

牡荆内生真菌的分离与鉴定

黄芳¹, 韩婷², 秦路平^{1,2*}

(1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062;
2. 第二军医大学 药学院 生药学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的:探讨牡荆内生真菌类群在不同器官中分布的多样性及其与生态环境的关系。方法:利用PDA培养基进行牡荆内生真菌的分离、纯化,根据菌落的形态特征并结合真菌的5.8S和ITS序列进行菌株鉴定。结果:从牡荆中共分离到内生真菌97株,鉴定为6目8科10属12种,其中从野生牡荆中获得内生真菌60株,鉴定为6目7科9属9种,从栽培牡荆中获得内生真菌37株,为3目3科5属7种。结论:牡荆内生真菌具有多样性,不同地理环境和组织类型的牡荆内生真菌在数量和种群组成上存在差异。

[关键词] 牡荆;内生真菌;分离;鉴定

牡荆 *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* (sieb. et Zucc) Hand. Maz 为马鞭草科牡荆属植物,落叶灌木或小乔木,广布于我国长江流域及南部各省区^[1]。牡荆是传统的药用植物,不同部位的药效也不尽相同,如牡荆茎可治感冒、疮肿、牙痛;牡荆子可祛风、治咳嗽、哮喘;牡荆根可治疟疾、关节风湿痛等;牡荆叶可除湿、杀虫、治痢疾、脚气^[2],牡荆含有丰富的挥发油,具有显著的祛痰、镇咳、平喘的作用,是治疗慢性气管炎的有效药物,由其制成的牡荆油胶丸已被载入《中国药典》^[3]。

近年来的研究表明,药用植物内生真菌能够产生种类丰富的生物活性物质甚至新结构类型的活性物质^[4],国内外掀起对药用植物和濒危植物内生真菌的研究热潮^[5],药用植物内生真菌已成为发现新天然活性物质的重要资源^[6]。目前有关于牡荆的研究报道主要集中在有效成分、药理和药效方面,但至今未见对其内生真菌的报道。本实验以野生和栽培牡荆为材料,研究其内生真菌的多样性及其分布与生态环境、组织类型的关系,旨在为揭示牡荆内生真菌多样性的分布规律,以及进一步寻找新的活性代谢产物积累数据和资料。

1 材料

1.1 样品

2010年5月9日在浙江省天目山采集野生牡

荆植株的茎、叶、根以及一年生枝条;2010年5月10日在第二军医大学药学院校园内采集栽培牡荆植株的茎、叶、根以及一年生枝条,均经第二军医大学药学院生药学教研室秦路平教授鉴定为牡荆,拉丁名为 *V. negundo* var. *cannabifolia*。

1.2 培养基

PDA培养基:马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂20g,水1000mL。

1.3 DNA提取试剂

CTAB提取缓冲液(0.1 mol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 2% CTAB, 1.4 mol · L⁻¹ NaCl, 20 mmol · L⁻¹ EDTA), TE缓冲液(10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol · L⁻¹ EDTA, pH 8.0)。

1.4 PCR所用试剂

Taq DNA polymerase, 10 × PCR buffer, dNTPs Mix, MgCl₂, 引物 ITS4, ITS5 等均由上海生工生物工程有限公司提供。

2 方法

2.1 内生真菌的分离

将采集到的新鲜、健康的牡荆叶、茎、根和一年生枝条表面清洗干净,进行如下表面消毒:在无菌操作台中用70%乙醇漂洗30s,无菌水冲洗4次,2.5% NaClO 溶液漂洗3min,无菌水冲洗4次,70%乙醇漂洗1min,无菌水冲洗4次。无菌滤纸片吸干水分,切成5mm × 5mm × 1mm的小块接种于培养基上,每个培养皿中接种4块,置28℃恒温培养箱中培养3~30d,观察到培养基上从各植

[稿件编号] 20110129003

[通信作者] * 秦路平,教授,博士生导师,主要从事中药资源与活性研究工作, Tel: (021) 81871300, E-mail: qinsmmu@126.com



物组织块内部向周围长出菌丝时,采用尖端菌丝挑取法把真菌转移到新的培养基上继续培养、转接,待纯化后转移到 PDA 斜面试管中保存,用于菌种鉴定^[12]。分离过程中设置对照组,采用经表面消毒的组织块在空白培养基上滚动,使组织块各表面接触到培养皿,与接种好的培养皿一起培养,检查表面消毒是否彻底,辨别真菌是否为内生,对照培养皿上未长出菌落,说明表面消毒彻底。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌株的形态学特征 将保存好的菌株复壮在 PDA 平板上,28 ℃ 恒温培养箱培养 5 ~ 10 d,记录菌株的培养特征,包括菌落形态、大小、颜色、生长速率、质地、生长培养基颜色变化等。

2.2.2 菌株的分子鉴定 真菌基因组 DNA 的提取:用刮刀刮取平板培养 7 d 的菌落菌丝,置 1.5 mL 离心管中,加 500 μL 65 ℃ 预热的 2 × CTAB 提取缓冲液及少量石英砂,用玻棒研磨 5 ~ 10 min 后,65 ℃ 水浴 1 h;再加入 500 μL 氯仿-异戊醇(24:1)充分混匀后,12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min;取上清,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),混匀后,4 ℃ 下 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,重复抽提 1 次;加入 2/3 体积的异丙醇(400 μL),混匀,出现沉淀后,4 ℃ 下 10 000 r · min⁻¹ 离心 2 min,重复洗涤 1 次;弃去液相,加入 400 μL 70% 乙醇,震荡洗涤,10 000 r · min⁻¹ 离心 2 min,重复洗涤 1 次;40 ~ 60 ℃ 真空干燥 DNA,约 10 min;加入 100 μL TE 缓冲液(10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl,1 mmol · L⁻¹ EDTA,pH 8.0),37 ℃ 溶解 DNA 样品,并于 -20 ℃ 下保存。

PCR 扩增菌株 5.8S 和 ITS 区段:根据已知真菌的保守序列设计特异性引物 ITS4,ITS5,以真菌基因组 DNA 为模板,扩增菌株 5.8S 和 ITS 区段。PCR 扩增体系为 50 μL,含 DNA 模板(1 μL),去离子水(33.5 μL),10 × PCR buffer(5 μL),10 μmol · L⁻¹ ITS4(1 μL),10 μmol · L⁻¹ ITS5(1 μL),10 mmol · L⁻¹ dNTPs Mix(4 μL),25 mmol MgCl₂(4 μL),2.5 U · μL⁻¹ Taq DNA 酶(0.5 μL)。采用 Eppendorf 5331 梯度 PCR 仪进行 PCR,反应程序为 95 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 40 s,52 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经送上海申速生物技术有限公司测序。用每个菌株的 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,挑选与菌株序列最相近

的参考序列,用于系统发育分析。5.8S 基因和 ITS 区序列通过 Clustal X 1.81 程序来进行序列间的匹配排序,用于邻接法(Neighbor-joining, NJ)的系统发育分析。用 Clustal X 1.81 作邻接法分析时,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。将本研究中分子鉴定得到的核酸序列发送至 Genbank,并分配得到了相应的基因登录号。

2.3 数据分析

分离频率(relative frequency of isolation, RF),指分离到的某一种类的内生真菌的菌株数占分离到的内生真菌菌株总数的百分率,用来判断该种菌是否为植物内生的优势菌群^[13]。

3 结果

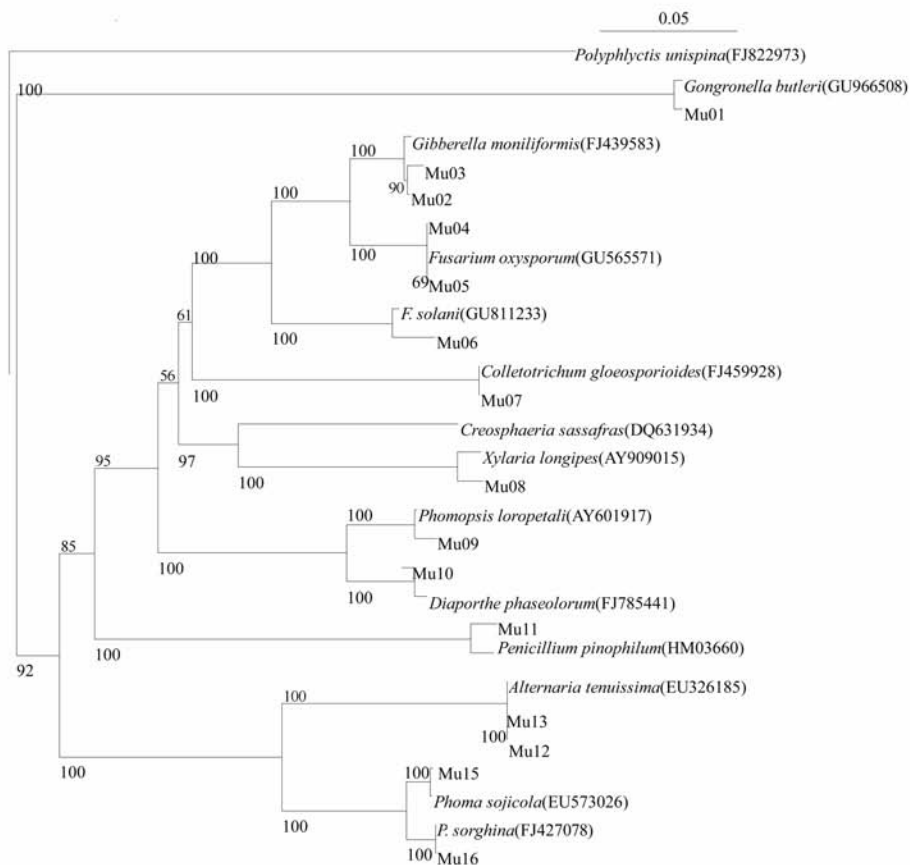
从浙江天目山野生牡荆和上海第二军医大学药学院内栽培牡荆的叶片、茎、根和一年生枝条中共分离获到内生真菌 97 株,根据其菌落特征并结合其分子序列合并为 16 个形态型,再对这些形态型菌株的 5.8S 和 ITS 序列与 Genbank 中最相近的参考序列进行比对,用邻接法构建系统发育树(图 1),鉴定为 6 目 8 科 10 属 12 种。这 16 个形态型在 Genbank 中被分配到的登录号为 HQ916318 ~ HQ916333(表 1)。从牡荆中分离得到的内生真菌具有丰富的生物多样性,在属的分类水平上以镰孢菌属 *Fusarium* 和茎点霉属 *Phoma* 为优势种群,分别为 20,17 株,分别占总菌株数的 20.82%,17.53%(表 1,2)。

3.1 不同地区牡荆内生真菌的分布

从天目山采集的野生牡荆植株分离到的内生真菌种类与数量明显要多于药学院校园内的栽培牡荆。野生牡荆中分离到的内生真菌为 60 株,为 6 目 7 科 9 属 9 种,其中 *Alternaria tenuissima* 为优势菌种,占野生牡荆内生真菌分离总数的 18.33%;栽培牡荆中分离到内生真菌 37 株,共 3 目 3 科 5 属 7 种,*Fusarium solani* 为优势菌种,占栽培牡荆内生真菌分离总数的 21.62%。在不同生态环境下的牡荆内生真菌感染的最终结果有着较大的差异,野生环境中牡荆内生真菌种类和数量明较多,其物种较为丰富,而从受人类活动影响较大地区生长的栽培牡荆中分离到的内生真菌种类和数量明显较少(表 2)。

3.2 牡荆不同部位内生真菌的数量与种类分布

从牡荆不同部位分离获得的内生真菌种类不同,而且分离频率不同(表 2)。从野生牡荆叶片分离出内生真菌 16 株,占野生牡荆分离菌株总数的



Polyphlyctis unispina (FJ822973) 作为外群; 括号中为参考菌株在 GenBank 中的登录号; 分支上的数值表示等于或大于 50% 的 Bootstrap 值 (1 000 次重复)。

图 1 根据 ITS 和 5.8S 序列得到的系统发育树

表 1 牡荆内生真菌种群组成及其分类地位

No.	基因登录号	种	属	科	目
Mu01	HQ916318	<i>Gongronella butleri</i>	<i>Gongronella</i> 孢球托霉属	Mucoraceae 毛霉菌科	Mucorales 毛霉菌目
Mu02	HQ916319	<i>Gibberella moniliformis</i>	<i>Gibberella</i> 赤霉菌属	Nectriaceae 从赤壳科	Hypocreales 肉座菌目
Mu03	HQ916320				
Mu04	HQ916321	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium</i> 镰胞菌		
Mu05	HQ916322				
Mu06	HQ916323	<i>F. solani</i>	<i>Fusarium</i> 镰胞菌		
Mu07	HQ916324	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Alternaria</i> 链格孢属	Pleosporaceae 孢菌科	Pleosporales 格孢菌目
Mu08	HQ916325				
Mu09	HQ916326	<i>Phoma sojaicola</i>	<i>Phoma</i> 茎点霉属		
Mu10	HQ916327				
Mu11	HQ916328	<i>P. sorghina</i>	<i>Phoma</i> 茎点霉属		
Mu12	HQ916329	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum</i> 刺盘孢属	Glomerellaceae 小丛壳菌科	
Mu13	HQ916330	<i>Xylaria longipes</i>	<i>Xylaria</i> 炭角菌属	Xylariaceae 炭角菌科	Xylariales 炭角菌目
Mu14	HQ916331	<i>Phomopsis phoenicicola</i>	<i>Phomopsis</i> 拟茎点霉属	Valsaceae 黑座菌科	Diaporthales 间座壳菌目
Mu15	HQ916332	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>Diaporthe</i> 间座壳属	Diaporthaceae 间座壳科	
Mu16	HQ916333	<i>Penicillium pinophilum</i>	<i>Penicillium</i> 青霉菌属	Trichomaceae 发菌科	Eurotiales 散囊菌目



表2 野生和栽培牡荆不同部位内生真菌的数量与种类分布

内生真菌	野生牡荆					栽培牡荆				
	叶片	茎	根	枝条	合计	叶片	茎	根	枝条	合计
<i>Gongronella butleri</i>	3	1	0	0	4	0	0	0	0	0
<i>Gibberella moniliformis</i>	5	2	0	0	7	2	2	0	0	4
<i>Fusarium proliferatum</i>	1	3	2	1	7	3	3		2	8
<i>F. solani</i>	0	0	0	0	0	1	2	1	1	5
<i>Alternaria tenuissima</i>	1	2	6	2	11	0	1	3	0	4
<i>Phoma sojaicola</i>	0	3	3	2	8	1	2	1	0	4
<i>P. sorghina</i>	0	0	0	0	0	0	3	2	0	5
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1	6	0	0	7	0	0	0	0	0
<i>Xylaria longipes</i>	0	7	1	0	8	0	0	0	0	0
<i>Phomopsis phoenicicola</i>	3	2	1	0	6	0	0	0	0	0
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	0	0	0	0	0	2	4	1	0	7
<i>Penicillium pinophilum</i>	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
菌株数/株	16	26	13	5	60	9	17	8	3	37
物种丰富度	7	8	5	3	9	5	7	5	2	7

26.67%,有7属7种,以 *Gibberella moniliformis* 为优势种群,占叶片分离菌株数的31.25%;茎部内生真菌26株,占分离菌株总数的43.33%,有8属8种,以 *Xylaria longipes*, *Colletotrichum gloeosporioides* 为优势种群,分别占茎部菌株数的26.92%,23.08%;从根部分离到内生真菌13株,占分离菌株总数的21.67%,有5属5种,其中 *Alternaria tenuissima* 为优势种群,占根部分离菌株数的46.15%;从一年生枝条内分离到内生真菌5株,占分离菌株总数的8.33%,有3属3种,分别为 *A. tenuissima*, *Phoma sojaicola*, *Fusarium proliferatum*,各占枝条分离菌株数的40%,40%,20%。在栽培的牡荆中不同器官内生真菌的差距也很明显,叶片分离出内生真菌9株,占分离菌株总数的24.32%,有2目2科4属5种,以 *F. solani* 为优势种群,占叶片分离菌株数的33.33%;茎部内生真菌17株,占分离菌株总数的45.95%,有3目3科5属7种, *C. gloeosporioides*, *F. solani* 为优势种群,均占茎部菌株数的17.65%;从根部分离到内生真菌8株,占栽培牡荆分离菌株总数的21.62%,有3目2科4属5种,以 *A. tenuissima* 为优势种群,占根部分离菌株数的37.50%;从一年生枝条内分离到内生真菌3株,占分离菌株总数的10.00%,有1目1属2种,分别为 *F. solani* (66.67%) 和 *F. proliferatum* (33.33%)。由此可见,牡荆的叶、茎、根和一年生枝条内生真菌在数量、种群分布和优势种群方面有很大差异,这表明牡荆内生真菌数量和种群的多样性特点。同种植物不同

部位内生真菌种群存在差异的原因可能是由于不同部位的微环境如通气状况、酶和其他化学成分的不同而适合不同的内生真菌类群侵入生长。

4 结论

本研究通过对2种不同生态环境下的牡荆进行内生真菌的分离和鉴定,结果显示牡荆内生真菌的数量和类群组成极为丰富,并且内生真菌的分布与生态环境具有一定的相关性。关于内生真菌的分布与环境密切相关也得到了很多研究的支持^[14-17],甚至环境的影响大于宿主植物对内生真菌分布的影响^[18]。本研究中野生牡荆内生真菌共分离得到60株,属于6目7科9属9种,而校园内栽培的牡荆中分离得到的内生真菌为37株,属于3目3科5属7种,野生环境中的牡荆内生真菌多样性上明显高于栽培中的牡荆。这一现象可能与其生长的环境相关:与栽培环境相比,野生环境中生态系统复杂,物种较丰富,竞争压力较大,野生植物可能需要更多的不同种类的内生真菌与其共生,以增强抗病能力和提高抗逆性^[20];当植株由野生状态移栽时,由于生存环境的改变其内生真菌渐渐地减少了^[21-22]。特别是对于生长在不同生境中的中药材,由于所处生态环境的差异以及药材本身所产生的遗传变异,结果导致内生真菌种群结构与分布在道地药材与非道地药材中必然存在较大差异。

就内生真菌分布部位而言,茎中内生真菌明显高于其他器官,许多研究也报道了相似的结果^[23-24],这可能是由于不同植物组织的结构和含有



的营养物质不完全相同,而不同的真菌对营养物质的需求不尽相同,从而影响到内生真菌的侵染、生长和分布^[23]。而一年生枝条中内生真菌类群和数量最少,植物组织年龄对内生真菌分布的影响,可能是由于在老的植物组织上真菌有充分的时间进行重复侵染,或者幼龄组织受到侵染后内生真菌随植物组织的生长而不断扩展繁殖^[24-25],另外,随着年龄的增长,植物组织发生了变化或表皮被降解,使真菌更加容易侵入^[23,26]。

研究表明,上述药用植物中蕴藏着丰富的内生真菌,同时内生真菌在植物中的分布受生态环境和组织类型的影响。就目前来看,人们对马鞭草科植物的内生真菌鲜有研究,在随后的研究中,将结合牡荆的原种植物黄荆内生真菌多样性的研究,较为系统地揭示内生真菌类群与宿主植物、生态环境以及器官类型的关系,旨在深入研究内生真菌资源分布的特点和规律。

[参考文献]

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:767.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:1130.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2005:276,附录XD,附录VIB.
- [4] Strobel G, Daisy B, Castill U, et al. Natural products from endophytic microorganisms[J]. J Nat Prod, 2004, 67: 257.
- [5] 陈毅坚, 张硕, 王艳, 等. 云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)内生真菌中产紫杉醇真菌的筛选[J]. 生物技术, 2003, 13(2): 10.
- [6] 谷芬, 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]. 中国药学杂志, 2001, 36(1): 14.
- [7] You F, Han T, Wu J Z, et al. Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. [J]. Biochem System Eco, 2009, 37: 162.
- [8] Xu L L, Han T, Wu J Z, et al. Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Panax ginseng* and its endophytic fungus[J]. Phytomedicine, 2009, 16: 609.
- [9] Guo L, Wu J Z, Han T, et al. Chemical composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapania verrucosa* Heeg and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*[J]. Molecules, 2008, 13: 2114.
- [10] Sun P X, Zheng C J, Li W C, et al. Trichodermin A, a novel

- diterpenoid from endophytic fungus culture [J]. J Nat Med, 2011, 65(2): 381.
- [11] 于洪升, 张磊, 李琳, 等. 银杏内生真菌的分离鉴定及其生物活性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2133.
- [12] Huang W Y, Cai Y Z, Xing J, et al. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants[J]. Econ Bot, 2007, 61: 14.
- [13] 庞蕾. 银杏、厚朴内生真菌的初步研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2005.
- [14] White J J, Cole G T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*[J]. Mycologia, 1985, 77: 323.
- [15] Lewis G C, Ravel C, Naffaa W, et al. Occurrence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium* ssp. in European countries and a relationship between level of infection and climate in France[J]. Ann Appl Biol, 1997, 130: 227.
- [16] Oliveira J A, Rottinghaus G E, Collar J, et al. Perennial ryegrass endophytes in Galicia, northwest Spain[J]. J Agr Sci, 1997, 129: 173.
- [17] Schulthess F M, Faeth S H. Distribution, abundances and associations of the endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica* Vasey)[J]. Mycologia, 1998, 90: 569.
- [18] Gange A C, Dey S, Currie A F, et al. Site- and species- specific differences in endophyte occurrence in two herbaceous plants[J]. J Ecol, 2007, 95: 614.
- [19] Clay K. Fungal endophytes of grasses[J]. Annu Rev Ecol Evol S, 1990, 21: 275.
- [20] 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: 335.
- [21] Bertoni M D, Cabral D. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*. II. Distribution of endophytes[J]. Nova Hedwigia, 1988, 46: 491.
- [22] Kumaresan V, Suryanarayanan T S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community[J]. Mycol Res, 2001, 105: 1388.
- [23] Carroll G C, Petrini O. Patterns of substrate utilization by some endophytes from coniferous foliage[J]. Mycologia, 1983, 75: 53.
- [24] Espinosa F J, Langenheim J H. The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population diversity and spatial patterns[J]. New Phytol, 1990, 116: 89.
- [25] Stone J K. Initiation and development of latent infection by *Rhizoctonia parkeri* on Douglas fir[J]. Can J Bot, 1987, 65: 2614.
- [26] Fröhlich J, Hyde K D, Petrini O. Endophytic fungi associated with palms[J]. Mycol Res, 2000, 104: 1202.



Isolation and identification of endophytic fungi from *Vitex negundo* var. *cannabifolia*

HUANG Fang¹, HAN Ting², QIN Luping^{1,2*}

(1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200063, China;

2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[**Abstract**] **Objective:** The research aimed to investigate the endophytic fungal community of *Vitex negundo* var. *cannabifolia*, including the biodiversity from different organs and the correlations with habitations. **Method:** PDA medium was used to isolate and purify the endophytic fungi in *V. negundo* var. *cannabifolia*. The purified strains were identified by morphology together with similarity of 5.8S gene and internal transcribed spacer (ITS) sequence. **Result:** Ninety-seven strains of endophytic fungi were isolated from *V. negundo* var. *cannabifolia*. They were identified belonging to 12 species, 10 genera, 8 families and 6 orders, while 60 isolations identified into 9 species, 9 genus, 7 families and 6 orders were obtained from the wild plants and 37 belonging to 7 species, 5 genus, 3 families and 3 orders were from the cultivated ones. **Conclusion:** It indicated that the endophytic fungi in *V. negundo* var. *cannabifolia* were diverse, and there were some differences at quantity and species in different sites and organs of *V. negundo* var. *cannabifolia*.

[**Key words**] *Vitex negundo* var. *cannabifolia*; endophytic fungi; isolation; identification

doi:10.4268/cjcm20111422

[责任编辑 吕冬梅]