

## 海南粗榧内生真菌的分离与初步鉴定

陈 苹 戴好富 解修超 吴 娇 廖文彬 梅文莉\*

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所在海口 571101)

**摘 要:** 从海南粗榧(*Cephalotaxus hainanensis* L.)健康的树皮、枝、叶中分离得到 72 株内生真菌。依据其菌落形态和显微特征, 将其中 68 株归为半知菌类, 即产孢的 33 株鉴定为 5 个属, 未产孢的 35 株中除 1 株鉴定为丝核菌属外, 其余 34 株暂归为无孢菌群。还有 4 株属于担子菌纲。结果表明, 海南粗榧内生真菌对宿主具有一定的组织专一性, 树皮的真菌在数量、种群及其组成方面与枝、叶的相比存在较大差异。

**关键词:** 海南粗榧, 内生真菌, 分离, 鉴定

## Isolation and Primary Identification of Endophytic Fungi from *Cephalotaxus hainanensis* L.

CHEN Ping DAI Hao-Fu XIE Xiu-Chao WU Jiao LIAO Wen-Bin MEI Wen-Li\*

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101)

**Abstract:** Seventy-two strains of endophytic fungi were isolated from the healthy bark, branches and leaves of *Cephalotaxus hainanensis* L.. Sixty-eight of them were morphologically classified into Fungi Imperfecti, thirty-three sporulated were identified to five genera. For those did not sporulate, one was identified to *Rhizoctonia* sp., the rest were tentatively classified into Mycelia Sterilia. Four were identified to Basidiomycetes. The result indicated the endophytic fungi of *C. hainanensis* show a degree of tissue specificity. There were significant differences about the quantity, genera and composition between the fungi isolated from bark and those from branches and leaves.

**Keywords:** *Cephalotaxus hainanensis* L., Endophytic fungi, Isolation, Identification

海南粗榧(*Cephalotaxus hainanensis* L.)为三尖杉科(Cephalotaxaceae)三尖杉属(即粗榧属) (*Cephalotaxus*)植物, 别名薄叶三尖杉、红壳松、薄叶篦子杉<sup>[1]</sup>。该科仅有三尖杉 1 属共 9 个种, 主要分布在亚洲东部至南亚次大陆, 我国分布最为集中, 有 7 个种和 3 个变种。该属的海南粗榧、三尖杉(*C. fortunei*)、中国粗榧(*C. sinensis*)、篦子三尖杉(*C. oliveri*)

等多种植物中含有三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱、异三尖杉酯碱和脱氧三尖杉酯碱等具有抗癌活性的三尖杉酯类生物碱成分, 其中高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱已成为治疗白血病的临床药物<sup>[2]</sup>。海南粗榧是三尖杉属中分布最南的一个种, 研究表明其抗癌活性成分含量在国产种中是最高的<sup>[3]</sup>, 但因其生长缓慢, 加之过度采伐, 目前数量稀少, 已成为国家二

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30560018); 973 计划前期研究专项(No. 2007CB116306)

\* 通讯作者: Tel: 0898-66988061; ✉: meiwenli@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-01-31; 接受日期: 2008-04-10

级保护植物。由于半合成路线长、总收率偏低等原因,临床使用的三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的实际生产仍然主要从三尖杉属植物中提取<sup>[2]</sup>,而可供药用的植物资源已经极其有限。以中国人民解放军第一八七医院为主要研发单位研制成功的海南粗榧生物碱抗癌针剂,由于生产原料的奇缺和限制而被迫停产多年。巨大的临床需求与有限的天然资源的矛盾激发人们不断寻找新的药用资源。植物内生真菌作为一类应用前景广阔的资源微生物正受到越来越多的关注。已有研究表明内生真菌普遍存在于植物体中<sup>[4]</sup>,且有可能产生与宿主植物相同或具有相似生理活性的代谢产物<sup>[5,6]</sup>。目前已有报道从三尖杉属其他植物中分离到内生真菌,并筛选到具有抗肿瘤活性的菌株<sup>[7]</sup>。本文首次对海南粗榧的树皮、枝和叶进行内生真菌的分离鉴定,希望从中筛选到产三尖杉酯类生物碱或其他抗肿瘤活性成分的菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 来源:**海南粗榧(*Cephalotaxus hainanensis* L.)健康的树皮、枝、叶,于2005年6月采自海南省尖峰岭自然保护区内海拔800 m的热带雨林,由中国热带农业科学院热带生物技术研究所代正福副研究员鉴定,凭证标本(No. CE20050612)保存在中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

**1.1.2 培养基:**马铃薯葡萄糖培养基(PDA),其中分离培养基中添加链霉素(50 U/mL)抑制细菌生长。

### 1.2 方法

**1.2.1 内生真菌的分离:**取海南粗榧健康的树皮、枝、叶,洗净晾干后在无菌条件下用75%乙醇浸泡3 min,无菌水漂洗,再用0.1%升汞浸泡10 min~15 min,无菌水漂洗5次,无菌滤纸吸干水分后备用。将树皮切成0.5 cm×0.5 cm的小块,枝及叶切成1 cm左右的小段接入新鲜的加有链霉素的PDA培养基,置28℃培养箱中培养3 d~7 d。待切口处长出菌丝,即转接至新鲜PDA培养基,采用菌丝顶端纯化法逐步纯化。同时做对照实验:将表面消毒后的树皮、枝、叶不作切割置相同条件下培养,结果无任何微生物长出,证明表面消毒彻底,分离到的真菌是海南粗榧的内生真菌。

**1.2.2 分类鉴定:**根据内生真菌主要的群体形态特

点(包括菌落大小、颜色、表面特征、质地)和个体形态特点(包括菌丝、子实体和孢子形态),参考文献[8]和[9]对其分类地位进行了鉴定。

## 2 结果

从海南粗榧植物中共分离获得72株内生真菌。经菌落特征与显微形态观察,将其中68株归为半知菌类,产孢的33株鉴定为5个属,以刺盘孢属(*Colletotrichum* sp.)和镰孢霉属(*Fusarium* sp.)为优势种群;未产孢的35株中有1株鉴定为丝核菌属(*Rhizoctonia* sp.),其余的暂定为无孢菌群。另4株在PDA固体培养基上长出子实体,将其归为担子菌纲。初步的鉴定结果见表1,部分真菌的菌落特征与显微形态特征见图1与表2。

海南粗榧树皮所分离的内生真菌与其枝、叶的相比,无论在数量上还是在种群组成上都有较大差异(表1)。从树皮分离到的内生真菌最多,共37株,已鉴定22株,涉及半知菌类的5个属,其中镰孢霉属(*Fusarium* sp.)为优势种群,共10株,担子菌(Basidiomycetes)和葡萄孢属(*Botrytis* sp.)为亚优势种群,各有4株。枝和叶分离到的内生真菌分别为17株和18株,枝所鉴定的9株内生真菌全部是刺盘孢属(*Colletotrichum* sp.);而叶所鉴定的7株内生真菌涉及2个属,6株属于刺盘孢属(*Colletotrichum* sp.),1株属于丝核菌属(*Rhizoctonia* sp.)。

## 3 讨论

本研究表明,海南粗榧的树皮、枝、叶均有内生真菌存在,并且对宿主具有一定的组织专一性。树皮中分离到的内生真菌种群较为丰富,所鉴定的类群中以镰孢霉属(*Fusarium* sp.)为优势种群,而枝和叶中分离到的内生真菌种类较少,以刺盘孢属(*Colletotrichum* sp.)为优势种群。此外,各部位均有较高比例的不产孢菌株存在。有资料显示海南粗榧树皮中的生物碱含量最高,而枝及叶的生物碱含量很低<sup>[3]</sup>,这是否与其不同部位中的内生真菌在种类和数量上的差异存在一定关系,还有待于进一步的研究确证。

本次研究的海南粗榧采集自热带雨林地区,其内生真菌多样性与文献报道的产于温带地区宁陕秦岭的中国粗榧的内生真菌多样性相比具有差异。海

南粗榧内生真菌优势种群为刺盘孢属和镰孢霉属, 树皮内生真菌种群最为丰富。中国粗榧内生真菌的优势种群为链格孢属和镰孢霉属, 叶部的最为丰富<sup>[10]</sup>。这与刺盘孢属是常见的热带地区植物内生真菌, 链格孢属是常见的温带地区植物内生真菌<sup>[4]</sup>的报道一致, 体现了同属植物的内生真菌类群的分布在不同气候条件地区的差别。同时, 从这两种植物中均分离鉴定到丰富的镰孢霉属真菌, 说明此属真菌可能普遍存在于该属植物中。可以推断, 植物内生真菌的数量和种类既与植物自身状况, 也与其所处环境密切相关。

已有研究表明三尖杉属植物内生真菌能够产生

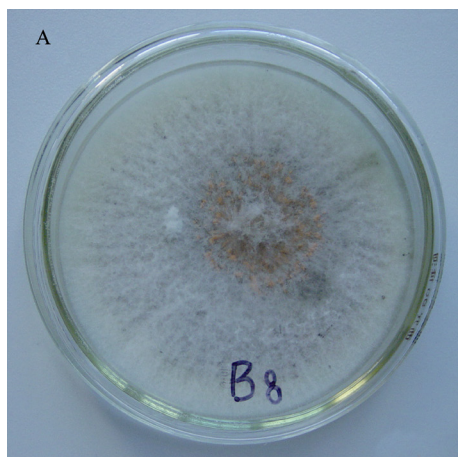
具抗肿瘤活性的化合物<sup>[11,12]</sup>。何玉华等<sup>[11]</sup>已从分离自粗榧的内生真菌 HCCB1621 中获得 1 个具有抗肿瘤活性的杂环类单体化合物。方美娟等<sup>[12]</sup>采用 HPLC-MS-MS 等技术分析确认三尖杉植物内生真菌 C56 和 C65 的发酵液中含有抗肿瘤化合物 Brefeldin A。我们对海南粗榧内生真菌的发酵产物进行了生物碱检测, 并用高三尖杉酯碱为标准品, 经薄层层析和 HPLC 检测<sup>[13]</sup>筛选到一些可能含有高三尖杉酯碱或其类似化合物的菌株。我们已对其中的 S26 菌株进行了化学成分研究, 并分离到异香豆素、麦角甾醇等类型的化合物<sup>[14]</sup>。对其他菌株的化学成分研究仍在继续。

表 1 海南粗榧内生真菌的种群、数量与种类分布  
Table 1 Quantity, genera and composition of endophytic fungi from *C. hainanensis*

纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	分离部位/株 Isolated section / Strains			合计/株 Total/Strains
				树皮 Bark	枝 Branches	叶 Leaves	
半知菌类 Fungi Imperfecti	从梗孢目	从梗孢科	青霉属( <i>Penicillium</i> sp.)	1	0	0	1
			葡萄孢属( <i>Botrytis</i> sp.)	4	0	0	4
		暗梗孢科	弯孢属( <i>Curvularia</i> sp.)	1	0	0	1
		瘤座孢科	镰孢霉属( <i>Fusarium</i> sp.)	10	0	0	10
	黑盘孢目	黑盘孢科	刺盘孢属( <i>Colletotrichum</i> s.)	2	9	6	17
	无孢菌群		丝核菌属( <i>Rhizoctonia</i> sp.)	0	0	1	1
担子菌纲 Basidiomycetes				15	8	11	34
总计/株 Total/Strains				4	0	0	4
				37	17	18	72

表 2 海南粗榧内生真菌形态特征描述  
Table 2 Description about morphological characters of endophytic fungi from *C. hainanensis*

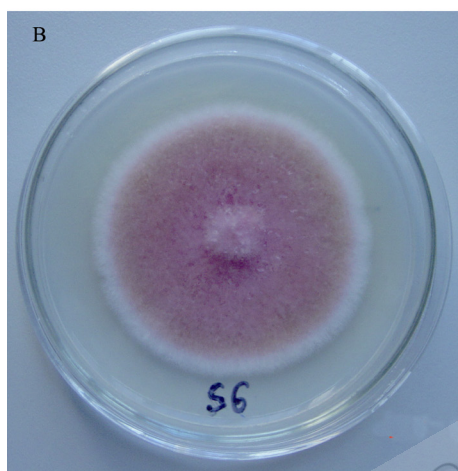
属 Genus	菌落特征 Colony character	显微形态特征 Microscopical morphological characters
刺盘孢属 <i>Colletotrichum</i>	菌落初为白色, 多渐变为灰黑色	分生孢子盘中有暗色刚毛, 分生孢子梗不分枝, 分生孢子单细胞, 椭圆形
镰孢霉属 <i>Fusarium</i>	菌落为红、黄色, 气生菌丝棉絮状	大型分生孢子多细胞, 微弯或两端尖而弯曲显著, 镰刀形; 小型孢子多数单细胞, 卵形或长圆形
葡萄孢属 <i>Botrytis</i>	菌落淡黄色, 菌丝紧密	分生孢子梗单枝以至树状分枝。分生孢子丛生于枝端, 单细胞, 球形、椭圆形或圆筒形, 无色或淡褐色
青霉属 <i>Penicillium</i>	菌落初白色, 渐变为墨绿色, 易生绿色孢子分	分生孢子梗从菌丝上垂直长出, 顶端排列成帚状, 一轮或多轮分枝, 分生孢子串生, 无色, 球形
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	菌落边缘白色, 中部淡褐色, 菌丝疏松	菌丝在分枝处略缢束, 离此不远处形成隔膜, 菌核从菌丝生出, 褐色, 表面粗糙, 内外颜色一致, 不形成无性孢子
弯孢属 <i>Curvularia</i>	菌落边缘白色, 中部粉红色, 菌丝疏松	分生孢子暗色, 梭形, 3~5 个细胞, 两端细胞色较淡, 多数弯曲, 中部的 2~3 个细胞较大, 色较浓



A: 刺盘孢属真菌菌落  
A: Colony of *Colletotrichum* sp.



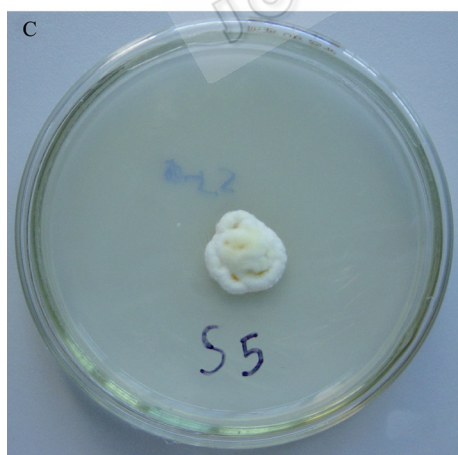
A': 刺盘孢属真菌分生孢子 ( $\times 40$ )  
A': Conidia of *Colletotrichum* sp. ( $\times 40$ )



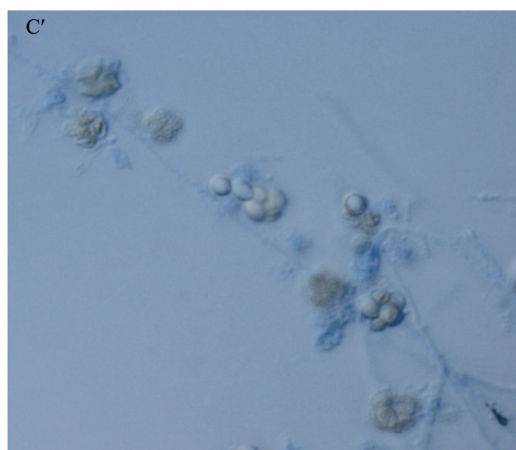
B: 镰孢霉属真菌菌落  
B: Colony of *Fusarium* sp.



B': 镰孢霉属真菌大型分生孢子 ( $\times 100$ )  
B': Macroconidia of *Fusarium* sp. ( $\times 100$ )

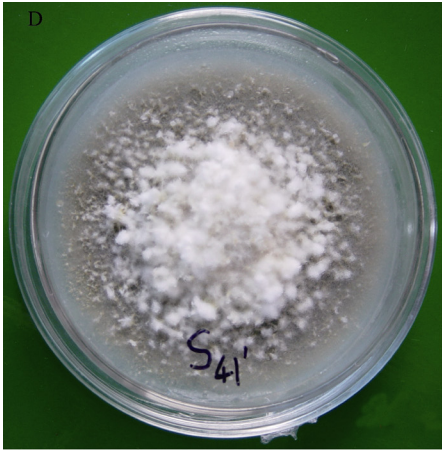


C: 葡萄孢属真菌菌落  
C: Colony of *Botrytis* sp.

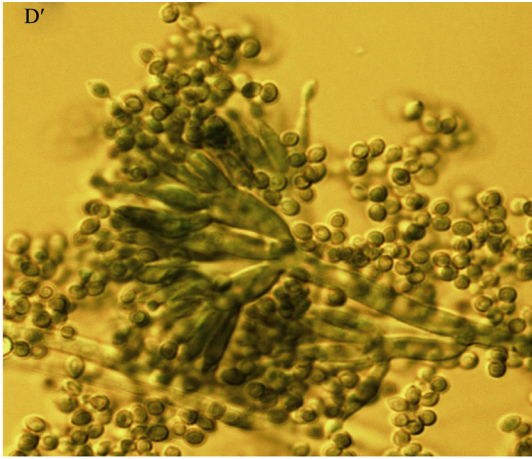


C': 葡萄孢属真菌分生孢子 ( $\times 100$ )  
C': Conidia of *Botrytis* sp. ( $\times 100$ )

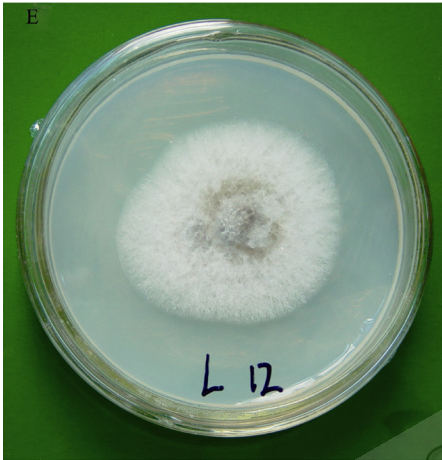




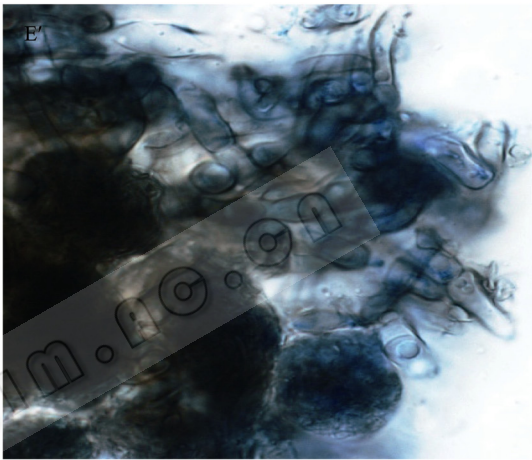
D: 青霉属真菌菌落  
D: Colony of *Penicillium* sp.



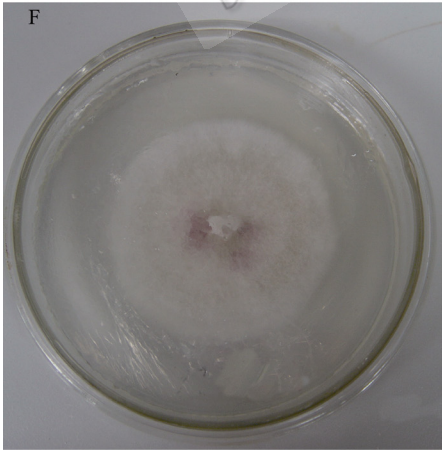
D': 青霉属真菌分生孢子梗及分生孢子(× 100)  
D': Conidiophores and conidia of *Penicillium* sp. (× 100)



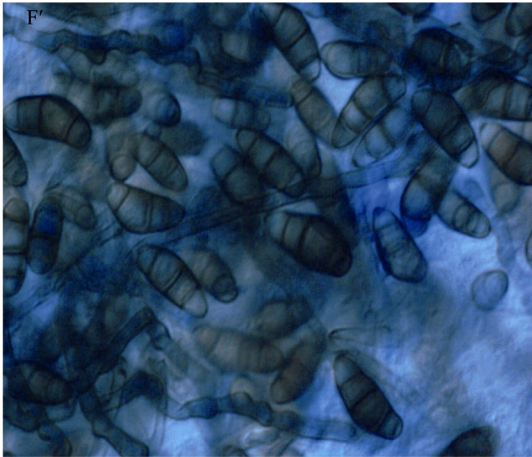
E: 丝核菌属真菌菌落  
E: Colony of *Rhizoctonia* sp.



E': 丝核菌属真菌菌丝及菌核(× 40)  
E': Mycelia and sclerotia of *Rhizoctonia* sp. (× 40)



F: 弯孢霉属真菌菌落  
F: Colony of *Curvularia* sp.



F': 弯孢霉属真菌分生孢子(× 100)  
F': Conidia of *Curvularia* sp. (× 100)

图 1 海南粗榧内生真菌菌落及显微形态照片  
Fig. 1 Photos of colony and microscopical morphological characters of endophytic fungi from *C. hainanensis*





<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

## 参 考 文 献

- [1] 广东省植物研究所编著. 陈焕镛. 海南植物志. 第一卷. 北京: 科学出版社, 1964, p.220.
- [2] 梅文莉, 戴好富, 吴 娇. 三尖杉属植物化学成分与药理活性研究进展. 中草药, 2006, 37(3): 452-458.
- [3] 中国医学科学院药物研究所编著. 中草药现代研究. 第二卷. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996, p.143, 128.
- [4] 郭良栋. 内生真菌研究进展. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D, *et al.* Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanal*, an endophytic fungus of *Pacific yew*. *Science*, 1993, 260: 214-216.
- [6] 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. 中国医药生物技术, 2007, 2 (4): 254-259.
- [7] 李桂玲, 王建锋, 黄耀坚, 等. 植物内生真菌抗肿瘤活性菌株的筛选. 菌物系统, 2001, 20 (3): 387-391.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1982, pp.258, 468-476, 495, 501-512, 513-516, 560-561, 609-639, 645-647.
- [9] 巴尼特 HL, 亨特 BB 著. 沈崇尧译. 半知菌属图解. 北京: 北京科学出版社, 1977, pp.72-73, 92-93, 120-121, 128-129, 202-203, 210-211.
- [10] 朱明旗, 边 洋, 苏 静. 中国粗榧内生真菌多样性研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(zl): 244.
- [11] 何玉华, 戈 梅, 盛下放, 等. 一株抗肿瘤活性的粗榧内生真菌的鉴定及其产物特性初步研究. 生命科学研究, 2007, 11(3): 233-237.
- [12] 方美娟, 王建锋, 赵玉芬, 等. 用 HPLC-MS-MS 快速分析和鉴定三尖杉植物内生真菌发酵液中的 Brefeldin A. 分析测试学报, 2005, 24 (1): 21-24.
- [13] 王慕邹, 张丽艳. 三尖杉属植物中生物碱的高效液相色谱测定. 药物分析杂志, 1991, 11: 333.
- [14] 陈 苹, 吴 娇, 戴好富, 等. 海南粗榧内生真菌 S26 化学成分研究. 中国药物化学杂志, 2008, 18(4): 81-85.

## 征订启事

## 2009 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 全年定价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订 阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。 汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401 收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn 请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>