

湘西地区蛇足石杉内生真菌的分离

徐巧玉¹, 何兴兵^{2,3}, 唐克华^{2,3}, 唐源江⁴, 李 菁^{3*}, 田兴军¹

(1. 南京大学 生命科学学院, 中国江苏 南京 210093; 2. 吉首大学 城乡资源与规划学院, 中国湖南 张家界 427000; 3. 吉首大学—武陵山区植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 中国湖南 吉首 416000; 4. 中国科学院 华南植物园, 中国广东 广州 510650)

摘 要: 采集不同生境的药用植物蛇足石杉, 运用不同灭菌方法处理外植体, 并用 PDA 平板培养基及孟加拉红培养基进行内生真菌的分离纯化。经过几种灭菌方法的摸索和比较研究, 发现蛇足石杉外植体的灭菌十分困难 (尤其是其茎部), 难以在保持植物鲜活状态下达到一次彻底灭菌, 有必要二次灭菌。通过二次灭菌分离得到的 9 株内生真菌中, 来自蛇足石杉茎部的 6 株, 来自叶片的 3 株。蛇足石杉的 9 株内生真菌在平板培养时生长极其缓慢, 仅一株可在培养时产生孢子。

关键词: 蛇足石杉; 内生真菌; 灭菌; 分离

中图分类号: Q939.99

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2008)04-0340-03

Isolation of Endophytic Fungi from *Huperzia Serrata* in Western Hunan Province

XU Qiao-yu¹, HE Xing-bing^{2,3}, TANG Ke-hua^{2,3}, TANG Yuan-jiang⁴, LI Jing^{3*}, TIAN Xing-jun¹

(1. School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China; 2. College of Resources and Planning Sciences, Jishou University, Zhangjiajie 427000, Hunan, China; 3. Hunan Provincial University Key Laboratory of Plant Resources Protection and Utilization of Wuling Mountain Area, Jishou 416000, Hunan, China; 4. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, Guangdong, China)

Abstract: *Huperzia serrata* was collected from different environment for the isolation of endophytic fungi and finding the effective sterilizing method. The result showed that the epiphytic fungi were difficult to be sterilized thoroughly for one time sterilization, and the second time sterilization was needed, especially for the stem. Of nine endophytic fungi strains isolated from healthy *H. serrata* with conventional isolation method, 6 strains were from stems and 3 strains were from leaves. The isolated fungi grew slowly on culture medium, and only one strain was observed to have spores.

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

(Life Science Research 2008, 12(4) 340~342)

蛇足石杉 *Huperzia serrata*(Thunb.) Trev. (千层塔) 属蕨类石杉科石杉属植物, 它含有的石杉碱甲 (Huperzine A, Hup A) 是一种倍半萜生物碱, 为高效、高选择性、可逆性的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制剂^[1], 具有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

老性痴呆有显著疗效^[2]。石杉碱甲制剂 (哈伯因), 现已应用于临床, 用于治疗老年人记忆减退和早期老年性痴呆症^[3]。近年研究还证明 Hup A 有神经保护和预防化学武器的潜力, 引起世界各国药学工作者广泛关注和研究^[1]。但是石杉碱甲的构造复杂, 人工合成十分困难, 且合成产物

收稿日期 2008-07-28; 修回日期 2008-10-30

基金项目 湖南省自然科学基金项目(2007NK3075) 广东省科技计划资助项目(2007B020704003)

作者简介: 徐巧玉(1983-) 女, 山东烟台人 南京大学微生物与生化制药专业硕士研究生 主要从事微生物资源与利用研究 Tel: 15905153041; E-mail xqy202@yahoo.com.cn; 通讯作者: 李菁 (1955-), 男, 湖南吉首人, 吉首大学教授。主要从事自然资源保护与利用研究 E-mail: ljing103@hotmail.com

有副作用,因此石杉碱甲的主要来源还是少数石杉科植物的提取^[4]。而该类植物都是古老的蕨类植物,大多已经灭绝,现存植物对生长环境要求苛刻,生产缓慢,可利用野生资源极其有限^[5]。因此研究石杉科植物的外植体组织培养和石杉碱甲资源的新来源显得尤为重要。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^[6]。已有研究表明,石杉科植物内生真菌具有产石杉碱甲的能力^[7]。本实验采用严格的外植体灭菌方法对蛇足石杉的内生真菌进行分离,并对植物与真菌的关系作初步研究,为下一步研究共生真菌能否产石杉碱甲及能否促进植物组织培养提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料 采自湖南省古丈县及湖南省八大公山自然保护区。

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 外植体灭菌方法

将新鲜千层塔用自来水冲洗干净,75%乙醇漂洗2~3 min;一次灭菌:用20%饱和浓度的次氯酸钠溶液分别灭菌5、15、25 min,或者用0.1%的氯化汞溶液分别灭菌10、15、20 min;二次灭菌:用0.1%的氯化汞溶液灭菌15 min。

1.4 内生真菌的分离与纯化

一次灭菌后的外植体用无菌水冲洗4~5次,用无菌刀片将根切成5×5×5 mm小块,将茎切成生长5 mm的小段,将叶片切成5×5 mm的小片,接在PDA培养基上和孟加拉红培养基上,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,然后接到试管斜面上保存,供鉴定用。

一次灭菌后用无菌水冲洗,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周后再重复氯化汞灭菌一次,无菌水冲洗4~5次,后面操作同前。将经过一次和二

次表面灭菌处理的材料不作切割并分别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。

2 结果与讨论

2.1 外植体的灭菌方法

本实验采用20%饱和浓度的次氯酸钠溶液和0.1%氯化汞溶液作一次灭菌,灭菌时间不同,产生的灭菌效果也不相同。采用次氯酸钠灭菌5 min,外植体一周内多数被污染,说明时间过短,灭菌不彻底;灭菌15 min,污染率为30%,植物体保持鲜绿状态;灭菌25 min,污染率10%,但植物体颜色发白死亡,推断对其内生真菌会产生影响,不利分离。采用0.1%氯化汞溶液灭菌10 min,一周后污染率50%,时间过短,灭菌不彻底;灭菌15 min,污染率10%,植物体保持鲜绿状态;灭菌20 min,污染率2%,植物体颜色发白死亡,不利于内生真菌分离。以上结果证明无论采用哪种方法,都难以在植物体尤其是茎部保持鲜活状态下,一次彻底灭菌,因而二次灭菌是有必要的。确定内生真菌分离的最佳外植体灭菌方法为0.1%氯化汞溶液灭菌15 min,并用于二次灭菌。

2.2 内生真菌在植物中的分布

经过严格的灭菌处理,确定9株真菌为内生真菌。不同植物体内分离到的内生真菌数量不同,少则十几种,多则近百种,平均每种寄主有4~5种寄生菌^[8],本实验结果表明蛇足石杉的内生真菌数量相对较少。所获内生真菌全部分离自生长于海拔600~800 m植株高于20 cm的蛇足石杉。而海拔高于1 000 m的植株高度在9~10 cm,没有分离出内生真菌。海拔600~800 m,高度低于20 cm的植株也未分离出内生真菌,植物体内内生真菌的分布可能与植物的生长年限及生长环境有关。大量研究表明,多数情况下,内生真菌在叶鞘和种子中分布量最多,而叶片和根含量极微^[9]。本实验分离得到的9株内生真菌,包括茎部6株、叶片3株。说明蛇足石杉内生真菌在茎部分布最多。

表1 内生真菌宿主植株高度及分离部位

Table 1 The height of the host and the part where endophytic fungi were isolated

Strain No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Height/cm	21.5	27.0	30.0	25.0	28.0	27.0	25.5	24.5	22.0
Part	Leaf	Stem	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem	Stem	Stem

2.3 内生真菌生长特性和形态特征

分别用孟加拉红培养基和 PDA 培养基对所分离 9 株内生真菌在植物体外进行平板培养,结果显示在孟加拉红培养基菌落生长较快。接种一周后,开始呈现菌落生长状态;两周后菌落直径 1.0~1.5 cm;一个月后,菌落直径达 4.0~5.0 cm。可见内生菌在体外生长速度相当缓慢。菌落大多平坦,颜色较浅;气生菌丝不发达,多呈棉絮状或是致密绒毛状菌丝;菌株 6 和 7 的菌落结实坚硬,有明显的角质化特性。显微镜下观察,菌株 1 有锁状联合繁殖现象,可断定为担子菌。只有菌株 5 有孢子生成,其菌落外部形态呈致密绒毛状,中央稍隆起,表面呈近黑绿色,具有放射状沟纹,反面黑色;其分生孢子梗直立、分隔、有短枝,褐色或暗绿色;分生孢子为单细胞,有的具有一个分隔,椭圆形到长椭圆形。根据菌株 5 的以上特征,查阅有关文献进行初步鉴别,将该菌株鉴定为枝孢霉(*Cladosporium sp.*)。其他菌株没有孢子产生,有待进行分子鉴定。

3 结论

植物内生真菌是一类相对来说开发较少、次生代谢产物丰富、应用前景广阔的微生物资源。目前已从内生真菌中分离到多种具有生物活性的代谢产物,主要有黄酮、生物碱、萜类、甾体、醌类、环肽、脂肪酸等化合物^[10,15]。本研究中分离出的内源真菌中是否可产生石杉碱甲,是否可能成为石杉碱甲的来源,都尚需进一步实验论证。

另外,蛇足石杉组织培养的大量实验表明,这类较低等且伴有内源真菌的蕨类植物离体培养十分困难^[4],可以从内生真菌对组织培养的影响着手研究,实现蛇足石杉外植体的工业化大规模生产,提高石杉碱甲的产量,但目前还有大量的基础工作需要作进一步深入的研究。

致 谢:湖南八大公山自然保护区田连生、吉首大学生物资源与环境科学学院黎友友同学协助采集材料。特此致谢!

参考文献 (References):

[1] 张磊,万谦宏,高文远. 石杉碱甲的研究进展[J]. 中草药

- (ZHANG Lei, WAN Qian-hong, GAO Wen-yuan. Advances in study of hyperzine A[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs) 2005, 36(9):1422-1425.
- [2] YU H Y, SUN Y M, YANG Y J. Advances in studies on *Huperzia serrata*[J]. Chinese Traditional Herbal Drugs, 2001, 32(3): 279-281.
- [3] MA L, WU F. An Chinese traditional drug which can enhance the memory retention *Huperzia serrata*[J]. Plant, 2000, 3: 151.
- [4] 沈晓霞,俞旭平,盛束军. 千层塔茎尖组织培养灭菌方法的研究[J]. 中国中药学杂志 (SHEN Xiao-xia, YU Xu-ping, SHENG Shu-jun. The comparison of sterilizing and culturing methods for *Huperzia Serrata*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica) 2002, 27(6): 457-459.
- [5] 石玮,罗建平,丁振华,等. 千层塔内生真菌分离鉴定的初步研究[J]. 中草药(SHI Wei, LUO Jian-ping, DING Zhen-hua, et al. Isolation and identification of endophytic fungi of *Huperzia serrata* [J]. Chinese Traditional Herbal Drugs), 2005, 36(2): 281-283.
- [6] GUO L D. Advances on researches on endophytic fungi[J]. Mycosystema, 2001, 20(1): 148-152.
- [7] 黎万奎,周吉燕,林子为,等. 蛇足石杉内生真菌 2F09P03B 产石杉碱甲发酵条件的研究[J]. 中国医药生物技术(LI Wan-kui, ZHOU Ji-yan, LIN Zi-wei, et al. Study on fermentation condition for production of hyperzine A from endophytic fungus 2F09P03B of *Huperzia serrata*[J]. Chinese Medicinal Biotechnology) 2007, 24: 254-259.
- [8] 武子敬,杨小生,朱海燕. 植物内生真菌的研究现状[J]. 江西中医学院学报 (WU Zi-jing, YANG Xiao-sheng, ZHU Hai-yan. The present research status of plant endophytic fungi[J]. Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine) 2007, 19(1): 98-100.
- [9] CARROL G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont[J]. Ecology, 1998, 69: 29.
- [10] 谷苏,邵华,蒋晓华,等. 药用植物内生真菌多样性及其活性成分的潜在应用价值[J]. 中国药理学杂志(GU Su, SHAO Hua, JIANG Xiao-hua, et al. The variety of endophytic fungi and potential value of the active elements in medical plant[J]. China Journal of Chinese Materia Medica) 2001, 36(1): 14-15.
- [11] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by Tax2omyces and reanae[J]. An Endophytic Fungus of Pacific Science, 1993, 260(5105): 214.
- [12] STROBEL G, YANG X S, SEARS J, et al. Taxol and taxane production by Tax2omyces and reanae. An endophytic fungus of *Taxus wallachiana*[J]. Microbiology, 1996, 142(2): 435.
- [13] BARRY V C. Secondary Products from Plant Tissue Culture [M]. Oxford (England) Clarendon Press; New York: Oxford University Press, 1990:224.
- [14] STROBEL E G, STIERLE A, STIERLE D, et al. Taxomyces and reanae, a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete as associated with pacificyew (*Taxus brevifolia*)[J]. Mycotaxon, 1993, 47: 71.
- [15] STROBEL G A, DIRKSE E, SEARS J, et al. Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus[J]. Microbiology, 2001, 147(11): 294-350.