

内生真菌对铁皮石斛多糖和生物碱合成关键酶基因表达的影响

王 进¹, 李俊峰¹, 张婷婷¹, 孙腾飞², 刘文洪^{1*}

1. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 分析内生真菌菌株 GXRz2、GXRz3 和 GXRz10 对铁皮石斛多糖含量和多糖合成途径关键酶尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase, UGPase) 基因表达以及生物碱含量和生物碱合成途径中关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase, HMGR)、法尼基焦磷酸合酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPS) 基因表达的影响。**方法** 铁皮石斛幼苗施加内生真菌菌液, 采用分光光度法测定铁皮石斛多糖和生物碱含量。以 18 S rRNA 为内参照基因, 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测多糖、生物碱关键酶基因表达的变化。**结果** 铁皮石斛活性成分多糖含量较高, 主要集中于茎, 根中最低; 而生物碱含量较低, 主要存在于叶, 根中最低, 3 株内生真菌处理均能在一定程度上促进铁皮石斛多糖及生物碱的积累。qRT-PCR 技术检测 UGPase、HMGR 和 FPS 基因在不同内生真菌处理下的相对表达, 结果显示, 内生真菌 GXRz3 和 GXRz10 均可显著提高铁皮石斛 UGPase、HMGR 和 FPS 基因的表达量; 其中, 多糖合成途径中, UGPase 基因在茎中的相对表达量最高, 叶次之, 根中最少; 生物碱合成途径中, HMGR 基因在茎中的相对表达量最高, 叶次之, 根中最少, 而 FPS 基因在叶中的相对表达量最高, 茎次之, 根中最少。**结论** 内生真菌可能通过调控 UGPase 的表达, 影响多糖的合成, 结合多糖积累情况, 推测 UGPase 可能是铁皮石斛多糖合成途径中的关键酶; 内生真菌可能通过调控 HMGR、FPS 的表达, 影响生物碱的合成, 而结合生物碱积累情况, 推测 FPS 可能是生物碱合成途径中的关键酶。

关键词: 铁皮石斛; 内生真菌; 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶; 法尼基焦磷酸合酶; 荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)23-5838-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.027

Effect of endophytic fungi on expression of key enzyme genes in polysaccharide and alkaloid synthesis from *Dendrobium officinale*

WANG Jin¹, LI Jun-feng¹, ZHANG Ting-ting¹, SUN Teng-fei², LIU Wen-hong¹

1. College of Basic Medicine Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: **Objective** To analyze the effect of endophytic fungi GXRz2, GXRz3 and GXRz10 on content of poly saccharide and alkaloid, and the expression of key enzyme genes UGPase, HMGR, and FPS in *Dendrobium officinale*. **Methods** The endophytic fungi liquid were added to *D. officinale* seedlings. Polysaccharide and alkaloid content were measured by spectrophotometry method. With 18S rRNA as internal control gene, the expression of key enzyme genes was detected by real-time quantitative PCR method. **Results** It was found that the content of polysaccharide in *D. officinale* was higher, mainly concentrated in stem, but the lowest in root. And the content of alkaloid in *D. officinale* was lower, mainly accumulated in leaf, but the lowest in root. In addition, the three endophytic fungi strains could promote accumulation of polysaccharide and alkaloid in *D. officinale* to a certain extent. The expression of UGPase, HMGR and FPS genes in *D. officinale* induced by different strains was detected by real-time quantitative PCR. The results showed that endophytic fungi GXRz3 and GXRz10 could significantly increase the expression of UGPase, HMGR and FPS genes in *D. officinale*. In the polysaccharide synthesis pathway, the UGPase gene had the highest relative expression in the stem, followed by the leaf, and the least in the root. In the alkaloid synthesis pathway, HMGR gene had the highest relative expression in the stem, followed by the leaf, and the least in the root. However, FPS gene had the highest relative expression in the leaf, followed by the stem, and the

收稿日期: 2019-04-03

基金项目: 浙江省医药卫生科研基金项目 (2019KY469); 浙江中医药大学校级科研基金项目 (2019ZY22)

作者简介: 王 进, 男, 硕士研究生, 主要从事中药药理研究。Tel: 13067919213 E-mail: 949263287@qq.com

*通信作者 刘文洪, 副教授, 主要从事中药药理研究。E-mail: lwh@zcmu.edu.cn

least in the root. **Conclusion** Endophytic fungi may affect the synthesis of polysaccharide by regulating the expression of UGPase. Considering the accumulation of polysaccharide, it is speculated that UGPase may be a key enzyme in the polysaccharide synthesis pathway of *D. officinale*. Endophytic fungi may affect the synthesis of alkaloid by regulating the expression of HMGR and FPS. Considering the accumulation of alkaloid, it is speculated that FPS may be a key enzyme in the alkaloid synthesis pathway of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; endophytic fungi; UDP-glucose pyrophosphorylase; farnesyl pyrophosphate synthase; real-time quantitative PCR

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* L. 多年生附生草本植物^[1], 是我国传统的名贵中药材, 在医药养生方面占有重要的地位。近年来, 国内外学者对铁皮石斛化学成分进行了大量研究, 发现该属植物所含的化学成分类型多样, 主要包括多糖、生物碱、氨基酸、微量元素、甾体及挥发油^[2-3]等。其中, 多糖和生物碱是铁皮石斛的主要活性成分, 对铁皮石斛的品质和药效产生重要作用^[4]。

近年来, 因人类的盲目开采、环境的急剧恶化, 使铁皮石斛的自然资源变得短缺, 甚至濒临灭绝。利用铁皮石斛悬浮细胞培养技术解决铁皮石斛资源问题的研究已有报道^[5], 但是植物细胞培养成本较高, 且铁皮石斛多糖、生物碱等有效成分含量与产率都较低。内生真菌通过产生特定的代谢产物, 影响药用植物的代谢过程, 干预植物中某些活性成分的合成, 影响植物的生长、发育和活性成分积累差异化的形成。内生真菌促进中药材活性成分的积累及其对影响宿主植物生长的研究报道较多, 例如分离于药用植物滇重楼的内生真菌可促进皂苷类活性成分的积累^[6]; 朱波等^[7]研究发现, 分离自铁皮石斛的 7 个内生菌株可改变铁皮石斛组培苗茎节变紫进程, 并影响茎糖类及醇溶性成分组成及含量积累。内生真菌对宿主植物活性成分积累的诱导作用的探讨是目前内生真菌研究的一个重要方向。Wan 等^[8]从铁皮石斛中克隆获得尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因 (UGP) 基因的 cDNA 序列, 并对其功能进行鉴定。张琳等^[9]首次从铁皮石斛中克隆了 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 基因, 林榕燕^[10]从霍山石斛中克隆了法尼基焦磷酸合酶 (FPS) 基因, 但有关铁皮石斛内生真菌促进宿主多糖、生物碱合成积累相关机制研究报道较少。

铁皮石斛中含有丰富的内生真菌, 其中菌株 GXRz2、GXRz3 和 GXRz10 分别鉴定为 *Fusarium oxysporum* f. sp.、*Fungal endophyte* sp. 和 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissle^[11], 已有相关研究发现它们有

利于铁皮石斛的萌发或生长, 在石斛生长过程中扮演着重要角色, 对于增加石斛中药材资源具有重要意义^[12-14]。本实验在研究铁皮石斛内生真菌对宿主多糖、生物碱合成积累影响的基础上, 采用 qRT-PCR 检测添加外源内生真菌 GXRz2、GXRz3 和 GXRz10 后铁皮石斛幼苗中 UGPase、HMGR 及 FPS 基因表达情况, 分析 UGPase 与多糖, HMGR、FPS 与生物碱合成积累之间的关系, 以期对铁皮石斛多糖、生物碱合成途径中关键酶的研究提供新的技术支持, 在分子水平上初步揭示铁皮石斛内生真菌促进其活性成分积累的规律, 为解决某些药用植物生长缓慢、资源紧缺、生态破坏等因素导致的药源紧张问题提供一个新的参考方向。

1 材料与仪器

1.1 材料

铁皮石斛幼苗为本实验室建立的铁皮石斛组培苗繁殖体系。铁皮石斛内生真菌菌株 GXRz2、GXRz3 和 GXRz10 经课题组分别鉴定为 *Fusarium oxysporum* f. sp. (EF611088)、*Fungal endophyte* sp. (EU818918) 和 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissle (JF802121), 保存于浙江中医药大学基础医学院病原生物与免疫学实验室^[11]。

1.2 试剂与仪器

PDA 培养基由实验室配制; 新型植物总 RNA 提取试剂盒 (杭州宝赛生物科技有限公司); DNase I (Promega 公司); PrimeScriptTM RT Master Mix、SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒 (TaKaRa 公司); 石斛碱对照品 (批号 2115-91-5, 质量分数 97.5%) 购自曼思特生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。754 紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); NanoVue 超微量分光光度计 (GE Healthcare 公司); Light-Cycler 480 II (Roche 公司)。

2 方法

2.1 内生真菌对铁皮石斛幼苗活性成分生物合成的影响

2.1.1 菌液制备 将内生真菌 GXRz2、GXRz3 和 GXRz10 分别接种于含 100 mL 的 PDA 液体培养基

的 500 mL 三角瓶中,置于摇床中 180 r/min、28 °C 振荡培养 3~7 d,得到真菌菌液。

2.1.2 内生真菌诱导 取 3 种真菌菌液 5 mL 施于每株苗根部,每株苗施加一种真菌菌液,每组处理重复 3 次,另取 3 株长势相当的幼苗在相同条件下接入等量无菌水作为对照。于培养 60 d 后收获幼苗^[15-17],分析对照组、处理组铁皮石斛幼苗根、茎、叶活性成分多糖和生物碱含量变化。

2.1.3 多糖含量测定 参照陈晓梅^[18]的方法,以葡萄糖为对照品测定铁皮石斛多糖的含量。

(1) 标准曲线绘制:准确称取干燥至恒定质量的葡萄糖 100.0 mg,溶解后定容到 100 mL 量瓶中。取 10 mL 于 100 mL 量瓶中,用蒸馏水定容即得含葡萄糖 1 μg/μL。精密量取葡萄糖对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL,加蒸馏水至 2 mL,各管再加入 6%苯酚溶液 1.0 mL,混匀,迅速加入 5.0 mL 浓硫酸,摇匀,静置 5 min 后,放入沸水中加热 20 min,取出避光冷却至室温,在 490 nm 处测吸光度 (A)。以葡萄糖质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y),绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=0.0162X+0.0006$, $r^2=0.9994$ 。

(2) 样品溶液制备:各处理组的铁皮石斛样本干燥称定质量后,精密称取铁皮石斛粉(40 目)100 mg,加石油醚 50 mL (60~90 °C)脱脂 1 h,加入 80%乙醇 100 mL,回流提取 1 h,趁热滤过。挥干溶剂,再用 10 mL 蒸馏水回流提取 1 h,趁热滤过,浓缩,取上清液 2 mL 加 8 mL 无水乙醇,4 °C 过夜,多糖沉淀析出,取出后 4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,将多糖沉淀用蒸馏水溶解,Sevag 法脱蛋白,上清液如上述醇沉,用 80%乙醇洗涤多糖沉淀,蒸馏水溶解后定容于量瓶中,得样品溶液备用。

(3) 样品多糖含量测定:用葡萄糖对照品溶液 1.0 mL 作为对照,以蒸馏水作为空白对照,吸取样品溶液 1.0 mL,按标准曲线绘制项下操作,于 490 nm 处测量 A 值,计算多糖的含量^[18]。

2.1.4 生物碱含量测定 参照陈晓梅^[18]的方法,以石斛碱为对照品,采用酸性染料比色法测总生物碱含量。

(1) 标准曲线绘制:精密称取石斛碱对照品 1.0 mg,置 100 mL 量瓶,加氯仿至刻度。精确量取石斛碱对照溶液(0.01 mg/mL) 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置于分液漏斗中,加入氯仿至 10.0 mL,再加入邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠缓冲液 5.0 mL,

0.04%溴甲酚绿溶液 2.0 mL,剧烈振摇 3 min 后静置 30 min,氯仿层经氯仿浸泡处理并干燥后的药棉滤过,取续滤液 5.0 mL,加入 0.01 mol/L 氢氧化钠乙醇溶液 1.0 mL,摇匀,以氯仿 10.0 mL 为空白,同法操作,于 620 nm 处测 A 值。以石斛碱质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y),绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.0115X+0.0022$, $r^2=0.9993$ 。

(2) 样品溶液的制备和总生物碱含量的测定:各处理组的铁皮石斛样本干燥称定质量后,粉碎(40 目),准确称取铁皮石斛粉末 300 mg,用适量氨水湿润,加塞放置 30 min,准确加入氯仿 10.0 mL,称定质量,置于水浴锅中于 80 °C 温度下恒温水浴回流提取 2 h,室温冷却 20 min 后补充氯仿至原质量,再用氯仿浸泡并干燥后的药棉滤过,取续滤液 5.0 mL,加 5.0 mL 氯仿稀释至 10.0 mL,作为样品液。另以石斛碱对照品溶液 2.0 mL 置分液漏斗中作为对照,以 10.0 mL 氯仿置分液漏斗中为空白对照,按“2.1.4 (1)”项操作,于波长 620 nm 处测量 A 值。按照对照品对照法计算总生物碱含量^[18]。

2.2 内生真菌对铁皮石斛活性成分合成途径中关键酶的诱导

2.2.1 铁皮石斛幼苗总 RNA 的提取与反转录 以内生真菌处理的幼苗根、茎、叶为实验材料,按照新型植物总 RNA 提取试剂盒(宝赛)进行总 RNA 提取,用 DNase I (Promega 公司)消化样品 RNA 中的 DNA。用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。以 Oligo (dT)₁₈ 为引物,用 PrimeScript™ RT Master Mix (TaKaRa 公司)进行反转录合成 cDNA 第 1 链,反应总体积 20 μL。

2.2.2 qRT-PCR 反应 根据已克隆的铁皮石斛关键酶 UGPase (JX294909.1)、HMGR (JX909333.1)、FPS (JX679465.1) 基因序列,利用 Primer premier 5.0 设计 qRT-PCR 特异性引物(表 1),以 18 S rRNA 为内参基因^[19],进行荧光定量表达分析。qRT-PCR 反应总体积 20 μL,其中,SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 10 μL,上、下游引物各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL。除模板外先将其他成分混匀,分装后加入模板。所有操作均在冰浴上完成。qRT-PCR 反应条件:95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析,以鉴定 PCR 产物的特异性。

表 1 qRT-PCR 引物序列及扩增片段大小
Table 1 qRT-PCR primer sequences and amplified fragment size

引物	序列 (5'→3')	扩增大小/bp
HMGR-F	GCCCAGAATGTGGAGAGTTC	107
HMGR-R	ACAGTGCCTACCTCAATGGAT	
FPS-F	ACCTCAATCTACGGGCGATA	
FPS-R	CTGAACCTGTTTGCTTGCT	
UGPase-F	CTTGTTGATGGCTTCGTAGT	117
UGPase-R	GAATGGACTTGAAACGAGCAA	
18 S rRNA-F	CGTGTTGCGTCACTCGTTC	84
18 S rRNA-R	CCAAGCCTAACCAACCGTC	

2.2.3 荧光定量数据分析 仪器分析得出各个样品量 C_t 值, 使用相对定量 $\Delta\Delta C_t$ 方法, 以 18 S rRNA 作为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算相对表达量。

2.3 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件进行统计分析处理, 计数资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据比较选择单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 内生真菌对铁皮石斛幼苗多糖含量的影响

3 种内生真菌对铁皮石斛幼苗不同部位多糖含量的影响见表 2。与对照组相比, 铁皮石斛的根在不同内生真菌诱导下, 多糖含量均得到提高, 有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01); 铁皮石斛的茎部位多糖含量均得到提高, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$); 同样, 铁皮石斛叶部位中多糖含量也得到提高, 有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01)。另外, 对照组及各处理组铁皮石斛茎的多糖含量均高于叶的多糖含量, 而根部位的多糖含量最低。

3.2 内生真菌对铁皮石斛幼苗生物碱含量的影响

3 种内生真菌对铁皮石斛幼苗不同部位生物碱含量的影响见表 2。与对照组相比, 铁皮石斛的根在不同内生真菌诱导下, 生物碱含量均得到提高, 但除 GXRz3 诱导组外均不显著; 铁皮石斛的茎部位生物碱含量也得到提高, 除 GXRz2 诱导组外, 差异达到显著水平 ($P < 0.05$); 而铁皮石斛叶部位中生物碱含量虽得到提高, 但各诱导组差异均不显著。另外, 各诱导组铁皮石斛叶的生物碱含量均高于茎的生物碱含量, 而根部位的生物碱含量最低。

3.3 内生真菌对铁皮石斛活性成分合成途径中关键酶的诱导

3.3.1 RNA 质量分析 提取的铁皮石斛幼苗总 RNA

表 2 内生真菌对铁皮石斛幼苗多糖、生物碱含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effects of endophytic fungi on content of polysaccharides and alkaloids in *D. officinale* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	部位	多糖/%	生物碱/%
对照	根	1.849 ± 0.029 7	0.029 0 ± 0.000 79
	茎	3.454 ± 0.078 2	0.030 1 ± 0.000 69
	叶	3.002 ± 0.091 2	0.031 7 ± 0.001 11
GXRz2	根	1.995 ± 0.053 8*	0.029 5 ± 0.000 59
	茎	3.816 ± 0.057 2 ^{△△}	0.030 6 ± 0.000 58
	叶	3.268 ± 0.067 1 [▲]	0.031 8 ± 0.000 42
GXRz3	根	2.218 ± 0.081 6**	0.031 4 ± 0.000 80*
	茎	4.043 ± 0.068 9 ^{△△}	0.032 4 ± 0.000 51 [△]
	叶	3.629 ± 0.055 3 ^{▲▲}	0.033 0 ± 0.000 28
GXRz10	根	2.632 ± 0.059 6**	0.030 3 ± 0.000 43
	茎	4.148 ± 0.060 5 ^{△△}	0.031 8 ± 0.000 47 [△]
	叶	3.789 ± 0.111 0 ^{▲▲}	0.032 4 ± 0.000 23

与对照组根比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与对照组茎比较: [△] $P < 0.05$

^{△△} $P < 0.01$; 与对照组叶比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control root group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs control stem group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control leaf group

经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。如图 1 所示, 28S、18S、5S rRNA 的电泳条带完整且清晰, RNA 没有发生降解。经超微量分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 值在 1.9~2.1, 说明 RNA 纯度好, 满足后续实验要求。

3.3.2 qRT-PCR 各基因扩增 实验结果表明, UGPase、HMGR、FPS、18 S rRNA 基因 PCR 扩增曲线拐点清楚, 基线平而无上扬现象, 指数期明显, 模板有扩增。相对应的熔解曲线出现单一峰, 说明各组 PCR 扩增特异性较好 (图 2)。

3.3.3 内生真菌对铁皮石斛多糖合成途径 UGPase

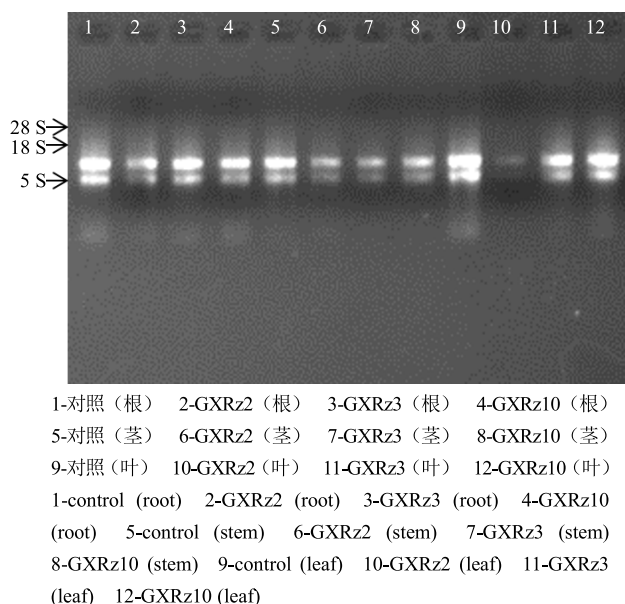


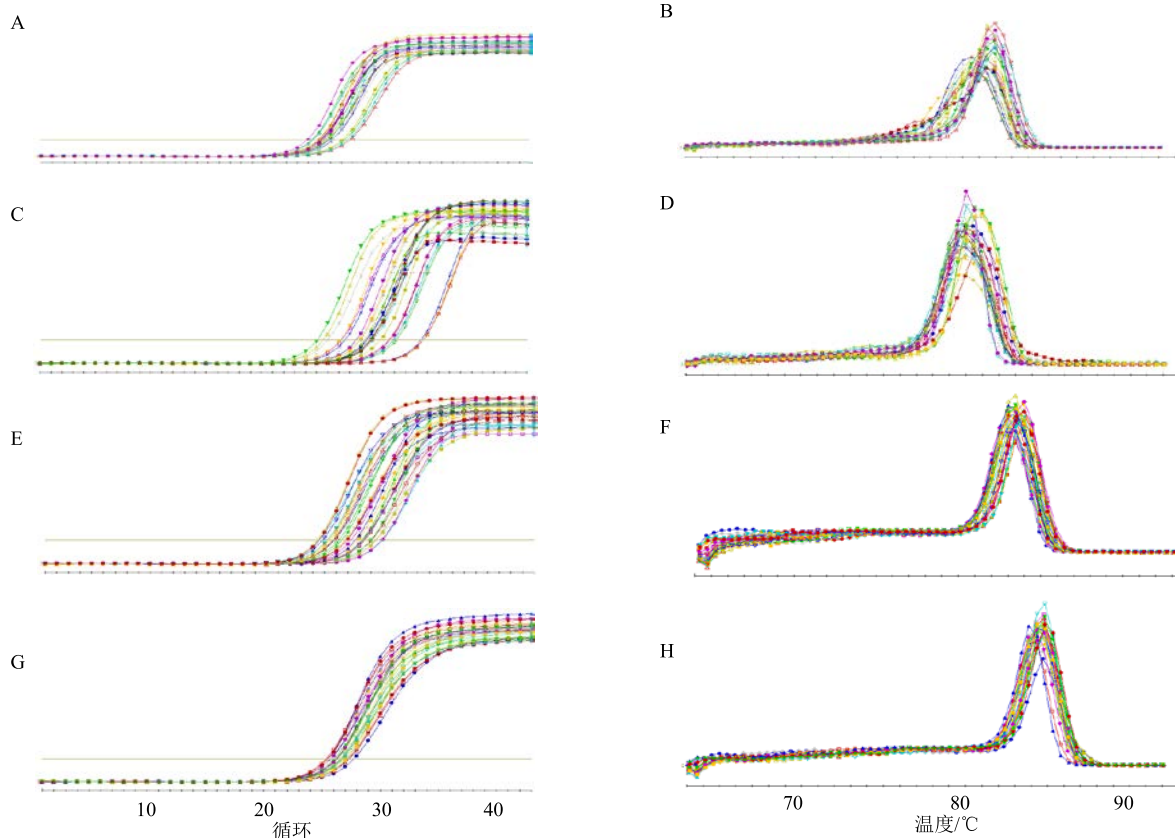
图 1 不同处理组总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA electropherogram of different treatment groups

基因表达的影响 在不同内生真菌处理下, 铁皮石斛幼苗 UGPase 基因都有表达, 相对表达量有差异 (图 3)。根中, 与对照组相比, 内生真菌 GXRz3 和 GXRz10 处理, UGPase 表达均显著受到促进, 有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中在内生真菌 GXRz10 处理下表达量最高; 内生真菌 GXRz2 处理下, UGPase 表达显著受到抑制, 有显著性差异 ($P < 0.01$)。

茎中, 不同处理对铁皮石斛 UGPase 基因表达情况与根中 UGPase 基因的影响趋势相一致。与对照组相比, 内生真菌 GXRz3 和 GXRz10 处理, UGPase 表达均显著受到促进, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 其中在内生真菌 GXRz10 处理下表达量最高; 内生真菌 GXRz2 处理下, UGPase 表达显著受到抑制, 有显著性差异 ($P < 0.01$)。

不同处理组对叶 UGPase 基因表达影响存在差异。与对照组相比, 内生真菌 GXRz3 和 GXRz10



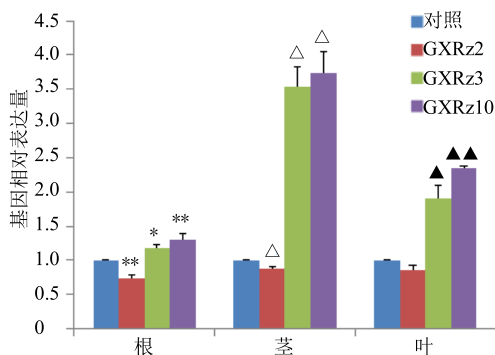
A-UGPase 基因扩增曲线 B-UGPase 基因溶解曲线 C-HMGR 基因扩增曲线 D-HMGR 基因溶解曲线 E-FPS 基因扩增曲线 F-FPS 基因溶解曲线 G-18 S rRNA 基因扩增曲线 H-18 S rRNA 基因溶解曲线
A-GPase gene amplification curve B-UGPase gene dissolution curve C-HMGR gene amplification curve D-HMGR gene dissolution curve E-FPS gene amplification curve F-FPS gene dissolution curve G-18 S rRNA gene amplification curve H-18 S rRNA gene dissolution curve

图 2 qRT-PCR 各基因扩增曲线与溶解曲线

Fig. 2 Amplification curve and dissolution curve of each gene by real-time PCR

处理, UGPase 表达均显著受到促进, 有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中在内生真菌 GXRz10 处理下表达量最高; 内生真菌 GXRz2 处理下, UGPase 表达受到抑制, 但无显著性差异。

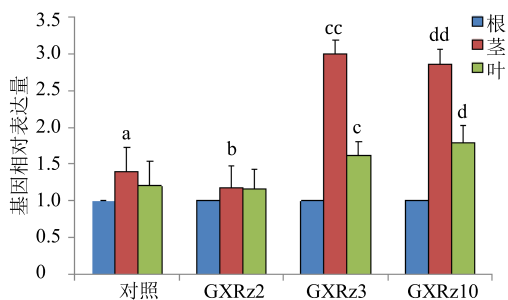
同一菌株处理后, 以根中的表达量为对照, 铁皮石斛幼苗不同组织部位间相对表达量显示, UGPase 基因在茎中的相对表达量最高, 叶次之, 根中最少 ($P < 0.05$ 、 0.01 , 图 4)。



与对照组根比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与对照组茎比较: Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$; 与对照组叶比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control root group; Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ vs control stem group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs control leaf group

图 3 不同处理组对 UGPase 基因表达的影响

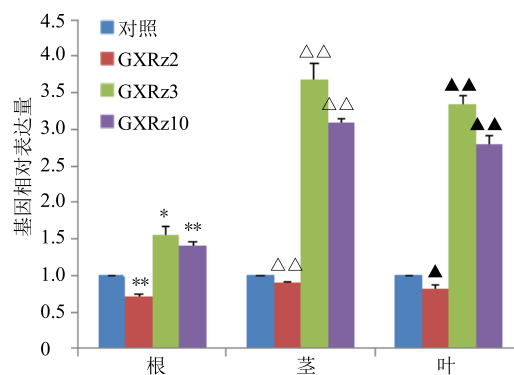
Fig. 3 Effect of different treatment groups on UGPase gene expression



与对照根比较: ^a $P < 0.05$; 与 GXRz2 根比较: ^b $P < 0.05$; 与 GXRz3 根比较: ^c $P < 0.05$ ^{cc} $P < 0.01$; 与 GXRz10 根比较: ^d $P < 0.05$ ^{dd} $P < 0.01$
^a $P < 0.05$ vs control root group; ^b $P < 0.05$ vs GXRz2 (root); ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$ vs GXRz3 (root); ^d $P < 0.05$ ^{dd} $P < 0.01$ vs GXRz10 (root)

图 4 铁皮石斛幼苗不同组织部位间 UGPase 基因相对表达量
Fig. 4 Relative expression of UGPase gene in different tissue parts of *D. officinale* seedlings

3.3.4 内生真菌对铁皮石斛生物碱合成途径 HMGR 基因表达的影响 在不同内生真菌处理下, 铁皮石斛幼苗的 HMGR 基因都有表达, 相对表达量有差异 (图 5)。根中, 与对照组相比, 内生真菌



与对照组根比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与对照组茎比较: Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$; 与对照组叶比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control root group; Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ vs control stem group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs control leaf group

图 5 不同处理组对 HMGR 基因表达的影响

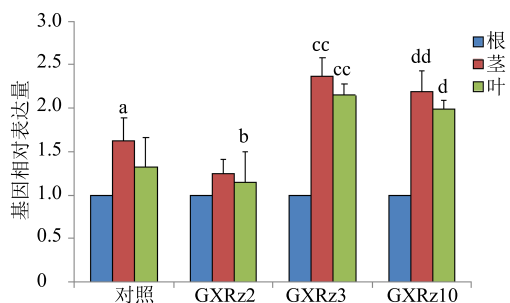
Fig. 5 Effect of different treatment groups on HMGR gene expression

GXRz3 和 GXRz10 处理, HMGR 表达均显著受到促进, 有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中在内生真菌 GXRz3 处理下表达量最高; 内生真菌 GXRz2 处理下, HMGR 表达显著受到抑制, 有显著性差异 ($P < 0.01$)。茎和叶中, 不同处理对铁皮石斛 HMGR 基因表达情况与根中 HMGR 基因的影响趋势较一致。与对照组相比, 内生真菌 GXRz3 和 GXRz10 处理, HMGR 表达均显著受到促进, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 其中在内生真菌 GXRz3 处理下表达量最高; 内生真菌 GXRz2 处理下, HMGR 表达显著受到抑制, 有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

同一菌株处理后, 以根中的表达量为对照, 铁皮石斛幼苗不同组织部位间相对表达量显示, HMGR 基因在茎中的相对表达量最高, 叶次之, 根中最少 ($P < 0.05$ 、 0.01 , 图 6)。

3.3.5 内生真菌对铁皮石斛生物碱合成途径 FPS 基因表达的影响 在不同内生真菌处理下, 铁皮石斛幼苗的 FPS 基因都有表达, 相对表达量有差异 (图 7)。根中, 与对照组相比, 内生真菌 GXRz3 和 GXRz10 处理, FPS 表达均显著受到促进, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 其中在 GXRz3 处理下表达量最高; GXRz2 处理下, FPS 表达受到抑制, 但无显著性差异。

在茎中 FPS 基因表达影响相似。与对照组相比, 内生真菌 GXRz3 和 GXRz10 处理, FPS 表达均显著受到促进, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 其中



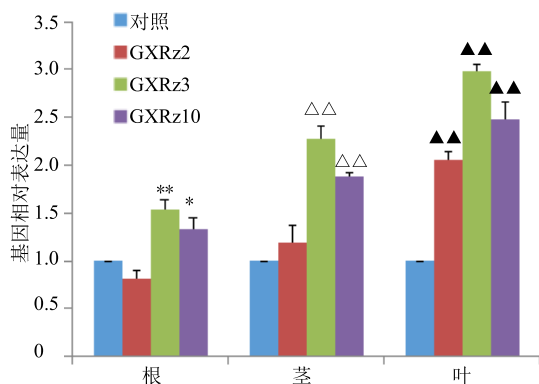
与对照根比较: ^a $P < 0.05$; 与 GXRz2 根比较: ^b $P < 0.05$; 与 GXRz3 根比较: ^{cc} $P < 0.01$; 与 GXRz10 根比较: ^d $P < 0.05$ ^{dd} $P < 0.01$
^a $P < 0.05$ vs control root group; ^b $P < 0.05$ vs GXRz2 (root); ^{cc} $P < 0.01$ vs GXRz3 (root); ^d $P < 0.05$ ^{dd} $P < 0.01$ vs GXRz10 (root)

图 6 铁皮石斛幼苗不同组织部位间 HMGR 基因相对表达量
 Fig. 6 Relative expression of HMGR gene in different tissue parts of *D. officinale* seedlings

在 GXRz3 处理下表达量最高, GXRz2 处理下, FPS 表达量同样得到提高, 但无显著性差异。

不同处理组对叶 FPS 基因表达影响存在差异。与对照组相比, 内生真菌 GXRz2、GXRz3 和 GXRz10 处理, FPS 表达均显著受到促进, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 其中在 GXRz3 处理下表达量最高。这一实验现象与不同处理对铁皮石斛茎中 FPS 基因的影响趋势较一致。

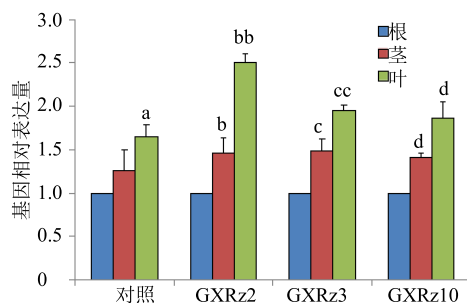
同一菌株处理后, 以根中的表达量为对照, 铁皮石斛幼苗不同组织部位间相对表达量显示, FPS 基因在叶中的相对表达量最高, 茎次之, 根中最少 ($P < 0.05$ 、 0.01 , 图 8)。



与对照组根比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与对照组茎比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与对照组叶比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$
^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs control root group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs control stem group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control leaf group

图 7 不同处理组对 FPS 基因表达的影响

Fig. 7 Effect of different treatment groups on FPS gene expression



与对照根比较: ^a $P < 0.05$; 与 GXRz2 根比较: ^b $P < 0.05$ ^{bb} $P < 0.01$;
 与 GXRz3 根比较: ^c $P < 0.05$ ^{cc} $P < 0.01$; 与 GXRz10 根比较: ^d $P < 0.05$
^a $P < 0.05$ vs control root group; ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ vs GXRz2 (root); ^c $P < 0.05$ ^{cc} $P < 0.01$ vs GXRz3 (root); ^d $P < 0.05$ vs GXRz10 (root)

图 8 铁皮石斛幼苗不同组织部位间 FPS 基因相对表达量
 Fig. 8 Relative expression of FPS gene in different tissue parts of *D. officinale* seedlings

4 讨论

在植物组织和细胞培养中, 利用真菌诱导子来提高目的次生代谢产物产量的研究在国内外都有相关的报道^[20-21]。它通过调节药用植物的代谢过程, 干预植物活性成分生物合成途径中关键酶的表达, 表现出促进或加速药用植物对某些活性成分的合成与积累^[22]。目前, 将内生真菌直接与宿主共培养或者诱导宿主产生更多活性代谢产物的研究逐渐增多^[23-24]。内生真菌与宿主细胞共同培养, 产生有益活性成分来增加宿主次生代谢产物的合成或积累是可行的, 因此, 利用内生真菌对药用植物活性成分积累的诱导效应, 可以促进植物细胞培养物生长、合成和积累次级代谢产物, 为研究植物细胞生长和次生代谢的调控提供新方法。

本实验将 3 株内生真菌处理铁皮石斛幼苗, 收获后测定幼苗不同组织部位多糖和生物碱含量的变化, 结果显示, 该 3 株内生真菌均能在一定程度上促进铁皮石斛活性成分多糖及生物碱的积累, 可能原因是由于内生真菌通过产生特定的代谢产物, 影响药用植物的代谢过程, 干预植物中某些活性成分的合成, 影响植物活性成分的积累。此外, 铁皮石斛不同部位之间活性成分含量存在差异, 铁皮石斛的总多糖含量较高, 主要集中于茎, 根中最低; 而生物碱含量较低, 主要存在于叶, 根中最低, 该实验结果与唐丽等^[25]研究结果较一致。

已有研究表明 UGP 基因是多糖生物合成的关键酶基因^[26-27]。目前铁皮石斛多糖生物合成的机制

还不是很清楚,铁皮石斛多糖的具体合成途径尚未见报道,但是植物间的多糖的合成途径基本相似,初步推测铁皮石斛多糖合成的关键酶可能是UGPase。本实验研究发现,除内生真菌GXRz2外,内生真菌GXRz3和GXRz10均可显著提高铁皮石斛UGPase基因的表达量,同时前文多糖含量分析结果表明,各菌株均可显著提高铁皮石斛的多糖含量,其中以能显著提高铁皮石斛基因表达的内生真菌GXRz10为最高。并且在茎中的UGPase基因的表达量与铁皮石斛多糖含量均高于根中和叶中,说明UGPase基因受有益内生真菌GXRz3、GXRz10的诱导,并与多糖含量相关,推测UGPase基因参与促进铁皮石斛多糖的合成与积累。

铁皮石斛生物碱具有倍半萜骨架结构,植物细胞萜类生物合成途径也可称为类异戊二烯生物合成途径,由甲羟戊酸(MVA)和5-磷酸脱氧木酮糖/2C-甲基-4-磷酸-4D-赤藓醇(DXP/MEP)途径组成,其中,MVA为细胞合成萜类、甾醇、激素等物质提供前体化合物,在植物次生代谢过程中发挥着十分重要的作用^[28]。HMGR和FPS是甲羟戊酸代谢途径中的两个关键酶基因^[29-30],也就是倍半萜类生物碱合成途径中的关键酶基因。根据石斛碱具有倍半萜骨架结构的特征,推测铁皮石斛生物碱的合成可能也受HMGR和FPS这2个酶调控。本实验研究发现,在不同内生真菌处理下,除内生真菌GXRz2外其他2株内生真菌均可显著提高铁皮石斛HMGR基因的表达量,而生物碱含量分析结果表明,各菌株均可提高铁皮石斛的生物碱含量,其中以能显著提高铁皮石斛基因表达的内生真菌GXRz3为最高。其次,HMGR基因在茎中的相对表达量最高,叶次之,根中最少,与林榕燕等^[31]在霍山石斛中研究结果相吻合,而生物碱含量为叶>茎>根,可能是铁皮石斛生物碱的生物合成涉及到多步生化反应,HMGR虽然是MVA途径的重要限速酶,但其催化作用处于较上游,其后还有多种酶的相互协同作用影响生物碱的合成;此外,铁皮石斛生物碱的合成除通过MVA途径外,还可能通过DXP/MEP途径。

本实验中,经过不同有益内生真菌诱导处理后,除内生真菌GXRz2外,内生真菌GXRz3和GXRz10均可显著提高铁皮石斛FPS基因的表达量,同时生物碱含量分析结果表明,各菌株均可提高铁皮石斛的生物碱含量,其中以能显著提高

铁皮石斛基因表达的内生真菌GXRz3为最高。并且在叶中的FPS基因的表达量与铁皮石斛生物碱含量均高于根中和茎中,说明FPS基因受有益内生真菌GXRz3、GXRz10的诱导,并与生物碱含量相关,推测FPS基因参与促进铁皮石斛生物碱的合成与积累。

为进一步深入探究内生真菌在铁皮石斛活性成分合成与积累中的作用,一方面,需要对获得的有益内生真菌进行发酵、分离纯化,筛选发酵代谢产物中具有诱导作用的活性单体成分,并研究活性单体成分对多糖和生物碱代谢途径中关键酶活性的影响;另一方面,还需研究铁皮石斛活性成分多糖和生物碱合成途径中其他代谢支路或合成途径中关键酶基因的调节作用,初步揭示铁皮石斛内生真菌促进铁皮石斛活性成分积累的机制。

参考文献

- [1] 洪森荣. “救命仙草”铁皮石斛研究进展 [J]. 生物学教学, 2010, 35(11): 6-7.
- [2] 宁英海, 顾敬文, 刘志萍, 等. 铁皮石斛活性成分及药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(13): 71-73.
- [3] 周佳, 周先丽, 梁成钦, 等. 铁皮石斛化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1292-1295.
- [4] 王再花, 李杰, 章金辉, 等. 石斛属植物多糖与生物碱含量的比较研究 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(24): 242-246.
- [5] 魏小勇. 铁皮石斛原球茎悬浮培养研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(4): 7-11.
- [6] 李艳冰, 林亮, 廖秋红, 等. 促进滇重楼皂苷类活性成分积累的内生真菌筛选 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2019, 34(1): 132-137.
- [7] 朱波, 刘京晶, 斯金平, 等. 铁皮石斛内生真菌对宿主组培苗生长与代谢成分的影响 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(9): 1602-1607.
- [8] Wan R L, Sun J, He T, et al. Cloning cDNA and functional characterization of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Dendrobium officinale* [J]. Biol Plant, 2017, 61(1): 147-154.
- [9] 张琳, 王继涛, 张大为, 等. 珍稀濒危药用铁皮石斛HMGR基因的克隆和特征分析 [J]. 药学学报, 2014, 49(3): 411-418.
- [10] 林榕燕. 霍山石斛离体培养物生物碱合成的生理与分子机制研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
- [11] 周琢艳, 刘玉寒, 刘文洪, 等. 铁皮石斛内生真菌的分离及其体外抑菌和抗肿瘤活性初步研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 533-538.
- [12] 侯晓强, 郭顺星. 铁皮石斛促生长内生真菌的筛选与

- 鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3232-3237.
- [13] 吴慧凤, 宋希强, 胡美姣. 铁皮石斛促生内生真菌的筛选与鉴定 [J]. 西南林业大学学报, 2011, 31(5): 47-52.
- [14] Chen X M, Dong H L, Hu K X, *et al.* Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic Fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe [J]. *J Plant Growth Regul*, 2010, 29(3): 328-337.
- [15] 李昆华, 杨丹, 苏娟, 等. 铁皮石斛根系促生内生真菌的筛选 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(1): 128-132.
- [16] 谢玲, 张雯龙, 蓝桃菊, 等. 1 株内生真菌的分离鉴定及其对铁皮石斛的促生作用 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 83-88.
- [17] 金辉, 许忠祥, 陈金花, 等. 铁皮石斛组培苗与菌根真菌共培养过程中的相互作用 [J]. 植物生态学报, 2009, 33(3): 433-441.
- [18] 陈晓梅. 真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长及次生代谢产物的影响 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004.
- [19] 张岗, 赵明明, 张大为, 等. 铁皮石斛实时定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(19): 1664-1668.
- [20] 张爽, 郭盛磊, 王谦博, 等. 刺五加内生真菌诱导子对宿主生长及抗氧化酶系统影响 [J]. 中药材, 2019, doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.
- [21] Salehi M, Moieni A, Safaie N. Elicitors derived from Hazel (*Corylus avellana* L.) cell suspension culture enhance growth and paclitaxel production of *Epicoccum nigrum* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12053.
- [22] Zhai X, Jia M, Chen L, *et al.* The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2017, 43(2): 238-261.
- [23] Lindblom S D, Wangeline A L, Valdez Barillas J R, *et al.* Fungal endophyte *Alternaria tenuissima* can affect growth and selenium accumulation in its hyperaccumulator host *Astragalus bisulcatus* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 20(9): 1213-1219.
- [24] Santamaria O, Lledó S, Rodrigo S, *et al.* Effect of fungal endophytes on biomass yield, nutritive value and accumulation of minerals in *Ornithopus compressus* [J]. *Microb Ecol*, 2017, 74(4): 841-852.
- [25] 唐丽, 李菁, 龙华, 等. 不同生长龄铁皮石斛茎与叶中总多糖、总生物碱及总黄酮含量的差异 [J]. 广东农业科学, 2015, 42(8): 17-21.
- [26] Zhou J, Bai Y, Dai R, *et al.* Improved polysaccharide production by homologous Co-overexpression of phosphoglucomutase and UDP glucose pyrophosphorylase genes in the Mushroom *Coprinopsis cinerea* [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(18): 4702-4709.
- [27] 肖桂青, 卢向阳, 张海文. 植物尿苷二磷酸糖焦磷酸化酶研究进展 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 1149-1155.
- [28] Liao P, Hemmerlin A, Bach T J, *et al.* The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(5): 697-713.
- [29] Heuston S, Begley M, Davey MS, *et al.* HmgR, a key enzyme in the mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis, is essential for growth of *Listeria monocytogenes* EGDe [J]. *Microbiology*, 2012, 158(Pt 7): 1684-1693.
- [30] Kim Y K, Kim Y B, Uddin M R, *et al.* Enhanced triterpene accumulation in *Panax ginseng* hairy roots overexpressing mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase and farnesyl pyrophosphate synthase [J]. *ACS Synth Biol*, 2014, 3(10): 773-779.
- [31] 林榕燕, 赖钟雄. 霍山石斛 HMGR 基因的克隆及其定量表达分析 [J]. 热带作物学报, 2014, 35(10): 1975-1983.