

千层塔内生真菌分离鉴定的初步研究

石 玮, 罗建平*, 丁振华, 吴 洁

(合肥工业大学生物技术与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘 要:目的 从治疗老年痴呆药用植物千层塔中分离内生真菌, 并进行初步鉴定。方法 用 PDA 平板培养基分离菌株, 对照真菌鉴定手册, 根据菌株的菌落形态、大小、颜色、生长速率、质地、生长培养基颜色变化以及菌丝体和孢子的形态特征进行鉴定。结果 从千层塔的茎中分离出 4 株内生真菌, 分别属于顶孢霉属、单轴霉属、酵母和青霉属。结论 首次从千层塔中分离和鉴定出 4 株内生真菌。

关键词:千层塔; 内生真菌; 分离; 鉴定

中图分类号:R282.7

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)02-0281-03

Isolation and identification of endophytic fungi of *Huperzia serrata*

SHI Wei, LUO Jian-ping, DING Zhen-hua, WU Jie

(Department of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Key words: *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.; endophytic fungi; isolation; identification

千层塔 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. 又名蛇足石杉, 属蕨类石杉科石杉属植物。其活性成分石杉碱甲具有很强的抑制胆碱酯酶活性、提高学习记忆力和改善老年人记忆功能的效果, 对治疗重症肌无力和早发性痴呆有显著疗效^[1]。临床上石杉碱甲(商品名哈伯因)已用于治疗各种原因和不同年龄组的老年人记忆减退和早期老年痴呆症^[2]。由于石杉碱甲在全草中含量甚微, 结构复杂, 人工合成十分困难。千层塔资源稀少, 尚未能人工栽培, 目前药品生产完全依赖野生资源, 价格昂贵, 长期采挖势必破坏千层塔天然资源的保存与可持续开发。因此, 研究千层塔中石杉碱甲资源的新来源显得尤为重要。笔者在企图建立千层塔组织培养系用植物细胞工程方法生产石杉碱甲的试验中发现, 尽管采用了各种灭菌方法, 植株总是带菌。这提示千层塔健康植株中生活着内生真菌。基于某些内生真菌能产生和其共生植物相同或相似生理活性物质的特点^[3], 对药用植物内生真菌的研究十分活跃, 已先后从红豆杉属、长春花、桃儿七、德国鸢尾等珍贵植物中分离出能够产生活性成分的内生真菌^[4~7]。本实验首次对千层塔植株茎、孢子囊内生真菌进行了分离、纯化与初步鉴定, 为下一步研究千层塔内生真菌能否合成石杉碱甲提供材料。

1 材料与方 法

1.1 材料: 千层塔 *H. serrata* (Thunb.) Trev. 全草采自安徽青阳。植株茎高 10~24 cm, 多年生丛生, 单一或数回二叉分支, 匍匐或直立, 茎生叶长 1~2 cm、宽 2~4 cm, 孢子腋生, 不定根生于匍匐茎。

1.2 培养基: 培养基为植物组织培养基 (MS)、马铃薯葡萄糖培养基 (PDA)、孟加拉红培养基。

1.3 内生真菌的分离与纯化: 按常规无菌操作, 将新鲜千层塔用自来水冲洗干净, 75% 乙醇漂洗 2~3 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 于 0.1% 升汞溶液中浸泡 15 min 后无菌水冲洗 4~5 次, 再将茎段、叶片、不定根和孢子分别种植于 MS 培养基上, 置 28 ℃ 恒温箱培养 1 周后再重复升汞灭菌一次, 切割后接种于 PDA 中培养。观察样品边缘部分是否有菌丝长出, 用接种针挑取不同部位的边缘菌丝, 分别接种于 PDA 培养基平板上, 30 ℃ 恒温培养, 长出新的菌落后, 再挑取其尖端菌丝转到 PDA 培养基平板上重复纯化 4 次以上, 然后接到试管或茄子瓶斜面上保存, 供鉴定用。将上述表面灭菌处理的材料不作切割置于同样条件下培养, 检查表面消毒是否彻底, 辨别真菌是否为内生的。

1.4 菌种鉴定: 真菌鉴定按常规方法进行。挑取纯化的菌株尖端菌丝分别接种于 PDA、MS、孟加拉红

收稿日期: 2004-04-06

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (00041508); 合肥工业大学校科学研究发展基金资助项目

作者简介: 石 玮 (1977—), 女, 安徽人, 讲师, 硕士, 2001 年获华中农业大学生物化学与分子生物学专业硕士学位, 现于合肥工业大学生物与食品工程学院任教, 发表论文 6 篇, 研究方向为药用植物生物技术。E-mail: greatwall0564@21cn.com

* 通讯作者 Tel: (0551) 2900089 E-mail: jianpingluo@sohu.com

培养基上。按如下各种方法培养一段时间后观察菌落、菌丝体和孢子的形态特征并进行鉴定。

(1)点植培养法(观察菌落及常规镜检):用接种针从斜面上蘸取少量孢子,点植于平板上适当的位置,使成三角形的3点,倒置放于恒温箱中30℃下培养4、7、10 d,观察菌落特征。接种针从菌落边缘处挑取少量菌丝,用乳酸石炭酸棉蓝染色液染色,进行常规镜检。

(2)载片培养观察法(观察孢子及菌丝体形态):将培养基琼脂薄置于载玻片上,接种后盖上盖玻片培养,真菌即在载玻片与盖玻片之间有限的空间内沿盖玻片横向生长。培养一段时间后,将载玻片置于显微镜下观察。

(3)切片法(观察基内、气生菌丝):将真菌接种到平板上,扞上灭菌盖玻片后培养,使真菌菌丝沿着培养基表面与盖玻片的交接处生长而附着在盖玻片上。观察时轻轻取出盖玻片,置于载玻片上直接观察。

2 结果与讨论

2.1 千层塔内生真菌培养与纯化:千层塔不同外植体经第1次灭菌后接种于MS培养基中,1周内基本没有细菌污染,符合常规的材料表面消毒,但随着时间延长,部分外植体逐渐出现真菌污染。为了排除非内生真菌,取培养2周未出现真菌污染的材料进行第2次灭菌,并切割成0.5~1.0 cm长度培养,3~4周后在切口处出现菌丝,随后快速生长。根据2次灭菌未切割外植体表面无任何菌长出,仅是第1次灭菌前的老切口偶尔有菌丝长出,证明第2次灭菌后新切口处长出的菌丝是内生真菌。千层塔内生真菌主要存在于茎部,其他部位很少,孢子未获得真菌。温度和光照对内生真菌的诱导和生长速度有较大影响,光照下长出菌丝的外植体数少,并且菌丝生长缓慢,这可能反映了千层塔生长对荫蔽生境的要求。通过反复分离和纯化,现已获得4株纯化菌株。从菌落形态和生长上看,千层塔内生真菌种类相当丰富,显示了该植物内生真菌的多样性。通过进一步改变培养条件和加强分离手段,将会分离出更多的纯化菌株。

2.2 内生真菌的特征与鉴定:内生真菌Ⅰ在孟加拉红培养基上生长较PDA上快,但在MS培养基上菌株生长非常缓慢,形成的菌落密集度低且呈绒毛状。当菌株在PDA培养基上培养20 d后,形成菌落直径可达15 mm,菌落表面白色、呈棉絮状,边缘全缘,背面黄色,中心突起呈半球状,并在周围形成同心环(图1-A)。显微观察菌丝体白色,菌丝较细、

有横隔,菌丝多次二叉分支,无孢子(图1-B)。根据菌落的形态结构,初步鉴定内生菌株Ⅰ是属于半知菌亚纲(Deuteromycotina)丛梗孢目(Moniliales)丛梗孢科(Moniliaceae)顶孢霉属(*Cephalosporium* Corda)的真菌。

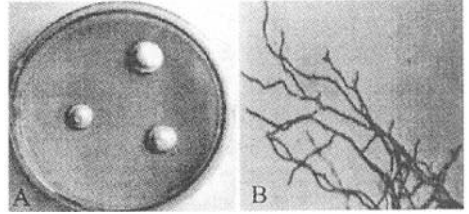


图1 菌株Ⅰ在PDA培养基上培养20 d后的生长形态(A)和菌丝结构(B)

Fig. 1 Morphology (A) and hyphal structure (B) of strain I after 20 d culture on PDA medium

内生真菌Ⅱ在PDA培养基上生长快,培养5 d后菌落直径即达到20 mm,菌落表面黑色、呈绒毛状,中心微凸并在周围形成多个同心环(图2-A)。气生菌丝结团匍匐于培养基表面,菌丝直径约2.0~6.5 μm、褐色、有横隔。基内菌丝如树根状,并分泌色素使培养基呈红褐色至黑褐色。分生孢子梗具数个隔,不分支,透明,筒形或瓶形。孢囊球形,直径1.5~5.0 μm,产孢细胞通常球形,由于产孢细胞和孢囊增生的结果,在分生孢子梗及菌丝上常聚成球形至卵形相当密实的孢子头(图2-B)。根据菌落的形态结构,初步鉴定内生菌株Ⅱ是属于卵菌亚纲(Oomycetes)霜霉目(Peronosporales)霜霉科(Peronosporaceae)单轴霉属(*Plasmopara* Schrot)的真菌。

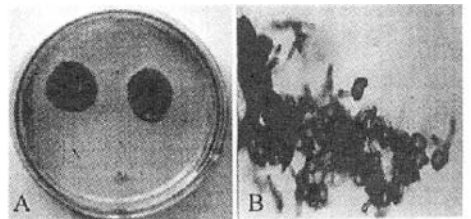


图2 菌株Ⅱ在PDA培养基上培养5 d后的生长形态(A)和菌丝结构(B)

Fig. 2 Morphology (A) and hyphal structure (B) of strain II after 5 d culture on PDA medium

内生真菌Ⅲ在PDA培养基上培养7 d后,菌落直径为2~3 cm,菌落平坦、湿润、无光泽,中心有环形沟状,稍突起,呈土黄色向边缘渐淡至乳白色,菌落边缘缺刻呈不规则锯齿状(图3-A)。菌落无假菌丝体,仅有1~3个细胞连接成短链,细胞呈卵形、

椭圆形或圆形,成表面光滑的子囊孢子(图3-B)。根据菌落的形态结构,初步鉴定内生菌株Ⅲ是属于子囊菌纲(Ascomycetes)酵母目(Endomycetales)酵母科(Saccharomycetaceae)酵母菌属[*Saccharomyces* (Meyen) Reess]的真菌。

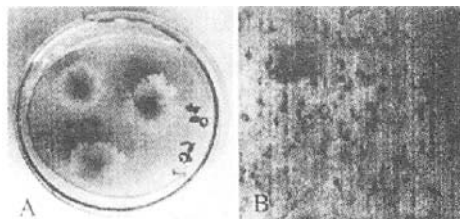


图3 菌株Ⅲ在PDA培养基上培养7d后的生长形态(A)和菌丝结构(B)

Fig. 3 Morphology (A) and hyphal structure (B) of strain III after 7 d culture on PDA medium

内生真菌Ⅳ在PDA培养基上培养5d后,菌落直径达1.5cm左右,呈青绿色绒毛状、中心突起、边缘圆整、反面黄色(图4-A)。菌落气生菌丝发达,表面密布绿色粉粒状结构,有横隔、透明,分生孢子梗不对称分支、光滑、竹节状,分生孢子串生于分生孢子梗顶端,分生孢子单胞、椭圆形或近球形,无色、光滑(图4-B)。根据菌落的形态结构,初步鉴定内生菌株Ⅳ是属于半知菌亚门(Deuteromycotina)丛梗孢目(Moniliales)丛梗孢科(Moniliaceae)青霉属(*Penicillium* Link)的真菌。

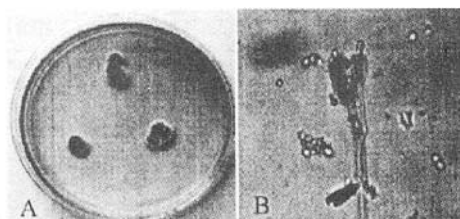


图4 菌株Ⅳ在PDA培养基上培养5d后的生长形态(A)和菌丝结构(B)

Fig. 4 Morphology (A) and hyphal structure (B) of strain IV after 5 d culture on PDA medium

3 结论

内生真菌是指生活在植物体内或在其生活史的一定阶段处于植物体内形成不明显侵染的一类真菌^[8]。自1993年发现从短叶红豆杉中分离出的内生真菌能够合成抗癌成分紫杉醇以来^[9],人们希望通过内生真菌发酵合成药用成分,已有多种植物内生真菌分离及其药用活性成分鉴定与合成的报道^[4~7,10],表明特定内生真菌可能在与宿主植物长

期协同进化中由于遗传信息的传递获得了宿主植物的特定代谢途径,从而使内生真菌产生与宿主相同或相似的生理活性成分^[11]。分离内生真菌和宿主植物生长部位有关。内生真菌的菌丝通常生长于植物组织的细胞间,分布于叶鞘、种子、花、茎、叶片和根中。在千层塔中,内生真菌以茎中最多。在所分离的内生真菌中以丛梗孢目居优势类群,获得的内生真菌Ⅰ属顶孢霉属,没有孢子。

利用内生真菌生产药用活性成分才刚刚起步,许多基础性工作有待深入研究。红豆杉植物内生真菌生产紫杉醇能力从最初的纳克级水平到现在的微克级水平已经提高了3个数量级,据认为要商业化生产需达到毫克级水平,因此有若干关键问题需要解决^[4]。就千层塔内生真菌而言,应继续扩大内生真菌分离的数量和种类,并对分离的菌株能否合成石杉碱甲进行鉴定,以论证千层塔内生真菌发酵生产石杉碱甲的可行性。

References:

- [1] Yu H Y, Sun Y M, Yang Y J. Advances in studies on *Huperzia serrata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(3): 279-281.
- [2] Ma L, Wu F. An Chinese traditional drug which can enhance the memory retention—*Huperzia serrata* [J]. *J Plant* (植物杂志), 2000(3): 15.
- [3] Jiang D F, Ma P, Wang X H, et al. The studies on fungal population and relationship between fungi and forming of dragon's blood resin in *Dracaena cochinchinensis* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1995, 17(1): 79-82.
- [4] Chen Y J, Zhang Z, Wang Y, et al. Screening endophytic fungus to produce taxol from *Taxus yunnanensis* [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2003, 13(2): 10-11.
- [5] Zhang L Q, Guo B, Li H Y, et al. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(11): 805-807.
- [6] Li H Y, Wang Z J, Zhang L Q, et al. Isolation of an endophytic fungus associated with *Sinopodophyllu memodi* [J]. *J Yunnan Univ—Nat Sci* (云南大学学报·自然科学版), 1999, 21(3): 243.
- [7] Zhang L Q, Gu S, Shao H, et al. Isolation, determination and aroma product characterization of fungus producing irone [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 1999, 18(1): 49-54.
- [8] Guo L D. Advances on researches on endophytic fungi [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 2001, 20(1): 148-152.
- [9] Strobel G, Stierle A, Stierle D, et al. *Taxomyces andreae*, a proposed new taxon for a bulbiliferous hyphomycete associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. *Mycotaxon*, 1993, 47: 71-80.
- [10] Li Y L, He X C, Bai D L. Studies on analogues of huperzine A for treatment of senile dementia N synthesis of (±)-8,15-dihydrode-11,15-dimethyl-8-hydroxyl-huperzine A [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 1996, 6(3): 157-191.
- [11] Ding M X, Cui Z H. *Cytobiology* (细胞生物学) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1995.