

# 真菌诱导子对悬浮培养西洋参细胞的生理效应

刘长军 侯嵩生 李新明 吴玉兰 李洪林

(中国科学院武汉植物研究所 武汉 430072)

**提 要** 报道了不同真菌诱导子对悬浮培养的西洋参(*Panax quinquefolium*)细胞生长、皂甙和多糖合成,以及细胞内和培养液中过氧化物酶活性的生理效应。悬浮培养的西洋参细胞经刺盘孢菌(*Colletotrichum nicotianae*)丝体诱导子处理后,总皂甙产率可由对照的 296 mg/L 增加到 679 mg/L(约占细胞干重的 16.3%),比对照提高约 1.3 倍,而且总皂甙的 85% 排在培养液中;经黑曲霉(*Aspergillus nigran*)诱导子处理后,细胞多糖含量可达到 11.79%(细胞干重),比对照增加 1 倍多。初步纯化的刺盘孢菌丝体诱导子和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)滤液诱导子在诱导处理前期能明显促进西洋参细胞生长,同时细胞内及培养液中过氧化物酶活性显著增加;随时间延长,细胞生长和酶活性逐步受到抑制。

**关键词** 真菌诱导子,西洋参,细胞悬浮培养,生理效应

真菌诱导子是一类来自病原或非病原性真菌菌丝体壁、孢子或其培养液的特殊生化触发因子。它在植物防御反应中,能快速、专一和有选择地开启或活化特定基因的表达,改变细胞代谢途径和代谢强度,从而导致植物合成低分子量的次生物质——植保素(Phytoalexin)。近几年来,在植物细胞培养生产有用物质的研究中,利用诱导子处理培养细胞、刺激合成次生产物,以提高有用物质含量的方法一直受到人们极大重视。

西洋参(*Panax quinquefolium*)为五加科(Araliaceae)人参属植物,原产美国和加拿大,为名贵药材,含有皂甙、多糖等生理活性成分,具有促进血液循环、降低血糖、抗癌、抗衰老等作用。近年来,我国虽有引种栽培,但由于受气候、环境及栽培技术的限制,每年仍需大量进口,因而西洋参细胞培养工作倍受重视。自 Jhang 等<sup>[1]</sup>首次诱导出西洋参愈伤组织以来,有关西洋参愈伤组织、细胞悬浮培养和细胞大量培养的研究已有诸多报道<sup>[2~5]</sup>。但如何提高培养细胞中有效成分含量,仍是其实现商品化生产的关键问题。本文在西洋参细胞培养的研究基础上,利用刺盘孢菌(*Colletotrichum nicotianae*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、黑曲霉(*Aspergillus nigran*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)等真菌,分别

培养、收集菌丝体和滤液,制备诱导子,处理悬浮培养的西洋参细胞。系统研究了真菌诱导子对西洋参细胞生长、皂甙、多糖合成及细胞过氧化物酶活性的生理效应。为进一步提高细胞有用物质的含量,降低生产成本,实现商品化生产提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

西洋参愈伤组织由本实验室诱导和继代保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

(1) 固体培养:西洋参愈伤组织接种在附加 2,4-D 0.5 mg/L、IBA 2 mg/L、KT 0.1 mg/L 的 MS 固体培养基上,22~25℃、黑暗培养,每 20 d 继代一次。

(2) 细胞悬浮培养:选择生长旺盛、分散度高的西洋参愈伤组织接种到 250 mL 三角瓶中,加入 100 mL 去掉琼脂的上述 MS 培养液,于 110~120 r/min 摇床上,22~25℃ 黑暗、悬浮培养,每 15 d 继代培养一次。

#### 1.2.2 真菌培养和诱导子的制备

(1) 真菌培养:烟草刺盘孢菌、尖孢镰刀菌菌丝体接种到马铃薯-葡萄糖培养液中<sup>[6]</sup>。黑曲霉、米曲霉成熟孢子接种在查氏<sup>[6]</sup>培养液中,24±2℃,90~110 r/min 普通摇床上,液体培养 6~7 d。菌丝体充分生长后收获、抽滤,分别收集菌丝团和滤液。

(2) 诱导子的制备和粗提物中多糖含量测定:菌丝体诱导子的制备,参照 Ayers 等 (1976 年)<sup>[7]</sup>的方法;滤液诱导子的制备,参照 Anderson<sup>[8]</sup>等的方法。制得的各真菌诱导子粗提物,用蒽酮比色法<sup>[9]</sup>测定其多糖含量。高温灭菌后备用。

#### 1.2.3 细胞生长的测定

以细胞鲜重和干重为指标,减压滤取悬浮培养细胞,用蒸馏水洗涤数次,抽干后称鲜重,然后,60℃ 下烘干至恒重作为细胞干重。

#### 1.2.4 皂甙和粗多糖的提取、测定

(1) 干细胞中皂甙和粗多糖的含量测定:参考李玉等<sup>[10]</sup>方法,改用 85% 乙醇代替 95% 甲醇回流提取,减压回收乙醇,剩余物用水溶解、过滤,脱脂,水饱和正丁醇多次萃取,水相以蒽酮比色法<sup>[9]</sup>测定粗多糖含量,正丁醇相经减压回收,残余物溶于 5 mL 甲醇,比色法<sup>[11]</sup>测定吸光值,根据标准曲线  $y=334.13x+49.08$  求得样品皂甙含量。

(2) 悬浮培养液中皂甙提取、测定:精确量取适量培养液,70℃ 水浴蒸干,残余物溶于 85% 乙醇中,回流提取,过滤抽提液,其余步骤参照上述方法进行操作。

#### 1.2.5 过氧化物酶活性测定

(1) 粗酶液提取:3 g 鲜重的悬浮培养细胞加入 15 mL 预冷的 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.7),冰浴研磨至匀浆,3 500 r/min 离心 15 min,取上清液即为细胞中过氧化物酶粗酶液。定期精确吸取 10 mL 细胞培养液,3 500 r/min 离心 15 min,取上清液即为培养液中过氧化物酶的粗酶液。

(2) 酶活性测定:参考章骏德<sup>[12]</sup>、Evans<sup>[13]</sup>等方法,以 0.01% 愈创木酚作底物,在 7520 型分光光度计上于 470 nm 处测定吸光值,以  $\Delta A$  变化 0.01 为 1 个活力单位 (Unit) 分

别以Unit/min·g FW和Unit/min·mL medium表示细胞和培养液中过氧化物酶活性。

## 2 实验结果

### 2.1 不同诱导子对悬浮培养的西洋参细胞总皂甙合成进程的影响

图1表示悬浮培养于MS培养液中的西洋参细胞生长和培养液pH的变化情况。

悬浮培养的西洋参细胞接种后1~2 d为生长延滞期,2~6 d细胞增重缓慢,6~17 d为快速增长的指数生长期,17 d后进入生长静止期。培养液pH波动较大,悬浮培养的初期pH迅速降低,至后期又出现逐步回升趋势。

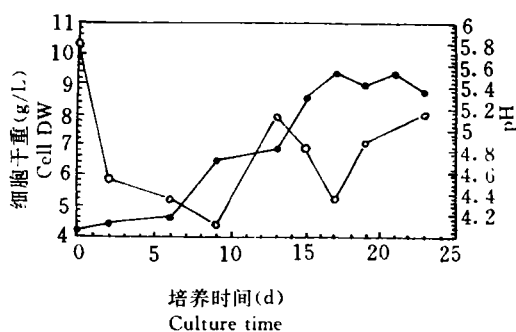


图1 悬浮培养的西洋参细胞生长和培养液pH的变化

Fig. 1 Changes in cell growth and pH value of the medium of *P. quinquefolium* cells in suspension culture

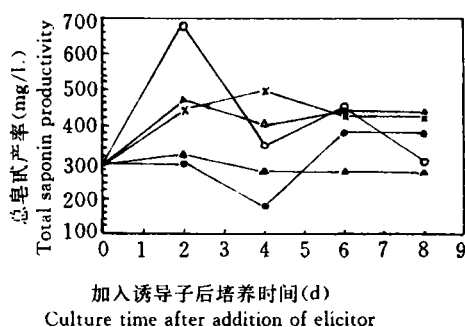


图2 不同诱导子对西洋参悬浮培养细胞皂甙合成进程的影响

Fig. 2 Effects of different elicitors on the time course of saponin biosynthesis of *P. quinquefolium* cells in suspension culture

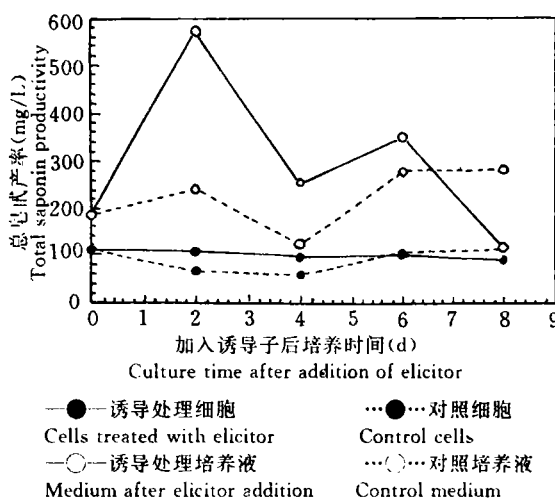


图3 刺盘孢诱导子处理的西洋参悬浮培养细胞及培养液中皂甙积累动态

Fig. 3 Time course of saponin accumulation in the cell and the medium of *P. quinquefolium* in suspension culture treated with elicitor of *C. nicotianae*

向指数生长末期(培养15 d)的西洋参细胞悬浮培养物中加入不同种类诱导子后,总皂甙积累动态的变化情况如图2所示。

不同诱导子对西洋参细胞总皂甙合成的诱导效果明显不同。加入刺盘孢菌丝体诱导子的细胞培养物,诱导处理2 d时,总皂甙产率由对照的296 mg/L快速增加到679 mg/L,占细胞干重的16.3%,比同期对照提高约1.3倍,随即皂甙含量迅速下降,表现出一种短期诱导效果;用尖孢镰刀菌滤液和米曲霉诱导子处理的细胞样品,总皂甙合成同样明显增加,而且保持相对稳定的产率;但黑曲霉诱导子对西洋参细胞皂甙合成的诱导效果却较小,随处理时间延长,导致部分培养细胞破裂、死亡,结果总皂甙产率明显低于对照样品。

正常悬浮培养于 MS 培养液中的西洋参细胞,能常规性的将占总量 50%~60%的皂甙成分排放到培养液中。诱导子处理促进了西洋参细胞皂甙产物的排放。效果最为显著的是加入刺盘孢菌丝体诱导子的细胞样品,如图 3 所示,总皂甙的 85%存在于培养液中。

## 2.2 不同诱导子对西洋参悬浮培养细胞多糖合成进程的影响

图 4 表示不同诱导子对西洋参悬浮培养细胞多糖合成动态的影响情况。

从图中可以看出,加入黑曲霉和米曲霉诱导子的样品,诱导处理 6 d 后,多糖含量分别是细胞干重的 11.79%和 10.9%,比同期对照提高了 100%和 85%,而刺盘孢菌丝体诱导子对多糖合成的诱导效果相对较小。

## 2.3 不同诱导子对西洋参悬浮培养细胞的生长和过氧化物酶活性的影响

用诱导子处理处于指数生长期(培养 13 d)的西洋参悬浮细胞,定期测定细胞干重积累情况,以反映细胞生长的变化,结果见图 5。

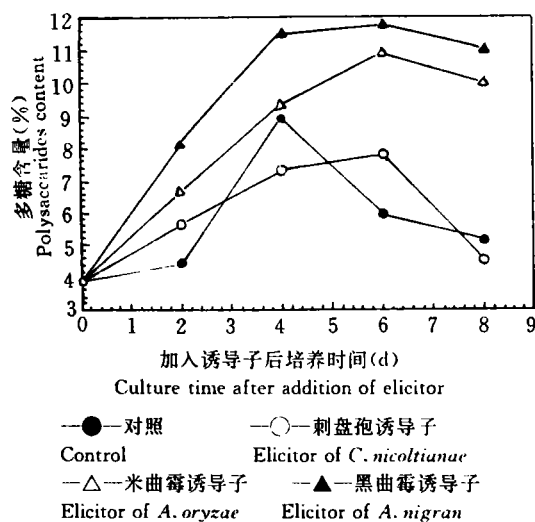


图 4 不同诱导子对西洋参悬浮培养细胞多糖合成进程的影响

Fig. 4 Effects of different elicitors on time course of polysaccharides biosynthesis of *P. quinquefolium* cells in suspension culture

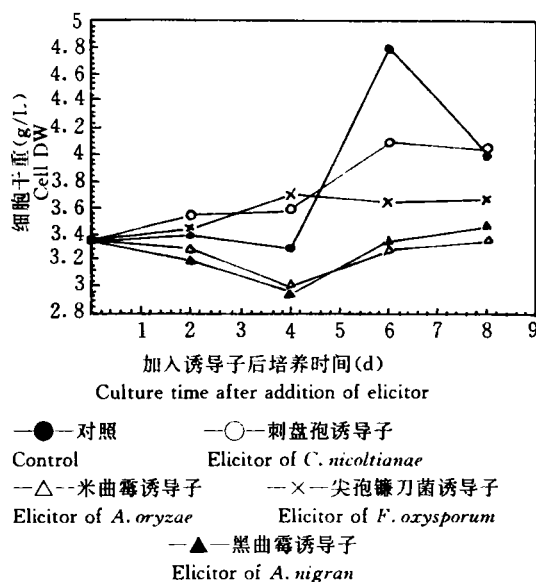


图 5 不同诱导子对西洋参悬浮培养细胞生长的影响

Fig. 5 Effects of different elicitors on cell growth of *P. quinquefolium* cells in suspension culture

从图中可以看出,在诱导处理的前期,初步纯化的刺盘孢菌丝体和尖孢镰刀菌滤液诱导子能有效地促进细胞干重的增加,随诱导时间延长,对细胞生长产生一定抑制作用。

分别测定加入刺盘孢菌丝体诱导子的悬浮培养西洋参细胞内和培养液中过氧化物酶活性,结果如图 6 和图 7 所示。

诱导子处理引起细胞内和培养液中过氧化物酶活性快速增加。处理 24 h 后,细胞内 POD 表现出最高活性,比对照增加 1 倍多;72 h 后,培养液中 POD 活性也达到最高值,随后酶活性迅速降低,形成一锐峰。

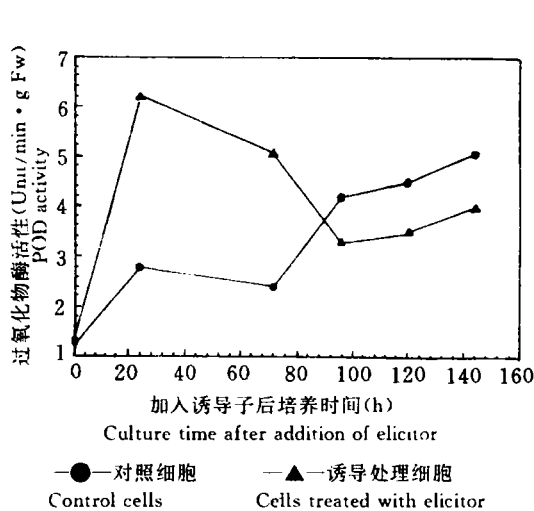


图6 诱导作用对悬浮培养的西洋参细胞中过氧化物酶活性的影响

Fig. 6 Effects of elicitation on POD activity of *P. quinquefolium* cells in suspension culture

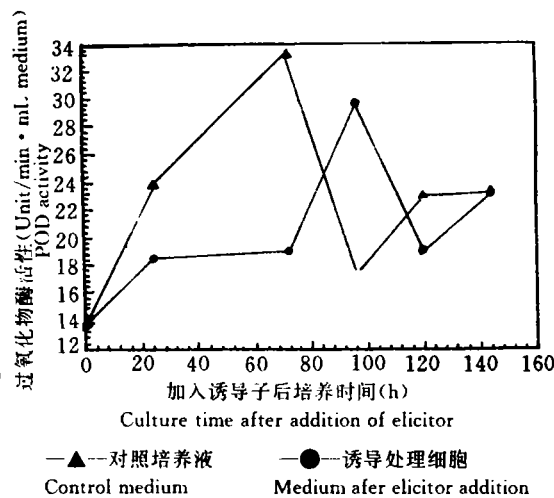


图7 诱导作用对西洋参悬浮细胞培养液中过氧化物酶活性的影响

Fig. 7 Effects of elicitation on POD activity in medium of *P. quinquefolium* cells in suspension culture

### 3 讨论

(1) 不同种类的真菌诱导子在植物细胞次生代谢调节中,因所具有的能被细胞受体所接受的信息类型、数量、时间先后不同,使诱导反应发生的类型、速度和强度不同,从而不同诱导子表现出的生理活性有明显差异。在西洋参细胞培养物中加入诱导子,对皂甙合成的生理效应而言,活性最高的是刺盘孢菌丝体诱导子,能使细胞总皂甙含量达到干重的16.3%,比对照提高约1.3倍;在同一诱导反应体系中,对于不同的产物,诱导子表现出的活性也不相同,黑曲霉诱导子虽不利于西洋参细胞皂甙的合成,却能促进多糖的大量积累,诱导处理后粗多糖含量达到细胞干重的11.79%,比对照增加1倍。

(2) 悬浮培养的植物细胞能常规性地向培养液中释放部分代谢产物<sup>[14]</sup>,诱导子处理后能刺激细胞将次生产物向培养液中排放<sup>[15]</sup>。加入刺盘孢菌丝体诱导子的西洋参细胞培养物总皂甙的85%外排在培养液中。次生产物的外排可能是由于诱导子处理引起了细胞膜透性的改变、离子平衡和运输流向的变化,从而导致细胞内次生产物流向的改变。利用这一特性,采用两相培养等方法,可以不断回收次生产物,改变代谢平衡,从而有利于产物的生物合成。

(3) 过氧化物酶(POD)是一个生长发育过程中起作用的酶,参与调控细胞伸长、细胞壁多糖的交联、木质素合成和抗胁迫反应等。李新明等<sup>[9,16]</sup>实验表明 POD 活性变化同培养细胞的生长速率呈正相关性。诱导子处理西洋参细胞后,细胞内和培养液中 POD 活性比对照明显升高,在此阶段细胞干重积累也相应增加。诱导处理活化了与细胞生长相关的酶,其中包括参与木质素代谢的 POD 酶,导致细胞生物量增加。

## 参 考 文 献

- 1 Jhang J A, Staba E J, Kim J Y. American and Korean ginseng tissue cultures growth, chemical analysis and plant let production. *In vitro*, 1974, **9**(4): 253~259
- 2 郑光植, 王世林, 何静波. 三七参、人参、西洋参细胞悬浮培养的比较研究. 云南植物研究, 1989, **11**(1): 97~102
- 3 周立刚, 郑光植. 西洋参细胞大量培养的研究. 生物工程学报, 1990, **6**(4): 316~321
- 4 周立刚, 郑光植. 西洋参细胞大量培养的工艺学研究. 生物工程学报, 1991, **7**(3): 230~234
- 5 范代娣, 李宝璋. 西洋参细胞培养及  $MgSO_4$  含量对培养结果的影响. 生物技术, 1994, **4**(3): 23~25
- 6 范秀容, 沈萍. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1986. 130
- 7 Ayers A R, Jurgen EBEL. Host-pathogen interactions X: Fraction and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant physio*, 1976, **57**: 760~765
- 8 Anderson A J. Isolation from three species of *colletotrichum* of glucan-containing polysaccharides that elicit browning and phytoalexin production in bean. *Phytopathol*, 1978, **68**: 189~194
- 9 侯嵩生, 李新华, 尚廷兰等. 九连小囊悬浮培养细胞生理生化研究 I. 细胞生长与培养液电导率和过氧化物酶的活性变化. 武汉植物学研究, 1988, **6**(2): 129~132
- 10 李玉, 傅星魁, 胡本贵. 人参产品配方与加工新技术. 吉林: 吉林科学出版社, 1991. 13~15
- 11 章观德, 周志华, 王慕邹等. 人参的分析 I. 人参皂甙的测定. 药学报, 1980, **15**(3): 175~181
- 12 章骏德. 植物生理实验法. 南昌: 江西人民出版社, 1982. 35
- 13 Evans J J, Alldridge N A. The distribution of peroxidases in extreme dwarf and normal tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Phytochem*, 1965, **4**: 499~503
- 14 Wink M. The cell culture medium—a functional extracellular compartment of suspension cultured cells. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1994, **38**: 307~309
- 15 Dicosmo F, Misawa M. Applied Biochem. *Biotechnol*, 1987, **14**: 101~107
- 16 李新华, 侯嵩生, 陈士云等. 植物细胞生长与培养液电导率及过氧化物酶活性关系. 生物工程学报, 1993, **9**(1): 93~95

## THE PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF FUNGAL ELICITORS ON THE *PANAX QUINQUEFOLIUM* CELLS IN SUSPENSION CULTURE

Liu Changjun Hou Songsheng Li Xinming Wu Yulan Li Honglin

(Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences Wuhan 430071)

**Abstract** The physiological effects of fungal elicitors on the cell growth, the biosynthesis of saponin and polysaccharide and the peroxidase activity of *Panax quinquefolium* cells in suspension culture was reported. After treated with *Colletotrichum nicotianae* mycelia elicitor, the productivity of total saponin of *Panax quinquefolium* cells in suspension culture went up from 296 mg/L to 679 mg/L (about 16.3% DW), increasing 130% over the control, and about 85% of total saponin were excreted into the medium. The polysaccharide content of *Panax quinquefolium* cells treated with *Aspergillus nigran* eli-

citor increased to 11.79%, up more than 100% over the control. The cell growth of *P. quinquefolium* was firstly promoted by adding *C. nicotianae* mycelia and *Fusarium oxysporum* filtration elicitors, meanwhile, the peroxidase activity in the cells and in the medium remarkable rose, and then both of the cell growth and the POD activity were inhibited.

**Key words** Fungal elicitor, *Panax quinquefolium*, Cell suspension culture, Biophysiological effects

## 欢迎订阅《北京林业大学学报》

《北京林业大学学报》主要刊登林学基础理论、造林经营、森林经理、森林生态、病虫害防治、水土保持、林业经济、林业机械、木材加工、林产化学、园林植物与园林设计等方面的论文、简报、综述、学术问题讨论、书刊评介及学术动态等。

《北京林业大学学报》是林业中文核心期刊,在首届全国优秀科技期刊评比中曾获三等奖;该刊是中国科学引文数据库首批收录的315种期刊之一,并在被引频次最高的中国科技期刊500名排行表上名列第149位(1994年度统计数据,1996年5月公布)。

该刊为季刊,季首月出版,国内外公开发行。国内总发行:河北廊坊市邮局,全国各地邮局均可订阅。刊号:CN11-1932/S,邮发代号:18-91,定价:每期3.50元,全年14元。

如在当地邮局订阅不便或错过邮局订阅时间,请直接向该刊编辑部订阅。

地址:100083 北京林业大学学报编辑部 刘大林。

## 欢迎订阅《西北林学院学报》

《西北林学院学报》是由西北林学院主办的以林业科学为主的综合性学术期刊。主要反映我院教学和科研成果及国内外林业科技研究新成果、新动态。主要刊登林木遗传育种、造林、水土保持、经济林、园林绿化与设计、森林资源及其保护、森林经理、森林生态、木材工业、林产化工、林业机械、林业经济及管理学科和有关基础理论学科的学术论文、调查研究、研究简报、文献综述、学术动态和书介等。

主要阅读对象:农业高等院校师生、林业科研人员及中等林业学校师生、林业科技与生产人员及有关综合大学生物专业师生。

西北林学院学报1995年被评为全国高校自然科学学报系统优秀学报一等奖,1996年被确定为林业类核心期刊。欢迎订阅,欢迎投稿。

西北林学院学报为季刊,季末月出版,16开本,每期96页,每期定价4.00元,全年共16.00元。公开发行,全国各地邮局(所)均可订阅,邮发代号:52-99。国外发行由中国教育图书进出口公司代办,代号:JNSC-88。

编辑部地址:陕西省咸阳市杨陵区西北林学院内 邮政编码:712100 电挂:2651