

文章编号:1007-2985(2011)03-0078-04

# 内生真菌 JSM 10 的分离及鉴定<sup>\*</sup>

贺 乐,刘祝祥,朱 杰,李晓腾,陈奇辉,熊利芝

(吉首大学植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室,湖南 吉首 416000)

**摘 要:**以蛇足石杉为材料,经过严格的表面消毒,分离纯化得到 1 株内生真菌 JSM 10. 对 JSM 10 进行培养特征、显微形态观察和基于 ITS 序列的系统发育分析. 结果表明:菌株 JSM 10 和 *Fusarium* 属的 *Fusarium oxysporum* 菌株系统发育关系最为密切,聚在同一个小枝上,相似程度为 99%. 因此,从系统发育分析来看,JSM 10 应为 *Fusarium oxysporum* 菌株.

**关键词:**蛇足石杉;内生真菌;ITS 序列;系统发育分析;鉴定

中图分类号:Q93-331

文献标志码:A

植物内生菌(*Endophyte*)是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌、细菌、放线菌,被感染的宿主植物(至少是暂时)不表现出外在病症,可通过组织学方法或从严格表面消毒的植物组织中分离或从植物组织内直接扩增出微生物 DNA 的方法来证明其内生<sup>[1]</sup>. 内生菌是一个生态学概念,而非分类学单位,是植物生态系统的天然组成部分<sup>[2]</sup>. 其在植物中分布广、种类多,在植物的生长发育、抗逆境、抗病毒、抗动物危害等方面有重要的生理学和生态学作用<sup>[3]</sup>. 从 19 世纪末 Guerin 等人从黑麦草(*Lolium temulentum* L.)中首次分离到植物内生真菌以来,有关内生真菌的研究已有百余年的历史<sup>[4]</sup>. 蛇足石杉(*Huperzia serrata*)又名千层塔,属于石杉科石杉属,是一种多年生小型草本植物,土生、附生或生于苔藓层中,喜阴潮湿环境<sup>[5]</sup>. 沈晓霞等<sup>[6]</sup>对其蛇足石杉外植体进行组织培养,筛选出一套理论上较完善的消毒方法和组织培养条件,且进一步推断出其植株中有内源真菌的共生,并标记了内源真菌的共生部位. 石玮<sup>[7]</sup>等首次对千层塔植株茎、孢子囊内生真菌进行了分离、纯化与初步鉴定,从千层塔的茎中分离出 4 株内生真菌,分别属于顶孢霉属、单轴霉属、酵母和青霉属. 黎万奎<sup>[8]</sup>等从蛇足石杉中分离出支顶孢属内生真菌菌株,首次证明蛇足石杉内生真菌能够生成与宿主植物相同的活性成分石杉碱甲,有望成为石杉碱甲新药源. 张琳等对蛇足石杉内生真菌进行研究,发现蛇足石杉内生真菌包括盘菌属、镶孢霉属、瓶梗青霉属、青霉属、沙卡氏属、曲霉属<sup>[9]</sup>. 本实验从湘西产蛇足石杉中分离到 1 株内生真菌,经系统发育鉴定为 *Fusarium oxysporum* 菌株.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 蛇足石杉的采集 供试材料蛇足石杉植株采自湖南省古丈县. 采样时选取健康、生长较为旺盛的植株,带土采集后,回实验室后尽快对新鲜的植物材料进行内生真菌的分离.

1.1.2 内生真菌分离培养基 PDA 培养基:马铃薯 200 g;葡萄糖 20 g;琼脂 15~20 g;水 1 000 mL;硫酸链霉素 120 μg/mL;pH 值自然.

查氏培养基:NaNO<sub>3</sub> 2 g;K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g;KCl 0.5 g;MgSO<sub>4</sub> 0.5 g;FeSO<sub>4</sub> 0.01 g;蔗糖 30 g;琼脂 15~

\* 收稿日期:2010-12-24

基金项目:湖南省及吉首大学大学生创新性实验计划项目资助;植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室开放项目资助

通讯作者:熊利芝(1974-),女,湖南益阳人,吉首大学植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室讲师,博士生,主要从事植物资源与保护利用研究.

20 g;pH 值自然.

## 1.2 方法

1.2.1 蛇足石杉外植体表面消毒 将新鲜蛇足石杉用洗洁精清洗数遍,用自来水冲洗 1 h,然后用超声波反复清洗直到清洗液极为清澈,再将植物样本表面水分用滤纸吸干.然后将植株分成根、茎和叶等几个部分,之后按以下步骤进行表面消毒:75%乙醇浸泡 40 s,无菌水冲洗 3~4 次;0.1%升汞浸泡 8 min,无菌水冲洗 3~4 次;0.3%双氧水浸泡 10 min,无菌水冲洗 3~4 次.表面消毒后置于无菌水中准备接种(以上步骤均在超净工作台上进行).

1.2.2 外植体表面消毒效果的检验 (1)无菌水检验法.收集最后一次冲洗外植体的无菌水涂布于培养基上作为对照,28 °C 下培养 2 周以检查外植体表面消毒是否彻底.(2)组织块印迹法.将表面消毒后的外植体在培养基上轻轻印迹,之后取出,将培养基在 28 °C 下培养 2 周,考察表面消毒效果.

1.2.3 内生菌的分离和纯化 内生真菌的分离和纯化:取表面消毒后蛇足石杉根、茎、叶,将根、茎斜截成 0.5 cm 的小段,叶剪成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,接种到相应培养基上,28 °C 培养,待切口边缘长出菌丝后,取菌落边缘部分转到新的 PDA 培养基上,分别进行编号,用尖端菌丝纯化法培养 3 次左右后编号并接种到 PDA 试管斜面培养 5~7 d 后,放入冰箱 4 °C 保存备用.

1.2.4 内生真菌的培养特征和显微形态观察 用接种针从斜面上取少量孢子,点植于促孢培养基上,倒置于恒温箱中,28 °C 培养 4,7,10 d,观察菌落特征.取少量菌丝,用乳酸石炭酸棉蓝染色液染色,进行常规显微形态观察.

1.2.5 内生真菌的基因组 DNA 提取 平板上挑取米粒大小菌丝置于碾钵中,加少许石英砂与 600 μL 的 CTAB 溶液匀浆.将匀浆液转入离心管中,置于 60 °C 恒温水浴锅中水浴 30 min.取出离心管,往离心管中加入 600 μL 抽提液(酚:氯仿:异戊醇=25:24:1)轻摇至匀,4 °C 14 000 r/min 离心 10 min.取上清液约 300 μL,转管再次抽提,直至 2 层液相间无白色膜状物质.取离心后的上清液 300 μL 转管,每管中加浓度为 3 mol/L 的醋酸钠约 30 μL,轻摇至匀.补加 -20 °C 无水乙醇 600 μL,摇匀后转至 -80 °C 冰箱中冷冻 15 min.取出离心管,4 °C 14 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,留沉淀.往离心管中加入 70%乙醇 1 mL,4 °C 14 000 r/min 离心 10 min,倒出上清液,再将离心管中沉淀置于 37 °C 干燥箱中烘干.向烘干后的离心管中加入 20 μL 的 TE 缓冲液,于 4 °C 保存,备用.

1.2.6 内生真菌 ITS 序列扩增和测序 PCR 扩增反应体系:10 × Buffer 5.0 μL, dNTP 4.0 μL (2.5 mol/mL);Primer1 ITS4 1.0 uL(25 μmol/L),Primer2 ITS5 1.0 μL(25 μmol/L);Taq 酶 0.2 μL (3 U/μL);去离子水 37.8 μL.

PCR 反应条件:95 °C 预变性 1 min;95 °C 变性 1 min,51 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;35 个循环后再 72 °C 延伸 10 min.反应结束后,将反应产物 4 °C 保存.按照上述扩增条件进行 ITS 序列扩增,扩增产物寄上海生物工程有限公司测序.

1.2.7 ITS 序列系统发育分析 真菌 ITS 基因序列,先用 National Center for Biotechnology Information 网站(NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)提供的 Blast(Basic Local Alignment Search Tool)搜索程序在 GenBank/EMBL/DBJ 等公共数据库中在线搜索高度相似序列,调取同源性高的相关序列组成序列集.然后用 CLUSTAL X<sup>[10]</sup>软件包中的 Alignment 程序进行多重序列比对.用 Trees 程序计算序列间的相似性(sequence similarity),用 BioEdit 软件进行序列剪辑.系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算<sup>[11]</sup>.MEGA 4.0(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件包采用邻接法(Neighbor-Joining)进行聚类分析和构建系统进化树<sup>[12]</sup>.重复取样 1000 次进行自展值(bootstrap value)分析以评估系统进化树的拓扑结构稳定性<sup>[13]</sup>.

## 2 结果

### 2.1 内生真菌 JSM 10 分离纯化

经表面消毒后的外植体接种至培养基上置于 25 °C 恒温培养箱培养 10 d 后,可看到外植体切口边缘有真菌长出,对照培养皿上无菌生长,证明所分离的微生物为内生微生物.根据菌落形态、菌落正反面颜色

等特征将菌落挑出并编号,采用尖端菌丝分离纯化法将挑出来的真菌经过反复纯化,察氏培养基分离得到 16 株、PDA 培养基分离得到 66 株、共 82 株纯化的典型真菌菌落,其中一株真菌编号为 JSM 10.

## 2.2 内生真菌 JSM 10 培养特征和显微形态

按照上述方法对内生真菌 JSM 10 培养特征和显微形态进行观察,结果见图 1.

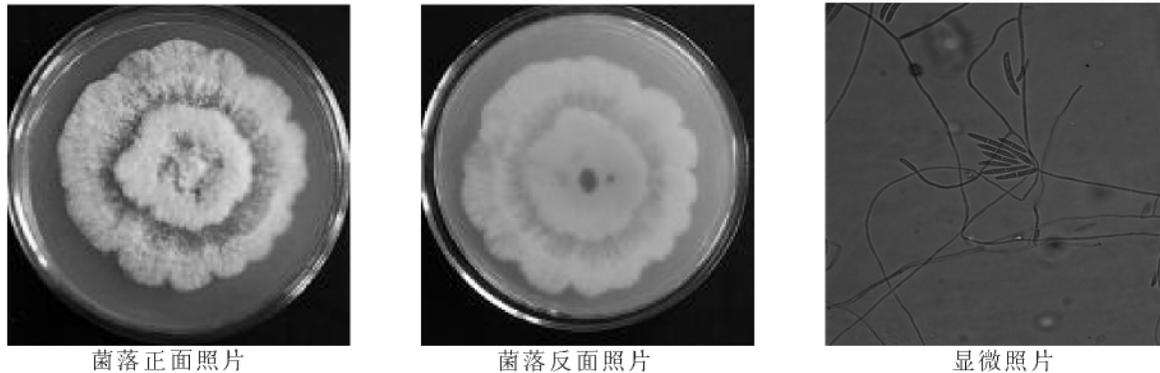


图 1 内生真菌 JSM 10 培养特征和显微形态照片

从图 1 可看出,JSM 10 菌落毛绒状、正面边缘白色、中间灰色、边缘不整齐,反面淡黄色.显微形态显示其菌丝有隔,分生孢子呈弯镰刀状,应为镰刀菌属真菌典型特征.

## 2.3 内生真菌 JSM 10 的 ITS 序列系统发育分析

按照上述方法对内生真菌 JSM 10 的 ITS 进行测序和系统发育分析,JSM 10 的 ITS 序列如下:

> JSM 10

```
TCCGTAGGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTG
AACATACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCGTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAG
AGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGACGAT
TCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGAC
TCGCGTTAATTCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTA
GTAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
```

以 Hypocreaceae 科 *Trichoderma* 属的 *Trichoderma dorothea* 和 *Trichoderma koningiopsis* 菌株为外群,JSM 10 基于 ITS 序列的系统发育分析结果见图 2.从图 2 可以看出,与 *Trichoderma* 属同属 Hypocreaceae 科的 *Fusarium* 属(镰刀菌属)菌株都聚类在系统发育树一个大枝上,*Fusarium* 属的 3 个不同菌株在这个大枝上又形成 3 个独立稳定的小枝,而菌株 JSM 10 和 *Fusarium* 属的 *Fusarium oxysporum* 菌株系统发育关系最为密切,聚在同一个小枝上,相似程度为 99%.因此,从系统发育分析来看,JSM 10 应为 *Fusarium oxysporum*.

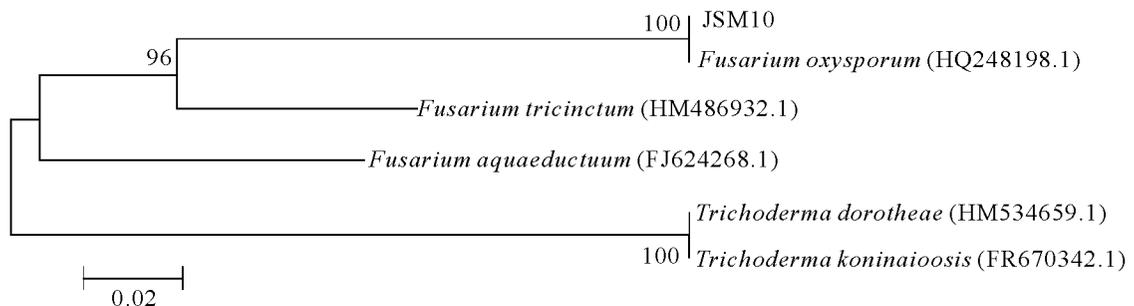


图 2 JSM 10 基于 ITS 序列构建的系统发育树

### 3 结论

以蛇足石杉为材料,经过严格的表面消毒,分离纯化得到1株内生真菌JSM 10.对JSM 10进行培养特征、显微形态观察和基于ITS序列的系统发育分析.结果表明菌株JSM 10分生孢子镰刀状,和*Fusarium*属的*Fusarium oxysporum*菌株系统发育关系最为密切,聚在同一个小枝上,相似程度为99%.因此,从系统发育分析来看,JSM 10应为*Fusarium oxysporum*菌株.镰刀菌(*Fusarium*)真菌是最常见的植物病原菌以及植物内生真菌,目前,在灯盏细辛、苦楝、咖啡和金银花内生真菌中均有发现,同国内外大多数学者的相关研究结果一致.因此,镰刀菌无论是作为植物病原菌还是具药用价值的内生菌,都具有重要的研究价值<sup>[14]</sup>.

#### 参考文献:

- [1] STONE J K, BACON C W, WHITE J F. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined [M]. Microbicen-dophytes. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.
- [2] 黎万奎,胡之璧.内生菌与天然药物[J].中国天然药物,2005,3(4):193-199.
- [3] 邹文欣,谭仁祥.植物内生菌研究进展[J].植物学报,2001,4(3):881-892.
- [4] 郭良栋.内生真菌研究进展[J].菌物系统,2001,20(1):148-152.
- [5] 李沛玲,郭水良.石杉科植物研究综述[J].安庆师范学院学报:自然科学版,2005,11(1):56-62.
- [6] 沈晓霞,俞旭平,盛束军.千层塔茎尖组织培养消毒方法的研究[J].中国中药杂志,2002,27(6):458-459.
- [7] 石玮,罗建平,丁振华,等.千层塔内生真菌分离鉴定的初步研究[J].中草药,2005,36(2):281-283.
- [8] 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[J].中国医药生物技术,2007,2(4):254-259.
- [9] 张琳,段紫英,耿欣,等.蛇足石杉内生菌的分离与鉴定[J].吉首大学学报:自然科学版,2010,31(5):79-84.
- [10] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL\_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools [J]. Nucleic acids research, 1997, 25(24): 4 876-4 882.
- [11] KIMURA M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences [J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [12] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1 596-1 604.
- [13] FELSENSTEIN J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [14] 李瑾,伊艳杰,时玉,等.高抑菌活性的金银花内生真菌的ITS序列分析法鉴定[J].河南工业大学学报,2010,31(3):50-54.

## Isolation and Molecular Identification of Endophytic Fungi JSM 10 from *Huperzia crispate*

HE Le, LIU Zhu-xiang, ZHU Jie, LI Xiao-teng, CHEN Qi-hui, XIONG Li-zhi

(Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization, Hunan Province, College of Biological Resource and Environment Science, Jishou University, Jishou 416000, China)

**Abstract:** Endophytic fungi JSM 10 was isolated from surface-sterilized *Huperzia crispate*. Phylogenetic analysis of JSM 10 was carried out based on ITS gene sequences. Phylogenetic analysis result showed that JSM 10 strain was closely related to the recognized members of the genus *Fusarium*, in which strain JSM 10 resembled *Fusarium oxysporum* at a rate of 99% and JSM 10 was identified as *Fusarium oxysporum*.

**Key words:** *Huperzia crispate*; endophytic fungi; ITS gene sequence; phylogenetic analysis; identification

(责任编辑 易必武)