

三尖杉内生真菌的季节动态和组织分布研究

相延英¹, 明乾良², 李文超², 韩婷², 秦路平² (1. 解放军第161医院药剂科, 湖北武汉430010; 2. 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海200433)

[摘要] 目的 研究不同季节药用植物三尖杉(*Cephalotaxus fortunei* Hook. f.)不同组织部位内生真菌的种类组成、数量和分布规律的差异。方法 采用组织分离法分离出春、夏、秋、冬4次采样的三尖杉叶片、枝条和树皮中的内生真菌,根据形态分型后进行分子鉴定。结果 从4次采样的3个组织部位中共分离得到内生真菌1851株。根据培养特征共划分为77个形态型,分子鉴定为70个分类单元。研究表明,季节和组织对内生真菌定殖率、分离率和种类组成均有明显的影响,但是季节的影响远大于组织的影响。结论 三尖杉内生真菌具有丰富的生物多样性,结合内生真菌丰度和多样性指数综合分析,春季为获得较多种类的内生真菌的最佳取样时间。

[关键词] 三尖杉;内生真菌;季节动态;组织分布

[中图分类号] R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)04-0267-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.04.007

Seasonal dynamics and tissue distribution of endophytic fungi in *Cephalotaxus fortunei* Hook. f.

XIANG Yan-ying¹, MING Qian-liang², LI Wen-chao², HAN Ting², QIN Lu-ping² (1. Department of Pharmacy, The 161th Hospital of PLA, Wuhan 430010, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the species composition, number and distribution of endophytes in medicinal plants *Cephalotaxus fortunei* Hook. f. in different seasons and different tissues. **Methods** Endophytic fungi were isolated by tissue-culture method and identified by ITS analysis. **Results** 1851 strains of endophytic fungi were isolated from the leaves, twigs and barks of *C. fortunei* which were sampled in spring, summer, autumn and winter. These strains were divided into 77 morphotype according to the cultural characteristics and were identified as 70 taxons by ITS analysis. The results suggested that effects of season and tissue on the colonization rate, isolation rate and species composition of endophytes were apparent, and effects of season were stronger than that of tissue. **Conclusion** There are abundant and multiple endophytic fungi in *Cephalotaxus fortunei*. According to the comprehensive analysis combined with richness and biodiversity indexes, spring was the best sampling time for getting most species of endophytes.

[Key words] *Cephalotaxus fortunei* Hook. f.; endophytic fungi; seasonal dynamics; tissue distribution

植物内生真菌(endophytic fungi)是指在生活史中的某一个阶段存在于健康植物组织内部,不会引起宿主明显病症或者对宿主造成明显伤害的真菌^[1]。1993年,Strobel等^[2]首次报道了从短叶紫杉*Taxus brevifolia*的树皮中分离得到一株能够产生紫杉醇的内生真菌*Taxomyces andreanae*,引起了国内外众多研究者的极大关注,纷纷把目光投向药用植物内生真菌的研究。随着研究的深入,研究者发现内生真菌与宿主植物存在着密切的互利共生关系。研究表明内生真菌能够促进宿主植物生长^[3],增强

宿主植物对生物和非生物胁迫的抗逆性^[4],促进宿主植物有效成分的积累^[5]等。三尖杉(*Cephalotaxus fortunei* Hook. f.)是三尖杉科三尖杉属9种植物中的一种,是我国亚热带特有植物,分布于陕西、甘肃、河南、湖北、湖南、安徽、江西、浙江、四川等地。三尖杉的种子具有驱虫、消积作用,在我国一般用于治疗蛔虫病、钩虫病、食积等。三尖杉叶、枝、种子及根等部位主要含有生物碱类、黄酮类以及甾醇类物质,其中生物碱类成分主要包括三尖杉碱类和高刺酮类。现代临床试验研究表明,三尖杉碱类化合物具有抗肿瘤活性,其中三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱活性最好^[6]。目前,三尖杉内生真菌的研究已有部分文献报道,主要是寻找能够产生高三尖杉酯碱的内生真菌^[7]和研究三尖杉内生真菌的遗传多样性^[8],但未见三尖杉内生真菌季节动态和组织分布方面的研究

[作者简介] 相延英(1967-),女,硕士,副主任药师。Tel:(027)50660115, E-mail:xyy2001@126.com.

[通讯作者] 秦路平。Tel:(021)81871300, E-mail:lpqin@smmu.edu.cn.

报道。本研究分别对春、夏、秋、冬4个季节三尖杉叶片、枝条、树皮3个组织的内生真菌进行分离鉴定,探讨不同季节和不同组织三尖杉内生真菌组成的差异及其成因,为三尖杉内生真菌资源的开发利用提供理论基础。

1 材料与试剂

1.1 材料 供试植物三尖杉(*Cephalotaxus fortunei* Hook. f.)的采样时间:2009年5月1日(春季)、8月25日(夏季)、11月5日(秋季)和2010年1月20日(冬季);采样地点:浙江省建德市乾潭镇唐家村;采样方法:随机选取20株三尖杉植株进行采样,取所选取植株的叶片、枝条和树皮放入无菌纸袋中,写上标签带回实验室,在48 h内进行植物标本处理和内生真菌分离。

1.2 试剂 PDA培养基组成:马铃薯200 g(煮沸30 min后弃去土豆泥),葡萄糖20 g,琼脂20 g,水1 000 ml。CTAB提取缓冲液[0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA]、TE缓冲液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)均由本实验室配制。PCR所用材料Taq DNA polymerase、Tris-HCl (pH 8.4)、KCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、dNTP购自天根生物有限公司。引物ITS4和引物ITS5由上海生工生物有限公司合成。

2 方法

2.1 内生真菌的分离纯化 将三尖杉的叶片、枝条和树皮在自来水下冲洗2 h,除去表面的泥土和杂质后,无菌水冲洗3次。表面采用三步消毒法,即将叶片、枝条和树皮连续浸入75%乙醇1 min,2%次氯酸钠3 min,75%乙醇30 s处理后,用无菌滤纸将组织表面水分吸干。用消毒后的剪刀将叶、枝条和树皮切成 0.5 cm^2 的组织块,随机从每种组织块中挑取8个,每4个为一组放在加有青霉素的PDA平板(2%, 90 mm)上,密封后25℃培养2个月,定期观察内生真菌菌落形成情况。

根据菌落形态、颜色的差异以及长出时间的不同,分别挑取各平板上菌落边缘的菌丝接种于新的PDA平板上28℃进行分离培养。培养数日后,观察菌落的形态及其菌落边缘的整齐情况,经纯化得到单一菌落。依照生长速度、菌落颜色、质地等培养特征将菌株划分成不同的形态型,每种形态型挑选一株代表性菌株进行分子鉴定,以CM来表示。对已经纯化的菌株,编号后转至相应的PDA斜面培养基上,在28℃恒温箱中培养,待菌落生长成熟,放入4℃冰箱保存。

2.2 内生真菌的分子鉴定 将菌株在PDA平板上25℃培养3~7 d,挑取菌丝的顶端部分,转接到新的PDA培养基上进行培养。刮取菌丝采用CTAB法提取基因组DNA,然后用引物ITS4(5'-GGAAG-TAAAAGTCGTAAG G-3')和ITS5(5'-TCCTCCGCT-TATTGATATG C-3')对内生真菌的ITS和5.8S基因进行PCR扩增。PCR反应体系(50 μl)组成:Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM; KCl, 20 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM; MgSO_4 , 2 mM; dNTP, 200 μM; 引物ITS5, 15 pmols; 引物ITS4, 15 pmols; 模板DNA, 100 ng; TaqDNA聚合酶, 2.5 U。PCR反应循环参数与步骤:①初始变性, 95℃, 3 min; ②变性, 94℃, 40 s; ③退火, 52℃, 50 s; ④延伸, 72℃, 1 min; ⑤循环②~④步骤35次; ⑥延伸, 72℃, 10 min; 取4 μl PCR产物点样于 $1 \times \text{TAE}$ (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)的0.8%琼脂糖凝胶, 75 V条件下电泳40 min, 溴化乙锭EB(0.5 μg/ml)染色10 min, 然后在紫外灯下检测产物。PCR产物交上海申速生物技术有限公司进行序列测定。

以每个形态型菌株的ITS和5.8S基因作为靶序列,在GenBank数据库中用Blast程序来搜索同源序列。下载相关的序列用于系统发育分析,以确定其系统发育地位。在系统进化分析中,把碱基间的空缺作为碱基缺失处理,所有的碱基状态为无序并且不加权。5.8S基因和ITS区序列通过Clustal X1.81程序来进行序列间的匹配排序,为了实现匹配排序的最优化,在一些碱基位置进行必要的调整。这些被匹配排序后的数据,用于邻接法(neighbor-joining, NJ)的系统发育分析。用Clustal X1.81作邻接法分析,随机挑取1个序列,重复比对1 000次,保存其中遗传距离最短的系统发育树。分类单元的确定由Sequencher 4.0 (GeneCodes Corp., Ann Arbor, MI, USA)进行,ITS区相似性高于97%的序列归入同一个分类单元。

2.3 数据分析 对不同季节不同组织分离得到的三尖杉内生真菌进行定殖率、分离率、分离频率、多样性指数、皮耶诺均匀度指数、丰度、相似性系数等指标进行统计。

3 结果

3.1 内生真菌的分离鉴定 本研究从春、夏、秋、冬4个季节所采取的三尖杉叶片、枝条和树皮三个组织中共分离内生真菌1 851株。根据培养特征共划分为77个形态型,并PCR扩增ITS和5.8S基因测序。根据97%的ITS序列相似性,将其划分为70个分类单元,其中6个属于担子菌门,62

个属于子囊菌门,2 个属于接合菌纲。在 70 个分类单元中,49 个鉴定到种的水平,14 个鉴定到属

的水平,7 个鉴定到科及以上分类地位。图 1 为鉴定部分菌株的系统发育树。

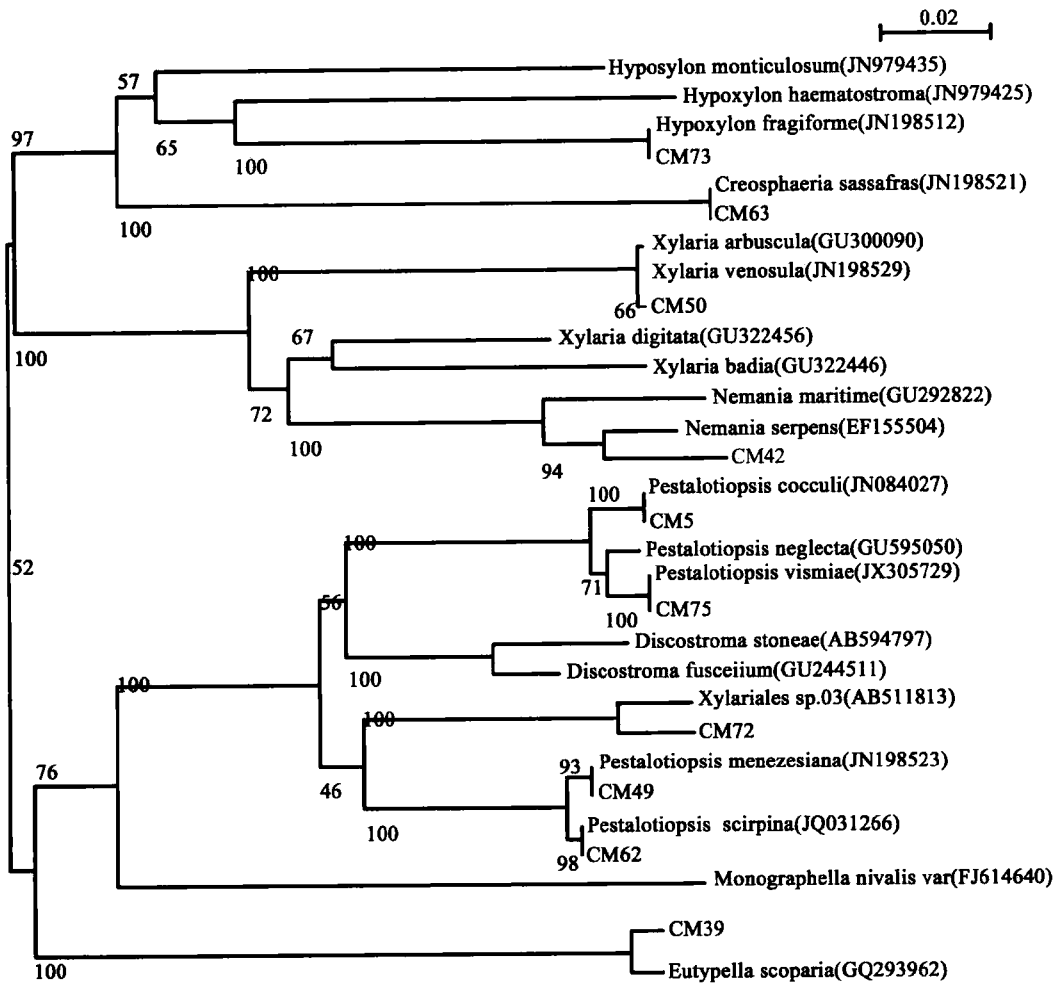


图 1 部分菌株分子鉴定的系统发育树

(根据菌株 CM5、CM39、CM42、CM49、CM50、CM72、CM73、CM75 ITS 和 5.8S 序列得到的 NJ 树。分支上的数值表示等于或大于 50% 的 Bootstrap 值,1 000 次重复。)

3.2 内生真菌的季节动态 在 70 种内生真菌分类单元中,只有 1 种内生真菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 在春、夏、秋、冬 4 个季节都被分离得到,5 种内生真菌在 3 个季节被分离到,12 种内生真菌在 2 个季节被分离到,52 种只在 1 个季节被分离到。不同季节三尖杉内生真菌的分离整体情况见表 1。从分离得到的菌株数目看,春季和冬季明显多于夏季和秋季,但是从分类单元来看 4 个季节相差不大。这些内生真菌主要属于担子菌门和子囊菌门,但春秋两季出现了接合菌纲的内生真菌。从优势菌的角度来看,春、夏、秋 3 季均有的优势菌 *Phomopsis occulta* 和 *Colletotrichum gloeosporioides*,但分离率各不相同;冬季的优势菌为与春、夏、秋 3 季均不同的 *Phomopsis fukushii*、*Pestalotiopsis scirpina* 和 *Neofusicoccum parvum*,可能是这些内生真菌更容易在低温条件下

生长。

不同季节三尖杉内生真菌平均定殖率从高到低的顺序为冬(83.9%)>春(72.2%)>秋(63.1%)>夏(51.6%);分离率从高到低的顺序为冬(1.15)>春(1.1.3)>秋(0.78)>夏(0.65);丰度从高到低的顺序为:夏(26)>春(25)>秋(23)>冬(21);多样性指数从高到低的顺序为:春(2.43)>秋(2.36)>夏(2.22)>冬(1.94);均匀度指数随季节变化差异不大,在秋季均匀度指数最高为 0.4,在冬季最低为 0.31,在春季、夏季均为 0.38。不同季节分离到的内生真菌相似性系数变化范围为 0.13~0.33。春季与秋季的相似性系数最高为 0.33,其次是春季与夏季 0.31、夏季与秋季 0.24、秋季与冬季 0.18、春季与冬季 0.15,夏季与冬季相似性系数最低为 0.13。

表1 春、夏、秋、冬4个季节三尖杉内生真菌的分离情况

	春	夏	秋	冬
菌株数目	568株	329株	375株	579株
分类单元	25个	26个	23个	21个
鉴定情况	17个鉴定到种,4个到属、 4个到科及以上水平	21个鉴定到种,3个到属、 2个到科及以上水平	18个鉴定到种,4个到属、 1个到科及以上水平	15个鉴定到种,5个到属、 1个到科及以上水平
归属情况	1个属于接合菌纲,2个属于 担子菌门,22个属于子囊菌门	3个属于担子菌门,23个属于 子囊菌门	1个属于接合菌纲,1个属于 担子菌门,21个属于子囊菌门	2个属于担子菌门,19个属于 子囊菌门
优势菌	<i>Phomopsis occulta</i> (25.7%)、 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (15.8%)、 <i>Botryosphaeria</i> <i>dothidea</i> (12.7%)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (33.7%)、 <i>Phomopsis occulta</i> (17%)、 <i>Botryosphaeria do-</i> <i>thidea</i> (13.7%)	<i>Phomopsis occulta</i> (34.9%)、 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (15.5%)	<i>Phomopsis fukushii</i> (28.7%)、 <i>Pestalotiopsis scirpina</i> (23.3%)、 <i>Neofusicoccum parvum</i> (22.1%)

注:括号中数字为该菌株的分离率

3.3 内生真菌的组织分布 不同季节枝条、叶片和树皮内生真菌的分离情况见表2。总体来看,3个组织内生真菌的定殖率最高为枝条(78.8%),其次为叶片(70.8%),树皮最低(53.7%);分离率呈现一样的趋势,分别为枝条(1.13),其次为叶片(1),树

皮最低(0.65);丰度指数从高到低为叶片(14) > 树皮(13) > 枝条(11);多样性指数从高到低为树皮(2.06) > 叶片(1.94) > 枝条(1.75);树皮中均匀度指数最高为0.47,其次为叶片0.38,枝条中均匀度指数最低为0.34。

表2 不同季节枝条、叶片和树皮内生真菌的分离情况

	叶片	枝条	树皮
春 菌株数目	190株	222株	156株
分类单元	15个	10个	15个
优势菌	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (29.5%)、 <i>Guignardia mangiferae</i> (23.7%)	<i>Phomopsis occulta</i> (32%)	<i>Phomopsis occulta</i> (37.8%)
共有菌	<i>Botryosphaeria dothidea</i> 、 <i>Phomopsis lagerstroemiae</i> 、 <i>Phomopsis occulta</i> 、 <i>Pestalotiopsis cocculi</i>		
夏 菌株数目	139株	151株	39株
分类单元	8个	13个	13个
优势菌	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (46.8%)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (27.8%)、 <i>Phomopsis occulta</i> (22.5%)、 <i>Botryospha-</i> <i>eria dothidea</i> (21.1%)	<i>Phomopsis occulta</i> (20.5%)
共有菌	<i>Botryosphaeria dothidea</i> 、 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 、 <i>Diaporthe phaseolorum</i> 、 <i>Glomerella sp. 1</i> 、 <i>Phomopsis fukushii</i> 、 <i>Phomopsis occulta</i>		
秋 菌株数目	139株	151株	39株
分类单元	12个	11个	9个
优势菌	<i>Phomopsis occulta</i> (41.5%)	<i>Phomopsis occulta</i> (32.7%)、 <i>Colletotri-</i> <i>chum gloeosporioides</i> (26.7%)	<i>Phomopsis occulta</i> (27.7%)
共有菌	<i>Phomopsis occulta</i> 、 <i>Paraconiothyrium sp.</i>		
冬 菌株数目	193株	230株	156株
分类单元	11个	8个	14个
优势菌	<i>Pestalotiopsis scirpina</i> (34.7%)、 <i>Neofusicoc-</i> <i>cum parvum</i> (22.3%)	<i>Phomopsis fukushii</i> (33.9%)、 <i>Neofusicoc-</i> <i>cum parvum</i> (33%)、 <i>Pestalotiopsis scirpina</i> (28.3%)	<i>Phomopsis fukushii</i> (36.5%)、 <i>Phomopsis</i> <i>sp. 1</i> (34%)
共有菌	<i>Neofusicoccum parvum</i> 、 <i>Pestalotiopsis scirpina</i> 、 <i>Pestalotiopsis vismiae</i> 、 <i>Phomopsis fukushii</i> 、 <i>Phomopsis sp. 1</i>		

注:括号中数字为该菌株的分离率

不同组织之间的相似性系数高于不同季节之间的相似性系数。不同季节取样时,各部位之间的相似性系数平均值从高到低的顺序为:夏(0.55) > 冬(0.52) > 春(0.48) > 秋(0.34)。在春季取样时,各部位之间的相似性系数基本相同,叶片与枝条、枝条与树皮之间的相似性系数均为0.48,叶片与树皮之

间的相似性系数为0.47。在夏季取样时,叶片与枝条、叶片与树皮间的相似性系数为0.52,枝条与树皮间的相似性系数为0.62。在秋季取样时,叶片与枝条的相似性系数最高为0.52,其次为叶片与树皮0.29,枝条与树皮的相似性系数最低为0.2。在冬

(下转第289页)

致脂质体破乳,使其包封率降低。所以本工艺采取葡聚糖凝胶柱过滤法,此法简单易行,重现度较好。该方法是利用分子筛原理,粒径大的脂质体先从柱中流出,粒径小的游离药物后流出。应用这种方法能将脂质体与游离药物较好分开。

3.4 分离效果 黄洁等^[6]采用 G-100 凝胶色谱法分离苦参碱与苦参碱隐形脂质体时上样量为 0.5 ml。笔者在预实验中,以 0.2 ml 上样量即能够达到很好的分离效果,共收集了 40 瓶洗脱液,每瓶 1 ml。在第 34 瓶洗脱液里已经检测不到苦参碱。所以在试验中,只收集了 35 瓶洗脱液。

3.5 影响苦参碱脂质体的三个主要因素 仵文英等^[7]曾提出影响苦参碱脂质体制备的因素有药脂比,硫酸铵溶液浓度等。笔者通过 9 组试验优选了影响脂质体制备的三个主要因素,即卵磷脂和胆固醇的比值,药脂比和超声时间。正交试验得出的最佳处方组成为 HSPC:Ch,质量比为 3:1,超声时间为 10 min,药脂比为 1:15。

【参考文献】

- [1] 刘梅,刘雪英,程建峰.苦参碱的药理研究进展[J].中国中药杂志,2003,28(9):801.
- [2] Amarnath S, Uma SS. Liposomes in drug delivery: progress and limitation[J]. Int J Pharm, 1997(154):123.
- [3] 陈浩,戴俊东,王玉蓉,等.薄膜超声法制备槲皮素脂质体研究[J].药学实践杂志,2012,30(1):32.
- [4] 陆彬.药物新剂型与新技术[M].北京:人民卫生出版社,1998:120.
- [5] 王绍宁,邓意辉,严志,等.硫酸铵梯度法制备盐酸环丙沙星脂质体的影响因素[J].沈阳药科大学学报,2003,20(2):94.
- [6] 黄洁,仵文英,席枝侠,等.苦参碱脂质体的制备与包封率测定[J].医药导报,2008,27(1):87.
- [7] 仵文英,黄洁,刘硕,等.苦参碱隐形脂质体的制备及影响因素考察[J].中国医院药学杂志,2008,28(21):1816.

[收稿日期]2012-09-05

[修回日期]2012-11-28

(上接第 270 页)

季取样时,叶片与枝条的相似性系数最高 0.63,叶片与树皮的相似性系数为 0.48,枝条与树皮的相似性系数最低为 0.45。

4 讨论

本研究对不同季节三尖杉不同组织的内生真菌进行了分离鉴定,并对内生真菌的定殖率、分离率、分离频率、多样性指数、皮耶诺均匀度指数、丰度、相似性系数等指标进行统计分析。研究发现不同季节三尖杉内生真菌的组成和多样性明显不同;三尖杉不同组织部位内生真菌的组成和多样性也存在差异。但是不同季节三尖杉不同组织的内生真菌均具有较高的定殖率、分离率和丰度,说明三尖杉内生真菌具有较为丰富的生物多样性。

研究还发现季节对内生真菌的种类组成有明显的影响,70 种内生真菌分类单元中只有 1 种分布于 4 个季节;同时季节对定殖率和分离率也有明显的影响。植物组织部位对定殖率、分离率有一定的影响,定殖率、分离率最高的是枝条,最低的是树皮。但是植物组织部位对内生真菌的种类组成的影响小于季节,说明宿主植物所处环境的温度是影响内生真菌的菌群结构和生物多样性的一个重要的因素。结合内生真菌丰度和多样性指数综合分析,在春季三尖杉内生真菌具有较高的丰度和多样性。因此,

春季是获得较多种类的内生真菌的最佳取样时间。

【参考文献】

- [1] Petrini O, Fisher P. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*[J]. Mycological Res,1990,94(8):1077.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science,1993,260:214.
- [3] Contreras-Cornejo, HA, Macias-Rodriguez L, Cortes-Penagos C, et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*[J]. Plant-Physiol, 2009,149(3):1579.
- [4] Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2005,102(38):13386.
- [5] 万德光.中药品质研究:理论、方法与实践[M].上海:上海科学技术出版社,2008:35.
- [6] 张艳艳,韩婷,吴令上,等.三尖杉碱类化合物的来源、药理作用及临床应用研究进展[J].现代药物与临床,2011,26(5):370.
- [7] 叶静,冉雪琴,孙端方,等.三尖杉内生真菌的遗传多样性研究[J].山地农业生物学报,2009,28(2):130.
- [8] 韩洁,赵杰宏.一株产高三尖杉酯碱内生真菌 *gyzy-6* 的分离与鉴定[J].广东农业科学 2011,5:112.

[收稿日期]2013-01-16

[修回日期]2013-04-05