

内生真菌对刺五加种子萌发过程激素及酶含量变化的影响

沈宏伟¹, 张爽¹, 付士朋¹, 李佳宾¹, 刘悦¹, 崔红花², 郭盛磊^{1,3}, 王振月^{1*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

3. 黑龙江珍宝岛药业 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 158400

摘要: **目的** 研究内生真菌破除刺五加种子休眠的方法及其内源激素和酶的变化规律。**方法** 用内生真菌感染刺五加种子后对种子进行变温层积处理, 利用高效液相色谱法测定刺五加种子中内源激素赤霉素(GA₃)、脱落酸(ABA)、吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)及水杨酸(SA)的含量, 并且检测体内酶[过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、丙二醛(MDA)]活力变化。**结果** 5株刺五加内生真菌对种子萌发有明显的促进作用, 在变温层积过程中, GA₃、IAA、IBA、SA均有不同程度的上升, ABA呈现明显的下降趋势。POD活力和MDA水平显著下降, CAT和SOD的酶活力显著上升。**结论** 内生真菌可调控刺五加种子激素和酶的含量, 促进种子萌发。

关键词: 刺五加种子; 内生真菌; 内源激素; 酶活力; 解除休眠

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)03-0716-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.027

Rule of endophytic fungi on changes in content of plant hormones and enzyme during seed germination

SHEN Hong-wei¹, ZHANG Shuang¹, FU Shi-peng¹, LI Jia-bin¹, LIU Yue¹, CUI Hong-hua², GUO Sheng-lei^{1,3}, WANG Zhen-yue¹

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

3. Postdoctoral Programme of Heilongjiang Zbd Pharmaceutical Co., Ltd., Harbin 158400, China

Abstract: Objective To study the methods of endophytic fungi to break the dormancy of *Acanthopanax senticosus* seeds and the changes of endogenous hormones and enzymes. **Methods** The seeds of *A. senticosus* were stimulated with endophytic fungi, then treated under thermophilic stratification. The content of endogenous hormones such as GA₃, ABA, IAA, IBA, and SA, in the seeds of *A. senticosus* were tested by HPLC. And the changes of its *in vivo* enzymes (CAT, SOD, POD, and MDA) activity were tested. **Results** Five strains of endophytic fungi from *A. senticosus* apparently promoted the germination of seeds. In the process of fluctuating temperature stratification, the content of GA₃, IAA, IBA, and SA were increased, at the same time, the content of ABA was reduced. The activity of POD and MDA enzymes was significantly reduced, and the enzyme activities of CAT and SOD increased obviously. **Conclusion** It is suggested that endophytes have significant effect on the content of seed hormones and enzymes, in addition endophytes could promote the initiation of seed germination.

Key words: seeds of *Acanthopanax senticosus*; endophytic fungi; endogenous hormones; enzyme activity; break dormancy

刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms 为五加科五加属植物, 是我国东北地区的道地药材, 入药部分为其干燥根和根茎或茎^[1]。其主要分布于东北 3 省地区, 次产区有山西、陕西、河

北等地。刺五加含有苷类、多糖、微量元素及氨基酸类成分, 具有免疫调节、抗肿瘤、抗辐射、抗损伤及抗疲劳作用, 还可治疗心脑血管疾病、糖尿病、神经衰弱等症^[2], 中医用作强壮剂, 具有益气健脾、

收稿日期: 2018-07-06

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划“东北森林区道地林药资源生态开发利用技术与示范”(2016YFC0500303); 黑龙江省国家科技重大专项和重点研发项目省级资助(GX17C006); 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z17208)

作者简介: 沈宏伟(1993—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为中药资源与开发研究。Tel: 17745164070 E-mail: 724165148@qq.com

*通信作者 王振月(1955—), 男, 教授, 研究方向为中药资源学。Tel: (0451)87266873 E-mail: wangzhen_yue@163.com

补肾安神的功能。

刺五加被中国植物红皮书列为渐危物种^[3], 自然状态下生殖能力弱, 无性繁殖困难。刺五加种子具有先天休眠的特性, 在自然条件下, 种子需要 2 年的时间才有近 10% 的萌发率。近年来有许多研究致力于提高刺五加种子发芽率, 大多集中利用外源激素或层积处理的方法^[4]。为了响应绿色种植, 保护生态环境, 实现中药种植的可持续发展, 本实验从内生真菌促进种子萌发及种苗的生长发育角度出发, 利用植物与内生真菌之间的互利共生的关系^[5-6], 对刺五加种子进行内生真菌侵染结合变温层积处理, 筛选出对刺五加种子萌发具有促进作用的菌株, 监测刺五加种子中激素含量及酶活力的变化, 探索种子的萌发的机制, 提高刺五加发芽势及发芽率, 为刺五加资源发展及生态资源保护奠定基础。

1 材料与仪器

刺五加种子采自七台河, 由黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms 的种子, 种子在室温干燥条件下保存; 菌株为刺五加根、茎和叶分离得到的内生真菌, 具体见表 1; 马铃薯葡萄糖肉汤 (PDB) 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 水 1 L; Wasters 高效液相色谱仪 (美国 Wasters 公司); 激素对照品吲哚乙酸 (IAA)、赤霉素 (GA₃)、脱落酸 (ABA)、吲哚丁酸 (IBA)、水杨酸 (SA) 均购自上海澄绍生物技术有限公司; 新洁尔灭 (山东益家康消毒制品有限公司, 20170302); 过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

2 方法

2.1 内生真菌菌悬液的制备

将表 1 中菌种接种于 PDB 液体培养基震荡培养, 28 °C 暗培养 1 周, 得到内生真菌混合菌悬液。

表 1 供试内生真菌株

Table 1 Eleven endophytic fungi tested

菌株	菌种	菌株	菌种
CWJ-1	<i>Phomopsis vaccinii</i>	CWJ-7	<i>Cylindrocarpon olidum</i>
CWJ-2	<i>Fusarium tricinctum</i>	CWJ-8	<i>Leptosphaerulina australis</i>
CWJ-3	<i>Fungal endophyte</i>	CWJ-9	<i>Fusarium acuminatum</i>
CWJ-4	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	CWJ-10	<i>Cladosporium cladosporioids</i>
CWJ-5	<i>Penicillium chrysogenum</i>	CWJ-11	<i>Aspergillus fumigatus</i>
CWJ-6	<i>Alternaria alternata</i>	CWJ-12	<i>Penicillium oxalicum</i>

2.2 刺五加种子与内生真菌共生

精密称取饱满刺五加种子 50 g, 用 75% 酒精消毒 30 s, 用无菌水冲洗 3 次, 然后用 10% 次氯酸钠溶液消毒 10 min, 无菌水冲洗 5 次。将刺五加种子放入内生真菌悬液中 120 r/min 震荡培养 7 d^[7], 取出消毒后进行层积处理。同时设空白对照组, 称量消毒方法同上, 直接进行层积处理。GA₃ 对照组, 称量消毒方法同上, 10% GA₃ 处理 24 h, 进行层积处理^[4]。

2.3 变温层积处理

将刺五加种子平铺于经高压灭菌的湿河沙中, 种子与湿河沙按体积比 1:2 混匀, 装入大花盆中进行混沙层积催芽, 保持湿度 50%~70%, 根据湿度变化适量浇水, 水中加 1% 新洁尔灭。

层积条件为第 1 阶段: 层积温度保持在 20~25 °C, 时间为 10 周, 每日翻动 1 次; 第 2 阶段: 层积温度保持在 10~15 °C, 时间为 6 周, 2~3 d 翻 1 次; 第 3 阶段: 层积温度保持在 0~5 °C, 时间为 9 周。

2.4 胚率的测定

在层积时间 0、20、50、80、100、130 d, 每次分别取 30 粒刺五加种子, 沿其种胚中央切成两半, 在实体解剖镜下测定胚及胚乳的长度, 并计算其平均胚率, 胚率 = 胚长/胚乳长^[8]。

2.5 内源激素的提取与测定

2.5.1 内源激素的提取 在层积时间 0、20、50、80、100、130 d 时分别精密称取 1.00 g 刺五加种子, 用液氮研磨后, 加入 20 mL 含有抗氧化剂 (50 mg/L 2,6-二叔丁基对甲酚、0.2 g/L 抗坏血酸) 的 80% 甲醇, 4 °C 中低温避光提取, 分 2 次提取, 每次 12 h。滤过, 合并 2 次滤液。滤液用等体积石油醚萃取 3 次, 弃去石油醚相, 减压浓缩去掉甲醇, 用蒸馏水溶解残渣, 调节 pH 2.5~2.8。加入 0.5 g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP), 吸附震荡 30 min, 再用等体积醋酸乙酯萃取 3 次, 取醋酸乙酯层减压蒸馏后用 2 mL 色谱甲醇溶解, 0.22 μm 滤膜滤过, 作为供试液^[9]。

2.5.2 内源激素的测定 色谱柱为 Thermo C₁₈ 分析柱 (250.0 mm × 4.6 mm, 5 μm), 预柱 Phenomenex ODS-C₁₈ (4.0 mm × 3.0 mm); 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液^[10]。梯度洗脱: 0~30 min, 5%~80% 甲醇; 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 35 °C; 进样量 20 μL, 检测波长 296 nm, 采用外标法定量。

2.6 酶的提取与测定

准确称量刺五加种子 0.5 g 各 3 份，按照质量与体积比 1 : 9 加入 4.5 mL 的生理盐水，液氮研磨制备匀浆，2 500~3 000 r/min，离心 10 min，取上清液待用。采用南京建成试剂盒法，分别在层积时间 0、20、50、80、100、130 d 时测定其各种酶的含量。

3 结果与分析

3.1 内生真菌侵染对种子萌发的影响

变温层积过程中，刺五加种子胚率变化、发芽率与层积时间见表 2。从表 2 中可以看出，种

胚生长速率与层积时间呈正相关，胚率随着层积时间的延长而逐渐增大。有 5 株内生真菌(CWJ-4、CWJ-6、CWJ-7、CWJ-10、CWJ-12) 可显著提高种子胚率及发芽率。在 130 d 分别比空白对照组种子胚率增加了 48.00%、100.00%、36.00%、64.00%、22.00%，发芽率分别增加了 92.19%、145.31%、85.16%、128.91%、119.53%；比 GA₃ 对照组增加了 25.42%、69.49%、15.25%、38.98%、3.39%，发芽率分别增加了 28.13%、62.76%、23.44%、52.60%、46.35%。刺五加种子发育进程见图 1。

表 2 刺五加种子变温层积中胚率和发芽率的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Embryo ratio and germination rate during fluctuating temperature stratification of *A. senticosus* seeds ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌株	胚率/%						发芽率/%
	0	30 d	50 d	80 d	100 d	130 d	
CWJ-1	0	1.850±0.041	4.150±0.122	9.670±0.812	28.960±1.061	46.000±2.449	12.800±0.002
CWJ-2	0	1.900±0.016	4.560±0.141	10.230±0.816	29.800±0.189	49.000±0.816	19.200±0.010
CWJ-3	0	1.400±0.041*	4.030±0.037*	9.380±0.245	27.460±0.816	45.300±0.816	12.000±0.008**
CWJ-4	0	12.130±0.008***	34.000±3.266	36.000±2.940	43.000±2.494	74.000±0.816*	49.200±0.002*
CWJ-5	0	1.800±0.082	4.230±0.081	10.130±0.748	29.240±0.081	48.000±0.408	14.800±0.001
CWJ-6	0	18.180±0.816	50.000±4.109	55.560±0.653***	66.670±2.494*	100.000±0.000*	62.800±0.023*
CWJ-7	0	10.150±0.147	33.000±0.245	35.000±0.081	42.000±0.329	68.000±0.082	47.400±0.011**
CWJ-8	0	1.130±0.016*	3.600±0.245	8.360±0.816	25.520±0.833	40.560±0.081	8.000±0.029
CWJ-9	0	0.900±0.707	3.000±2.449	7.240±1.632	20.420±1.633	39.240±0.816	42.800±0.019
CWJ-10	0	15.150±0.931	38.000±3.266	42.000±4.320	51.000±3.266	82.000±1.633**	58.600±0.016**
CWJ-11	0	1.200±0.081	3.900±0.163	9.150±0.779	26.540±0.779	41.240±0.816	11.000±0.016
CWJ-12	0	13.140±0.816	36.000±1.633*	38.000±1.633	42.000±1.886	61.000±2.160	56.200±0.003**
GA ₃	0	12.340±0.726	35.200±2.870	37.650±0.379	40.200±0.983	59.000±2.378	38.400±0.004
对照	0	2.000±0.041	5.000±0.489	10.000±0.408	30.000±1.633	50.000±1.633	25.600±0.009

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs blank control group



1-种子吸水膨胀阶段 2~4-萌动阶段 5、6-发芽阶段

1-seed water absorption and swelling stage 2-4 germination stage 5,6-germination stage

图 1 刺五加种子发育进程

Fig. 1 Development process of *A. senticosus* seeds

3.2 变温层积过程中刺五加种子内源激素的动态变化

内源激素 GA₃、IAA、SA 的变化规律见图 2，在种子后熟过程中，所有处理组种子的 GA₃、IAA、SA 均呈上升趋势，菌处理组种子中 GA₃、IAA 的含量在 100~130 d 增加显著，SA 的含量在 0~50 d 增加显著，由菌 CWJ-6 刺激的种子的 GA₃、IAA、SA 含量提高最多，在 130 d 分别达到 1.289、0.727、0.115 μg/g，相对空白对照组提高了 163.6%、357.2%、475.0%；相对 GA₃ 对照组提高了 91.85%、101.39%、61.19%，同一时期处理组 GA₃、IAA、

SA 的含量始终高于对照组；IBA 含量呈现上升趋势，在 50~100 d 上升缓慢，0~30 d 和 100~130 d 上升迅速，由菌 CWJ-6 刺激的种子的 IBA 含量在 130 d 达到最高 0.180 μg/g，同一时期处理组 IBA 含量始终高于对照组，但促进效果较弱。在刺五加种子后熟过程中，处理组和对照组种子 ABA 含量均呈下降趋势，0~30 d 和 100~130 d 下降迅速，由菌 CWJ-6 刺激的种子的 ABA 量在 130 d 达到最低 0.011 μg/g，相对空白对照组降低了 936.60%，相对 GA₃ 对照组降低了 572.73%，同一时期处理组的 ABA 含量始终低于对照组。

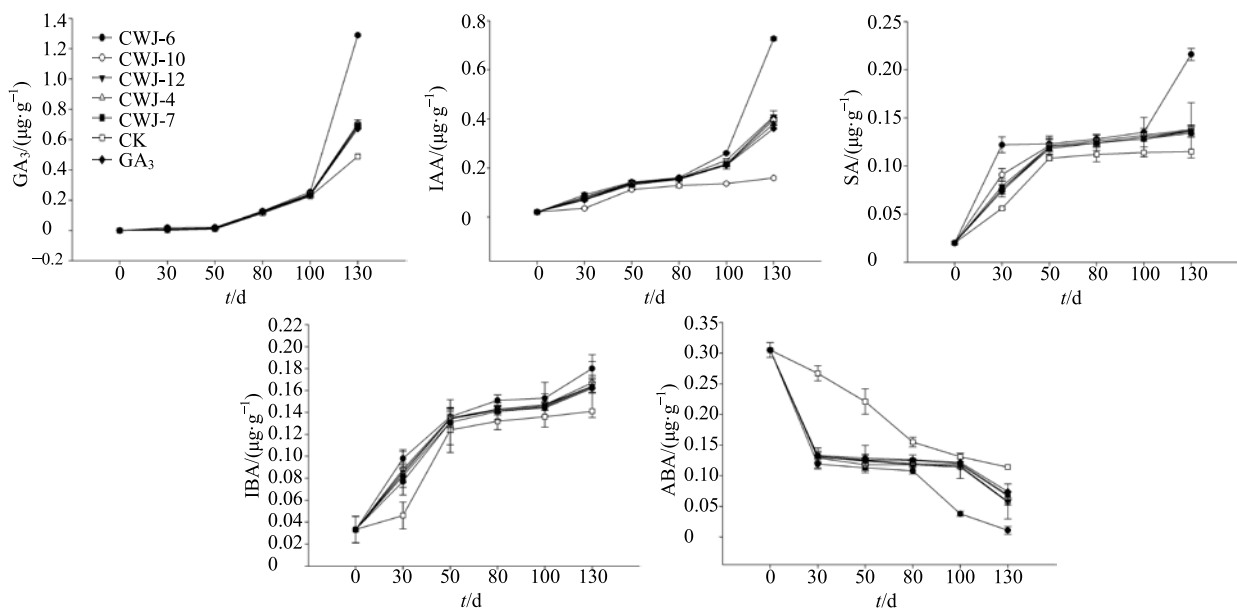


图 2 刺五加种子变温层积中 GA₃、IAA、SA、IBA、ABA 的变化

Fig. 2 Content of GA₃, IAA, SA, IBA, and ABA during fluctuating temperature stratification of *A. senticosus* seeds

3.3 变温层积过程中刺五加种子酶的动态变化

在破除刺五加种子后熟过程中，种子内多种酶均发生显著变化（图 3）。CAT 在所有处理组种子中的活力均上升，在 0~100 d 上升缓慢，100~130 d 上升迅速，130 d 由菌 CWJ-6 刺激的种子的 CAT 含量最高值为 4.339 U/mg，相对空白对照组提高了 138.6%，相对 GA₃ 对照组提高了 86.97%；MDA 在所有处理组种子中含量呈逐渐下降趋势，处理组种子在 0~30 d 下降迅速，30~100 d 逐渐下降缓慢，对照组则主要在 30~100 d 迅速下降。在 130 d，CWJ-6 组含量最低为 0.010 nmol/mg；POD 在所有处理组种子中活力逐渐降低，处理组种子在 0~30 d 下降迅速，而对照组则主要在 30~50 d 下降显著，同一时期处理组种子的 POD 活力始终低于对照组；

SOD 在所有处理组种子中活力先降低后升高，0~50 d 逐渐下降，50~130 d 逐渐上升，50 d 达到最低 15.186 U/mg，130 d 达到最高 86.219 U/mg，同一时期处理组种子的 SOD 活力始终高于对照组。

4 讨论

4.1 刺五加内生真菌对种子萌发促进机制

对刺五加种子进行解剖，发现其未有完整的胚结构，胚率极低，即种子内呈现一个未分化的原胚状态，存在严重的形态后熟，同时也具有生理后熟的现象，与马淑兰^[11]的研究结果一致，整个种子处于休眠状态。本研究从刺五加根、茎和叶中分别提取分离出 12 株内生真菌可筛选出 5 株对刺五加种子发芽有益菌，其可显著地提高刺五加种子胚率、发芽率，缩短发芽时间。侯姣姣等^[12]在内生真

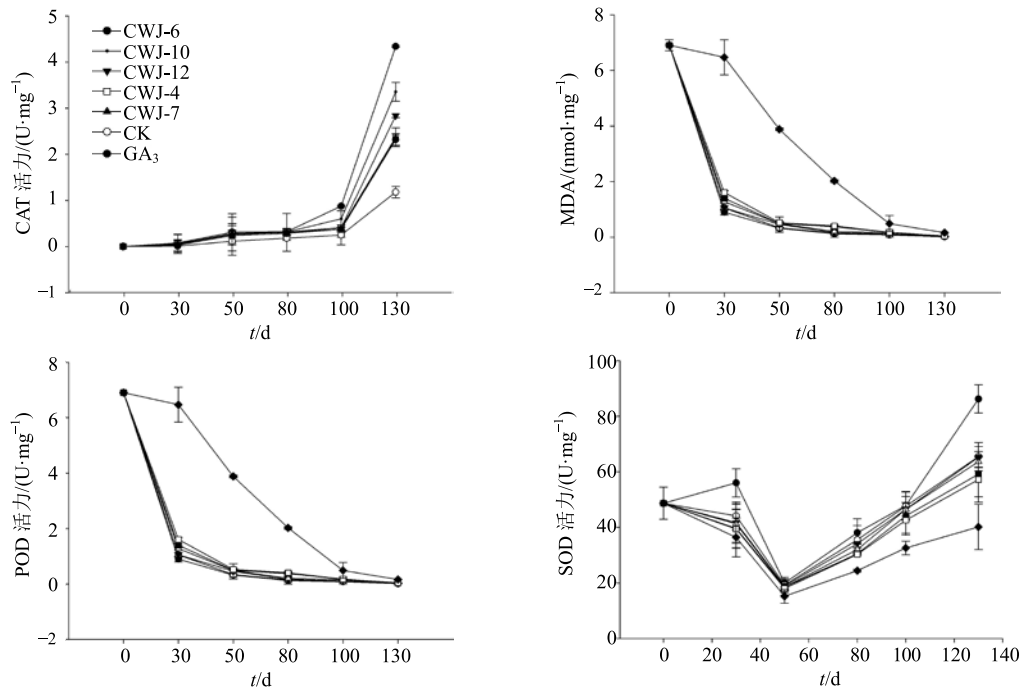


图 3 刺五加种子变温层积中 CAT、MDA、POD 和 SOD 的变化

Fig. 3 Content of CAT, MDA, POD, and SOD during fluctuating temperature stratification of *A. senticosus* seeds

菌感染对古侧柏种子的萌发中也有类似情况，可能是菌株可分泌 GA₃ 和 IAA，对 SOD、POD、CAT、POD 酶基因表达进行调节^[13]，药用植物种子在完成胚后熟过程中，内生真菌直接通过浸种产生各种代谢物及影响植物激素含量和酶活力的变化，促进种子发育^[14]。

4.2 激素及酶对刺五加种子破除休眠的影响

根据三因素学说，种子萌发过程中，GA₃ 促进种子萌发，是植物生长调节剂，可诱导水解酶的产生，使植物中大分子转化为易被胚吸收的小分子物质^[15]；而 ABA 是导致种子休眠的重要因素^[16-17]，可抑制多种种子的萌发，内源乙烯生成量下降，抑制乙烯生成和萌发，抑制核酸的正常代谢，干扰核糖核酸的合成，使种子不能进行正常的代谢活动，导致种子休眠^[18]。在本研究内生真菌浸染种子萌发过程中，GA₃、IAA、SA 和 IBA 含量显著增加，整个过程中始终高于对照组及 GA₃ 对照组的水平；ABA 的含量逐渐减少，整个过程中始终低于对照组的水平，CAT 活力逐渐升高，当 100~130 d 活力迅速增加，此时也正是刺五加种子萌发的旺盛阶段，SOD 活力也正是这一阶段迅速增加，这说明 SOD 和 CAT 对种子萌发起重要的作用，MDA 的量与 POD 活力在 0~50 d 明显降低，说明 MDA、POD 有很强的耐脱水能力，对种子萌发无显著作用，与

秦国臣^[19]抗氧化酶在种子萌发的观点一致。

本实验以内生真菌为方法探索了破除刺五加种子休眠的方法，为研究刺五加种子破除休眠提供了新方向，且为其他植物种子萌发提供了新思路，而内生真菌调节刺五加种子萌发的分子机制尚不明确，将在后续实验中对其深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 葛超, 赵成昊, 胡凯, 等. 刺五加种子休眠解除过程中过氧化物酶和酯酶同工酶的变化 [J]. 种子, 2010, 29(1): 50-52.
- [3] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录 (第一卷) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [4] 高成华. 外源 GA 对刺五加种子后熟过程中内源激素含量变化的影响 [J]. 种子, 2016, 35(1): 35-37.
- [5] Jia M, Chen L, Xin H L, et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 906.
- [6] Rey T, Schornack S. Interactions of beneficial and detrimental root-colonizing filamentous microbes with plant hosts [J]. *Genome Biol*, 2013, 14: 121-127.
- [7] Ramalingam R, Abdul Latif K, Lee I J. Endophytic fungal pre-treatments of seeds alleviates salinity stress effects in soybean plants [J]. *J Microb*, 2013, 5(6): 850-857.
- [8] 陈疏影, 尹品训, 杨艳琼, 等. 变温层积对解除滇重楼

- 种子休眠及其内源激素变化的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 793-795.
- [9] 齐永平, 顾蔚, 罗成, 等. 华中五味子种子的发育和 3 种内源激素含量的变化 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(6): 615-618.
- [10] 秦国臣. 内源激素 ABA 含量、抗氧化酶活性和种子质量在丝瓜种子发育过程中的变化 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [11] 马淑兰. 刺五加种子休眠机理研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2006.
- [12] 侯姣姣, 余仲东, 康永祥, 等. 内生真菌侵染对古侧柏种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. 西北林学院学报, 2016, 31(6): 110-115.
- [13] 熊玉萍. 地黄促生真菌的筛选及其作用机制的研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2016.
- [14] Shen L, Li L Y, Zhang X J, *et al.* A new indole derivative from endophyte *Myrothecium roridum* IFB-E091 in *Artemisia annua* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2015, 50: 1305-1308.
- [15] 谭玲玲, 胡正海. 不同浸种处理对桔梗种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(4): 468-472.
- [16] Kucera B, Cohn M A, Leubner-Metzger G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination [J]. *Seed Sci Res*, 2005, 15(4): 281-307.
- [17] Rohde1 A, Bhalerao R P. Plant dormancy in the perennial context [J]. *Trends Plant Sci*, 2007, 12(5): 217-223.
- [18] 赵鑫, 马小军, 凯撒·苏来曼, 等. 低温解除阜康阿魏种子休眠和内源激素变化规律的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 268-270.
- [19] 秦国臣. 内源激素 ABA 含量、抗氧化酶活性和种子质量在丝瓜种子发育过程中的变化 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.