

张波,梁雪飞,陈晏,等. 内生真菌孔球孢霉对茅苍术的生长及挥发油主组分的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):204-207.

内生真菌孔球孢霉对茅苍术的生长及挥发油主组分的影响

张波¹, 梁雪飞¹, 陈晏¹, 王新风², 戴传超¹

(1. 南京师范大学生命科学学院/江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心/江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 江苏南京 210023; 2. 淮阴师范学院/江苏省生物质能与酶技术重点实验室, 江苏淮安 223300)

摘要:在茅苍术组培苗阶段接种内生真菌孔球孢霉 AL12 菌株,以不接菌处理为对照,将炼苗后 2 年内的茅苍术分 7 个生长阶段,检测挥发油主要成分含量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)活力的变化。结果表明,接种真菌孔球孢霉提高了组培炼苗成活率,比对照提高 25.71 百分点。在 2 年的生长阶段内,孔球孢霉 AL12 处理组植株的生长情况优于对照组。至生长的第 7 阶段(第 2 年 12 月),孔球孢霉 AL12 处理组植株的全植株重为 11.54 g,比对照提高 3.5%。分析挥发油的主组分表明,内生真菌孔球孢霉 AL12 处理组的挥发油含量高于对照组;对照组挥发油中苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇、苍术素 4 种成分含量(占植株干重)分别为 2.32、0.07、0.19、2.39 mg/g;处理组挥发油的 4 种成分含量分别是对照组的 1.15、1.57、1.37、1.12 倍。在 2 年的生长阶段内,孔球孢霉 AL12 处理组的 SOD、POD、HMGR 活力都有所提高。研究表明,对茅苍术接种内生真菌孔球孢霉,在 2 年的生育期内均有利于宿主植物的生长及活性成分的积累。

关键词:内生真菌;孔球孢霉;茅苍术;促生长;挥发油

中图分类号: S567.21⁺1.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0204-04

茅苍术(*Atractylodes lancea*)是我国民间常用的菊科苍术属多年生药用植物,始记载于《神农本草经》,其性辛、苦、温,归脾、胃、肝经,具有燥湿健脾、祛风散寒、明目的作用^[1]。茅苍术为江苏省著名的道地药材,在中医临床上的使用历史悠久,其活性成分主要是 β -桉叶醇、苍术酮、苍术醇以及聚乙炔类成分苍术素^[2]。近年来,随着国际市场对茅苍术的需求量日益增加,野生茅苍术被掠夺性采挖,加上人们对茅苍术生态环境的破坏,造成茅苍术资源的枯竭,使其濒临灭绝^[3]。虽然近年来,我国在茅苍术人工栽培研究领域取得了许多重要成果^[4-7],但还存在着在生长缓慢、人工栽培的茅苍术与野生茅苍术的主要活性成分含量有差别^[8]、品质不稳定、抗逆性差等问题。

研究发现,植物内生真菌可以通过改善植物的营养条件来促进植物生长,还可以通过产生次生代谢产物、快速激活宿主的逆境反应系统来增强宿主对环境的生态适应能力^[8-9]。笔者所在实验室的前期工作曾报道,用内生真菌接种茅苍术组培苗,可以促进其苗期生长并提高其抗逆性,同时影响其植株活性成分的积累^[10-13]。茅苍术作为多年生药材,需要栽培

2 年以上才能形成商品药材,而在多年生药材的栽培中,自然界的微生物也会从多个方面影响植物的生长和活性物质的积累。在室外生长的 2 年中,人工接种的内生真菌能否对茅苍术一直起作用、对其根茎的形成是否具有作用等问题尚需进一步探讨。本研究在前人研究的基础上,探讨了内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术组培苗炼苗后 2 年内生长的影响及其主要活性成分积累影响的规律,以期进一步为茅苍术的人工栽培提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

茅苍术于 2004 年 5 月采自宁镇山脉(南京汤山),经南京师范大学生命科学学院植物教研室鉴定后移栽于南京师范大学的花房中^[11]。内生真菌:孔球孢霉 AL12(*Gilmaniella* sp.)分离自茅苍术中^[12],现保藏在笔者所在实验室中。

植物内生真菌菌种保藏与活化培养基均用马铃薯葡萄糖培养基。植物材料分化培养基配方为:MS+2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+10 g/L 琼脂;生根培养基配方为:1/2MS+0.3 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+10 g/L 琼脂。培养基先用 0.2 mol/L KOH 和 0.2 mol/L HCl 调节 pH 值至 5.8,再在 121 °C 条件下高压湿热灭菌 20 min^[14]。

1.2 组培苗的快速繁殖

剪取分化培养基上茅苍术组培苗的丛生芽,移入含有 50 mL 固体生根培养基的 100 mL 三角瓶中,每瓶接入 1 株,培养 2 个月。培养光照强度为 1 500 lx,光照时间为 12 h/d,培养温度为(25±2)°C。

1.3 组培苗接种内生真菌

选取长势一致的茅苍术苗进行接菌。先将内生真菌孔球

收稿日期:2012-12-06

基金项目:江苏省高校科研成果产业化推进工程项目(编号:JHB2012-16);南京市科委工程中心创新能力提升项目(编号:201105058)。

作者简介:张波(1983—),男,江苏溧阳人,硕士研究生,主要从事微生物生态学研究。Tel:(025)85891382;E-mail:zbxzy2003@163.com。

通信作者:戴传超,男,江苏泗阳人,教授,主要从事微生物生态学研究。Tel:(025)85891382;E-mail:daichuanhao@njnu.edu.cn。

孢霉 AL12 在马铃薯葡萄糖固体培养基平板上活化 7 d, 后用打孔器(直径 9 mm)在菌落表面打取平板菌片, 再用接种针将菌片接种于茅苍术组培苗的根部, 每瓶接种 1 片, 与茅苍术组培苗共生培养。以不接种真菌的组培苗作为对照。采用完全随机试验设计, 各处理 100 瓶。

1.4 炼苗及移栽方法

所有处理组的组培苗培养 9 周后开始炼苗: 先在室温条件下打开封口膜, 3~4 d 后将组培苗从培养瓶中取出, 洗净根部的培养基, 对生物量、根数、根长、株高等生物学性状进行测定。然后将组培苗移栽入草炭、蛭石、珍珠岩体积比为 1:1:1 的混合基质中, 适时喷水, 并用塑料小拱棚进行保湿和遮阴。3 周后, 将炼苗成活的茅苍术苗移入装有 4.5 kg 土壤的花盆(直径×高度=23 cm×22 cm)中进行移栽, 每盆 1 株, 定期浇水、除草。

1.5 样品的处理和收集

2007 年 3 月扩繁组培苗, 5 月得到足够的组培苗后接种孔球孢霉 AL12, 以不接菌的组培苗作为对照。2007 年 6 月进行炼苗, 炼苗成活后移到室外花盆中, 同时统计成活率。将移栽后的茅苍术在 2 年内的生长分成 7 个阶段: (1)2007 年(第 1 年)8 月、(2)2007 年 10 月、(3)2007 年 12 月、(4)2008 年(第 2 年)6 月、(5)2008 年 8 月、(6)2008 年 10 月、(7)2008 年 12 月。每个生长阶段收集 9 株茅苍术植株用于检测各项指标。9 株苗先称取各部分鲜重, 然后分为 3 部分: 第 1 部分于 40 °C 下烘干至恒量, 再测定植物生物量, 同时根据各部分的折干率和鲜重计算所有苗的干重^[12]; 第 2 部分选取茅苍术全植株, 经研磨后对其挥发油类活性成分进行气相色谱分析; 第 3 部分于第 1、第 2、第 4、第 5、第 6 等 5 个生长阶段采集茅苍术叶片, 用于超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)活力的检测(由于第 3、第 7 阶段为 12 月, 没有叶片, 因此不检测 SOD、POD、HMGR 活力)。

1.6 酶活力的检测

SOD、POD 活力的测定方法参考相关文献^[15-16]并稍作改变。分别取接种和未接种内生菌的茅苍术叶片 0.3 g 于预冷的研钵中, 加 2 mL 预冷的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.8), 在冰浴中将叶片研磨成浆, 加入磷酸缓冲液冲洗研钵, 使终体积为 5 mL, 在 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 10 min, 上清为酶液。

酶活力的测定: SOD 采用氮蓝四唑(NBT)法, 以抑制氮蓝四唑(NBT)光化还原 50% 的酶量作为 1 个酶单位(U), 单位为 U/g 鲜重^[15]; POD 以愈创木酚为底物, 以 1 min 内 1 g 材料的 D 值变化 0.01 为 1 个相对酶活单位(U)计算植物组织内过氧化物酶活力的大小, 单位为 U/g 鲜重^[16]。HMGR 活力的测定参考 Toroser 等的研究^[17]。将过滤收集的茅苍术鲜细胞置于含 50 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L β-巯基乙醇、10 g/L 聚乙烯吡咯烷酮的提取缓冲液(pH 值 7.5)中, 使终浓度为 1 g/mL, 冰浴匀浆 5 min 后, 在 4 °C、14 000 r/min 条件下离心 30 min, 上清液即为粗酶液。蛋白质含量用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定, 以牛血清白蛋白作标准曲线。反应混合液为: 50 mmol/L Tris-HCl(pH 值 7.0)缓冲液, 0.3 mmol/L HMG-CoA(Sigma 公司), 0.2 mmol/L NADPH, 4 mmol/L 二

硫蔗糖醇, 按 50 μg(蛋白)/mL(反应液)的量添加酶提取物。在 25 °C 下用紫外-可见分光光度计在 340 nm 处检测吸光度的减少。以 1 min 氧化 1 nmol NADPH 的量定义为 1 个 HMGR 活力单位 U, 酶活力用 U/mg 蛋白表示。

1.7 挥发油的提取和检测

将茅苍术根干燥样品粉碎后过 40 目筛, 精确称取 1 g 茅苍术粉末, 加 4 倍体积的环己烷浸泡 8 h, 然后在 30 °C 恒温条件下超声破碎提取 15 min, 在 5 000 r/min 条件下离心 5 min 后取上清液。加入无水硫酸钠以去除水分, 用气相色谱进行分析^[24], 气相色谱仪器: 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(30 m×0.25 μm×0.25 mm)。检测条件同文献^[25]。用保留时间法进行定性, 根据标准曲线计算苍术酮、苍术醇、β-桉叶醇、苍术素的含量^[18]。

1.8 统计分析

应用 Excel 软件进行相关性分析, 计算各处理的平均值及标准差, 并绘图。采用 SPSS 13.0 统计分析软件的 one-way ANOVA 对试验数据进行方差分析。使用 Duncan's 检验进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术组培苗炼苗成活率的影响

内生真菌对茅苍术组培苗炼苗成活率的影响见表 1。可以看出, 接种内生真菌孔球孢霉 AL12 提高了茅苍术组培苗的成活率, 使成活率达到 90.00%, 和对照相比提高了 25.71 个百分点。

表 1 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术组培苗炼苗成活率的影响

处理	炼苗数 (株)	成活数 (株)	成活率 (%)
CK	98	63	64.29
AL12	100	90	90.00

2.2 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术生物量的影响

从表 2 可以看出, 接种内生真菌孔球孢霉 AL12 的处理在每个阶段的生物量均稍高于对照。全植株重在试验的第 2 年 12 月达到最大, AL12 处理组达到 11.54 g, 对照组为 11.15 g。从植株整体生长情况看, 对照组和试验组在第 4 至第 5 阶段、第 5 至第 6 阶段增长最快, 并在第 7 阶段达到最大, 第 7 阶段的 AL12 组比对照组提高了 3.5%。在 2 年的生长阶段内, 茅苍术的根干重一直在增加, AL12 组在每个阶段的根干重均略高于对照; 对照组和试验组在第 5 至第 6 阶段增长最快, 第 4 至第 5 阶段次之, 但均都在第 7 阶段达到最大值, 在第 7 阶段 AL12 组根干重达到 9.36 g, 比对照提高了 3.08%。结果说明, 用 AL12 接种茅苍术, 促进植株生长的特性能够一直表现出来。

2.3 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术 4 种主要挥发油活性成分含量的影响

接种内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术 4 种主要挥发油活性成分含量的影响见表 3。可以看出, 茅苍术的 4 种主要

表2 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术生物量的影响

取样阶段	全植株重(g)		根干重(g)	
	CK	AL12	CK	AL12
1	0.88 ± 0.16a	0.92 ± 0.17a	0.59 ± 0.16a	0.61 ± 0.13a
2	1.48 ± 0.21a	1.65 ± 0.32b	1.14 ± 0.21a	1.23 ± 0.16a
3	2.02 ± 0.32a	2.10 ± 0.35a	1.63 ± 0.19a	1.66 ± 0.14a
4	4.52 ± 0.52a	5.13 ± 0.53b	3.14 ± 0.28a	3.45 ± 0.40b
5	7.59 ± 0.87a	8.08 ± 0.93b	5.10 ± 0.67a	5.37 ± 0.29b
6	10.91 ± 0.67a	11.31 ± 0.75b	8.36 ± 0.67a	8.57 ± 0.51a
7	11.15 ± 0.86a	11.54 ± 0.65b	9.08 ± 0.57a	9.36 ± 0.72a

注:使用 Duncan's 检验, $n=9$ 。同行同一指标数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

表3 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术挥发油 4 种主成分的影响

取样阶段	苍术酮(mg/g)		苍术醇(10^{-2} mg/g)		β -桉叶醇(10^{-2} mg/g)		苍术素(mg/g)		4种组分总量(mg/g)	
	CK	AL12	CK	AL12	CK	AL12	CK	AL12	CK	AL12
1	1.64 ± 0.21a	1.81 ± 0.14a	6.13 ± 0.14a	5.07 ± 0.81a	8.30 ± 0.32b	6.36 ± 0.54a	2.67 ± 0.21a	2.44 ± 0.18a	4.45	4.36
2	1.87 ± 0.09a	2.66 ± 0.11b	6.51 ± 0.47a	7.85 ± 0.69b	19.23 ± 0.74a	22.52 ± 0.67b	2.27 ± 0.09a	3.12 ± 0.02b	4.39	6.09
3	1.80 ± 0.12a	1.89 ± 0.09a	7.39 ± 0.36b	6.69 ± 0.31a	26.22 ± 0.36b	19.35 ± 0.02a	2.91 ± 0.16a	2.91 ± 0.04a	5.04	5.06
4	1.39 ± 0.03a	2.12 ± 0.23b	7.22 ± 0.06a	9.03 ± 0.52b	17.35 ± 1.84a	23.30 ± 2.59b	2.20 ± 0.05a	3.06 ± 0.08b	3.83	5.50
5	3.16 ± 0.12a	3.49 ± 0.07b	10.41 ± 1.23a	17.12 ± 0.80b	37.97 ± 4.87a	45.90 ± 2.13b	3.42 ± 0.39a	3.88 ± 0.03a	7.06	8.00
6	2.02 ± 0.04a	2.37 ± 0.11b	6.99 ± 0.38a	9.05 ± 1.76a	24.03 ± 3.27a	22.79 ± 5.09a	2.29 ± 0.19a	2.21 ± 0.15a	4.62	4.89
7	2.32 ± 0.15a	2.66 ± 0.17b	6.88 ± 0.35a	10.86 ± 1.22b	19.38 ± 1.36a	26.17 ± 2.40b	2.39 ± 0.24a	2.68 ± 0.13a	4.97	5.71

注:使用 Duncan's 检验, $n=3$ 。同行同一指标数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

表4 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术 HMGR 活力的影响

取样阶段	HMGR 活力(U/mg)	
	CK	AL12
1	7.26 ± 0.68a	10.96 ± 1.12b
2	14.07 ± 1.70a	19.26 ± 2.31b
4	17.56 ± 1.02a	20.22 ± 1.02b
5	12.44 ± 1.01a	14.44 ± 1.68a
6	13.33 ± 1.11a	16.30 ± 1.70a

注:使用 Duncan's 检验, $n=3$ 。同行数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。因第3、第7阶段的地上部分已接近枯萎,未检测其酶活。表5、表6同。

2.5 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术 SOD 和 POD 活力的影响

内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术生长过程中 SOD 活力的影响见表5。可以看出在各个阶段 AL12 组 SOD 活力均高于对照组,并在第2、第4阶段与对照组之间的差异达到了显著水平($P<0.05$),AL12 组于第6阶段达到最大值。

表5 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术 SOD 活力的影响

取样阶段	SOD 活力(U/g)	
	CK	AL12
1	455.40 ± 20.06a	485.92 ± 35.52a
2	424.38 ± 97.15a	537.44 ± 19.20b
4	396.46 ± 6.31a	463.13 ± 11.37b
5	959.94 ± 9.57a	973.36 ± 14.21a
6	945.67 ± 100.20a	1 033.77 ± 57.33a

接种内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术植株 POD 活力的影响见表6。可以看出在各个阶段 AL12 组均稍高于对照组,

挥发油成分苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇、苍术素在其生长的7个阶段中含量都呈现先升后降的趋势,且在第5阶段达到了最大值。在第7阶段,AL12 组和对对照组相比,苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇3种组分都是显著高于对照($P<0.05$),而苍术素的含量则与对照之间差异不显著。

2.4 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术 HMGR 活力的影响

植物接种内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术 HMGR 活力的影响见表4。可以看出 AL12 组的 HMGR 活力均高于于对照组,说明内生真菌的接种促进了植株体内萜类合成酶活力的提高。对照组和试验组的 HMGR 活力均于第4阶段达到最大值,说明6月是大量合成萜类物质的生长时期。

在第4阶段与对照组之间差异达到显著水平($P<0.05$),试验组和对对照组均于第5阶段即2008年8月达到最大值。

表6 内生真菌孔球孢霉 AL12 对茅苍术 POD 活力的影响

取样阶段	POD 活力[U/(g·min)]	
	CK	AL12
1	3 753.33 ± 153.77a	3 764.44 ± 110.02a
2	3 637.04 ± 504.10a	3 718.52 ± 577.07a
4	3 977.78 ± 473.34a	5 391.67 ± 309.04b
5	4 913.33 ± 137.76a	5 173.33 ± 150.11a
6	4 333.33 ± 280.43a	4 359.30 ± 128.78a

3 结论与讨论

试验结果表明,接种内生真菌孔球孢霉 AL12 提高了茅苍术组培苗的炼苗成活率,和对照相比提高了25.71个百分点,这与笔者所在课题组张波等之前的研究结果^[10-11]一致。从本实验室前期研究的组培苗生长状况来看,内生真菌极大地促进了茅苍术根的生长,而根系的发达增强了组培苗对环境的适应能力,所以显著提高了组培苗炼苗后的成活率,这个优势在整个生育期均能表现出来。从生长情况看,内生孔球孢霉促进宿主生长的效果是稳定的,但在大部分阶段尚未达到显著性水平。

挥发油组分被认为是苍术的主要药效成分,尤其是挥发油中的苍术醇、 β -桉叶醇、苍术酮及苍术素等成分因在苍术根茎中含量大,且因为对其药理作用的研究较透彻,因此常被用作苍术鉴定或质量评价的特征成分或指标成分^[2]。本研究主要对苍术中4种主要挥发油类活性成分进行了定量分析,与对照相比,AL12 处理组的4种挥发油主成分总量中苍

术酮、苍术醇在第2年大都显著高于对照。苍术素的含量在第1阶段低于对照,这和组培苗苗期接种内生菌结果是一致的^[12];在第3阶段则和对照基本持平,这可能和组培苗在室外长期培养,对照组有其他微生物侵入植物有关。说明内生真菌的刺激可以增加某单一成分的含量,从而也增加了总挥发油的含量。从本研究结果看,内生真菌促进了苍术酮含量的增加,说明内生真菌接种有利于药材地道性成分的积累,这对药材栽培是十分有利的。

3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR)催化HMG-CoA形成甲羟戊酸(MVA),由于MVA的形成是一个不可逆过程,因此HMGR被认为是动物、植物、真菌,可能也是昆虫的类异戊二烯代谢途径的一个限速酶。许多研究者都报道,类异戊二烯生物合成途径的诱导,尤其是倍半萜类物质的合成与HMGR活性成正相关^[19-20]。本试验中AL12组的HMGR活力均高于对照,这和苍术酮、苍术醇2种倍半萜成分含量一直高于对照是一致的。推测由于接种内生真菌对宿主植物是一种刺激,直接促进了次级代谢相关的酶HMGR活力的提高,从而植株的萜类代谢途径被加强。

SOD是植物体内抵抗各种活性氧积累的主要物质,能清除超氧阴离子,阻止脂质过氧化作用^[21]。AL12组的SOD活力在每个阶段都有所提高,说明内生真菌增强了茅苍术对超氧阴离子的防御能力,提高了植物对外界胁迫的耐受能力^[22]。POD作为一种机体抗氧化酶,酶活性越高,消除自由基的能力越强^[23],AL12组的POD活力在每个阶段都稍微提高,说明抗逆性能在加强。比较植株生物量发现,接种AL12处理的茅苍术在整个试验过程中的生物量均大于对照,这说明内生真菌的侵入给予了植株刺激,诱导植物产生一定的防御反应,虽然这个防御反应不剧烈,但在持续发挥作用,从而加强了植株的抗逆性,对植株的生长是有利的。这和Wang等在组培苗中对粗诱导子和内生菌接种进行对比的研究结果^[12-13]是一致的。

目前茅苍术濒临灭绝,由于生长缓慢、抵御不良环境能力差等原因,使得茅山地区茅苍术的人工栽培有困难。试验证明,给茅苍术接种内生真菌以提高生长和抗逆性的方法对茅苍术的人工栽培具有重要的指导意义。此外栽培茅苍术过程中会遇到活性成分含量下降、主要药用成分之间比例失调等问题,由此会制约人工栽培的发展。笔者的试验结果表明,接种内生真菌不仅增加了活性物质含量,而且接种后植株挥发油的积累更接近于茅山地区的茅苍术挥发油积累趋势,有望解决茅苍术品质不稳定的问题,对茅苍术的人工栽培具有重要的参考价值。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2000:127.
 [2] 郭兰萍,刘俊英,吉力,等. 茅苍术地道药材的挥发油组成特征分析[J]. 中国中药杂志,2002,27(11):814-819.
 [3] 贺晋安,贺慧生,吕晔,等. 茅苍术资源的保护和利用[J]. 植物资源与环境,1993,2(1):1-6.
 [4] 郭兰萍,黄璐琦,邵爱娟,等. 苍术根际区土壤养分变化规律[J]. 中国中药杂志,2005,30(19):1504-1507.

[5] 巢建国,谈献和,张瑜,等. 茅苍术快速繁殖[J]. 中药材,2001,24(7):473-474.
 [6] 陈敏,邵爱娟,林淑芳,等. 人工种植茅苍术最佳采收期的初步研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(12):1023-1024.
 [7] 徐晓兰,冯煦,王鸣,等. 野生与栽培茅苍术挥发油成分的比较分析[J]. 植物资源与环境学报,2007,16(1):28-30.
 [8] 谢丽华,王国红,杨民和. 内生真菌及其对宿主植物生态适应性的影响[J]. 菌物研究,2006,4(3):98-106.
 [9] 陈晓梅,郭顺星. 4种内生真菌对金钗石斛无茵苗生长及其多糖和总生物碱含量的影响[J]. 中国中药杂志,2005,30(4):253-257.
 [10] 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):704-709.
 [11] 陈佳昕,戴传超,李霞,等. 茅苍术内生真菌的分离鉴定及在组培苗中的回接[J]. 广西植物,2008,28(2):256-260.
 [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 Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012,28(2):575-584.
 [13] Wang Y, Dai C C, Zhao Y W, et al. Fungal endophyte-induced volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea* plantlets is mediated by nitric oxide, salicylic acid and hydrogen peroxide[J]. Process Biochemistry, 2011,46(3):730-735.
 [14] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures[J]. Physiologia Plantarum, 1962,15(3):473-497.
 [15] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 1971,44(1):276-287.
 [16] Upadhyaya A, Sankhla D, Davis T D, et al. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves[J]. Journal of Plant Physiology, 1985,121(5):433-461.
 [17] Toroser D, Huber S C. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase kinase and sucrose-phosphate synthase kinase activities in cauliflower florets; Ca²⁺ dependence and substrate specificities[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998,355(2):291-300.
 [18] 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):452-455.
 [19] Chappell J, Wolf F, Proulx J, et al. Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? [J]. Plant Physiology, 1995,109(4):1337-1343.
 [20] 王红,叶和春,刘本叶,等. 青蒿素生物合成分子调控研究进展[J]. 生物工程学报,2003,19(6):646-650.
 [21] 丑敏霞,朱利泉,张明,等. 金钗石斛对温度的生理反应[J]. 中国药理学杂志,2001,36(3):153-155.
 [22] 刘连涛,李存东,孙红春,等. 棉花叶片衰老生理研究进展[J]. 中国农学通报,2006,22(7):316-321.
 [23] 宋瑞芳,丁永乐,官长荣,等. 烟草抗病性与防御酶活性间的关系研究进展[J]. 中国农学通报,2007,23(5):309-314.