物酶(APX)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒、过氧化物酶(POD)试剂盒、BCA 法微量蛋白检测试剂盒,以上试剂盒皆购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方 法

1.2.1 苦豆子组培苗的培养 按高媛等[12]的方法培养苦豆子组培苗。饱满健康的种子经过 80%浓硫酸(V/V)软化种皮和 5%次氯酸钠(V/V)消毒处理后,暗培养 24 h,每天连续光照 12 h,培育 5 d 后用 5%次氯酸钠(V/V)再次对幼苗消毒,接种于 MS 培养基上。培养条件为:25℃,每天连续光照 12 h,光强为 1 000 lx,组培苗每 25 d 继代 1 次。

1.2.2 内生真菌诱导子的制备与添加 真菌诱导子的制备参照 Farmer[13]的方法,将内生真菌菌株接种于马铃薯葡萄糖液体培养基中,25℃,150 r·min^{-1}恒温摇床中暗培养 7 d,对获取的菌株发酵液进行抽滤,分离得到菌液后,经过减压浓缩,获得菌液浓缩物。真菌诱导子的浓度以多糖浓度为标准,向组培苗的 MS 培养基中添加一定量的菌液浓缩物,使培养基中多糖浓度为 1.00 mg·L^{-1},高压灭菌后备用。以不加诱导子组培苗为对照,25℃培养,各处理组每天连续光照 12 h,光强为 1 000 lx,包括添加诱导子当天在内每 3 d 取 1 次样本,共取样 6 次,液氮速冻后,-80℃保存。

1.2.3 苦豆子组培苗中 OMA 含量测定

(1)苦豆子组培苗中 OMA 的提取。称取 0.5 g 苦豆子组培苗子叶,加入 2 mL 无水乙醇充分研磨,常温水浴超声处理 30 min,置于 4℃冰箱过夜浸提,于 25℃ 8 000 g 离心 10 min,取上清液于新离心管中,氮吹后,用流动相定容至 1.5 mL,0.45 μm 滤膜过滤后,即为样品制备液,于 4℃冰箱中保存,待测。

(2)色谱柱条件。色谱柱:Kromasil C18 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.037 mol·L^{-1}磷酸缓冲液(H_3PO_4=3.65 g·L^{-1})-甲醇(90∶10,V/V);紫外检测波长:216 nm;柱温:30℃;流速:1.0 mL·min^{-1}(见图 1)。

(3)OMA 标准曲线的建立。精确称量 OMA 标准品 2.0 mg,用流动相溶解定容至 1 mL,配制浓度为 2 mg·mL^{-1}的标准贮备液。精密吸取标准贮备液,梯度稀释成质量浓度为 2 000、1 000、500、200、100 mg·mL^{-1}和 50 mg·mL^{-1}的标准品溶液。按上述的色谱条件,吸取标准品溶液进样,每次进样 10 μL,以质量浓度为横坐标(x),以峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,绘制标准曲线,其回归方程为:$y=794.9x+11713.2$,$R^2=0.9990$,表明氧化苦参碱浓度在 0.002~2.000 mg·mL^{-1}范围内,峰面积线性关系良好。

(4)OMA 含量测定。精密量取待测样品制备液 10 μL 进样,在相同色谱条件下检测,根据标准曲线计算待测样品 OMA 含量,其单位为 mg·g^{-1}。

1.2.4 苦豆子组培苗中防御酶的活性测定 以不加诱导子的组培苗为对照组,4 种内生真菌诱导子处理的苦豆子组培苗为处理组,分别测定不同处理组不同诱导天数的组培苗中 PAL、POD、APX、CAT 活性,每个处理重复 3 次。

(1)PAL 活性测定。按照 PAL 测定试剂盒说明书进行操作。参照宛伟国等[14]的方法,按样本鲜重计算,以每克组织在每 mL 反应体系中每分钟使 290 nm 吸光度变化 0.1 为一个酶活力单位。

(2)POD 活性测定。按 POD 检测试剂盒说明书进行操作。参照魏池泉[15]的方法,按照样本蛋白浓度计算:以每毫克组织蛋白每分钟催化 1 μg 底物的酶量为一个酶活力单位。样本可溶性蛋白含量按照 BCA 法微量蛋白检测试剂盒说明书进行测定。

(3)抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的测定。按 APX 检测试剂盒说明书进行操作。参照孙云[16]的方法,按照样本蛋白浓度计算:以每毫克组织蛋白每分钟氧化 1 μmol 抗坏血酸(AsA)的酶量作为一个酶活性单位。样本可溶性蛋白含量按照 BCA 法微量蛋白检测试剂盒说明书进行测定。

(4)过氧化氢酶(CAT)活性测定。按 CAT 检测试剂盒说明书进行操作。参照朱小文[17]的提取方法,以每毫克组织蛋白每秒钟分解 1 μmol H_2O_2的量为一个活力单位。样本可溶性蛋白含量按照 BCA 法微量蛋白检测试剂盒说明书进行测定。

2 结果与分析

2.1 不同内生真菌诱导子对苦豆子组培苗 OMA 含量的影响

由图 2 可知,4 种内生真菌诱导子在不同程度上均能提高苦豆子组培苗中 OMA 的含量,其中产碱菌株 $XKYKDF_{40}$的诱导效果最好,苦豆子组培苗中 OMA 含量增加较为明显,在诱导第 15 d 达到最高,为 3.616 mg·g^{-1},是对照组第 15 d 的 2.09 倍。内生真菌诱导子 $XKZKDF_{11}$与诱导子 $XKYKDF_{40}$的诱导趋势相似,在 0~15 d 诱导期间 OMA 含量持续

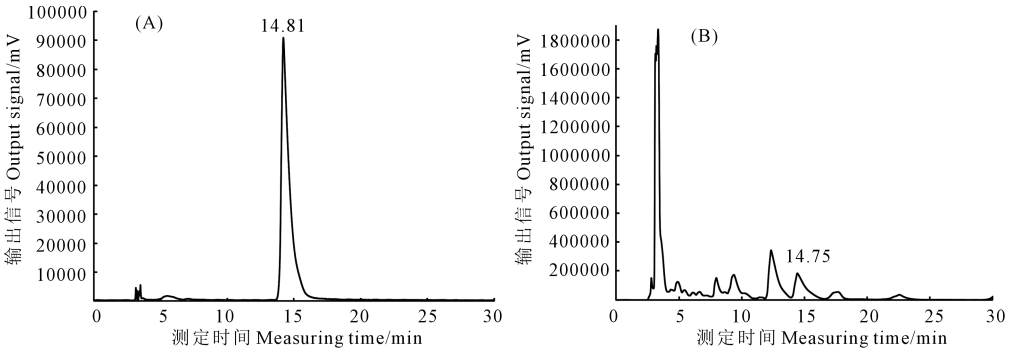

图 1　氧化苦参碱标准品(A)和苦豆子组培苗中氧化苦参碱(B)的 HPLC 检测色谱图

Fig.1　HPLC chromatograms of OMA standard (A) and OMA of *S. alopecuroides* L. tissue culture (B)

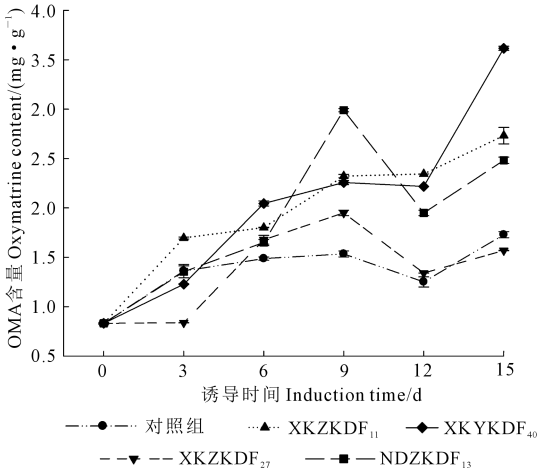

图 2　苦豆子内生真菌诱导子在不同诱导时间下对宿主 OMA 含量的影响

Fig.2　Effects of endophytic fungal elicitors from *S. alopecuroides* L. on host OMA at different induction time

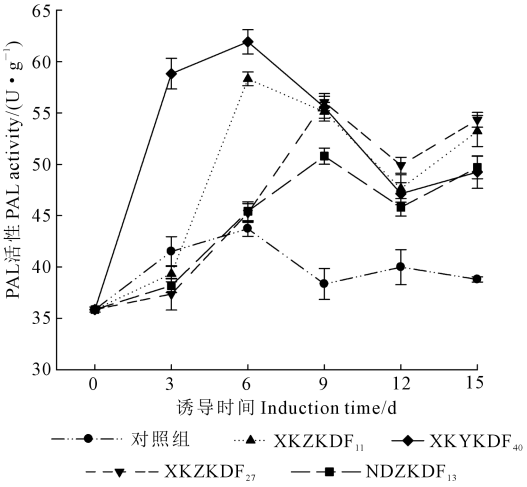

图 3　内生真菌诱导子对苦豆子组培苗 PAL 活性的影响

Fig.3　Effects of endotrophic fungal elicitors on activity of PAL in aseptic seedlings of *S. alopecuroides* L.

增长,且始终高于对照,并在第 15 d 达到最高,是对照组第 15 d 的 1.58 倍。诱导子 $XKZKDF_{27}$、$NDZKDF_{13}$在诱导第 3~9 d,组培苗中 OMA 含量保持增长,在第 9 d 时 OMA 含量达到最高,分别为对照组第 9 d 的 1.27 和 1.95 倍,此后随着培养时间的延长,OMA 含量逐渐下降,至诱导结束 $NDZKDF_{13}$仍高于对照组。

2.2　内生真菌诱导子对宿主防御酶活性的影响

2.2.1　内生真菌诱导子对宿主 PAL 活性的影响

以不同内生真菌诱导子处理的苦豆子组培苗为材料,测定不同诱导时间下 PAL 的活性。如图 3,在 4 种内生真菌诱导子处理初期,苦豆子组培苗中 PAL 的活性均持续升高,随着诱导时间的延长,PAL 活性逐渐呈现下降趋势,但均高于对照组。其中,诱导子 $XKYKDF_{40}$和 $XKZKDF_{11}$激发 PAL 活性的作用最好,在诱导处理 0~6 d 内迅速诱发宿主 PAL 活性,诱导第 6 d 达最大值,分别为 61.92 U·g^{-1}和 58.32 U·g^{-1},是对照组第 6 d 的 1.42 和 1.33 倍。其次,内生真菌诱导子 $XKZKDF_{27}$和 $NDZKDF_{13}$则是在诱导的 3~9 d 内诱发宿主 PAL 活性,诱导第 9 d 达到峰值,分别为 56.05 U·g^{-1}和 50.80 U·g^{-1},是对照组第 9 d 的 1.46 倍和 1.32 倍。

2.2.2　内生真菌诱导子对宿主 POD 活性的影响

如图 4 所示,4 种内生真菌诱导子加入后,宿主中 POD 活性均高于对照组,其中内生真菌诱导子 $XKZKDF_{27}$诱导效果最显著,POD 活性始终保持增长,在第 12 d 达到最大值,为 62.30 U·mg^{-1},是对照组第 12 d 的 2.70 倍。诱导子 $XKZKDF_{11}$诱导宿主中 POD 活性的变化规律与诱导子 $XKZKDF_{27}$相似,在诱导处理前期 POD 活性保持增长,第 12 d 达到最大值,为 49.13 U·mg^{-1},是对照组第 12 d 的2.13 倍。诱导子 $NDZKDF_{13}$和 $XKYKDF_{40}$对宿主 POD 活性的影响存在小的波动,在第 3 d 出现第一个小高峰,在诱导第 9 d 时,诱导子 $NDZKDF_{13}$诱发宿主中 POD 的活性达到峰值,为 49.79 U·mg^{-1},是对照组第 9 d 的 2.46 倍。而诱导子 $XKYKDF_{40}$处理组在第 12 d 时 POD 活性达到最高,为42.46 U·mg^{-1},是对

照组第 12 d 的 1.84 倍。

2.2.3 内生真菌诱导子对宿主 APX 活性的影响

如图 5 所示,4 种内生真菌诱导子在诱导处理前期苦豆子组培苗中 APX 的活性虽高于对照组,但增长缓慢,而在诱导处理中后期宿主 APX 活性均大幅升高。其中诱导子 $XKZKDF_{11}$ 的诱导效果最为明显,在诱导 9~12 d 时 APX 活性激增,在第 12 d 达到峰值,为 0.5538 U · mg^{-1},是各自同时期对照组的 4.97 倍;其次,诱导子 $XKYKDF_{40}$ 和 $XKZKDF_{27}$ 在诱导处理第 9 d 后,APX 活性开始迅速升高,分别于第 12 d 和 15 d 达到最高,为 0.3948 和 0.4991 U · mg^{-1},是同时期对照组的 3.54 和 3.31 倍;诱导子 $NDZKDF_{13}$ 则在诱导 6~9 d 内 APX 活性激增,在诱导第 9 d 达到最高,为 0.2728 U · mg^{-1},是同时期对照组的 1.34倍。

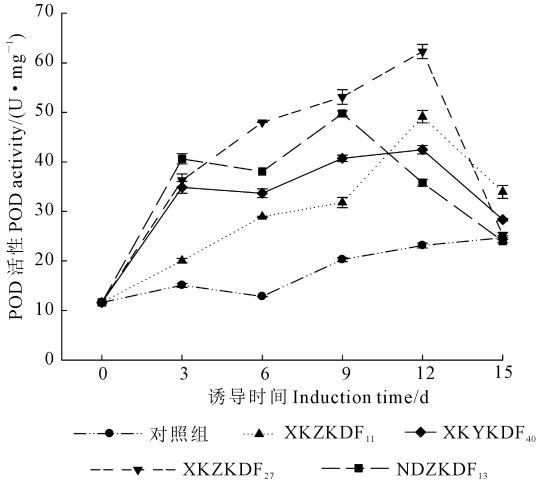

图 4 内生真菌诱导子对苦豆子组培苗 POD 活性的影响

Fig.4 Effects of endotrophic fungal elicitors on activity of POD in aseptic seedlings of *S. alopecuroides* L.

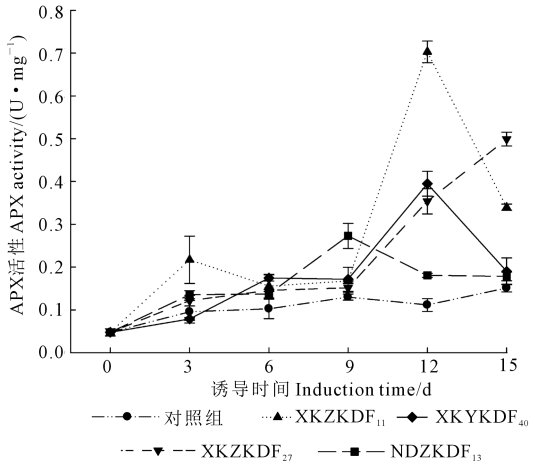

图 5 内生真菌诱导子对苦豆子组培苗 APX 活性的影响

Fig.5 Effects of endotrophic fungal elicitors on activity of APX in aseptic seedlings of *S. alopecuroides* L.

2.2.4 内生真菌诱导子对宿主 CAT 活性的影响

由图 6 可知,除诱导子 $NDZKDF_{13}$ 外,其他 3 种诱导子在诱导处理前期 CAT 活性皆呈现相对缓慢的增长趋势,在诱导中后期 CAT 活性快速升高,之后随着诱导时间的延长,CAT 活性逐步减弱。诱导子 $XKZKDF_{11}$ 和 $XKYKDF_{40}$ 在处理 0~9 d 内 CAT 活性增长缓慢,在 9~12 d 内 CAT 活性迅速增加,第 12 d 达到最高,CAT 活性分别为 19.82、16.87 U · mg^{-1},是同时期对照组的 3.00 倍和 2.56 倍;诱导子 $XKZKDF_{27}$ 在 6~15 d 内 CAT 活性快速增长,于第 15 d 达到最高为 10.30 U · mg^{-1},是同时期对照组的1.47 倍;$NDZKDF_{13}$ 诱导子在诱导 3~9 d 内 CAT 活性持续增长,于第 9 d 达到最高,CAT 活性为14.97 U · mg^{-1},是同时期对照组的 2.47 倍。

3 讨 论

内生真菌诱导子现已广泛用于提高植物次生代谢产物的合成积累,人们选择性地利用真菌诱导子促进某种植物中次生代谢物质的合成和累积[18]。陶如等[19]通过向白花丹参毛状根中添加内生真菌诱导子,使丹酚酸 B 和丹参素的产量分别增加 1.55 倍和 2.68 倍。本试验以内生真菌菌液浓缩物为诱导子,研究其对宿主 OMA 含量的影响,发现 4 种内生真菌诱导子在不同程度上均能提高苦豆子组培苗氧化苦参碱 OMA 含量,其中产碱菌株 $XKYKDF_{40}$ 的诱导效果最好,但其余 3 种诱导子对宿主中 OMA 含量的诱导效果并不持续增加,而是在 OMA 的合成积累量达到某一临界值后开始下降,其原因可能是:一方面,内生真菌诱导子对苦豆子合成 OMA 的

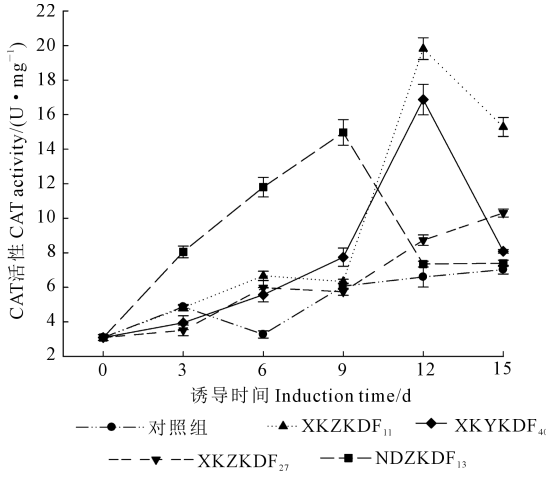

图 6 内生真菌诱导子对苦豆子组培苗 CAT 活性的影响

Fig.6 Effects of endotrophic fungal elicitors on activity of CAT in aseptic seedlings of *S. alopecuroides* L.

作用受内生真菌种类、诱导子时间和浓度等许多因素的影响。不同类型的内生真菌诱导子所具备的被宿主细胞受体识别的信息类型及时间先后不同,诱导反应的途径、速度和强度也不相同,故不同内生真菌诱导子表现出的诱导活性有明显的差异[20]。以同浓度的炭角菌(*Xylaria* sp.)、黑孢霉菌(*Nigrospora* sp.)和链抱菌(*Alternaria* sp.)诱导子分别处理毛葡萄愈伤组织,虽 3 种真菌诱导子对毛葡萄愈伤组织黄酮含量的积累都有一定程度的促进作用,但炭角菌(*Xylaria* sp.)的诱导效果最好,经其处理的愈伤组织中黄酮含量比对照提高了 76%[21]。另一方面,植物次生代谢物的合成积累不是无限制的,过多的次生代谢物积累会使植物细胞受到毒害[22]。植物细胞自身通过调控代谢途径中关键酶的活性来限制次生代谢物的产量,以维持内生真菌与宿主植物之间的拮抗平衡[23]。

PAL 是苯丙烷类代谢途径中的第一个关键酶,也是植物防御反应中重要的标志性酶,参与调控黄酮类、生物碱类及萜类等次生代谢物的合成,同时,PAL 还参与了木质素、植保素和植物信号分子水杨酸的合成及多种与植物防御反应相关代谢物的合成[24]。本试验中 4 种内生真菌诱导子均能有效激活宿主 PAL,在诱导早期使宿主 PAL 活性明显提高,表明诱导子触发了细胞快速应答。诱导处理后期,PAL 活性呈现下降趋势,可能是由于参与 OMA 合成的前体物质已经合成,路径中的后续物质合成需要其他酶来催化。

活性氧中的 H_2O_2 是一种常见植物信号分子,是植物对细胞内信号及外界刺激响应的重要调节物,参与介导多种代谢反应,但它也可伤害植物细胞,胞内高浓度的 H_2O_2 可引起细胞膜的氧化及过敏反应,从而引起细胞死亡[25-26]。逆境下植物中 H_2O_2 浓度会升高,POD、APX 及 CAT 都是清除活性氧的关键酶,POD 还可提高植物抗逆性并促进次生代谢产物的合成[27],CAT 和 APX 通过将 H_2O_2 还原为 O_2 和 H_2O,以减轻 H_2O_2 对植物的伤害,对维持细胞中活性氧的代谢平衡也起着十分关键的作用[28, 29]。陶金华等[30]用内生真菌 Fusarium SP1 处理茅苍术悬浮细胞,不仅诱发了 PPO、POD、CAT 的活性,还提高了 β-桉叶醇的含量。本试验中 4 种内生真菌诱导子诱导宿主组培苗中 POD、CAT 和 APX 活性大幅上升,最后促进宿主 OMA 的合成,由此说明苦豆子内生真菌诱导子可能引起宿主中活性氧的迸发,宿主细胞对诱导子的刺激迅速做出响应,利用抗氧化酶清除过多的 H_2O_2,减轻活性氧对植物的毒害,从而有利于宿主生物碱的合成积累。

总之,苦豆子内生真菌诱导子的加入激发了苦豆子组培苗的防御性应答反应,继而提高了宿主中 OMA 含量。内生真菌诱导子诱导植物次生代谢物合成是一个复杂的生物学过程,往往受众多内源信号分子调控[31]。苦豆子内生真菌诱导子是否通过激活宿主细胞内某些特殊的信号转导途径,诱发宿主的防御反应并促进生物碱合成,还有待于进一步研究。

参 考 文 献:

[1] Kutney J P, Samija M D, Hewitt G M, et al. Anti-inflammatory oleanane triterpenes from Tripterygium wilfordii cell suspension cultures by fungal elicitation [J].Plant Cell Reports,1993,12(6):356-359.

[2] Lebrun-Garcia A, Bourque S, Binet M N, et al. Involvement of plasma membrane proteins in plant defenseresponses. Analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco [J]. Biochimie,1999,81(6):663-668.

[3] Singh G J, Oakey J S, Curtis W R. Interaction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in Hyoscyamus muticus in root cultures [J]. Plant Cell Reports,1998,17(5):391-395.

[4] Chong T M, Abdullah M A, Lai O M, et al. Effective elicitation factors in Morinda elliptica cell suspension culture [J].Process Biochemistry,2005,40(11):3397-3405.

[5] Zhao J. Elicitor signal transduction leading to biosynthesis of plant defensive secondary metabolites [M]. USA: Global Science Books Ltd, 2006:344-357.

[6] 肖佳雷,来永才,李炜,等.内生真菌与植物的防御机制研究进展[J].Botanical Research,2013,2(1):13-17.

[7] 李培琴,于瑞婷,徐丹,等.内生真菌 *Berkleasmium* sp.寡糖对盾叶薯蓣培养细胞和幼苗防御相关酶活性的影响(英文)[J].天然产物研究与开发,2015,27(4):585-591.

[8] 王梦亮,焦晋,邢婕,等.内生真菌 ZPRa-R-1 对红景天中关键信号分子及主要次生代谢物的影响[J].植物研究,2016,36(3):416-420.

[9] 尚博扬,杨萍,陈丽,等.苦豆子中生物碱成分的网络药理学研究[J].中国中药杂志,2018,43(1):160-167.

[10] 胡会平,刘建慧,孙鑫,等.苦参碱及衍生物的生物活性和合成研究进展[J].鲁东大学学报(自然科学版),2015,31(4):339-345.

[11] 周星辰.苦豆子内生真菌遗传多样性及其产喹诺里西啶生物碱菌株的筛选[D].银川:宁夏大学,2014.

[12] 高媛,孙牧笛,徐全智,等.苦豆子内生真菌对宿主培养物生长及喹诺里西啶类生物碱合成的影响[J].干旱地区农业研究,2017,35(3):212-218.

[13] Farmer E E. Effects of fungal elicitor on lignin biosynthesis in cell suspension cultures of soybean[J]. Plant Physiology,1985,78(2):338-342.

[14] 宛国伟,董娟娥,梁宗锁,等.培养条件对离体丹参根苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶活性的影响[J].西北植物学报,2007,27(12):2471-2477.

[15] 魏池泉.云南白芸豆过氧化物酶的提取及其酶学性质的研究[D].昆明:云南师范大学,2008.

[16] 孙云.茶叶抗坏血酸过氧化物酶(APX)的生理学与分子生物学研究[D].福州:福建农林大学,2009.

(下转第 71 页)