

# 虎杖内生真菌产白藜芦醇苷菌株的分离鉴定

彭浩<sup>1,2</sup> 邓百万<sup>1</sup> 陈文强<sup>1</sup> 陈福生<sup>2\*</sup> 刘开辉<sup>1</sup> 解修超<sup>1</sup> 陈元涛<sup>1</sup>

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院 陕西 汉中 723001)

(2. 华中农业大学 食品科技学院 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 利用组织培养法对秦巴山区虎杖进行内生真菌分离, 通过内生真菌的液体发酵, 对发酵液和菌丝的乙酸乙酯萃取液进行 HPLC 分析检测, 筛选出一株产白藜芦醇苷的菌株 M-56, 其产量达 1.029 mg/L。根据该菌株的形态特征及菌丝 ITS 序列分析, 将该株菌确定为无性型真菌丝孢纲链格孢菌 *Alternaria alternaria*。

**关键词:** 白藜芦醇苷, 内生真菌, 链格孢菌

## Isolation and identification of the endophytic fungus producing polydatin in *Polygonum cuspidatum*

PENG Hao<sup>1,2</sup> DENG Bai-Wan<sup>1</sup> CHEN Wen-Qiang<sup>1</sup> CHEN Fu-Sheng<sup>2\*</sup>  
LIU Kai-Hui<sup>1</sup> XIE Xiu-Chao<sup>1</sup> CHEN Yuan-Tao<sup>1</sup>

(1. School of Biological Science & Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

(2. Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** Endophytic fungi isolated from *Polygonum cuspidatum* in Qinba Mountains, China, were studied in this paper. Screening of metabolites in submerged cultures for these isolates by HPLC showed strain M-56 could produce polydatin with the yield of 1.029 mg/L. According to the morphological characteristics and ITS sequence, we identified the strain as *Alternaria alternaria*.

**Keywords:** Polydatin, Endophytic fungi, *Alternaria alternaria*

白藜芦醇苷(Polydatin), 又名虎杖苷, 是白藜芦醇的葡萄糖苷形式。白藜芦醇苷是虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的有效成分之一, 具有保护心肌细胞、改善微循环、抑制血小板聚集、抵抗内毒素休克、降血脂、抗脂质过氧化、镇咳、平喘

和抗病原微生物等多种药理作用<sup>[1]</sup>。天然白藜芦醇苷主要存在于虎杖等植物中, 并可在微生物的作用下转化为白藜芦醇(Resveratrol)<sup>[2-3]</sup>。与白藜芦醇苷一样, 白藜芦醇同样具有多种生物活性, 普遍存在于葡萄、虎杖、藜芦等植物中<sup>[4-6]</sup>。近年来, 白藜芦

基金项目: 陕西省教育厅科研专项项目(No. 2010JK461); 陕西省教育厅重点实验室科研专项项目(No. 2010JS045); 陕西理工学院科研专项(No. SLG0814)

\* 通讯作者: Tel: 86-27-87282927; E: chenfs@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2010-10-27; 接受日期: 2011-03-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

醇在医药及保健食品方面的应用引起了人们的极大兴趣<sup>[7]</sup>, 极有希望发展成为抗癌新药和新型保健品成分, 被誉为继紫杉醇之后的又一新的绿色抗癌药物<sup>[5,8-9]</sup>。

目前, 获取白藜芦醇及白藜芦醇苷的主要途径有天然药用植物提取法和化学合成法<sup>[10-11]</sup>, 但由于其在植物中含量较低, 且植物生长缓慢, 资源短缺, 生产成本过高, 因而利用天然药用植物提取法有很多限制; 而化学合成法才刚刚起步, 成本过高且容易造成环境污染<sup>[12-13]</sup>。因此, 寻找获取白藜芦醇及白藜芦醇苷的新途径尤为重要。

本文从药用植物虎杖中分离筛选出一株产白藜芦醇(苷)的内生真菌 M-56, 其产量达 1.029 mg/L。通过形态与分子生物学鉴定, M-56 为无性型真菌丝孢纲链格孢菌 *Alternaria alternaria* 真菌。研究结果为采用微生物发酵技术生产白藜芦醇苷奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、仪器及试剂

**1.1.1 材料:** 新鲜虎杖根茎采自陕西勉县同沟寺, 共 9 株。

**1.1.2 培养基:** CPDA 培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 5.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.0, 琼脂 18.0, pH 自然。

发酵培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.0,  $\text{VB}_1$  0.01,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0, 蛋白胨 3.0, 酵母粉 0.8, pH 自然。

查氏(Czapek)培养基(g/L):  $\text{NaNO}_3$  2.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{KCl}$  0.5,  $\text{MgSO}_4$  0.5,  $\text{FeSO}_4$  0.01, 蔗糖 30.0, 琼脂 15.0-20.0, pH 6.7。

**1.1.3 主要试剂:** 乙酸乙酯(分析纯)、乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、超纯水。白藜芦醇苷标准对照品(99%, Sigma 公司)。

**1.1.4 主要仪器:** 高效液相色谱仪(美国惠普 Agilent-1100), 人工气候箱(中国广东 LRH-250-GS), 旋转蒸发器(德国 IKA RV-10), 双层恒温培养振荡器(上海智城 ZHWY-2102C), 高级生物显微镜(日本尼康 Nikon E600), 超净操作台(中国苏州 SWCT-1F),

超声波细胞破碎仪(美国必能信 S-450DE), 高速离心机(上海安亭 TGL-16C)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 内生真菌的分离与纯化:** 将新鲜虎杖的根状茎在自来水下冲洗干净, 沥干水分, 剪去须根, 切割成 3 cm-4 cm 小段, 表面消毒处理: 75%酒精漂洗 30 s→无菌水冲洗 5 次→0.1%  $\text{HgCl}_2$  漂洗 7 min→无菌水冲洗 5 次。将处理过的根状茎在无菌条件下剥其韧皮部, 剪切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 置于含有 0.1 g/L 氯霉素的 PDA 平板上, 28 °C 培养 3-7 d 后, 可见组织块边缘有菌丝长出, 及时将菌丝转接到 PDA 斜面上纯化培养后备用。同样, 将上述表面消毒过的一部分材料不做剪切, 直接放置于 PDA 平板上作对照培养处理, 结果对照材料周围均无任何菌丝长出, 证明材料表面消毒彻底, 从而保证所分离出的真菌是虎杖的内生真菌。

**1.2.2 白藜芦醇苷提取及分离:** 将从虎杖中分离得到的真菌菌株接种于发酵培养基中, 28 °C、160 r/min 摇床培养 7 d, 抽滤得发酵液及菌丝。以乙酸乙酯在超声波细胞破碎仪中萃取发酵液及干菌丝 30 min, 收集合并乙酸乙酯萃取液, 40 °C 旋蒸至干, 甲醇溶解旋蒸瓶中残留物并定容至 25 mL, 遮光保存。

**1.2.3 白藜芦醇苷的检测及活性菌株筛选:** HPLC 检测标品购自 Sigma 公司, 甲醇定容, 配制成 0.003 6-0.014 4 g/L 的梯度, 绘制标准曲线。色谱条件: 水-乙腈(78:22, V/V)为流动相, 流速 1 mL/min, 检测波长 303 nm, 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 柱温 25 °C, 色谱柱 Accusil C-18 柱(250 mm×4.6 mm, i.d.=10  $\mu\text{m}$ )。精密称取白藜芦醇苷标准品 2.50 mg, 甲醇定容至 25 mL, 得母液浓度为 0.1 g/L, 将母液依次稀释成浓度梯度为 0.003 6、0.007 2、0.010 8、0.014 4 g/L, 吸取 10  $\mu\text{L}$  进样( $n=4$ ), 建立标准曲线。

菌株筛选: 将 1.2.2 的萃取液在上述色谱条件下检测, 对照白藜芦醇苷标准品的保留时间对产白藜芦醇苷活性物质的菌株进行筛选。

**1.2.4 M-56 形态观察及初步鉴定:** 将筛选得到的活性菌株接种于查氏培养基平板上, 28 °C 倒置培养 3-7 d, 待平板内长出菌落后, 打开皿盖, 用干净的透明胶带在菌落的不同位置轻轻粘取少量菌丝, 覆

盖在滴有少量生理盐水及乳酸棉兰染液的载玻片上, 在显微镜下观察其形态特征, 并做好记录。同时定期记录菌落生长的情况。

**1.2.5 M-56 的 ITS 序列测定:** 采用 CTAB 方法<sup>[14]</sup>进行菌丝中总 DNA 的提取, 用 DNA 回收试剂盒对琼脂糖凝胶板上的 DNA 进行纯化回收, 再对回收的 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增引物为: ITS1: 5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC-3'。20.0  $\mu$ L PCR 反应体系: 1 $\times$ PCR buffer、2.5 mmol/L  $MgCl_2$ 、0.25 mmol/L dNTPs、引物 ITS1 和引物 ITS4 各 0.25 mmol/L、0.05 U/ $\mu$ L *Taq* 酶, 约 2.5 g/L 基因组 DNA。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}C$  5 min; 94 $^{\circ}C$  1 min, 55 $^{\circ}C$  1 min, 72 $^{\circ}C$  80 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}C$  10 min。将纯化后的 PCR 产物送交上海英骏生物技术有限公司进行双向测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 虎杖内生真菌的分离及纯化

从陕西勉县同沟寺采回的虎杖根茎材料中, 分离纯化得到内生真菌 53 株, 初步鉴定结果表明, 这些内生真菌主要为曲霉 (*Aspergillus*)、青霉 (*Penicillium*)、无孢类 (Agonomycetaceae)、拟盘多毛孢属 (*Pestalotia*) 等 3 目、4 科、8 属的真菌, 且以曲霉属、青霉属及无孢类为优势种群, 这表明该地区虎杖中的内生真菌具有一定的多样性。

### 2.2 活性菌株代谢产白藜芦醇苷的 HPLC 分析

对 53 株虎杖内生真菌的菌丝体与发酵液中代谢产白藜芦醇苷的分析表明, 其中 4 株菌株能产生较高含量白藜芦醇苷。这 4 株中, M56 发酵液中白藜芦醇苷含量最高达 1.029 mg/L, 另外 3 株内生真菌发酵液中白藜芦醇苷的含量约为 40–80  $\mu$ g/L。产白藜芦醇苷的内生真菌约占分离内生真菌总数的 8.0%。

在 1.2.3 描述的色谱条件下, 对分离得到的虎杖内生真菌菌株的发酵液萃取物进行 HPLC 检测, 结果发现菌株 M-56 发酵液萃取物的保留时间为 3.914 min (图 1), 而白藜芦醇苷标准品的保留时间为 3.736 min (图 2)。在菌株 M-56 发酵液萃取物里添加一定量的白藜芦醇苷标准品, 结果在保留时间为 3.795 min 出现白藜芦醇苷的特征峰(图 3), 且

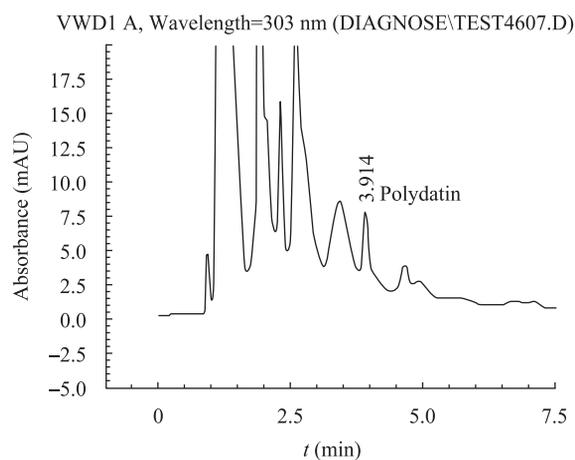


图 1 真菌 M-56 萃取物的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of extracts of the fungus M-56

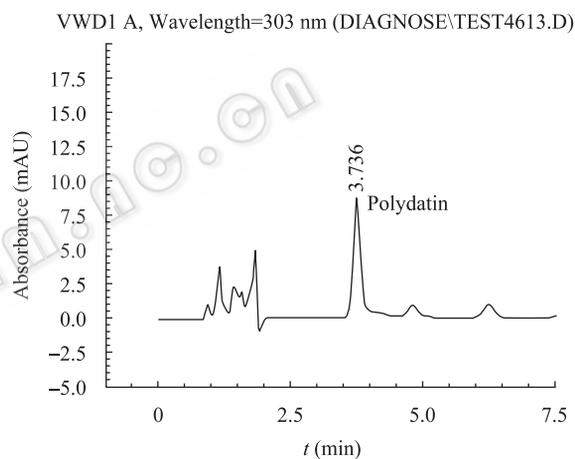


图 2 白藜芦醇苷标准品的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of the reference polydatin

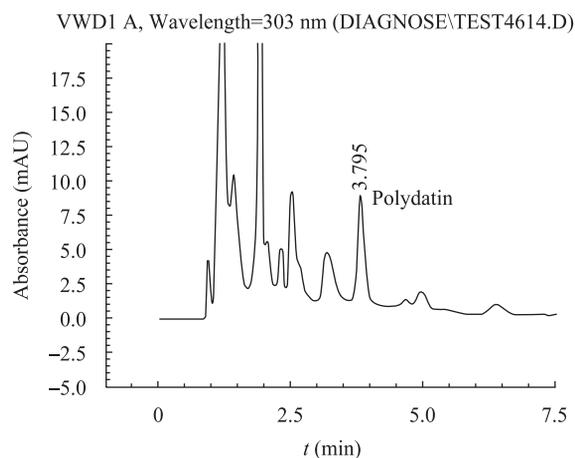


图 3 真菌 M-56 萃取物+标准品的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of extracts of the fungus M-56 and the reference polydatin

吸收明显增强, 这表明 M-56 产生白藜芦醇苷或结构类似物。依照白藜芦醇苷的标准曲线  $y=22.38x+3.94$  ( $r=0.999\ 61$ )(图 4)可知菌株 M-56 产生白藜芦醇苷或结构类似物的量为 1.029 mg/L。

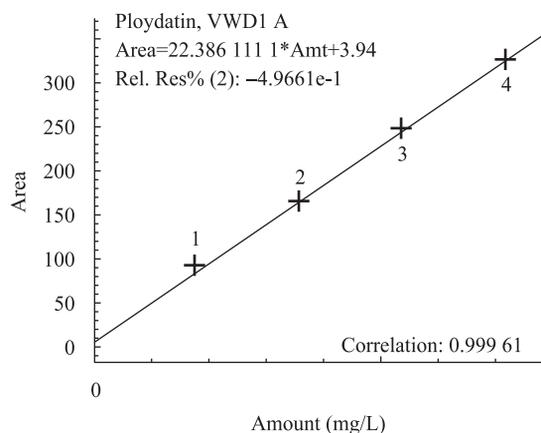


图 4 白藜芦醇苷的标准曲线  
Fig. 4 A standard curve of the reference polydatin

### 2.3 内生真菌 M-56 的形态特征及初步鉴定

将菌株 M-56 转接于查氏培养基上, 28 °C 培养 5 d, 起初 3 d 生长较快, 气生菌丝初为米白色, 较致密, 边缘白色, 后变为灰褐色至黑色, 平展; 初期正反面为白色, 继续培养菌落正面渐变为浅褐色至褐色, 背面为深褐色至黑色, 直径 4 cm–5 cm, 无渗出物(图 5A、B)。后期菌落不再扩展, 菌丝开始老化呈深褐色并产生淡褐色至深褐色孢子。

菌株 M-56 菌丝细长, 分隔, 分枝, 淡色至褐色, 宽 3.5  $\mu\text{m}$ –5.9  $\mu\text{m}$ 。分生孢子梗由菌丝顶端生成, 或从菌丝侧壁产生, 通常比菌丝粗而色深, 直立, 不分枝或有时分枝, 直或弯曲, 单生或簇生, 淡色至褐色, 与菌丝有明显区别(图 5C)。分生孢子链生(图 5C)或单生, 长(19.9–42.4)  $\mu\text{m}$ ×(9.0–14.0)  $\mu\text{m}$ , 淡褐色至深褐色, 卵形或倒棍棒形, 具若干纵横真隔膜, 分隔处不隘缩或不同程度的隘缩, 表面光滑或具疣、刺(图 5D)。

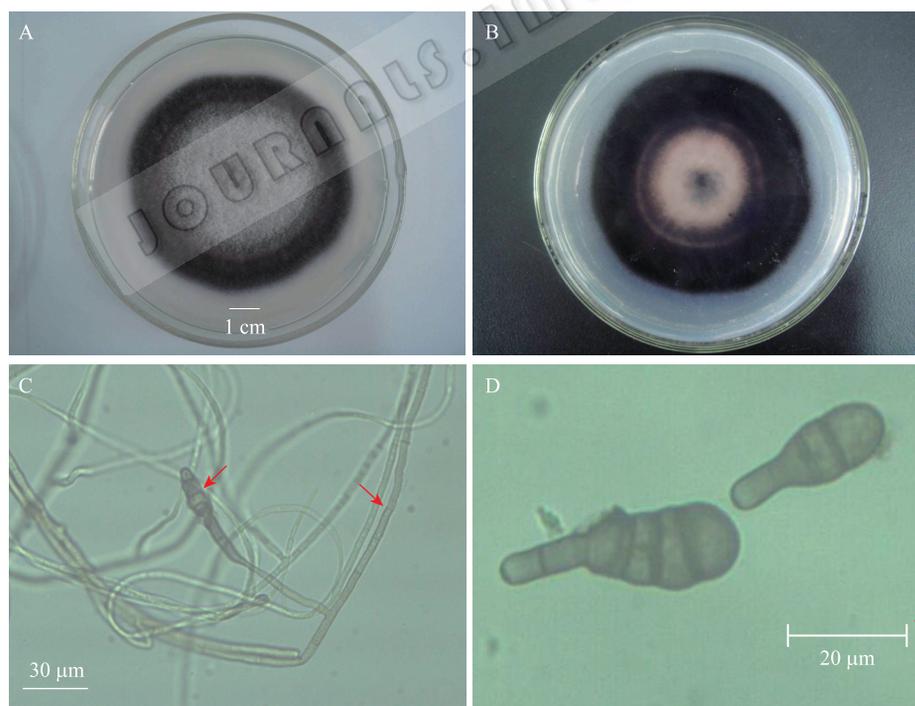


图 5 菌株 M-56 的菌落及培养特征

Fig. 5 Colony and Cultural characteristics of strain M-56

注: A: 正面; B: 背面; C: 菌丝及分生孢子梗; D: 分生孢子。

Note: A: The surface of colony; B: The back of colony; C: Hyphae & Conidiophore; D: Conidia.

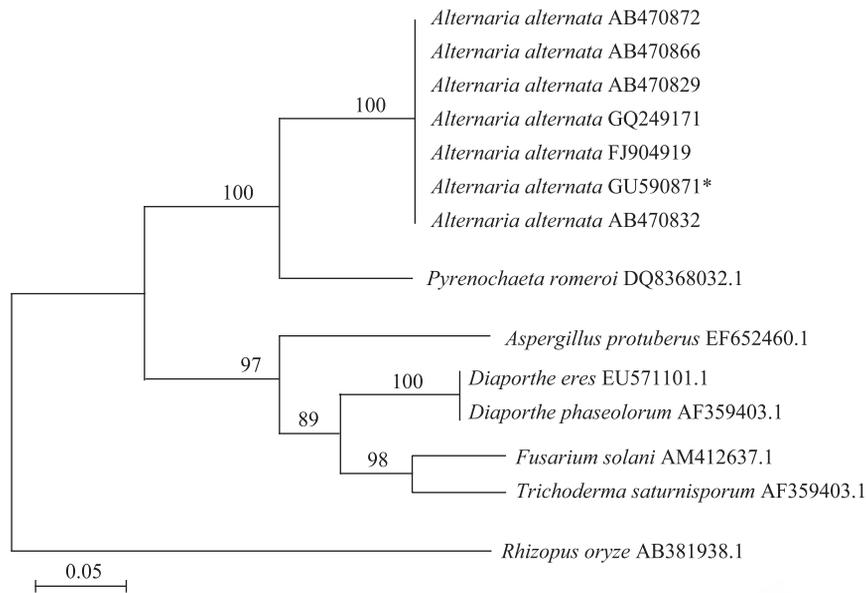


图 6 内生真菌 M-56 的 ITS 系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of endophytic fungus M-56 based on ITS region sequences (Neighbor-Joining)

注: \*: 菌株 M-56.

Note: \*: Fungus M-56.

基于其菌落形态和显微结构特征,依据《中国真菌志》<sup>[15]</sup>初步鉴定菌株 M-56 为链格孢属 (*Alternaria* sp.)真菌。

#### 2.4 内生真菌 M-56 的 ITS 序列分析

利用 ITS 通用引物(ITS1、ITS4)对内生真菌 M-56 的 ITS 序列进行 PCR 扩增,结果获得一长约 550 bp 的单一 DNA 条带,对纯化的 DNA 产物进行测序分析,内生真菌 M-56 的 ITS 序列长为 560 bp。将上述序列提交 GenBank 数据库并进行 BLAST 检索,下载同源性较高的数据,再与 M-56 的 ITS 序列组成一套数据集,用 ClustalX<sup>[16]</sup>软件进行多序列比对并进行人工校正,运行统计分析和系统发育分析软件 MEGA 3.1<sup>[17]</sup>并按照 N-J 法<sup>[18]</sup>聚类构建系统发育树,经自举法检测(重复 1 000 次),得到进化树(图 6)。

内生真菌 M-56 (GU590871)和 NCBI 中的 *Alternaria alternata* (AB470872)、*Alternaria alternata* (AB470866)、*Alternaria alternata* (AB470829)等已有的链格孢属真菌 ITS 序列同源性达到 100% 以上,随机匹配性为 100%,该结果和形态鉴定结果相符,初步可将 M-56 鉴定为链格孢菌 *Alternaria*

*alternata* (Fr.) Keissl。

### 3 讨论

近年来,研究人员相继从红豆杉、长春花、桃儿七等植物中分离出了产活性物质的内生菌,利用内生菌发酵生产与宿主相同或相似的生理活性代谢物质已成为科研人员关注的焦点。而内生真菌产生的生物活性物质存在极大的多样性,如:抗肿瘤、抗病毒、抗细菌、抗真菌、抗虫等,这表明植物内生真菌能够产生与宿主植物相同或结构类似物质,还可能产生结构新颖、功能特殊的次生代谢产物,是新化合物、新药物的潜在资源,它们在医药、工业、农业等领域具有重要的应用前景<sup>[19]</sup>。

作者通过对药用植物虎杖进行内生真菌分离、纯化、液体发酵、活性物质(白藜芦醇苷)的分析检测,并对分离得到的菌株进行筛选,获得了一株产白藜芦醇苷的活性菌株 M-56,其代谢产量为 1.029 mg/L,远高于同类研究中白藜芦醇含量 39.58  $\mu$ g/L、紫杉醇代谢产量 161–448  $\mu$ g/L 的报道<sup>[20–21]</sup>。根据真菌形态特征结合分子生物学手段,初步确定该株菌为无性型真菌丝孢纲链格孢真

菌 *Alternaria alternata*, 此研究结果在国内属首次报道。

该研究为获取白藜芦醇苷等活性物质开辟了新途径, 并为下一步工业化发酵生产白藜芦醇等活性物质奠定了基础, 为摆脱植物资源短缺创造了可能性。

## 参 考 文 献

- [1] 白杨, 潘隽丽, 苏薇薇. 白藜芦醇与白藜芦醇甙的研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(1): 55-59.
- [2] 袁润蕾, 徐萌萌, 孙艳娟, 等. 微生物转化虎杖苷粗提物生成白藜芦醇的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 712-714.
- [3] 王辉. 微生物转化虎杖中白藜芦醇苷及其产物的分离纯化[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2009.
- [4] Jang M, Cai LN, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes[J]. Science, 1997, 275(5297): 218-220.
- [5] Jeandet P, Bessis R, Gautheron B. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages[J]. Am J Enol Vitic, 1991, 42(1): 41-46.
- [6] 赵克森. 白藜芦醇的一般生物学作用[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2002, 29(6): 374-376.
- [7] Filip V, Plocková M, Šmidrkal J, et al. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness[J]. Food Chemistry, 2003, 83(4): 585-593.
- [8] Caruso F, Tanski J, Villegas-Estrada A, et al. Structural basis for antioxidant activity of *trans*-resveratrol: Ab initio calculations and crystal and molecular structure[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(24): 7279-7285.
- [9] 牛培勤, 郭传勇. 白藜芦醇药理作用的研究进展[J]. 医药导报, 2006, 25(6): 524-525.
- [10] 曹庸. 虎杖中白藜芦醇的提取、纯化技术研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2001.
- [11] 王尊元, 马臻, 沈正荣, 等. 白藜芦醇的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(9): 428-429.
- [12] 王盛世, 赵伟杰, 刘志广, 等. 白藜芦醇的化学合成研究[J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14(2): 91-93.
- [13] 李晓光, 王三永, 李春荣, 等. 白藜芦醇合成研究[J]. 中国食品添加剂, 2002(5): 25-27.
- [14] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amp lification and direct sequenceing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//Innins MA, Gelf DH, Sninsky JJ, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [15] 张天宇. 中国真菌志第十六卷链格孢属[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 26-31.
- [16] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The ClustaIX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [17] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Brief Bioinform, 2004, 5(2): 150-163.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogentic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [19] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.
- [20] 唐永红, 姚茂君, 曹庸, 等. 一株产白藜芦醇真菌的分离及培养[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 30-33.
- [21] 郭晓静, 王俊鹏, 宋晓平, 等. 南方红豆杉产紫杉醇内生真菌的分离鉴定[J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1874-1878.