

· 资源与鉴定 ·

# 鹰爪花茎和叶中内生真菌的组织化学定位与分子鉴定

严寒静<sup>1</sup>, 高晓霞<sup>2</sup>, 何梦玲<sup>1</sup>, 王磊<sup>3</sup>, 李浩华<sup>3</sup>, 章卫民<sup>3\*</sup>

(1. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 2. 广东药学院药科学院, 广州 510006;

3. 广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东省华南应用微生物重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 广州 510070)

**[摘要]** 目的: 研究鹰爪花 *Artabotrys hexapetalus* 茎叶的显微结构及其内生真菌在组织内的分布特点及种类鉴定。方法: 采用石蜡永久制片法对鹰爪花的显微结构进行研究, 细胞化学法确定内生真菌的分布, 平板分离法对内生真菌分离培养, 通过 rDNA 中内转录间隔区 (ITS) 序列进行分类鉴定。结果: 鹰爪花茎次生构造由周皮、皮层和维管柱组成, 韧皮部纤维成层分布; 叶为异面叶, 主脉维管束为外韧型, 具纤维组成的维管束鞘; 茎和叶多个组织有内生菌分布。共分离鉴定 18 株内生真菌, 其中拟茎点霉 *Phomopsis* spp. 是鹰爪花内生真菌优势菌群, 占分离总数的 61.1%, 其次为胶孢刺盘孢 *Colletotrichum gloeosporioides*。结论: 鹰爪花茎和叶显微特征明显, 其内生真菌的分布无明显组织特异性, 拟茎点霉为鹰爪花内生真菌的优势种群。

**[关键词]** 鹰爪花; 内生真菌; 组织化学; 内转录间隔区; 鉴定

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0157-05

**[doi]** 10.11653/syfj2013130157

## Histochemical Localization and Molecular Identification of Endophytic Fungi in Stems and Leaves of *Artabotrys hexapetalus*

YAN Han-jing<sup>1</sup>, GAO Xiao-xia<sup>2</sup>, HE Meng-ling<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>3</sup>, LI Hao-hua<sup>3</sup>, ZHANG Wei-min<sup>3\*</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

3. State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry- Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the microstructure of stems and leaves of *Artabotrys hexapetalus* and distribution characteristics of endophytic fungi in the tissues, and to isolate and identify these endophytic fungi from the stem and the leaf of *A. hexapetalus*. **Method:** Permanent paraffin-cut section, optical microscope photography and histochemistry were used to study the location of endophytic fungi. The solidified potato dextrose agar (PDA) of plates was applied for the isolation of the endophytic fungi, and the identification was completed by the internal transcribed spacer (ITS) sequence. **Result:** The secondary structure of the stems of *A. hexapetalus* consisted of the periderm, cortex and vascular cylinder (stele). Sieve and tubes phloem fibers, scattering in bundles, arranged at intervals. The leaves of *A. hexapetalus* were of typically bifacial, consisted of epidermis, mesophyll and veins. The midrib vascular bundle, collateral vascular bundle, was ring with vascular bundle sheath. Endophytic fungi existed in the local cells of cortex, phloem, palisade tissue and spongy tissue. A total of 18 strains was isolated and

**[收稿日期]** 20121211(003)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(S2012010009773)

**[第一作者]** 严寒静, 博士, 副教授, 长期从事中药资源与环境相关性研究, E-mail: yanhanjing1211@163.com

**[通讯作者]** \* 章卫民, 博士, 研究员, E-mail: wmzhang58@yahoo.com.cn

identified, among them *Phomopsis* spp. accounted for 61.1% in all strains of endophytic fungi. **Conclusion:** The microscopic characteristics of *A. hexapetalus*'s stem and leaf can be used as a reference for identification. The endophytic fungi of *A. hexapetalus* were distributed with no obvious tissue specificity and *P.* spp. were determined as dominant species.

[**Key words**] *Artabotrys hexapetalus*; endophytic fungi; histochemistry; ITS; identification

鹰爪花为番荔枝科鹰爪花属植物<sup>[1]</sup>, 又称鹰爪, 产于我国南方各省, 既是药用植物, 又是名贵芳香的观赏植物, 多为栽培。其根有杀虫作用, 用于治疗疟疾; 果实有清热解毒作用, 用于治疗颈部淋巴结核<sup>[2]</sup>。1982 年 Jolad 等<sup>[3]</sup>通过生物活性测试为跟踪手段从美洲植物 *Uvaria accuminata* (番荔枝科紫玉盘属) 根部提取物中分离出一种抗癌活性很强的内酯类化合物 Uvaricin, 从而引起了科学界对番荔枝科植物的关注。鹰爪花属植物多具生物活性, 化学成分主要有番荔枝内酯类、黄酮类<sup>[4-5]</sup>、生物碱<sup>[6-7]</sup>等。这些化合物多具有抗肿瘤活性, 特别是其中的番荔枝内酯大多有不同程度的细胞毒、抗肿瘤、抗疟、抗菌、杀虫、免疫抑制等多种生物活性, 是目前报道中体内外抗癌活性最强的化合物之一。

近年来, 国内外已陆续报道了从多种植物中分离获得了产生药理活性物质的内生真菌。美国科学家 Strobel 等<sup>[8]</sup>首次从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* Nutt. 的韧皮部中分离到了菌株 *Taxomyces andreanae*, 可在半合成培养液中产生紫杉醇和紫杉烷类化合物, 引发了人们对研究植物内生真菌代谢产物的极大兴趣。有关鹰爪花属植物药用成分的提取分离、抗氧化活性等方面已有研究报道, 但未见到有鹰爪花茎、叶的解剖构造的报道, 尤其是对鹰爪花属植物中内生真菌的分布尚未见报道。本文研究了自然生长状态的鹰爪花的显微结构及其内生真菌的分布, 为今后研究鹰爪花植物的生长发育、内生真菌分布规律以及次生代谢产物与内生真菌的关系提供科学依据。

## 1 材料和方法

**1.1 植物来源** 自然生长的鹰爪花取材于广东肇庆市鼎湖山自然保护区, 经广东药学院中药学院中药资源系刘基柱副教授鉴定为番荔枝科植物鹰爪花 *Artabotrys hexapetalus* (L. f.) Bhandari 的茎和叶。

**1.2 石蜡切片制作方法** 将鹰爪花的茎和叶在流水下冲洗干净, 选取正常完整的, 切成 2~3 mm 长的小段迅速固定于 FAA 固定液中, 常规石蜡法制片, 切片厚度为 16~20  $\mu\text{m}$ 。苯胺蓝染色, 中性树脂胶封片, 在 Carl Zeiss Axio imager. A1 显微镜下观察并

摄影。

**1.3 内生真菌的分离** 将采集的样品在 0.1% 的升汞溶液中浸泡 1 min, 用无菌水冲洗, 75% 乙醇中浸泡 1 min, 无菌水冲洗。叶片剪去边缘, 并剪成 0.5 cm  $\times$  0.5 cm 的方块置于分离平板 (含 100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 卡那霉素和 100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的综合 PDA 培养基) 上; 茎剪切为 1 cm 左右长度, 放入分离平板后轻轻按压。26  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养, 待长出菌丝后, 挑取平板中单一菌落的菌丝接种于新的平板, 继续 26  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养, 经多次分离纯化获得单一菌株后, 转接斜面保存。

**1.4 总 DNA 的提取** 从平板或斜面上刮取少量菌丝体移入已灭菌的 1.5 mL 微型离心管中, 采用植物基因组小量提取试剂盒提取总 DNA (申能博彩), 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

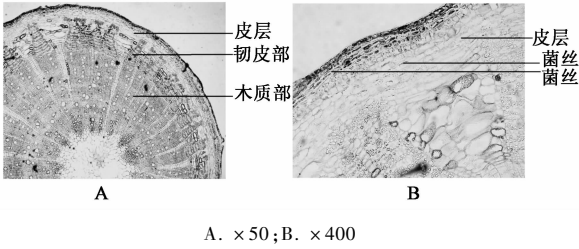
**1.5 目的基因片段的 PCR 扩增、产物纯化和测序** 利用真菌 rDNA 内转录间隔区 (rDNA ITS) 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', 正向) 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 反向)<sup>[9]</sup> 扩增分离菌株的 rDNA ITS 区, 使用 Ex Taq (TaKaRa) 按说明书进行 PCR 反应, 反应条件: 93  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 然后 93  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 53  $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min, 共 30 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应产物利用 PCR 产物纯化试剂盒 (QIAGEN) 纯化, 采用 *Hae* III 及 *Hha* I 两种限制性内切酶 (TaKaRa) 对纯化的 PCR 产物进行酶切分型。根据酶切分型结果挑选 PCR 产物, 由上海美吉生物医药科技有限公司进行直接测序。

**1.6 序列分析** 测序结果通过 Blast 程序在 GenBank 上进行相似性序列检索, 根据 Blast 结果确定分离真菌的种类。

## 2 结果

**2.1 鹰爪花茎的解剖特征** 木栓层为数列扁平细胞; 皮层窄, 为数列椭圆形细胞。中柱鞘部位具纤维束, 常横排成不连续的环, 木化。维管束外韧型, 韧皮纤维束与韧皮薄壁细胞、筛管群呈切向交互排列; 初生射线喇叭形, 有分泌细胞散在分布。形成层明显。木质部宽广, 导管类方形或多角形, 多单个或

2~3个径向排列;具伴管纤维,木化;木射线为1~2列细胞。髓部薄壁细胞类圆形,较大。薄壁细胞含淀粉粒、草酸钙方晶(图1)。



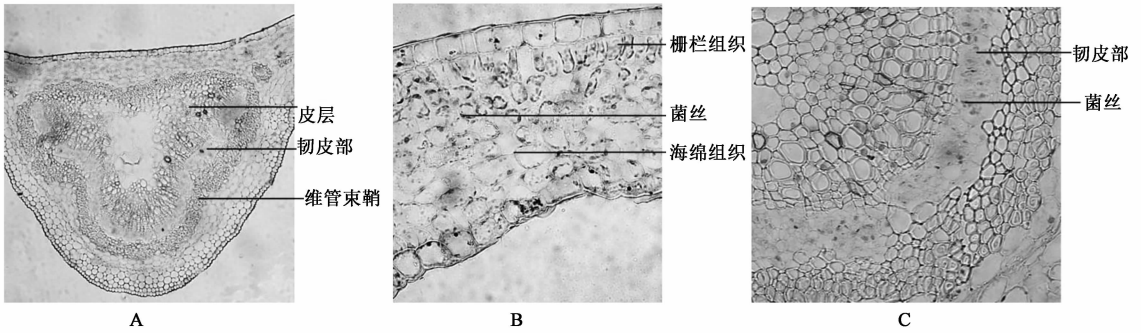
A. ×50; B. ×400

图1 鹰爪花茎横切面

**2.2 鹰爪花叶的解剖特征** 上表皮细胞类长方形,下表皮细胞较小;栅栏细胞1~2列,短柱状,不通过

主脉上方;海绵组织为3~4列类圆形细胞,排列疏松。主脉于下表面明显凸出,主脉维管束3个,均为外韧型,中央有1个大型的倒三角形维管束,两侧各有2个近圆形的小型维管束。维管束鞘纤维多个相聚成群且断续排列(图2A)。

**2.3 鹰爪花茎、叶中内生真菌的分布和群落构成** 依据苯胺蓝可将真菌的原生质体染成蓝色的特性<sup>[10-11]</sup>,经过石蜡切片组织观察结果:从鹰爪花茎的石蜡切片可以看到内生真菌斑点主要分布在木栓层、皮层、韧皮部薄壁细胞和髓周细胞中(图1),在叶中主要分布于主脉上方的薄壁细胞、栅栏组织、海绵组织和韧皮部(图2)。



A. ×100; B. ×400; C. ×400

图2 鹰爪花叶横切面

本文共分离获得18株内生真菌,经酶切分型共获得8种RFLP型,测序后获得8条不同的rDNA序列,Blast分析结果见表1。所有分离菌株除HB3外,均具有99%以上的序列相似率,分别属于3个属(*Diaporthe*为*Phomopsis*的有性型属),其中11株

为拟茎点霉 *Phomopsis* spp.,占分离总数的61.1%,是鹰爪花内生真菌优势菌群,其次为胶孢刺盘孢 (*Colletotrichum gloeosporioides*),占分离总数的33.3%。

表1 鹰爪花内生真菌的分离及测序结果

菌株	ITS 区长度 /bp	分离菌株		GenBank Accession No.	最相近物种 种名/菌株/序列名称	GenBank		
		分离部位	分离数量			Accession No.	分值	相似度 /%
HB1	484	叶,顶芽	6	JQ417280	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> clone h6	HM016795	892	100.0
HB3	480	叶	1	JQ417281	<i>Diaporthe</i> sp. MA104	HM012815	708	92.3
HC1	497	茎、顶芽	4	JQ417282	<i>Phomopsis</i> sp. IP-51	DQ780430	893	99.0
HC2	445	茎	1	JQ417283	<i>Zopfiella latipes</i> strain F-068,392	FJ175158	816	100.0
HC3	497	茎	1	JQ417284	<i>Phomopsis</i> sp. A57	EF564153	877	99.4
HC4	487	茎、顶芽	3	JQ417285	<i>Diaporthe phaseolorum</i> isolate ZJ4	EU196746	902	99.4
HC6	501	茎	1	JQ417286	<i>Phomopsis</i> sp. RP257	JF44120	893	99.8
HC7	498	茎	1	JQ417287	<i>Phomopsis</i> sp. 45GP/T	GQ352480	893	100.0

### 3 讨论

内生真菌在鹰爪花中的侵染区域主要分布在皮层、韧皮部及髓部的薄壁细胞,菌丝不是在整个组织中均匀分布,只是集中在某个区域的细胞中,这与以往的研究报道相一致<sup>[12-13]</sup>。这种菌丝区域性侵染是否存在一定的选择性还有待于进一步研究。

拟茎点霉 (*Phomopsis*) 及其有性型间座壳属 (*Diaporthe*) 真菌的许多种是重要的植物病原菌,又是很常见的热带地区植物内生真菌,但很少在温带地区植物中分离到<sup>[14]</sup>。本试验从茎、叶、顶芽均能分离到拟茎点霉,分离菌株占分离总株数的61.1%,是优势种群,但从整体来看无明显的组织特

异性。刺盘孢是普遍存在于植物中的植物病原菌,为引起树木炭疽病的主要致病菌,其中胶孢刺盘孢是刺盘孢属内最大的一个种,分布广泛,寄主种类繁多,可引起多种树种的炭疽病,以木本植物为主<sup>[15]</sup>,虽然是致病菌但胶孢刺盘孢也常以内生菌的形式寄生于多种植物中,如泰国野生姜(*Amomum siamense* Criab)、棕榈(*Trachycarpus fortunei*)、蒙古蒿(*Artemisia mongolica*)和红豆杉(*Taxus mairei*)等植物<sup>[16-19]</sup>。内生真菌的定殖会随着季节的变化在宿主植物生长的同时,植物内生真菌群落构成以及在植物宿主内的丰度和分布都可能发生改变,如拟茎点霉和小丛壳(*Glomerella*)均为在生长季节寄生在活体植物上的真菌物种<sup>[20]</sup>。

植物内生真菌是筛选新的生物活性物质的重要来源。Dicerandrols 在濒危薄荷类植物 *Dicerandra frutescens* 内生真菌 *Phomopsis longicolla* 中分离到的具有临床应用前景的新抗生素<sup>[21]</sup>。来自柚木 *Tectonag randis* L. 内生真菌的 *P. sp. gC1323*, 其提取物中分离到具有抗疟、抗结核和细胞毒活性的 phomoxanthenes A 和 B<sup>[22]</sup>。Silva 等从美丽决明 *Cassia spectabilis* 1 株内生真菌 *Phomopsis cassiae* 中分离获得了 5 个杜松烷倍半萜次生代谢产物,其中 3, 11, 12-t6hydroxycadMene 对球孢枝孢菌(*Cladosporium sphaerospermum*)和枝状枝孢霉(*C. cladosporioides*)抑菌活性最强<sup>[23]</sup>。周凤等从黄芪 *Astragalus membranaceus* 的内生真菌 *Aspergillus sp.* 中分离得到具有抗菌活性的代谢产物 cyclotryprostatins B<sup>[24]</sup>。Lu 等从黄花蒿 *Artemisia annua* 内生真菌 *Colletotrichum sp.* 中分离得到了一种具有抗菌活性的新的吲哚类生物碱 6-iso-prenylindole-3-carboxylic acid<sup>[25]</sup>。

内生真菌长期生活在植物体内的特殊环境中,与宿主协同进化,在演化过程中二者形成了互惠共生关系<sup>[26-27]</sup>。因此,内生真菌能产生很多种类结构复杂的次级代谢产物,这些代谢产物有些与宿主的某些代谢产物相同或相似。鹰爪花属内生真菌资源迄今尚未被研究和开发,因此今后有必要对其内生真菌的活性代谢产物作进一步研究。

#### [参考文献]

[1] 中科院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第 30 卷. 第 2 分册[M]. 北京:科学出版社,1979:122.  
[2] 吴征镒. 新华本草纲要[M]. 上海:上海科技出版社,1988:71.

[3] Jolad S D, Hoffmann J J, Schram K H, et al. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (annonaceae)[J]. J Org Chem, 1982, 47(16):351.  
[4] Li T M, Li W K, Yu J G. Flavonoids from *Artabotrys hexapetalus*[J]. Phytochemistry, 1997, 45(4):831.  
[5] 李彤梅,余竞光. 鹰爪叶化学成分研究[J]. 药学学报, 1998, 33(8):591.  
[6] Hsieh T J, Chen Y C, Kuo R Y. Two new alkaloids from *Artabotrys uncinatus* [J]. J Nat Prod, 1999, 62(8):1192.  
[7] 韩长日,朱国元,陈光英,等. 狭瓣鹰爪花的生物碱成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21):1660.  
[8] Strobel G, Yang X S, Sears J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of taxus wallachiana[J]. Microbiology, 1996, 142:435.  
[9] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. //Innis M A. PCR Protocols: A guide to methods and applications [M]. New York: Academic Press Inc, 1990:315.  
[10] Patriquin D G, Dobreiner J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in brazil[J]. Can J Microbiol, 1978, 24(6):734.  
[11] Bacon C W, Hinton D M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi // Knudsen G R, McInerney M J, Stetzenbach L D, et al. A manual of environmental microbiology[M]. Washington DC ASM Press, 2007:413.  
[12] 谭小明,郭顺星,周雅琴,等. 美登木根的显微结构及其内生真菌的分布[J]. 植物学通报, 2006, 23(4):368.  
[13] 刘基柱,严寒静,高晓霞. 紫玉盘茎叶的显微结构及内生真菌的分布[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(6):579.  
[14] Rodrigues K F, Petrini O. Biodiversity of endophytic fungi in the tropic regions // Hyde K. D, Biodiversity of tropical microfungi [M]. Hong Kong: Hong Kong University Press, 1997:57.  
[15] Schoch C L, Crous P W, Wittuhn R C, et al. Recombination in *Calonectria morganii* and phylogeny with other heterothallic small-spored *calonectria* species [J]. Mycologia, 2000, 94(4):665.  
[16] Tetrashita T. Studies on an anthracnose fungus on broad-leaves trees in Japan with special reference to the latency of the fungus [R]. Bull Govern For Exper S, 1973, 252:1.  
[17] Bussaban B, Lumyong S, Lumyong P, et al. Endophytic fungi from *Amomum siamense* [J]. Can J Microbiol, 2001, 47(10):943.

# 宁夏六盘山栽培黄芩适宜采收期研究

安瑜<sup>1\*</sup>, 王旭鹏<sup>1</sup>, 赵建军<sup>2</sup>

(1. 固原市药品检验所, 宁夏 固原 756000; 2. 宁夏师范学院, 宁夏 固原 756000)

**[摘要]** 目的: 确定宁夏六盘山栽培黄芩的适宜采收期。方法: 通过 HPLC 比较测定不同生长期采集的不同株龄的栽培黄芩中黄芩苷的含量, 同时比较醇溶性浸出物的含量。结果: 栽培黄芩中黄芩苷的含量 10 月份最高, 醇溶性浸出物的含量在 7~9 月份增长较快、在 10 月份达最高, 3 年生黄芩根重(10 月份)较 2 年生重。结论: 综合分析栽培黄芩中黄芩苷的含量、醇溶性浸出物的含量及其生物量, 栽培黄芩适宜的采收期为第 3 年的 10 月份。

**[关键词]** 宁夏六盘山栽培黄芩; 适宜采收期; 黄芩苷; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0161-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013130161

## Suitable Harvest Time of Cultivating *Scutelleria baicalensis* in Ningxia Liupan Mountain

AN Yu<sup>1\*</sup>, WANG Xu-peng<sup>2</sup>, ZHAO Jian-jun<sup>1</sup>

(1. Guyuan Institute of Drug Control, Guyuan 756000, China;  
2. Ningxia Teachers University, Guyuan 756000, China)

**[收稿日期]** 20121213(023)

**[基金项目]** 宁夏自然科学基金项目(NZ10225)

**[通讯作者]** \* 安瑜, Tel: 0954-2039052, E-mail: ay9363@126.com

- [18] Taylor J E, Hyde K D, Jones E B G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range [J]. *New Phytol*, 1999, 142(2):335.
- [19] Zou W X, Meng J C, Lu H, et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(11):1529.
- [20] Araújo W L, Marcon J, Maccheroni W Jr, et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(10):4906.
- [21] Wagenaar M M, Clardy J. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(8):1006.
- [22] Isaka M, Jaturapat A, Rukseree K, et al. Phomoxanthenes a and b, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis species* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(8):1015.
- [23] Silva G H, Teles H L, Zanardi L M, et al. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (leguminosae) [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(17):1964.
- [24] 周凤, 张弘弛, 刘瑞, 等. 恒山黄芪内生真菌 *Aspergillus* sp. 代谢产物的分离和生物活性的测定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4):125.
- [25] Lu H, Zou W X, Meng J C, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua* [J]. *Plant Science*, 2000, 151(1):67.
- [26] Tan R X, Zou W X. Endophytes: a rich source of functional metabolites [J]. *Nat Prod Rep*, 2001, 18(4):448.
- [27] Zhang H W, Song Y C, Tan R X. Biology and chemistry of endophytes [J]. *Nat Prod Rep*, 2006, 23(5):753.

[责任编辑 邹晓翠]