

DOI:10.14188/j.ajsh.2020.02.002

药用植物内生真菌的多样性及生物功能研究进展

王景仪,李梦秋,李艳茹,徐玲霞,曹小迎*,蒋继宏

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

摘要: 药用植物内生真菌资源丰富,其代谢产物常具有抗肿瘤、抗氧化、抑菌等作用,能产生药用植物生长调节物质及与宿主相同或类似的次生代谢产物,从而成为近年来的研究热点。本文对药用植物内生真菌的分离鉴定、多样性、生物活性及生物学功能等方面进行综述,以期为今后筛选及利用有效的药用植物内生真菌奠定基础。

关键词: 药用植物;内生真菌;分离鉴定;多样性;生物活性;生物学功能

中图分类号: S567.3

文献标识码: A

文章编号: 2096-3491(2020)02-0164-09

Research progress on diversity and biological function of endophytic fungi in medicinal plants

WANG Jingyi, LI Mengqiu, LI Yanru, XU Lingxia, CAO Xiaoying*, JIANG Jihong

(Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China)

Abstract: Endophytic fungi in medicinal plants are rich in resources, and their metabolites often have anti-tumor, anti-oxidation, bacteriostatic effect and so on. They can produce growth regulators of medicinal plants and the same or similar secondary metabolites as the host, which have become a research hotspot in recent years. In this paper, the isolation, identification, diversity, biological activity and biological function of endophytic fungi in medicinal plants are reviewed, in order to lay a foundation for the screening and utilization of effective endophytic fungi on medicinal plants in the future.

Key words: medical plants; endophytic fungi; isolation and identification; diversity; biological activity; biological function

0 引言

世界上已知的植物多达数万种,它们是地球上必不可少的一部分,药用植物更是为人类生活带来了福音。药用植物比中草药的概念更为广泛。人们认识和利用的植物资源中,药用植物是指具有特殊的化学成分和药理功效,或在农业生产中具有除草、杀虫、杀菌等作用的各类植物的总称。植物内生真

菌是指其生活史的部分阶段或全部阶段生存在健康植物体内而不引起植物明显感染症状的一类真菌。内生真菌因能产生与宿主相同或相似的次级代谢产物而成为近年来的研究热点。研究表明,几乎所有被研究过的植物体内都含有内生真菌^[1],药用植物内生真菌更不例外。本文将从药用植物内生真菌的分离鉴定、多样性、生物活性及生物学功能等方面来阐述药用植物内生真菌的研究进展。

收稿日期: 2019-12-11 修回日期: 2020-02-18 接受日期: 2020-03-03

作者简介: 王景仪(1994-),女,硕士,从事植物学研究。E-mail: 2020170838@jsnu.edu.cn

* 通讯联系人: 曹小迎(1975-),女,高级实验师,主要从事药用植物生物技术工作。E-mail: cxy4868@jsnu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(31401443);江苏师范大学研究生创新项目:植物病原细菌效应蛋白HopAM1抑制免疫分子机理的研究(KY-CX18_2144)

引用格式:王景仪,李梦秋,李艳茹,等. 药用植物内生真菌的多样性及生物功能研究进展[J]. 生物资源, 2020, 42(2): 164-172.

Wang J Y, Liu M Q, Li Y R, et al. Research progress on diversity and biological function of endophytic fungi in medicinal plants [J]. Biotic Resources, 2020, 42(2): 164-172.

1 药用植物内生真菌的分离鉴定

1.1 表面消毒

药用植物的健康组织和器官中普遍存在内生真菌,并且种类丰富,分布所有器官。目前常用的药用植物内生真菌的分离方法有:组织表面消毒法,真空提取法和压力提取法等,其中最常用的是组织表面消毒法。组织表面消毒法通常包括以下几个步骤:①用流动的自来水冲洗药用植物表面,洗掉表面的泥土、杂物等;②在超净工作台中,用消毒剂对药用植物表面进行消毒,以去除药用植物表面的微生物;常用的消毒液有酒精、升汞、次氯酸钠等,也可使用不同消毒剂进行组合的方式进行表面消毒以提高消毒效果;③在超净工作台中,用无菌水漂洗药用植物数次,以去除消毒剂对试验的影响;④将表面消毒后的药用植物组织块接种到真菌培养基上,并进行表面消毒的无菌检查,常用的无菌检查的方法有组织印迹法、漂洗液检验法、组织浸渍法等^[2]。

组织表面消毒法中消毒剂使用量较难掌握,使用过多,部分内生真菌被误杀,无法分离出来。使用少了又会将组织表面的菌分离出来。因此需要针对不同的组织,采用不同的消毒剂组合及不同的消毒时间,获得某个样品的最佳消毒效果。

王志勇等^[3]用不同消毒剂对水花生的茎处理不同时间,并以最佳组合对植物材料进行消毒处理,在适温下培养不同时间,观察各个处理对植物内生菌数量的影响。结果表明,用5%NaClO浸泡4 min、0.1%HgCl₂浸泡0.5 min或先用75%乙醇浸泡0.5 min,再用0.1%HgCl₂浸泡0.5 min,分离内生菌的效果均较好;0.1%HgCl₂浸泡0.5 min后置于分离培养基平板上培养2 d,内生菌数量极显著增加。在南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei*)内生真菌分离的过程中,使用75%乙醇、2%NaClO代替升汞对外植体进行了表面消毒摸索^[4],结果表明,红豆杉叶、茎、皮经预处理后,先用75%乙醇浸泡3 min,再用2%NaClO浸泡2 min,然后红豆杉叶、茎、皮分别用75%乙醇浸泡3、5、7 min,可取得满意的表面消毒效果。邓雪萍等^[5]探索并建立了小叶榕茎段和叶片内生菌的表面消毒方法,对茎段的表面消毒有两种方案:75%酒精浸泡1~1.5 min,0.1%升汞浸泡1 min;或者75%酒精浸泡1 min,0.1%升汞浸泡1~1.5 min。对叶片的表面消毒,两种消毒剂漂洗持续时间分别为75%酒精1.5~2.0 min,0.1%升汞1.5 min。茎段用组织块法分离内生菌,叶片用组织匀浆法分离内生菌。结果从小叶榕植物样本中分离得到

3株丝状真菌,2株细菌。

1.2 分离培养基

分离药用植物内生真菌常用的培养基有:马铃薯葡萄糖培养基(PDA)、Martin培养基、SBS培养基、完全培养基等,其中最常用的是PDA培养基,并加入一定量的抗生素以抑制细菌的生长。内生真菌的分离也会受到人工培养基的限制,有时不能成功分离。培养基不同,所分离出的内生真菌的种类和数量也会不同,故而可将同一药用植物的组织或器官接种到不同的分离培养基中,以提高分离的种类和数量。以铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为研究对象,采用组织块法,选取不同的分离培养基,从铁皮石斛根、茎和叶中分离获得22株内生真菌^[6]。李丹等^[7]利用不同的分离培养基,从黑果枸杞中分离得到18株内生真菌,其中从棘刺分离得到3株,从根部分离得到10株,从茎部分离得到5株。

但仍需注意的,目前分离鉴定的只是一小部分内生真菌,大部分的药用植物内生真菌是无法在现有培养基上进行纯培养的。因此需要开发新的分离培养基去分离培养出更多的内生真菌。

1.3 药用植物内生真菌的鉴定

药用植物内生真菌的鉴定主要是在真菌形态学方法的基础上,利用分子生物学方法加以鉴定。形态学方法主要根据内生真菌的形态特点进行归类和鉴定,肉眼观察菌落大小、颜色、表面特征和质地等,用显微镜观察菌丝、子实体、孢子、产孢结构等,然后根据真菌鉴定手册进行分类鉴定。但是,常规人工培养条件下,内生真菌一般不产生孢子,故而需要人为的设置恶劣环境来诱导药用植物内生真菌产孢以进行鉴定。有些药用植物内生真菌无法产孢,只能根据培养特征进行分类,但这种划分意义不大,故而可结合分子生物学的方法进行鉴定。

宣群等^[8]利用药用植物莪术(*Curcuma zedoary*)地下器官,采用PDA培养基分离内生真菌,查氏培养基和促孢培养基为鉴定培养基,经形态观察进行初步鉴定。结果从莪术根、根茎和块根中获得24株内生真菌,分属8个属,且莪术不同部位内生真菌的数量、种类及分布存在差异。

随着现代分子生物学的发展,对于不产孢或者形态相似的药用植物内生真菌,常采用基因间隔序列(ITS)分析进行鉴定。从药用植物内生真菌中提取DNA,使用通用引物(如ITS1、ITS4)进行PCR扩增,测序后比对,鉴定了大部分形态学鉴定困难的药用植物内生真菌^[2]。Manganyi等^[9]从南非植物斯立丁(*Sceletium tortuosum*)中分离了60株内生真菌,

并使用ITS区进行鉴定为16属。

2 药用植物内生真菌多样性

根据内生真菌与宿主间的专一性分析,目前自然界至少有100多万种内生真菌^[10]。通过分离培养只能获得一小部分菌种,大部分内生真菌不能通过培养获得。谭小明等^[11]基于近10年来已报道的可培养内生真菌,总结了国内外已报道的药用植物内生真菌的种类,从83科212种的药用植物组织(根、茎、叶、花、果实、叶柄、根茎等)中共分离得到376属以上的内生真菌,涉及子囊菌、担子菌和无孢类群等,具有丰富的物种多样性。

药用植物内生真菌的种类和数量在不同的宿主体内是不同的,而同一药用植物体内的内生真菌也会随着地区、季节、生长阶段、组织或器官的改变而改变。

以湖南省壶瓶山国家级自然保护区生长的9株(3组)不同树龄银杏为研究对象,应用Illumina-HiSeq高通量测序技术,分析银杏叶片组织内生真菌的多样性及群落结构^[12],结果表明,银杏叶片内生真菌群落的多样性、群落结构与组成均存在显著性差异,且随着树龄的增加,叶片内生真菌群落结构差异增大;子囊菌门(Ascomycota)为绝对优势菌门;曲霉属(*Aspergillus*)、假丝酵母属(*Candida*)、球腔菌属(*Mycosphaerella*)等真菌为银杏叶内生真菌群落优势菌属。

吕立新等^[13]对茅山型茅苍术(MA)和湖北型茅苍术(HA)的内生真菌多样性进行调查。将两种化学型的茅苍术移栽至同一环境中,分别于春夏秋3个季节采集叶片进行内生真菌的分离、鉴定和多样性分析。调查发现,MA内生真菌分离率要高于HA,二者的真菌多样性构成有一定差异性。随着季节的变化,内生真菌群落显示出一定的演替规律。夏季内生真菌的多样性高于春季和秋季。

通过在云南省嵩明县、鹤庆县、保山市采集野生滇重楼植株,从其根、块茎、叶中分离得到内生真菌749株,分别归属于41个属,其中3个属仅在根部出现,12个属仅在块茎出现,8个属仅在叶部出现。各个样地分离出的内生真菌表现出一定的差异,其中鹤庆样地块茎部位分离的内生真菌多样性最高^[14]。各样地间,各部位间的内生真菌组成相似性系数低。不同样地、不同部位的滇重楼内生真菌的差异性可能与生境以及各部位结构、成分等因素有关。

近年来发展起来的高通量测序技术为分析药用植物内生真菌多样性提供了方便。比如刘蓬蓬等^[15]

应用Illumina MiSeq高通量测序技术测定黄芪内生真菌的18S rDNA NS1-Fung区域序列并进行物种丰度等生物信息分析,发现黄芪内生真菌群落多样性较低,咖啡锈菌(*Hemileia*)和赤霉菌(*Gibberella*)是黄芪内生真菌的优势种群。基于高通量测序及宏基因组分析法对采自贵州遵义县枫香镇、湖南慈利县零阳镇、四川旺苍县木门镇等3个产地的杜仲树皮内生真菌的群落组成及生态功能结构进行分析^[16],发现四川旺苍样本(EWP)中优势属为丛赤壳科(Nectriaceae)中的未定属,相对丰度为55.03%;湖南慈利样本(ECP)中优势属为子囊菌门(Ascomycota)中的未定属,相对丰度为40.23%;贵州遵义样本(EZP)中优势属为扁孔腔菌属(*Lophiostoma*),其相对丰度为47.15%。

3 药用植物内生真菌的生物活性

内生真菌具有产生多种植物次生代谢产物的能力,美国科学家Stierle等^[17]1993年的研究工作是药用植物内生真菌研究史上的里程碑。他们首次从药用植物太平洋短叶红豆杉韧皮部分分离得到1株能产紫杉醇的内生真菌。紫杉醇是一种二萜衍生物,对卵巢癌、乳腺癌等具有良好的治疗效果。自此,利用药用植物内生真菌产生与该药用植物相近或相同的活性物质,成为人类寻找天然药物的重要途径。

3.1 抗肿瘤方面

药用植物内生真菌能产生一些抗肿瘤的活性成分。如南酸枣的一株内生真菌(*Nigrosporone* sp.) BCC 47789中分离到新的天然化合物氢蒽醌nigrosporone A和nigrosporone B具有细胞毒性^[18]。一柱分离自诺丽的内生真菌M50,经鉴定确定为*Leptoxylum fumago*,具有广谱的抗肿瘤生物活性,对肝癌细胞株SMMC-7721、Lewis肺癌、前列腺癌细胞株PC-3的半抑制浓度分别为45.46、53.33和80.48 μg/mL^[19]。从一种称为叶点霉菌(*Phyllosticta aristolochiicola*)的铁皮石斛内生真菌次生代谢产物中分离得到化合物环-(甘氨酸-L-脯氨酸)、环-(L-苯丙氨酸-L-亮氨酸)和(2S,3R)-1-(4-羟基苯基)丁烷-2,3-二醇对HL-60、A-549、SMMC-7721、MCF-7和SW-480细胞株具有一定的抑制活性^[20]。红豆杉内生真菌青霉菌(*Penicillium* sp.)H⑥.1发酵产物中自然析出的一种化合物Penitrem A对恶性黑色素瘤细胞A375有一定的抑制作用,且抑制作用随浓度的增大而增强,IC₅₀为27.24 μg/mL^[21]。

药用植物蒲公英内生真菌PG23发酵液中的多糖对A549肺癌细胞具有较强的抑制作用。PG23发

酵液抑制 A549 肺癌细胞的最佳作用浓度为 14.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抑制率为 87.63%, IC_{50} 为 1.073 mg/mL (24 h)^[22]。

药用植物八角莲 (*Dysosma versipellis*) 内生真菌具有抗 IN-LEDGF/p75 相互作用活性, 对人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 整合酶与晶状体上皮源性生长因子 p75 蛋白 (LEDGF/p75) 之间的蛋白-蛋白相互作用具有抑制作用。其中, 106 号菌株的发酵液部分提取物的活性最好, IC_{50} 为 5.23 mg/L 。ITS-rDNA, LSU 和 RPB2 序列综合鉴定的结果, 表明 106 号真菌属于巨囊藻科 (Magnaporthaceae) 的一个潜在的新种。这一结果将为新型抗获得性免疫缺陷综合征药物的研究和开发提供可利用的候选菌株资源^[23]。

从络石内生真菌露湿漆斑菌 (*Myrothecium roridum*) 发酵液中分离获得 2 个单端孢霉烯化合物——12'-hydroxyroridin E (1) 和 trichoverritone (2), 其对 HepG2 细胞和 Hela 细胞有明显的抑制增殖作用, IC_{50} 值分别为 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 阳性对照药顺铂的 IC_{50} 值分别为 4.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 2.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。进一步研究发现, 12'-hydroxyroridin E (1) 可能通过诱导 HepG2 细胞 G2 期周期阻滞而抑制其增殖, 该诱导作用可能与细胞中 p27 蛋白的表达上调相关^[24]。

3.2 抗氧化方面

从秦巴山区虎杖中分离到的无性型真菌丝孢链格孢菌 (*Alternaria alternaria*), 可产白藜芦醇苷, 其产量达 1.029 mg/L ^[25]。白藜芦醇苷具有清除自由基及抗脂质过氧化的作用。白藜芦醇苷体外可清除 O_2^- 及 $\cdot\text{OH}$, 抑制 H_2O_2 诱导的大鼠红细胞氧化性溶血, 抑制 $\cdot\text{OH}$ 引起的小鼠肝微粒体过氧化脂质 (LPO) 和大鼠红细胞膜丙二醛 (MDA) 含量的升高^[26]。百年树龄银杏组织中分离到一株产银杏黄酮性能较好的菌株 BLCC1-0130, 对其发酵条件进行优化, 优化后其发酵液中银杏黄酮的量达到 132.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。研究发现 BLCC1-0130 在每只小鼠灌胃 1 亿至 100 亿剂量菌体的范围内对小鼠是安全的^[27]。从宁夏枸杞表面消毒的茎、叶和果组织块中分离出的 4 株枸杞内生真菌发酵产物对 $\cdot\text{OH}$ 自由基有清除作用^[28]。从河南红油香椿中分离得到的链格孢属内生真菌菌株 56-50, 均具有较好的抗氧化活性, 其 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 ABTS $\sim\text{H}\cdot$ 和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 DPPH \cdot 的清除活性分别为 (95.92 \pm 0.40)% 和 (91.77 \pm 0.45)%^[29]。

3.3 抑菌方面

药用植物内生真菌的抑菌活性也是研究的重点, 对开发新的抑菌药物具有重要意义, 多数药用植物内生真菌的代谢产物对常见的病原菌具有一定的抑制作用。

曲柳中发现了具有抗菌活性的内生真菌^[30]。刺五加根茎叶中分离纯化得到的 16 种内生真菌至少对一种指示菌有抗菌活性。镰孢霉 (*Fusarium oxysporum*) CWJ-5 对金黄色葡萄球菌抑菌效果显著, 抑菌直径为 (27.17 \pm 0.07) mm; 链格孢 (*Alternaria alternata*) CWJ-6 对大肠杆菌抑菌效果显著, 抑菌直径为 (18.07 \pm 0.01) mm^[31]。

为了筛选新的生防菌种资源, 从银杏根、叶中分离出对青枯劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 有拮抗作用的内生真菌球黑孢菌 (*Nigrospora sphaerica*)。该菌株的发酵产物在自然条件下稳定性高, 对姜青枯病的生物防治具有巨大的应用潜力^[32]。绞股蓝内生真菌 JY25 对金黄色葡萄球菌具有抑制作用, 其作用主要是破坏细菌细胞膜及影响细菌蛋白质合成, 进而破坏其生物膜的形成延迟耐药性的产生^[33]。车前草叶内存在具有抑菌活性的内生真菌, 可作为筛选抑菌活性物质的新资源^[34]。从车前草叶中分离到的菌株 Y 对金黄色葡萄球菌、粪链球菌、大肠杆菌、沙门氏菌均表现出较强的抑菌作用, 其效果与杆菌肽相近。

海南广藿香内生真菌具有一定的生物多样性, 部分内生真菌菌株具有较强的抑菌活性。镰刀菌属 (*Fusarium*) 菌株 PfuJ20、PfuG16 和 PfuG5 对澳洲坚果叶枯病菌具有抑制效果, 其中 PfuJ20、PfuG16 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌等动植物病原细菌均有较强抑制效果, 棒孢属 (*Corynespora*) 菌株 PfuH2 对西瓜枯萎病菌具有抑菌效果, 链格孢属 (*Alternaria*) PfuH1 对金黄色葡萄球菌的生长抑制效果相对较强^[35]。

4 药用植物内生真菌的生物学功能

4.1 促进药用植物生长、发育

龙葵叶中分离的一株内生真菌, 可以在宿主植物根部固定镉, 从而降低龙葵对镉的吸收, 起到保护宿主植物的作用。将该株真菌回接植物, 发现植物的芽长、根长、干重、叶面积和叶绿素含量均有显著增加^[36]。银胶菊植物的根部分离出的一株暗隔膜内生真菌, 可以溶解不同来源的磷, 并具有产吲哚乙酸 (IAA) 能力。将该株真菌接种到木豆植物, 可使木豆植物呈现更好的生长状态^[37]。

利用兰科药用植物的5种内生真菌的发酵液和菌丝体,分别提取植物激素,用高效液相色谱进行梯度洗脱,分析鉴定其中赤霉素(GA₃)、IAA、脱落酸(ABA)、玉米素(ZT)、玉米素核苷(ZR)5种植物激素并测定其含量^[38]。发现5种内生真菌均能不同程度地产生一种或几种上述激素。这为阐明内生真菌促进兰科药用植物生长发育的作用机制提供实验依据。

从茅苍术(*Atractylodes lancea*)的叶、茎和根中分离鉴定内生真菌,共获得茅苍术内生菌16株,经内生菌和茅苍术快繁苗实验初筛,观测内生菌回接对茅苍术组培苗生长的影响,得到两株对植物无害的内生菌——小菌核菌和孔球孢霉,将它们回接到茅苍术组培苗中。其中小菌核菌能提高茅苍术炼苗的存活率,接入内生菌的茅苍术叶片超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性均高于未接菌的对照,脂肪酸不饱和指数基本不变,说明分离自茅苍术的内生菌回接后可以与宿主建立共生关系^[39]。

从野生金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)根中分离获得16株菌根真菌,其中丝核菌类真菌有6株,经形态及分子鉴定为丝核菌属1种(J8)。将其与金线莲组培苗共生培养8个月后,组培苗长势良好,鲜重增长率达70.8%,菌根的显微结构观察显示已形成菌丝结,说明组培苗已成功菌根化。故而J8真菌的筛选为仿生野外种植金线莲提供理论依据^[40]。

内生真菌侵染刺五加种子后,对种子进行变温层积处理,利用高效液相色谱法测定刺五加种子中内源激素GA₃、ABA、IAA、吲哚丁酸(IBA)及水杨酸(SA)的含量。发现5株刺五加内生真菌对种子萌发有明显的促进作用,在变温层积过程中,GA₃、IAA、IBA、SA均有不同程度的上升,ABA呈现明显的下降趋势。故而可得出,内生真菌可调控刺五加种子中激素的含量,从而破除刺五加种子休眠,促进种子萌发^[41]。

菊花茎叶分离的56株内生真菌,通过回接菊花组培苗,根据组培苗生长存活情况初筛得到4株促生长内生真菌,并进一步炼苗跟踪测定各种生理指标。发现4株内生真菌对菊花生长均有不同程度的促进作用,其中编号C1、C4的菌株促生长作用较好,在生物量、株高、根数、可溶性蛋白等方面均优于对照,且能提高菊花的抗逆性,有望用于解决菊花种植上存在的连作障碍等问题。经鉴定,C1为葡萄孢属(*Botrytis* sp.)真菌,C4为球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)^[42]。

4.2 促进药用植物次生代谢产物的积累

葫芦根中4株真菌的发酵液中总黄酮含量较高,其中1株真菌既能促进葫芦生长,又能促进总黄酮含量^[43]。接种大戟内生真菌到大戟组培苗,将建立共生后的组培苗移栽室外,生长1年后检测生物量和萜类含量。发现内生真菌E4(*Fusarium* sp. I)和E5(*Fusarium* sp. II)均促进了宿主植物生长,提高了大戟组培期和室外生长1年后二萜物质异大戟素和三萜物质大戟醇的量。室外生长1年后,E4处理组的异大戟素和大戟醇分别比对照提高了92.79%和40%;E5处理组的异大戟素和大戟醇分别比对照提高了105.32%和241.38%。由此可见,大戟内生真菌可促进其萜类的合成^[44]。

将湿热灭菌后的人参药材与菌种M1进行固体发酵培养,分别利用紫外分光光度法和高效液相色谱法对人参药材发酵前后的总皂苷以及单体皂苷含量的变化进行分析检测。发现M1真菌能够显著提高人参药材中人参总皂苷的水平,总皂苷含量在第12天达到最高,增长率为103.82%;六种单体人参皂苷Rg1、Re、Rb1、Rc、Rb2和Rd的含量之和也有显著提高。表明通过真菌M1的生物转化作用,可以显著提高人参药材中有效成分人参皂苷的含量^[45]。

采用不同的培养基、初始pH、温度、摇床转速、培养时间对曼地亚红豆杉内生真菌进行组合优化培养,测定其对紫杉醇产量的影响。通过正交试验,进一步探究前体物质对紫杉醇产量的影响。发现使用YES发酵培养基,初始pH值为6.0,培养温度为30℃,摇床转速200 r/min为最佳培养条件。当向培养基中加入20 mg/L的苯丙氨酸、10 mg/L的乙酸铵、5 mg/L的络氨酸、20 mg/L的甘氨酸时,紫杉醇产量最高,达到547 μg/L,比初始产量高337%,能更好地满足广大的医药需求^[46]。

从阿江橄榄树(*Terminalia arjuna*)中分离到一株内生真菌,经鉴定为生链格孢菌,该株真菌的发酵液中可检测到紫杉醇的存在;经HPLC检测,产量约为140.8 μg/L。该株真菌可作为生产紫杉醇的潜在来源^[47]。

锁阳的代谢产物积累与其内生真菌群落有密切关系,这些结果为植物-真菌共生和次级代谢产物生产提供了新的机会^[48]。

从中国的药用植物龙胆(*Gentiana scabra* bge.)中分离出三种木霉属种虫害菌株(F1、F2和F9),并进行了回接实验,发现龙胆中的药用成分龙胆苦苷均有提高,还可抑制枯萎病的发生^[49]。

药用植物积雪草(*Centella asiatica*)中的积雪草

皂苷是其重要成分之一。从积雪草中分离得到13株内生真菌,其中一株可以产生积雪草皂苷。经鉴定,该株真菌为刺盘孢属。这是第一次利用内生真菌产生积雪草皂苷的报道^[50]。

以新鲜黄芩植株为材料,黄芩药粉选择性培养法初筛,黄芩苷发酵转化实验复筛,HPLC分析转化产物。筛选得到黄芩内生真菌(*Penicillium*),该菌能够转化黄芩苷得到活性更强、更易吸收的黄芩素,以及近年来因更多药效不断被发现而备受关注的千层纸素A,具有一定的研究价值与应用价值^[51]。

5 小 结

药用植物内生真菌具有重大的研究意义和利用价值。随着药用植物研究深入和现代生物技术的发展,内生真菌和药用植物相互关系的探明,利用内生真菌菌株生产具有药用价值的活性物质,推动我国中药材发展,并为新药发现和应用开辟了新途径。也可利用药用植物内生真菌的生物学功能,促进药用植物的生长发育、次生代谢产物积累。近年来,高通量测序技术为研究药用植物内生真菌的群落结构和多样性提供了巨大的便利,逐渐受到重视,有助于人们进一步的了解和认识药用植物内生真菌。

参 考 文 献

- [1] Aly A H, Debbab A, Proksch P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 90(6): 1829-1845.
- [2] 严菊芬,王素萍,齐宁波,等. 药用植物内生真菌研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(S1): 176-181.
- Yan J F, Wang S P, Qi N B, et al. Research progress of endophytic fungi from medicinal plants [J]. Nat Prod Res Dev, 2012, 24(S1): 176-181.
- [3] 王志勇,刘秀娟,易曲. 植物内生菌分离时表面消毒条件的比较 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 366-367.
- Wang Z Y, Liu X J, Yi Q. Comparison of surface disinfection conditions for endophyte isolation [J]. Jiangsu Agricultural Science, 2014, 42(8): 366-367.
- [4] 李军勤,殷小雯,宋培勇. 南方红豆杉内生真菌分离时的表面消毒方法探索 [J]. 生物技术进展, 2014, 4(6): 443-446.
- Li J Q, Yin X W, Song P Y. Exploration of surface sterilization methods for isolation of endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. Current Biotechnology, 2014, 4(6): 443-446.
- [5] 邓雪萍,傅文红,陈清乐,等. 小叶榕内生菌分离纯化方法的建立 [J]. 清远职业技术学院学报, 2018, 11(5): 40-43.
- Deng X P, Fu W H, Chen Q L, et al. Establishment of method for isolation and purification of endophytes from *Ficus microphylla* [J]. Journal of Qingyuan Vocational and Technical College, 2018, 11(5): 40-43.
- [6] 徐梦珂,印嘉闻,谈思源,等. 铁皮石斛内生真菌的分离及其挥发性成分分析 [J]. 生物资源, 2017, 39(1): 53-57.
- Xu M K, Yin J W, Tan S Y, et al. Isolation of endophytic fungi of *Dendrobium officinale* and analysis of their volatile constituents [J]. Biotic Resources, 2017, 39(1): 53-57.
- [7] 李丹,谈思源,陶欣,等. 药食植物黑果枸杞内生真菌的分离及其挥发性成分分析 [J]. 生物资源, 2017, 39(1): 62-69.
- Li D, Tan S Y, Tao X, et al. Isolation of endophytic fungi from *Lycium ruthenicum* murr and analysis of their volatile components [J]. Biotic Resources, 2017, 39(1): 62-69.
- [8] 宣群,张玲琪. 莪术内生真菌的分离与鉴定 [J]. 中国民族民间医药, 2007, 16(1): 45-46.
- Xuan Q, Zhang L Q. Isolation and identification of endophytic fungi from *Curcuma zedoary* [J]. Chinese Folk Medicine, 2007, 16(1): 45-46.
- [9] Manganyi M C, Regnier T, Kumar A, et al. Phylogenetic analysis and diversity of novel endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sceletium tortuosum* [J]. Phytochem Lett, 2018, 27: 36-43.
- [10] Andrews J H, Hirano S S. Microbial ecology of leaves [M]. New York: Springer New York, 1991.
- [11] 谭小明,周雅琴,陈娟,等. 药用植物内生真菌多样性研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(18): 1563-1580.
- Tan X M, Zhou Y Q, Chen J, et al. Advances in research on diversity of endophytic fungi from medicinal plants [J]. Chin Pharm J, 2015, 50(18): 1563-1580.
- [12] 杨琴,邹凯,陈爱佳,等. 不同树龄银杏叶内生真菌的多样性及群落结构分析 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2019, 45(1): 42-49.
- Yang Q, Zou K, Chen A J, et al. Endophytic fungal communities structure and variation in *Ginkgo biloba* leaf tissues with different ages [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2019, 45(1): 42-49.
- [13] 吕立新,王宏伟,梁雪飞,等. 不同化学型和季节变化对茅苍术内生真菌群落多样性的影响 [J]. 生态学报, 2014, 34(24): 7300-7310.
- Lü L X, Wang H W, Liang X F, et al. Effects of different chemotypes and seasonal dynamic variation on the

- species diversity of endophytic fungal communities harbored in *Atractylodes lancea* [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(24): 7300-7310.
- [14] 王茜, 申仕康, 张爱丽, 等. 滇重楼内生真菌分离与多样性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(22): 3838-3844.
Wang Q, Shen S K, Zhang A L, *et al.* Isolation and diversity of endophytic fungi from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Chinese Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, 38(22): 3838-3844.
- [15] 刘蓬蓬, 陈江宁, 贾天柱. 基于 Illumina MiSeq 高通量测序分析黄芪内生真菌的多样性 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12): 34-38.
Liu P P, Chen J N, Jia T Z. Analysis of diversity of endophytic fungi in *astragali Radix* by illumina MiSeq high-throughput sequencing technology [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2018, 24(12): 34-38.
- [16] 杨娟, 董醇波, 陈万浩, 等. 不同地区杜仲树皮内生真菌群落组成及生态功能结构的差异分析 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(6): 1126-1134.
Yang J, Dong C B, Chen W H, *et al.* Community composition and ecological functional structural analysis of endophytic fungi in bark of *Eucommia ulmoides* in different areas [J]. *Chinese Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44(6): 1126-1134.
- [17] 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.
- [18] Kornsakulkarn J, Choowong W, Rachtawee P, *et al.* Bioactive hydroanthraquinones from endophytic fungus *Nigrospora* sp. BCC 47789 [J]. *Phytochem Lett*, 2018, 24: 46-50.
- [19] 胡征波, 吴友根, 马文婷, 等. 一株具有抗菌和抗肿瘤活性的诺丽内生真菌的鉴定 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(1): 277-282.
Hu Z B, Wu Y G, Ma W T, *et al.* Identification of one noni endophytic fungus with antibacterial and antitumor activity [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(1): 277-282.
- [20] 徐迪, 金日升, 王海翔. 铁皮石斛内生真菌次生代谢产物研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2019, 27(1): 102-108.
Xu D, Jin R S, Wang H X. Study on secondary metabolites of endophytic fungus *Phyllosticta aristolochiicola* from *Dendrobium officinale* [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2019, 27(1): 102-108.
- [21] 陈淑娟, 刘佳佳, 杨栋梁, 等. 南方红豆杉内生真菌的抗肿瘤产物震颤毒素的研究 [J]. *菌物学报*, 2018, 37(1): 120-125.
Chen S J, Liu J J, Yang D L, *et al.* A study on tremorgen with antitumor activity of endophytic fungus isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Mycosystema*, 2018, 37(1): 120-125.
- [22] 孙新城, 李丹, 罗宇, 等. 蒲公英内生真菌 PG23 抗癌活性的初步研究 [J]. *动物医学进展*, 2012, 33(9): 78-81.
Sun X C, Li D, Luo Y, *et al.* Preliminary study on anticancer activity of endophytic fungi PG23 from *Taraxacum* [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33(9): 78-81.
- [23] 周雅琴, 张大为, 余丽莹, 等. 八角莲内生真菌抑制 HIV-1 IN-LEDGF/p75 相互作用活性筛选 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(9): 1808-1813.
Zhou Y Q, Zhang D W, Yu L Y, *et al.* Inhibitory effect of endophytic fungi from *Dysosma versipellis* on HIV-1 IN-LEDGF/p75 interaction [J]. *Chinese Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44(9): 1808-1813.
- [24] 陈曦, 张小君, 叶桐, 等. 络石内生菌露湿漆斑菌发酵液的细胞毒活性成分研究 [J]. *实用临床医药杂志*, 2019, 23(10): 47-52.
Chen X, Zhang X J, Ye T, *et al.* Study on cytotoxic active constituents in fermentation liquid of endophytic fungus *Myrothecium roridum* in *Trachelospermum jasminoides* [J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2019, 23(10): 47-52.
- [25] 彭浩, 邓百万, 陈文强, 等. 虎杖内生真菌产白藜芦醇苷菌株的分离鉴定 [J]. *微生物学通报*, 2011, 38(6): 889-894.
Peng H, Deng B W, Chen W Q, *et al.* Isolation and identification of the endophytic fungus producing polydatin in *Polygonum cuspidatum* [J]. *Microbiology China*, 2011, 38(6): 889-894.
- [26] 田京伟, 杨建雄. 白藜芦醇苷的体外抗氧化活性 [J]. *中草药*, 2001, 32(10): 918-920.
Tian J W, Yang J X. *In vitro* antioxidative effect of polydatin [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2001, 32(10): 918-920.
- [27] 辛国芹, 徐海燕, 赵影, 等. 产银杏黄酮内生菌的分离筛选及小鼠安全试验 [J]. *广东饲料*, 2015, 24(1): 27-30.
Xin G Q, Xu H Y, Zhao Y, *et al.* Isolation and screening of endophytes producing ginkgo flavone and safety test in mice [J]. *Guangdong Feed Journal* 2015, 24(1): 27-30.
- [28] 刘建利. 宁夏枸杞内生真菌的分离及抗氧化活性的测定 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(4): 857-860.
Liu J L. Isolation and determination of antioxidant activ-

- ity of endophytic fungi from *Lycium barbarum* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(4): 857-860.
- [29] 王晓敏, 万景瑞, 史冠莹, 等. 一株具 α -糖苷酶抑制活性、抗氧化和抗细菌活性的香椿内生真菌的筛选与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(16): 136-142.
Wang X M, Wan J R, Shi G Y, *et al.* Screening and identification of an endophytic fungus with α -glucosidase inhibitory, antioxidative and antibacterial activities from *Toona sinensis* [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(16): 136-142.
- [30] Manganyi M C, Regnier T, Tchatchouang C D K, *et al.* Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from *Sceletium tortuosum* L. (Kougoed) [J]. Ann Microbiol, 2019, 69(6): 659-663.
- [31] 刘悦, 张爽, 李佳宾, 等. 刺五加内生真菌分离鉴定及抗菌活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(1): 30-37.
Liu Y, Zhang S, Li J B, *et al.* Isolation and identification of endophytic fungi from *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) harms and their antibacterial activity [J]. Nat Prod Res Dev, 2019, 31(1): 30-37.
- [32] 张祖姣, 袁志辉, 赵子豪, 等. 抗姜青枯菌银杏内生真菌的分离及抑菌特性 [J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(6): 890-896.
Zhang Z J, Yuan Z H, Zhao Z H, *et al.* Isolation and characterization of the antibacterial property of *Ginkgo biloba* endophytic fungi against *Ralstonia solanacearum* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(6): 890-896.
- [33] 孟素香, 曹健, 张慧茹, 等. 绞股蓝内生真菌对金黄色葡萄球菌的抗菌机制 [J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(4): 268-273.
Meng S X, Cao J, Zhang H R, *et al.* Antibacterial mechanisms of endophytic fungi from *Gynostemma pentaphyllum* on *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2015, 40(4): 268-273.
- [34] 柴明艳. 车前草内生真菌的分离及抑菌活性测定 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 353-356.
Chai M Y. Isolation and antimicrobial activity of endophytic fungi from *plantain* [J]. Jiangsu Agricultural Science, 2016, 44(1): 353-356.
- [35] 易天凤, 吴友根, 于靖, 等. 海南广藿香内生真菌分离鉴定及拮抗菌株筛选[J]. 热带作物学报, 2019, 40(8): 1598-1605.
Yi T F, Wu Y G, Yu J, *et al.* Isolation and identification of endophytic fungi from Hainan patchouli and screening of antagonistic strains [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(8): 1598-1605.
- [36] Khan A R, Ullah I, Waqas M, *et al.* Host plant growth promotion and cadmium detoxification in *Solanum nigrum*, mediated by endophytic fungi [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2017, 136: 180-188.
- [37] Priyadharsini P, Muthukumar T. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production [J]. Fungal Ecol, 2017, 27: 69-77.
- [38] 张集慧, 王春兰, 郭顺星, 等. 兰科药用植物的5种内生真菌产生的植物激素 [J]. 中国医学科学院学报, 1999, 21(6): 460-465.
Zhang J H, Wang C L, Guo S X, *et al.* Studies on the plant hormones produced by 5 species of endophytic fungi isolated from medicinal plants (Orchidaceae) [J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 1999, 21(6): 460-465.
- [39] 陈佳昕, 戴传超, 李霞, 等. 茅苍术内生真菌的分离鉴定及在组培苗中的回接 [J]. 广西植物, 2008, 28(2): 256-260.
Chen J X, Dai C C, Li X, *et al.* Endophytic fungi screening from *Atractylodes lancea* and inoculating into the host plantlet [J]. Guihaia, 2008, 28(2): 256-260.
- [40] 陈雨薇, 唐军荣, 段雪甜, 等. 金线莲组培苗菌根化研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3778-3780.
Chen Y W, Tang J R, Duan X T, *et al.* Study on mycorrhization of tissue-cultured *Anoectochilus roxburghii* [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 31(9): 3778-3780.
- [41] 沈宏伟, 张爽, 付士朋, 等. 内生真菌对刺五加种子萌发过程激素及酶含量变化的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 716-721.
Shen H W, Zhang S, Fu S P, *et al.* Rule of endophytic fungi on changes in content of plant hormones and enzyme during seed germination [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(3): 716-721.
- [42] 宋文玲, 戴传超, 姜宝娟, 等. 促进菊花苗期生长的内生真菌筛选与鉴定研究 [J]. 江苏农业科学, 2009, 37(1): 149-151, 152.
Song W L, Dai C C, Jiang B J, *et al.* Research on screening and identification of the endophytic fungi promoting seedling growth in *Chrysanthemum morifolium* Rarmat [J]. Jiangsu Agricultural Science, 2009, 37(1): 149-151, 152.
- [43] Song Y, Wu P, Li Y F, *et al.* Effect of endophytic fungi on the host plant growth, expression of expansin gene and flavonoid content in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg ex Diels [J]. Plant Soil, 2017, 417(1/2): 393-402.
- [44] 勇应辉, 戴传超, 高伏康, 等. 大戟内生真菌对其生长

- 和两种萜类物质质量的影响 [J]. 中草药, 2009, 7(7): 1136-1139.
- Yong Y H, Dai C C, Gao F K, *et al.* Effects of endophytic fungi on growth and two kinds of terpenoids for *Euphorbia pekinensis* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2009, 7(7): 1136-1139.
- [45] 张瑜, 陈照宇, 都晓伟. 真菌固体发酵提高人参药材中皂苷含量的研究 [J]. 中医学报, 2015, 43(2): 85-87.
- Zhang Y, Chen Z Y, Du X W. Increasing ginsenoside contents in dried ginseng root by solid fermentation with fungus [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2015, 43(2): 85-87.
- [46] 乔广军, 张海峰, 汪忠山, 等. 高产紫杉醇菌株发酵条件优化 [J]. 生物技术, 2014, 24(4): 94-99.
- Qiao G J, Zhang H F, Wang Z S, *et al.* Optimization of fermentation conditions of high-production taxol endophytic fungi [J]. Biotechnology, 2014, 24(4): 94-99.
- [47] Gill H, Vasundhara M. Isolation of taxol producing endophytic fungus *Alternaria brassicicola* from non-*Taxus* medicinal plant *Terminalia arjuna* [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2019, 35(5): 1-8.
- [48] Cui J L, Zhang Y Y, Vijayakumar V, *et al.* Secondary metabolite accumulation associates with ecological succession of endophytic fungi in *Cynomorium songaricum* Rupr [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(22): 5499-5509.
- [49] Wang D M, Wang H, Li J, *et al.* Investigating the role of endophytic fungi in *Gentiana scabra* Bge. by cross-growth period inoculation [J]. Indian J Microbiol, 2018, 58(3): 319-325.
- [50] Gupta S, Bhatt P, Chaturvedi P. Determination and quantification of asiaticoside in endophytic fungus from *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2018, 34(8): 111.
- [51] 马宗敏, 刘佳, 段绪红, 等. 黄芩苷发酵转化成黄芩素和千层纸素 A 的黄芩内生真菌的筛选及鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 166-171.
- Ma Z M, Liu J, Duan X H, *et al.* Screening and identification of endophytic fungi in scutellariae *Radix* transformed baicalin to baicalein and oroxylin A [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 25(9): 166-171.

□

(编辑: 杨晓翠)