

- diarylheptanoid glucosides from *Myrica gale* var. *tomentosa* and absolute structure of plant-chiral Galeon [J]. *Chem Pharm Bull*, 1997, 45(5): 820-823.
- [36] Lee K S, Li G, Kim S H, et al. Cytotoxic diarylheptanoids from the roots of *Juglans mandshurica* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(11): 1707-1708.
- [37] Jin W Y, Cai X F, Na M K, et al. Diarylheptanoids from *Alnus hirsute* inhibit the NF- κ B activation and NO and TNF- α production [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(4): 810-813.
- [38] Li G, Xu M L, Choi H G, et al. Four New Diarylheptanoids from the Roots of *Juglans mandshurica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(30): 262-264.
- [39] Kim S H, Lee K S, Son J K, et al. Cytotoxic compounds from the roots of *Juglans mandshurica* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(5): 643-645.
- [40] Jiang Z H, Tanaka T, Inutsuka C, et al. Alkaloids, diarylheptanoid and naphthalene carboxylic acid ester from *Rhoiptelea chiliantha* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(6): 737-740.
- [41] Tanaka T, Jiang Z H, Kouno I. Distribution of ellagic acid derivatives and a diarylheptanoid in wood of *Platycarya strobilacea* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(5): 851-854.
- [42] Smith P H, Whiting D A, Wood A F. Methods for the construction of linear 1, 7-diarylheptanoids; synthesis of di-O-methylcentrolol and precursors (synthetic and biosynthetic) to the meta, meta-bridged biphenyls myricanol and myricanone [J]. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1980, 1: 614-622.
- [43] Roughley P J, Whiting D A. Diarylheptanoids: The problems of the biosynthesis [J]. *Tetrahed Lett*, 1971, 40: 3741-3746.
- [44] Akazawa H, Akihisa T, Taguchi Y, et al. Melanogenesis inhibitory and free radical scavenging activities of diarylheptanoids and other phenolic compounds from the bark of *Acer nikoense* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(9): 1970-1972.
- [45] Ishida J, Kozuka M, Tokuda H, et al. Chemopreventive potential of cyclic diarylheptanoids [J]. *Bioor Med Chem*, 2002, 10(10): 3361-3365.
- [46] Matsuda H, Morikawa T, Tao J, et al. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. VI. Inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells and absolute stereostructures of three new diarylheptanoid glycosides from the bark of *Myrica rubra* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(2): 208-215.

植物内生菌与道地药材的相关性研究

江 曙, 钱大玮, 段金康*, 严 辉, 于 光

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘 要: 内生菌与其宿主植物在长期共进化过程中, 形成了密切的互惠共生关系。分析不同生态环境中道地药材与非道地药材内生菌种群结构与功能, 总结了内生菌对药用植物生长发育与抗逆性, 特别是对药材有效成分积累的影响, 初步探讨了内生菌对道地药材形成的机制, 提出了从植物内生菌的角度研究药材道地性的新思路。

关键词: 植物内生菌; 道地药材; 种群结构

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)08-1268-05

Research on correlation between plant endophytes and geoherbism

JIANG Shu, QIAN Da-wei, DUAN Jin-ao, YAN Hui, YU Guang

(Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medical Formulae Research, Nanjing University
of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Key words: plant endophytes; geoherbism; population structure

几千年来, 道地药材一直是人们防治疾病的有力武器, 但是由于历史的原因、科学技术发展水平的影响, 对中药材道地性的认识仅局限于产地、生态、性状、功用等方面, 未能提示其本质和规律。以中医药理论为指导, 充分运用道地药材研究的历史积累、实践经验和现代系统科学的思想方法与技术手段, 开展多学科交叉研究, 以证实和阐明道地药材的科学内涵。因此, 在集成多学科理论与技术的基础上进行药材道地性研究理论与方法的创新具有重要意义。国家科技部、国家中医药管理局等 16 个部门联合制定了《中医药创新

发展规划纲要(2006—2020 年)》。《纲要》中指出集成国家相关计划支持中医药创新发展, 形成项目联动机制, 加强对中药道地药材的科学表征。国家“973”计划将“中药药性理论与中药材道地性关键科学问题的基础研究”作为中医理论专项加以研究, 开展中药道地性的科学问题研究。为保持中药资源可持续利用提供理论依据。“十一五”期间国家科技支撑计划设立了“中药资源可持续利用与产业共性技术研究”重点项目, 项目指南提出了在以往中药资源调研的基础上, 借鉴农业区划、地理信息系统等手段, 应用地质背景系统知识及

收稿日期: 2008-03-14

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(2006BAI09B05-1); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2007241); 江苏省高校自然科学基金基础研究项目(07KJD360164); 江苏省中医药局项目(HL07076); 南京中医药大学基础研究与重点培育专项基金资助(08XPY02)

作者简介: 江 曙(1970—), 男, 博士, 副教授, 主要从事微生物与中药品质研究。 E-mail: jiangshu1970@yahoo.com.cn

* 通讯作者 段金康 Tel: (025)85811116 E-mail: dja@njutcm.edu.cn

数值分类、模糊数学和灰色系统等分析方法开展道地药材生产(天然资源、人工生产)与自然条件、社会经济条件的相关性研究,以揭示道地药材的地域分布规律以及道地性形成的生态环境及其土壤微生物生态结构特征,建立中药材生态适宜性分析的共性关键技术体系,促进中药资源的可持续利用和提高中药产业可持续发展能力。此外,中药资源可持续开发利用相关基础研究也一直是国家自然科学基金资助的研究项目。因此,研究道地药材的形成机制,从源头解决药材优质高产的问题一直以来是人们关注的焦点。近年来,关于药材道地性的形成,从生物学角度来看应是基因型和环境相互作用的产物,目前对其研究方法多是按照产地环境因子与道地药材的相关性进行研究,产地的气候(光照、温度、水分、空气)、土壤和水质是道地药材适宜性评价的主要指标^[1,2]。这些研究成果为揭示中药材道地性的科学内涵奠定了一定的工作基础,但尚未形成统一的认识,主要体现在研究内容宽泛,往往只针对个别环境因子的单因素影响研究,缺乏对药材道地性有影响的环境因子的综合性和系统性研究;在环境因子研究中,仅仅局限于植物外环境对药材道地性的影响,缺乏对中药内环境的研究,尤其是植物内生菌对中药优良品质的形成缺乏足够的认识;此外,研究方法局限,缺乏学科的交叉和渗透,药材道地性的研究需要在多学科交叉渗透的基础上,通过系统集成不同学科对道地药材不同角度、不同层次研究成果,才能获得对药材道地性的全面和深刻的认识^[3]。

因此,将中药学、植物学以及微生物学相结合,以内生菌与植物所构成的微生态系统作为研究对象,充分利用微生物学、植物学等学科的理论、方法与技术,研究道地药材与非道地药材内生菌种群结构与功能,道地药材不同生长发育期内生菌种群结构的动态变化规律与生物效应,对揭示道地药材的科学内涵,开创中药道地性研究的新思路、新方法 with 关键技术体系具有重要意义。

1 道地药材内生菌种群结构分析

道地药材是指在特定生态环境下所产生的临床疗效好、质量优的一类中药材,传统的概念突出强调了植物体外的生态环境对药材道地性的影响,作为一系列生理生化反应、能量与物质代谢的植物体内环境对药材道地性的形成同样具有重要的作用,尤其是对于内生菌与植物所构成的体内微生态系统的研究,将有助于从一个全新的角度来阐释道地药材的形成机制。

植物内生菌是指在植物体内完成其生活史的部分或全部,生长于植物组织细胞间,分布于叶鞘、种子、花、茎、叶片和根中,但又不引起任何病症的微生物,突出强调了内生菌与植物的互惠共生关系^[4]。植物内生菌是一个多样性十分丰富的生物类群,分布广、种类多,无论从宿主植物种类,还是自身种类、遗传以及生态环境等多方面都具有极其丰富的生物多样性^[5~7]。内生菌对植物的感染,在植物体内的定殖以及内生菌孢子萌发、菌体生长繁殖和代谢都需要合适的环境条件,因此这种多样性的种群结构及其分布受到多种内外因素的影响,包括生物因子和非生物因子。其中生物因子主要

涉及宿主植物的表型和基因型,内生菌间的相互作用,食草动物以及昆虫等内生菌的传播载体;非生物因子包括温度、湿度、光照、地理位置、植被等^[8,9]。由此可见,对于生长在不同生境中的中药材,由于所处生态环境的差异以及药材本身所产生的遗传变异,结果导致内生菌种群结构与分布在道地药材与非道地药材中必然存在较大差异。由于不同内生菌产生的代谢产物种类一般不同,因此这种种群结构的差异会产生功能多样性,不同的内生菌种群以各自不同的方式影响着药材性状、生长以及有效成分的积累等,最终导致道地药材与非道地药材品质的差异。

1.1 药材品种对内生菌种群结构的影响:不同宿主植物影响内生菌的生态分布,即使是同一种植物不同的变种,由于遗传背景的不同,其内生菌的种群结构也存在明显的差异。对内生菌而言,药材基因型和同种异质是一种选择性的压力,影响着内生菌的种群结构和分布^[10,11]。生长在芬兰东南部具有不同生态环境岛屿上的白桦两个品种欧洲桦 *Betula pubescens* Ehrhart 和垂枝桦 *B. pendula* Roth, 其内生菌种群结构存在较大差异,即使是同一种内生菌,定殖率也不相同,内生菌毛日规壳菌 *Gnomonia setacea* (Pers.:Fr.) Ces. & deNot. 在前者叶片中的定殖率达到 25%,而在后者叶片中只有 3%。这种差异可能是由于垂枝桦存在形态学和化学上的障碍,抑制了毛日规壳菌对其叶片的侵染,而后筛选到一些毛日规壳菌的遗传突变株可以克服这些障碍,表明宿主植物的遗传背景影响着内生菌对植物的感染和定殖^[12~14]。此外,内生菌在植物不同组织中的种群分布差异也较明显,一些内生菌表现出一定的组织专一性,其原因除了植物体外环境因素的影响外,还可能是由于宿主不同部位(或组织)微环境的影响。Verma 等^[15]系统研究了植物印度苦楝 *Azadirachta indica* A. Juss. 树皮、茎以及叶片部位内生菌的分布规律,发现内生菌在叶片中的种类最多,定殖率最高,优势种群包括针状拟茎点霉 *Phomopsis oblonga* (Sacc.) Bubak、枝孢芽枝菌 *Cladosporium cladosporioides* Fres. 拟盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis* sp.、木霉 *Trichoderma* sp. 和曲霉 *Aspergillus* sp.。

1.2 药材不同生长发育期内对内生菌种群结构的影响:在不同的生长发育期,植物体内的生理状态不同,代谢也存在很大的差异,在气温较高,日照较长的月份,植物光合作用较强,能合成较多的营养物质,从而有利于内生菌的生长繁殖;而在寒冷的季节,由于植物体内环境的变化,如呼吸强度、氧气浓度、pH 值等,不利于一些内生菌的生长,若能够适应这种变化,则成为优势种群。所以内生菌的种群结构会呈现随着药材不同的生长发育期而出现动态的变化规律。如春季时络石 *Trachelospermum jasminoides* (Lindl.) Lem. 内生菌的感染率为 93.5%,夏季内生菌的感染率则为 78%。内生菌优势菌群的分离频率也随季节变化而变化,如刺盘孢霉 *Colletotrichum* sp. 与卵形孢霉 *Oospora* sp. 春季分布明显高于夏季;而曲霉与刺葡萄孢霉 *Echinobortryum* sp. 则夏季分布较多^[16]。Mocali 等^[17]也发现榆属植物内生菌种群结构随

季节不同而发生动态变化,在4和12月,内生菌的优势种群为假单胞菌 *Pseudomonas* B35、B64、B65 和葡萄球菌 *Staphylococcus* B60;而在6和9月优势种群则是寡养单胞菌 *Stenotrophomonas* B50,芽孢杆菌 *Bacillus* B61、B73、B90,鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* B26,短小杆菌 *Curtobacterium* B20、B91^[17]。

1.3 生态环境对内生菌种群结构的影响:由于受气候等环境条件的影响,植物内生菌种类组成和数量常表现出一定的地域专一性,相同生境下的植物内生菌分布具有一定的相似性,在不同地点的同一种植物中内生菌的种群结构往往有较大的差异。王梅霞^[18]研究发现西安的杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliver 叶片中以链孢霉 *Alternaria* sp. 和刺孢壳霉 *Chaetomella* sp. 为优势类群,分离率分别为9.69%和8.91%,而南京各地杜仲叶片主要以蜜孢霉 *Sphacelia* sp. 和刺孢壳霉为优势类群,在不同地区杜仲的枝条和树皮组织中,优势种群也存在差异。Murali 等^[19]发现生长在潮湿和干燥落叶林中的柚木树 *Tectona grandis* L. f.,其内生菌种群结构差异较大,内生菌粪壳菌 *Sordaria* sp.、刺盘孢霉 *Colletotrichum* sp. 仅仅定殖于潮湿气候条件下的柚木树中,而胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. 只存在于干燥气候条件下的柚木树中;内生菌拟茎点霉 *Phomopsis* sp. 和叶点霉 *Phyllosticta capitalensis* 是两种生态环境下的优势种群,前者在潮湿落叶林中分布数量较多,定殖率较高,后者在干燥落叶林中分布数量较多,定殖率较高。由此可见,内生菌与药材的相互作用依赖于环境条件,由于道地药材与非道地药材生长的生态环境不同,内生菌种群结构和分布必然会存在一定的差异。

2 植物内生菌对药材道地性形成的影响

道地药材形成的内因是由于其具有特定的遗传基因,在特定的环境条件下,表现为特定的药性、组织结构和药效等。因此,环境条件对药材道地性的形成具有重要的影响。内生菌是构成植物内环境重要的组成部分,与植物在长期共进化的过程中形成了一种稳定的互利共生关系,而这种关系的物质基础是内生菌与植物共同作用产生的次生代谢产物,这些物质多具有植物生长调节活性、抗虫活性和其他生物活性等,使植物具备了优良的抗逆性和生长特性。内生菌不但自身能够产生特殊的生物活性物质,还能诱导和促进药材有效成分的合成或积累,甚至产生与药材相同或相似的活性成分^[20-21]。内生菌对道地药材形成的影响主要表现在以下几个方面。

2.1 促进药材生长:内生菌可促进植物的生长发育,增加植物的总生物量、单株花序数量和种子数量,提高植物种子的饱满率和发芽率,促进幼苗存活和分蘖生长,从而有利于提高道地药材的产量。Ernst 等^[22]从芦苇 *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. 中分离到一株内生菌壳多隔孢 *Stagonospora* sp.,通过盆栽实验表明该内生菌可显著促进芦苇根、茎的生长,提高干物质总量。此外,研究发现开唇兰小菇 *Mycena anoectochila*、石斛小菇 *M. dendrobii* 和兰小菇 *M. orchidocda*

3种内生真菌代谢物对铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. 和金线莲 *Anectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 的生长均有显著促进作用;与内生真菌共生培养,可以促进金线莲无茵苗的生长,增加气生根的数量,从而提高无茵苗出瓶后的成活率,使之更加容易适应环境^[23]。因此,内生菌对道地药材的优质高产、栽培具有重要意义。

内生菌促进植物生长发育的机制主要有两种:一方面,产生 IAA、细胞激动素等植物生长激素^[24];另一方面,内生菌可增强植物对氮、磷、钾等营养元素的吸收,如从兰科植物分离出的内生真菌接种大花蕙兰后,植株吸收氮、磷、钾养分的能力明显增强,其中 *Mycena anoectochila* GC945 菌株使幼苗吸收氮和钾的量比对照分别提高了175.7%和97.5%;*M. orchidocola* GC943 菌株使植株对磷的吸收量比对照提高了7倍^[25]。

2.2 增强抗逆性:感染内生菌的植物对环境具有很强的抗逆性,可分为对非生物胁迫和对生物胁迫的抗性两方面,前者主要包括干旱和高温耐性,后者主要包括阻抑昆虫和食草动物的采食、抵抗病虫害等^[26-28]。

感染内生菌的高羊茅 *Festuca elata* Keng ex E. Alexeev 生长能力在水分胁迫条件下高于未感染植株,尤其在重度胁迫条件下,当75%未感染植株死亡时,感染植株全部存活^[29]。高羊茅与内生菌共生体抗旱性试验表明,与未感染植株相比,感染植株的叶片加厚变窄,叶片卷曲现象普遍,根系生物量更大,并且分布深,这说明内生菌能够提高高羊茅的耐旱性^[30]。

内生菌对植物病原菌的抑制现象较为普遍^[31,32],在内生菌与植物构成的微生态系统中,内生菌发挥着重要的生态学作用。80%的植物内生真菌在抗真菌、抗藻类或抗杂草方面具有活性,而来自土壤中的真菌大约只有43%具有活性^[27]。如从卫矛科药用植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 中分离的内生菌能产生一种酰胺生物碱,该物质对稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae* Cav. 及其他多种植物病原真菌具有较强的抑杀作用^[33,34]。内生菌白色恶臭菌 *Muscodor albus* Gary S. 可产生一系列的有机酸、酯类、酮类以及乙醇等挥发性物质,可抑杀多种植物病原真菌和细菌^[35]。内生菌与植物共生过程中,可产生一些对昆虫有毒性的物质,增强植物的抗虫性,阻抑昆虫对植物的侵害。牧草中两种常见内生菌香柱菌 *Epichloe* sp. 和 *Neotyphodium* sp. 能够合成黑麦草生物碱,该物质可杀死多种害虫,是一种广谱性杀虫物质,目前研究表明该次生代谢产物受到内生菌 *lolA*、*lolC*、*lolD*、*lolE*、*lolF*、*lolO*、*lolP*、*lolT* 和 *lolU* 等9种基因的调控^[36-38]。分离于多年生黑麦草的一株香柱菌基因 *perA* 可合成一种过胺物质,阻抑害虫对黑麦草的吞食^[39]。

2.3 促进药材有效成分的积累:药材有效成分主要为植物次生代谢产物,而关于次生代谢产物在植物体内的积累机制至今尚未能阐明^[9]。现代研究表明,内生菌在与植物协同进化过程中,不但自身能够产生特殊的化学物质,还能诱导宿主植物次生代谢产物的合成和积累。因此,从内生菌的角度阐明植物次生代谢产物的积累机制以及道地药材的成因将

是一种新的研究思路和方法。

在内生菌与植物建立共生体的早期,二者存在一系列信号物质的交换与识别,从而引起植物代谢的变化。一般认为,提高药材有效成分的内生菌诱导子为多糖和寡糖,在植物与内生菌的相互作用中能快速、高度专一和选择性地诱导植物特定基因的表达,进而活化特定的植物次生代谢途径,合成和积累特定的有效成分^[40]。研究证实,接种内生菌有利于提高药用植物有效成分的量。分离于长春花 *Catharanthus roseus roseus* (L.) G. Don 的内生真菌可诱导长春花碱的合成和积累,产量比对照提高了2~5倍^[41],黄花蒿 *Artemisia annua* Linn. 内生真菌刺盘孢霉细胞壁寡糖提取物也可促进青蒿素的合成,青蒿素产量比对照提高50%以上^[42]。

3 展望

目前国内外对于药材道地性的研究主要集中于化学成分、遗传多样性、药理作用以及生态环境(气候因子、光照、土壤、水分)等方面,而忽视了植物体内环境在道地药材形成中所发挥的作用,特别是植物内生菌的作用。在内生菌与植物形成的微生态系统中,内生菌不仅可改良药用植物的生物学特性,促进植物生长,增加根的数量,提高植物抵御不良环境,还可以促进药用植物有效成分的合成和积累。因此,通过研究道地药材内生菌种群结构,并分析其对药材性状、产量及有效成分所产生的影响,有利于揭示内生菌与道地药材之间的相关性。在道地药材不同生长发育期,通过分析内生菌种群结构的动态变化规律,阐明不同内生菌优势种群在道地药材生长发育的不同阶段所产生的不同作用,可揭示道地药材的形成机制,进而通过控制内生菌的种群结构,实现道地药材大规模的高效、优质栽培。因此,研究内生菌对药材道地性的形成具有重要的指导意义和应用前景。

参考文献:

- [1] 黄璐琦,陈美兰,肖培根. 中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 494-496.
- [2] 任德权,索凤梅,陈士林. 道地药材的产地适宜性研究[J]. 中药研究与信息, 2005, 7(9): 4-9.
- [3] 王永炎,张文生. 中药材道地性研究状况与趋势[J]. 湖北民族学院学报, 2006, 23(4): 1-4.
- [4] Promputtha I, Lumyong S, Dhanasekaran V, et al. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence[J]. *Microb Ecol*, 2007, 53(4): 579-590.
- [5] Strobel G A. Microbial gifts from forests[J]. *Can J Plant Pathol*, 2002, 24: 14-20.
- [6] Ananda K, Sridhar K R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west of India[J]. *Can J Microbiol*, 2002, 48(10): 871-878.
- [7] Brady S F, Singh M P, Janso J E. Cytoskyrins A and B, new BIA active bisanthraquinones isolated from an endophytic fungus[J]. *Org Lett*, 2002, 25(2): 4047-4049.
- [8] Ahlholm J, Helander M L, Elamo P, et al. Micro-fungi and invertebrate herbivores on birch trees: fungal mediated plant-herbivore interactions or responses to host quality? [J]. *Ecol Lett*, 2002, 5: 648-655.
- [9] Ahlholm J U, Helander M, Henriksson J, et al. Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of *Venturia ditricha*, a fungal endophyte of birch trees[J]. *Evolution*, 2002, 56: 1566-1573.
- [10] Higgins K L, Arnold A E, Miadlikowska J, et al. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, 42(2): 543-555.
- [11] Saikkonen K, Ion D, Gyllenberg M. The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations[J]. *Proc Royal Soc*, 2002, 269: 1397-1403.
- [12] Helander M, Ahlholm J, Sieber T N, et al. Fragmented environment affects birch leaf endophytes[J]. *New Phytol*, 2007, 175(3): 547-553.
- [13] Helander M, Wali P, Kuuluvainen T, et al. Birch leaf endophytes in managed and natural boreal forests[J]. *Can J Forest Res*, 2006, 33: 20-29.
- [14] Saikkonen K, Helander M, Rousi M. Endophytic foliar fungi in *Betula* spp. & their F1 hybrids[J]. *Forest Pathol*, 2003, 33: 215-222.
- [15] Verma V C, Gond S K, Kumar A, et al. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) from Varanasi (India) [J]. *Microb Ecol*, 2007, 119-125.
- [16] 黄午阳,王凤舞. 络石内生真菌的生态分布[J]. 金陵科技学院学报, 2005, 21(2): 88-92.
- [17] Mocali S, Bertelli E, Di Cello F, et al. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs[J]. *Res Microbiol*, 2003, 154(2): 105-114.
- [18] 王梅霞,张丽,陈双林,等. 杜仲内生真菌类群与分布的初步研究[J]. 菌物研究, 2006, 4(3): 55-58.
- [19] Murali T S, Suryanarayanan T S, Geeta R. Endophytic *Phomopsis* species, host range and implications for diversity estimates[J]. *Can J Microbiol*, 2006, 52(7): 673-680.
- [20] Saikkonen K, Wali P, Helander M, et al. Evolution of endophyte-plant symbioses[J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(6): 275-280.
- [21] Toofanec B S, Dulymamode R. Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia* [J]. *Fungal Diver*, 2002, 11: 169-175.
- [22] Ernst M, Mendgen K W, Wiersel S G. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16(7): 580-587.
- [23] 高微微,郭顺星. 内生真菌丝及代谢物对铁皮石斛及金线莲生长的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(6): 556-559.
- [24] Jha P N, Kumar A. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3 [J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 103(4): 1311-1320.
- [25] 赵杨景,郭顺星,高薇薇,等. 三种内生真菌与大花蕙兰共生对矿质营养吸收的影响[J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 110-115.
- [26] Kongsaree P, Prabpai S, Sriubolmas N, et al. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(5): 709-711.
- [27] Schulz B, Boyle C, Draeger S, et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites[J]. *Mycol Res*, 2002, 106(9): 996-1004.
- [28] Stinson M, Ezra D, Hess W M, et al. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds[J]. *PLant Sci*, 2003, 165(4): 913-922.
- [29] Arachevala T A M, Bacon C W, Hoveland C S, et al. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress[J]. *Appl J*, 1989, 81: 83-90.
- [30] White R H, Engelke M C, Morton S J, et al. Acremonium endophyte effects on tall fescue drought tolerance[J]. *Crop Sci*, 1992, 32: 1392-1396.
- [31] Arnold A E, Mejia L C, Killo D, et al. Fungal endophyte limit pathogen damage in a tropical tree[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100: 15649-15654.
- [32] 江曙,陈代杰,戈梅,等. 药用植物内生真菌抗菌活性的筛选[J]. 药物生物技术, 2006, 13(5): 351-353.
- [33] Strobel G A, Miller R V, Martinez-Miller C, et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 1919-1926.
- [34] Li J Y, Strobel G A, Harper J, et al. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* [J]. *Org Lett*, 2000, 2: 767-770.
- [35] Strobel G A. Harnessing endophytes for industrial microbiology[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(3): 240-244.
- [36] Kutil B L, Greenwald C, Liu G, et al. Comparison of loline alkaloid gene clusters across fungal endophytes: predicting the co-regulatory sequence motifs and the evolutionary history[J]. *Fungal Genet Biol*, 2007, 44(10): 1002-1010.

- [37] Spiering M J, Moon C D, Wilkinson H H, *et al.* Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum* [J]. *Genetics*, 2005, 169: 1403-1414.
- [38] Spiering M J, Wilkinson H H, Blankenship J D, *et al.* Expressed sequence tags and genes associated with loline alkaloid expression by the fungal endophyte *Neotyphodium uncinatum* [J]. *Fung Genet Biol*, 2002, 36: 242-254.
- [39] Tanaka A, Tapper B A, Popay A, *et al.* A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory [J]. *Mol Microbiol*, 2005, 57(4): 1036-1050.
- [40] Ryan C A, Farmer E E. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment [J]. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1991, 42: 651-674.
- [41] Namdeo A, Patil S, Fulzele D P. Influence of fungal elicitors of production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(1): 159-163.
- [42] 王剑文, 郑丽屏, 谭仁祥. 促进黄花蒿发根青蒿素合成的内生真菌诱导子的制备 [J]. *生物工程学报*, 2006, 22(5): 829-834.

高速逆流色谱在中药分离中溶剂体系的筛选

程 杰, 符晓晖*, 王维娜

(上海同田生物技术有限公司, 上海 201203)

高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)是近年来迅速发展起来的新型液-液分配色谱技术。与其他液相色谱分离方法相比,其不使用固体载体作固定相,被分离物质在互不相溶两相分配分离,克服了固体载体带来的样品吸附、变性、污染、峰形拖尾等缺点^[1]。由于其所具有的分离功能强、速度快、制备量大的优势,在天然产物、生物制品、抗生素^[2,3]的分析、分离工作中得到越来越广泛的应用。

高速逆流色谱在中药领域的分离纯化中得到相当广泛的应用^[4-6],在黄酮、生物碱、植物多酚、酯类、萜类、木脂素、香豆素、皂苷等几乎所有的天然植物化学成分的分离纯化中都有应用。高速逆流色谱应用分离中,溶剂体系的成功选择是关键。在多年逆流色谱溶剂体系筛选的研究中,有不少研究学者也对此提出自己的思路和看法^[7,8],这些信息对应用逆流色谱分离中药的研究工作有较大的借鉴意义。目前溶剂体系的选择和优化多在于实验经验的积累,没有充分的理论依据,但却具有较强的实用价值。

本文主要是对逆流色谱分离中药实验中溶剂体系的筛选经验进行论述。

1 溶剂体系的选择原则

溶剂体系的选择是高速逆流色谱分离重要的一个环节。选择逆流色谱的溶剂体系时,应注意以下几个方面:不造成样品的分解和变性;足够高的样品溶解度;样品在系统中合适的分析系数值;固定相能够实现足够高的保留^[4]。

2 溶剂体系的筛选

通过查阅文献了解待分离物质的理化性质,如溶解度、极性、酸碱度、稳定性、熔点等,方便寻找合适的溶剂体系。

构成溶剂体系的各组分组成可根据样品的溶解度来筛选,在两相体系中选择某一或几种对其溶解度较好的组分和溶解度较差的组分构成新的溶剂体系。

2.1 常用体系:随着逆流色谱应用的日益广泛,越来越多的

研究人员针对不同的分离物质及类型进行相应的分离纯化研究。通常的筛选体系参考与待分离目标成分相类似的成分的分实例,初步确定溶剂体系的组分及比例,进而根据具体情况做出调整。

以本实验室的实践经验,氯仿体系和醋酸乙酯体系均为常见的经典体系。如采用氯仿-甲醇-水(4:3:2)体系,从银杏叶粗提物中一次分离得到白果内酯单体^[9];采用氯仿-甲醇-水(4:3:2)、醋酸乙酯-乙醇-水(10:1:10)等溶剂体系,从虎杖根的醋酸乙酯提取物及水提物中分离得到白藜芦醇和虎杖苷^[6];应用石油醚-醋酸乙酯-乙醇-水(4:4:1)体系从白术中分离出苍术苷和苍术烯丙酯^[10]。在研发中根据样品的性质、实际的应用效果,参考常见溶剂体系或相应类型和性质的物质的分离文献是个有效的体系筛选方法。

中药的分离通常有3类体系:非极性或弱极性体系、中等极性体系、亲水性体系。可根据待分离物质的性质来选择。

2.1.1 非极性或弱极性体系:一般指适合分离在己烷、石油醚、乙醚、四氯化碳等溶剂中易溶,在甲醇、乙醇等溶剂中溶解的物质。通常选用的溶剂有:正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水、正己烷-甲醇-水、正己烷-乙醇-水、四氯化碳-甲醇-水、正己烷-甲醇、正己烷-乙腈-醋酸乙酯、正己烷-乙腈-二甲醚等。非极性或弱极性体系溶剂条件筛选模型见图1。

2.1.2 中等极性体系:一般适合分离在氯仿、醋酸乙酯、丙醇、丁醇等溶剂中易溶,在甲醇、乙醇溶剂中溶解,石油醚、己烷等溶剂中不溶或难溶的物质。通常选用的溶剂:正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水、正己烷-醋酸乙酯-乙醇-水、氯仿-甲醇-水、氯仿-甲醇-丁醇-水。中等极性体系溶剂条件筛选模型见图2。

2.1.3 亲水性体系:一般适合分离在丁醇、甲醇、乙醇、水等溶剂中易溶,在石油醚、己烷、氯仿等溶剂中难溶的物质。通常为醋酸乙酯-丁醇-甲醇-水;醋酸乙酯-丁醇-乙醇-水;丁醇-水等体系。亲水性体系溶剂条件筛选模型见图3。

2.2 测定分配系数筛选体系:分配系数(K)是分离中一个

植物内生菌与道地药材的相关性研究

作者：[江曙](#)，[钱大玮](#)，[段金彪](#)，[严辉](#)，[于光](#)
作者单位：[南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 江苏南京, 210046](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39 (8)
被引用次数：11次

参考文献(42条)

1. [黄璐琦;陈美兰;肖培根](#) [中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#) 2004 (06)
2. [任德权;索风梅;陈士林](#) [道地药材的产地适宜性研究](#)[期刊论文]-[中药研究与信息](#) 2005 (09)
3. [王永炎;张文生](#) [中药材道地性研究状况与趋势](#)[期刊论文]-[湖北民族学院学报（自然科学版）](#) 2006 (04)
4. [Promputtha I;Lumyong S;Dhanasekaran V](#) [A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence](#)[外文期刊] 2007 (04)
5. [Strobel G A](#) [Microbial gifts from forests](#)[外文期刊] 2002 (1)
6. [Ananda K;Sridhar K R](#) [Diveristy of endophytic fungi in the toots of mangrove species on the west of India](#)[外文期刊] 2002 (10)
7. [Brady S F;Singh M P;Janso J E](#) [Cytoskyrins A and B,new BIA active bisanthraquinones isolated from an endophytic fungus](#) 2002 (02)
8. [Ahlholm J;Helander M L;Elamp P](#) [Micro-fungi and invertebrate herbivores on birch trees:fungal mediated plantherbivore interactions or responses to host quality?](#)[外文期刊] 2002 (5)
9. [Ahlholm J U;Helander M;Henriksson J;et el](#) [Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of Venturia ditricha,a fungal endophyte of birch trees](#)[外文期刊] 2002 (8)
10. [Higgins K L;Arnold A E;Miadlikowska J](#) [Phylogenetic relationships,host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytea from three major plant lineages](#)[外文期刊] 2007 (02)
11. [Saikkonen K;Ion D;Gyllenberg M](#) [The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations](#)[外文期刊] 2002 (1498)
12. [Helander M;Ahlholm J;Sieber T N](#) [Fragmented environment affects birch leaf endophytes](#)[外文期刊] 2007 (03)
13. [Helander M;Wall P;Kuuluvainen T](#) [Birch leaf endophytes in managed and natural boreal forests](#) 2006
14. [Saikkonen K;Helander M;Rousi M](#) [Endophytic foliar fungi in Betula app.& their F1 hybrids](#)[外文期刊] 2003
15. [Verma V C;Gond S K;Kumar A](#) [The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of Azadirachta indica A. Juss \(neem\) from Varanasi \(India\)](#)[外文期刊] 2007 (1)
16. [黄午阳;王凤舞](#) [络石内生真菌的生态分布](#)[期刊论文]-[金陵科技学院学报](#) 2005 (02)
17. [Mocali S;Bertelli E;Di Cello F](#) [Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs](#)[外文期刊] 2003 (02)
18. [王梅霞;张丽;陈双林](#) [杜仲内生真菌类群与分布的初步研究](#)[期刊论文]-[菌物研究](#) 2006 (03)
19. [Murali T S;Suryanarayanan T S;Geeta R](#) [Endophytic Phomopsis species:host range and implications for diversity estimates](#)[外文期刊] 2006 (07)

20. [Saikonen K;Wall P;Helander M Evolution of endophyte-plant symbioses\[外文期刊\] 2004\(06\)](#)
21. [Toofanec B S;Dulymamode R Fungal endophytes associated with Cordemoya integrifolia 2002](#)
22. [Ernst M;Mendgen K W;Wirsal S G Endophytic fungal mutualists:seed-borne Stagonospora spp.enhance reed biomass production in axenic microcosms\[外文期刊\] 2003\(07\)](#)
23. 高微微;郭顺星 [内生真菌丝及代谢物对铁皮石斛及金线莲生长的影响\[期刊论文\]-中国医学科学院学报](#) 2001(06)
24. [Jha P N;Kumar A Endophytic colonization of Typha australia by a plant growth-promoting bacterium Klebsiella oxytoca stain GR-3\[外文期刊\] 2007\(04\)](#)
25. 赵杨景;郭顺星;高薇薇 [三种内生真菌与大花蕙兰共生对矿质营养吸收的影响\[期刊论文\]-园艺学报](#) 1999(02)
26. [Kongsaree P;Prabpai S;Sriubolmas N Antimalarial dihydrocoumarins produced by Geotrichum sp., an endophytic fungus of Crassocephalum crepidioides 2003\(05\)](#)
27. [Schulz B;Boyle C;Draeger S Endophytic fungi:a source of novel biologically active secondary metabolites\[外文期刊\] 2002\(09\)](#)
28. [Stinson M;Ezra D;Hess W M An endophytic Gliocladium sp.of Eucryphia cordifolia producing selective volatile antimicrobial compounds\[外文期刊\] 2003\(04\)](#)
29. [Araehevale T A M;Bacon C W;Hovelaod C S Effect of the tall rescue endophyte on plant response to environmental stress 1989](#)
30. [White R H;Engelke M C;Morton S J Acremonium endophyte effects on tall rescue drought tolerance 1992](#)
31. [Arnold A E;Mejia L C;Kyllo D Fungal endophyte limit pathogen damage in a tropical tree 2003](#)
32. 江曙;陈代杰;戈梅 [药用植物内生真菌抗菌活性的筛选\[期刊论文\]-药物生物技术](#) 2006(05)
33. [Strobel G A;Miller R V;Martinez-Miller C Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus Cryptosporiopsis cf. quercina 1999](#)
34. [Li J Y;Strobel G A;Harper J Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus Cryptosporiopsis of quercina 2000](#)
35. [Strobel G A Harnessing eodophytes for industrial microbiology 2006\(03\)](#)
36. [Kutil B L;Greenwald C;Liu G Comparison of loline alkaloid gene clusters across fungal endophytes, predicting the co-regulatory sequence motifs and the evolutionary history\[外文期刊\] 2007\(10\)](#)
37. [Spiering M J;Moon C D;Wilkinson H H Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus Neotyphodium uncinatum\[外文期刊\] 2005\(3\)](#)
38. [Spiering M J;Wilkinson H H;Blankenship J D Expressed sequence tags and genes associated with loline alkaloid expression by the fungal endophyte Neotyphodium uncinatum\[外文期刊\] 2002\(3\)](#)
39. [Tanaka A;Tapper B A;Popay A A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutulistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory\[外文期刊\] 2005\(04\)](#)
40. [Ryan C A;Farmer E E Oligosaccharide signals in plants:a current assessment 1991](#)
41. [Namdeo A;Patil S;Fulzele D P Influence of fungal elicitors of production of ajmalicine by cell](#)

42. [王剑文](#); [郑丽屏](#); [谭仁祥](#) [促进黄花蒿发根青蒿素合成的内生真菌诱导子的制备](#) [期刊论文] - [生物工程学报](#) 2006(05)

本文读者也读过(10条)

1. [姚领爱](#), [胡之璧](#), [王莉莉](#), [周吉燕](#), [黎万奎](#), [YAO Ling'ai](#), [HU Zhibi](#), [WANG Lili](#), [ZHOU Jiyan](#), [LI Wankui](#) [植物内生菌与宿主关系研究进展](#) [期刊论文] - [生态环境学报](#) 2010, 19(7)
2. [江曙](#), [陈代杰](#), [陶金华](#), [戈梅](#), [JIANG Shu](#), [CHEN Dai-jie](#), [TAO Jin-hua](#), [GE Mei](#) [植物内生菌及其代谢产物的药学研究进展](#) [期刊论文] - [中国生化药物杂志](#) 2008, 29(6)
3. [江军山](#), [张鑫](#) [产抗菌活性物质植物内生菌的研究进展](#) [期刊论文] - [安徽农业科学](#) 2010, 38(22)
4. [陈美兰](#), [黄璐琦](#), [欧阳少华](#), [邵爱娟](#), [林淑芳](#) [植物内生菌对道地药材形成的影响](#) [期刊论文] - [中国中医药信息杂志](#) 2006, 13(9)
5. [邓义熹](#), [张亚雄](#), [涂璇](#) [植物内生菌活性成分研究进展](#) [期刊论文] - [安徽农业科学](#) 2009, 37(24)
6. [江曙](#), [钱大玮](#), [段金廛](#), [于光](#), [严辉](#) [植物内生菌与道地药材的相关性研究](#) [会议论文] - 2008
7. [易婷](#), [缪煜轩](#), [冯永君](#), [YI Ting](#), [MIAO Yu-Xuan](#), [FENG Yong-Jun](#) [内生菌与植物的相互作用: 促生与生物薄膜的形成](#) [期刊论文] - [微生物学通报](#) 2008, 35(11)
8. [蔡坤](#), [刘四新](#), [李从发](#) [植物内生菌及其生物活性物质研究进展](#) [会议论文] - 2009
9. [贾敏](#), [游飞](#), [秦路平](#), [JIA Min](#), [YOU Fei](#), [QIN Lu-ping](#) [内生菌药用新资源与道地药材的关系探讨](#) [期刊论文] - [药学服务与研究](#) 2009, 9(5)
10. [杜永新](#), [生吉萍](#), [申琳](#) [植物内生菌及其代谢产物抗虫活性研究进展](#) [期刊论文] - [安徽农业科学](#) 2010, 38(26)

引证文献(11条)

1. [韦小艳](#), [朱秀芹](#), [郑艳](#), [杨安娜](#) [牡丹皮根际AM真菌与土壤因子相关性分析](#) [期刊论文] - [中国民族民间医药](#) 2010(1)
2. [陶金华](#), [汪冬庚](#), [濮雪莲](#), [赵喜](#), [江曙](#) [H2O2介导内生真菌诱导子促进茅苍术细胞HMGR的活化和 \$\beta\$ -枝叶醇的生物合成](#) [期刊论文] - [中草药](#) 2013(19)
3. [刘建利](#) [宁夏枸杞内生真菌的分离及抗氧化活性的测定](#) [期刊论文] - [时珍国医国药](#) 2011(4)
4. [江曙](#), [段金廛](#), [钱大玮](#), [陶金华](#) [当归内生真菌抗植物病原菌的活性研究](#) [期刊论文] - [植物保护](#) 2012(1)
5. [江曙](#), [段金廛](#), [陶金华](#), [严辉](#), [郑建兵](#) [明党参内生真菌种群的生态分布及其诱导子活性研究](#) [期刊论文] - [中草药](#) 2010(1)
6. [姚领爱](#), [胡之璧](#), [王莉莉](#), [周吉燕](#), [黎万奎](#) [植物内生菌与宿主关系研究进展](#) [期刊论文] - [生态环境学报](#) 2010(7)
7. [郑国栋](#), [蒋林](#), [杨雪](#), [杨得坡](#), [周芳](#), [林乐维](#) [不同贮藏年限广陈皮黄酮类成分的变化规律研究](#) [期刊论文] - [中成药](#) 2010(6)
8. [陈宜涛](#), [王伟剑](#) [植物内生菌的研究进展](#) [期刊论文] - [现代生物医学进展](#) 2009(16)
9. [周应群](#), [曹海禄](#), [赵润怀](#), [陈士林](#) [中药资源生态学方法研究进展](#) [期刊论文] - [中国中药杂志](#) 2011(3)
10. [邓锋](#), [梁蔚阳](#) [陈皮质量研究进展](#) [期刊论文] - [今日药学](#) 2012(10)
11. [魏宝阳](#), [曹亮](#), [李顺祥](#), [黄丹](#), [周晋](#), [魏小翊](#) [内生菌与药用植物的关系及对次生代谢产物的影响](#) [期刊论文] - [中国农学通报](#) 2011(19)