

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201501023

魏琴, 谭韵雅, 李群, 等. 内生真菌对油樟悬浮细胞培养的影响[J]. 广西植物, 2016, 36(8):923-929

WEI Q, TAN YY, LI Q, et al. Effects of fungal endophytes on cell suspension culture of *Cinnamomum longepaniculatum*[J]. Guihaia, 2016, 36(8):923-929

## 内生真菌对油樟悬浮细胞培养的影响

魏琴<sup>1</sup>, 谭韵雅<sup>2</sup>, 李群<sup>2\*</sup>, 游玲<sup>1</sup>, 汪超<sup>2</sup>, 王玉<sup>1</sup>, 廖淋<sup>1</sup>

(1. 宜宾学院 香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室, 四川 宜宾 644000;

2. 四川师范大学 生命科学学院, 成都 610101)

**摘要:** 该文研究了内生真菌 YG42、YG71、YY11 和 YY26 发酵液, 对油樟悬浮细胞的生长量及挥发性代谢产物积累量的影响。结果表明: 4 种内生真菌对油樟悬浮细胞的生长均有抑制作用, 抑制强度随发酵液添加量的增加而加强。4 种内生真菌对油樟悬浮细胞挥发性代谢产物积累总量及 1,8-桉叶油素、 $\gamma$ -叶松油烯和  $\alpha$ -松油醇 3 种油樟油组物质积累量的影响多表现为低浓度促进高浓度抑制的趋势。其中, 1% 添加量的 YG42 和 YY26 及 0.25% 添加量的 YY11 对悬浮细胞总挥发性代谢产物积累的促进作用相当且最强, 其积累量分别是空白组的 2.00、1.95、2.01 倍; 0.25% 添加量的 YG71 对 1,8-桉叶油素积累的促进作用最强, 其积累量为空白组的 11.03 倍; 0.25% 添加量的 YG71 和 YY26 对  $\alpha$ -松油醇积累的促进作用相当且最强, 其积累量分别为空白组的 1.72 和 1.81 倍; 对于  $\gamma$ -松油烯的积累, 在空白组中未检测到其峰值, 4 种真菌诱导子对  $\gamma$ -松油烯的产生有诱导作用, 诱导的最大峰面积为 0.19, 诱导菌是 0.25% 添加量的 YG71。该研究结果为充实内生菌影响香料植物挥发性代谢产物合成理论奠定了基础, 也为生产上内生真菌提高油樟油中有效物质组分含量措施的采用提供了依据。

**关键词:** 内生真菌, 挥发性代谢产物, 悬浮培养, 1,8-桉叶油素,  $\gamma$ -松油烯,  $\alpha$ -松油醇

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2016)08-0923-07

## Effects of fungal endophytes on cell suspension culture of *Cinnamomum longepaniculatum*

WEI Qin<sup>1</sup>, TAN Yun-Ya<sup>2</sup>, LI Qun<sup>2\*</sup>, YOU Ling<sup>1</sup>, WANG Chao<sup>2</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, LIAO Lin<sup>1</sup>

(1. Key Lab of Aromatic Plant Resources Exploitation and Utilization in Sichuan Higher Education, Yibin University, Yibin 644000, China; 2. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China)

**Abstract:** We studied the effects of fungal endophytes YG42, YG72, YY11 and YY26 on cell growth and volatile of secondary metabolites accumulation in suspension cultures of *Cinnamomum longepaniculatum*. The results showed that four kinds of fungal endophytes had obvious inhibitory effects on *C. longepaniculatum* cell growth, and the denser the fermentation fluid was, the stronger inhibitory effects they had. The trend of the effects that the four kinds of endophytic fungi had on the total volatile of secondary metabolites accumulation and *C. longepaniculatum* oil component 1,8-cineole  $\gamma$ -terpinene and  $\alpha$ -terpineol accumulation in suspension cultures of *C. longepaniculatum* was promoted at a low concentration and inhibition at a high concentration. The promotion effects of 1% YG42, YY26 and 0.25% YY11 on the total

收稿日期: 2015-01-19 修回日期: 2015-03-03

基金项目: 四川省教育厅项目(08ZA002); 四川省科技计划项目(2010JY0093); 宜宾市科技局项目(2011ZSF008); 四川省高校重点实验室项目(2012KFZ001)[Supported by Sichuan Program of Education Office(08ZA002); Sichuan Planning Program of Science and Technology(2010JY0093); Yibin City Program of Science and Technology Bureau(2011ZSF008); Key Laboratory of Sichuan Colleges and Universities(2012KFZ001)]。

作者简介: 魏琴(1967-), 女, 四川屏山人, 博士, 教授, 主要从事资源植物学研究, (E-mail) weiqin2001-67@163.com。

\*通讯作者: 李群, 博士, 副教授, 主要从事植物组织培养研究, (E-mail) liqun01234@163.com。

volatile of secondary metabolites accumulation were equivalent, and they had the strongest promoting effects on the total volatile of secondary metabolites accumulation, which were 2.00, 1.95 and 2.01 times of the control respectively. The 0.25% YG71 had the strongest promoting effects on the 1,8-cineole accumulation, which was 11.03 times of the control. The 0.25% YG71 and YY26 had the strongest promoting effects on the  $\alpha$ -terpineol accumulation, which were 1.72 and 1.81 times of the control respectively.  $\gamma$ -terpinene was not detected in the control. Four kinds of endophytic fungi could induce  $\gamma$ -terpinene production, the biggest peak areas were 0.19, and the endophytic fungi was 0.25% YG71. This research will enrich the theory that fungal endophytes affect the volatile of secondary metabolites in aromatic plant, and provide experimental evidence for the use of endophytic fungi to increase the amount of useful component in *C. longepaniculatum* oil accumulation in production.

**Key words:** fungal endophytes, volatile of secondary metabolites, suspension culture, 1,8-cineole,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -terpineol

植物内生菌群落和宿主在长期协同进化过程中,内生真菌能产生某些物质以快速、专一、选择性地诱导植物代谢过程中某些基因的表达,进而调节植物中代谢物质的积累(谭燕等,2013)。由于内生真菌与宿主植物之间存在基因水平转移,使内生菌与宿主植物有相似的代谢途径,从而可能形成相同或相似的代谢产物或者宿主植物代谢产物的前体物质,导致内生菌对宿主细胞代谢产物产量有较大影响(朱国胜等,2005;Peters et al, 1998; Vijay et al, 2014; Yang et al, 2014)。某些真菌具有萜类生物转化能力(Molina et al, 2013; Michael et al, 2009)。因此,以单萜、倍半萜、二萜等多种萜类物质为主要成分的香料植物的芳香油的形成可能与内生真菌有相关性。

油樟(*Cinnamomum longepaniculatum*)为樟科(Lauraceae)樟属(*Cinnamomum*)常绿乔木,是重要的经济作物,其根、茎、叶、种子均可提取芳香油。油樟叶中提取的芳香油主要成分是萜类物质,占芳香油在85%以上(胡文杰等,2012)。其中,已报道有重要经济价值的成分有1,8-桉叶油素, $\gamma$ -松油烯, $\alpha$ -松油醇等(Li et al, 2014)。游玲等(2009)研究表明,油樟内生真菌代谢产物中存在大量油樟油组分中的单萜组分、其类似物或前体物质,并推测油樟内生真菌参与了油樟油的形成过程。关于油樟油中有重要经济价值的1,8-桉叶油素, $\gamma$ -松油烯, $\alpha$ -松油醇等的形成是否与内生真菌有密切关系尚未见有研究报道。基于此,本研究以悬浮培养系为对象,以分离到的内生真菌为诱导子,通过研究内生真菌对悬浮细胞挥发性物质积累及相关萜类物质积累的影响情况,以期探讨内生真菌与1,8-桉叶油素, $\gamma$ -松油烯, $\alpha$ -松油醇等萜类物质积累的相关性。这对充实内生

菌影响香料植物萜类物质等挥发性代谢产物合成理论有积极意义,也对生产上内生真菌提高油樟油中 有用物质组分含量措施的采用提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

内生真菌 YG42(从油樟根中分离的真菌,编号为42,初步鉴定为初步鉴定为稀丝头孢霉属 *Haplotrichum*)、YG71(从油樟根中分离的真菌,编号为71,肿节暗孢霉属 *Oedemium*)、YY11(从油樟叶中分离的真菌,编号为11,有待鉴定)和 YY26(从油樟叶中分离的真菌,编号为26,初步鉴定为拟内孢霉属 *Endomycopsis*)由宜宾学院香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室提供;1,8-桉叶油素( $0.5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ , HPLC  $\geq 99\%$ )、 $\alpha$ -松油醇( $0.1 \text{ g} \cdot \text{支}^{-1}$ , 98%) 和  $\gamma$ -松油烯( $1 \text{ g} \cdot \text{支}^{-1}$ , GC 95%)三种标品在北京世纪奥科生物技术有限公司购回。

采用气相色谱仪[Agilent7890A、火焰离子化检测器(FID)]。

### 1.2 方法

1.2.1 油樟悬浮细胞系建立 参照魏琴等(2008)的配方进行愈伤组织培养。培养基配方是 B5 + NAA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 蔗糖 3% + 琼脂 0.7%, pH 5.8。将愈伤组织(约2g鲜重)接种到40 mL 液体培养基中悬浮培养,培养温度  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , 摇床转速  $110 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。每20 d 继代1次,连续继代3次,直至愈伤组织较为疏松后用于建立悬浮培养体系。

1.2.2 内生真菌发酵液制备 将内生真菌 YG42、YG71、YY11 和 YY26 接种于 PDA 培养基上,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温培养 4 d, 无菌水洗脱孢子, 制成浓度为  $10^7$  个

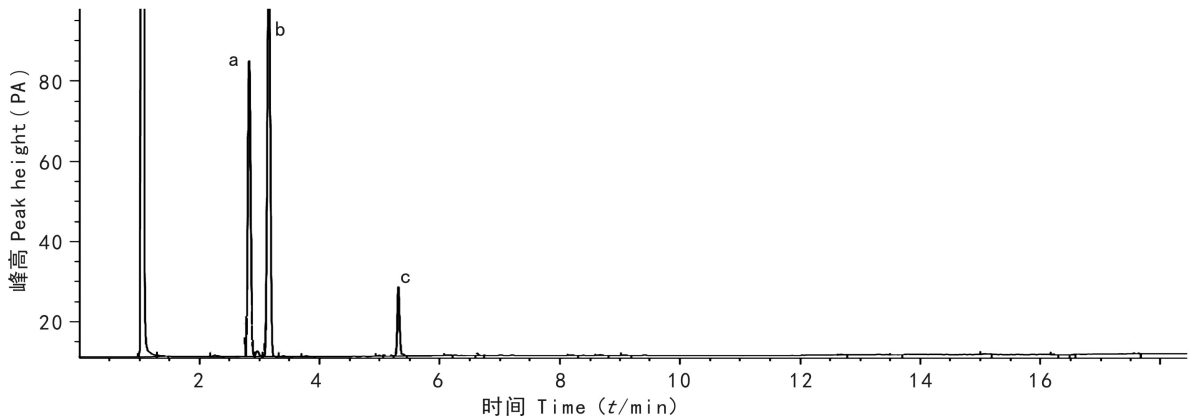


图 1 混合标样 GC 图 a. 1,8-桉叶油素, 出峰时间为 2.840 min; b.  $\gamma$ -松油烯, 出峰时间为 3.167 min; c.  $\alpha$ -松油醇, 出峰时间为 5.325 min。

Fig. 1 Chromatograms for mix standard The retention time of 1,8-cineole (a),  $\gamma$ -Terpinene (b) and  $\alpha$ -Terpineol (c) is 2.840, 3.167 and 5.325 min, respectively.

孢子  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的孢子悬液, 接种 1 mL 于含 40 mL 液体培养基 (麦芽浸膏 20 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 1 g, pH 5) 的三角瓶中, 摇床转速为  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  培养 8 d。超声波破碎, 备用。

1.2.3 1,8-桉叶油素、 $\gamma$ -松油烯和  $\alpha$ -松油醇 3 种物质混和标样的制备与检测 称取 0.5 g 1,8-桉叶油素、 $\gamma$ -松油烯和  $\alpha$ -松油醇标品, 分别置于 50 mL 容量瓶中用乙醇定容, 制成  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的标准溶液。取配好的  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 3 种标准溶液, 用超纯水稀释配制成浓度为  $0.001 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的混和标样。取 10 mL 培养物顶空进样, 气相色谱检测。

1.2.4 内生真菌对悬浮细胞生长和挥发性物质积累的影响 试验分三轮进行。第一轮: 在液体培养基中分别添加浓度为 1% (100 mL 悬浮细胞培养基中) 添加 1 mL 内生真菌发酵液, 以下同)、4%、7%、10% 的 4 种内生真菌发酵液, 以不加内生真菌发酵液的悬浮培养系作为空白组,  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  高压灭菌 18 min。待冷却后, 将愈伤组织 (2 g 鲜重) 接种到含不同浓度发酵液的 40 mL 液体培养基中悬浮培养。每组重复 3 瓶, 摇床转速  $110 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下培养 20 d 后, 进行生物量的测定; 取 10 mL 培养物顶空进样, 气相色谱检测。在此试验结果基础上, 进行第二轮试验: 在液体培养基中分别添加浓度为 0.1%、0.25%、0.5%、0.75%、1% 的 4 种内生真菌发酵液, 以不加内生真菌发酵液的悬浮培养系作为空白组, 接种、灭菌、培养、检测等方法同上。根据试验结果, 进行第三轮试验: 选择上两轮试验中的关键性浓度

0.1%、0.25%、1%、4%、10% 的 4 种内生真菌添加量重复以上试验以验证试验结果。方法同上。

1.2.4.1 生物量的测定 将悬浮细胞培养物抽滤, 取细胞, 置于烘箱中  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  干燥至恒重, 称其质量为细胞干重。每组重复 3 次。

1.2.4.2 气相色谱检测条件 HP-5 (30 m  $\times$  320  $\mu\text{m}$   $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ) 毛细管柱, 平衡温度  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 平衡时间 20 min。载气为氮气, 氢气流速  $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 空气流速  $400 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 氮气尾吹气  $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 顶空进样, 分流比 3.0。柱箱程序: 先  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  保持 4 min, 再  $20 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  到  $130 \text{ }^\circ\text{C}$  保持 5 min, 然后  $20 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  到  $190 \text{ }^\circ\text{C}$  保持 1 min, 最后  $20 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  到  $240 \text{ }^\circ\text{C}$  保持 1 min。每组重复 3 次。

1.2.5 数据处理 以峰面积表示各物质的产量, 其中总挥发性次生代谢产物以总峰面积表示。所有数据均用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。数据以平均值  $\pm$  标准误即 ( $x \pm s$ ) 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 混合标样 GC 分析

由混合标品的气相色谱检测结果 (图 1) 可知, 1,8-桉叶油素、 $\gamma$ -松油烯和  $\alpha$ -松油醇的出峰时间分别为 2.840、3.167 和 5.325 min。图 1 中相同的出峰时间被认为是标品相同的物质。

### 2.2 4 种内生真菌对悬浮细胞生长的影响

4 种内生真菌对悬浮细胞的生长的影响见表 1。

表1 内生真菌处理后悬浮细胞的生物量

Table 1 Suspension cell biomass after processed by fungal endophytes ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

浓度 Concentration	0 (空白) 0 (Control)	0.1%	0.25%	1%	4%	10%
YG42	12.15 ± 1.10a	12.09 ± 0.92a	10.88 ± 0.32b	10.30 ± 0.30b	7.28 ± 0.15c	6.15 ± 0.07d
YG71	12.15 ± 1.10a	11.99 ± 1.22a	10.91 ± 0.28b	10.62 ± 0.17b	7.55 ± 0.19c	5.76 ± 0.15d
YY11	12.15 ± 1.10a	12.11 ± 0.99a	10.76 ± 0.12b	10.66 ± 0.16b	5.80 ± 0.15d	3.71 ± 0.11f
YY26	12.15 ± 1.10a	12.04 ± 1.02a	10.82 ± 0.15b	10.45 ± 0.44b	6.04 ± 0.15d	5.26 ± 0.08e

注:数据均为“平均值 ± 标准误”,标准误后面所带字母表示其对比因素下的差异性,字母相同表示无差异,字母不同表示具有显著差异,字母顺序按所对比数据从大到小排列;数据用 SPSS 17.0 处理分析,数据显著性检测在  $P \leq 0.05$  下多范围 Duncan 检测下获得。下同。

Note: Data represent mean ± SE”, and the letters mean significant differences. Same letters mean no significant difference, and different letters mean contrary results. Data are tested ( $P \leq 0.05$ ) according to Duncan’s multiple range test (DMRT) with SPSS 17.0. The same below.

方差分析表明,除浓度为 0.1% 的试验组外,其余所有试验组中的细胞干重与对照组相比都有显著性差异。4 种内生真菌对悬浮细胞的生长均有一定的抑制作用,且抑制作用强度随着真菌发酵液浓度的增加而增强。经 Duncan 检测得知,在试验范围内,10% 添加量的 YY11 真菌诱导子对悬浮细胞生长的抑制作用最强。

### 2.3 4 种内生真菌对悬浮细胞总挥发性代谢产物积累量的影响

4 种内生真菌对悬浮细胞总挥发性代谢产物积累量的影响见表 2。表 2 显示,经 4 种内生真菌诱导后悬浮细胞总挥发性代谢产物积累的量与空白相比,有显著性差异。总体趋势是低浓度促进高浓度抑制,但不同内生真菌起促进作用的浓度是不一样的。对于 YG42 和 YY26 在真菌浓度为 1% 时,其总峰面积最大,分别是空白的 2.00 和 1.95 倍;YY11 在真菌浓度为 0.25% 时其总峰面积最大,为空白的 2.01 倍;YG71 在所设实验浓度范围内未出现促进作用,而是呈接近空白(低浓度时)或抑制作用(高浓度时),抑制强度随着浓度的增加而增强。经 Duncan 检测得知,1% 添加量的 YG42 和 YY26 及 0.25% 添加量的 YY11 对总峰面积的影响无显著性差异,其对悬浮细胞总挥发性代谢产物积累量的促进作用相当且最强。

### 2.4 4 种内生真菌对 3 种萜类物质及其它物质积累的影响

4 种内生真菌对悬浮细胞 3 种萜类物质及其它物质积累的影响见表 3 及图 2。经 4 种内生真菌诱导后 3 种萜类物质积累的量与空白组相比,大部分有显著性差异。总体影响与总挥发性物质积累量相

似,同一内生真菌对 3 种物质表现为在低浓度条件下呈促进作用或与空白接近,在高浓度条件下呈抑制作用。不同内生真菌在同一浓度下,对 3 种萜类的作用效果不同;同一浓度下,不同内生真菌对不同萜类物质诱导效果有差异;对每一种萜类的诱导,要求的最佳内生真菌的浓度是不一样的。

对于 1,8-桉叶油素的积累,YG42 和 YG26 对其均呈抑制作用,YG71 和 YY11 对其均表现为低浓度促进高浓度抑制的现象,且均是在浓度为 0.25% 促进作用最强,此时 1,8-桉叶油素的产量分别为空白组的 11.03 和 1.59 倍。经 Duncan 检测得知,其中促进作用最强的是浓度为 0.25% 的 YG71(图 2,表 3)。

对于  $\gamma$ -松油烯的积累,在空白对照组中未检测到其峰值。在 0.25% 添加量的 4 种真菌诱导子作用下,检测到  $\gamma$ -松油烯有不同的峰值,其中峰面积最大的是 0.19,其诱导菌是 0.25% 添加量的 YG71。说明 4 种真菌诱导子对  $\gamma$ -松油烯的产生有诱导作用(表 3)。

对于  $\alpha$ -松油醇的积累,4 种真菌诱导子对松油醇积累均表现为低浓度促进高浓度抑制的现象,且均是在浓度为 0.25% 时其促进作用最强,此时  $\alpha$ -松油醇的产量分别为空白组的 1.57、1.72、1.43 和 1.81 倍。经 Duncan 检测得知,浓度为 0.25% 的 YG71 和 YY26 对悬浮细胞  $\alpha$ -松油醇的积累影响无显著性差异,其促进作用相当且最强(表 3)。

从图 2 可见,0.25% YG71 试验组色谱图中,在 2~3 min 及 8~14 min 范围内所出面积和峰数量与对照组相比有明显的增加,出现了一些空白组中没有的峰,证明诱导子除诱导增加了所测的 1,8-桉叶油素、 $\alpha$ -松油醇和  $\gamma$ -松油烯产量外,还诱导了其他

表 2 内生真菌处理后悬浮细胞中总挥发性代谢产物积累量 (总峰面积/pAs)

Table 2 Accumulation of total volatile substances in suspension cells after processed by fungal endophytes (Total peak area/pAs)

浓度 Concentration	0(空白) 0 (Control)	0.1%	0.25%	1%	4%	10%
YG42	658.02 ± 25.90b	650.45 ± 29.09b	661.74 ± 35.49b	1318.97 ± 89.53a	332.99 ± 11.77d	-567.48 ± 24.84h
YG71	658.02 ± 25.90b	662.57 ± 33.18b	673.68 ± 28.80b	662.38 ± 32.51b	52.56 ± 2.91e	-579.79 ± 19.88h
YY11	658.02 ± 25.90b	671.68 ± 30.56b	1321.40 ± 75.97a	532.88 ± 15.74c	322.92 ± 5.30d	67.59 ± 5.56e
YY26	658.02 ± 25.90b	657.02 ± 25.78b	653.01 ± 26.90b	1284.70 ± 65.07a	16.00 ± 1.66f	-530.87 ± 17.26g

注: 总峰面积=样品总峰面积-空白总峰面积。下表同。

Note: Total peak area = Sample total peak area - control total peak area. The same below.

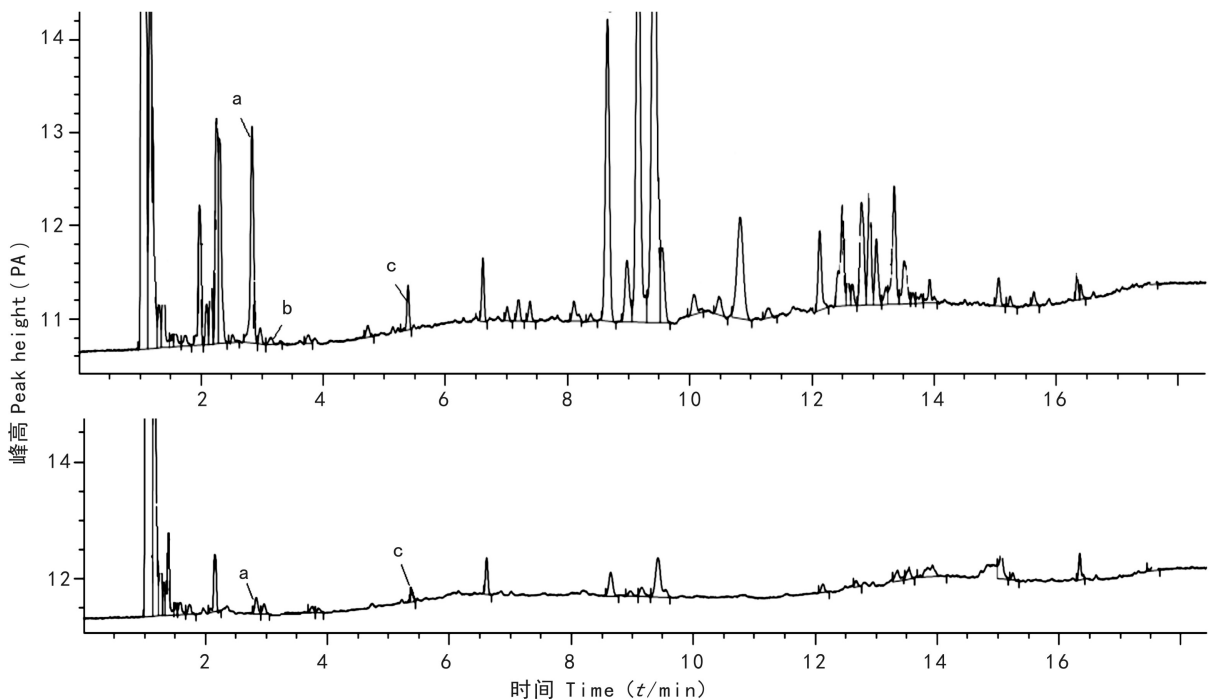


图 2 0.25%YG71 处理悬浮细胞后挥发性物质积累的色谱图 A. 样品; B. 空白。

Fig. 2 Chromatograms for the accumulation of volatile substances in suspension cells after processed by 0.25% YG71 A. Sample; B. Control.

代谢产物的增加与新的代谢产物的产生。

### 3 讨论与结论

本研究中,从油樟根和叶中分离得到的 4 种内生真菌加入悬浮细胞后,细胞生物量普遍受到抑制,而对总挥发性代谢产物及 3 种萜类物质积累影响的总体趋势是在低浓度下有促进作用。这与细胞生长分裂能力下降时,次生代谢物产量高,及细胞生长分裂能力旺盛时,次生代谢物产量低的普遍规律(李

浚明和朱登云,2005)吻合。虽然内生真菌对悬浮细胞生长有一定的抑制作用,但可尝试通过改变添加真菌发酵液的时间等因素来克服这一问题(游玲等,2009),有待进一步研究。本研究中,4 种内生真菌对油樟悬浮细胞生长的抑制作用随着浓度的增加其抑制作用越强。这表明真菌代谢物中可能含有某些会影响细胞生长的有毒物质,或者是诱导过程中细胞本身产生了一些对自身有毒的物质(Lan et al, 2003)。具体的作用机制还需进一步深入研究。

本研究中,4种内生真菌中,无论是来自油樟叶

表 3 内生真菌处理后悬浮细胞中 3 种萜类化合物积累量 (峰面积/pAs)

Table 3 Accumulation of three kinds of terpenoids in suspension cells after processed by endophytic fungi (Peak areas /pAs)

油樟油组分物质 <i>Cinnamomum longepaniculatum</i> oil component	浓度 Concentration (%)	内生真菌号 Code of fungus endophytes			
		YG42	YG71	YY11	YY26
1,8-桉叶油素积累量 1,8-cineole accumulation	0 (空白) (Control)	0.76 ± 0.03e	0.76 ± 0.03e	0.76 ± 0.03e	0.76 ± 0.03e
	0.10	0.72 ± 0.04e	2.18 ± 0.09c	0.77 ± 0.03e	0.73 ± 0.04e
	0.25	0.79 ± 0.03e	8.38 ± 0.22a	1.21 ± 0.06d	0.55 ± 0.02e
	1	0.12 ± 0.01f	3.67 ± 0.12b	-0.87 ± 0.05g	-0.76 ± 0.05g
	4	-4.14 ± 0.18i	-4.61 ± 0.18j	-2.32 ± 0.10h	-3.68 ± 0.12i
	10	-10.98 ± 0.36l	-11.08 ± 0.45l	-10.35 ± 0.29k	-10.56 ± 0.042k
γ-松油烯积累量 γ-Terpinene accumulation	0 (空白) (Control)	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
	0.10	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
	0.25	0.09 ± 0.01a	0.19 ± 0.01a	0.11 ± 0.01a	0.11 ± 0.01a
	1	-0.92 ± 0.02a	-0.52 ± 0.02b	0.17 ± 0.01a	-0.40 ± 0.02a
	4	-4.52 ± 0.13e	-1.59 ± 0.19c	-0.04 ± 0.00a	-2.28 ± 0.14d
	10	-13.21 ± 0.64h	-5.21 ± 0.15f	-0.17 ± 0.01a	-6.51 ± 0.28g
α 松油醇积累量 α-Terpineol accumulation	0 (空白) (Control)	0.68 ± 0.01f	0.68 ± 0.01f	0.68 ± 0.01f	0.68 ± 0.01f
	0.10	0.70 ± 0.02f	0.67 ± 0.03f	0.71 ± 0.03f	0.69 ± 0.04f
	0.25	1.07 ± 0.12c	1.17 ± 0.05a	0.97 ± 0.04d	1.23 ± 0.04a
	1	0.87 ± 0.001e	1.12 ± 0.03b	0.73 ± 0.03f	0.56 ± 0.06g
	4	0.65 ± 0.02f	0.40 ± 0.02h	0.38 ± 0.01h	0.01 ± 0.00i
	10	-0.25 ± 0.02j	-0.83 ± 0.02m	-0.61 ± 0.04l	-0.43 ± 0.02k

的内生真菌 YY11 和 YY26 还是来自油樟根的内生真菌 YG71 和 YG42 都在不同程度上促进了挥发性代谢产物的积累。诱导作用最强的内生真菌 YG71 是来自于根的,而诱导的对象 1,8-桉叶油素主要存在于叶 (55.58%) 中。说明内生真菌影响宿主细胞挥发性代谢产物,特别是萜类物质的积累,无器官特异性或无明显的器官关联性。这可能与内生真菌在宿主体内的定殖与扩散有关。

本研究中,内生真菌对 3 种挥发性萜类积累的促进作用最大的产物是油樟油主成分 1,8-桉叶油素,高于空白 10 倍。这在一定程度上解释了游玲 (2009) 等推测的宜宾产油樟油 1,8-桉叶油素的含量高于江西等地产的原因是宜宾独特的生态环境导致的特殊内生菌微环境有关系,但 YG71 是否是宜宾油樟特有的内生真菌还有待于进一步研究。

Expósito et al (2009) 研究表明外源紫杉醇诱导

子对紫杉醇相关基因的表达存在调控作用。本研究所用内生真菌中可能含有与所测物质相同或类似物的外源物质 (游玲等, 2009), 这些物质在对油樟细胞的诱导过程中起到一定的作用,但是怎样影响相关基因的表达,还有待进一步针对内生菌作用下这些代谢产物的 mRNA 水平和蛋白质水平分子响应情况及基因组和蛋白质组解释研究。

本研究因为受标品限制,仅检测了目前开发利用价值较高的、有标品的 3 种萜类物质。内生真菌 YG71 还可以诱导其它代谢产物的增加或新的代谢产物的产生。这些物质有待于进一步的鉴定。这说明内生真菌对宿主细胞代谢影响是通过多代谢途径实现的,并影响多种物质的生物合成。

由于本研究中所加发酵液含有与所测产物相同或相似的挥发性物质,在表示产物的积累时减去了诱导子原本含有的部分,因此部分产物积累量为负

值。负值意味着悬浮细胞挥发性物质积累量少于添加的真菌发酵液中所含挥发性物质。负值主要是在高浓度(10%)真菌发酵液条件下出现的。这说明高浓度的内生真菌发酵液抑制了悬浮细胞挥发性物质的产生。这可能与内生菌和宿主细胞之间有共代谢途径,内生真菌参与了油樟油的形成过程并有共同代谢产物有关(游玲等,2009)。这样的结果可能导致悬浮体系中添加的多量诱导子促进了悬浮细胞生成物增加,使悬浮细胞代谢反应向减少生成物质方向进行,也许生成了其它不挥发性或者挥发性差的物质,擅长检测挥发性物质的 GC-MS 未能检测到。这还有待于进一步研究。

内生真菌在体外进行培养时,菌的生长代谢状况会与其在体内有较大差异,再加上挥发性物质产生后在培养、破碎、灭菌等过程中有不少的挥发损失。因此,真正加入到培养基中起作用的挥发性代谢产物的种类和数量会少于在内环境中实际的代谢产物,所以,此结果只能在一定程度上反映内生真菌对宿主细胞生长和代谢产物积累的作用。但本研究结果对于世界需求量很大的油樟来源的左旋 1,8-桉叶油素(其它植物源 1,8-桉叶油素是右旋)生产有指导意义,如通过强化接种、浇灌菌种发酵液等形式进行提高代谢产物措施的菌种选择有指导意义,对充实内生菌影响香料植物萜类物质等挥发性代谢产物合成理论有积极意义。

## 参考文献:

EXPÓSITO O, BONFILL M, ONRUBIA M, et al, 2009. Effect of taxol feeding on taxol and related taxane production in *Taxus baccata* suspension cultures [J]. *New Biotechnol*, 25(4): 252-259.

HU WJ, GAO HD, JANG XM, et al, 2012. Analysis on constituents and contents in leaf essential oil from three chemical types of *Cinnamum camphora* [J]. *J Cent S Univ For Technol*, 32(11): 186-194. [胡文杰, 高捍东, 江香梅, 等, 2012. 脑樟和异樟化学型的叶精油成分及含量分析 [J]. *中南林业科技大学学报*, 32(11): 186-194.]

LAN WZ, YU LJ, LIM Y, et al, 2003. Cell death unlikely contributes to taxol production in fungalelicitor-induced cell suspension cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Biotechnol Lett*, 25(1): 47-49.

LI JM, ZHU DY, 2005. *Plant tissue culture course* [M]. Beijing: China Agricultural University Press. [李浚明, 朱登云, 2005. *植物组织培养教程* [M]. 北京: 中国农业大学出版社.]

LI L, LI ZW, YIN ZQ, et al, 2014. Antibacterial activity of leaf

essential oil and its constituents from *Cinnamomum longepaniculatum* [J]. *Int J Clin Exp Med*, 7(7): 1 721-1 727.

LI YC, TAO WY, LONG, et al, 2009. Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83:233-239.

MICHAEL PESCHECK, MARCO ANTONIO MIRATA, BIANCA BRAUER, et al, 2009. Improved monoterpene biotransformation with *Penicillium* sp. by use of a closed gas loop bioreactor [J]. *J Ind Microbiol Biot*, 36(6): 827-836.

MOHANA KUMARA P, SHWETA S, VASANTHAKUMARI MM, et al, 2014. Endophytes and plant secondary metabolite synthesis: molecular and evolutionary perspective [J]. *Adv Endophytic Res*: 177-190.

MOLINA G, PINHEIRO DM, PIMENTEL MR, et al, 2013. Monoterpene bioconversion for the production of aroma compounds by fungi isolated from Brazilian fruits [J]. *Food Sci Biotechnol*, 22(4): 999-1 006.

PETERS S, AUST HJ, DRAEGER S, et al, 1998. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli [J]. *Mycologia*, 90(3): 360-367.

SONG X, YIN ZQ, WEI Q, et al, 2014. Anti-hepatoma effect of safrole from *Cinnamomum longepaniculatum* leaf essential oil *in vitro* [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(5): 2 265-2 272.

TAN WY, JA R, TAO JH, et al, 2013. Regulation on biosynthesis of active constituents in medicinal plants by endophytic fungal elicitor [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 44(14): 2 004-2 008. [谭燕, 贾茹, 陶金华, 等, 2013. 内生真菌诱导子调控药用植物活性成分的生物合成 [J]. *中草药*, 44(14): 2 004-2 008.]

VIJAY CHANDRA VERMA, SATYA PRAKASH, RANA GOPAL SINGH, et al, 2014. Host-mimetic metabolomics of endophytes: looking back into the future [J]. *Adv Endophytic Res*, 203-218.

WEI Q, WANG L, FU TH, et al, 2008. Studies of cell suspension culture and induction of secondary metabolism products in *Cinnamomum longepaniculatum* [J]. *Chin Bull Bot*, 5: 591-596. [魏琴, 王丽, 傅体华, 等, 2008. 油樟悬浮培养及次生代谢产物的诱导 [J]. *植物学通报*, 5: 591-596.]

YANG Q, YAN M, HUS B, 2014. Endophytic fungal strains of soybean for lipid production [J]. *Biol Energy Res*, 7(1): 353-361.

YOU L, WANG T, LI L, et al, 2009. Analyses on volatile organic compound of 78 endophytic fungi isolated from *Cinnamomum longepaniculatum* N [J]. *J NW A & F Univ: Nat Sci Ed*, 37(9): 193-198. [游玲, 王涛, 李兰, 等, 2009. 78 株油樟内生真菌发酵产物的挥发性组分分析 [J]. *西北农林科技大学学报·自然科学版*, 37(9): 193-198.]

ZHU GS, GUI Y, HUANG YH, et al, 2005. The endophytic fungus resources of spermatophyte in China and their coevolution [J]. *J Fung Res*, 3(2): 6-13. [朱国胜, 桂阳, 黄永会, 等, 2005. 中国种子植物内生真菌资源及菌植协同进化 [J]. *菌物研究*, 3(2): 6-13.]