· 综述 ·

真菌对植物的诱导作用及其在天然药物研究上的应用

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: 介绍了真菌对植物诱导作用中, 其诱导子的类别、信号转导模式及其在植物次生代谢和天然药物应用研究等方面的国内外研究进展。

关键词: 真菌诱导子; 诱导作用; 天然药物

中图分类号: R282.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)09-0855-03

Fungal elicitation to plants and its application in natural medicines

HO U Pi-yong, GUO Shun-xing

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Key words fungal elicitor; elicitation; natural medicines

真菌对植物的诱导作用 (elicitation) 研究始于植物真菌病害的研究。为了排除直接用病原感染植物对观察植物反应现象的干扰, 人们选用能代表病原的一定特性, 而又失去病原感染活力的一类物质作为诱导子 (elicitor), 诱导植物产生反应来研究真菌及其他生物对植物的作用, 这便是诱导作用的研究范畴。诱导作用的研究主要集中在真菌对植物的作用上。真菌的诱导作用在研究植物与真菌相互作用的植物病理学机制和有效提高植物中天然产物的产率两个领域受到广泛的关注。尤其是分子生物学及基因工程等新兴研究手段的应用, 使这一研究取得了新的进展。

1 用于诱导作用的真菌诱导子

已经有大量真菌来源的诱导子被用于对植物的诱导作用的研究。常用的真菌诱导子是真菌的表面结构性成分及分泌的代谢物。它们可以是真菌的菌丝体、菌丝体降解产物、发酵液、真菌分泌物等。从结构上分主要包括: 多糖、脱乙酰几丁质、 β -1-3 葡聚糖、乙酰葡萄糖醛酸、糖蛋白、蛋白质、短肽、不饱和脂肪酸等^[1]。一些用于真菌诱导子研究的真菌类型见表 1。

有一类真菌分泌蛋白 (elicitins) 是由疫霉属或腐霉属真菌分泌的一种小分子蛋白, 可以诱导烟草类植物产生局部坏死 (necrosis), 并且使植物产生抗性, 其作为诱导子的作用越来越为人们所重视。有多种 elicitins 从真菌中分离出来, 其中研究较为详细的是从马铃薯晚疫霉分离的 cryptogin, 它的晶体结构显示其作为一个锁钥结构的钥匙而构型, 通过结合甾体物质而使植物细胞受体识别^[2]。Elicitins 在与细胞膜发生作用之前, 还可以与植物细胞壁调节蛋白发生作用。这

两种作用的制衡可能是导致了植物对 elicitins 的敏感或不感的原因^[3]。

表 1 用于诱导作用的真菌

真菌种类	作用植物 (次生代谢物)	诱导子成分
蜜环菌 <i>Armillaria mallea</i> (vahl.) Fr.	延胡索	hyphae
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i> V. T.	红豆杉 (taxol)	hyphae
米曲霉 <i>A. oryzae</i> (Ahlbury) Cohn	新藏假紫草	hyphae
葡萄孢霉属 <i>Botrytis</i> Pers. ex Fr.	长春花 (sabinarine)	hyphae
番茄芽枝霉 <i>Cladosporium fulvum</i> Cke.	番茄 (rishitin)	AV R9
烟草炭疽霉 <i>C. nicotianae</i> Averna-Sacca	西洋参	hyphae
翠菊萎萎镰孢霉 <i>Fusarium conglutinans</i> Wr. var. <i>calistephi</i> Beach	孔雀草	chitosan
罗氏毛霉 <i>Mucor ramosissimus</i> Moller	大豆 (genistein)	hyphae
葡枝根霉 <i>Rhizopus stolonifer</i> Ehrenb et Fr.	黄花蒿 (artemisinin)	hyphae
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn.	大豆	hyphae
少雄腐霉 <i>Pythium oligandrum</i> Drechsler.	烟草	oligandrin
辣椒疫霉 <i>Phytophthora capsici</i> (Leon.) Sacc.	烟草	eidin-like
樟疫霉 <i>P. cinnamomi</i> Rands	烟草	phospholipases cinnamomin
隐地疫霉 <i>P. cryptogea</i> Pethyb. et Laff.	烟草	cryptogin
马铃薯晚疫霉 <i>P. infestans</i> (Mont.) de By.	烟草	IN F1
大子疫霉 <i>P. megasperma</i> Drechs.	烟草	β -megaspermin
棕疫霉 <i>P. palmivora</i> Butler	橡皮树	palmivorein
寄生疫霉 <i>P. parasitica</i> Dastur	欧芹 (furanocoumarin)	cell wall
大丽菊轮枝霉 <i>Verticillium dahliae</i> Kelb.	棉花 (cadinene)	hyphae
酵母	苜蓿	glycopeptide

2 诱导作用的机制

多年以来人们对真菌与植物的交互机制进行了广泛而

* 收稿日期: 2001-10-31

作者简介: 侯丕勇, 男, 1993年毕业于沈阳药学院中药系, 2000年获得南开大学理学硕士学位。现为中国医学科学院中国协和医科大学在读博士研究生, 主要从事天然药物资源及相关分子生物学特性的研究。

* 通讯作者

深入的研究,主要涉及的领域包括:诱导作用中的细胞信号转导途径,诱导子对植物次生代谢的影响等。

2.1 诱导作用中的细胞信号转导

2.1.1 真菌诱导子的受体:诱导作用相关的植物受体模式和细胞内信号转导途径细节目前还不清楚。植物中的诱导子受体可能是一类与动物中任何一类细胞膜受体都不同的物质。要明确细胞受体模式,需要确定诱导子亲和蛋白的存在,并了解相关的信号转导级联。已经有几种植物细胞膜上的诱导子亲和蛋白被分离出来(表2)

表2 几种植物细胞膜上的诱导子亲和蛋白

亲和蛋白相对分子质量	诱导子类型	来源植物	结构特点
1.5 × 10 ⁶	hepta β -glucoside	sobean	dimer of 75KD
7 × 10 ⁵	chitin	rice	
9. K × 10 ⁵	peptides	parsley	
1.93 × 10 ⁶	elicin	tobacco	glycoprotein

2.1.2 类似于G蛋白介导的信号转导模式:G蛋白是动物细胞信号转导途径中重要物质。尽管没有证据显示植物中有类似于动物中的三聚体G蛋白的存在,但真菌对植物的诱导作用确实有G蛋白的参与。G蛋白激活剂百日咳毒素和霍乱毒素可以促进菜豆和大豆悬浮细胞对真菌诱导子的应答反应^[4]。真菌诱导番茄细胞中的Dna λ 族基因LeJ1增加表达,而LeJ1与G蛋白 α 亚基有明显的亲和作用^[5]。而在烟草细胞中cryptogein诱导的1.85 × 10⁶和2.05 × 10⁵的蛋白,能够与人类G蛋白rac2的抗体探针发生免疫反应^[6]。

2.1.3 离子通道:钙离子、质子内流和氯离子、钾离子外流是真菌诱导子作用下的植物细胞共有的现象。Nurnberger^[7]提出欧芹可能有一种细胞膜受体,在来自大豆疫霉的4.2 × 10⁶的糖蛋白诱导子作用下,起到调节细胞内外离子流动的作用。离子的流动引起蛋白的磷酸化,进而引起防卫基因的表达。Chung^[8]分离了一种植物细胞膜Ca²⁺-ATPase,不同于动物的Ca²⁺-ATPase,可以被真菌诱导子在大豆细胞中迅速和大量诱导。

2.1.4 类似于酶耦联受体介导的信号转导模式:植物细胞中有类似于动物细胞受体蛋白激酶(RPKs)的受体样蛋白激酶(RLKs)。真菌病原基因AVR9诱导番茄细胞产生一个高度糖苷化的跨膜RLKs蛋白,与RPKs不同的是该蛋白没有胞内的蛋白激酶的结构^[9]。最为接近RPKs的是水稻中提取的一个细菌病原诱导基因Xa21。该基因对应的蛋白产物同时含有胞外LRR受体结构和胞内的丝氨酸/苏氨酸结构^[10]。

2.1.5 真菌诱导的气体信号:真菌感染还可以导致植物间气体信号的传导。有证据显示哺乳动物体内重要的起信号传导和防卫作用的分子NO在植物的抗病反应中也起着重要的作用。cryptogein可引起烟草细胞内不同部位NO强烈的爆发。这种爆发在几分钟之内发生,类似于活性氧的爆发^[11]。

2.2 诱导作用对次生代谢物合成途径的影响:很多植物抗毒素是珍贵的天然药物,因此,真菌的诱导作用在植物次生代谢机制方面的研究显得非常重要。这类研究主要涉及苯丙烷类和类异戊二烯两类植物次生代谢产生的生物合成途径。

2.2.1 苯丙烷类生物合成途径:苯丙氨酸解氨酶(PAL)和查尔酮合成酶(CHS)是苯丙烷类生物合成途径的关键酶。目前为止,已经有很多种植物的依赖真菌诱导的PAL和CHS基因被克隆。烟草PAL基因为1个由3~4个不连续基因组成的基因家族编码。在真菌诱导子处理后,该基因则被强烈地诱导^[12]。Pisum sativum基因组中有2个CHS基因串联排列,中间隔1个88nt的内含子。基因中含CCTACC motif,该基因能够被真菌诱导子诱导^[13]。豌豆PAL和CHS基因序列都有在TATA近侧区的At-rich部分存在,至少有一个细胞核内因子与该部位稳定地结合^[14]。

有些真菌虽然能激活PAL的活性,但对整个苯丙烷类生物合成途径的激活并不起作用。真菌Mycosphaerella pinodes中既有PAL和CHS基因的诱导子,也有它们的阻遏子存在^[15]。

2.2.2 类异戊二烯生物合成途径:类异戊二烯是自然界中重要的一类天然化合物。天然药物中萜类成分就是由这一途径合成的。用大丽菊轮枝霉诱导子处理棉花可显著增强法呢基二磷酸合成酶(FPS)和杜松烯合成酶(CAD)的表达,同时使得半萜醛在细胞中的积累增加^[16]。EAS4是烟草倍半萜环化酶的启动子基因,将之与报告基因相连,在真菌诱导下,报告基因高水平表达。但是在SA与MeJA作用下,则没有表达,在H₂O₂作用下只有低水平的表达^[17]。MeJA和真菌诱导子对烟草细胞倍半萜烯的代谢环节产生不同的影响。真菌诱导的反应快速而剧烈,但产生合成倍半萜烯类的植物抗毒素的关键酶的过程短暂^[18]。

3 真菌诱导作用在天然药物研究上的应用

将真菌的诱导作用应用于天然药物的产生,一直是个热门研究领域。尤其在利用植物组织或细胞培养生产天然药用成分方面,诱导作用有着非常好的应用前景。

紫杉醇在红豆杉细胞悬浮培养物中几乎检测不到,而加上橘青霉菌丝体提取物,可以使指数生长期的细胞的紫杉醇含量显著提高,在培养细胞的指数生长末期或静止期加入诱导子对细胞次生代谢产物产量有好的增加效果^[19]。内生真菌黑曲霉作为诱导子,可以使红豆杉中的紫杉醇产量比对照高7倍^[20]。真菌诱导子不仅使紫杉醇产量提高,还可以促进紫杉醇向培养基中分泌^[21]。

真菌诱导子处理长春花悬浮培养细胞,可以使长春花碱的产量提高2~5倍。其中最好的加入时间是细胞继代培养7d后用诱导子处理3d^[22]。不同的悬浮培养细胞系对同一真菌的同一剂量的敏感程度不同。曲霉与化学诱导子混合使用使阿吗碱、长春花碱的产量得到相对较大的提高^[23]。

延胡索愈伤组织细胞培养物的生物碱随着细胞的增殖而逐渐积累,在细胞生长进入静止期后仍然继续积累。在蜜环菌诱导子作用下,生物碱的合成能力,尤其是具有抗菌、消炎作用的生物碱的合成能力显著的增强^[24]。

通过真菌的诱导作用还可使一些药用植物产生新的药用成分。真菌诱导子可使得药用植物Piqueria trinervia培养细胞分泌的单萜类化合物piquerol A消失而分泌新单萜类

化合物,这些新分泌的化合物有抗真菌的作用^[25]。墨西哥柏树中的大叶崖柏素是一种新的有抗菌活性的托酚酮,真菌诱导的悬浮培养细胞中的大叶崖柏素比对照含量高4倍^[26]。

不同真菌的诱导能力各不相同。同样用刺盘孢菌、尖孢镰刀菌、黑曲霉、米曲霉做诱导子,刺盘孢菌对西洋参的效果好;黑曲霉对紫草的效果好^[27,28]。真菌的诱导作用对于解决生长困难的药用植物药源的问题也有积极的意义。用肉苁蓉中分离出的真菌菌丝体制成的诱导子能够显著提高肉苁蓉的愈伤组织中的氨基酸含量。与野生植株相比,7种人体必需氨基酸均高于原植株^[29]。

4 结语

真菌的诱导作用具有很高的理论研究和实际应用价值,相信这一领域的发展对有效开发植物资源将起到很大的推动作用。

参考文献:

- [1] 宁文,曹日强. 真菌诱导物在植物次生代谢中的调节作用[J]. 植物生理学通讯, 1992, 29(5): 321-329.
- [2] Demaret S, Demaret J P, Brunie S. A possible binding path of ergosterol within elicitors revealed by molecular dynamics [J]. J Biomol Struct Dyn, 2000, 18(3): 453-460.
- [3] Legendre L, Heinstejn P F, Low P S. Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 20140-20147.
- [4] Gregg N. Investigation of a putative interaction between T Galphal, a heterotrimeric G protein alpha subunit, and a DnaJ homologue in tomato [J]. MAI, 2000, 38(6): 1546.
- [5] Kieffer F, Simon-Plas F, Maume B F, et al. Tobacco cells contain a protein, immunologically related to the neutrophil small G protein Rac2 and involved in elicitor-induced oxidative burst [J]. FEBS Lett, 1997, 403(2): 149-153.
- [6] Nurnberger T, Nennstiel D, Jabs T, et al. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses [J]. Cell, 1994, 78(3): 449-460.
- [7] Chung W S, Lee S H, Kim J C, et al. Identification of a calmodulin regulated soybean Ca²⁺-ATPase (SCAI) that is located in the plasma membrane [J]. Plant Cell, 2000, 12(8): 1393-1407.
- [8] Piedras P, Rivas S, Droge S, et al. Functional, c-myc-tagged Cf-9-resistance gene products are plasma-membrane localized and glycosylated [J]. Plant J, 2000, 21(6): 529-536.
- [9] Song W Y. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21 [J]. Science, 1995, 270: 1804-1806.
- [10] Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, et al. In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco [J]. Plant J, 2000, 23(6): 817-824.
- [11] Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B, et al. Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor [J]. Plant physiology, 1994, 106(3): 877-886.
- [12] An C, Ichinose Y, Yamada T, et al. Organization of the genes encoding chalcone synthase in *Pisum sativum* [J]. Plant Mol Biol, 1993, 21(5): 789-803.
- [13] Lois R, Dietrich A, Hahlbrock K, et al. Phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements [J]. EMBO J, 1989, 8(6): 1641-1648.
- [14] Kato H, Wada M, Muraya K, et al. Characterization of nuclear factors for elicitor-mediated activation of the promoter of the pea phenylalanine ammonia-lyase gene 1 [J]. Plant Physiol, 1995, 108(1): 129-139.
- [15] Yamada T, Snipasertsak P, Kato H, et al. Functional analysis of the promoters of phenylalanine ammonia-lyase genes in pea [J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35(6): 917-926.
- [16] Liu C J, Heinstejn P, Chen X Y. Expression pattern of genes encoding farnesyl diphosphate (FPS) synthase and sesquiterpene cyclase in cotton suspension-cultured cells treated with fungal elicitors [J]. Mol Plant Microbe Interact, 1999, 12(12): 1095-1104.
- [17] Yin S, Mei L, Newman J, et al. Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression. Characterization of an elicitor and pathogen-inducible promoter [J]. Plant Physiol, 1997, 115(2): 437-451.
- [18] Mandujano-Chavez A, Schoenbeck M A, Ralston L F, et al. Differential induction of sesquiterpene metabolism in tobacco cell suspension cultures by methyl jasmonate and fungal elicitor [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 381(2): 285-294.
- [19] 李家儒,刘曼西. 桔青霉诱导子对红豆杉培养细胞中紫杉醇生物合成的影响 [J]. 植物研究, 1998, 18(1): 18-83.
- [20] Wang C, Wu J, Mei X. Enhancement of Taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55(4): 404-410.
- [21] Christen A A, Gibson D M, Bland J. Production of taxol or taxol-like compounds in all culture [P]. US patent 5019504, 1991.
- [22] Zhao J, Zhu W, Hu Q. Enhanced catharanthine production in catharanthus roseus cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors [J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 28(7-8): 673-681.
- [23] Zhao J, Fujita K, Yamada J, et al. Improved beta-thujaplicin production in Cupressus lusitanicus suspension cultures by fungal elicitor and methyl jasmonate [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55(3): 301-305.
- [24] 张荫麟,朱敏,赵保华. 蜜环菌诱导子对延胡索培养物的生物碱积累的影响 [J]. 植物学报, 1992, 34(9): 658-661.
- [25] Saad I, Diaz E, Chavez I, et al. Antifungal monoterpene production in elicited cell suspension cultures of *Piqueria trinervia* [J]. Phytochemistry, 2000, 55(1): 51-57.
- [26] Zhao J, Zhu W, Hu Q. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *catharanthus roseus* suspension cell culture [J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 28(7-8): 666-672.
- [27] 刘长军,侯嵩生. 真菌诱导子对悬浮培养西洋参细胞的生理效应 [J]. 武汉植物研究, 1998, 14(3): 240-246.
- [28] 刘长军,侯嵩生. 真菌诱导子对新疆紫草悬浮培养细胞的生长和紫草素合成的影响 [J]. 植物生理学学报, 1996, 24(1): 6-10.
- [29] 李森,吴新,董效成,等. 茄菌诱导子对肉苁蓉愈伤组织氨基酸含量的影响 [J]. 西北药学杂志, 1998, 13(6): 247-248.