

## 大戟内生真菌对其生长和两种萜类物质质量的影响

勇应辉,戴传超\*,高伏康,杨启银,赵沫  
(南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210046)

**摘要:**目的 探讨内生真菌促进大戟药材生产的方法。方法 接种大戟内生真菌到大戟组培苗,将建立共生后的组培苗移栽室外,生长1年后,检测生物量和萜类的量。结果 内生真菌 E4 (*Fusarium* sp.) 和 E5 (*Fusarium* sp.) 均促进了宿主植物生长,使根的鲜质量分别提高了 49.45% 和 59.74%;并使大戟的折干率提高了 2.99% 和 6.48%;同时提高了大戟组培期和室外生长1年后二萜物质异大戟素和三萜物质大戟醇的量。室外生长1年后,E4 处理组,异大戟素和大戟醇分别比对照提高了 92.79% 和 40%;E5 处理组,异大戟素和大戟醇分别比对照提高了 105.32% 和 241.38%。结论 内生真菌 E4 和 E5 对大戟有促生长作用,并能同时促进其萜类的合成。

**关键词:**大戟;内生真菌;异大戟素;大戟醇

**中图分类号:**R282.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-2670(2009)07-1136-04

### Effects of endophytic fungi on growth and two kinds of terpenoids for *Euphorbia pekinensis*

YONG Ying-hui, DAI Chuan-chao, GAO Fu-kang, YANG Qi-yin, ZHAO Mo

(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract : Objective** To study the producing method for *Euphorbia pekinensis* promoted by endophytic fungi. **Methods** The tissue culture plantlets were innoculated with endophytic fungi, then it was transplanted to the pods and cultured for one year. The biomass and content of terpenoids (isoeuphpekinensin and euphol) were determined. **Results** The growth of the *E. pekinensis* was promoted by endophytic fungi E4 (*Fusarium* sp.) and E5 (*Fusarium* sp.). The fresh weight of the root increased 49.45% and 59.74% for E4 and E5 treated, respectively. The plants dry weight coefficient increased 2.99% and 6.48% for E4 and E5 treated, respectively. The contents of isoeuphpekinensin and euphol in the plants were increased for tissue cultured in both bottles and pods. For the plants cultured in pods for one year, the isoeuphpekinensin and euphol increased 92.79% and 40%, respectively treated by E4. The isoeuphpekinensin and euphol increased 105.32% and 241.38%, respectively treated by E5. **Conclusion** The endophytic fungi E4 and E5 could promote the growth of *E. pekinensis* and accumulated terpenoids.

**Key words:** *Euphorbia pekinensis* Rupr.; endophytic fungi; isoeuphpekinensin; euphol

大戟 *Euphorbia pekinensis* Rupr. 是一种多年生宿根药用植物,性苦、寒、有毒,可用于治疗疔疮、疖肿水肿、血吸虫病、肝硬化、结核性结膜炎引起的腹水和胸腔积液<sup>[1]</sup>。因其内含丰富的二萜和三萜类化合物,故具有抗肿瘤、抗白血病等生理活性<sup>[2]</sup>。但由于大戟生长慢,种子数量少,繁殖受季节等多种因素的制约,因此难以满足人们对该药材的需求。本实验室先前已开展利用大戟内生真菌提高大戟组培苗的炼苗成活率的研究<sup>[3]</sup>,结果表明大戟内生真菌镰刀菌 E4 和 E5 菌株能促进大戟组培苗的生长并

提高其炼苗成活率。大戟内生真菌 E4 和 E5 能否在促进组培苗室外生长的同时促进萜类活性物质的积累,是否促进大戟的生物量和活性物质的双增长,有待于深入探讨。笔者前期研究发现,大戟根内量最大的二萜为异大戟素(isoeuphpekinensin);量最大的三萜为大戟醇(euphol)。因此在研究中分别以异大戟素和大戟醇为二萜和三萜代表。探索用 HPLC 法对大戟培养物中的萜类物质进行定量分析;并从整体生物学角度,在植株整体水平研究大戟内生真菌对大戟生长和活性物质合成的影响,为这

\* 收稿日期:2009-01-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500066)

作者简介:勇应辉(1981—),女,江苏宜兴人,硕士,从事微生物资源和生物技术研究。

Tel:(025)85891382 E-mail:coralyong@163.com

\*通讯作者 戴传超 Tel:(025)85891382 E-mail:daichuancho@njnu.edu.cn

类真菌的应用提供理论基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料:大戟原植物采自安徽省琅琊山森林公园,经江苏省植物研究所徐增莱副研究员鉴定后移栽于花盆中<sup>[4]</sup>。通过组织培养得到其无菌试管苗,株高2~3 cm。大戟醇和异大戟素对照品由南京中医药大学中药学院梁侨丽副教授分离鉴定,经过HPLC分析,为单一峰,质量分数为99%。

1.2 内生真菌菌种和培养基:两种内生真菌均由本实验室分离、鉴定和保藏,E4(*Fusarium* sp.)和E5(*Fusarium* sp.)分离自大戟。使用之前先接种在马铃薯葡萄糖培养基(PDA)上活化培养7 d。

培养基:植物材料继代培养基为1/2MS+蔗糖30 g/L+琼脂8 g/L的固体培养基,用0.2 mol/L KOH和0.2 mol/L HCl调pH值为5.8,然后高压高温(121 ℃)灭菌20 min<sup>[5]</sup>。植物内生真菌菌种保藏和活化培养基均用马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。

1.3 组织培养:剪取在MS+蔗糖30 g/L+琼脂8 g/L培养基上生长2个月左右、长势较一致、高约2 cm的大戟苗,分别移入继代培养基和其他几种处理培养基中,每个装有50 mL培养基的100 mL三角瓶中接入两株大戟苗,相距1.5~2 cm,称量并记录每瓶的接种量。培养温度为白天(24±2) ℃;夜间(18±2) ℃,光照强度1500 lx,光照时间12 h/d。

1.4 接菌培养:于转接后培养的第3周时,将经马铃薯葡萄糖培养基活化培养7 d的2种内生真菌分别用打孔器(直径9 mm)在菌落表面打取平板菌片,然后用接种针将菌片接种于2株苗中间的培养基上,每瓶接种1片,与大戟共生培养。两种处理的对照相同(即在继代培养基中只接种苗不接种真菌)<sup>[6]</sup>。采用完全随机实验设计,每种处理重复10瓶。定期观察并记录苗和内生菌的生长情况。

1.5 炼苗和移栽:所有处理组均于转接后培养的第9周开始炼苗,先在室温条件下打开封口膜,3~4 d后,把组培苗从培养瓶中取出,洗净根部的培养基,对鲜质量、折干率等生物学性状进行测定。然后移栽入草炭-蛭石-珍珠岩(1:1:1)的基质中,适时喷水,并用塑料小拱棚保湿和遮荫。3周后,将炼苗成活的大戟苗移入装有普通土的大花盆中移栽,定期浇水、除草。

1.6 鲜质量和折干率的计算:将从瓶中收获的各处理大戟和炼苗成活并于花盆栽培1年后挖取的大戟,洗净后用吸水纸吸干水分,分别称取鲜质量,置于烘箱中50 ℃干燥至恒重,称取干质量,随后根据

每株大戟的鲜质量和干质量计算折干率<sup>[7]</sup>。

## 1.7 大戟根内异大戟素和大戟醇提取及检测方法

1.7.1 仪器:Agilent 1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);二极管阵列紫外检测器。

1.7.2 色谱条件:Hedera Packing Material Lichrospher 5-C<sub>18</sub>色谱柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);异大戟素流动相:甲醇-水(80:20),体积流量1.0 mL/min,柱温30 ℃,检测波长268 nm。大戟醇流动相:乙腈-水(95:5),体积流量1.0 mL/min,柱温25 ℃,检测波长217 nm。

1.7.3 样品的提取:将烘干至恒重的大戟根用粉碎机打磨成均匀的粉末,准确称取0.5 g,置具塞锥形瓶中,加入20 mL甲醇后称质量,超声处理(功率400 W;频率40 kHz;KQ-100E型超声波清洗器)30 min,冷却后再称质量,补足损失的甲醇。真空减压抽滤,滤液40 ℃真空浓缩至浸膏状,用甲醇溶解定容至1 mL,转入离心管中12 000 r/min离心5 min后取上清液,用有机滤膜(孔径0.45 μm)滤过后作为供试品溶液备用。

1.7.4 异大戟素标准曲线的绘制:精密称取异大戟素1.0 mg置1 mL容量瓶中,加入少许甲醇,超声使完全溶解,冷却至室温后,用甲醇定容至刻度。用微量进样器分别取对照品溶液2、4、6、8、10 μL分别进样,并记录各峰面积。

1.7.5 大戟醇标准曲线的绘制:精密称取大戟醇1.5 mg超声溶解于2 mL甲醇中,再依次稀释成0.75、0.375、0.1875、0.09375、0.046875、0.0234375 mg/mL,用微量进样器分别吸取20 μL进样,记录各峰面积。

1.8 统计方法:用SPSS10.0统计软件处理大戟的生物量、根数、主根长、株高分别与对照进行方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示<sup>[8]</sup>,用F检验显著性差异。

## 2 结果

2.1 异大戟素和大戟醇检测方法的建立:异大戟素保留时间为14.03 min,大戟醇36.87 min。在根提取物的相应保留时间,分别出现了相应的峰,回加对照品后,该峰增高。色谱图分别见图1和2。

2.1.1 回归方程:分别以对照品进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标进行线性回归。异大戟素(0.4~2 μg)和大戟醇(0.46875~30 μg)的峰面积与质量浓度呈线性关系,回归方程分别为: $Y = 3136.3 X - 85.651, r = 0.9999$ ;  $Y = 201.84 X + 51.874, r = 0.9993$ 。

2.1.2 平均回收率:取已测定的样品溶液,精密加

入异大戟素 (0.8 μg/μL) 和大戟醇 (7.5 μg/μL) 对照品溶液 10 μL, 按样品测定法测定, 计算回收率, 结果异大戟素和大戟醇平均回收率分别为 96.85% 和 97.13% (n=4)。

2.1.3 精密度试验: 取同一样品, 各重复进样 5 次,

根据测得的样品中异大戟素和大戟醇的质量浓度 (μg/μL) 计算 RSD 分别为 3.64% 和 2.85%。

2.1.4 重现性试验: 取同一样品各 5 份, 制备 5 份样品液, 分别进样测定异大戟素和大戟醇的质量浓度, 计算 RSD 为 4.10% 和 3.2%。

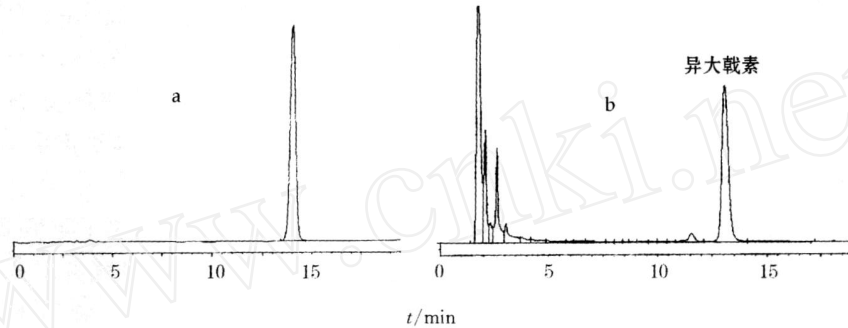


图 1 异大戟素对照品(a)和大戟提取物(b)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of isoeuphpekinensin reference substance (a) and extract from *E. pekinensis* (b)

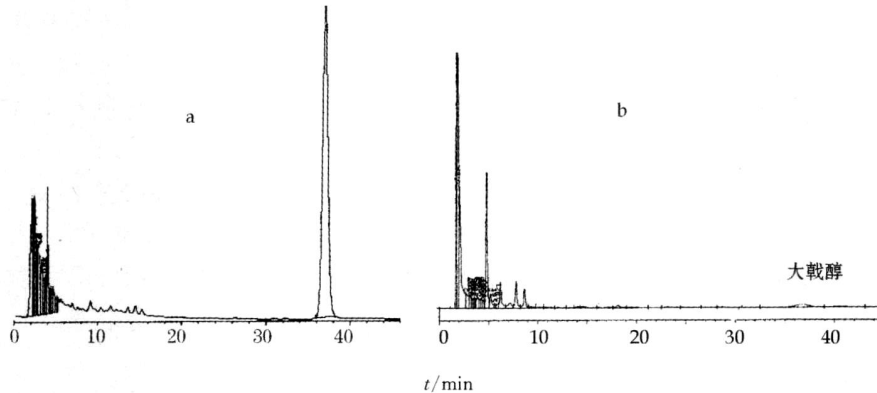


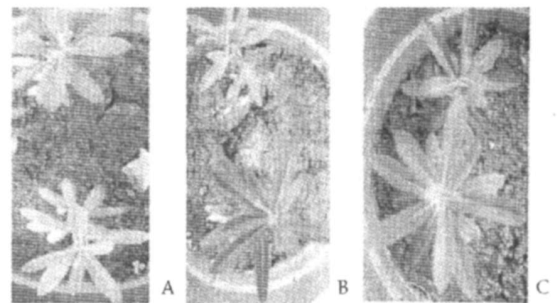
图 2 大戟醇对照品(a)和大戟提取物(b)的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatogram of euphol reference substance (a) and extract from *E. pekinensis* (b)

2.2 内生真菌 E4 和 E5 处理对大戟在室外生长状况和折干率的影响: 由图 3 可以看出, 在室外栽培两个月的大戟, 与对照相比, 内生真菌处理组大戟叶片生长速度较快, 叶片更绿, 尤其是 E5 处理后的大戟植株最高, 叶片最大, 最厚实。

而经室外栽培 1 年后收获的大戟, 如图 4 所示, 对照的须根较多, 根毛较短, 内生真菌处理的植株的根比对照粗、长。对照鲜质量为 (12.014 ± 0.26) g, E4 和 E5 菌都提高了大戟的鲜质量, 分别为 (17.955 ± 0.35) g 和 (19.191 ± 0.44) g。E5 处理的大戟鲜质量最高, 比对照提高了 59.74% (图 4)。

折干率即烘干至恒重的根茎单株质量与其鲜质量的百分比, 是干物质积累状况的反映, 也是大戟内在质量的反应。折干率高, 则大戟加工后成品率高, 加工质量较好。从测定结果看, 2 种内生真菌都能提高大戟的折干率, 其中 E5 能显著提高组培苗和室外栽培苗的折干率。与对照相比, 在无其他菌的



A-对照 B-E4 菌处理 C-E5 菌处理

A-control B-treated by strain E4 C-treated by strain E5

图 3 各处理大戟在室外生长状况

Fig 3 Growth status of *E. pekinensis* in field by various treatments

影响条件下, E4 和 E5 处理的大戟折干率分别提高了 2.99% 和 6.48%。与在自然环境中生长 1 年的大戟相比, E4 和 E5 处理后的大戟折干率分别提高了 6.06% 和 12.19%。该测定结果说明内生真菌对大戟的增产效应是其对干物质积累的促进作用所



A-对照 B-E4菌处理 C-E5菌处理

A-control B-treated by strain E4 C-treated by strain E5

图4 内生菌对1年生大戟根的影响

Fig 4 Effects of endophytic fungi on roots of one-year growth *E. pekinensis*

致,而不仅是含水量的增加所致,见表1。

表1 2种内生真菌对大戟折干率的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 1 Effect of two endophytic fungi on dry weight coefficient of *E. pekinensis* ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

处理	折干率/ %	
	瓶中组培苗	1年生
对照	4.01 ± 0.05	28.38 ± 0.93
E4	4.13 ± 0.04	30.10 ± 0.66
E5	4.27 ± 0.13*	31.84 ± 0.28*

\*与对照组比较,  $P < 0.05$

$P < 0.05$  vs control group

2.3 内生真菌 E4 和 E5 处理对大戟组培期和生长1年后萜类量的影响:在组培期,对照的异大戟素和大戟醇的量分别为 0.023 和 0.164 mg/g,与内生真菌共生的大戟组培苗根内二萜和三萜类化合物的量都比对照高,E4 菌株使异大戟素的量提高到 0.067 mg/g,大戟醇达到 0.496 mg/g,E5 处理组异大戟素的量达 0.145 mg/g,大戟醇的量达 0.624 mg/g。

生长1年后,大戟与内生真菌共生1年后,其根内异大戟素和大戟醇的量都得到了显著的提高,对照异大戟素的量为 3.705 mg/g,大戟醇为 0.065 mg/g。与对照相比,E4 菌株处理使异大戟素的量比对照提高了 92.79%,为 7.138 mg/g;大戟醇的量提高了 40%,达到 0.091 mg/g。E5 菌株的处理效果更明显,异大戟素的量达 7.607 mg/g,比对照提高了 105.32%。大戟醇的量为 0.222 mg/g,比对照提高了 241.38%。

### 3 讨论

目前大戟中单一萜类化合物的提取和检测的完整方法至今没有建立。王文祥<sup>[9,10]</sup>、裴月湖<sup>[11]</sup>和潘勤<sup>[12]</sup>等主要研究狼毒大戟和月腺大戟的化学成

分及生理活性;孔令义<sup>[13]</sup>和师彦平<sup>[14]</sup>等集中研究大戟类药材主要萜类化合物的分离提取及结构鉴定。本研究建立的大戟二萜和三萜的主要代表性化学物质异大戟素和大戟醇量的检测方法回收率高、精密度好,提取方法简单易行,对于大戟类药材品质的鉴定、化合物的分离检测都提供了有利条件。

农作物的生产中可以利用化肥提高产量,而药材有其特殊性,其产量的高低取决于生物量和次生代谢产物的量两方面<sup>[15,16]</sup>。杨靖<sup>[17]</sup>等研究发现剑叶龙血树根部的特异性内生真菌作用于龙血树材质可促成血竭的形成。大戟的成活率低,药材生产周期长,利用其内生真菌提高它的成活率,并提高大戟的产量,尤其是根的产量,同时提高了主要次生代谢产物的量。这说明,内生真菌除了能改善大戟的营养条件以外,还能影响大戟中萜类物质的产生。该结果为单一利用大戟内生真菌促进药材内目标化合物的合成提供了新的方法,并为提高特殊药材的地道性提供了新的生产思路。而内生真菌侵染大戟组培苗后产生影响的作用机制将有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 中国药材公司. 药用植物资源志要[M]. 北京:科学出版社, 1994.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社, 1977.
- [3] 勇应辉,戴传超,杨启银,等. 内生真菌和培养基对大戟组培苗生长和炼苗的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(2): 505-507.
- [4] 戴传超,余伯阳,董晨,等. 药用植物大戟的快速繁殖研究[J]. 广西植物, 2005, 25(2): 152-155.
- [5] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. *Physic Plant*, 1962, 15(4): 473-479.
- [6] 于雪梅,郭顺星. 金钊石斛与内生真菌共生培养体系的建立[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(2): 81-83.
- [7] 高微微,郭顺星. 三种内生真菌对铁皮石斛、金线莲生长影响的研究[J]. 中草药, 2002, 33(6): 543-545.
- [8] 张勤,张启能. 生物统计学[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2002.
- [9] 王文祥,丁杏苞. 月腺大戟根中的乙酰间苯三酚类衍生物[J]. 药学报, 1999, 34(7): 514-517.
- [10] 王文祥,丁杏苞. 月腺大戟根中二萜化学成分的研究[J]. 药学报, 1998, 33(2): 128-131.
- [11] 裴月湖,韩冰,冯宝民,等. 狼毒大戟化学成分的研究[J]. 中草药, 2002, 33(7): 591-592.
- [12] 潘勤,施敏锋,闵知大. 狼毒大戟中4种Jolkinolide型二萜的二维核磁共振研究[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(1): 16-19.
- [13] 孔令义,闵知大. 大戟根化学成分的研究[J]. 药学报, 1996, 31(7): 524-529.
- [14] 师彦平,贺志军,贾忠建. 大戟二萜结构及其生理活性研究进展( ) [J]. 天然产物研究与开发, 1998, 11(5): 85-89.
- [15] 龙云,杨睿,钟章成,等. 不同水分和氮素条件对栽培绞股蓝生物量和皂苷量的影响[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1872-1876.
- [16] 唐娟娟,孟志霞,于雪梅,等. 内生真菌对离体培养的福建金线莲生长的影响[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1876-1880.
- [17] 杨靖,江东福,马萍. 特异性真菌作用于龙血树材质形成血竭的研究[J]. 中草药, 2004, 35(5): 572-574.