

罗布麻产黄酮内生真菌的筛选与鉴定

范瑛阁^{1,2} 孙晓东² 龚明福³

1. 塔里木大学植物科学学院, 阿拉尔 843300;

2. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 阿拉尔 843300;

3. 乐山师范学院化学与生命学院, 乐山 614000

摘要 以罗布麻叶中内生真菌为研究对象, 用化学显色法和薄层层析显色法对产生黄酮的内生真菌进行筛选, 并根据形态特征对筛选到的内生真菌进行鉴定。结果表明: 内生真菌菌株 P-1 和 P-2 均能产生黄酮; 菌株 P-1 为镰孢菌(*Fusarium* sp.), 菌株 P-2 为嗜松青霉(*Penicillin pinophilum*)。

关键词 罗布麻; 内生真菌; 黄酮; 筛选; 鉴定

中图分类号 S 482.2⁺92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)01-0059-04

罗布麻(*Apocynum venetum*)是一种世界上稀有的野生植物, 自古以来就被国人誉为仙草。罗布麻叶含有大量黄酮、三萜、有机酸、氨基酸等化学成分, 其黄酮化学结构系槲皮素和异槲皮素甙^[1-2]。由罗布麻制成的罗布麻茶是降压美容茶品, 其中以新疆罗布泊地区产出的罗布麻茶效果尤为明显。研究表明, 药用植物内生菌可以产生与宿主相同的活性物质或新的活性物质^[3-4]。目前, 对罗布麻的研究主要集中在对其活性成分分析和相关功能性产品研发, 而对罗布麻内生菌中提取活性物质及其功能性成分的研究报道不多。

植物内生菌是多样性十分丰富的微生物类群, 它们生活在健康植物的各种组织和器官内部的细胞或细胞间隙内而不引起植物病变, 是与寄主植物在长期的共同进化过程中建立起互惠共存、相互制约和谐联合关系的一类微生物^[5]。内生菌具有潜在的应用价值, 但绝大多数植物内生菌还没有被研究, 迄今研究过的植物不过数百种, 这相对自然界存在的 25 万余种植物而言是微不足道的^[6]。随着对药用植物内生菌研究的深入, 人们正在不断地从各种药用植物中分离多种内生菌, 以此发掘内生菌的实用价值。

黄酮类化合物广泛存在于自然界, 是一类重要的天然有机化合物, 具有降血压、降血脂、美容养颜、抗肿瘤、抗 HIV 等功效, 已被应用到医学领域, 具有

良好的开发利用前景。笔者从新疆阿拉尔沙漠地区采集野生罗布麻进行内生真菌的分离, 旨在筛选出能产生黄酮的内生菌株, 为开发与利用微生物资源提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试样本

于罗布麻的营养生殖顶峰期(5 月下旬), 从新疆阿拉尔沙漠地区边缘选择长势较好的植株, 采集适量的罗布麻叶供试。

1.2 培养基

查氏培养基(CZA): 硝酸钠(NaNO_3) 3.0 g, 磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 1.0 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 g, 氯化钾(KCl) 0.5 g, 硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.01 g, 葡萄糖 30.0 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1 000 mL。

PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH 值。

PDA 液体培养基: PDA 培养基不加琼脂粉。

1.3 内生真菌的分离

用自来水反复冲洗罗布麻叶后用蒸馏水浸泡 10 min, 再用 75% 乙醇浸泡 5 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 2% 次氯酸钠表面消毒 4~5 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 3% 双氧水浸泡 10 min, 无菌水冲洗 3~4 次后, 用灭过菌的剪刀剪成长约 5 cm 的条段, 置

于查氏培养基和 PDA 培养基中 25 ℃ 恒温培养, 5 d 后观察是否有真菌长出。

1.4 叶片表面的无菌检查

将最后一次冲洗的洗液涂布平板, 25 ℃ 下培养, 2 周后检查外植体表面消毒是否彻底。

1.5 内生真菌的纯化

根据菌落形态、菌落正反面颜色等特征将菌落挑出并编号, 采用单孢分离法将挑出来的真菌纯化 3 次, 编号并接种到 PDA 斜面培养 5~7 d 后再置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.6 产活性物质真菌的筛选

黄酮类物质的提取: 将纯化的内生真菌菌丝体放入 PDA 液体培养基中, 28 ℃ 振荡培养 6~8 d, 3 500 r/min 离心 15 min 收集菌丝体, 50 ℃ 烘干后加入适量的浸提液(甲醇: 盐酸 = 7: 3, 体积比)浸泡, 超声波破碎 30 min, 加入石英砂充分研磨, 4 000 r/min 离心 30 min, 将上清液置于 45 ℃ 真空干燥浓缩。在浓缩液中加入 15 mL 水解液(HCl: 甲醇 = 3: 7, 体积比), 78 ℃ 避光水解 4 h, 冷却过滤后即获得内生真菌抽提物样品^[7-8]。

将内生真菌抽提物稀释 100 倍, 取 10 mL 加入试管做好标记, 每试管中加入 10 mL 3% AlCl₃, 轻轻摇晃后在紫外灯照射下观察是否有荧光物质, 并选取有荧光物质的菌株进行荧光显色试验。

取有荧光物质的菌种, 经 PDA 液体培养基培养 48 h 后抽滤发酵液, 用蒸馏水冲洗菌体 3~4 次, 55 ℃ 低压蒸发浓缩菌体, 醇沉(95% 乙醇: 发酵液 = 3: 1, 体积比) 12 h, 脱醇后冻干。将冻干粉用甲醇浸提 24 h, 浸提液样品 8 000 r/min 离心 5 min, 留上清液备用。

取 2.5 g 硅胶 G 加 7.5 mL 的蒸馏水混匀、碾磨、涂板, 自然晾干后放入 100 ℃ 烘箱内活化 1 h。将制备好的萃取液用毛细管取液, 点样 100 μL。展层剂的成分为甲苯: 甲酸乙酯: 甲酸 = 5: 4: 1(体积比), 以 0.2 mg/mL 的标准品和罗布麻叶醇提物为对照。层析缸中展开 40 min 后将层析板取出, 以 3% AlCl₃ 作为显色剂, 在 360 nm 的紫外灯下观察并拍照, 有条带的即为产黄酮内生真菌。

1.7 产活性物质真菌的鉴定

将筛选到的产黄酮内生真菌, 接种到 PDA 培养基上培养 2 d 后, 在显微镜下观察分生孢子梗、产孢结构和分生孢子的形态特征, 参照文献^[9]和^[10]的描述进行鉴定。

2 结果与分析

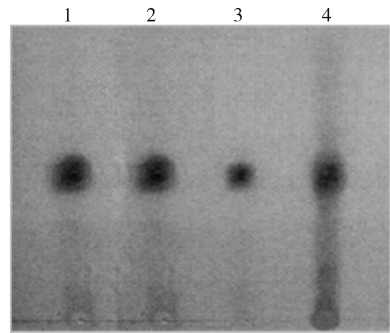
2.1 内生真菌的分离和纯化

根据菌落形态和颜色等特征共分离 34 株真菌, 其中采用查氏培养基分离到 12 株, 采用 PDA 培养基分离到 22 株。

2.2 产活性物质真菌的筛选

根据显色反应, 从 34 个内生真菌菌株中筛选出 5 个产生黄酮物质的内生真菌菌株, 其中菌株 P-1 和 P-2 荧光显色明显, 而菌株 PD-8、PD-17 和 PD-25 显色微弱。

将有明显荧光物质的 P-1 和 P-2 菌株进行薄层层析, 由薄层层析图谱对比可见, P-1 和 P-2 菌体醇提物与标准品、罗布麻叶醇提物在紫外光下具有迁移率相同、颜色一致的黄棕色荧光斑点(图 1), 表明这 2 个菌株可产生黄酮类物质。



1: 黄酮标准品 Flavone standard; 2: 罗布麻黄酮提取物 Apocynum flavone extract; 3: 菌株 P-1 菌丝提取物 Strain P-1 extract; 4: 菌株 P-2 菌丝提取物 Strain P-2 extract.

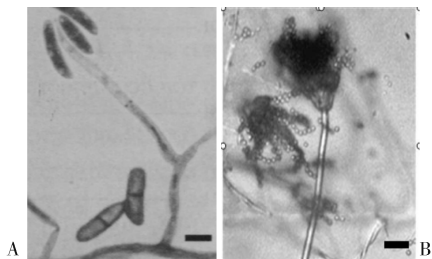
图 1 内生真菌菌株 P-1 和 P-2 产生类黄酮物质的薄层层析检测

Fig. 1 TLC chromogenic detection of production of flavoids by the endophytic fungal strains P-1 and P-2

2.3 产黄酮真菌的鉴定

在显微镜下观察发现, P-1 和 P-2 两株产黄酮内生菌的形态学特征各异。内生真菌 P-1 在 PDA 培养基上生长较快, 菌落厚且呈棉絮状, 中间略微凸起, 圆形。刚生长出来的菌丝体为白色, 随后逐渐变成灰白色, 培养基呈灰白色, 颜色较一致。液体培养的菌丝球较大, 呈黄色, 培养液亦为黄色。分生孢子梗长短不一, 细长或粗短, 分枝不规则或着生 1 圈小梗, 在孢子座上单生或群生。分生孢子(梗孢子)无色, 数个大型分生孢子略弯曲或折曲在茎的顶端, 为典型镰刀形。小型分生孢子单胞, 卵圆形或长圆形,

单个着生或链状。部分分生孢子表现为中间类型,由2个或3个细胞组成,长圆形或略弯曲(图2-A)。内生真菌P-2在PDA培养基上菌落为青黄绿色,有时无色或呈淡灰黄色絮状,生长速度较快,2周后直径可达9 cm。菌株的菌丝无色或淡色。分生孢子梗单独直立或集成菌丝束,无足细胞,顶端生有扫帚状的分枝,帚状枝轮生或单生。分生孢子串呈不分枝的链状,孢子球形或卵圆形,大小(2~6) μm × (2~6) μm (图2-B)。



A: P-1 分生孢子梗和分生孢子(标尺=1 μm) A conidiospore and conidia produced by strain P-1 (Bar=1 μm); B: P-2 分生孢子梗和分生孢子(标尺=5 μm) B conidiospores and conidia produced by strain P-2 (Bar=5 μm).

图2 P-1和P-2菌株的形态特征

Fig. 2 Morphology of strains P-1 and P-2

根据P-1和P-2两株产黄酮内生菌的形态学特征和培养性状,对其株进行鉴定,结果显示P-1为镰孢菌(*Fusarium* sp.),P-2为嗜松青霉(*Penicillium pinophilum*),都属于从梗孢科的真菌。

3 讨论

近年来,从天然产物中筛选生物活性成分或先导化合物成为研究创制新药的有效途径之一。植物历来是筛选天然药物最主要的原料,但药用植物的过度使用,使得许多药用植物濒临灭绝。为解决资源问题,药用植物新资源研究的热点已集中在药用植物内生菌上^[11]。

药用植物内生菌的研究始于1993年,但近年对药用植物内生菌的研究才真正发展起来。2000年,Lu等^[12]研究发现传统中药青蒿内生菌 *Colletotrichum* sp. 能够产生新的生物活性物质;Wagenaar等^[13]从来源于传统中药雷公藤的内生真菌(*Colletotrichum* sp.)培养液中分离出3种新的生物碱(cytochalasins),它们均具有细胞毒素,且对多种人肿瘤细胞有很强的抑制作用;同时该项目组成员于2001年从薄荷(*Dicerandra frutescens*)中分离出的

内生菌 *Phomopsis longicolla* 能产生3种新的具有抗肿瘤活性的二聚物 *dicerandrols* A、B和C^[14];王梅霞等^[15]从银杏(*Ginkgo biloba* L.)树叶中分离得到1株内生真菌EG4,经鉴定为刺盘孢(*Colletotrichum* sp.),应用薄层层析、显色反应和分光光度法对该菌的发酵产物进行了初步分析,结果表明该真菌能够产生黄酮类化合物;苏印泉等^[16]发现杜仲内生真菌的代谢产物具有不同程度的抑菌能力,其中有些可作为抗菌药物的来源或可能分泌与寄生植物相似的活性物质。从已有的研究结果可以看出,药用植物内生菌能产生同宿主相同的活性物质或活性物质前体。

本试验首次从罗布麻中获得了产生黄酮成分的内生真菌,初步鉴定分别是镰孢菌和嗜松青霉。研究结果再次支持了内生真菌可以产生与宿主相同或相似活性产物的观点。同时,丝状真菌具有生长和繁殖快速、培养简便、成本低廉等优点,可为利用内生真菌开发黄酮类活性成分提供新资源。

笔者从新鲜的罗布麻叶中分离出34株内生真菌,表明新疆阿拉尔沙漠地区罗布麻中的内生菌资源很丰富。P-1和P-2两株产黄酮内生菌能产生罗布麻黄酮类物质,代表性地揭示了这类资源具有比较重要的经济价值。由于微生物内生真菌的发酵培养具有可操作、易控制、周期短、所需条件和成本均较低等特点,因此对罗布麻黄酮生产而言,这显然是不同于从罗布麻叶片中提取和悬浮细胞培养的又一条重要途径。

另外,对34种菌株的显色反应中其他菌株也有微弱的荧光现象,这可能是其本身产黄酮的量少或者是容易受外界环境影响使其产生的黄酮量减少。本试验对药用植物罗布麻中分离的内生真菌进行了筛选与鉴定,其有效成分及其功能还有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] 相淞华,宋建平,刘训红,等.罗布麻叶黄酮类成分分析及其动态研究[J].中华中医药学刊,2010(10):2115-2118.
- [2] 马成,马龙,RAUSCH W.大花罗布麻对MPTP型小鼠的多巴胺能神经保护作用研究[J].中国药理学通报,2010(3):397-400.
- [3] 郑梅竹,范亚军,修瑾,等.罗布麻叶总黄酮抗抑郁作用参与5-HT能系统可能机制的研究[J].辽宁中医杂志,2012(5):935-937.
- [4] BI Y S, QING S L, LIN C, et al. Preparation and application of

- core-hell PMMA/Chitosan nanoparticle [J]. *Advanced Materials Research*, 2012(5):535-537.
- [5] KLEOPPER J W, SCHIPPER B, BAKKER P. Proposed elimination of the term endorhizosphere [J]. *Phytopathology*, 1992, 82:726-727.
- [6] 刘芸, 殷红, 彭辉, 等. 植物内生真菌潜在的天然药物新来源[J]. *中华现代中西医杂志*, 2005, 3(5):404.
- [7] 何照范, 张迪清. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 112-114.
- [8] 廖亮. 银杏叶总黄酮提取方法研究[J]. *食品科学*, 1994(8): 33-35.
- [9] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 487-641.
- [10] 孔华忠. 中国真菌志(第三十五卷): 青霉属及其相关有性型属[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 1-284.
- [11] 董静洲, 易自力, 蒋建雄. 我国药用植物种质资源研究现状[J]. *西部林业科学*, 2005, 34(2): 95-100.
- [12] LU H, ZOU W X, TIAN R X, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp. an endophytic fungus in *Artemisia annua* [J]. *Plant Science*, 2000, 151: 67-73.
- [13] WAGENAAR M M, CORWIN J, STMBEL G, et al. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochrysiella* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(12): 1692-1695.
- [14] WAGENAAR M M, CLARDY J, DICERANDROL S. New antibiotic and cytotoxic dimmers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(8): 1006-1009.
- [15] 王梅霞, 陈双林, 霍娟. 一株银杏内生真菌的分离及其产黄酮类物质的初步研究[J]. *工业微生物*, 2004, 34(2): 15-18.
- [16] 苏印泉, 朱红微, 马希汉, 等. 杜仲内生真菌的抑菌活性筛选[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(6): 1153-1157.

Screening and identification of endophytic fungi produced by flavonoids in *Apocynum venetum*

FAN Ying-ge^{1,2} SUN Xiao-dong² GONG Ming-fu³

1. *College of Plant Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, China;*

2. *Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources of Xinjiang Production and Construction Corps in Tarim Basin, Tarim University, Alar 843300, China;*

3. *College of Chemistry and Life, Leshan Normal University, Leshan 614000, China*

Abstract Plant endophytic microorganisms have a close metabolic relationship with its host plants. Endophytic fungi in leaves of *Apocynum venetum* was used as research material. Endophytic fungi with the capability of producing flavonoids were screened with the methods of chemical colorimetry and thin layer chromatography, and then they were identified by observing their morphological characteristics. The results showed that two fungal strains named P-1 and P-2 were screened out. They were detected to be able to produce flavonoid compounds. Strain P-1 belongs to *Fusarium*, whereas strain P-2 belongs to *Penicillium pinophilum*. This study laid a foundation for further exploitation of the endophytic fungi in *A. venetum*.

Key words *Apocynum venetum*; endophytic fungi; flavonoids; screening; identification

(责任编辑:陈红叶)