

桃儿七茎部产鬼臼毒素类成分的内生真菌筛选及鉴定

王婷, 马越兴, 叶耀辉*, 郑红梅, 张博文, 张恩慧
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 筛选和鉴定濒危藏药桃儿七茎部产鬼臼毒素类成分的内生真菌, 为保护桃儿七植物资源和发现新的天然活性菌株提供参考。方法: 采用组织块法对桃儿七茎部的内生真菌进行分离, 利用 TLC 和 HPLC 检测其代谢产物中的鬼臼毒素类成分, 检测波长 254 nm, 流动相乙腈-水(40:60)。采用形态学和分子生物学相结合的方法对产鬼臼毒素类成分的内生真菌进行鉴定。结果: 共分离得到 9 株内生真菌, 其中菌株 J-1, J-2, J-3 的发酵液中含有鬼臼毒素类成分, 分别鉴定为 *Chaetomium globosum* strain MF564, *C. sp.* 4RF3 和 *Pseudallescheria sp.* T55。结论: 从桃儿七茎中分离到 3 株产鬼臼毒素类成分的内生真菌, 分别来源于 2 个新属的不同种菌株, 为开发新绿色生物能源和实现内生真菌工业发酵生产鬼臼毒素类成分奠定了理论基础。

[关键词] 桃儿七; 内生真菌; 鬼臼毒素; 分子鉴定; 系统进化树

[中图分类号] R282; Q939; R284.1; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0027-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020027

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161107.1510.040.html>

[网络出版时间] 2016-11-07 15:10

Screening and Identification of Endophytic Fungi Producing Podophyllotoxin Compounds in *Sinopodophyllum hexandrum* Stems

WANG Ting, MA Yue-xing, YE Yao-hui*, ZHENG Hong-mei, ZHANG Bo-wen, ZHANG En-hui
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To screen and identify endophytic fungi producing podophyllotoxin compounds from *Sinopodophyllum hexandrum* stems, and to provide the reference for protection of *S. hexandrum* plant resources and discovery of new natural active strains. **Method:** The endophytic fungi from *S. hexandrum* stems was isolated by tissue block method, the metabolites of podophyllotoxin compounds were detected by TLC and HPLC, combination of morphology and molecular biology was adopted to identify endophytic fungi producing podophyllotoxin compounds. **Result:** Nine strains of endophytic fungi were isolated, which J-1, J-2 and J-3 strains in the fermentation broth contained podophyllotoxin compounds, they were identified as *Chaetomium globosum* strain MF564, *C. sp.* 4RF3 and *Pseudallescheria sp.* T55. **Conclusion:** Three strains of endophytic fungi producing podophyllotoxin compounds are isolated from *S. hexandrum* stems, they are from different strains of 2 new genus.

[Key words] *Sinopodophyllum hexandrum*; endophytic fungi; podophyllotoxin; molecular identification; phylogenetic tree

桃儿七是小檗科鬼臼亚科桃儿七属多年生草本植物^[1], 其药用部位根和茎所含鬼臼毒素可用于治

[收稿日期] 20160428(007)

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(20132BAB205080); 江西省专利研发引导与产业化示范专项(20143BBM26057)

[第一作者] 王婷, 在读硕士, 从事生药学研究, Tel:13237529448, E-mail:375026687@qq.com

[通讯作者] *叶耀辉, 博士, 教授, 从事中药学研究, Tel:0791-87118716, E-mail:55925368@qq.com

疗子宫癌、皮肤癌、乳腺癌等^[2]。随着鬼臼毒素在药物市场需求量的不断增大,不合理的开发与利用桃儿七药用资源逐渐增多,致使桃儿七种群数量急剧减少,而人工栽培产业又未成规模^[3]。近年来药用植物新资源研究的热点集中在药用植物内生菌上,国内外已先后报道了从多种药用植物中获得具有药理活性的内生真菌。自 Strobel^[4]从短叶红豆杉的韧皮部分离到一株可产生紫杉醇的内生真菌起,后续不断有学者发现新的活性内生菌,张玲琪等^[5]从长春花茎的韧皮部中分离到产长春新碱的内生真菌。从川八角莲、南方山荷叶、砂地柏和桃儿七等植物中分离到产鬼臼毒素类似物的内生真菌^[6-9]。研究表明药物植物内生真菌能够合成与宿主相同或相似的生物活性物质^[10],具有抗肿瘤、抗菌、杀虫等活性^[11],现已成为寻找新天然活性物质的替代资源。

目前关于桃儿七内生真菌的活性研究几乎都集中于抑菌和抗肿瘤研究,而对其杀虫活性鲜有报道。本实验对桃儿七茎部的内生真菌进行了分离与纯化,筛选能够产生鬼臼毒素类化合物的内生真菌并鉴定其种属,建立了植物内生真菌分离与鉴定的系统方法,拓宽了桃儿七内生真菌研究范围的同时,有利于农业绿色抗虫农药的开发,为今后利用内生真菌进行工业发酵生产鬼臼毒素类成分提供了菌株资源保证,对缓解该药用植物资源匮乏的现状具有重要意义。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪和 2489 型紫外检测器(美国 Waters 公司),GeneAmp 2400 型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 ABI 公司),EPS604 型稳压稳流电泳仪(南京科宝仪器研究所)。濒危藏族药桃

儿七植株采自四川省康定县,经江西中医药大学药学院曹岚副教授鉴定为小檗科植物桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum*,采集的桃儿七植株幼苗种植于 28 ℃ 的组织培养室内;鬼臼毒素对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 150328),琼脂(生物工程上海有限公司),溴化乙锭(EB)替代染料(北京普利莱基因技术有限公司,批号 D1210),DNA Marker(加拿大 BioBasic 公司),La Taq 酶(日本 Takara 公司,批号 KA4601JA),DNA 提取试剂盒(美国 Biomiga 公司),通用引物 nu-SSU-0817-5 和 nu-SSU-1536-3(生工生物工程(上海)股份有限公司],试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 桃儿七内生真菌的分离与纯化 挑选新鲜无病虫害的健康桃儿七植株,用剪刀剪下其茎部分,用水冲洗干净表面的泥土,按常规方法消毒^[12](加 75% 乙醇 30 mL 漂洗 1 min,加 0.1% 氯化汞 20 mL 漂洗 3 min,加 75% 乙醇 30 mL 漂洗 30 s,加无菌水 50 mL 漂洗 5 次),放在灭菌的滤纸上,吸干多余水分。将消毒过的茎在无菌条件下用手术刀和剪刀分别切割成 0.5 cm 长的小段,并用无菌镊子转接到制备好的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上,使切割处接触培养基上,每个平板放 4~5 块组织,置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 3~7 d。取最后 1 次漂洗液作为空白对照,检验消毒效果。待组织块周围长出菌落后,挑取菌落边缘的菌丝转接到新的平板培养基上,纯化数次即可得到单一菌株。结果从桃儿七茎部共分离纯化得到 9 株内生真菌,观察菌落表面性状、菌丝态、菌落边缘及培养基基质颜色等,得具体菌株形态特征,见表 1。

表 1 桃儿七茎部内生真菌的菌落形态

Table 1 Colony morphology of endophytic fungi from *Sinopodophyllum hexandrum* stems

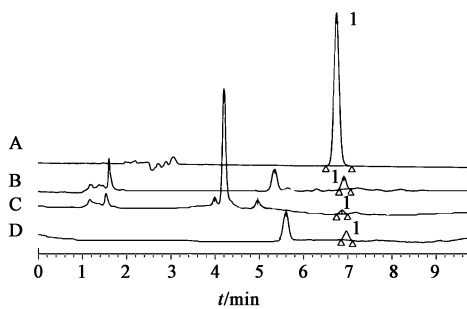
| 菌株编号 | 菌落表面 | 菌丝 | 菌落边缘 | 基质颜色 |
|------|------------------|----------|------|------|
| J-1 | 中心棕黄色边缘墨绿色,放射状沟纹 | 致密,干燥 | 光滑 | 黄色 |
| J-2 | 中心黄色边缘墨绿色 | 致密,发达 | 全缘 | 橘黄色 |
| J-3 | 黑色,轮纹状沟纹 | 束状,致密,发达 | 整齐 | 浅黄色 |
| J-4 | 中心白色边缘褐色,中心突起 | 干燥,致密 | 光滑 | 奶白色 |
| J-5 | 中心灰白色边缘墨绿色,辐射状沟纹 | 毡状,致密 | 全缘 | 淡黄色 |
| J-6 | 白色 | 绒毛状,发达 | 锯齿状 | 红色 |
| J-7 | 中心褐色边缘墨绿色 | 干燥,致密 | 光滑 | 橘黄色 |
| J-8 | 灰色 | 毡状,致密 | 全缘 | 无色 |
| J-9 | 黑色,轮纹状 | 致密,发达 | 光滑 | 无色 |

2.2 菌株的液体培养及发酵产物萃取 将保存的菌种 28 ℃ 活化培养 6 d, 挑取适量活化好的菌体分别接种于装有发酵培养基 100 mL 的 250 mL 锥形瓶中, 于 28 ℃, 110 r·min⁻¹ 恒温振荡培养 7~10 d。将振荡培养后的菌体和发酵液一起倒入组织捣碎匀浆机中充分捣碎, 以便菌丝体内的物质充分释放出来; 抽滤并收集滤液, 滤液浓缩至一定体积后, 加等量三氯甲烷萃取过夜, 取三氯甲烷层浓缩, 用于检测鬼臼毒素类似成分; 上层溶液加入等体积正丁醇, 振荡后继续静置萃取, 取正丁醇层浓缩, 备用。

2.3 产鬼臼毒素内生真菌的筛选

2.3.1 TLC 检测 将上述三氯甲烷提取物分别用甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 与 0.5 g·L⁻¹ 鬼臼毒素对照品溶液(甲醇为溶剂^[13])对比分析。展开系统为三氯甲烷-甲醇(9:1)或三氯甲烷-乙酸乙酯(8:2), 显色剂硫酸-乙醇(15:85)。结果显示 J-1, J-2, J-3 均出现与鬼臼毒素对照品比移值相同的斑点, 初步确定 J-1, J-2, J-3 菌株可产生鬼臼毒素类成分。

2.3.2 HPLC 检测 Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 25 ℃, 检测波长 254 nm, 流动相乙腈-水(40:60), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。见图 1。判定菌株 J-1, J-2, J-3 均可产生鬼臼毒素类成分。



A. 对照品; B. J-1; C. J-2; D. J-3; 1. 鬼臼毒素

图 1 桃儿七内生真菌菌丝发酵提取液的 HPLC

Fig. 1 HPLC of mycelium fermentation extract of endophytic fungi from *Sinopodophyllum hexandrum* stems

2.4 产鬼臼毒素类物质的内生真菌鉴定

2.4.1 形态学鉴定 菌株 J-1, J-2, J-3 进行显微形态学观察。采用制片法, 在无菌条件下挑取少量待测菌株菌丝, 用无菌水稀释涂布于盖玻片上, 将盖玻片转移到载玻片上进行镜检观察, 并记录图片数据与镜下显微形态特征^[14]。获得了菌株的菌落形态和显微结构特征, 见图 2。尽管差异性比较显著, 但是形态学的鉴定尚不能确定其种属关系。

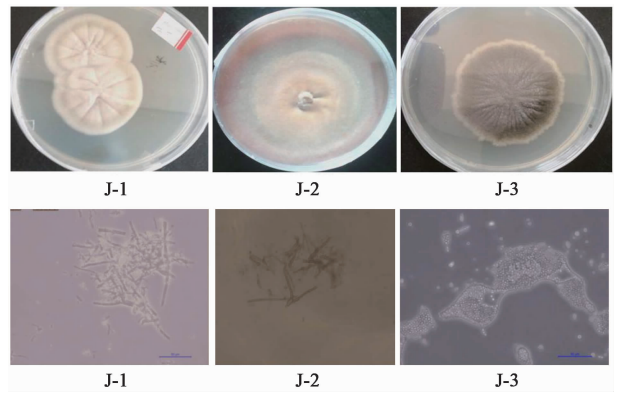


图 2 菌株 J-1, J-2, J-3 的菌落形态及显微形态(×400)

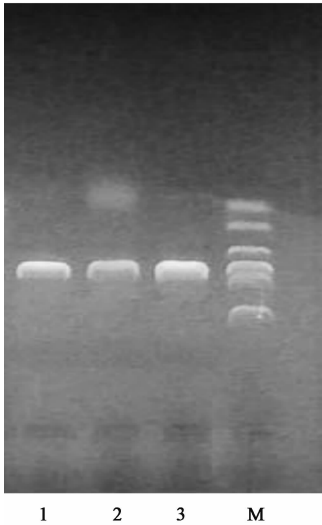
Fig. 2 Colony morphology and microscopic morphology of J-1, J-2 and J-3 strain(×400)

2.4.2 分子生物学鉴定 真菌基因组 DNA 的提取采用 DNA 试剂盒(EZgene™ fungal gDNA miniprep kit)方法提取。18S rRNA 基因片段的聚合酶链式反应(PCR)扩增引物为 nu-SSU-0817-5 和 nu-SSU-1536-3^[15]。PCR 采用 25 μL 反应体系, 包括 10×La Taq 缓冲液 2.5 μL, dNTP 2 μL, 引物各 0.5 μL, 双蒸水 18.4 μL, Taq 聚合酶 0.1 μL, DNA 模板 1 μL。反应条件为 95 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 变性 45 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 扩增 30 个循环, 最后 72 ℃ 延长 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。测序结果通过 NCBI 数据库的 BLAST 进行比对, 利用 DNA star 软件 MegAlign 方法进行聚类分析, 构建系统进化树^[16], 结合形态学分类方法确定待测菌的分类学地位。

菌株 J-1, J-2, J-3 利用引物 nu-SSU-0817-5, nu-SSU-1536-3 扩增出 18S rRNA 序列, 长度约 762 bp, 见图 3, 将目的片段序列在 GenBank 中的 BLAST 比对, 结果显示 J-1 菌株扩增片段碱基序列与球毛壳霉菌(*Chaetomium globosum* strain MF564)序列的相似性 100%; J-2 菌株与毛壳菌(*Chaetomium* sp. 4RF3)序列的相似性 100%; J-3 与假埃希氏菌属(*Pseudallescheria* sp. T55)序列的相似性 100%。J-1, J-2, J-3 菌株的 18S rRNA 序列与其他种属的相应序列构建系统进化树, 见图 4, 结果显示 J-1, J-2 属于 *Chaetomium* 不同种真菌; J-3 属于 *Pseudallescheria*。

3 讨论

植物内生真菌广泛存在于植物组织内, 与宿主植物长期共存, 能够产生与宿主相同或相似的活性代谢产物, 具有丰富的生物多样性^[17]。为了能够从数量繁多的植物内生真菌中寻找出能够通过代谢合



1. J-1; 2. J-2; 3. J-3; M. Marker

图 3 菌株 J-1, J-2, J-3 的 18S rRNA 序列扩增片段的凝胶电泳分析
Fig. 3 Gel electrophoresis analysis of 18S rRNA sequence amplified fragments of J-1, J-2 and J-3 strain

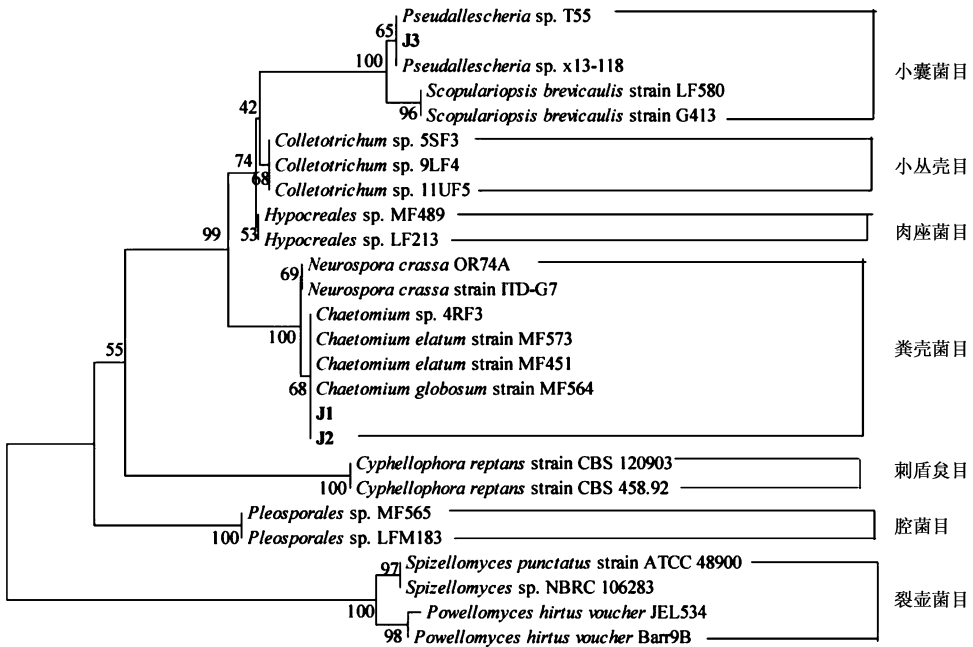


图 4 菌株 J-1, J-2, J-3 的 18S rRNA 序列系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree based on 18S rRNA sequences of J-1, J-2 and J-3 strain

成鬼臼毒素的目标菌株,本实验研究首先从桃儿七茎部分离出与植株共生的内生真菌 9 株。使用 TLC 及 HPLC 对目标菌株进行初步筛选,从 9 株内生真菌中分离出 3 株可以合成鬼臼毒素类成分的内生真菌,并对这 3 株内生真菌进行了分子鉴定。

李娟花^[9]选取桃儿七新鲜根、茎材料进行内生真菌的分离,结果茎部分离到 10 株。毕江涛等^[18]从桃儿七根、茎、叶中分离出 49 株内生真菌,其中茎部 18 株,占分离菌株数的 36.7%。前人从桃儿七茎部分离的菌株数与本实验存在一定差异,原因一方面可能是由于生长环境的差异及各部位化学组成的不同,引起植物内环境的改变,进而影响内生真菌的多样性和菌群的组成;另一方面可能是由于不同内生真菌最适培养基和培养条件的不同,而人工培养方法又无法分离到所有内生真菌,仍有许多内生真菌未被分离出来。目前对内生真菌的分离主要集中在常温分离,而对中、高温内生真菌的分离存在疏

漏。为了准确反映内生真菌种群的多样性,获取更加全面的信息,有必要进一步优化分离培养技术和运用多相分类方法。

一些内生真菌在人工培养基上不易产孢子,有些内生真菌已经发生了进化或者退化,但是其菌落形态有可能没有很大的变化,按照形态学归类,结果不一定准确,必须结合分子生物学方法进行分类。由于 18S rRNA 的序列分析能实质性地反映属间、

种间及菌株间的碱基对差异,加上片段较小、易于分析,目前已被广泛应用于真菌属内不同种间或近似属间的系统发育研究中^[19]。故本实验通过对内生真菌基因组 18S rRNA 序列比对,最终确定 3 株产鬼臼毒素内生真菌分别来源于 2 个属的不同种菌株。

张琨等^[20]从陕西太白山桃儿七中筛选出产鬼臼毒素的菌株和产鬼臼毒素单糖苷的菌株均属于毛霉属,但不属于同一组。刘芸等^[21]从秦岭濒危药用

桃儿七植株内分离出1株产鬼臼毒素的内生真菌T8,鉴定为头孢霉属。其他研究人员也曾从不同的桃儿七内生真菌中筛选出产鬼臼毒素的菌株,分别属于曲霉属、青霉属和交链孢属^[22-23]。前人筛选出的菌株与本实验鉴定的菌株存在较多差异,该现象说明由于内生真菌与宿主桃儿七长期共生关系导致宿主将其遗传物质或信息传递给其内生真菌,使之具有与宿主相同或相似的代谢途径。这说明不同来源的植株,由于其生长环境的不同,筛选到的产鬼臼毒素类似物的内生真菌数量和种类会存在较大差异。

桃儿七内生真菌能产生多种活性次级代谢产物,可能会影响植物合成多种药效成分^[24-25]。从桃儿七根、茎中分离筛选的产鬼臼毒素类成分的菌株,在培养基中培养也能够产生较多的鬼臼毒素类成分,该研究为桃儿七的可持续利用提供了关键信息,这些活性次级代谢产物具有增加药物合成主要药效成分的作用,说明桃儿七内生真菌可能会成为发现新天然活性物质的重要来源,同时这些活性次级代谢产物为研究药物抗肿瘤活性和开发新生物能源提供重要支持。本研究对桃儿七内生真菌的鉴定提供了详细的分子信息,给鉴定结果提供了可靠的依据。

[参考文献]

[1] 和增宏. 桃儿七药理作用及其栽培技术[J]. 科技与企业, 2013(11):305.

[2] Mortensen G L, Larsen H K. The quality of life of patients with genital warts: a qualitative study[J]. BMC Public Health, 2010, doi: 10. 1186/1471-2458-10-113.

[3] 杨显志, 邵华, 张玲琪, 等. 鬼臼毒素资源研究现状[J]. 中草药, 2001, 32(11):1042-1044.

[4] Strobel G A. Rainforest endophytes and bioactive products [J]. Crit Rev Biotechnol, 2002, 22(4): 315-333.

[5] 张玲琪, 郭波, 李海燕, 等. 长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究[J]. 中草药, 2000, 31(11):805-807.

[6] 郭仕平, 蒋斌, 苏莹珍, 等. 川八角莲内生真菌产鬼臼毒素类似物的初步研究[J]. 生物技术, 2004, 14(2): 55-57.

[7] 曾松荣, 邵华, 张玲琪. 从南方山荷叶分离出一株产鬼臼毒素类似物的内生真菌[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(4):1-2.

[8] 卢亮, 何军, 余鑫平, 等. 砂地柏内生真菌 SC13 菌株的分离鉴定及代谢产物初步研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(5):85-89.

[9] 李娟花. 桃儿七内生真菌代谢产鬼臼毒素定性分析

[J]. 经营管理者, 2013(22):380.

[10] 孙剑秋, 郭良栋, 臧威, 等. 药用植物内生真菌及活性物质多样性研究进展[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7):1505-1519.

[11] 曾培源, 吴锦忠. 国外植物内生真菌活性物质的研究进展[J]. 海峡药学, 2010, 22(11):9-13.

[12] 毕江涛, 何萍, 吕雯, 等. 桃儿七内生真菌分离及其抑菌活性初步研究[J]. 中草药, 2013, 44(12):1667-1672.

[13] 陈燕, 德吉, 刘倩伶, 等. 桃儿七果实中鬼臼毒素的鉴别和含量测定[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(1):93-94.

[14] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1982:221-245.

[15] Borneman J, Hartin R J. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(10):4356-4360.

[16] 祝英, 王治业, 杨晖, 等. 桃儿七地下茎内生真菌的分离和鉴定[J]. 中国现代中药, 2015, 17(6):572-576.

[17] 姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 等. 植物内生菌与宿主关系研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(7):1750-1754.

[18] 毕江涛, 何萍, 吕雯, 等. 桃儿七内生真菌分离及其抑菌活性初步研究[J]. 中草药, 2013, 44(12):1667-1672.

[19] GUO L D, Hyde K D, Liew E C. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences [J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 20(1):1-13.

[20] 张琨, 黄建新, 曹莉, 等. 桃儿七内生菌及产鬼臼类物质菌株的筛选[J]. 西北大学学报:自然科学版, 2008, 38(3):431-434.

[21] 刘芸, 仇农学, 殷红, 等. 一株产鬼臼毒素内生真菌的分离及其代谢产物抗小鼠 S180 肉瘤的研究[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(1):12-16.

[22] 李海燕, 王志军, 张玲琪, 等. 一种桃儿七内生真菌的分离初报[J]. 云南大学学报:自然科学版, 1999, 21(3):243.

[23] 杨显志, 郭仕平, 张玲琪, 等. 鬼臼类植物产鬼臼毒素内生真菌的筛选[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(5):419-422.

[24] 叶耀辉, 马越兴, 张恩慧, 等. 藏药桃儿七与小叶莲 HPLC 分析及其毒性差异研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18):80-84.

[25] 叶耀辉, 马越兴, 应亚宾, 等. 藏药桃儿七 HPLC 指纹图谱产地识别及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24):97-101.

[责任编辑 刘德文]