

产喜树碱内生真菌的筛选及鉴定

王玉美 陈洪章*

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室 北京 100190)

摘要: 从喜树 *Camptotheca acuminata* 树皮和果实中分离得到 27 株内生真菌, 发酵后经 HPLC 检测, 筛选出一株菌丝产喜树碱的菌, 产量达 774 $\mu\text{g/L}$ 。对其 ITS 序列进行系统发育分析, 结合其培养特征和显微特征, 鉴定为拟茎点霉属(*Phomopsis* sp.)。这是首次报道分离自喜树的该属真菌发酵产喜树碱。

关键词: 喜树, 内生真菌, 喜树碱, 拟茎点霉属, 系统发育分析

Isolation and identification of a camptothecin-producing endophytic fungus from *Camptotheca acuminata*

WANG Yu-Mei CHEN Hong-Zhang*

(National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: 27 endophytic fungi were isolated from the barks and fruits of *Camptotheca acuminata* and then cultured in submerged fermentation. The fermentation products of each strain were analyzed with high performance liquid chromatography (HPLC) which showed that one produced camptothecin with the output of 774 $\mu\text{g/L}$. The strain was identified as *Phomopsis* sp. by phylogenetic analysis based on ITS rDNA and cultural and morphological characteristics. This was the first report that *Phomopsis* sp., which was isolated from *Camptotheca acuminata*, produced camptothecin.

Keywords: *Camptotheca acuminata*, Endophytic fungi, Camptothecin, *Phomopsis* sp., Phylogenetic analysis

喜树碱(Camptothecin, CPT)是 1966 年 Wall 等^[1]从中国珙桐科植物喜树 *Camptotheca acuminata* 中提取的一种具有抗肿瘤活性的吲哚类生物碱, 对治疗结肠癌、卵巢癌等恶性肿瘤有很好的疗效。喜树中

CPT 含量很低(0.01%–0.10%)^[2], 大量砍伐喜树, CPT 仍然供不应求, 而且导致植被破坏、生态失衡等问题。自 Hsiang 等^[3]揭示了喜树碱的抑癌机理后, 化学全合成 CPT 取得成功, 但合成路线长、产率低、

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2004CB719700); 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(No. KJXC2-SW-206); “十一五”国家科技支撑计划项目(No. 2007BAD39B01)

* 通讯作者: Tel: 86-10-82627067; Fax: 86-10-82627071; ✉: hzhchen@home.ipce.cas.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>
收稿日期: 2010-10-08; 接受日期: 2010-12-20

成本高而较难工业化。因此, 开发 CPT 的新药源成为国内外研究的热点问题。

利用微生物发酵技术合成 CPT, 提高 CPT 产量成为目前研究的重要趋势, 而植物内生菌由于具有合成与宿主植物相同或相似活性成分的功能成为研究的焦点。植物内生菌是指生活史中的某一阶段或全部阶段生活在健康植物组织或器官内部, 但对植物没有引起明显病害症状的微生物^[4]。内生菌长期生活在宿主植物细胞或细胞间隙的特殊环境中, 与宿主之间相互影响, 发生基因传递, 具有与宿主相同或相似的代谢产物合成途径。喜树内生菌的研究始于 Puri 等^[5]首次从臭味假柴龙树 *Nothapodytes foetida* 中分离到内囊霉属 *Entrophospora infrequens* 真菌发酵产 CPT; 之后, Kusari 等^[6]和 Shweta 等^[7]分别从喜树 *Camptotheca acuminata* 树皮和茶茱萸科柴龙树 *Apodytes dimidiata* 中筛到产 CPT 及其类似物的腐皮镰刀菌属 *Fusarium solani* 真菌, 但所筛菌株发酵产物产量较低而且发酵周期较长。本文以喜树为材料, 从多株不同部位采集的树皮和果实中分离内生真菌, 期望筛选高产 CPT 的内生真菌, 并对筛到的产 CPT 菌株进行鉴定, 为其后续发酵研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

喜树 *Camptotheca acuminata* 树皮和果实, 2009 年 9 月从昆明植物研究所植物园内多株喜树的不同枝条采集, -20 °C 保存。

1.2 仪器与试剂

高效液相色谱(HPLC)仪: Agilent 1200 型, AminexC-18 柱由 Bio-Rad Laboratories 生产。

乙腈为液相色谱纯, 其他药品均为分析纯, 喜树碱标准品购于上海同田生物技术有限公司, 纯度 >98%, 配成 0.21 g/L 的标准品保存。

1.3 培养基

分离培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato dextrose agar, PDA)。

分类鉴定培养基:

(1) 马铃薯葡萄糖琼脂培养基;

(2) PDA+0.5%酵母膏;

(3) 麦芽汁琼脂培养基(Malt wort agar, WA);

(4) 察氏琼脂培养基(Cazpek agar, CA);

(5) 察氏酵母膏琼脂培养基(Cazpek yeast extract agar, CYA);

(6) 麦芽提取物琼脂培养基(Malt extract agar, MEA);

(7) 甘油硝酸盐琼脂培养基(25% Glycerol nitrate agar, G25N): CYA+25%甘油;

(8) 麦芽提取物酵母膏葡萄糖琼脂培养基(Malt yeast extract glucose agar, MY10G)。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, MgSO₄ 5, KH₂PO₄ 5, pH 6.8。

液体培养基中不加琼脂, 其余均同固体培养基。

1.4 方法

1.4.1 内生真菌的分离与纯化: 喜树树皮和果实依次进行以下处理: 无菌水冲洗表面尘土, 75%乙醇浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3-5 次; 0.1%升汞浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3-5 次; 无菌刀将上述材料剪切成 0.5 cm×0.5 cm 小块, 接到 PDA 平板上, 28 °C-30 °C 培养; 同时将不做剪切、表面消毒的材料接到 PDA 平板上平行培养, 用以检查消毒是否彻底。待样品周围明显长出菌落, 挑取不同形态的菌落转到 PDA 平板筛选单菌落。将单菌落转接到试管斜面, 分别编号, 28 °C-30 °C 纯化培养 2-3 d, 储藏备用。

1.4.2 内生真菌的发酵培养: 将分离的内生真菌接种于试管斜面, 28 °C-30 °C 活化 48 h; 活化后接种于装有 50 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C-30 °C、170 r/min 振荡培养 4-6 d。

1.4.3 喜树碱的提取及 HPLC 分析: 所有菌株发酵结束后分离菌丝和发酵液, 菌丝于 60 °C 烘干后粉碎, 加入 70% (V/V)乙醇超声提取 20 min, 离心收集上清液; 发酵液直接加入乙醇提取。然后在真空度为 0.08 MPa、60 °C 用旋转蒸发仪除去乙醇, 收集析出物加入萃取剂(氯仿:甲醇=4:1, V/V)静置萃取, 收集下相溶液 HPLC 进样检测。

HPLC 色谱柱为 Phenomenex Gemini C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)柱, 流动相为乙腈:水(30:70,

V/V), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 20 μ L, 紫外检测器的检测波长为 254 nm。

1.4.4 内生真菌的形态观察: 菌株 B29 在 1.3 中 A1-A8 培养基平板上连续培养, 观察其菌落特征, 显微镜下观察菌丝特征及孢子的产生及其形态特征。

1.4.5 内生真菌的系统发育分析: (1) 内生真菌 DNA 的提取: CTAB 法提取真菌总 DNA^[8]。(2) PCR 扩增: 以 ITS4 和 ITS5 为引物扩增真菌 ITS 区, 扩增反应体系为 100 μ L, 10 \times 扩增缓冲液 10 μ L, dNTPs (每种 2.5 mmol/L) 8 μ L, 引物(10 μ L/L)各 2.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 1.3 μ L, 无菌超纯水补足总体积 100 μ L。ITS 区扩增反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物的纯化及序列测定由上海基康生物技术有限公司完成。(3) 系统发育分析: 将 ITS 区序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行比对, 获取相关序列, 并与测定序列一起用 ClustalX (1.83)软件进行序列比对。以 MEGA 3.1 的 p-distance 模型计算进化距离, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 并计算 Bootstrap 值。

2 结果

2.1 内生真菌的分离纯化与产喜树碱菌株的筛选

从喜树树皮和果实中共分离、纯化得到 27 株内生真菌, 编号为 B11-B29 及 F01-F08。不做剪切的材料周围无菌长出, 说明材料消毒彻底, 分离的菌株确是植物内生菌。

菌株 B29 菌丝提取物的 HPLC 图谱中出峰时间为 8.483 min 左右的峰与 CPT 标准品出峰时间(8.475 min)非常相近(图 1), 因此判断该菌发酵后产生 CPT, 且产量为 774 μ g/L; 但其发酵液提取物中未检测到 CPT。其它菌株发酵后菌丝及发酵液提取物中均未检测到 CPT。

2.2 内生真菌 B29 的形态特征及系统发育分析

2.2.1 菌落形态: 采用 8 种分类鉴定培养基培养菌株 B29, 并对其菌落形态、菌丝特征及孢子的有无进行观察。

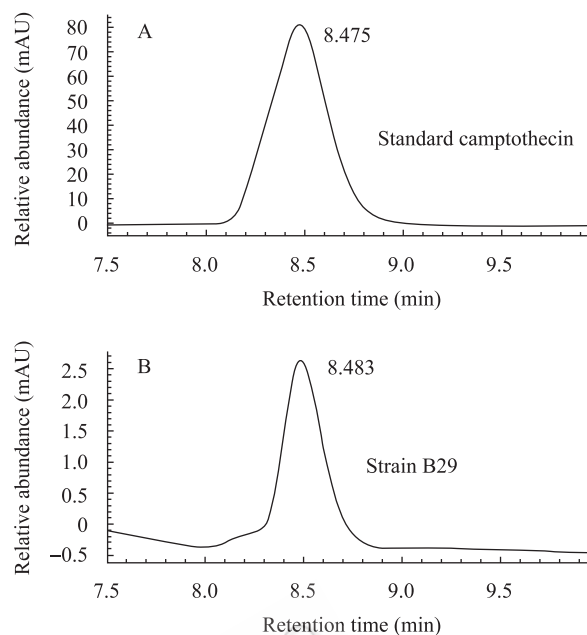


图 1 喜树碱标准品(A)和菌株 B29 菌丝提取物(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of standard camptothecin (A) and mycelia extraction of B29 (B)

菌株 B29 (图 2A)在 PDA 平板上培养 4 d 菌落直径达到 6 cm, 气生菌丝白色绒毛状, 向四周发散生长, 边缘较整齐, 6 d 后出现浅黄色。液体培养 2 d 菌丝球呈白色, 直径达 6 mm-8 mm, 培养液澄清。显微镜检(图 2B)菌丝无色、有隔, 长而直或稍弯曲, 直径约 1 μ m-2 μ m, 多分枝, 未发现有性或无性孢子。

2.2.2 菌株 B29 的系统发育分析: 根据菌株 B29 培养特征和显微特征, 以 *Sphaeropsis sapinea* CBS109943 (DQ458898)为外群, 构建菌株 B29 与相关近缘菌株的 ITS 区 rDNA 系统发育树(图 3)。系统发育分析结果表明: 菌株 B29 与拟茎点霉属 (*Phomopsis*)内的 *Phomopsis oryzae* 和间座壳属 (*Diaporthe*)内的 *Diaporthe phaseolorum* var. *phaseolorum* 聚在一个分支, 支持率为 100%, 并且与 2 个种的序列同源性分别为 98.8%和 97.9%, 拟茎点霉属菌种的有性型隶属于间座壳属, 因此鉴定该菌为 *Phomopsis* sp.。

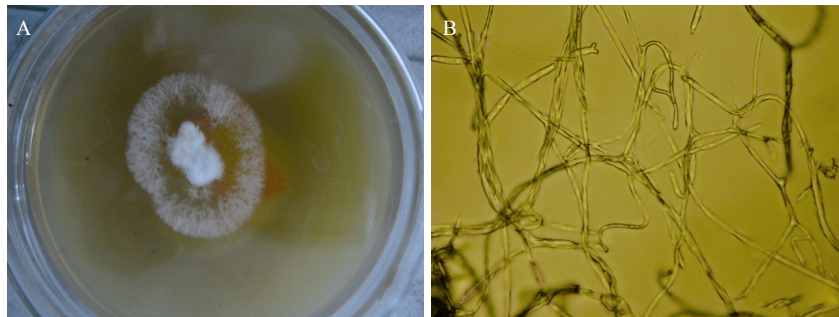


图 2 菌株 B29 在 PDA 上的菌落特征(A)及菌丝形态(B, ×40)
Fig. 2 Morphology of colony (A) and hyphae (B, ×40) of B29 on PDA

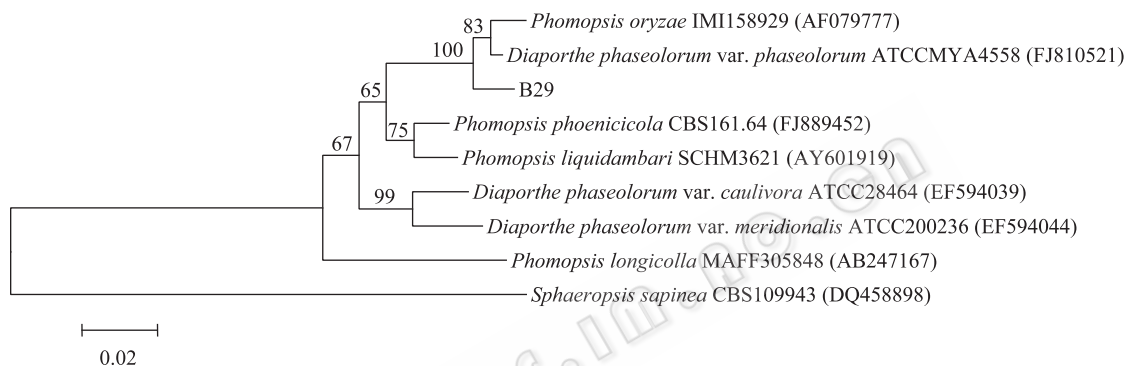


图 3 菌株 B29 与相关种的 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree inferred from Neighbour-Joining analysis of ITS rDNA sequence of B29 and its closest matches in the GenBank

注: 数字代表自展值; 图例为遗传距离; 括号内为基因库的序列号。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. 0.02% is nucleotide substitutions per site. In brackets are the GenBank accession number.

3 讨论

本文从喜树 *Camptotheca acuminata* 树皮和果实分离的内生真菌中筛选到一株产喜树碱的内生真菌 B29, 该菌株发酵喜树碱产量达 774 $\mu\text{g/L}$ 。系统发育分析鉴定其为 *Phomopsis* sp.。拟茎点霉属 (*Phomopsis*) 属于半知菌亚门, 分布广泛, 是植物内生菌的一个重要类群, 其活性代谢产物非常丰富, 主要有抗微管剂^[9]、抗疟剂^[10]、抗菌剂^[11]、细胞生长调节剂^[12]等。邓等^[13]从喜树中分离到 4 株 *Phomopsis acuminata* 内生真菌; Lin 等^[14]从喜树中分离到 174 株内生菌, 其中 *Phomopsis* 占 6.9%; Tan 等^[15]对分离自喜树枝条的拟茎点霉 NXZ-05 的次级代谢

产物进行了研究; Liu 等^[16]发现分离自喜树的一株 *Phomopsis* sp. 能够耐受 10 mg/L 的喜树碱。而本文首次报道分离自喜树的该属真菌发酵产喜树碱。

Puri 等^[5]筛选的真菌发酵 6-7 d 喜树碱产量为 18 mg/g 提取物, Kusari 等^[6]筛选的菌株发酵 5 d 喜树碱产量达 6 $\mu\text{g/g}$ 菌丝干重, Shweta 等^[7]筛选到 2 株产喜树碱的真菌, 发酵 4 d 喜树碱产量分别是 37 $\mu\text{g/100 g}$ 和 53 $\mu\text{g/100 g}$ 菌丝。菌株 B29 发酵 4 d 喜树碱产量达 23.45 $\mu\text{g/g}$ 菌丝干重。但产量不到 1 mg/L, 使得大量制备喜树碱存在很大问题, 很难实现工业化。但该菌生长能力强, 在 2% 葡萄糖培养基液态培养 4 d 生物量达到 1.5 g/L 发酵液, 发酵周期相对较短, 发酵条件的优化正在实验中。

参 考 文 献

- [1] Wall ME, Wani MC, Cook CE, et al. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*[J]. Journal of the American Chemical Society, 1966, 88(16): 3888–3890.
- [2] Liu ZJ, Carpenter SB, Bourgeois WJ, et al. Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata*[J]. Tree Physiology, 1998, 18(4): 265–270.
- [3] Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I[J]. Journal of Biological Chemistry, 1985, 260(27): 14873–14878.
- [4] Petrini O. Fungal Endophytes of Tree Leaves[M]. New York: Springer-Verlag, 1991: 179–197.
- [5] Puri SC, Verma V, Amna T, et al. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin[J]. Journal of Natural Product, 2005, 68(12): 1717–1719.
- [6] Kusari S, Zühlke S, Spitteller M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues[J]. Journal of Natural Product, 2009, 72(1): 2–7.
- [7] Shweta S, Zuehlke S, Ramesha BT, et al. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin[J]. Phytochemistry, 2009, 71(1): 117–122.
- [8] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6): 72–73.
- [9] Kobayashi H, Meguro S, Yoshimoto T, et al. Absolute structure, biosynthesis, and anti-microtubule activity of phomopsidin, isolated from a marine-derived fungus *Phomopsis* sp.[J]. Tetrahedron, 2003, 59(4): 455–459.
- [10] Isaka M, Jaturapat A, Rukseree K, et al. Phomoxanthones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species[J]. Journal of Natural Product, 2001, 64(8): 1015–1018.
- [11] Elsässer B, Krohn K, Flörke U, et al. X-ray structure determination, absolute configuration and biological activity of phomoxanthone A[J]. European Journal of Organic Chemistry, 2005, 2005(21): 4563–4570.
- [12] Wells JM, Cutler HG, Cole RJ. Toxicity and plant growth regulator effects of cytochalasin H isolated from *Phomopsis* sp.[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1976, 22(8): 1137–1143.
- [13] 邓静, 刘吉华, 余伯阳. 具有生物碱转化活力的 4 株喜树内生真菌的鉴定[J]. 药物生物技术, 2006, 13(6): 436–441.
- [14] Lin X, Lu CH, Huang YJ, et al. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity[J]. World Journal of Microbiol Biotechnology, 2007, 23(7): 1037–1040.
- [15] Tan QF, Yan XF, Lin X, et al. Chemical constituents of the endophytic fungal strain *Phomopsis* sp. NXZ-05 of *Camptotheca acuminata*[J]. Helvetica Chimica Acta, 2007, 90(9): 1811–1817.
- [16] Liu WZ, Reinscheid UM. Camptothecin-resistant fungal endophytes of *Camptotheca acuminata*[J]. Mycological Progress, 2004, 3(3): 189–192.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 x , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 SE 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。