

丽江塔城地区云南红豆杉内生真菌的多样性研究

郑法新¹,程璐¹,李侠¹,邵士成²,刘群¹

(1. 日照职业技术学院,山东日照 276826; 2. 中国科学院昆明植物研究所,云南昆明 650204)

摘要 为了探悉云南红豆杉内生真菌的多样性,研究了云南丽江维西地区云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu) 内生真菌的种类组成及数量。从云南红豆杉根、茎、叶中分离获得 115 种内生真菌,经过形态学和 ITS 分析结果表明,这 115 种内生真菌分属于 21 属,其中分布最广的类群是芽枝霉属 (19 种),其次是黑孢属 (17 种) 和拟茎点霉属 (14 种),说明云南红豆杉不同部位内生真菌的数量、分布、种群及其组成存在差异,具有丰富的物种多样性。经初步检测,其中有 4 个菌种能够产生紫杉醇。

关键词 云南红豆杉;紫杉醇;内生真菌;分类

中图分类号 S791.49 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)19-08885-03

Diversity of Endophytic Fungi from *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu of Tacheng Township in Lijiang City

ZHENG Fa-xin et al (Rizhao Polytechnic College, Rizhao, Shandong 276826)

Abstract In order to explore the endophytic fungi diversity in *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu, the composition and quantity of endophytic fungi was studied. 115 endophytes were isolated and obtained from yew tree, *Taxus yunnanensis*. According to the morphological characterization and ITS gene sequences, these 115 species belonged to 21 genera. Among these, *Cladosporium* sp. was the most prevalent genus, followed by *Nigrospora* sp. and *Phanopsis*. The results showed that the quantity, distribution, population and its components of endophytic fungi in different parts of *Taxus yunnanensis* existed differences. Among these endophytes, 4 species can produce taxol by the initial detection.

Key words *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu; Taxol; Endophytic fungi; Classification

红豆杉 (*Taxus*) 又名紫杉、赤柏松,属红豆杉科红豆杉属,是世界上濒临灭绝的天然珍稀抗癌植物。它的抗癌作用主要体现在紫杉类化合物,特别是紫杉醇上。自 1992 年美国食品和药物管理局 (FDA) 批准紫杉醇作为抗癌新药上市以来,研究紫杉醇热已经持续了 10 多年,科研人员试图寻找一种合理的途径来生产紫杉醇,从而解决红豆杉资源缺乏的问题。除了从化学合成的角度外^[1],主要是从生物工程角度来寻找生产紫杉醇的新途径,如高产紫杉细胞株的建立或微生物发酵^[2-9],而微生物发酵方法是不再依赖红豆杉而极具工业化生产潜力的方法。特别是自 1993 年 Strobel 等首次从太平洋短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 树皮中分离到 1 株能产生紫杉醇的内生真菌 (*Taxomyces andreae*)^[8] 以后,在云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis*)^[10]、西藏红豆杉 (*Taxus wallachiana*)^[3-11]、中国红豆杉 (*Taxus chinensis*)^[12]、南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var *mairei*)^[11]、云南红豆杉 (*Taxus cuspidata*)^[13-15] 等红豆杉属植物以及非红豆杉属植物榛 (*Corylus heterophylla*)^[16] 等中已分离到产紫杉醇或其类似物的内生真菌。因此,对产紫杉醇的红豆杉内生真菌从分子水平上进行基因工程改造,以获得高产紫杉醇的红豆杉内生菌株,从而实现紫杉醇工业的可持续发展,这正是人们所期待的。

云南红豆杉主要分布于我国滇西的保山市、腾冲县、滇西北的香格里拉、丽江、维西一带,是第四纪冰川遗留下的古老树种。云南红豆杉中含有紫杉醇,但含量很低,一般仅为干重的 0.005 8% ~ 0.022 0%^[17]。笔者对红豆杉内生真菌的分离鉴定,对产紫杉醇的真菌进行了筛选与内生真菌多样性的研究,探讨从菌物学的角度寻找产紫杉醇工程菌株的解决方案。

1 材料与方法

1.1 试验材料和仪器 试验材料:于 2008 年 9 月选择云南省维西塔城乡天然生长的健康红豆杉没有腐烂发霉及病斑、病害的健康新鲜植物树皮、根、茎、叶备用。紫杉醇标准品购自 Sigma 公司。马铃薯蔗糖琼脂培养基 (PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 ml,自然 pH 值。使用时在每 100 ml PDA 培养基中加 8 000 单位青霉素以抑制细菌生长。促孢培养基:KH₂PO₄ 1 g, KNO₃ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, 淀粉 0.2 g, 葡萄糖 0.2 g, 蔗糖 0.2 g, 琼脂 15 g, 水 1 000 ml, 自然 pH 值。水琼脂培养基:琼脂 20 g, 水 1 000 ml, 自然 pH 值。

试验仪器:高效硅胶薄层板 (Gel 60, Merck, 德国), C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, Waters, 德国), 高效液相色谱仪 (安捷伦, 美国), PCR 扩增仪 (ABI, 美国)。

1.2 内生真菌的分离 先用自来水将所采集的红豆杉植物组织表面冲洗干净,晾干水分后分别切取根、茎、叶,采用下述方法进行表面消毒:0.1% 升汞漂洗 (10 ~ 30 s) → 无菌水冲洗数次 → 75% 酒精漂洗 (30 ~ 60 s) → 无菌水冲洗数次。在无菌操作条件下取根、茎和叶,切成 0.2 cm × 0.2 cm 长段 (片),种植于加青霉素的 PDA 培养基中,在 (28 ± 1) 条件下置于温箱静置培养 3 ~ 7 d。同时将上述经表面灭菌的材料不做任何处理直接种植于加青霉素的 PDA 培养基中,在 (28 ± 1) 条件下置于温箱培养,检查表面消毒是否彻底。将种植样品的 PDA 平板置于 (28 ± 1) 温箱培养 3 ~ 15 d,待各植物组织切面长出菌丝后挑取边缘部分移至新的 PDA 培养基上,经反复纯化后保存于 PDA 斜面上即得植物内生真菌。

1.3 菌种鉴定 采用 PDA 培养基和促孢培养基进行插片培养,对分离所得真菌进行菌落特征和显微形态特征观察,参照文献 [18-19] 将其分类鉴定,并结合 ITS4/ITS5 的 DNA 序列分析方法对分离菌种进行鉴定^[8],结合其产孢结构、分生孢子梗着生情况、孢子形态与颜色等,鉴定到属^[20]。采用

基金项目 山东省中青年科学家科研奖励基金 (2007BS02010)。
作者简介 郑法新 (1975 -),男,山东即墨人,博士,讲师,从事微生物生物技术研究工作。
收稿日期 2009-05-04

PCR仪扩增 ITS基因,循环参数为 95 ℃,30 s→42 ℃,60 s→72 ℃,60 s,28个循环,反应液总体积为 20 μl(含 10 ×Buffer 2 μl,引物各 10 pmol,4 ×dNTP各 0.2 mmol/L,Taq DNA聚合酶 2 U,基因组 DNA 100 ng),扩增产物在 1.0%琼脂糖上电泳。纯化扩增产物送到测序公司测序。

1.4 未产孢菌株的促产孢培养 对不产孢子的菌株用促孢培养基诱发孢子产生,仍不产孢的再转入水琼脂培养基(28±1)℃培养 1~5周。如还不能产孢,再在以下 2种条件下培养:光照和黑暗 12~12 h循环条件下于(28±1)℃温箱培养或密闭不透光(如密封塑料袋等)室温培养 1~5周。

1.5 计算方法 物种丰富度(Richness)即某种源地印楝植物某一组织所分离到的内生真菌种类。

菌株优势度(Dominance): $D = N_i / (S - 1) \times 100$ 其中, N_i 表示第*i*个种类的菌株数量, S 表示所分离到菌株的总数。

1.6 紫杉醇测定 取定量的细胞发酵液 100 ml,以 5 000 r/min离心 15 min,分离上清液和沉淀物。上清液中加入等体积的乙酸丁酯,振荡,静置分层,收集有机相。重复 2次上述萃取步骤,将 3次萃取所得的乙酸丁酯合并,减压蒸干,加入 0.5 ml甲醇溶解,经 0.2 μm滤膜过滤,供 HPLC分析。HPLC

采用反相 C_{18} 柱;流动相为甲醇-水(65:35),流速 0.8 ml/min;紫外检测波长 227 nm。紫杉醇标样溶于甲醇(色谱纯)中。

2 结果与分析

2.1 红豆杉不同组织内生真菌种类及数量 从云南红豆杉植株上共分离得到内生真菌 115种,经鉴定全部属于半知菌亚门的 22个属即附球菌属(2种)、芽枝霉属(19种)、花核菌属(1种)、暗梗单孢霉属(1种)、茎叶核菌属(7种)、镰孢霉属(7种)、短梗梭孢霉属(5种)、叶点霉属(1种)、拟茎点霉属(14种)、筒梗孢霉属(2种)、束丝菌属(4种)、青霉属(8种)、黑孢属(17种)、刺盘孢菌属(3种)、交链孢属(5种)、地霉属(1种)、曲霉属(2种)、组丝核菌属(2种)、拟盘多毛孢属(12种)、单孢白粉菌属(1种)、小茎点霉属(1种)。其中优势属为芽枝霉属,其次是黑孢属和拟茎点霉属。其中,根部的优势属为茎叶核菌属,占 18.5%,茎部的优势属为黑孢属和芽枝霉属,韧皮部的优势属为茎叶核菌属,叶的优势属为拟盘多毛孢属。对 115个菌种进行紫杉醇测定,有 4个菌种含紫杉醇。

由表 1可以看出,优势度的差异在红豆杉各组织中内生真菌类群中还是比较明显的,如芽枝霉属的优势度为 16.66%,其次是黑孢属,再次是拟茎点霉属,第四为拟盘多

表 1 红豆杉不同组织中分离到的内生真菌菌株的数量

Table 1 Strain numbers of endophytic fungi isolated from different tissues of Taxus yunnanensis

属 Genus	菌种的分离部位 Isolation parts of strains				优势度 % Dominance	紫杉醇测定结果 Determination results of taxol
	根 Root	茎 Stem	韧皮部 Phloem	叶 Leaf		
附球菌属 <i>Epicoccum</i> sp.	2	-	-	-	1.75	-
芽枝霉属 <i>Cladosporium</i> sp.	3	8	4	4	16.66	-
花核菌属 <i>Anthina</i> sp.	-	1	-	-	0.88	-
暗梗单孢霉属 <i>Dematium</i> Pers	-	1	-	-	0.88	-
茎叶核菌属 <i>Ectostraca</i> Fr	5	-	2	-	6.14	+
镰孢霉属 <i>Fusarium</i> sp.	3	0	3	1	6.14	+
短梗梭孢霉属 <i>Fusoma</i>	-	3	2	-	4.38	-
叶点霉属 <i>Phyllosticta</i>	-	1	-	-	0.88	-
拟茎点霉属 <i>Phanopsis</i>	1	3	10	-	12.28	-
筒梗孢霉属 <i>Chromosporium</i> Corda	2	-	-	-	1.75	-
束丝菌属 <i>Ozonium</i>	3	1	-	-	3.51	-
青霉属 <i>Penicillium</i>	1	3	2	2	7.01	+
黑孢属 <i>Nigrospora</i> sp.	2	11	1	3	14.91	-
刺盘孢属 <i>Colletotrichum</i>	-	2	1	-	2.63	-
交链孢属 <i>Altemaria</i>	1	3	1	-	4.38	-
地霉属 <i>Geotrichum</i>	1	-	-	-	0.87	-
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	2	-	-	-	1.75	-
组丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	-	2	-	-	1.75	-
拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	0	2	2	8	10.52	-
白粉菌属 <i>Erysiphe</i>	1	0	0	0	0.87	-
茎点霉属 <i>Phoma</i>	-	1	-	-	0.87	+
菌株总数 Total isolates	27	42	28	18		

注:“+”表示有紫杉醇吸收峰;“-”表示无紫杉醇吸收峰。

Note: + stands for determinated absorption peak of taxol; - stands for undetermined absorption peak of taxol

毛孢属,其余种类红豆杉内生真菌优势度差异不是很大。

2.2 红豆杉不同组织内生真菌种类分布及优势度 通过对红豆杉不同部位的内生真菌进行分离,发现分离植物组织和部位不同,分离获得的内生真菌种类就不同,而且分离频率不同。由图 1可知,内生真菌在云南红豆杉的根、茎、韧皮部和叶中均有分布,但类群组成和分布数量差异较大:从茎部

分离到的菌株数量均明显高于从根、韧皮部及叶中分离到的菌株,从茎中分离的真菌数量占总数的 36.5%,而从根、韧皮部与叶中分离的真菌数量占总数分别为 23.4%、24.3%、15.6%。

无孢类群如茎叶核菌属、束丝菌属、组丝核菌属在红豆杉内生真菌中占的比例高低不同,分别为 6.0%、3.4%、1.7%。

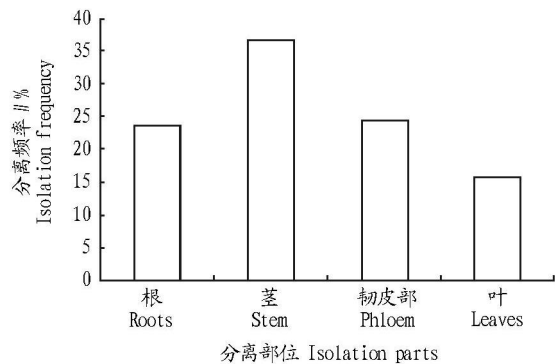


图 1 红豆杉内生真菌在不同部位的分布

Fig 1 Distribution of endophytic fungi in different parts of *Taxus yunnanensis*

3 结论与讨论

通过云南红豆杉不同组织内生真菌的分离和分类鉴定,显示红豆杉内生真菌的数量和类群组成极为丰富。研究表明,一些属的真菌,如芽枝霉属、黑孢属、拟茎点霉属在云南红豆杉体内形成一种相对稳定的真菌菌群,这些真菌为云南红豆杉的优势种属。丝状真菌的鉴定是这一研究领域的难题。笔者采用 ITS4/ITS5 的 DNA 序列分析方法,根据生物核糖体基因转录间隔区的 DNA 序列在种内不同个体之间具有高度保守性而种间差异较大等原理,选择大小适宜的 DNA 序列片段来鉴定丝状真菌,具有方便、快捷、切实可行的特点。另外,在植物体内微生态环境中,在红豆杉不同部位内生真菌的数量也不尽相同。这些真菌存在于云南红豆杉体内,能与植物相互协调生活,并建立一种平衡,形成共生关系:一是植物为内生真菌提供光合产物和矿物质;二是内生真菌的代谢物能刺激植物的生长发育。事实证明,内生真菌能够参与植物活性成分的合成,或者对植物次生代谢产物进行转化^[21]。

自 1993 年 Stobel 等首次从太平洋短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 树皮中分离到能产生紫杉醇的内生真菌至今,有许多关于产紫杉醇真菌的研究反映了产紫杉醇内生真菌的多样性。该研究所得紫杉醇,虽然经 HPLC 检测,但仍然需要从科学的角度进一步证明。另外,所获得的内生真菌产紫杉醇的遗传性状是否稳定,进而紫杉醇的产量是否稳定,有待进一步研究,从目前关于产紫杉醇红豆杉内生真菌来看,内生真菌紫杉醇的产量与工业化生产还有相当大的一段距离。如果能从产紫杉醇的红豆杉内共生菌中找到与紫杉醇

合成相关基因,从分子水平上研究清楚内生真菌产紫杉醇的机理并利用现代生物技术构建基因工程菌株将是规模工业化生产紫杉醇的一条切实可行的途径。

参考文献

[1] 甘烦远,沈月毛,郝小江. 紫杉醇生物合成的研究进展 [J]. 生物工程, 2000, 20 (1): 52 - 56

[2] L I C T, WANG Q J, FANG Z M, et al Isolation of paclitaxel producing microorganism, *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. [J]. Ksm News Letter, 2001, 13 (2): 32

[3] STROBEL G, YANG X S, SEARS J. Taxol from pestabiotopsis microspora, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. Microbiology, 1996, 142: 435 - 440

[4] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxol production by *Taxomyces andreae*, an endophytic fungus of pacific yew [J]. Science, 1993, 260: 214 - 216

[5] WANG J F, L I G, LU H, et al Taxol from *Tubercularis* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 193: 249 - 253

[6] 周东坡, 平文祥. 微生物发酵法生产抗癌药物紫杉醇 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2003: 1 - 234

[7] 王伟, 贺雄雷, 钟英长. 南方红豆杉内生真菌及紫杉烷类产物的初步鉴定 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38 (3): 116 - 118

[8] K M W K, MAUTHE W, HAUANER G, et al Isolation of high molecular weight DNA and double-standanded RNAs from fungi [J]. Can J Bot, 1990, 68: 1898 - 1902

[9] STROBEL G A, STIERLE A, STIELE D. *Taxomyces andreae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific Yew (*Taxus brevifolia*) [J]. Mycotaxon, 1993, 47: 71 - 80

[10] CHEN Y J, ZHANG S, WANG Y, et al Screening endophytic fungusto produce taxol from *Taxus yunnanensis* [J]. Biotechnology 2003, 13 (2): 10 - 11

[11] STMBEL G A, HESSW M, FORD E, et al Taxol from fungal endophytes and issue of biodiversity [J]. J Ind Microb, 1996, 17: 417 - 423

[12] MA T Y, DONG Z L. The study of isolating endophytic endophytic fungus synthesizing taxol from plant [J]. Jourmd of Northwest University, Nat Sci, 1999, 29 (1): 47 - 49

[13] ZHOU D P, PNGW X, SUN J Q, et al Isolation of taxol producing fungi [J]. J Microbio, 2001, 21 (1): 18 - 20

[14] ZHOU D P, SUN J Q, YU H Y, et al *Nodulisporium*, a genus to new to china [J]. Mycosystema, 2001, 20: 148 - 149

[15] XIANG Y, CUI J X, LV A G Isolation and screen of *Taxus cuspidata* Sieb et Zucc [J]. J Northeast Forestry, 2002, 30 (2): 30 - 34

[16] JANET R. Nutty and fungible taxol sources (hazelnut trees are new source of paclitaxe1) [J]. Science News, 2000, 157: 251

[17] CHOIM S, KWAK S S, LU J R, et al Taxol and related compounds in Korean native yews (*Taxus cuspidata*) [J]. Planta Med, 1995, 61 (3): 264 - 266

[18] BARNETT H L, HUNTER B B. Illustrated genera of imperfect fungi [M]. New York: American Phytopathological Society Press, 1977.

[19] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979

[20] KRK P M, CANNON P F, et al Ainsworth & biaby's dictionary of the fungi [M]. 9th ed Cambrige: CAB International, 2001.

[21] 李能章, 彭远义. 植物内生菌研究进展 [J]. 生物技术, 2004, 14 (2): 69 - 71

(上接第 8882 页)

参考文献

[1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.

[2] IGUNJATOV D J, SAPATS S Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus [J]. Arch Viro, 2005, 150 (9): 1813 - 1831

[3] 刘祥, 刘金华, 樊玉磊, 等. 鸡传染性支气管炎病毒分子生物学研究进展 [J]. 动物医学进展, 2004, 25 (5): 1 - 4

[4] 马德基, 刘胜旺, 李广兴. 鸡传染性支气管炎病毒 HN 株 5a 5b 及 N 基因的遗传变异分析 [J]. 中国兽医科技, 2005, 35 (5): 357 - 362

[5] 赵光伟, 杨晓伟, 黄伟. 鸡肾型传染性支气管炎病毒 QG 株的分离与鉴定 [J]. 兽医科技, 2007 (6): 8 - 10

[6] 尹燕博, 孙淑芳, 邹勇. RT-PCR 一步法检测鸡传染性支气管炎病毒的研究 [J]. 中国动物检疫, 1999, 16 (1): 3 - 6

[7] 王长远, 周启扉, 薛军. 鸡传染性支气管炎病毒 N 基因的克隆及序列分析 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008, 20 (3): 43 - 45

[8] 亓丽红, 艾武, 黄兵. 鸡传染性支气管炎病毒 S1 和 N 基因遗传变异的相关性 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28 (7): 762 - 765, 770

[9] 高文明, 崔保安, 李新生. 鸡传染性支气管炎病毒 HN99 株的分离与鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36 (4): 47 - 52