

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201604017

引文格式: 龚斌, 巫鑫, 韦婷, 等. 广西柳树桑寄生内生真菌的分离鉴定与抗肿瘤活性菌株筛选 [J]. 广西植物, 2017, 37(5):634-641  
GONG B, WU X, WEI T, et al. Isolation, identification and antitumor activity of endophytic fungi in *Taxilli herba* from *Salix babylonica* in Guangxi [J].  
Guihaia, 2017, 37(5):634-641

## 广西柳树桑寄生内生真菌的分离鉴定 与抗肿瘤活性菌株筛选

龚斌<sup>1</sup>, 巫鑫<sup>2</sup>, 韦婷<sup>1</sup>, 廖日权<sup>1</sup>, 苏本伟<sup>3</sup>, 宋静静<sup>1</sup>, 江国焕<sup>1</sup>, 朱开昕<sup>3\*</sup>

(1. 广西钦州学院 海洋学院, 广西 钦州 535000; 2. 广东医学院 广东天然药物研究与开发实验室, 广东 湛江 524000; 3. 广西钦州市中医医院, 广西 钦州 535000)

**摘要:** 该研究从广西钦州市采集健康的柳树桑寄生的根、茎和叶中分离并纯化内生真菌, 对真菌进行形态学鉴定, 提取内生真菌的 DNA, 采用真菌 ITS 序列对内生真菌进行分子鉴定。利用 A549 和 H460 细胞作为抗肿瘤活性指示细胞, 采用 MTT 法测定真菌乙酸乙酯提取物的抗肿瘤活性。经过初步分离分析, 从柳树桑寄生中纯化出 27 株内生真菌, 经鉴定它们分别属于 7 个目 9 个属 15 个种。拟盘多毛孢属和间座壳属为优势属, 其中拟盘多毛孢属全部定植于寄生根; 其次为新壳梭孢属、拟茎点霉属和球座菌属, 各分离到 3 株; 其他包括青霉属、镰刀菌属、炭疽菌属和派伦霉属, 各分离到 1 株。抗肿瘤活性研究表明, 有一株与 *Pestalotiopsis protearum* 的 ITS 序列相似性达 100% 的拟盘多毛孢属菌株 Gen24 表现有抑制肿瘤细胞 A549 和 H460 生长的特性, 在真菌乙酸乙酯浸提物浓度为 800  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 对 A549 细胞的抑制率达到了 56.92%, 对 H460 细胞的抑制率达到了 70.11%。该研究结果表明广西柳树桑寄生内生真菌较丰富, 在寄主中的分布表现了一定的组织特异性, 而且还存在一些具有抗肿瘤活性的菌株及其活性物质可供进一步深入研究。

**关键词:** 柳树, 桑寄生, 内生真菌, 拟盘多毛孢菌, 抗肿瘤

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)05-0634-08

## Isolation, identification and antitumor activity of endophytic fungi in *Taxilli herba* from *Salix babylonica* in Guangxi

GONG Bin<sup>1</sup>, WU Xin<sup>2</sup>, WEI Ting<sup>1</sup>, LIAO Ri-Quan<sup>1</sup>, SU Ben-Wei<sup>3</sup>,  
SONG Jing-Jing<sup>1</sup>, JIANG Guo-Huan<sup>1</sup>, ZHU Kai-Xin<sup>3\*</sup>

(1. College of Ocean, Qinzhou University, Qinzhou 535000, Guangxi, China; 2. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524000, Guangdong, China;  
3. Chinese Medicine Hospital of Oin Zhou, Qinzhou 535000, Guangxi, China)

**Abstract:** *Taxilli herba*, the branches with leaves of *T. chinensis* (DC.) Danser, is a traditionally used Chinese medicine. *T. herba* has been used to cure powerless bones and tendons, cancer, virus infection, rheumatic arthralgia and so

收稿日期: 2016-04-14 修回日期: 2016-10-11

基金项目: 国家自然科学基金(81173537, 31560727); 广西自然科学基金(2014GXNSFBA118135); 钦州市科技开发项目(201322034) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (81173537, 31560727); Guangxi Natural Science Foundation (2014GXNSFBA118135); Science and Technology Development Program of Qinzhou (201322034)]。

作者简介: 龚斌(1979-), 男, 湖北宜昌人, 博士, 副教授, 从事微生物学和生物技术制药研究, (E-mail) 342965691@qq.com。

\*通信作者: 朱开昕, 学士, 高级工程师, 从事天然药物及中药制剂研发, (E-mail) kaixinzhu908@126.com。

on. However, the endophytic fungi of *T. herba* has never been studied previously. In this article, the diversity of endophytic fungi in *T. herba* from *Salix babylonica* and their antitumor activity were researched. Endophytic fungi were isolated and purified from healthy stems, leaves and roots of *Taxilli herba* from *Salix babylonica* in Qinzhou and Guangxi, China. They were identified by morphological characterization firstly, and then the DNA of endophytes was extracted and subjected to ITS sequence analysis. The antitumor activity of ethyl acetate extracts from eight endophytic fungi was tested by MTT method using cancer cell A549 and H460. After preliminary separation, 27 strains of endophytes were isolated from *Taxilli herba*, and they belong to seven orders, nine genera and fifteen species respectively. Two strains, jin2 and jin30, share sequence max identity of  $\leq 97\%$  with available ITS sequences in NCBI database, and they formed a independent clade in Phylogenetic tree of ITS-rDNA sequences of existing fungi. Therefore, jin2 and jin30 maybe identified as novel species. *Pestalotiopsis* and *Diaporthe* were the preponderant genera [ accounting for colonization frequencies (CF) 25.9% for each ], and all the strains of *Pestalotiopsis* were isolated from roots. The isolating frequency of *Neofusicoccum*, *Phomopsis* and *Guignardia* were fewer, with three strains for each respectively. Other rare isolated fungi were *Penicillium*, *Fusarium*, *Colletotrichum* and *Peyronellaea*, with one strain for each. Tissue specificity of endophytes was also observed. For example, *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. colonized roots exclusively, *Diaporthe arecae*, *Colletotrichum* sp. can only colonized stems, and *Guignardia* sp. and *Peyronellaea* sp. only colonized leaves. The antitumor activity showed that one strain, which most related to *Pestalotiopsis protearum* with ITS sequence similarity at 100%, inhibited the growth of A549 and H460. The ethyl acetate extracts from fungus Gen24 inhibited the growth of A549 and H460 cell at concentration of  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , with the inhibiting rate to A549 reached 56.92%, and the inhibiting rate to H460 reached 70.11%. Our research showed the diversity of endophytes from *Taxilli herba*, and the antitumor endophytes and compounds can be further studied.

**Key words:** *Salix babylonica*, *Taxilli Herba*, endophytic fungi, *Pestalotiopsis*, antitumor

桑寄生药材为桑寄生科钝果寄生属广寄生 (*Taxillus chinensis*) 的干燥带叶茎枝, 为中国传统药材, 有祛风湿、补肝肾、强筋骨、安胎元的功能 (中国药典, 2010)。桑寄生具有广寄生性特点, 可寄生 150 多种植物 (朱开昕等, 2010), 其中柳树是其常见寄主之一。最近对不同寄主的桑寄生研究发现, 红花桑寄生总黄酮提取物有抗白血病功效 (肖义军等, 2008), 从桑寄生中提取的槲皮素、槲皮苷有抗病毒功效 (Choi et al, 2009), 而柳树寄主的桑寄生能累积寄主的水杨苷成分 (Lu et al, 2012), 增强其祛风湿功效等, 这使桑寄生受到越来越多的关注。

植物内生真菌是指在某一时期生活在健康植物体内但对寄主植物组织并不引起明显侵染的真菌。目前研究过的植物中均发现有植物内生菌的存在, 根据专家保守估计, 自然界的内生真菌物种至少有 150 万种 (Hawksworth, 1991)。然而, 已被人类描述的内生真菌不到 7 万种 (Zhang et al, 2015; Rodriguez et al, 2009; Xie et al, 2016)。Stierle et al (1993) 首次在 *Science* 杂志报道从短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 中分离得到一株能合成抗癌物质紫杉醇的内生真菌, 药用植物内生真菌的研究成为一个研究热点。内生菌不仅具有潜在的工业化应用价

值, 而且也可能对药用植物药效的产生具有重要作用, 如 Yuan et al (2016) 发现内生真菌孔孢霉菌株 (*Gilmaniella* sp. AL12) 可以促进苍术中类倍半萜化合物的积累, Zhou et al (2015) 报道苍术中内生细菌可以激发活性氧基团, 从而增加类倍半萜化合物的含量和多样性 (Zhou et al, 2015)。

桑寄生在不同的寄主具有不同的药用价值, 那么以不同植物为寄主的桑寄生其内生真菌种群如何, 这些内生真菌是否也具有一定药效, 与桑寄生的药效有何联系? 弄清楚这些问题有利于我们探讨桑寄生内生真菌对其药效产生的影响, 具有较重要的理论研究意义。本研究以钦州市采集的柳树桑寄生植物为材料, 对其内生真菌进行分离鉴定, 并对其抗肿瘤活性菌株进行筛选, 为进一步探明桑寄生植物内生真菌资源多样性及药用价值提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

采集位于广西钦州市市内、钦州港区、钦北郊区人工种植的柳树上生长的桑寄生, 采集地直线距离 5 km 以上, 共采集 10 株柳树桑寄生的根、茎、叶, 经

过钦州市中医院中医药研究所有关专家的鉴定,为桑寄生科钝果寄生属广寄生。

PDA(Potato Dextrose Agar)培养基:取去皮马铃薯 200 g,加适量水煮沸 20~30 min,2 层纱布过滤获得滤液,加入葡萄糖 20 g 和琼脂 15 g,补加纯化水到 1 000 mL,分装三角瓶 120 °C 灭菌 30 min。

### 1.2 柳树寄生内生真菌的分离纯化

将柳树寄生样品的根、茎、叶用自来水冲洗掉泥土,然后在无菌操作台中进行严格的表面消毒程序:依次浸泡在 75%酒精 0.5 min,3%~5%有效氯的次氯酸钠溶液 3 min,75%的酒精 0.5 min,然后再用无菌水冲洗 3 遍,在超净操作台中晾干,备用。将晾干后的样品,在超净台中将其剪成约 0.5 cm × 0.5 cm 左右小块。将剪成的小块铺于 PDA 平板上。28 °C 倒置培养 2~3 周。平板需每天检查真菌的生长情况。一旦发现有菌丝从组织小块长出,挑出菌丝尖端,马上将其转接到另一新的平板上,经几次纯化后接种于 PDA 斜面,并保存于本实验室 4~8 °C 冰箱。

### 1.3 菌株的形态学鉴定

在各菌株生长的最佳时期,初步观察菌落的形态、颜色、大小、生长情况、菌落、菌丝体和孢子的形态特征,对照《真菌鉴定手册》进行初步鉴定(魏景超等,1979)。

### 1.4 内生真菌 DNA 的提取

将分离得到的内生真菌接种斜面培养基,经活化后分别接种至 5 mL 不加琼脂的 PDA 培养基中,28 °C 摇床上以 150 r · min<sup>-1</sup> 的转速培养 6~7 d,12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取 200 mg 湿的培养菌丝,加入液氮研磨菌体至匀浆状,采用真菌 DNA 提取试剂盒(美国,omega)提取真菌的总 DNA,具体过程按试剂盒说明书进行。

### 1.5 内生真菌 ITS rRNA 序列分析

使用通用引物 ITS1/ITS4(ITS1:CTTGGTCATT-TAGAGGAAGTAA;ITS4:TCCTCCGCTTATTGATAT-GC)扩增真菌 ITS 序列(Takamatsu et al, 2001),PCR 产物直接送南京金斯瑞生物技术服务有限公司完成。采用 Blastn 程序将测序结果在 GenBank 数据库中进行同源性检索。调出与该序列相似性较高的核酸序列,采用 Mega 5.0 软件包进行多重序列匹配排列和聚类分析,形成一个多重序列匹配排列阵。采用邻接法(Neighbor Joining Method)构建系统发育树。

## 1.6 抗肿瘤活性检测

将真菌接种到 200 mL 液体 PDA 培养基中,28 °C 150 r · min<sup>-1</sup> 条件下进行震荡培养 7~10 d,将得到的菌丝体和发酵液进行干燥,干燥的菌丝体和发酵液称重后用乙酸乙酯进行浸提以获得浸提液。取对数生长期的 A549 和 H460 细胞,采用 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度到 10<sup>4</sup> 个 · mL<sup>-1</sup>,每孔 100 μL 加到 96 孔板中,置于 37 °C 5%湿度的二氧化碳培养箱中培养 24 h,吸出培养基,加入不同浓度的真菌提取液的细胞培养基,提取物浓度依次为 800、200、50 μg · mL<sup>-1</sup>;阳性对照组加入 25、6.25、1.5 和 0.4 μmol · L<sup>-1</sup> 的阿霉素;阴性对照组为每孔加入与提取物同体积乙酸乙酯的细胞培养基 100 μL,每个浓度做 3 个复孔,同时做三块板。继续培养 48 h 后用 MTT 法进行细胞染色,在 490 nm 波长处用酶标仪测定每孔吸光度值,并计算出细胞生长抑制率。

## 2 结果与分析

### 2.1 寄主为柳树的桑寄生内生真菌的分离

从寄主为柳树的桑寄生根、茎、叶表面消毒组织块(根组织块 247,叶组织 274,茎组织 221)分离纯化到 27 株内生真菌,这 27 株菌有的在 PDA 培养基上能够产孢,有的需要特殊条件诱导产孢。根据菌株的菌落(图 1)、菌丝体和孢子的形态特征,对照《真菌鉴定手册》进行初步鉴定,这 27 株菌属于 9 个属,其中根部分离到 5 个属共 13 株菌,占分离总量的 48.15%;茎部分离到 4 个属共 8 株菌,占分离总量的 29.63%;叶中分离到 4 个属共 6 株菌,占分离总量的 22.22%(表 1)。

### 2.2 内生真菌的分子生物学鉴定

采用 ITS 特异性引物对 27 株内生真菌 DNA 进行 PCR 扩增,对得到的序列进行 Blastn 分析,结果表明所有的 27 株内生真菌都属于子囊菌门,分属于 7 个目 9 个属;27 株菌种有 26 株与已有的真菌 ITS 序列相似性在 96% 以上,另外有一株 jin2 与 GenBank 中已有的序列相似对最高的只有 93%,暂时定名为 *Diaporthe* sp.(表 2)。

基于以柳树为寄主的桑寄生分离的 27 株内生真菌的 ITS 序列构建系统发生树(图 2),结果表明 27 株菌属于 8 个分支(bootstrap 值为 100%),jin2、gen17、gen27、jin32、gen30、ye11、jin33、jin35、ye6 都属于间座壳目 *Diaporthales*,与 *Diaporthe arecae*、*D. per-*

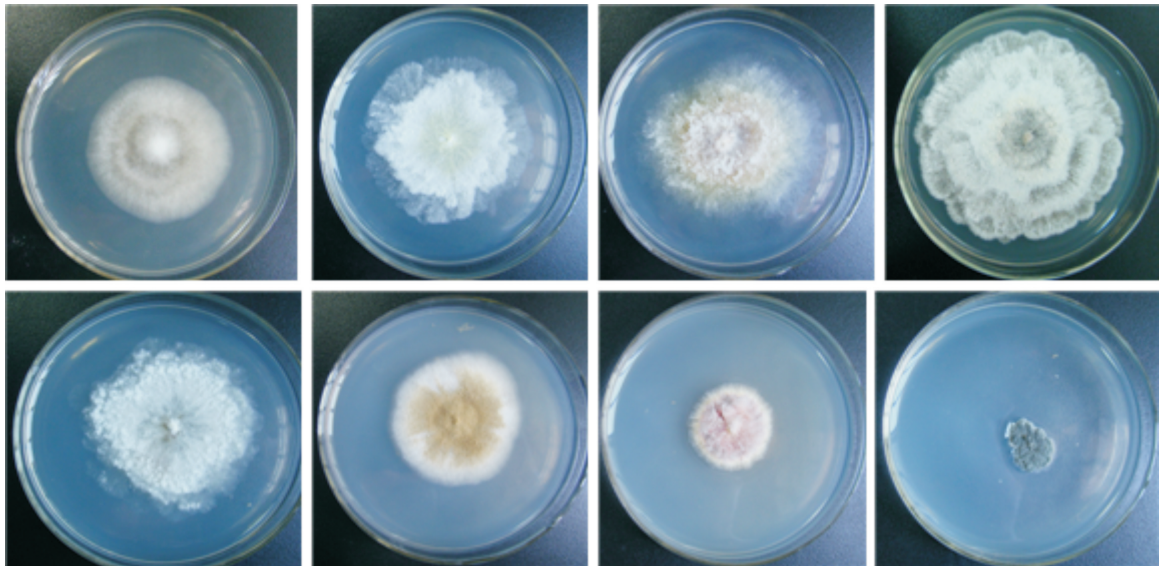


图 1 寄主为柳树的桑寄生部分内生真菌的典型菌落

Fig. 1 Colony morphology of some endophytic fungi isolated from *Taxilli herba* from *Salix babylonica*

表 1 寄主为柳树的桑寄生不同组织中内生真菌属的组成

Table 1 Composition of endophytic fungi in different tissues of *Taxilli herba* from *Salix babylonica*

来源组织 Tissue	分类 Taxa	数量 Number	分离率 CF (%)	总的分离率 Total CF (%)
根 Root	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	7	25.9	48.15
	<i>Penicillium</i> sp.	1	3.7	
	<i>Neofusicoccum</i> sp.	1	3.7	
	<i>Diaporthe</i> spp.	3	11.11	
	<i>Fusarium</i> sp.	1	3.7	
茎 Stem	<i>Neofusicoccum</i> spp.	2	7.41	29.63
	<i>Diaporthe</i> spp.	3	11.11	
	<i>Colletotrichum</i> sp.	1	3.7	
	<i>Phomopsis</i> spp.	2	7.41	
叶 Leaf	<i>Diaporthe</i> sp.	1	3.7	22.22
	<i>Phomopsis</i> sp.	1	3.7	
	<i>Guignardia</i> spp.	3	11.11	
	<i>Peyronellaea</i> sp.	1	3.7	

CF%: the colonization frequency.

*seae*, *D. pascoei*, *D. phaseolorum*, *Phomopsis liquidambari* 构成一个支持率为 100% 的分支; gen2 属于肉座菌目 *Hypocreales*, 与 *Fusarium decemcellulare* 在一个分支 (支持率为 100%); gen6、gen15、gen16、gen4、gen14、

gen24、gen26 都属于炭角菌目 *Xylariales*, 与 *Pestalotiopsis neglecta*、*P. disseminata*、*P. heterocornis*、*P. microspora* 等菌株构成一个支持率为 100% 的分支; Gen11 属于散囊菌目 *Eurotiales*, 与 *Penicillium oxalicum* 构成一个分支 (支持率为 100%); Ye2 属于格孢菌 *Pleosporales*, 与 *Peyronellaea glomerata* 聚类在一个支持率为 100% 的分支; jin24、jin3、gen13、ye13、ye7、ye1 对属于葡萄座腔菌目 *Botryosphaeriales*, 其中 jin24、jin3 和 gen13 与 *Neofusicoccum parvum* 聚类在一个分支 (支持率为 100%); ye13、ye7 和 ye1 与 *Guignardia mangiferae* 和 *Phyllosticta capitalensis* 的亲缘关系比较近。在所有的菌株中, 从系统发生树看 jin2 和 jin30 形成了一个独立的分支, 分类地位还不能确定, 可能是新种, 这有待进一步研究。

### 2.3 内生真菌在寄主为柳树的桑寄生组织中的分布

在所有分离到的菌株中, 拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*) 和间座壳属 (*Diaporthe*) 为优势属, 拟盘多毛孢属分离到 7 株菌, 分离率为 25.9%, 全部定植于以柳树为寄主的桑寄生的寄生根; 间座壳属分离到 7 株, 分离率为 25.9%, 广泛分布于根、茎和叶组织。其次为新壳梭孢属 (*Neofusicoccum*)、拟茎点霉属 (*Phomopsis*) 和球座菌属 (*Guignardia*), 均分离到 3 株; 其它包括青霉属 (*Penicillium*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、炭疽菌属 (*Colletotrichum*) 和派伦霉属 (*Peyronellaea*), 各分离到 1 株 (表 3)。

表 2 寄主为柳树的桑寄生内生真菌 ITS 序列 Blastn 分析

Table 2 Blastn analysis of ITS sequence of *Taxilli herba* from *Salix babylonica*

编号 Code	Blastn 分析的相似性 最高的类型 Reference accession by Blastn	分类号 Accession No.	最高相似性 Max. identity (%)
Gen2	<i>Fusarium decemcellulare</i>	GU797410	98
Gen4	<i>Pestalotiopsis palmarum</i>	AF409990	100
Gen6	<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	AB251918	98
Gen11	<i>Penicillium oxalicum</i>	JF732994	97
Gen13	<i>Neofusicoccum parvum</i>	KJ596527	96
Gen14	<i>Pestalotiopsis malicola</i>	JF501649	99
Gen15	<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	AB251918	98
Gen16	<i>Pestalotiopsis heterocornis</i>	AY681492	98
Gen17	<i>Diaporthe perseae</i>	KC343173	99
Gen24	<i>Pestalotiopsis protearum</i>	JX556231	100
Gen26	<i>Pestalotiopsis protearum</i>	JX556231	100
Gen27	<i>Diaporthe perseae</i>	KC343173	99
Gen30	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	AF001025	99
Jin2	<i>Diaporthesp.</i>	KF697689	93
Jin3	<i>Neofusicoccum parvum</i>	FJ904817	99
Jin22	<i>Diaporthe arecae</i>	KC343033	97
Jin24	<i>Neofusicoccum parvum</i>	KC706915	99
Jin30	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ456938	99
Jin32	<i>Diaporthe perseae</i>	KC343173	99
Jin33	<i>Phomopsis liquidambari</i>	JQ676191	98
Jin35	<i>Phomopsis liquidambari</i>	JQ676191	98
Ye1	<i>Guignardia mangiferae</i>	KF920711	98
Ye2	<i>Peyronellaea glomerata</i>	KC339777	99
Ye6	<i>Phomopsis liquidambari</i>	JQ676191	99
Ye7	<i>Guignardia mangiferae</i>	EU677817	99
Ye11	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	KJ174455	97
Ye13	<i>Guignardia mangiferae</i>	KF920711	98

寄生根分离的内生真菌还包括青霉属、新壳梭孢属、间座壳属、镰刀菌属真菌,其中青霉属和镰刀菌属为特异性寄生于根;茎部寄生的内生真菌包括新壳梭孢属、间座壳属、镰刀菌属、炭疽菌属和拟茎点霉属,其中间座壳属的 *Diaporthe arecae* 和炭疽菌

表 3 以柳树为寄主的桑寄生内生真菌

各种在组织中的分布情况

Table 3 Distribution of species of endophytic fungi in different tissues of *Taxilli herba* from *Salix babylonica*

编号 No.	属 Genus	种 Species	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
1	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	<i>Pestalotiopsis protearum</i>	2		
		<i>P. disseminata</i>	2		
		<i>P. malicola</i>	1		
		<i>P. heterocornis</i>	1		
		<i>P. palmarum</i>	1		
2	青霉属 <i>Penicillium</i>	<i>Penicillium ancalicum</i>	1		
3	新壳梭孢属 <i>Neofusicoccum</i>	<i>Neofusicoccum parum</i>	1	2	
4	间座壳属 <i>Diaporthe</i>	<i>Diaporthe perseae</i>	2	1	
		<i>D. phaseolorum</i>	1	1	1
		<i>D. arecae</i>		1	
5	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium decemcellulare</i>	1		
6	炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		1	
7	拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	<i>Phomopsis liquidambari</i>		2	1
8	球座菌属 <i>Guignardia</i>	<i>Guignardia mangiferae</i>			3
9	派伦霉属 <i>Peyronellaea</i>	<i>Peyronellaea glomerata</i>			1

属为茎内专性寄生;叶内寄生的真菌包括间座壳属、拟茎点霉属、球座菌属、派伦霉属,其中球座菌属和派伦霉属为叶内专性寄生(表3)。

#### 2.4 抗肿瘤活性

挑选拟盘多毛孢属 5 个种的代表菌株,以及新壳梭孢属、拟茎点霉属、派伦霉属共 8 株菌进行液体发酵培养,将菌丝体和发酵液在干燥箱中干燥后用乙酸乙酯进行浸提。采用浸提物对 A549 和 H460 细胞进行试验,以 A549 和 H460 细胞生长的抑制率表示抗肿瘤活性的大小。结果表明在检测的 8 株真菌粗提物中,有一株拟盘多毛孢属菌株 Gen24 表现有抑制 A549 和 H460 细胞生长的特性,在浸提物浓度为  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,对 A549 细胞的抑制率达到了 56.92%,而对 H460 细胞的抑制率达到了 70.11%,抗肿瘤活性明显高于其他菌株,抑制 A549 细胞活性与阳性对照阿霉素在  $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时活性相当

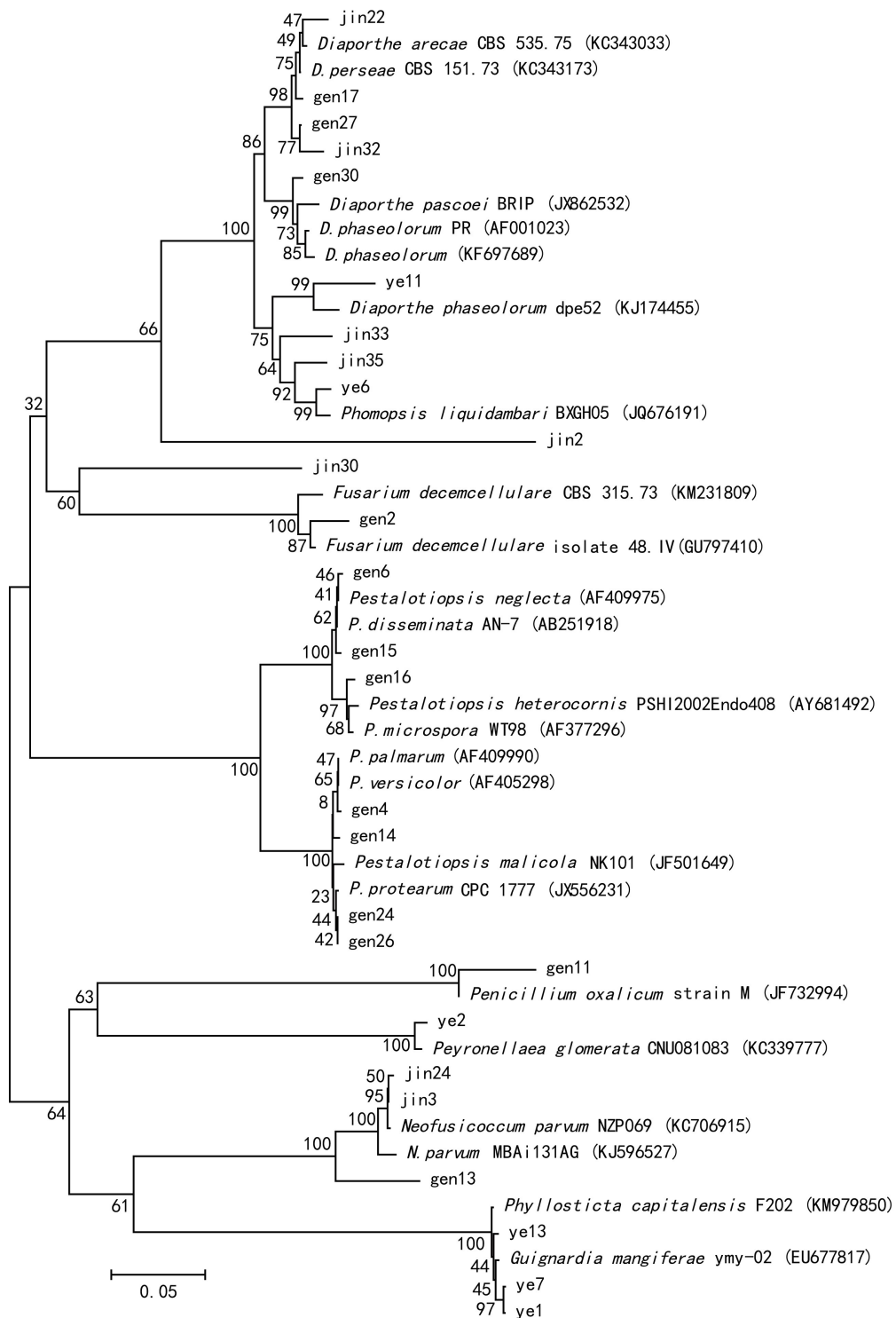


图 2 以柳树为寄主的桑寄生内生真菌 ITS 序列系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ITS-rDNA sequences of endophytic fungi in *Taxilli herba* from *Salix babylonica*

(图 3), 抑制 H460 细胞活性与阳性对照阿霉素在  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时活性相当(图 4), 而实验中添加有相

应乙酸乙酯提取溶剂的细胞培养液阴性对照对 A549 细胞无抑制(结果未显示)。

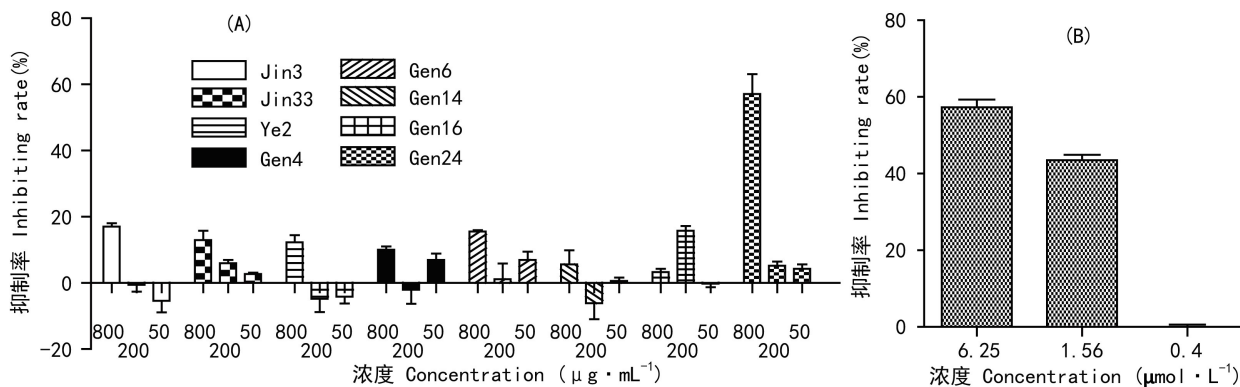


图 3 柳树桑寄生内生真菌粗提物抑制 A549 细胞活性 A. 8 个代表性内生真菌菌株抑制肿瘤细胞 A549 的活性; B. 阳性对照阿霉素抑制肿瘤细胞 A549 的活性。

Fig. 3 Inhibition of extracts from endophytes of *Taxilli herba* from *Salix babylonica* to cancer cell A549 A. Inhibiting activities of eight endophytic fungi to cancer cell A549; B. Positive control of Adriamycin to cancer cell A549.

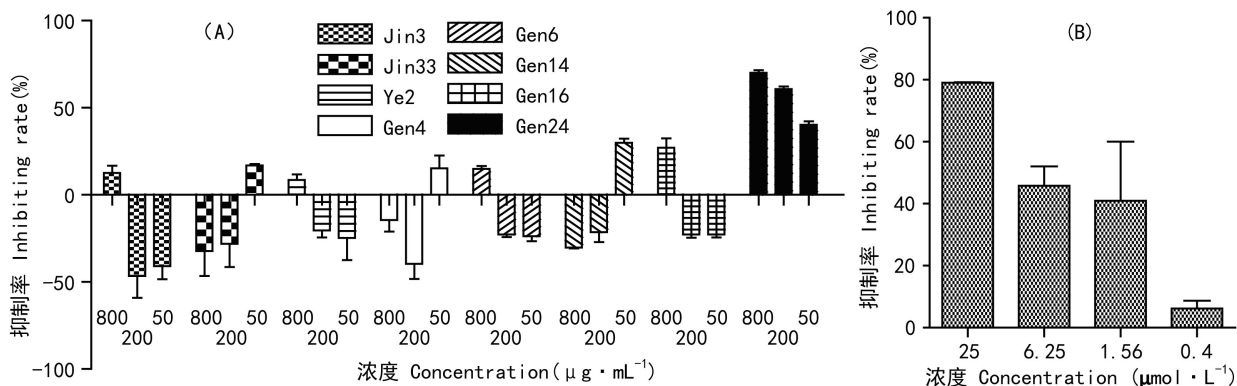


图 4 柳树桑寄生内生真菌粗提物抑制 H460 细胞活性 A. 8 个代表性内生真菌菌株抑制肿瘤细胞 H460 的活性; B. 阳性对照阿霉素抑制肿瘤细胞 H460 的活性。

Fig. 4 Inhibition of extracts from endophytes of *Taxilli herba* from *Salix babylonica* to cancer cell H460 A. Inhibiting activities of eight endophytic fungi to cancer cell H460; B. Positive control of Adriamycin to cancer cell H460.

### 3 讨论与结论

柳树桑寄生是一种重要的中药材,本研究首次报道了从广西钦州市柳树桑寄生中分离到 27 株共 8 个属 15 个种的内生真菌,并测定了内生真菌的抗肿瘤活性,为开展内生真菌在柳树桑寄生药用活性成分的生物合成机制等奠定了基础。

本研究发现柳树桑寄生的寄生根中分离到 5 个属 10 个种共 13 株内生真菌,分离率为 48.15%,其内生真菌分离率、多样性和分离到的绝对数量明显高于茎和叶,而柳树桑寄生的寄生根对于其从宿

主获取营养成分非常重要,寄生根的内生真菌多是否意味着内生真菌可以帮助柳树桑寄生从宿主获取营养,或者从宿主吸收次级代谢产物并进行转化,从而形成柳树寄生的活性成分还有待进一步研究。

从根部分离的内生真菌中,拟盘多毛孢属有 5 个种共 7 株,从种类和数量上都占绝对优势,并且是专性寄生于根部,这提示拟盘多毛孢可能对柳树桑寄生吸收宿主的营养或是次生代谢产物的转化中可能具有重要意义。从本研究中,我们得到一株具有明显抑制肿瘤细胞 A549 和 H460 的菌株 Gen24,根据其 ITS 基因序列鉴定为拟盘多毛孢,与 *Pestalotiopsis protearum* ITS 序列相似性为 100%。据

报道,拟盘多毛孢是一种具有重要药用价值的真菌,可以利用其提取到紫杉醇等多种药物或前体物质(Vennila et al, 2011; Gu et al, 2015; Xu et al, 2014),具有抗真菌(Li et al, 2008)、抗肿瘤(Liu et al, 2009)等活性。目前已经发现能够产生紫杉醇等抗肿瘤活性物质的拟盘多毛孢包括 *Pestalotiopsis microspora* (Strobel et al, 1996)、*Pestalotiopsis breviseta* (Kathiravan et al, 2010)、*Pestalotiopsis pauciseta* (Vennila et al, 2011)、*Pestalotiopsis malicola* (Bi et al, 2013)、*Pestalotiopsis hainanensis* (Gu et al, 2015)等,而有关 *Pestalotiopsis protearum* 的研究还非常少,目前未发现其具有抗肿瘤活性的相关报道。

本研究从柳树桑寄生中分离了内生真菌,并对内生真菌进行了形态学和分子生物学鉴定,并发现了一株具有抗肿瘤活性的内生真菌菌株,在后续研究中我们将研究内生真菌的活性物质,并探讨其在柳树桑寄生次生代谢物转化中的意义。

## 参考文献:

BI J, JI Y, PAN J, et al, 2013. A new taxol-producing fungus (*Pestalotiopsis malicola*) and evidence for taxol as a transient product in the culture [J]. *Afr J Biotechnol*, 10(34): 6647-6654.

Chinese Pharmacopoeia Commission, 2010. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Vol. 1) [S]. The medicine science and technology press of China: 280. [国家药典委员会编, 2010. 中华人民共和国药典(一部) [S]. 中国医药科技出版社: 280.]

CHOI HJ, SONG JH, PARK KS, et al, 2009. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication [J]. *Eur J Pharm Sci*, 37(3): 329-333.

GU Y, WANG Y, MA X, et al, 2015. Greater taxol yield of fungus *Pestalotiopsis hainanensis* from dermatitic scurf of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 175(1): 155-165.

HAWKSWORTH DL, 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation [J]. *Mycol Res*, 95(6): 641-655.

KATHIRAVAN G, RAMAN VS, 2010. *In vitro* TAXOL production, by *Pestalotiopsis breviseta*-a first report [J]. *Fitoterapia*, 81(6): 557-564.

LI E, JIANG L, GUO L, et al, 2008. Pestalochlorides A-C, anti-fungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta* [J]. *Bioorg Med Chem*, 16(17): 7894-7899.

LIU L, LI Y, LIU S, et al, 2009. Chloropestolide A, an antitumor metabolite with an unprecedented spiroketal skeleton from *Pesta-*

*lotiopsis fici* [J]. *Org Lett*, 11(13): 2836-2839.

LU D, SU BW, LI YH, et al, 2012. Study on salicin content correlation between *Taxilli herba* and their willow host plants [J]. *J Med Plants Res*, 6(12): 2474-2477.

RODRIGUEZ RJ, WHITE JF, AMOLD AE, et al, 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles [J]. *New Phytol*, 182(2): 314-330.

STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D, 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreaeanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 260(5105): 214-216.

STROBEL G, YANG X, SEARS J, et al, 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. *Microbiology*, 142(2): 435-440.

TAKAMATSU S, KANO Y, 2001. PCR primers useful for nucleotide sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi [J]. *Mycoscience*, 42(1): 135-139.

VENNILA R, MUTHUMARY J, 2011. Taxol from *Pestalotiopsis pauciseta* VM1, an endophytic fungus of *Tabebuia pentaphylla* [J]. *Biomed Prevent Nutr*, 1(1): 103-108.

WEI JC, 1979. Fungal identification manual [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers. [魏景超, 1979. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社.]

XIAO YJ, CHEN YZ, CHEN BH, et al, 2008. Study on cytotoxic activities on human leukemia cell line HL-60 by flavonoids extracts of *Scurrula parasitica* from four different host trees [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 33(4): 427-432. [肖义军, 陈元仲, 陈炳华, 等, 2008. 不同寄主红花桑寄生总黄酮提取物抗白血病细胞株 HL-60 的研究 [J]. 中国中药杂志, 33(4): 427-432.]

XIE XG, HUANG CY, FU WQ, et al, 2016. Potential of endophytic fungus *Phomopsis liquidambari* for transformation and degradation of recalcitrant pollutant sinapic acid [J]. *Fungal Biol*, 120(3): 402-413.

XU J, YANG X, LIN Q, 2014. Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products [J]. *Fungal Divers*, 66(1): 37-68.

YUAN J, ZHOU JY, LI X, et al, 2016. The primary mechanism of endophytic fungus *Gilmaniella* sp. AL12 promotion of plant growth and sesquiterpenoid accumulation in *Atractylodes lancea* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult (PCTOC)*, 125(3): 571-584.

ZHANG T, YAO YF, 2015. Endophytic fungal communities associated with vascular plants in the high arctic aone are highly diverse and host-plant specific [J]. *PLoS ONE*, 10(6): e0130051. doi:10.1371/journal.pone.0130051.

ZHOU JY, YUAN J, LI X, et al, 2015. Endophytic bacterium-triggered reactive oxygen species directly increase oxygenous sesquiterpenoid content and diversity in *Atractylodes lancea* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 82(5): 1577-1585.

ZHU KX, LU D, PEI HH, et al, 2010. The distribution and host of *Taxilli herba* in Guangxi [J]. *Guangxi J Trad Chin Med*, 33(2): 59-61. [朱开昕, 卢栋, 裴河欢, 等, 2010. 桑寄生在广西的分布及其寄主状况调查 [J]. 广西中医药, 33(2): 59-61.]