

中国油脂
China Oils and Fats
ISSN 1003-7969, CN 61-1099/TS

《中国油脂》网络首发论文

- 题目：印度血桐 (*Macaranga indica*) 种子中与神经酸累积相关的内生真菌
作者：姚雨玲，郭娟，强奇，庞志强，李绍朋，田波
DOI：10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.250200
网络首发日期：2025-06-27
引用格式：姚雨玲，郭娟，强奇，庞志强，李绍朋，田波. 印度血桐 (*Macaranga indica*) 种子中与神经酸累积相关的内生真菌[J/OL]. 中国油脂.
<https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.250200>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字符、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

印度血桐 (*Macaranga indica*) 种子中与神经酸累积相关的内生真菌

姚雨玲^{1, 2}, 郭娟², 强奇², 庞志强², 李绍朋³, 田波²

(1 云南中医药大学 中药学院, 昆明 650500; 2 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 650223; 3 滇西应用技术大学 普洱茶学院, 云南 普洱 671006)

摘要: 为了探究印度血桐 (*Macaranga indica*) 种仁中可培养内生菌的多样性, 并挖掘与神经酸合成相关的内生菌资源。采用不同的培养基对印度血桐种仁及其种仁油进行培养, 将分离纯化的内生菌通过 16sRNA 和 ITS 扩增子测序进行分子鉴定。对纯化获得的内生真菌进行脂肪酸检测, 进一步在培养基中添加芥酸作为底物培养后检测其脂肪酸组成。本研究共分离到细菌 151 株, 分属于 16 个属, 26 种; 真菌共 173 株, 分属于 27 个属, 47 种。内生真菌的脂肪酸组成以棕榈酸、油酸和亚油酸为主, 未检测到神经酸, 但有 5 个内生真菌检测到芥酸。添加芥酸作为底物进行培养, 内生真菌 MOF171 (*Aspergillus candidus*) 菌株能够产生 1.32% 的神经酸。本研究结果表明, 印度血桐种子中富含种子内生菌, 内生真菌可能在促进印度血桐种子神经酸累积中起到作用, 从种仁油中有更多的真菌在油中富集。研究结果为印度血桐种子内生菌资源的开发利用提供了数据支持, 同时也为神经酸合成相关微生物的筛选和生产神经酸的方法提供了新的研究方向。

关键词: 内生菌; 分离鉴定; 脂肪酸; 神经酸; 印度血桐

中图分类号: Q93-31 文献标识码: A

DOI:10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.250200

Endophytic fungi producing nervonic acid from *Macaranga indica* seeds

基金项目: 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目 (202105AC160083)

作者简介: 姚雨玲, 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物油脂代谢, E-mail: 3253455472@qq.com

通信作者: 田波, 男, 副研究员, 博士, 研究方向为植物油脂代谢, E-mail: tianbo@xtbg.ac.cn

YAO Yuling^{1,2}, GUO Juan², QIANG Qi², PANG Zhiqiang², LI Shaopeng³,

TIAN Bo²

(1 College of Chinese Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan Kunming 650500, China; 2 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Yunnan Xishuangbanna 650223, China; 3 West Yunnan University of Applied Sciences, Pu'er Tea College, Pu'er 671006, Yunnan Puer, China)

Abstract: This study aims to explore the diversity of cultivable endophytic bacteria in the seeds of *Macaranga indica* and explore endophyte resources related to nervonic acid biosynthesis. Different medium were used to culture the seed tissue and seed oil of *Macaranga indica*. Endophyte were identified using 16S rRNA and ITS amplicon sequencing respectively. And a phylogenetic tree was constructed to determine the speceis of each endophytic fungi. Fatty acid composition of each endophytic fungi were detected. Furtherly erucic acid was added as a substrate in the medium and the fatty acid composition after cultivation was detected . A total of 151 bacterial strains ,belonging to 16 genera and 26 species, and a total of 173 fungi, belonging to 27 genera and 47 species, were isolated in this study . No nervinic acid was detected in all endophytic fungi but erucidic acid was detected in five endophytic fungus. The fatty acid composition of endophytic fungi is mainly composed of palmitic acid, oleic acid, and linoleic acid . When cultivated in medium with erucidic acid as substrate the endophytic fungi MOF171 (*Aspergillus candidus*) strain contained 1.32% of nervonic acid. The results of this study indicated that the seeds of *Macaranga indica* are riching in endophytic fungi, which may play a role in promoting the accumulation of nervonic acid in *Macaranga indica* seeds. Moreover more fungus were enriched in the oil from the seed kernel. The research results provide data support for the development and utilization of endophyte resources in *Macaranga indica* seeds, and also provide new research directions for the screening of nervonic acid synthesis related microorganisms and methods for producing nervonic acid.

Keywords: Endophyte; Isolation identification; Fatty acid; Nervonic acid; *Macaranga indica*

1 前言

神经酸是一种特殊的超长链单不饱和脂肪酸 (C24:1), 化学名为顺-15-二十四碳烯酸 (*cis*-15-tetracosenic acid)。现代药理学研究表明, 神经酸具有神经保护作用, 能够减轻神经

细胞的损伤，延缓神经退行性疾病（如帕金森病、阿尔茨海默病等）的发展^[1-3]。神经酸的来源有鲨鱼油、化学合成和植物油等途径，由于捕猎鲨鱼安全隐患大，化学合成产生的副产物多且提取困难，目前主要依赖于少数特殊的多年生木本植物种子^[4-6]。但是木本植物生长周期长，且种子产量易受环境变化影响，导致原料供应不稳定，限制了神经酸的开发与利用。因此，探索更加高效的神经酸来源成为有待研究的方向。

利用微生物生产油脂是一种实现特殊油脂大规模生产的新途径，植物各种组织和器官内部普遍存在与其共生的内生菌，在植物和微生物协同进化过程中，通过平行基因转移、相互适应等过程，内生真菌能产生与宿主植物相似的代谢物，某些能产生与宿主相同脂肪酸的特殊内生真菌已被发现，少数内生真菌油脂含量能达到 60%^[7]。

近年来，能产生与宿主相同脂肪酸的内生真菌不断被发现，在香榧产油内生真菌中发现了一株能产生和累积宿主特殊功能性脂肪酸金松酸的内生真菌^[7]；月见草中分离到一株内生真菌能产生与宿主相同的 γ -亚麻酸，且含量达到总油脂的 22.08%^[8]；马尾松中分离到 4 株高油脂产量的内生真菌，油脂中不饱和脂肪酸含量达到 46%^[9]；28 株产油内生真菌分别从大戟科乌柏、大戟、泽漆、重阳木 4 种植物中被分离得到^[10]。

印度血桐 (*Macaranga indica*) 为大戟科血桐属多年生乔木，为神经酸含量最高的物种之一，其种仁油含量约 60%，油中神经酸含量约 45%^[11]。本研究以印度血桐种仁为研究对象，分离其内生菌并鉴定其内生菌群落。研究采用多种培养基对种仁及其种子油中的内生菌进行分离培养，并通过 16S rRNA 和 Internal Transcribed Spacer (ITS) 序列分析对菌株进行鉴定，分析内生菌的多样性。在此基础上，进一步筛选了能够利用外源底物合成神经酸的真菌。

2 材料与方法

2.1 实验材料

印度血桐成熟种子采集于中国科学院西双版纳热带植物园 (E101°16'35.53" N21°55'16.55")，剥去种皮后所得种仁用于匀浆和组织块培养，通过家用榨油机冷榨获得种仁油。

2.2 仪器和试剂

G154DS 立式自动压力蒸汽灭菌锅（致微厦门仪器有限公司），SWCJ-A 超净工作台（上海新苗医疗器械制造有限公司），SHP-250 生化培养箱（上海精宏实验设备有限公司），HH-2 数显恒温水浴锅（常州澳华仪器有限公司），DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司），QL-861 涡混合器（其林贝尔仪器制造公司），Clarus680FID 气

相色谱仪 (RkinElmer 公司), TDZ5-WS 低速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), 榨油机 (贝雨斯顿)。

试剂: 无水乙醇、次氯酸钠、硫酸链霉素、芥酸、四丁酚醇、正己烷、甲醇、Takara 裂解液 (Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 9164)。

所用培养基包括: 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、马铃薯葡萄糖水 (PDB)、ISP 系列培养基、联合固氮培养基、葡萄糖天冬门素培养基、葡萄糖酵母提取物琼脂培养基、酵母甘露醇肉汤培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基, 培养基均购置于青岛海博生物技术有限公司 (表 1)。

2.3 实验方法

2.3.1 印度血桐内生菌的分离

选取三棵树采集的黑色成熟的种子为三个生物学重复, 进行表面灭菌: 75%的乙醇浸泡 30 s, 10%的次氯酸钠浸泡 15 min, 无菌水冲洗三次。表面灭菌后的种子在研钵内敲开种皮, 挑出种仁, 所得种仁分别用于涂布培养、组织块培养、种仁油添加培养。

种仁涂布培养 称取 1 g 种仁研磨, 无菌水稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 三个不同浓度的稀释液, 依次取三个浓度的稀释液 100 μL 均匀涂布于不同类型的培养基上进行。

种仁组织切块培养 取剥出的种仁在无菌的培养皿中对半切开, 切面贴于培养基放置, 每个培养基约 12 块种仁组织进行。

种仁油培养 破壁机用 75% 酒精擦拭后, 放入超净工作台中紫外照射 15 min, 将灭菌处理后的种子采用机械破壁法剥取种仁榨取种仁油, 最后于 4°C 条件下保存。将种仁油与灭菌后冷却到 55°C 左右的培养基混匀 (种仁油的添加浓度为 5%), 待培养基凝固后放入培养箱。

将处理的平板 30°C 恒温倒置培养; 其中 PDA 和 CDA 两种加入细菌抗生素, 为了防止细菌生长过快影响真菌生长, 培养基中硫酸链霉素的浓度为 50 mg/mL; 根据不同的种类微生物对底物偏好不同, 分离细菌和真菌选用的培养基种类有所差异, 涂布培养和组织培养使用的培养基种类见表 1。

依据菌落大小、颜色、形状等形态挑出各类培养基上形态不同的菌落, 各培养基上形态相同菌落选取三个菌落进行纯化, 采用划线法接种到新的 10T 培养基上进行培养, 真菌使用 PDA 培养基, 划线纯化 2~3 次, 待菌落生长出来后观察记录其生长形态, 直到最后在平板上得到形态大小一致的单菌落。

表 1 内生菌分离使用的培养基种类

Table 1 The types of culture media used for the isolation of endophytic bacteria

简称	中文名	培养方式
10T	胰蛋白胨大豆琼脂	
assi	联合固氮培养基	
TSA	胰蛋白胨大豆琼脂	
YMB	Yeast Extract Mannitol Broth	
GAM	葡萄糖天冬门素培养基	
GYEA	葡萄糖酵母提取物琼脂培养基	匀浆涂布培养
ISP2	ISP 培养基 2	
ISP3	ISP 培养基 3 (燕麦培养基)	
ISP5	ISP 培养基 5	
ISP6	ISP 培养基 6	
PDA ⁺	马铃薯葡萄糖琼脂+抗生素	
PDA	马铃薯葡萄糖琼脂	种仁组织块培养、
CDA ⁺	Czapek Dox Broth Medium+抗生素	种子油培养
CDA	Czapek Dox Broth Medium	

2.3.2 DNA 的提取与鉴定

用 10 μL 枪头挑取肉眼可见大小的新鲜菌体，混入有 50 μL TAKARA 裂解液的 PCR 管中，放入 PCR 仪 80°C 裂解 15 min，裂解得到菌落的 DNA 粗提物，以所得的粗提物为模板，对内生细菌 16S rRNA 的 V1-V5 区域进行扩增，引物为 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/1492R: 5'-CGGTTACCTTGTACGACTT-3'，扩增程序为 94 °C 预变性 3 min，94 °C 变性 30 s，55 °C 退火 1 min，72 °C 延伸 1 min，35 次循环，72 °C 延伸 7 min，4 °C 保存。对真菌的 ITS 区进行扩增，引物为 ITS1F: 5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3'/ ITS2R: 5'-GCTGCGTTCTCATCGATGC-3'。扩增程序 94 °C 预变性 4 min，94 °C 变性 40 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，35 次循环，72 °C 延伸 10 min，4 °C 保存。

PCR 扩增产物由生工生物有限公司进行一代测序，测序结果经 BioEdit (7.0.9) 软件人工修饰去除首尾参差不齐的部分序列，再通过 NCBI 网站 BLASTN 比对，确定微生物物种分类。

2.3.3 真菌培养

将真菌菌丝挑取至含有 50 mL PDB 液体培养基的三角瓶中，于 30°C、200 r/min 条件下过夜培养后，加入 300 μL 四丁酚醇溶液（四丁酚醇与乙醇体积比为 1:5）和 10 μL 芥酸溶液（0.5 mol/L 芥酸乙醇溶液），继续培养 4 天。培养结束后，收集菌体，经真空冷冻干燥后保存备用。

2.3.4 脂肪酸检测

取干燥菌体 50 mg 于 10 mL 带螺纹盖试管中，加入 2 mL 的 2% 硫酸甲醇；85°C 水浴两个小时；冷却后加入 2 mL 的 0.9% 氯化钠溶液；加入 4 mL 正己烷，涡旋振荡 30 s，3 000 r/min 离心 5 min，转移上清至新的试管，在沉淀中加入 4 mL 正己烷，重复操作。合并上清于一新管中，置于氮吹仪吹干。最后加入 1.5 mL 正己烷，转入 1.5 mL 进样瓶中^[11]。气相色谱仪升温程序参照^[12] 所使用程序。

3 结果与分析

3.1 印度血桐种子内生菌分离鉴定

通过对匀浆涂布的培养基进行计数，发现不同培养基的菌落生长情况差异较大。GYEA、ISP2、TSA 和 ISP6 四种培养基富集到的微生物较少，富集的菌落数在 1~20 个之间，YMB、GAM、ISP5、ISP3 和 assi 富集菌落的在 100~3 360 个菌落，如表 2 所示

表 2 不同培养基菌落数

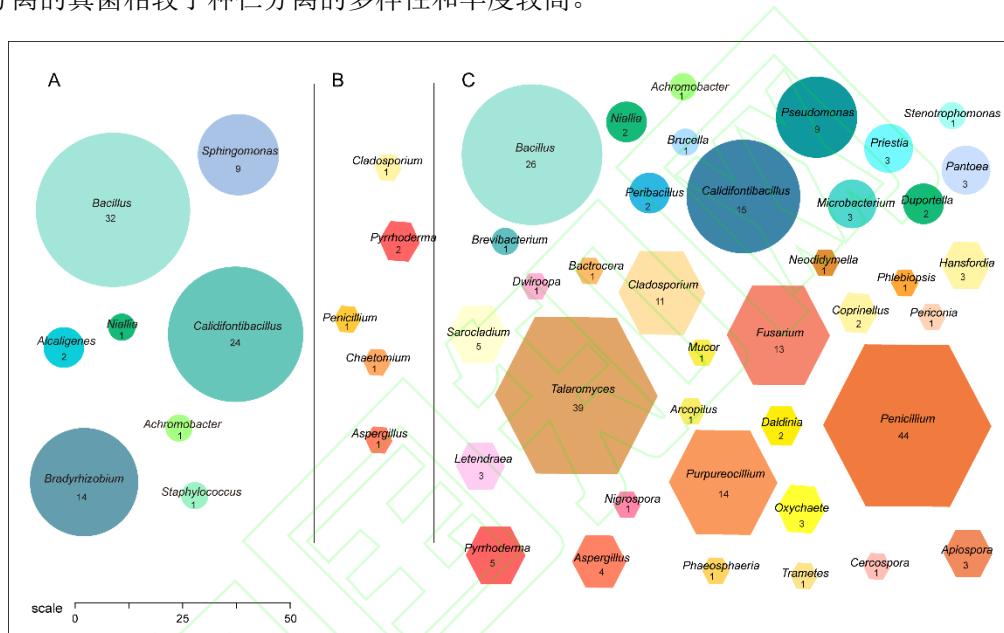
Table 2 Colony count on different culture media

培养基种类		XT-1	XT-2	XT-3
GYEA	7	9	1	
	10	10	1	
	11	18	7	
	992	15	1 911	
涂布培养	ISP6	10	17	1
	YMB	451	928	2 729
	GAM	751	940	2 182
	ISP5	1 394	2 553	3 360
assi	172	408	1 995	
	1 220	1 605	3 290	
ISP3				

注：XT-1、XY-2 和 XT-3 为三个重复样品编号。

为了鉴定印度血桐中的微生物分布特征，我们通过涂布、组织培养和种子油三种分离

培养的来源的微生物进行分析。经过 BLASTN 比对分析后共分离出 16 个细菌属和 27 个真菌属，并且发现不同分离方法所得到的微生物类群不同（图 1）。涂布培养分离出的微生物为细菌，主要是芽孢杆菌属（*Bacillus*）丰度最高，该属细菌共分离出 32 株，其次为 *Calidifontibacillus*，鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*）和蔓生根瘤菌属（*Bradyrhizobium*）（图 1A）。采用种仁培养中分离出的微生物主要是真菌，真菌 5 个属（图 1B）。在种子油中分离出的真菌青霉属（*Penicillium*）44 株，篮状菌属（*Talaromyces*）39 株，拟青霉属（*Purpureocillium*）14 株（图 1C）。芽孢杆菌属在不同的分离方法中都是优势属，而种子油中分离的真菌相较于种仁分离的多样性和丰度较高。



注：A：种仁匀浆涂布培养，B：种仁组织培养，C：种子油培养。圆形为细菌门，六边形为真菌门。

A: Kernel spread plate method, B: Seed Organization culture, C: seeds oil culture. The circular shape represents the phylum of bacteria, the hexagonal shape represents the phylum of fungi.

图 1 印度血桐种子通过不同分离方法获得的内生菌种类

Figure 1 Microbial composition of endophytic bacteria and fungi under different treatments

将不同的分离方法得到的共生菌中所有真菌进行属水平的系统归类并统计各类菌株占比情况，所有分离出的真菌中，种子油培养的真菌共 167 株，种仁组织中分离出 6 株，而种仁涂布培养的培养基中并不适合真菌生长（图 1）。青霉属在种仁组织中的占比为 33.33%，其他真菌属在种仁中的分布情况没有明显的差别，占比均为 16.67%（图 2A）。在种子油培养的真菌中，青霉属和篮状菌属为优势菌群，分别占 26.35% 和 23.35%。其次是镰刀菌属（*Fusarium*）和拟青霉属，占比分别为 7.78% 和 8.38%（图 2B）。在种子油中生长的真菌更

能凸显优势真菌属。

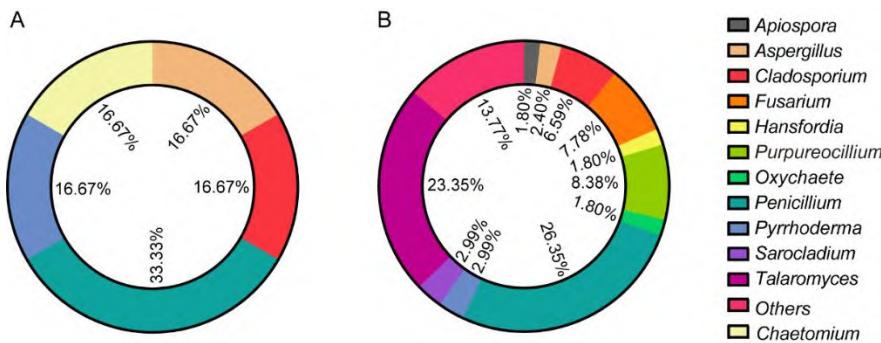


图 2 种仁组织块培养(A)和种子油培养(B)真菌物种组成

Figure 2 Fungal composition of cut-kernel culturing (A) and seeds oil culture (B)

为了明确微生物群落的物种组成，根据比对结果确定真菌分类种属关系，其中细菌分属于 16 个属，26 种；真菌共 173 株，分属于 27 个属，47 种。由于霉菌具有丰富的油脂成分，后续选取以下青霉属和曲霉属的真菌进行脂肪酸检测^[13]（表 3）。

表 3 脂肪酸检测真菌物种

Table 3 Fatty acid detection of fungal species

鉴定	登录号	菌株编号
<i>Aspergillus fumigatus</i>	MT635279.1	MiF101
<i>Aspergillus niger</i>	MT541880.1	MOF26
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	MT582789.1	MOF140
<i>Penicillium citrinum</i>	MN788117.1	MOF45
<i>Penicillium coprophilum</i>	MT410465.1	MOF131
<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	NR163669.1	MOF124
<i>Penicillium janthinellum</i>	KX090302.1	MOF116
<i>Aspergillus candidus</i>	NR135429.2	MOF171

3.2 内生真菌脂肪酸检测

通过对分离出的真菌进行脂肪酸检测发现这些真菌自身并没有合成神经酸的能力，并且主要的脂肪酸成分为主要以棕榈酸（C16:0）、油酸（C18:1）和亚油酸（C18:2）为主，其他脂肪酸成分含量较低，并且在不同的真菌中的含量有差异（表 4）。其中的霉菌通常具有较高的油脂含量，且其脂肪酸组成中富含多不饱和脂肪酸^[14]。MOF26、MiF101 等真菌脂肪酸中具有神经酸合成的前体物质 C22:1，但含量都较低。后续通过补充 C22:1 培养探究是否能促进芥酸后续碳链加长反应。

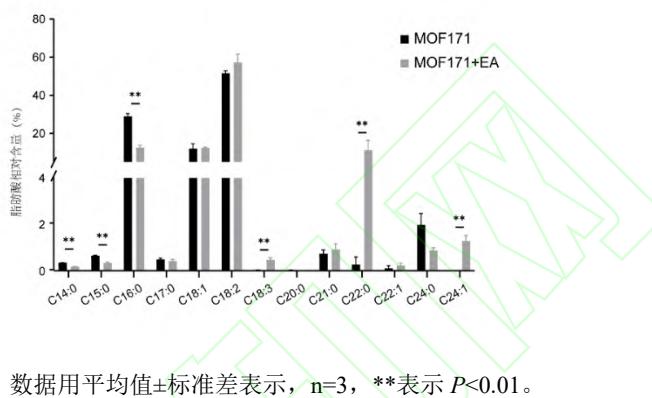
表4 真菌脂肪酸组成及相对含量

Table 4 Composition and relative content of fungal fatty acids

脂肪酸	脂肪酸含量 (%)							
	MOF45	MOF131	MOF140	MOF116	MOF171	MiF101	MOF26	MOF124
十四烷酸 C14:0	0.28±0.02	0.33±0.00	0.24±0.09	0.39±0.00	0.37±0.00	0.33±0.04	0.26±0.01	0.29±0.01
十五烷酸 C15:0	0.35±0.05	0.01±0.00	0.40±0.19	0.54±0.01	0.67±0.02	0.23±0.03	1.27±0.01	0.02±0.00
棕榈酸 C16:0	18.44±0.49	30.98±0.17	17.30±3.14	33.87±0.10	28.94±1.41	13.50±10.98	18.47±0.14	30.75±3.69
硬脂酸 C18:0	--	4.69±0.04	5.25±0.20	6.24±0.05	2.73±0.40	7.57±0.99	3.82±0.03	8.22±2.27
油酸 C18:1	48.31±3.73	29.13±0.25	38.68±4.98	37.95±0.32	11.99±2.64	56.93±7.54	32.62±0.25	18.15±0.43
亚油酸 C18:2	30.32±4.09	30.92±0.15	33.92±8.35	18.44±0.11	51.59±1.28	18.81±2.45	39.76±0.29	29.88±5.16
亚麻酸 C18:3	0.34±0.19	0.22±0.02	0.71±0.33	--	0.02±0.04	0.15±0.03	0.85±0.01	2.32±0.37
花生酸 C20:0	0.55±0.06	0.79±0.36	0.57±0.11	0.47±0.01	0.02±0.04	0.49±0.27	0.36±0.01	--
二十一烷酸 C21:0	0.21±0.03	0.39±0.01	0.29±0.07	0.72±0.54	0.75±0.16	0.07±0.04	0.11±0.07	--
山嵛酸 C22:0	0.45±0.03	--	0.31±0.10	0.44±0.00	0.29±0.32	0.54±0.08	0.32±0.14	0.87±0.06
芥酸 C22:1	--	1.14±0.02	0.76±0.52	0.05±0.01	0.13±0.11	--	0.59±0.67	--
二十四烷酸 C24:0	0.92±0.07	--	1.13±0.25	0.68±0.02	2.00±0.48	1.08±0.10	1.27±0.02	8.03±0.92

3.3 MOF171 可以利用芥酸合成神经酸

为了筛选可以产生神经酸真菌，本研究使用添加芥酸（Erucic Acid）的液体培养基（PDB）培养真菌后并检测脂肪酸含量。结果发现 MOF171 的芥酸含量有微量增长，并且有 1.32% 的 C24:1 产生（图 3）。其他脂肪酸成分变化显著，其主要成分以亚油酸为主（66.58%）。与对照组相比，其十四烷酸到硬脂酸之间的组分含量显著降低，亚麻酸（C18:3）、山嵛酸和神经酸的含量显著升高。



注：数据用平均值±标准差表示，n=3，**表示P<0.01。

EA is erucic acid. The data is presented as mean ± standard deviation, * represents P<0.05, **represents

P<0.01.

图 3 MOF171 脂肪酸成分

Figure 3 The MOF171 fatty acid composition

为进一步验证 MOF171 是否产生神经酸物质，将 MOF171 在含有芥酸（C22:1）的培养基下饲喂 4 天，通过 GC-MS 检测其体内产物为神经酸（C24:1）（图 4）。以上结果表明，MOF171 是产生神经酸的共生真菌，其体内可能具有催化芥酸合成神经酸的关键功能酶。

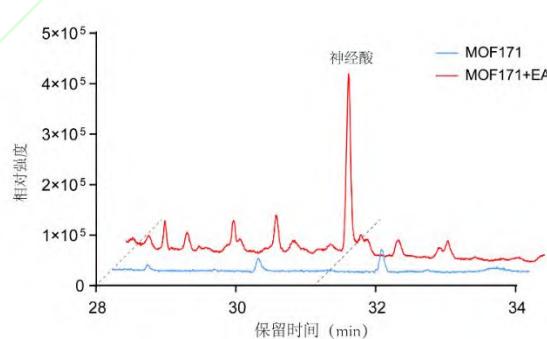


图 4 MOF171 神经酸 GC-MS 离子流图

Figure 4 MOF171 Neuronal acid GC-MS relative intensity diagram

4 讨论

为了全面分离培养印度血桐种子内生菌，本研究使用 10 种细菌培养基对种子匀浆进行涂布培养，4 种真菌培养基分别对种子组织块和种子油进行培养，印度血桐种子内生细菌丰富。不同培养基所培养到的细菌类群存在较大差异，不同培养方式富集的内生真菌群落数量差异显著，可能与不同内生菌对营养条件偏好不同相关。对于印度血桐的分离情况来看，采用 10T 培养基富集到的内生菌种类更丰富，对于真菌来说，添加了抗生素更有利于真菌的生长。采自三个不同个体的种子培养获得的内生菌多样性也存在差异，可能与生境和种子成熟度差异有关^[15, 16]；使用的培养基种类对内生菌的富集情况也有所不同^[17]，因此采用多种不同的培养基更有利于内生菌的资源收集。从印度血桐分离出的细菌中以芽孢杆菌属占比最大，为优势属（图 1）。芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 通过产生几丁质酶和挥发性物质表现出对镰刀菌属等植物病原菌有抑制作用^[18, 19]。印度血桐为热带先锋树种，对环境适应性强，芽孢杆菌的富集可能对增强印度血桐种子的抗病原菌能力和萌发力有关。

本研究从种子油中分离出的真菌相对于种仁组织块丰度和多样性更高，可能由于某些真菌更偏向于种子油的生态环境中，添加种子油有利于分离培养油料植物种子内生真菌。大多产油微生物为真菌，本研究重点对分离到的部分霉菌的脂肪酸组成进行检测，结果显示这些真菌油脂主要是由 C16 和 C18 两类脂肪酸组成，而其它的脂肪酸成分含量较低，如 C15:0、C17:0、C20:0 等^[20]。目前神经酸合成相关的真菌逐渐被发现，例如在真菌 *Mortierella capitata* 中，其神经酸积累量为细胞总脂肪酸的 6.94%；在神经酸含量较高的蒜头果中也具有能利用底物产神经酸的真菌 *Penicillium olsonii* ^[21, 22]。在分离的真菌中，菌株 MOF171 (*Aspergillus candidus*) 检测到一定量的芥酸，但未检测到神经酸，而在添加芥酸作为底物后培养能产生神经酸，而且芥酸含量也有增加。印度血桐种子油中芥酸含量较高，推测 MOF171 能利用芥酸作为底物合成神经酸，但神经酸含量仍较低，其利用芥酸合成神经酸的分子机制和提高神经酸含量的分子操作还需进一步研究。微生物在植物代谢调控中发挥重要作用，植物内生菌与植物的生长和代谢密切相关，通过外源添加底物，利用植物内生真菌发酵提高神经酸产量具有较大的发展潜力^[23, 24]。

5 结论

本研究共分离到细菌 151 株，分属于 16 个属，26 种；真菌共 173 株，分属于 27 个属，47 种。其中芽孢杆菌属细菌的数量占据主导，真菌青霉属和篮状菌属为主。研究结果显示，相较于种子，更多的微生物在种子油中被富集。在这些真菌中通过添加神经酸合成的前体物质芥酸后，MOF171 (*Aspergillus candidus*) 的脂肪酸检测结果中脂肪酸成分的变化较为显著，并且有 1.32% 的神经酸产生。

参考文献：

- [1] 胡丹东, 崔玉娟, 张继. 神经酸对帕金森病小鼠运动障碍的改善及保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(11): 1524-1529.
- [2] 玛依乐·艾海提, 刘垚杰, 李建科. 神经酸对 H₂O₂诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 食品科学, 2024, 45(09): 116-123.
- [3] HU D, CUI Y, ZHANG J. Nervonic acid amends motor disorder in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Translational Neuroscience*, 2021, 12(1): 237-246.
- [4] 马柏林, 梁淑芳, 赵德义, 等. 含神经酸植物的研究 [J]. 西北植物学报, 2004, 12: 2362-2365.
- [5] 孙小芹, 庞慧, 郭建林, 等. 十字花科 58 属 94 种野生植物种子脂肪酸组分分析 [J]. 林产化学与工业, 2011, 31(06): 46-54.
- [6] LIU F, WANG P, XIONG X, et al. A Review of Nervonic Acid Production in Plants: Prospects for the Genetic Engineering of High Nervonic Acid Cultivars Plants [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 626625.
- [7] 杨郁. 产功能性油脂香榧内生真菌的筛选及其脂肪酸合成关键酶的克隆表达研究 [D]; 南京农业大学, 2015.
- [8] 江木兰, 张银波, 胡小加, 等. 月见草内生真菌产 γ-亚麻酸(GLA)菌株的研究初报 [J]. 中国油料作物学, 2004, 26(04): 80-83.
- [9] 邓慧华, 洪滔, 吴承祯, 等. 马尾松(*Pinus massoniana*)内生真菌的产油脂效果 [J]. 应用与环境生物学, 2014, 20(03): 377-381.
- [10] 戴传超, 余伯阳, 徐增莱, 等. 大戟科 4 种药用植物及其内生真菌脂肪酸组分研究 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(09): 16-19.
- [11] 张桂兰, 郭娟, 姚雨玲, 等. 3 种血桐属植物种子营养组成分析 [J/OL]. 中国油脂, 1-9.
- [12] HE X, LU T-Q, LI J-Y, et al. Germplasm resources of three wood plant species enriched with nervonic acid [J]. *Plant Diversity*, 2022, 44(3): 308-315.
- [13] 朱丹实, 刘贺, 吕艳芳. 产油脂霉菌的研究进展 [J]. 粮油加工, 2009, 06: 54-57.
- [14] 张鹏, 杨培林, 戴美学. 微生物多不饱和脂肪酸的研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2006, 26(01): 101-105.
- [15] 贺辉, 陈建博, 王涛, 等. 青海冬虫夏草不同产区土壤理化性质对微生物多样性的影响 [J]. 西南农业学报, 2024, 37(04): 824-34.
- [16] 杜衍, 耿燕楠, 刘丽, 等. 北柴胡种子内生菌群落结构与多样性 [J]. 生物资源, 2022, 44 (01) : 36-44.
- [17] 张泽宇, 肖扬, 詹亚斌, 等. 不同营养类型培养基番茄内生细菌群落结构研究 [J]. 江苏农业科学, 2023, 51(11): 128-133.
- [18] CHEN Q, QIU Y, YUAN Y, et al. Biocontrol activity and action mechanism of *Bacillus velezensis* strain SDTB038 against *Fusarium* crown and root rot of tomato [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 994716.
- [19] KHAN N, MARTINEZ-HIDALGO P, ICE T A, et al. Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2363.
- [20] 宋遥遥. 丝状真菌生产多不饱和脂肪酸的研究 [D]; 长春工业大学, 2022.
- [21] UMEMOTO H, SAWADA K, KURATA A, et al. Fermentative production of nervonic acid by *Mortierella capitata* RD000969 [J]. *J Oleo Sci*, 2014, 63(7): 671-679.
- [22] 易绍金, 郑义平. 产油微生物的研究及其应用 [J]. 中外能源, 2006, 11(02): 90-94.
- [23] HU F, PIAO M, YANG C, et al. Effects of Coconut Oil and Palm Oil on Growth, Rumen Microbiota, and Fatty Acid Profile of Suckling Calves [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(3):655.
- [24] 王一凡. 蒜头果内生真菌发酵产神经酸油脂的研究 [D]; 广西大学, 2019.