

文章编号: 0529-6579 (1999) 03-0116-03

南方红豆杉内生菌及紫杉烷类产物的初步鉴定^{*}

王 伟, 贺雄雷, 钟英长

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 从南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *mairei*) 的主干和侧枝树皮及皮下部分, 分离、筛选得到 91 个纯化的微生物菌株. 经过摇瓶培养和静止培养, 再用二氯甲烷萃取抽提, 抽提产物经以 taxol、baccatin III 和 cephalomannine 为标准对照的薄层层析分析, 表明其中 6 个菌株能分泌紫杉烷类的化合物. 分类鉴定的初步结果为头孢霉属、轮柄梳霉属和无孢菌群等.

关键词: 南方红豆杉; 内生菌; 紫杉烷

中图分类号: Q 948.12 **文献标识码:** A

提取于高等裸子植物红豆杉 (*Taxus* spp.) 的树皮和根、叶等部位的紫杉烷 (taxane) 类化合物, 许多已被证明具有细胞毒性和抗肿瘤活性. 其中紫杉醇 (taxol)^[1] 和紫杉萜 (taxotere)^[2] 作为一些晚期癌症的特效药物已经通过临床试验逐渐进入实用阶段. 然而, 植物中的极微含量和植物资源的有限是人类规模利用这类化合物所面临的主要障碍.

扩种植物、开发植株可再生部位、组织和细胞培养、化学合成以及基因工程等, 都被认为是扩大药源的可行或潜在方式. 除此之外, 微生物工程的途径是摆脱自然依赖的一个极具潜力的方向.

从红豆杉及其近缘植物分离产紫杉烷微生物的工作已有报道, 涉及 5 个树种的若干个菌株^[3~6]. 南方红豆杉 (*T. chinensis* var. *mairei*) 是红豆杉属 (*Taxus*) 的一个变种植物, 零星产于我国南方各省海拔 1 000~1 200 m 以下的地方. 在南岭地区约生于海拔 800~1 100 m 的山林和更低海拔的丘陵地带, 多与壳斗科、山矾科和木兰科树种混交. 本文首次报道从南方红豆杉分离相关微生物的工作.

1 材料与方法

1.1 材料来源 南方红豆杉取材于粤北连州市, 约 20~30 a 生树龄. 取其主干内层树皮和侧枝, 经妥善处理后备回实验室供试.

1.2 菌种分离、纯化 分取主干和侧枝的树皮、韧皮部和木质部薄层小块, 约 0.5 cm×0.5 cm 大小, 以 $\varphi=75\%$ 酒精表面拭擦后无菌水清洗或直接取内层无污样, 分置于 PDA、查氏和水琼脂培养基平板, 22~24 °C 下避光培养.

培养 5~20 d, 分别待平板上菌丝萌发, 用划线、稀释以及直接用无菌小剪刀取尖端菌丝等分离方法, 经过分离、筛选、纯化的反复过程, 直至得到纯化的典型菌落.

^{*} 收稿日期: 1998-11-09 作者简介: 王 伟, 男, 1962 年生, 博士研究生.

1.3 液体培养 培养基为马铃薯 200 g/L (去皮煮汁, 过滤取液), 葡萄糖 10 g/L, 蔗糖 10 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 乙酸钠 1 g/L, 苯丙氨酸 20 mg/L, 121 °C 下高压灭菌 20 min.

结合分离部位、菌落观察和镜检结果的综合判定, 取其中有内生菌特征的部分真菌典型菌株, 分别用三角瓶进行液体摇瓶培养 (150 r/min) 或静止培养. 500 mL 三角瓶装液体培养基 180~220 mL, 接入纯菌丝. 培养温度 22~24 °C, 培养时间 5~28 d.

1.4 培养物处理 培养产物用两层纱布过滤, 滤取培养液; 菌丝体经捣碎后过滤, 合并滤液. 用等体积二氯甲烷萃取 3~4 次, 蒸馏除去有机溶剂, 最后萃取物溶于甲醇中, 供测试使用.

1.5 TLC 分析 ① 材料. TLC 用硅胶 G 板 (50 mm×200 mm), 青岛海洋化工厂分厂产品; 标准样, taxol ($w=76\%$, 99%) 及其紫杉烷类似物 baccatin III, cephalomannine 分别由中国科学院昆明植物所和中国医学科学院药物所提供. ② 展层和显色. 以 V (氯仿) : V (甲醇) = 7:1 和 V (乙酸乙酯) : V (异丙醇) = 95:5 做展开剂, 标准样品为对照, 浓硫酸-香兰素作显色剂, 每板点样 3 个, 展层完毕后, 喷雾显色剂, 约 90~100 °C 下干燥显色.

1.6 菌株鉴定 按照丝状真菌的分类方法, 采用菌落观察和载片培养后的显微观察, 研究其产孢结构和分生孢子梗着生情况, 对比相关分类系统 (Barnett 等, 1972, 魏景超, 1979), 确定供试菌的种属地位.

2 结果与讨论

2.1 菌种分离结果 本实验以丝状真菌为主要分离目标, 经过分离、筛选、纯化的反复过程, 除去比较明显的污染杂菌和常见霉菌, 得到 91 个纯化的真菌和放线菌菌株. 其中, 丝状真菌 87 个, 放线菌 4 个.

从分离部位看, 树皮、韧皮部和木质部得到的菌种数比例约为 3:2:1. 初步认为, 树皮层因受外界环境影响大, 由此部位得到的菌株以外界环境的“杂”菌为主, 植物内生菌可能占少数. 韧皮部是内生菌的良好栖息场所, 可以为植物-真菌系统提供稳定的生理环境和生长发育所需的氧气, 进化过程中宿主和寄生物二者逐渐相互适应, 稳定共生, 故认为韧皮部得到的菌株多为原植物内生菌. 木质部分离得到的菌株也多为稳定的内生菌, 但木质部通氧不足, 不适宜好气性真菌生长, 一些兼性厌氧菌可栖身于此. 此外, 韧皮部栖身菌菌丝也可深入木质部. 在分离植物内生菌时以韧皮部或韧皮部与木质部的交界区域较为适宜.

2.2 TLC 分析结果 TLC 检定结果, 6 株菌株的发酵抽提物具有与标准样迁移相同或相似的显色斑点及 R_f 值, 初步表明这些菌株能分泌紫杉烷类化合物.

对这一些斑点物质进一步的定性和定量分析, 以及菌种诱变、添加诱导物的工作, 目前正在进之中.

2.3 菌种鉴定结果 菌株鉴定结果, 初步判定为头孢霉属 (*Cephalosporium* spp.), 轮柄梳霉属 (*Martensiomycetes* spp.) 和无孢菌群 (*Mycelia sterilia*) 等.

本实验的初步结果, 结合其它最新报道^[5,9], 表明红豆杉内寄生真菌的存在并同宿主一样具有产紫杉烷的能力, 可能不是个别的现象, 而且这些真菌个种相互间并不存在种属联系, 也没有进化渊源. 如是, 则是人类与癌症抗争的一个福音.

致谢: 本研究植物材料的采集得到廖文波先生、连州市林业局莫炳友、郭银环工程师的热心帮助; 中国医学科学院陈未名先生、昆明植物研究所刘锡葵先生提供部分标准样品, 特此致谢!

参考文献:

- [1] WANIM C, TAYLOR H L, WALL M E, et al. Plant antitumor agents. VI [J]. J Am Chem Soc 1971, 93: 2325 ~ 2327.
- [2] RINGEL I, HORWITZ S B. Studies with RP56976 (Taxotere): A semisynthetic analogue of taxol [J]. J Natl Cancer Inst 1991, 83 (4): 288 ~ 292.
- [3] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. Science, 1993, 260: 214 ~ 216.
- [4] 邱德有, 黄美娟, 方晓华, 等. 一种云南红豆杉内生真菌的分离 [J]. 真菌学报, 1994, 13 (4): 314 ~ 316.
- [5] STROBEL G, YANG X S, SEARS J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. Microbiology, 1996, 142: 435 ~ 440.
- [6] LI J Y, STROBEL G, SIDHU R, et al. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress *Taxodium distichum* [J]. Microbiology, 1996, 142: 2223 ~ 2226.

Isolation of Endophytic Fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei* and Preliminary Identification of Taxane Products

WANG Wei^{*}, HE Xiong-lei, ZHONG Ying-dang

Abstract: Eighty seven pure endophytic fungal strains and four pure actinomycetes strains were isolated from inner bark (phloem-cambial) and the xylem of *Taxus chinensis* var. *mairei*. Some of the fungi were incubated singly in 500 mL taper flask containing 180 ~ 220 mL autoclaved liquid medium at 22 ~ 24 °C, under shaking and still conditions for 5 to 28 days. With authentic taxol, baccatin III and cephalomannine as the standard spot on silica gel plates, the organic extracts of the culture fluid from six strains, extracted with methylene chloride, were demonstrated the presence of taxanes by thin-layer chromatography (TLC). The strains were classified into *Cephalosporium* spp., *Martensiomycetes* spp., *Mycelia sterilia*, etc.

Keywords: *Taxus chinensis* var. *mairei*; endophytic fungi; taxane

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China