

南方红豆杉内生真菌多样性及内生真菌对紫杉醇和中间产物含量的影响

徐玲霞, 柳 巧, 王景仪, 董蒙蒙, 蒋继宏, 曹小迎^①

(江苏师范大学生命科学学院 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要: 使用 5 种分离培养基分离南方红豆杉 [*Taxus wallichiana* var. *mairei* (Lemée et H. Lév.) L. K. Fu et N. Li] 根、枝和叶中的内生真菌, 并对分离的菌株进行分子鉴定; 采用 HPLC 技术分析不同内生真菌处理组南方红豆杉叶中紫杉醇及中间产物巴卡亭Ⅲ和 10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ (10-DAB) 的含量差异。结果表明: 在南方红豆杉的根、枝和叶中共分离到 69 株内生真菌, 隶属于 26 属 36 种; *Muyocopron* Speg. 属有 15 株内生真菌, 占分离的内生真菌菌株总数的 21.7%, 为南方红豆杉内生真菌的优势属。在 19 个内生真菌处理组南方红豆杉的叶中可同时检测到紫杉醇、巴卡亭Ⅲ和 10-DAB, 且这些处理组的巴卡亭Ⅲ和 10-DAB 含量均低于对照组 (未喷洒内生真菌诱导子溶液), 而紫杉醇含量却存在明显差异。其中, 10 个内生真菌处理组的紫杉醇含量高于对照组, 以 *Pseudodidymocytis lobariellae* Flakus, Rodr. Flakus et Etayo 处理组的紫杉醇含量最高 ($0.228 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), *Gymnopilus luteofolius* (Peck) Singer 和 *Coniochaeta hoffmannii* (J. F. H. Beyma) Z. U. Khan, Gené et Guarro 处理组的紫杉醇含量也较高 (分别为 0.180 和 $0.139 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。重复验证结果表明: 与对照组相比, *P. lobariellae* 处理组南方红豆杉叶中紫杉醇含量显著升高, 但巴卡亭Ⅲ和 10-DAB 含量明显下降。研究结果显示: 南方红豆杉内生真菌多样性较高, 部分内生真菌能够促进南方红豆杉叶中紫杉醇的合成, 其中, *P. lobariellae*、*G. luteofolius* 和 *C. hoffmannii* 可作为调控南方红豆杉紫杉醇积累的候选菌。

关键词: 南方红豆杉; 内生真菌; 紫杉醇; 中间产物; 候选菌

中图分类号: Q948.12⁺2.3; Q939.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2022)04-0050-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.04.06

Diversity of endophytic fungi in *Taxus wallichiana* var. *mairei* and effects of endophytic fungi on contents of taxol and intermediates XU Lingxia, LIU Qiao, WANG Jingyi, DONG Mengmeng, JIANG Jihong, CAO Xiaoying^① (The Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant of Jiangsu Province, School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, 31(4): 50-56

Abstract: Endophytic fungi in root, branch, and leaf of *Taxus wallichiana* var. *mairei* (Lemée et H. Lév.) L. K. Fu et N. Li were isolated by using five types of isolation media, and molecular identification was conducted for the isolated strains; differences in contents of taxol and intermediates baccatin III and 10-deacetyl baccatin III (10-DAB) in leaf of *T. wallichiana* var. *mairei* in different endophytic fungus treatment groups were analyzed by HPLC technology. The results show that 69 strains of endophytic fungi are isolated from root, branch, and leaf of *T. wallichiana* var. *mairei* in total, belonging to 36 species of 26 genera; there are 15 strains of endophytic fungi in *Muyocopron* Speg., accounting for 21.7% of the total strain number of isolated endophytic fungi, so it is the dominant genus of endophytic fungi in *T.*

收稿日期: 2021-12-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31770613); 2021 年度校级研究生科研创新计划项目 (2020XKT494)

作者简介: 徐玲霞 (1996—), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事植物与微生物互作方面的研究。

^①通信作者 E-mail: cxy4868@jssu.edu.cn

引用格式: 徐玲霞, 柳 巧, 王景仪, 等. 南方红豆杉内生真菌多样性及内生真菌对紫杉醇和中间产物含量的影响 [J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(4): 50-56.

wallichiana var. *mairei*. Taxol, baccatin III, and 10-DAB can be simultaneously detected in leaf of *T. wallichiana* var. *mairei* in 19 endophytic fungus treatment groups, and contents of baccatin III and 10-DAB in these treatment groups are lower than those in the control group (not spraying endophytic fungal elicitor solution), but there is an evident difference in taxol content. In which, taxol content in ten endophytic fungus treatment groups is higher than that in the control group, taxol content in *Pseudodidymocyrtis lobariellae* Flakus, Rodr. Flakus et Etayo treatment group is the highest ($0.228 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), and those in *Gymnopilus luteofolius* (Peck) Singer and *Coniochaeta hoffmannii* (J. F. H. Beyma) Z. U. Khan, Gené et Guarro treatment groups are also relatively high (which are 0.180 and $0.139 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ respectively). The duplicate verification result shows that taxol content in leaf of *T. wallichiana* var. *mairei* in *P. lobariellae* treatment group increases significantly compared with the control group, while contents of baccatin III and 10-DAB decrease evidently. It is suggested that the diversity of endophytic fungi in *T. wallichiana* var. *mairei* is relatively high, and some endophytic fungi can promote the biosynthesis of taxol in leaf of *T. wallichiana* var. *mairei*, in which, *P. lobariellae*, *G. luteofolius*, and *C. hoffmannii* can be used as candidate fungi for regulating the accumulation of taxol in *T. wallichiana* var. *mairei*.

Key words: *Taxus wallichiana* var. *mairei* (Lemée et H. Lév.) L. K. Fu et N. Li; endophytic fungus; taxol; intermediate; candidate fungus

红豆杉属(*Taxus* Linn.)植物为常绿乔木或灌木,全世界共有11种,中国有4种1变种1杂交种,即红豆杉[*T. chinensis* (Pilger) Rehd.]、东北红豆杉(*T. cuspidata* Sieb. et Zucc.)、西藏红豆杉(*T. wallichiana* Zucc.)、云南红豆杉(*T. yunnanensis* W. C. Cheng et L. K. Fu)、南方红豆杉[*T. wallichiana* var. *mairei* (Lemée et H. Lév.) L. K. Fu et N. Li]和曼地亚红豆杉(*T. × media* Rehd.)^[1]。红豆杉(*Taxus* sp.)是珍贵的用材树种,不但具有较高的观赏价值,还具有很高的药用价值^[2,3]。红豆杉中的紫杉醇是一种抗癌活性成分,能够有效抑制癌细胞的生长和繁殖^[4]。然而,在自然条件下红豆杉生长缓慢,体内的紫杉醇和中间产物[如巴卡亭Ⅲ和10-去乙酰基巴卡亭Ⅲ(10-DAB)^[5]]的含量均极低,因此,利用现代生物技术手段提高红豆杉体内紫杉醇和中间产物含量具有重要意义。

研究发现,植物体内存在丰富的内生菌资源^[6-8],这些内生菌能够促进宿主植物生长,与宿主植物和谐共生、协同进化^[9,10]。部分内生菌可产生一些特殊的生物活性成分^[11],这些生物活性成分可以成为内生菌诱导子^[12]。植物的细胞膜或细胞质中含有可识别内生菌诱导子的受体,当受体与内生菌诱导子结合后,植物细胞中的受体激酶被激活,从而改变下游基因的表达,产生特定的次生代谢产物^[13],因此,内生菌诱导子对宿主植物的生长发育和次生代谢产物积累具有一定的促进作用^[14-16]。例如:内生真菌AL4的粗诱导子对茅苍术[*Atractylodes lancea*

(Thunb.) DC.]悬浮细胞中的挥发油成分苍术酮、苍术醇、 β -桉叶醇和苍术素的积累均有一定的促进作用^[17];Hemmati等^[18]从长春花[*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don]品种‘冰粉’(‘Icy Pink’)中分离到2株内生真菌,这2株内生真菌既可以促进长春花愈伤组织的生长,还可以提高长春花愈伤组织中次生代谢产物秋水仙碱和长春碱的含量。

南方红豆杉为国家一级重点保护野生植物,主要分布于长江流域以南地区,在多数省份常生于海拔1 000~1 200 m以下的山林中。目前,关于南方红豆杉内生真菌的多样性、群落结构、促生能力及产紫杉醇能力等的研究报道较多^[19-23],而关于南方红豆杉内生真菌对南方红豆杉体内紫杉醇等药效成分的合成和积累的影响尚不清楚。为此,本研究利用不同分离培养基从南方红豆杉的根、枝和叶中分离内生真菌,并对这些内生真菌进行了分子鉴定;随后,将这些内生真菌制成诱导子并均匀喷洒到3年生南方红豆杉植株上,采用HPLC技术分析不同内生真菌处理组南方红豆杉叶中紫杉醇、巴卡亭Ⅲ和10-DAB的含量差异,以期使用内生真菌调控南方红豆杉药效成分的积累提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

选取湖北星斗山国家级自然保护区(东经109°00′06″、北纬29°59′49″)内5株健康的野生南方

红豆杉植株,利用样株上的新鲜根、枝和叶分离内生真菌。采集样株周围0~5 cm土层中的侧根;在样株冠层的高、中、低位置各随机采1个枝条,并将枝和叶分开。将采摘的根、枝和叶分别蜡封于自封袋内,放入液氮中带回实验室立即进行实验。

内生真菌诱导子处理的样株为3年生南方红豆杉植株,盆栽于江苏师范大学生命科学学院重点实验室温室中。栽培基质为原生态土壤(由江苏省无锡市红豆集团红豆杉生物技术有限公司提供)和营养土(由棉籽壳、玉米芯、米糠、豆粕、麦麸、珍珠岩经高温发酵、消毒、杀虫加工制作而成)等质量比混合基质,培养条件为温度22℃、空气相对湿度60%~80%、光照时间16 h·d⁻¹、光照度6 000 lx。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离、纯化和保种 用流水将采集的南方红豆杉根、枝和叶冲洗2 h,室温条件下超声(功率500 W)清洗3次,每次2~3 min;参照臧威等^[21]的方法对根、枝和叶进行消毒。将最后一次冲洗根、枝和叶的无菌蒸馏水分别涂布在察氏培养基、马丁培养基、PDA培养基、Wickerham培养基和沙氏培养基5种分离培养基上,置于28℃条件下暗培养7 d。若无菌落长出,说明消毒效果较好,可认定分离的真菌均来自南方红豆杉体内。将消毒过的根、枝和叶置于无菌研钵中研磨,将磨好的粉末分别涂布在前述的5种分离培养基上,每个器官每种培养基10个平板,置于28℃条件下暗培养14 d。

待菌落长出后,将每个菌落分别接种到新的纯化培养基(PDA培养基)中,置于28℃条件下暗培养。经过反复纯化,直至形成单个菌落,即纯化的内生真菌菌株。

根据菌落形态和颜色去除重复菌株,取面积约5 mm×5 mm的菌块,接种到PDA斜面培养基中,置于4℃冰箱中保种。

1.2.2 内生真菌的分子鉴定 取面积约5 mm×5 mm的内生真菌保种菌块,接种到PDA固体培养基中,置于28℃条件下暗培养。培养5 d后记录菌落的生长情况,如菌落的形状、大小、颜色、菌丝致密程度和色素产生情况等。

将菌体收集到1.5 mL离心管中,置于-20℃冰箱中冷冻30 min;加入200 μL质量体积分数2%的CTAB和适量石英砂,置于65℃水浴中保温30 min;加入苯酚-三氯甲烷混合液[V(苯酚):V(三氯甲

烷)=2:1]200 μL,震荡2 min后,室温条件下10 000 r·min⁻¹离心10 min;取上清,加入等体积异丙醇后,置于-20℃冰箱中冷冻30 min;室温条件下10 000 r·min⁻¹离心10 min,去上清;加入体积分数70%乙醇200 μL并吹打数次;室温条件下10 000 r·min⁻¹离心10 min,弃乙醇,沉淀自然风干后加入30 μL无菌蒸馏水,即内生真菌基因组DNA粗提液,置于-20℃冰箱中保存。

将内生真菌基因组DNA粗提液涡旋震荡30 min后,用无菌蒸馏水稀释5~10倍;使用通用引物NL1(序列为5'-GCATATCAATAGCGGAGGAAAAG-3')和NL4(序列为5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')进行扩增反应。反应体系总体积30.0 μL,包括Premix Taq™ Version 2.0[宝生物工程(大连)有限公司]15.0 μL、引物NL1 0.5 μL、引物NL4 0.5 μL、基因组DNA粗提液1.0 μL, ddH₂O补足剩余体积。反应程序为:95℃预变性3 min;95℃变性20 s,55℃退火20 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸5 min。使用质量体积分数1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,并将扩增产物交生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果与NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中的相关菌株序列进行比对,从而确定各内生真菌菌株的种类。

1.2.3 内生真菌诱导子溶液的制备及处理方法 将纯化的内生真菌接种到PDA培养基上,置于28℃条件下暗培养;菌株活化后,取面积约5 mm×5 mm菌块,接种到装有PDB培养基的锥形瓶中,于28℃黑暗条件下200 r·min⁻¹震荡培养7 d;用无菌滤纸过滤,滤液即内生真菌诱导子溶液。

用小喷壶将内生真菌诱导子溶液均匀喷洒在南方红豆杉植株上,每株喷洒内生真菌诱导子溶液40 mL。对照组仅喷洒等体积的无菌蒸馏水。每组3株南方红豆杉植株。处理7 d后,剪取植株从上往下第4和第5个枝上的所有叶,置于-80℃冰箱中保存、待用。

1.2.4 紫杉醇和中间产物含量的测定

1.2.4.1 标准品溶液的制备 称取购自美国Sigma公司的紫杉醇(纯度在97%及以上)、巴卡亭Ⅲ(纯度在99%及以上)、10-DAB(纯度在99%及以上)标准品各1 mg,精密称量后,分别使用甲醇(色谱纯)配制质量浓度1 mg·mL⁻¹的标准品溶液,置于4℃冰箱中保存、待用。

1.2.4.2 样品溶液的制备 取南方红豆杉的叶,使用RV8冷冻干燥机(英国 EDWAROS)冷冻干燥后研磨成粉末;精密称取 1.0 g 叶粉末,置于 50 mL 离心管中,按照料液比($m:V$)1:20 添加酸化甲醇溶液(含体积分数 0.01% 乙酸的甲醇溶液),室温条件下超声(功率 500 W)处理 1 h;用双层滤纸过滤,保留滤液,滤渣重复提取 2 次;合并滤液,用 SB-1100 旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司)在低于 40 °C 的条件下进行减压蒸干;用甲醇将析出物溶解并定容至 1 mL,室温条件下超声(功率 500 W)处理 30 min;室温条件下 10 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,用孔径 0.45 μm 的有机相滤膜过滤,滤液即样品溶液。

1.2.4.3 HPLC 分析条件 采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)进行 HPLC 分析。色谱柱为 Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , 美国 Thermo Fisher 公司)。以乙腈(色谱纯)为流动相 A、体积分数 0.1% 甲酸溶液为流动相 B 进行线性梯度洗脱,洗脱程序为:0 min, 5% A; 25 min, 100% A; 30 min, 100% A; 35 min, 5% A。流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$;柱温 25 °C;检测波长 227 nm;进样量 10 μL 。

每个处理组随机选取 1 株植株的样品溶液,按照上述分析条件进样检测。选取紫杉醇含量最高的内生真菌处理组,利用该处理组和对照组各 3 个样品溶液的检测结果进行验证。

1.3 数据处理及统计分析

采用 EXCEL 2007 软件对相关数据进行统计和分析。

2 结果和分析

2.1 南方红豆杉不同器官内生真菌多样性分析

统计结果(表 1)表明:本研究从南方红豆杉的根、枝和叶中共分离到 69 株内生真菌。其中,叶中内生真菌菌株数量最多,有 46 株,占分离的内生真菌菌株总数的 66.7%;枝中内生真菌的菌株数量次之,有 14 株,占分离的内生真菌菌株总数的 20.3%;根中内生真菌的菌株数量最少,仅 9 株,占分离的内生真菌菌株总数的 13.0%。

鉴定结果表明:分离到的 69 株内生真菌隶属于 26 属 36 种,在这些内生真菌中,*Coniothyrium* Corda、*Muyocopron* Speg. 和 *Phyllosticta* Pers. 3 个属的菌株数量较多。其中,*Muyocopron* 属的菌株数量最多,有 15

表 1 南方红豆杉根、枝和叶中内生真菌的菌株数量

Table 1 Strain number of endophytic fungi in root, branch, and leaf of *Taxus wallichiana* var. *mairei* (Lemée et H. Lév.) L. K. Fu et N. Li

种类 Species	不同器官的菌株数量 ¹⁾			
	Strain number in different organs ¹⁾			
	根 Root	枝 Branch	叶 Leaf	总计 Total
<i>Alternaria doliconidium</i>	—	—	2	2
<i>Aporospora terricola</i>	—	1	—	1
<i>Arthrinium yunnanum</i>	—	—	1	1
<i>Aspergillus niger</i>	—	—	1	1
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	—	—	1	1
<i>Clonostachys rosea</i>	1	—	—	1
<i>Colletotrichum aotearoa</i>	—	—	2	2
<i>Colletotrichum boninense</i>	—	—	1	1
<i>Colletotrichum siamense</i>	—	—	1	1
<i>Coniochaeta hoffmanni</i>	—	—	1	1
<i>Coniothyrium fuckelii</i>	—	1	2	3
<i>Coniothyrium pyrinum</i>	—	1	1	2
<i>Diaporthe discoidispora</i>	—	—	1	1
<i>Didymella glomerata</i>	—	—	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	—	1	3
<i>Fusarium phaseoli</i>	—	1	—	1
<i>Glomerella acutata</i>	—	—	2	2
<i>Gongronella lacrispora</i>	1	—	—	1
<i>Gongronella</i> sp.	—	—	2	2
<i>Gymnopilus luteofolius</i>	—	—	2	2
<i>Montagnula chromolaenicola</i>	—	—	1	1
<i>Mucor lusitanicus</i>	1	—	—	1
<i>Muyocopron atromaculans</i>	—	4	11	15
<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i>	—	—	2	2
<i>Paraconiothyrium archidendri</i>	—	—	1	1
<i>Paraconiothyrium fuscomaculans</i>	—	1	1	2
<i>Phoma</i> sp.	—	—	1	1
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	—	—	1	1
<i>Phyllosticta foliorum</i>	—	2	2	4
<i>Phyllosticta philoprina</i>	—	1	1	2
<i>Pseudodidymocyttis lobariellae</i>	—	1	1	2
<i>Rhizoctonia callae</i>	—	—	1	1
<i>Talaromyces aduleatus</i>	1	—	1	2
<i>Talaromyces verruculosus</i>	2	—	—	2
<i>Trichoderma caribbaeum</i>	—	1	—	1
<i>Trichoderma theobromicola</i>	1	—	—	1
总计 Total	9	14	46	69

¹⁾—: 未分离到 Unisolated.

株,占分离的内生真菌菌株总数的 21.7%,远高于其他属菌株数量,说明该属为南方红豆杉内生真菌的优势属。值得注意的是,不同种类内生真菌在南方红豆杉根、枝和叶中的分布存在明显差异,许多内生真菌仅局限于南方红豆杉的特定器官中,如 *Alternaria* Nees 和 *Colletotrichum* Corda 属菌株仅分布在南方红

豆杉的叶中, *Aporospora* J. C. Krug et Jeng 属菌株仅分布在南方红豆杉的枝中, 而 *Clonostachys* Corda 属菌株仅分布在南方红豆杉的根中。 *Muyocopron atromaculans* (Bills et Polishook) Hern.-Restr., J. D. P. Bezerra et Crous 菌株在南方红豆杉的枝和叶中分别有 4 和 11 株, 为南方红豆杉枝和叶中最常见的内生真菌, 而 *Fusarium oxysporum* Schltdl. 和 *Talaromyces verruculosus* (Peyronel) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert 菌株在南方红豆杉的根中均有 2 株, 为南方红豆杉根中最常见的内生真菌。

2.2 内生真菌对南方红豆杉叶中紫杉醇及中间产物含量的影响

经 HPLC 检测分析, 在 19 种内生真菌处理组的南方红豆杉叶中可同时检测到紫杉醇及中间产物巴卡亭 III 和 10-DAB。统计结果(表 2)表明: 在检测到紫杉醇的 19 个内生真菌处理组中, 南方红豆杉叶中巴卡亭 III 和 10-DAB 的含量均低于对照组(未喷洒内生真菌诱导子溶液); *Coniochaeta hoffmannii* (J. F. H. Beyma) Z. U. Khan, Gené et Guarro, *Glomerella acutata* Guerber et J. C. Correll, *Gymnopilus luteofolius* (Peck) Singer, *Neopestalotiopsis aotearoa* Maharachch., K. D. Hyde et Crous, *Paraconiothyrium archidendri* Verkley, Göker et Stielow, *Paraconiothyrium fuscomaculans* (Sacc.) Verkley et Gruyter, *Phyllosticta foliorum* (Sacc.) Wikee et Crous, *Phyllosticta philoprina* (Berk. et M. A. Curtis) Wikee et Crous, *Pseudodidymocyrtis lobariellae* Flakus, Rodr. Flakus et Etayo 和 *Trichoderma caribbaeum* Samuels et Schroers 处理组南方红豆杉叶中的紫杉醇含量均高于对照组, 其余 9 个内生真菌处理组南方红豆杉叶中的紫杉醇含量均低于对照组。在紫杉醇含量高于对照组的 10 个内生真菌处理组中, *P. lobariellae* 处理组南方红豆杉叶中的紫杉醇含量较对照组升高幅度最大, 升高了 286.44%, 但该组的巴卡亭 III 和 10-DAB 含量却较对照组明显下降, 分别降低了 89.21% 和 70.64%; *G. luteofolius* 和 *C. hoffmannii* 处理组南方红豆杉叶中紫杉醇含量也明显高于对照组, 分别升高了 205.08% 和 135.59%, 这 2 组的巴卡亭 III 和 10-DAB 含量也较对照组明显下降。

为了验证上述结果的可信度, 对内生真菌 *P. lobariellae* 处理组和对照组的南方红豆杉叶中紫杉醇及中间产物巴卡亭 III 和 10-DAB 的含量进行了 3 次

重复检测, 结果见表 3。由表 3 可见: 经内生真菌 *P. lobariellae* 处理后, 南方红豆杉叶中巴卡亭 III 和 10-DAB 的含量确实较对照组下降, 而紫杉醇含量却较对照组明显升高。

表 2 不同内生真菌处理组南方红豆杉叶中紫杉醇和中间产物的含量¹⁾

Table 2 Contents of taxol and intermediates in leaf of *Taxus wallichiana* var. *mairei* (Lemée et H. Lév.) L. K. Fu et N. Li in different endophytic fungus treatment groups¹⁾

处理 Treatment	含量/(mg · g ⁻¹) Content		
	紫杉醇 Taxol	巴卡亭 III Baccatin III	10-DAB
CK	0.059	1.029	12.364
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	0.045	0.132	2.806
<i>Colletotrichum boninense</i>	0.054	0.077	1.546
<i>Coniothyrium pyrinum</i>	0.048	0.190	3.653
<i>Coniochaeta hoffmannii</i>	0.139	0.504	5.872
<i>Diaporthe discoidispora</i>	0.051	0.184	1.476
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.042	0.161	1.761
<i>Glomerella acutata</i>	0.092	0.206	3.339
<i>Gymnopilus luteofolius</i>	0.180	0.021	1.783
<i>Mucor lusitanicus</i>	0.031	0.211	3.680
<i>Muyocopron atromaculans</i>	0.052	0.133	2.015
<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i>	0.068	0.176	3.418
<i>Paraconiothyrium archidendri</i>	0.075	0.334	4.246
<i>Paraconiothyrium fuscomaculans</i>	0.064	0.469	4.858
<i>Phyllosticta foliorum</i>	0.081	0.387	6.372
<i>Phyllosticta philoprina</i>	0.099	0.703	9.859
<i>Pseudodidymocyrtis lobariellae</i>	0.228	0.111	3.630
<i>Rhizoctonia callae</i>	0.055	0.137	2.102
<i>Trichoderma caribbaeum</i>	0.120	0.199	4.762
<i>Trichoderma theobromicola</i>	0.023	0.133	1.956

¹⁾ 表中仅列出同时检测到紫杉醇和中间产物的内生真菌处理组数据 The table only lists the data of endophytic fungus treatment groups simultaneously detected taxol and intermediates. CK: 对照组(未喷洒内生真菌诱导子溶液) The control group (not spraying endophytic fungal elicitor solution); 10-DAB: 10-去乙酰基巴卡亭 III 10-deacetyl baccatin III.

表 3 内生真菌 *Pseudodidymocyrtis lobariellae* Flakus, Rodr. Flakus et Etayo 对南方红豆杉叶中紫杉醇和中间产物含量的影响 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 3 Effect of endophytic fungus *Pseudodidymocyrtis lobariellae* Flakus, Rodr. Flakus et Etayo on contents of taxol and intermediates in leaf of *Taxus wallichiana* var. *mairei* (Lemée et H. Lév.) L. K. Fu et N. Li ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

处理 Treatment	含量/(mg · g ⁻¹) Content		
	紫杉醇 Taxol	巴卡亭 III Baccatin III	10-DAB
CK	0.113±0.049	1.225±0.751	17.076±6.651
<i>Pseudodidymocyrtis lobariellae</i>	0.361±0.082	0.232±0.072	7.785±1.111

¹⁾ CK: 对照组(未喷洒内生真菌诱导子溶液) The control group (not spraying endophytic fungal elicitor solution); 10-DAB: 10-去乙酰基巴卡亭 III 10-deacetyl baccatin III.

3 讨论和结论

内生真菌普遍存在于各种植物中,并且广泛分布于植物的各个组织中,但研究者在不同植物种类中分离到的内生真菌菌株数量和菌种数量均存在较大差异,少则十几种,多则近百种^[8,21]。1993年,Stierle等^[24]从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia* Nutt.) 韧皮部中分离到第1个产紫杉醇的内生真菌 *Taxomyces andreanae* Strobel, A. Stierle, D. Stierle et W. M. Hess;迄今为止,研究者已经分离出大量的红豆杉内生真菌,并发现多种内生真菌能产生紫杉醇^[25-28]。本研究从南方红豆杉中分离到的 *Diaporthe discoidispora* F. Huang, K. D. Hyde et Hong Y. Li, *F. oxysporum*, *Trichoderma theobromicola* Samuels et H. C. Evans 和 *Coniothyrium pyrinum* (Sacc.) J. Sheld. 会降低南方红豆杉叶中紫杉醇含量,而 *Trichoderma caribbaeum* 会提高南方红豆杉叶中紫杉醇含量。有研究者发现,红豆杉内生真菌可以促进植物体内紫杉醇的积累,如 *Chaetomium globosum* Kunze 和 *Paraconiothyrium brasiliense* Verkley 可促进欧洲榛(*Corylus avellana* Linn.) 细胞中紫杉醇的积累^[29]。本研究结果表明:在南方红豆杉中分离到 *P. brasiliense* 的同属种类 *P. archidendri*,且经该菌种处理后南方红豆杉叶中的紫杉醇含量高于对照组(未喷洒内生真菌诱导子溶液),据此推测 *P. archidendri* 可能具有促进紫杉醇积累的功能。红豆杉内生真菌还可促进紫杉醇合成过程中中间代谢物向终产物的转化,如从云南红豆杉中分离到的 *Microsphaeropsis onychiuri* (Punith.) Morgan - Jones, *Mucor* sp. 和 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 可以羟基化和环化2个紫杉烷类中间产物,生成下游代谢物^[30]。然而,本研究虽然分离到 *A. alternata* 的同属种类 *A. doliconidium* J. F. Li, Camporesi et K. D. Hyde,但是未在该菌种处理的南方红豆杉叶中检测到紫杉醇,推测该菌种可能抑制南方红豆杉叶中紫杉醇的合成,致使紫杉醇含量低于检测极限,从而无法检出。

本研究中,*P. lobariellae* 处理组南方红豆杉叶中紫杉醇含量较对照组升高幅度最大,值得一提的是,该菌种是 Flakus 等^[31] 在地衣中首次分离并命名的一个新菌种,关于其生物功能尚未见研究报道,在后续研究中可对该菌种进行系统研究。*G. luteofolius* 处理

组南方红豆杉叶中的紫杉醇含量较对照组升高幅度仅次于 *P. lobariellae*,该菌种也是近年来发现的新菌种,具有药品废物的生物降解功能^[32]。*C. hoffmannii* 处理组南方红豆杉叶中的紫杉醇含量较对照组升高幅度也较大,该菌种为丝状子囊菌,是一种兼性植物病原菌,可用于生产生物柴油^[33]。与对照组相比,上述3种内生真菌处理组南方红豆杉叶中的10-DAB和巴卡亭Ⅲ含量明显降低,而紫杉醇含量却明显升高,说明这3种内生真菌能促进紫杉醇的生物合成,推测可能是这3种内生真菌的发酵液中含有某种活性因子,激发了紫杉醇生物合成过程中某些代谢酶的活性,催化巴卡亭Ⅲ和10-DAB转化为紫杉醇。

作者在实验过程中发现,将内生真菌诱导子溶液喷洒在南方红豆杉植株上7d后,南方红豆杉的叶未出现明显的微生物侵染症状,这可能是由于内生真菌诱导子的处理时间较短,尚未发挥出明显效应。检测发现,经内生真菌诱导子溶液处理7d后,在半数处理组南方红豆杉的叶中未检出紫杉醇,这可能是由于紫杉醇含量太低,超出了高效液相色谱仪的检测极限。重复验证结果显示:*P. lobariellae* 处理组南方红豆杉叶中的紫杉醇含量虽然存在较大波动,但该组的紫杉醇含量与对照组间差异显著,再次证明 *P. lobariellae* 可提高南方红豆杉叶中的紫杉醇含量。

综合上述研究结果,南方红豆杉的内生真菌多样性较高,在其根、枝和叶中共分离到69株内生真菌,隶属于26属36种;其中10种内生真菌能够促进南方红豆杉叶中紫杉醇的合成,以 *P. lobariellae* 的促进作用最显著,*G. luteofolius* 和 *C. hoffmannii* 的促进作用也较明显,这3种内生真菌可作为调控南方红豆杉紫杉醇积累的候选菌。

参考文献:

- [1] 周其兴,葛 颂,顾志建,等. 中国红豆杉属及其近缘植物的遗传变异和亲缘关系分析[J]. 植物分类学报, 1998, 36(4): 323-332.
- [2] 向春娥,侯铁军,覃毅刚. 南方红豆杉育苗及造林技术[J]. 广西林业, 2013(3): 44-45.
- [3] 王红萍,段红梅. 红豆杉的价值与开发利用研究进展[J]. 北方园艺, 2013(12): 192-195.
- [4] SRIVASTAVA V, NEGI A S, KUMAR J K, et al. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2005, 13: 5892-5908.
- [5] 吴长桥,蒋路园,杨艳芳,等. 红豆杉属植物中紫杉烷化合物含

- 量比较与分析[J]. 中草药, 2021, 52(2): 538-543.
- [6] STROBEL G, YANG X, SEARS J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. *Microbiology*, 1996, 142: 435-440.
- [7] 吴庆珊, 雷 珣, 雷友梅, 等. 金钗石斛内生细菌的组成及多样性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(1): 79-90.
- [8] 寇晓琳, 谢 楠, 吴彩娥, 等. 青钱柳产黄酮类物质真菌的分离与鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2020, 44(2): 26-34.
- [9] 魏宝阳, 曹 亮, 李顺祥, 等. 内生菌与药用植物的关系及对次生代谢产物的影响[J]. 中国农学通报, 2011, 27(19): 83-88.
- [10] 张 礼, 童文君, 薛庆云, 等. 细茎石斛内生和根围细菌多样性及促生能力分析[J]. 植物资源与环境学报, 2015, 24(3): 32-40.
- [11] 张瑞芬, 李培琴, 赵江林, 等. 盾叶薯蓣内生真菌及其对宿主培养物生长和皂苷元生产的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(1): 11-15.
- [12] 郜玉钢, 莫琪琪, 赵 岩, 等. 微生物介导植物次生代谢产物累积及在药用植物作用机制中的研究进展[J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2234-2240.
- [13] 齐凤慧, 詹亚光, 景天忠. 诱导子对植物细胞培养中次生代谢物的调控机制[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 568-573.
- [14] 谢海伟, 冯嘉琪, 付晓晴, 等. 药用植物内生真菌的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(14): 1-6.
- [15] 谭 燕, 贾 茹, 陶金华, 等. 内生真菌诱导子调控药用植物活性成分的生物合成[J]. 中草药, 2013, 44(14): 2004-2008.
- [16] 陶金华, 濮雪莲, 江 曙. 内生真菌诱导子对茅苍术细胞生长及苍术素积累的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(1): 27-31.
- [17] 方 芳, 戴传超, 张 波, 等. 茅苍术悬浮细胞系建立及内生真菌诱导子对其挥发油积累的影响[J]. 中草药, 2009, 40(3): 452-455.
- [18] HEMMATI N, AZIZI M, SPINA R, et al. Accumulation of ajmalicine and vinblastine in cell cultures is enhanced by endophytic fungi of *Catharanthus roseus* cv. Icy Pink[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 158: 112776.
- [19] 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.
- [20] 张盼盼, 秦 盛, 袁 博, 等. 南方红豆杉内生及根际放线菌多样性及其生物活性[J]. 微生物学报, 2016, 56(2): 241-252.
- [21] 臧 威, 孙 翔, 孙剑秋, 等. 南方红豆杉内生真菌的多样性与群落结构[J]. 应用生态学报, 2014, 25(7): 2071-2078.
- [22] 胡 凯, 谈 锋, 唐克轩, 等. 南方红豆杉中产紫杉醇内生真菌的分离和筛选[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2006, 31(1): 134-137.
- [23] LIU K, DING X, DENG B, et al. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis* [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, 36: 1171-1177.
- [24] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [25] STROBEL G A, HESS W M, FORD E, et al. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity [J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 17: 417-423.
- [26] WANG J, LI G, LU H, et al. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 193(2): 249-253.
- [27] ZHAO K, PING W, LI Q, et al. *Aspergillus niger* var. *taxi*, a new species variant of taxol-producing fungus isolated from *Taxus cuspidata* in China [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107: 1202-1207.
- [28] SOCA-CHAFRE G, RIVERA-ORDUÑA F N, HIDALGO-LARA M E, et al. Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa* [J]. *Fungal Biology*, 2011, 115(2): 143-156.
- [29] SALEHI M, MOIENI A, SAFAIE N, et al. Elicitors derived from endophytic fungi *Chaetomium globosum* and *Paraconiothyrium brasiliense* enhance paclitaxel production in *Corylus avellana* cell suspension culture [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2019, 136: 161-171.
- [30] ZHANG J, ZHANG L, WANG X, et al. Microbial transformation of 10-deacetyl-7-epitaxol and 1 β -hydroxybaccatin I by fungi from the inner bark of *Taxus yunnanensis* [J]. *Journal of Natural Products*, 1998, 61(4): 497-500.
- [31] FLAKUS A, ETAYO J, MIADLIKOWSKA J, et al. Biodiversity assessment of ascomycetes inhabiting *Lobariella lichens* in Andean cloud forests led to one new family, three new genera and 13 new species of lichenicolous fungi [J]. *Plant and Fungal Systematics*, 2019, 64(2): 283-344.
- [32] CASTELLET-ROVIRA F, LUCAS D, VILLAGRASA M, et al. *Stropharia rugosoannulata* and *Gymnopilus luteofolius*: promising fungal species for pharmaceutical biodegradation in contaminated water [J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 207: 396-404.
- [33] KARATAY S E, DEMIRAY E, DÖNMEZ G. Efficient approaches to convert *Coniochaeta hoffmannii* lipids into biodiesel by *in-situ* transesterification [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 285: 121321.

(责任编辑: 佟金凤)