



· 资源与鉴定 ·

1 株选择性降解茅苍术挥发油 内生真菌的筛选与鉴定

李蕾, 刘付燕, 任承钢, 戴传超*

(南京师范大学 生命科学学院 江苏省微生物与功能基因组学重点实验室
江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的:从茅苍术 *Atractylodes lancea* 根中分离内生真菌,筛选能选择性降解转化茅苍术挥发油的菌株,实现内生真菌对茅苍术挥发油主要成分的转化作用。方法:利用微生物体外转化方法,通过气相色谱追踪挥发油变化,筛选出能选择性利用挥发油的内生真菌。通过单因素试验研究碳源、转速、装液量、初始 pH 和植物组织添加对内生真菌降解的影响,并选取对降解影响较大的因素进行正交试验。结果:筛选到的内生真菌 ALG-13 可以选择性利用挥发油,改变了挥发油主要成分相对百分比。总体表现为苍术酮和苍术素增加, β -桉叶醇和茅术醇含量减少。经过真菌选择性降解后,挥发油组分更加接近道地茅苍术的挥发油组成。ALG-13 基于形态特征、ITS 序列系统学分析,确定为生赤壳属真菌 *Bionectria ochroleuca*。最优降解条件为 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, pH 4.5, 250 mL 装液量为 50 mL、蔗糖为碳源。结论:内生真菌 ALG-13 可以选择性降解挥发油,使挥发油组分接近道地药材。

[关键词] 茅苍术;内生真菌;挥发油;选择性利用;生赤壳属

茅苍术为我国常见菊科植物,属多年生药用植物,史载于《神农本草经》具有燥湿健脾、祛风散寒、明目作用。其挥发油对正常小鼠胃肠推动功能具有促进作用^[1]。江苏茅山地区的苍术为茅苍术道地药材^[2]。道地产区苍术挥发油总含量较非道地产区的低,尤其表现为 β -桉叶醇和茅术醇成分显著低而苍术酮、苍术素高于非道地地区^[3]。研究发现^[4-6],多种内生真菌对宿主次级代谢有降解转化作用。前期研究发现,内生真菌接种茅苍术无菌苗后可以改变茅苍术挥发油组分^[7]。内生真菌接种增加了茅苍术挥发油中苍术酮和苍术素相对百分含量的提高,其组分更加接近茅苍术道地药材的组分。进一步分析接种后挥发油组分表明,最初 β -桉叶醇和苍术酮、苍术素同样增高,后来随着生长碳源的匮

乏, β -桉叶醇含量开始下降。因此,作者推测可能是内生真菌与植物体共存在某种适应机制,内生真菌参与植物次级代谢产物挥发油的选择性降解过程。本实验研究内生真菌对挥发油代谢作用,希望进一步阐述内生真菌与宿主植物道地性形成的关系并为茅苍术的持续利用探索新的途径。

1 材料

1.1 植物材料

新鲜茅苍术根茎 2010 年 12 月采自江苏茅山地区句容九龙药材公司种植园;干茅苍术根茎 2010 年 4 月购于西安,陕西地道药材有限公司。经南京师范大学生命科学学院戴传超教授鉴定为茅苍术 *Atractylodes lancea* 的根茎。

1.2 茅苍术内生真菌

菌株 AL4, 为小克银汉霉属 *Cunninghamella* sp.; 菌株 AL11, 为镰刀菌属 *Fusarium* sp.; 菌株 AL10, 为不产孢类群, 种属待定。所有菌株由本实验室分离保藏。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):200 g 马铃薯洗净去皮,煮沸 30 min 过 8 层纱布,葡萄糖 20 g · L⁻¹, 琼脂 20 g · L⁻¹ 无机盐培养基:NaNO₃ 2 g ·

[稿件编号] 20120214009

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31070443,30970523); 国家理科基地人才培养项目(J1103507); 江苏高教优势学科建设工程项目; 南京市科委工程中心创新能力提升项目(201105058)

[通信作者] *戴传超, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为微生物生态学, Tel: (025)85891382, E-mail: daichuanchao@njnu.edu.cn

[作者简介] 李蕾, 硕士研究生, 主要从事微生物学研究, E-mail: 18062818.good@163.com



L^{-1} , K_2HPO_4 $1 g \cdot L^{-1}$, KCl $0.5 g \cdot L^{-1}$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $0.5 g \cdot L^{-1}$, $FeSO_4$ $0.01 g \cdot L^{-1}$, 蔗糖 $30 g \cdot L^{-1}$, 蒸馏水定容至 $1 L$ 。上述培养基均在 $121 \text{ }^\circ\text{C}$, 0.1 MPa 下高压灭菌 20 min 。

1.4 试剂与仪器

环己烷(分析纯)购于上海四试赫维化工有限公司,正十五醇和 α -硝基萘内标购于Sigma公司,主要仪器与设备包括旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、恒温霉菌培养箱(上海跃进医疗仪器厂)、HPSF-1890气相色谱仪及氢火焰检测器FID(惠普上海分析仪器有限公司)。

2 方法

2.1 挥发油提取

采用有机溶剂萃取法^[8]。将苍术根粉碎,称取 $100 g$ 的粉末,加入4倍体积环己烷浸泡 $8 h$,超声破碎 30 min , $5000 r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 。将萃取液经无水硫酸钠干燥,过滤,无水低温蒸馏挥去滤液中环己烷,得苍术挥发油,红棕色油状液体,具有特殊浓郁香味。

2.2 内生真菌的分离

取新鲜茅苍术根,按下列程序表面消毒:自来水冲洗,75%乙醇漂洗 30 min ,0.1%升汞 $7 \sim 8 \text{ min}$,无菌水冲洗 $4 \sim 5$ 次。将上述处理过的材料切成约 $0.2 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的小片,然后将小片置于含链霉素($50 \text{ mg} \cdot L^{-1}$)的PDA平板上, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养,待材料边缘有菌丝长出后,挑取菌丝尖端转入新PDA平板培养 $2 \sim 4 \text{ d}$,重复挑取菌丝分离,直至为纯培养物。

2.3 具有降解挥发油能力菌株的筛选

2.3.1 菌株的分离筛选 挥发油由上述方法获得,灭好菌的 50 mL 无机盐培养基中加入 2 mL 挥发油,振荡过夜至环己烷完全挥发,将挥发油作为唯一碳源。将分离得到的 27 株真菌接种到PDB $28 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 r \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温活化 2 d 后,用无菌水冲洗菌丝数遍,以2%接菌量接种,于 $28 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 r \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 10 d 。每天观察菌株的生长情况。气相色谱法测定第 20 天后溶液和菌丝挥发油的残余组分,考察菌株对挥发油的降解能力。

2.3.2 菌株对挥发油各组分的降解 将活化的菌株接入以挥发油为唯一碳源的查氏培养基中 $28 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 r \cdot \text{min}^{-1}$ 培养,每隔 4 d 取样,将培养液离心获得上清液用环己烷将挥发油萃取,沉淀冷冻干燥后用等量环己烷萃取,旋转蒸发浓缩至 $200 \text{ } \mu\text{L}$,添加

一定浓度的正十五醇、 α -硝基萘为内标,分别精密吸取 $1 \text{ } \mu\text{L}$,注入气相色谱仪测定^[9]。每组重复 3 次,以不接菌组为对照,测定不同组分的含量变化。

2.4 生物量计算

内生菌与挥发油共培养后,用烘干至恒重的滤纸过滤菌丝,蒸馏水洗涤 3 次, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下烘干至恒重,称量其质量即得生物量。

2.5 气相色谱条件

惠普上海分析仪器有限公司 1890 型气相色谱仪(HPSF-1890GC),氢火焰检测器(FID)。色谱柱:FFAP无蜡聚乙烯乙二醇交联石英毛细管色谱柱($0.25 \text{ } \mu\text{m} \times 0.25 \text{ mm}, 30 \text{ m}$)。数据处理用N2010型色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司)^[8]。

2.6 内生真菌的初步鉴定

通过形态特征和内转录间隔区(ITS)序列分析对具有 β -桉叶醇降解能力的内生真菌进行初步鉴定。

2.6.1 菌株的形态观察 将内生真菌在PDA平板 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 倒置培养,观察菌落生长形态, 15 d 后显微镜下观察真菌产孢结构。

2.6.2 菌株的ITS序列分析 菌株在PDA培养基上活化 4 d ,取面积约 0.1 cm^2 含菌丝的琼脂接入含 200 mL PDA 液体培养基的 500 mL 锥形瓶中, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $180 r \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 $3 \sim 4 \text{ d}$,4层纱布过滤(无菌生理盐水冲洗 3 次),烘干,研磨至粉碎。基因组DNA用CTAB法提取,提取后采用ITS通用引物进行PCR扩增,具体序列为ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTAT TGATATGC -3')PCR采用 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 体系,反应条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min ,然后 35 个循环, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s , $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 45 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1.5 min ,最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 。 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR产物送华大基因测序,序列提交GenBank数据库获序列号,经BLAST分析,采用Clustal-1.83进行比对分析,之后用Mega5软件进行序列分析,采用邻接法(Neighbor-joining, NJ法)用Bootstrap法(1000 次重复)检验。进行系统发育树的构建和同源性比较。将所测 $18S \text{ rDNA}$ 序列提交GenBank注册。

2.7 内生真菌在组培苗中的回接与重新分离

将分离所得内生真菌经PDA培养基活化后,用接种铲挑取一小块(直径 0.5 cm 左右)回接到已生



根的茅苍术无菌苗,共培养 3 周。待菌与苗长成一片后,取出无菌苗,洗净,表面消毒后重新分离。

2.8 正交试验

选择对菌株代谢挥发油影响较大的碳源、转速、装液量和初始 pH 4 个常见生态因子进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(表 1)。以挥发油含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)为指标,考察内生真菌与其他生态因子对其影响及对 β -桉叶醇降解影响。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	A		B		C		D	
	碳源	转速/ $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	pH	溶氧量/ mL				
1	蔗糖	200	4.5	50				
2	挥发油	220	5.5	60				
3	淀粉	240	6.5	70				

2.9 数据统计

试验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件进行方差分析(One-Way ANOVA) 检验处理间差异显著性,并用 Duncan 法进行多重比较,当 $P \leq 0.05$ 时,各个处理间存在显著差异。使用 Excel 2003 进行作图。

3 结果

3.1 菌株的分离和筛选

利用纯培养方法从茅苍术根内分离获得 27 株内生真菌,将 27 株菌和实验室保藏菌株 AL4, AL10, AL11 分别做液体培养试验,分离到 1 株可以利用挥发油为唯一碳源生长的菌株(图 1),初步确定为有效降解挥发油菌株,编号为 ALG-13。用挥发油作为唯一碳源,接种分离得到的菌株,研究其降解曲线。从图 1 可以看出,挥发油含量从第 0 天到第 8 天为快速降解期,之后平稳下降;生物量同样从第 0 天到第 8 天为快速积累期,并于第 8 天达到最大值。这表明菌株到第 8 天时降解效果最好,生物量的积累和挥发油的快速降解是同时进行的 2 个过程。以后降解均取第 8 天作为取样点。

3.2 挥发油各组分的含量变化

将菌株接入以挥发油为唯一碳源的查氏培养基中进行发酵培养后,挥发油中 4 种主要活性成分的含量发生了不同程度改变。接菌处理中,4 种主要成分的总量到第 8 天时降解最快(71%)。与其他组分相比, β -桉叶醇含量显著降低,降解率达到

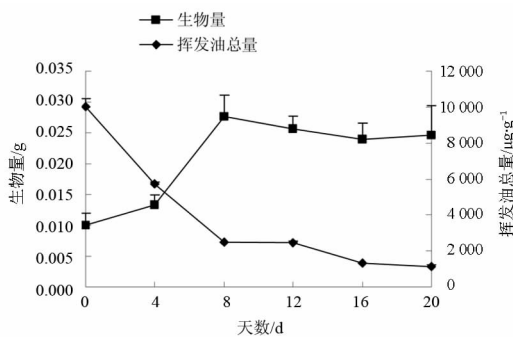


图 1 菌株降解挥发油含量变化曲线

Fig. 1 Time courses of degradation of volatile oil and biomass of ALG-13 mycelia

79.4%,其次是茅术醇,降解率达到 72.1%。另一方面,真菌接种组中,随着培养天数的增加,苍术素和苍术酮的相对百分比是增加的,在试验末期,苍术酮相对百分比从 5.39% 增加到 6.38% 而苍术素由 6.33% 增加到 16.36% (表 2)。与对照组相比,真菌接种组中 β -桉叶醇和茅术醇相对百分含量是显著降低的,而苍术酮和苍术素呈上升趋势。 β -桉叶醇是挥发油中含量最高,同时也是降解最快的成分,以后试验都以 β -桉叶醇的降解为标准研究内生菌对挥发油的降解过程。

3.3 降解条件的优化

3.3.1 转速对 β -桉叶醇代谢的影响 设转速分别为 160,180,200,220,240 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 d,观察对 β -桉叶醇降解的影响。220 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速时,菌丝体生物量最高, β -桉叶醇和茅术醇分别减少 6.86%,4.81%。而苍术酮和苍术素增加 5.68%,6.09% (表 3)。

3.3.2 培养基初始 pH 对 β -桉叶醇代谢的影响 真菌一般适合于在 pH 为中性偏酸的培养基中生长,过高或者过低的 pH 环境均会影响真菌的存活及生长速度。培养基灭菌前调节 pH 至 4.5,5.5,6.5,7.5,8.5,于 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 d,测定不同初始 pH 对菌株降解 β -桉叶醇的影响。不同初始 pH 对 β -桉叶醇代谢的影响中,在初始 pH 为 6.5 时可以获得最大菌丝体生物量。使 β -桉叶醇相对质量分数减少 8.06%,苍术酮、苍术素增加 8.61%,5.17% (表 4)。

3.3.3 碳源对 β -桉叶醇代谢的影响 分别以葡萄糖、淀粉、蔗糖、纤维素作为培养基中碳源,添加量为 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,其他成分不变。碳源对 β -桉叶醇的代谢



表2 茅苍术内生真菌对挥发油组分相对百分含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Changes of relative percentage content of volatile oil during different time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

%

处理 天数	苍术酮		茅术醇		β -桉叶醇		苍术素	
	接菌	对照	接菌	对照	接菌	对照	接菌	对照
0	5.39 ± 0.02a	5.51 ± 0.18a	43.45 ± 0.62a	43.59 ± 0.48a	44.83 ± 0.73a	44.45 ± 0.72a	6.33 ± 0.25a	6.20 ± 0.26a
4	6.58 ± 0.23a	5.21 ± 0.05b	46.31 ± 0.79a	43.75 ± 0.50b	38.24 ± 0.75a	44.52 ± 0.93b	8.87 ± 0.10a	6.52 ± 0.45b
8	12.01 ± 0.52a	5.45 ± 0.42b	42.23 ± 2.74a	43.86 ± 1.36a	31.15 ± 2.17a	44.01 ± 1.02b	14.61 ± 1.16a	6.68 ± 0.29b
12	7.07 ± 0.50a	4.44 ± 0.25b	43.95 ± 0.86a	45.12 ± 2.10b	36.37 ± 0.67a	43.84 ± 1.57b	12.61 ± 0.59a	6.60 ± 0.40b
16	6.88 ± 0.13a	5.18 ± 0.84b	43.11 ± 0.57a	44.30 ± 0.47b	36.61 ± 0.18a	43.88 ± 0.27b	13.39 ± 0.67a	6.63 ± 0.97b
20	6.38 ± 0.25a	5.14 ± 0.16b	40.35 ± 0.43a	43.76 ± 0.57b	36.91 ± 1.82a	44.21 ± 0.84b	16.36 ± 1.73a	6.88 ± 0.55b

注:同列不同字母表明差异显著, $P < 0.05$ (表3~7, 10同)。

表3 不同转速对挥发油组分相对百分含量影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of shaking speed on relative percentage content of volatile oil ($\bar{x} \pm s, n=3$)

转速/ $r \cdot \min^{-1}$	苍术酮/%	茅术醇/%	β -桉叶醇/%	苍术素/%	生物量/g
对照	5.39 ± 0.02a	43.45 ± 0.62a	44.83 ± 0.73a	6.33 ± 0.25a	0.01 ± 0.002a
160	9.50 ± 2.53c	41.15 ± 1.72ab	41.58 ± 3.76ab	7.77 ± 2.26b	0.034 ± 0.005b
180	11.12 ± 0.66d	40.50 ± 0.4ab	40.70 ± 0.87bc	7.68 ± 0.87b	0.032 ± 0.002b
200	7.36 ± 1.74b	42.14 ± 2.18a	42.14 ± 2.15ab	8.37 ± 2.59b	0.037 ± 0.002b
220	11.07 ± 0.48d	38.64 ± 1.13b	37.97 ± 1.63c	12.42 ± 2.29c	0.059 ± 0.002c
240	10.59 ± 0.37cd	41.34 ± 1.05ab	41.55 ± 1.28ab	6.53 ± 1.96a	0.037 ± 0.005b

表4 不同培养基初始 pH 对挥发油组分相对百分含量影响

Table 4 Effect of PH on relative percentage content of volatile oil

pH	苍术酮/%	茅术醇/%	β -桉叶醇/%	苍术素/%	生物量/g
对照	5.39 ± 0.02a	43.45 ± 0.62a	44.83 ± 0.73a	6.33 ± 0.25a	0.01 ± 0.002a
4.5	8.69 ± 1.10c	42.61 ± 1.13a	40.10 ± 0.97b	8.60 ± 1.58c	0.025 ± 0.004b
5.5	9.61 ± 0.58d	39.34 ± 0.82d	39.01 ± 1.39b	12.03 ± 1.64f	0.035 ± 0.003c
6.5	14.00 ± 9.06e	38.21 ± 4.30d	36.77 ± 4.74c	11.50 ± 3.45e	0.052 ± 0.003d
7.5	9.74 ± 0.76d	40.92 ± 0.56b	38.80 ± 0.56b	10.54 ± 0.85d	0.031 ± 0.004c
8.5	6.23 ± 1.33b	43.10 ± 0.84a	43.59 ± 1.25a	7.08 ± 1.25b	0.026 ± 0.002b

有很大影响,用蔗糖作为碳源时,菌丝体生物量最高,减少了15.7% β -桉叶醇,2.82% 茅术醇,同时苍术酮增加11.29%,苍术素增加7.22%(表5)。

3.3.4 不同装液量对 β -桉叶醇代谢的影响 取250 mL的三角瓶,分别装入液体培养基30,40,50,60,70 mL,其他培养条件不变,考察溶解氧对降解结果的影响。50 mL装液量时 β -桉叶醇减少了6.99%,苍术素增加了4.33%。同时,菌丝体生物量也以50 mL装液量最大(表6)。

3.3.5 植物组织对 β -桉叶醇代谢的影响 摘取新鲜苍术叶片5 g,洗净,研磨后配置成50,100,250,500,950 $g \cdot L^{-1}$ 植物组织质量浓度,其他培养条件

未变,研究其对 β -桉叶醇代谢影响, β -桉叶醇含量在100 $g \cdot L^{-1}$ 最低,菌丝体在250 $g \cdot L^{-1}$ 时生物量最大。此时 β -桉叶醇仅减少0.08%,苍术酮和苍术素有略微增加(表7)。

3.3.6 正交试验结果与分析 微生物生长以及对 β -桉叶醇的利用受到转速、初始pH、碳源等许多因素的影响,提供最适条件可加速 β -桉叶醇的降解,反之则会降低微生物降解 β -桉叶醇速率。本实验以碳源、转速、装液量和pH作为4个重要因子,进行4因素3水平的正交试验。

结果表明,4种因素的极差从大到小顺序为ACDB,说明在本试验范围内,碳源对降解水平影响



表 5 不同碳源对挥发油组分含量影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of different carbon sources on relative percentage content of volatile oil($\bar{x} \pm s, n=3$)

碳源	苍术酮/%	茅术醇/%	β -桉叶醇/%	苍术素/%	生物量/g
对照	5.39 ± 0.02a	43.45 ± 0.62a	44.83 ± 0.73a	6.33 ± 0.25a	0.01 ± 0.002a
挥发油	8.04 ± 0.80c	43.17 ± 0.48a	39.64 ± 0.66b	9.15 ± 0.31d	0.029 ± 0.002a
葡萄糖	7.08 ± 0.11b	43.22 ± 1.40a	41.90 ± 1.86c	7.80 ± 0.79c	0.276 ± 0.014b
淀粉	6.99 ± 0.84b	43.37 ± 2.46a	42.49 ± 2.99c	7.16 ± 0.82b	0.328 ± 0.028c
蔗糖	16.68 ± 0.85e	40.63 ± 3.01b	29.13 ± 3.91d	13.55 ± 0.72e	0.343 ± 0.035c
纤维素	8.53 ± 1.62d	42.78 ± 0.36a	42.09 ± 2.77c	6.60 ± 3.68a	0.259 ± 0.029b

表 6 不同装液量对挥发油组分含量影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of culture medium volume on relative percentage content of volatile oil($\bar{x} \pm s, n=3$)

装液量/mL	苍术酮/%	茅术醇/%	β -桉叶醇/%	苍术素/%	生物量/g
对照	5.39 ± 0.02a	43.45 ± 0.62a	44.83 ± 0.73a	6.33 ± 0.25a	0.01 ± 0.002a
70	7.61 ± 1.02c	43.45 ± 0.24a	40.85 ± 1.44bc	8.27 ± 2.01c	0.03 ± 0.005b
60	9.31 ± 1.68d	41.25 ± 2.28b	39.66 ± 2.54bd	9.78 ± 3.33d	0.036 ± 0.003b
50	9.89 ± 0.5e	41.61 ± 4.12ab	37.84 ± 5.24d	10.66 ± 1.51e	0.049 ± 0.002c
40	6.25 ± 1.88b	42.62 ± 1.73ab	43.84 ± 5.17ac	7.29 ± 1.70b	0.034 ± 0.004b
30	7.22 ± 1.46c	43.36 ± 0.86a	41.43 ± 1.01bc	7.99 ± 0.6c	0.044 ± 0.004c

表 7 植物组织质量浓度对挥发油组分相对含量影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of host tissue extract (HTE) on relative percentage content of volatile oil($\bar{x} \pm s, n=3$)

植物组织质量浓度/g · L ⁻¹	苍术酮/%	茅术醇/%	β -桉叶醇/%	苍术素/%	生物量/g
对照	5.39 ± 0.02a	43.45 ± 0.62a	44.83 ± 0.73a	6.33 ± 0.25a	0.01 ± 0.002a
50	5.57 ± 0.83ab	42.98 ± 0.65a	44.90 ± 0.29a	6.55 ± 1.41a	0.025 ± 0.002b
100	5.65 ± 0.92ab	43.01 ± 0.62a	44.80 ± 0.37a	6.55 ± 1.70a	0.033 ± 0.003c
250	5.64 ± 0.77ab	42.96 ± 0.57a	44.75 ± 0.42a	6.64 ± 1.52a	0.036 ± 0.003c
500	5.70 ± 0.52b	42.94 ± 0.92a	44.81 ± 0.40a	6.55 ± 1.34a	0.027 ± 0.002b
950	5.63 ± 1.32ab	42.95 ± 0.04a	44.77 ± 0.48a	6.66 ± 1.59a	0.024 ± 0.004b

最大(表 8),而转速影响最小,培养基的最佳水平组合为 $A_1 B_1 C_1 D_1$,即当碳源为蔗糖,转速为 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,pH 为 4.5,装液量为 50 mL 时培养 8 d 的菌株对挥发油组分影响最大。此时,挥发油各组分相对百分含量显示出与地道药材组分一致的特征。蔗糖是植物运输糖类主要形式,与植物体内成分相似,因而添加一定含量的蔗糖有利于菌株代谢,从方差分析结果可以看出,A 具有极其显著效应(表 9, 10)。

3.4 菌种鉴定

3.4.1 形态鉴定 菌株在 PDA 培养基上生长情况:供试菌株在 PDA 培养基上 28 °C 接种 2 d 后便开始萌发。菌落呈白色“绒毛状”菌丝致密,菌落边缘呈轮纹状向外扩散,菌丝边缘不整齐菌落平展圆形,培养 7 d 后有色素分泌使培养基颜色变黄。发酵培

养时菌丝结成 2~4 mm 的球状。产孢结构中顶囊不明显,轮状分支出双层小梗,椭圆形分生孢子散落其中。

表 8 正交试验结果

Table 8 Results of orthogonal array design experiments

No.	β -桉叶醇/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
1	613.40
2	723.64
3	756.48
4	2 543.89
5	3 540.80
6	3 384.81
7	1 985.62
8	1 763.95
9	1 728.77



表9 各因素试验方差分析

Table 9 Analysis of variance for β -eudesmol

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	F _a
A	8 175 496. 819	2	4 087 748. 41	53. 4	F _{0.05(2,8)} = 4. 46
B	282 559. 519	2	141 279. 759 5	1. 84	F _{0.01(2,8)} = 8. 65
C	258 400. 987	2	129 200. 493 5	1. 68	
D	270 320. 841	2	135 160. 420 5	1. 77	
误差	612 243. 65	8	76 530. 456 25		

注: 当 $F > F_{0.01(2,8)}$, 表示差异极其显著。

表10 正交试验中挥发油组分相对百分比含量

Table 10 Relative percentage content of volatile oil in orthogonal array

处理	苍术酮	茅术醇	β -桉叶醇	苍术素
1	15. 72 ± 1. 49a	31. 43 ± 1. 26a	32. 34 ± 1. 81a	20. 51 ± 1. 56a
2	9. 48 ± 0. 55c	45. 08 ± 8. 1e	41. 48 ± 8. 32cd	3. 95 ± 0. 35b
3	9. 28 ± 1. 12c	41. 34 ± 4. 07cd	42. 25 ± 4. 54de	7. 13 ± 1. 62c
4	11. 32 ± 0. 97d	40. 02 ± 1. 80c	38. 62 ± 3. 83b	10. 04 ± 1. 24e
5	9. 41 ± 1. 00c	42. 01 ± 1. 39d	39. 78 ± 1. 29bc	8. 81 ± 0. 15de
6	6. 43 ± 0. 86b	42. 26 ± 3. 74d	43. 99 ± 3. 90e	7. 31 ± 0. 77cd
7	3. 63 ± 0. 32e	46. 17 ± 0. 79ef	48. 40 ± 0. 77g	1. 80 ± 0. 27f
8	3. 79 ± 0. 19e	47. 29 ± 9. 95f	46. 13 ± 10. 85f	2. 79 ± 1. 58fb
9	10. 00 ± 2. 06c	38. 22 ± 1. 72b	42. 50 ± 1. 01de	9. 29 ± 1. 67e

3.4.2 18S rDNA 序列测定和系统发育分析 菌株 ALG-13 的 18S rDNA 序列长度为 459 bp, GenBank 注册号为 JN885185。采用邻接法构建的系统发育树,结果显示菌株 ALG-13 与 *Bionectria ochroleuca* 聚类在一起,相似度高达 100% (图 3)。结合其形态和培养特征确定菌株 ALG-13 为生赤壳属 *Bionectria*, 命名为 *B. ochroleuca*。

3.5 内生菌的回接与重新分离

将内生真菌 ALG-13 回接到茅苍术无菌苗内, 培养 3 周, 茅苍术无菌苗生长正常, 未见任何生病现象。摘取叶片, 经过表面消毒, 可以重新分离获得该菌, 说明已经建立共生关系, 确定 ALG-13 是内生真菌。

4 讨论

药用植物的品质取决于其药用活性成分的含量和配比^[10], 道地药材具有特定的遗传基因, 在特定环境条件下, 表现为特定的药性、组织结构和药效。茅山苍术是在长期大量临床实践检验的基础上为历代医家推崇和肯定的, 苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇及苍术素是茅苍术挥发油中主要活性成分, 它们决定了苍术药材的品质。挥发油中主要活性成分配比是决定苍术药材道地性的主要因素之一^[11]。

一般来说, 低浓度的 β -桉叶油醇及高浓度的苍术酮含量暗示高品质的苍术药材^[12]。目前国内外对于茅苍术品质及其道地性的研究主要集中于化学成分、遗传多样性、药理药效分析以及外部环境(气候因子、光照、土壤、水分)等方面, 而忽视了茅苍术

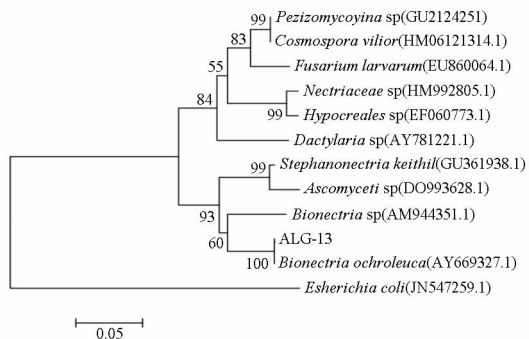


图3 邻接法构建的菌株 ALG-13 18S rDNA 序列系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on 18S rDNA sequence of strain ALG-13



植物体内环境的作用,特别是植物内生菌的作用^[13]。内生菌作为微生物生态系统的一个重要组成部分,植物中微生物环境对药材道地性形成有着举足轻重的作用,从植物体内部对植物性能起着重要的诱导作用^[14]。内生真菌存在于所有植物组织中,内生菌与宿主长期共存逐渐形成了对宿主的适应机制,内生真菌可以通过自身代谢降解宿主体内有毒物质,将其代谢为无毒物质,增强自身生态位优势^[15]。付少彬^[16]从蛇足石杉中分离出内生真菌转化乌苏酸,进一步增强了乌苏酸的药理活性,为寻找和开发新的高效低毒的化合物提供了崭新的途径。

有研究表明将内生真菌接种茅苍术组培苗后,随着时间增加, β -桉叶醇含量和茅术醇逐渐降低而苍术酮表现出持续增加^[12]。本研究发现,内生真菌接种初期,挥发油总量快速降低,同时 β -桉叶醇和茅术醇的相对百分含量减少而苍术酮和苍术素相对百分含量快速增加,后期呈稳定增加趋势。这对茅苍术品质稳定有非常积极的影响。内生真菌为缓解宿主特有的次级代谢产物对其生长的抑制作用,在长期进化过程中,必定形成了某种机制对宿主代谢产物进行分解转化^[17],内生真菌能够分泌一些特殊的胞外酶系选择性利用宿主次级代谢产物,而真菌的这种选择性代谢转化机制是其适应宿主体内环境的表现。

此外,茅苍术在栽培过程中存在明显的连作障碍,严重地影响了苍术的栽培种植。陈敏等^[18]研究发现茅苍术根茎及根际土中都有抑制自身生长发育的化感物质,其中含量较大的 β -桉叶醇对苍术胚芽伸长有显著自毒作用,为茅苍术连作障碍与自毒作用提供了理论依据。本实验从茅苍术根部筛选到一株可以选择性降解 β -桉叶醇内生真菌生赤壳属 *B. ochroleuca* ALG-13,该菌在兰科植物石斛中为优势菌群^[19],在红豆杉中也分离出一株可以产紫杉醇或其类似物^[20],同时还具有降解 PBS 特性^[21]。因此,推测 ALG-13 在植物体内以 β -桉叶醇为碳源,维持自身在植物体内生态位。筛选出能降解 β -桉叶醇的内生真菌对缓解茅苍术连作障碍也具有一定意义。

目前,道地性的缺失是人工种植中药材的瓶颈。本研究首次从内生菌角度出发研究内生真菌选择性利用宿主次级代谢,改变相关活性成分含量的配比,解释了挥发油形成与茅苍术道地性之间关系。更好

的了解了内生菌与宿主道地性间关系,为今后大规模人工种植道地药材提供理论基础。

[参考文献]

- [1] 张贝贝,方婧,许海玉,等. HPLC 测定道地产地和主要茅苍术中 β -桉叶醇及其它成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):116.
- [2] 吴宝成,韦阳连,高兴,等. 茅山苍术挥发油组分特征及根茎鲜质量相关性研究[J]. 林产化学与工业,2008,28(5):84.
- [3] 周洁,郭兰萍,黄璐琦,等. 基于道地药材标准的炮制苍术挥发油变化规律研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):567.
- [4] Zikmundova M, Dranadarov K, Bigler L, et al. Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona* [J]. Appl Envi Microbiol,2002, 24(8):4863.
- [5] Denise Z, Bastos L, Pimentel I C, et al. Bio-transformation of betulinic and betulonic acids by fungi [J]. phytochemistry, 2007, 68:834.
- [6] Kelly B B, Warley De S B, et al. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2007,77:669.
- [7] 王宇,戴传超,陈晏. 茅苍术挥发油对三种内生真菌及七种外源真菌的抑菌活性[J]. 应用生态学报,2009,20(11):2778.
- [8] 方芳,戴传超,张波,等. 茅苍术悬浮细胞系建立及内生真菌诱导子对其挥发油积累的影响[J]. 中草药,2009,40(3):452.
- [9] 张波,戴传超,方芳,等. 三种内生真菌对茅苍术组培苗的生长及主要挥发油成分的影响[J]. 生态学杂志,2009,28(4):704.
- [10] 郭兰萍,刘俊英,吉力,等. 茅苍术道地药材的挥发油组成特征分析[J]. 中国中药杂志,2002,27(11):814.
- [11] Yuan Y, Liu Y J, Huang L Q, et al. Soil acidity elevates some phytohormone and β -eudesmol contents in roots of *Atractylodes lancea* [J]. Russ J Plant Physiol, 2008, 56: 133.
- [12] Wang Y, Dai C C, Cao J L, et al. Comparison of the effects of fungal endophyte *Gilmaniella* sp. and its elicitor on *Atractylodes lancea* plantlets [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2012, 28: 575.
- [13] 陶金华,濮雪莲,江曙. 内生真菌诱导子对茅苍术细胞生长及苍术素积累的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(1):27.
- [14] 魏宝阳,曹亮,李顺祥,等. 内生菌与药用植物的关系及对次级代谢产物的影响[J]. 中国农学通报,2011,27(19):83.
- [15] Wang Y, Dai C C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation [J]. Ann Microbiol, 2011, 61: 207.
- [16] 付少彬,杨俊山,崔晋龙,等. 药用植物内生菌对乌苏酸的微生物转化筛选[J]. 中国药学杂志,2011,46(16):1225.
- [17] Amaral L S, Murgu M, Rodrigues-Fo E, et al. A saponin tolerant and glycoside producer xylariaceae fungus isolates from fruits



- of *Sapindus saponaria* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2002, 24:1341.
- [18] 陈敏, 黄璐琦, 郭兰萍, 等. 苍术根茎及根茎土水提取物生物活性研究及化感物质鉴定[J]. 生态学报, 2006, 26(2): 528.
- [19] Rossman A Y, Samuels G J, Rogerson C T, et al. Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* [J]. Stud Mycol, 1999, 42:1.
- [20] 余艳, 胡昌华. 南方红豆杉内生真菌 *Bionectria* sp. 的分离、鉴定及代谢产物活性研究[J]. 西南大学学报, 2007, 29(6): 131.
- [21] 梅雪立, 梁英梅, 田呈明, 等. 聚丁二酸丁二醇酯高效降解菌的筛选及降解特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(3): 348.

Screening and identification of an endophytic fungus from *Atractylodes lancea* which utilizes volatile oil selectively

LI Lei, LIU Fu-yan, REN Cheng-gang, DAI Chuan-chao*

(Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources, Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

[Abstract] In order to transform main active ingredient of volatile oil, endophytic fungi were screened from the root of *Atractylodes lancea*. Transformation method was used *in vitro*. The changes of volatile oil were traced by gas chromatography. One endophytic fungus (strain ALG-13) which could utilize volatile oil selectively was screened. Single factor experiment were conducted for exploring the effects of various factors that including kinds of carbon source, speed, liquid volume, pH and concentration of plant tissue on degradation by this strain. Subsequently, the main affecting factors carbon source, speed, pH and liquid volume were optimized using orthogonal array design. Results showed that endophytic fungus ALG-13 selectively used the volatile oil, change the relative percentage of the main components of volatile oil, Atractylon and Atractylidin were increased, While, β -eudesmol and Atractylol decreased. After selectively degradation by fungus, volatile oil components percentage were closer to the geo-herbs. Strain ALG-13 was identified as *Bionectria ochroleuca* according to its morphological characteristics and systematic analysis of ITS sequence. The optimal conditions were as follows: sucrose used as carbon source, rotating speed was $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, initial pH for medium was 4.5, 50 mL liquid was added in 250 mL flask. The endophytic fungus ALG-13 could degrade the volatile oil selectively, which was benefit for forming geo-herbs *A. lancea* volatile oil composition.

[Key words] *Atractylodes lancea*; endophytic fungi; volatile oil; selectively use; *Bionectria ochroleuca*

doi:10.4268/cjmm20121905

[责任编辑 吕冬梅]