

• 生物技术与方法 •

利用紫外诱变选育鞣灵素合成缺陷株

胡丹, 唐克轩, 苗志奇

上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240

胡丹, 唐克轩, 苗志奇. 利用紫外诱变选育鞣灵素合成缺陷株. 生物工程学报, 2017, 33(5): 838–848.

Hu D, Tang KX, Miao ZQ. Preparation of catalitaxol-deficient defective strains by using ultraviolet mutagenesis. Chin J Biotech, 2017, 33(5): 838–848.

摘要: 鞣树内生真菌菌株 FSN002 次生代谢产物鞣灵素具有优良的抗肝癌性能, 选育突变株是研究鞣灵素生物合成机制的重要手段。真菌孢子预培养 13 h 左右, 萌发形成 4–6 个细胞的幼嫩菌丝, 适合作为紫外诱变的出发材料。实验发现紫外光强度和照射时间对真菌致死率的影响符合线性模型, 二者之间不存在明显的交互作用。当紫外光强度为 90 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, 时长为 6 s 时, 真菌的致死率在 95% 左右。在上述优化选育诱变条件下, 获得了 1 株鞣灵素合成能力完全丧失的突变株和 1 株鞣灵素合成能力下降到野生型 16% 的突变株, 为下一步研究鞣灵素的生物合成机制以及高效生产鞣灵素奠定了基础。

关键词: 紫外诱变, 内生真菌, 突变株, 致死率, 鞣灵素, 抗癌代谢物

Preparation of catalitaxol-deficient defective strains by using ultraviolet mutagenesis

Dan Hu, Kexuan Tang, and Zhiqi Miao

The Agricultural and Biological School, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Secondary metabolites of endophytic fungi FSN002 from *Juglans mandshurica* Maxim have excellent liver cancer resistance. Preparation of mutant strains is an important means to study the biosynthesis mechanism of catalitaxol.

Received: November 15, 2016; **Accepted:** December 22, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30700061), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No. 144319057001), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2015CB755700).

Corresponding authors: Kexuan Tang. E-mail: kxtang@sjtu.edu.cn

Zhiqi Miao. Tel: +86-21-34205017; E-mail: zamiao@sjtu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30700061), 上海市科技支撑项目 (No. 144319057001), 国家重点基础研究发展计划 (973 Program) (No. 2015CB755700) 资助。

网络出版时间: 2017-01-09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170109.1246.004.html>

Fungal spores germinating young hyphae with 4 to 6 cells after culturing for 13 hours were used as starting materials of ultraviolet (UV) mutagenesis. UV light intensity and irradiation time have a linear relationship with fungal mortality. The two factors had no obvious interactions. When UV light was 90 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ and irradiation time for 6 s, the mortality of fungi was around 95%. Under the optimization mutation condition, two mutant strains were obtained, of which one lost the synthesis ability of catalitaxol completely, and the another synthesized only 16% catalitaxol of the wild strain. Our findings may serve basis for further study on the biosynthesis mechanism and efficient production of catalitaxol.

Keywords: ultraviolet mutagenesis, endophytic fungi, mutant strains, mortality, catalitaxol, antitumor metabolites

1993年 Stierle 等从短枝红豆杉 *Taxus brevifolia* 的树皮中分离出能够合成治疗癌症的紫杉醇的内生真菌,从而开启了一个利用药用植物内生真菌发酵产生次生代谢抗癌药物的新时代^[1-2]。胡桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim 为胡桃科胡桃属植物,又名核桃楸,属于落叶乔木,主要分布在我国东北海拔在 300–800 m 的沟谷两岸及山麓湿润沃土地带,具有多种药用价值^[3]。胡桃楸中含有丰富的环烯醚萜类化合物,具有抗炎、抗氧化和神经保护等作用^[4]。植物内生真菌是指整个生活史都在植物体内或生活史的一定阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌^[5]。它们是组成植物和微生物共生系统的重要成分^[6-7]。研究表明,内生真菌广泛存在于大部分植物中^[8],对其产生生物活性物质的研究报道也越来越多^[9-10]。药用植物内生真菌作为新的药物资源引起了广泛的关注,从内生真菌中寻找和发现新的活性化合物成为热点^[11-12],许多学者已经发现多种植物内生真菌的次生代谢产物具有抗肿瘤的活性^[13-16]。近几年,有学者从胡桃楸中发现一些具有抗肿瘤活性的物质,Gao 等从其树皮中分离到一种不饱和脂肪酸 JA 可以诱导肝癌细胞凋亡^[17],Ruijun W 等提取纯化的水溶性多糖 JRP1 对 s180 细胞的生长有显著的抑制作用^[18],Nian 等发现物质 HT 能够抑制细胞增殖和端粒酶活性,诱导 HeLa 细胞凋亡,在癌症

治疗方面具有潜在的应用价值^[19]。现有从胡桃楸树中分离到的 1 株木霉属内生真菌 FSN002^[20],该菌株能够合成分泌抑制癌细胞生长的次生代谢物楸灵素,其发酵液对肝癌细胞具有显著的抑制作用^[21-23],即使在稀释 20 倍后仍能实现对体外培养的肝癌细胞 HepG2 的半数抑制^[24]。本研究有望通过紫外诱变法获得其突变株,为进一步明确楸灵素的生物合成机制奠定基础。

国内外众多的专家学者采用紫外诱变法进行相关研究,Liang 等采用鼠李糖和丙酸钠抑制选择策略,利用紫外光对菌体进行诱变,使诱变菌 UV-42-13 生产多杀菌素的能力较之野生菌得到增强^[25];Jin 等通过亚硝基胍和紫外照射相结合的诱变方法对 10 株多杀菌素生产菌进行诱变获得刺糖多孢菌突变菌株 4-7,生产能力较野生菌也显著提高^[26];张跃群等利用紫外线照射盐藻,获得的突变株蛋白质含量降低^[27]。鉴于此法的有效性,我们力图建立获得 FSN002 突变株的紫外诱变方法,并通过对诱变条件的优化提高菌株的突变率。

1 材料与方 法

1.1 材 料

内生真菌 FSN002 分离自楸树树皮^[20],为长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum*。其菌丝细长,有分枝,透明、有隔,细胞壁光滑;分

生孢子梗由菌丝直立生出,无色、多对,分枝与分生孢子梗呈近似直角,末端为小梗。小梗为瓶色,分生孢子呈球形或长椭圆形,表面粗糙,分生孢子为绿色,种质资源库保存编号为 CCTCC M 208102^[28]。

实验所用的孢子悬液来源于此菌株,保存于上海交通大学植物生物技术中心-80℃冰箱;诱变所用的紫外诱变仪购自美国 UVP 公司(单位:×100 μJ/cm²);实验所用的培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)与马铃薯葡萄糖肉汤(PDB)培养基。

1.2 方法

1.2.1 紫外诱变条件的优化

内生真菌 FSN002 在进行紫外诱变获得突变株的过程中,需要对紫外诱变条件进行优化,一是孢子的萌发率,二是孢子的预培养时间,三是紫外光强度与照射时长。

孢子萌发:材料取自上海交通大学植物生物技术中心保存的菌株 FSN002 的孢子悬液,通过血细胞计数板计数,1 mL 的原液中大概有 5×10^7 个孢子;用无菌水对孢子原液进行不同梯度的稀释,获得稀释 10 000 倍、20 000 倍、40 000 倍、80 000 倍的孢子液,并取部分置于显微镜下计算孢子个数;分别取 200 μL 不同浓度的稀释液涂布在 4 个固体培养基上,涂布棒涂抹均匀后,用封口膜封住,倒置在 28℃ 的恒温培养箱中进行黑暗培养;24 h 之后进行观察,记录萌发的孢子个数,获得内生真菌 FSN002 的孢子萌发率。

$$\text{孢子萌发率}(\%) = N_0/N_1 \times 100\%$$

(N₀:萌发的孢子个数,N₁:涂板的孢子个数)

孢子预培养时间:先在超净台中,将浓度为 5×10^7 /mL 的内生真菌 FSN002 孢子悬液用无菌水稀释 100 倍后,取 100 μL 的稀释液分别涂

布在 4 个固体 PDA 培养基上,涂布棒将稀释液涂抹均匀后,用封口膜封住,倒置在 28℃ 的恒温培养箱中进行黑暗培养;之后每隔 5 h,取出一个培养皿,用切刀在培养皿的不同位置切下 3 块 2 cm×2 cm 的固体培养基,放置在载玻片上进行观察,选取 15 个萌发的孢子,并纪录其萌发的细胞个数。观察的时间点分别为培养后的 5、10、15 和 20 h。

紫外光强度与照射时长:将浓度为 5×10^7 /mL 的内生真菌 FSN002 孢子悬液用无菌水稀释 50 000 倍后,将含有 1 000 个左右孢子的 100 μL 孢子稀释液,在超净台中用移液枪注射到固体 PDA 培养基上,用涂布棒涂抹均匀后,封口膜封口;倒置在 28℃ 培养箱中进行预培养 10–15 h,将其取出,放入已在超净台中灭菌 0.5 h 的紫外诱变仪中,对预培养后的真菌进行诱变;紫外光的能量的分别设置为 10 000 μJ/cm²、30 000 μJ/cm²、60 000 μJ/cm²、90 000 μJ/cm²、120 000 μJ/cm²,5 组不同光照强度的实验每组设置 3 个重复实验,照射时间相同,均为紫外诱变仪的最小时间单位 6 s。将长出菌丝的培养皿打开,放进紫外诱变仪中照射,之后,将其置于超净台中,吹风 2–3 min,再将培养皿用封口膜封住,锡箔纸包裹住,倒置在 28℃ 的恒温培养箱中进行黑暗培养,以防止发生光修复现象。

实验步骤如上,准备好预培养 10–15 h 的内生真菌 FSN002,将紫外诱变仪的照射光强设置成 30 000 μJ/cm²,时间分别设置为 6、12、18、24 和 30 s,每个时间点设置 3 个重复实验,减少实验误差,照射完之后,不要立即将培养皿的盖子盖上,而是放在超净台中,吹风 2–3 min 后,用封口膜封住培养皿,锡箔纸包裹住,倒置在 28℃ 的恒温培养箱中进行黑暗培养;黑暗培养

20–24 h 后,对存活下来的真菌个数进行统计。重复上述实验步骤,将紫外光强设置为 $50\,000\ \mu\text{J}/\text{cm}^2$,照射时长设置为 10 s,实验后,对存活下来的菌落数进行统计。

紫外光照射能够引起真菌 DNA 结构的变化,不同的强度紫外光会导致不同的致死率。用于诱变的紫外光的能量以及照射时间的改变都会影响内生真菌的致死率,计算方法如下:

$$\text{致死率}(\%) = (N_0 - N_1) / N_0 \times 100\% \quad [29]$$

(N_0 : 诱变前平板单菌落总数, N_1 : 诱变后平板单菌落总数)

1.2.2 内生真菌 FSN002 突变株的获得

根据上述优化后的方法,对菌株 FSN002 进行紫外诱变,获得了诱变株;取未经诱变过的野生型真菌孢子和 2 株诱变株 b4、b5 进行培养,每组设置 3 个重复实验来减少实验误差;将真菌分别培养 3、6、13 d 进行观察拍照记录;用 HPLC 高效液相色谱法测培养 6 d 的内生真菌 FSN002 野生型菌株与 2 株诱变株分泌的楸灵素含量。

1.2.3 内生真菌 FSN002 突变株的验证

提取经紫外诱变获得的内生真菌 FSN002 突变株基因组 DNA,采用通用引物 ITS1 (5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3')对真菌 18S rDNA ITS 区域进行扩增^[20]。将测序获得的 ITS 序列与出发菌株内生真菌 FSN002 的 ITS 序列进行双序列比对,并与 GenBank 核酸数据库序列进行 Blast 等生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变法各相关参数对菌株 FSN002 的孢子致死率的影响

2.1.1 孢子的萌发率

紫外诱变后孢子的致死率在 90%–95% 之间,

是成功选育诱变株的最佳诱变范围。在本实验中将稀释不同倍数的孢子液涂在 PDA 固体培养基上进行培养,24 h 后统计萌发菌落数,计算菌株 FSN002 的萌发率,以期获得 100 个萌发菌落的涂板孢子悬液的浓度。将孢子母液分别稀释 4 个不同浓度之后用显微镜计数,孢子数分别为 400、260、140 和 70,通过涂板统计萌发的菌落数,分别为 50、28、17 和 9,得到萌发率分别为 12.5%、10.7%、12.1% 和 12.8% (图 1)。菌株 FSN002 的萌发率在 10%–13% 之间,可以根据萌发率来计算涂板浓度,确定实验稀释倍数。孢子装在 EP 管中,会有不同程度的沉降现象,即便是呈倍数稀释后得到的实际孢子的数量也不会呈倍数递减,也就不能得到准确的萌发率,只能是预估一个范围。此萌发率的范围是在孢子培养 24 h 后确定所得,由于有的孢子还没有萌发,随着时间的增加,萌发率会有所增加,这需要根据不同的实验需求和实验环境再次确认,此孢子是冻存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱,萌发率会低于一般的孢子萌发率。在今后的其他真菌的诱变实验中,可以通过实验找到其孢子的萌发率来计算所需要的涂板浓度。

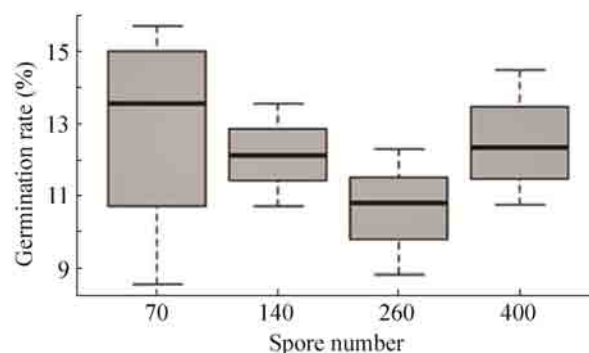


图 1 菌株 FSN002 的孢子在不同稀释倍数下的萌发率

Fig. 1 The germination rate of spores with different dilution ratio.

2.1.2 孢子预培养时间

在孢子培养 4 个实验时间点后, 将其放置在显微镜下进行观察拍照, 记录萌发的菌落数, 找到孢子萌发出 4-6 个细胞的时间段, 此时间段是孢子进行紫外诱变的最佳预培养时间, 萌发的孢子是最佳的实验材料^[30]。

孢子预培养 5、10、15 和 20 h 的结果 (图 2) 显示, 培养 5 h 孢子只有 1 个细胞, 10 h 可以清楚地看到 2-3 个细胞结构, 15 h 可以看到 10 个以上细胞组成的菌丝, 到 20 h 的时候, 真菌长出 20 个以上的细胞, 菌丝更长。通过观察, 菌株 FSN002 平均每 2-3 h 长出 1 个细胞 (图 3)。

统计不同时间点孢子萌发的细胞数, 可以看出菌株 FSN002 的细胞呈指数式增长 (图 4), 其细胞生长模型为 $y=e^{(x-5.73)/4.23}$, 推导过程如下:

设 y 为萌发出来的细胞数, x 为真菌生长时间, t 为孢子休眠时间, T 为真菌细胞的分泌周期, 设指数函数的系数为 k , 菌株 FSN002 的细胞生长模型为 $y=k \times e^{(x-t)/T}$, 通过对获得的实验数据进行统计, 并且经过 R 语言对数据进行模拟, 计算出指数的系数 k 为 1, t 为 5.73, T 为 4.23, 通过数学计算, 可知菌株 FSN002 孢子的休眠期为 5.73 h, 细胞的分裂周期是 4.23 h。

通过实验观察得到的数据与生长模型的推算, 可以推断孢子萌发出形成 4-6 个细胞 (图 5) 的时间在 10 到 15 h 之间, 可能是 13 h 左右。

2.1.3 紫外光照射强度与照射时长

通过紫外光照强度与照射时长对真菌致死率影响的实验结果, 可以看出随着紫外光强度或照射时长的增加, 真菌的致死率也随之发生变化。

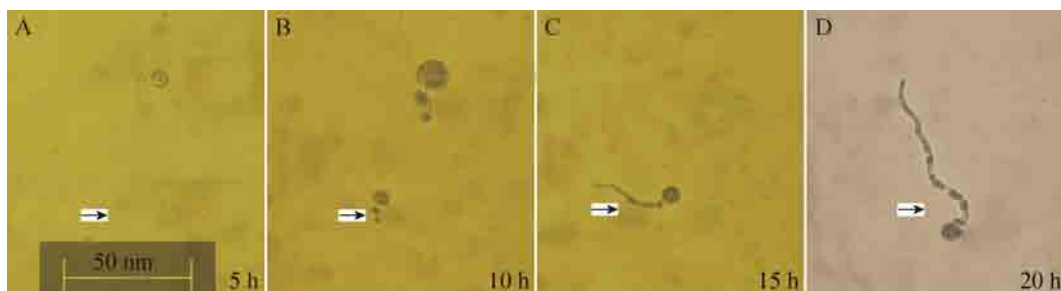


图 2 菌株 FSN002 的孢子在不同预培养时间下萌发形成的细胞数

Fig. 2 Cell number of spore germination in different pre incubation time. (A) 1 cell for 5 h. (B) 2-3 cells for 10 h. (C) More than 10 cells for 15 h. (D) More than 20 cells for 20 h.



图 3 菌株 FSN002 孢子萌发形成的细胞

Fig. 3 Cell growth pattern of strain FSN002. (A) 1 Spore. (B) 2 cells. (C) 3 cells. (D) 4 cells.

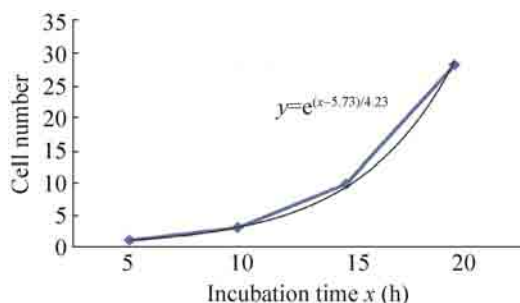


图4 菌株 FSN002 的孢子预培养时间与萌发形成的细胞数量之间的关系

Fig. 4 Relationship between pre incubation time and cell number in the spore germination of strain FSN002.

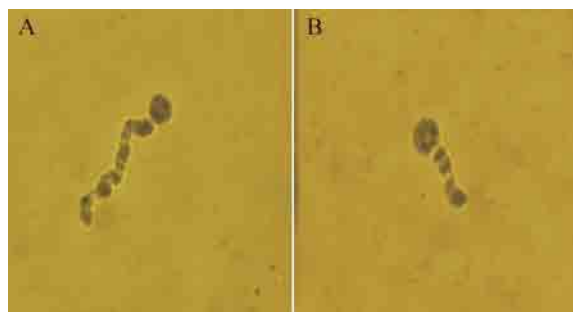


图5 菌株 FSN002 的孢子萌发形成 4-6 个细胞

Fig. 5 4-6 cells of strain FSN002. (A) 6 cells. (B) 4 cells.

将照射时间设置为紫外诱变仪的最小照射时间 6 s, 通过 4 个不同能量强度的紫外光对预培养后的真菌进行诱变, 统计经紫外照射后存活下来的菌落数并计算其致死率, 分别为 61%、73%、87%、95% 和 99% (图 6), 随着紫外光照射强度的增大, 致死率呈线性增加, 呈线性正相关关系, 当诱变剂量为 (90 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, 6 s) 时, 真菌的致死率在 95% 左右。将诱变光强设置为仪器的最小能量值 10 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, 统计 5 个不同紫外照射时长的真菌致死率, 分别为 61%、70%、79%、88% 和 97% (图 7), 从图中可以看出随着照射时间的增加, 致死率呈线性增加,

两者为线性正相关关系, 当诱变剂量为 (10 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, 25-29 s) 时, 真菌的致死率在 95% 左右。紫外光强为 50 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, 照射时长为 10 s 的真菌致死率是 94%。

为了明确紫外光强度与照射时长两个因素对真菌致死率影响的相关性, 对上述实验得到的 11 组数据采用 R 语言对其进行了分析, 建立了两个数学模型, 即交互模型, 紫外光强度与照射时长的共同作用与真菌致死率相关; 非交互模型, 紫外光强度与照射时长的共同作用与真菌致死率不相关, 演算过程如下:

在数学模型中, 设 Y 是真菌的致死率, x_1 是紫外光强项, x_2 是照射时长项, x_1x_2 是紫外光强与照射时长共同作用项, 则交互模型的数学方程为 $Y = Ax_1 + Bx_2 + Cx_1x_2$, 式中 A 、 B 、 C 为模型方程的系数, 非交互模型的数学方程为 $Y = Ax_1 + Bx_2$, 式中 A 、 B 为模型方程的系数。将实验数据通过 R 语言进行分析, 结果如表 1 所示, 在非交互模型中, 光强与时间两个因素对致死率的影响显著, 但它们两者的共同作用对致死率几乎没影响; 在交互模型中, 仅有时间因素对致死率的影响显著, 照射光强对结果的影响不显著, 光强与时长的共同作用项的影响也不显著。结合实际的实验结果可知, 光强对致死率的影响不能够被忽略, 非交互模型更加符合实验结果, 同时, 非交互模型的 R-squared (0.942) 较小, 说明模型的拟合度更好, 因此, 可以认为在紫外光强度和时长与致死率之间的关系的数学模型为 $Y = 0.083x_1 + 3.703x_2$ 。在紫外光能量一定的情况下, 照射时间越长, 真菌的致死率越高, 照射时间不足, 致死率下降, 得不到突变株; 紫外光照强度与时长对致死率的影响是两个不相关的因素。根据此模型可以做出当致

死亡率在 90%–95% 范围内的紫外光照强度范围与光照时长的函数图 (图 8), 在今后的紫外诱变试验中, 可以根据此模型来确定光强和时长两个因素的大小。此外, 该数学模型的函数图 (图 8) 显示, 随着光照时长的增加, 真菌的致死率为 100%, 这可能有两方面原因, 一是紫外光照射时长增加, 真菌受照的能量过多, 导致全部死亡, 二是随着紫外光照射时间的延长, 会产生出臭氧, 臭氧对真菌具有强烈的杀灭作用。

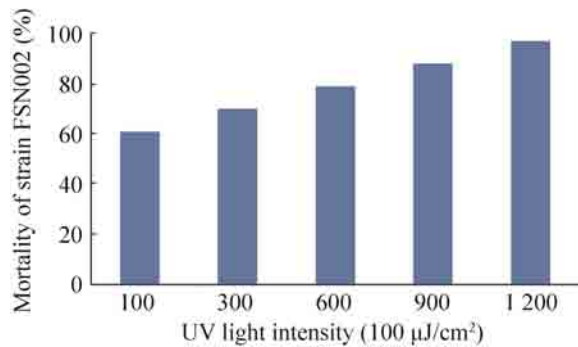


图 6 不同紫外光强照射强度对菌株 FSN002 的致死率

Fig. 6 Mortality of strain FSN002 under different UV light intensity.

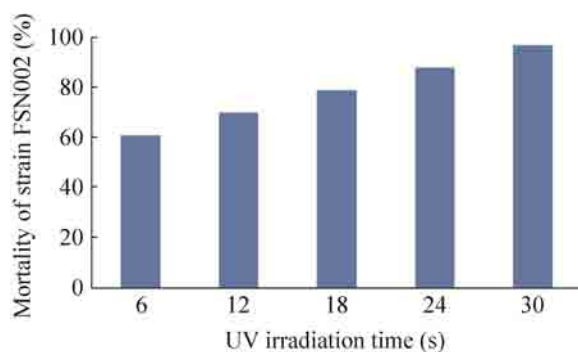


图 7 紫外光不同照射时长对菌株 FSN002 的致死率
Fig. 7 Mortality of strain FSN002 in different irradiation time.

表 1 不同紫外光照射强度与照射时长与致死率的 R 语言分析模型

Table 1 Two R-language analysis models of different UV light intensity and exposure time and mortality

Model types	Interactive model	Non-interactive model
	Pr (> t)	Pr (> t)
Energy (x_1)	1.34×10^{-1}	$2.07 \times 10^{-4}***$
Time (x_2)	$6.26 \times 10^{-3}**$	$4.56 \times 10^{-5}***$
Energy+time (x_1x_2)	5.33×10^{-1}	-
R-squared	9.45×10^{-1}	9.42×10^{-1}

Add: ***: extremely significant; **: highly significant; *: significant; Without *: not significant.

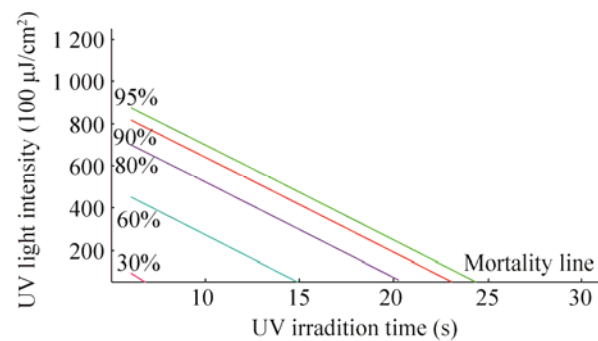


图 8 紫外光照射强度和时长与真菌致死率的非交互模型函数图

Fig. 8 Non-interactive model function of light intensity and time length and mortality.

经过多次反复实验验证, 当时间设置为 6 s, 能量在 900 J 时, 孢子诱变的致死率在 95% 左右, 达到实验致死率的要求。因此, 最佳的实验诱变剂量是 (90 000 μJ/(cm²·6 s)), 在今后的实验中, 可以结合模型尝试不同的紫外光强与照射时长组合, 紫外照射时长不应过长, 但诱变剂量效果应该在 (90 000 μJ/(cm²·6 s)) 左右, 可以通过适当增加照射时长, 降低紫外光强, 或者减少照射时长, 提高紫外光强来组合紫外诱变的剂量。

2.2 菌株 FSN002 突变株产楸灵素的 HPLC 鉴定

根据条件优化后的诱变方法对菌株 FSN002 进行诱变,获得了 2 株可能的突变菌株 b4 和 b5, 将其与野生型菌株分别同时进行培养(图 9)后发现,野生型菌株与菌株 b5 在培养到第 6 天时,培养液的颜色均变成了黄色,诱变株 b4 的培养液颜色呈现出透明淡黄色;在培养到第 13 天时,野生型菌株与 b5 菌株的培养液均变为亮黄色, b4 菌株的培养液仍然呈现透明淡黄色,表观上可以判断 b4 菌株分泌次生代谢物楸灵素的量少于野生型和 b5 菌株,或者也可能没有产生楸灵素,此外, b4 菌株的生长速度也明显慢于野生型菌株和 b5 菌株,菌株 b4 可能是突变株。

为了更加科学地对 b4、b5 菌株是否分泌楸灵素进行判断,采用 HPLC 高效液相色谱法检

测了 3 株菌株经培养 6 d 后分泌的楸灵素含量,结果(图 10)显示,在 289 nm 色谱图中,楸灵素的出峰时间是 20 min 左右。从图中可以看出在 20 min 左右,对照野生型菌株 CK 和 b5 菌株的色谱图有峰, b4 菌株则没有峰,再从其分泌的楸灵素含量(图 11)可以看出, b5 菌株和野生型菌株都具有明显的楸灵素合成能力, b5 的楸灵素平均含量仅比野生型的降低了 16%,不具有显著差异,而 b4 菌株的培养液中没有检测到楸灵素,因此可以进一步确定 b4 为突变株。

2.3 内生真菌 FSN002 的突变株的 ITS 序列鉴定

为了进一步确认突变株 b4 是否与出发菌株 FSN002 为同一个种,我们提取了突变株 b4 的基因组 DNA,对其 nrDNA 的 ITS 区域进行扩增,得到其 ITS 序列(GenBank 登录号: KY123648),并与

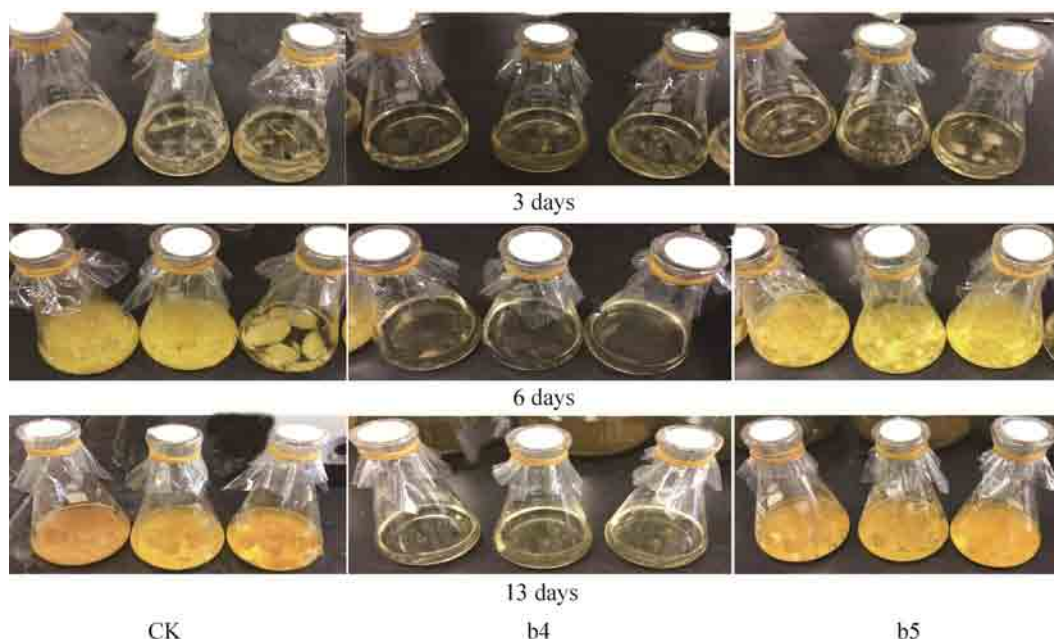


图 9 培养不同天数的野生型菌株与突变株的生长情况

Fig. 9 The growth of wild type and mutant strains in different days. b4 is for mutant strain b4; b5 is for mutant strain b5; CK is for wild strain.

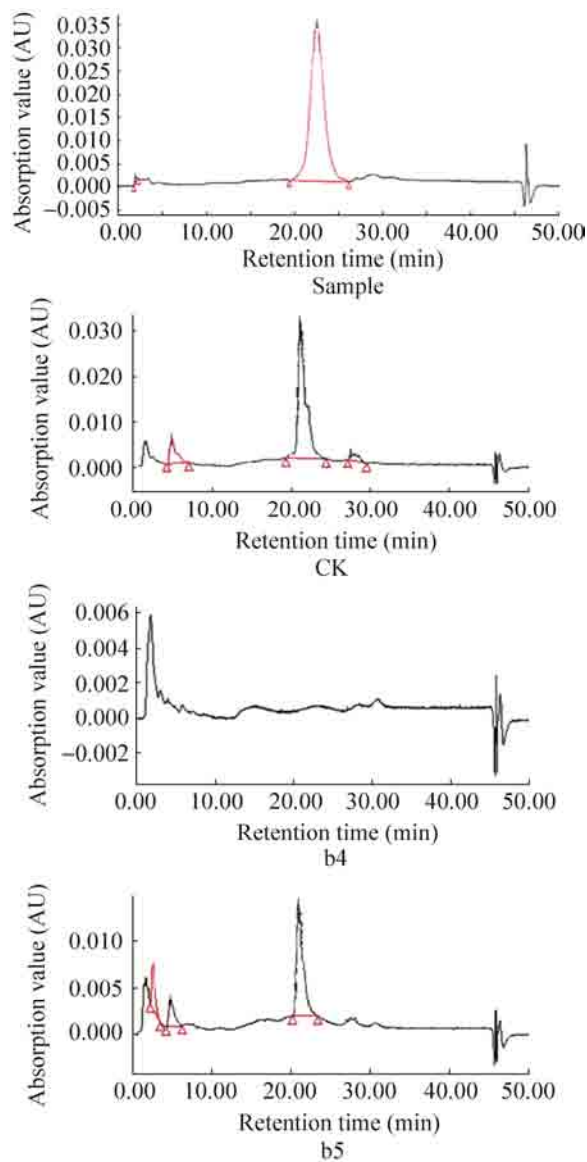


图 10 对照菌株 (CK)、b4 及 b5 菌株培养 6 d 时分泌楸灵素的色谱图 (289 nm)

Fig. 10 The secretion catalitaxol of 289 nm chromatograms of cultured CK, b4 and b5 strains of 6 days.

出发菌株 FSN002 的 ITS 序列 (GenBank 登录号: JX119024) 进行了序列比对, 发现两者的 ITS 序列相似性为 99.6%, 说明突变株 b4 与菌株 FSN002 为同种, 菌株 b4 是菌株 FSN002 的突变株。

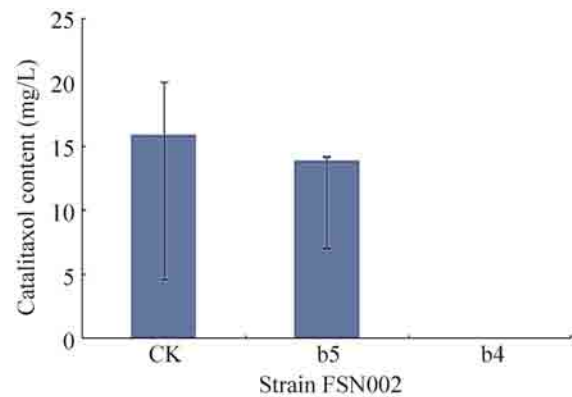


图 11 对照菌株 (CK)、b4 及 b5 菌株培养 6 d 时的楸灵素含量

Fig. 11 The content histogram of secretion Catalitaxol of cultured CK, b4 and b5 strains for culturing 6 days.

3 结论与展望

通过对选育内生真菌长枝木霉 FSN002 突变株的紫外诱变方法的建立和优化, 发现该真菌的孢子在培养 24 h 的萌发率在 10%–13% 之间, 可以据此来确定实验的涂板浓度; 在对真菌进行诱变时, 当孢子萌发出 4–6 个细胞时是最佳的诱变时间; 通过实验发现内生真菌 FSN002 在预培养 13 h 左右可以萌发出 4–6 个细胞, 此时是最佳的诱变时间; 紫外光强度与光照时长均能够引起真菌致死率的变化, 两个因素均与真菌的致死率呈线性正相关关系, 但两者之间的相关性可以忽略, 可以根据实验获得的数学模型来设置致死率在 95% 左右的紫外诱变剂量。

本研究用建立优化后的紫外诱变法对内生真菌 FSN002 进行多次诱变, 筛选突变菌株, 发现 1 株不分泌楸灵素的突变株 b4, 采用 ITS 序列对该突变株进行了分子鉴定, 确认 b4 为长枝木霉, 是由菌株 FSN002 经过紫外诱变而来, 由

此可以看出经过优化后的紫外诱变法对于此木霉菌进行突变育种是可行的。该方法的建立为今后通过突变株来研究抗癌次生代谢物楸灵素的生物合成机制奠定了基础,具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Zhang XX, Yu XL, Miao ZQ. Correlation with pellet shape, metabolic profiling and anticancer activity of endophyte FSN002. J Shanghai Jiaotong Univ, 2012, 46(5): 796–802 (in Chinese). 张星星, 于湘莉, 苗志奇. 楸树内生真菌菌球形态和代谢谱与抗癌活性的相关性. 上海交通大学学报, 2012, 46(5): 796–802.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. Science, 1993, 260(5105): 214–216.
- [3] Wang DN. Studies on genetic diversity and genetic structure of *Juglans mandshurica* maxim nature population[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2011 (in Chinese). 王东娜. 胡桃楸天然种群遗传多样性和遗传结构的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- [4] Nan Y, Zheng LX, Zhou LD. Studies and development of *Catalpa bungei* c. A. Mey. Northwest Pharmaceut J, 2007, 22(2): 90–93 (in Chinese). 南垚, 郑莲香, 周立东. 楸树的研究现状与开发前景. 西北药学杂志, 2007, 22(2): 90–93.
- [5] Leuchtman A. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. Nat Toxins, 1993, 1(2): 150–162.
- [6] Kuasri S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. Chem Biol, 2012, 19(7): 792–798.
- [7] Zhou YQ, Cheng YP, Liu DD, et al. Research on activities of medicinal plant endophytic fungi metabolites. Information on Traditional Chinese Medicine, 2014, 31(3): 159–160 (in Chinese). 周永强, 程玉鹏, 刘丹丹, 等. 药用植物内生真菌代谢产物的活性研究进展. 中医药信息, 2014, 31(3): 159–160.
- [8] Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist, 2009, 10: 1–17.
- [9] Aly AH, Debbab A, Kjer J, et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. Fungal Divers. 2010, 41: 1–16.
- [10] Kusari S, Spiteller M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes. Nat Prod Rep, 2011, 28: 1203–1207.
- [11] Audhya TK, Russell DW. Production of enniatins by *Fusarium sambucinum*: selection of high-yield conditions from liquid surface cultures. Microbiology, 1974, 82(1): 181–190.
- [12] Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes. Nat Prod Rep, 2006, 23(5): 753–771.
- [13] Puri SC, Verma V, Amna T, et al. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. J Nat Prod, 2005, 68(12): 1717–1719.
- [14] Eyberger AL, Dondapati R, Porter JR. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. J Nat Prod, 2006, 69(8): 1121–1124.
- [15] Kusari S, Kosuth J, Cellarova E, et al. Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. Fungal Ecol, 2011, 4: 219–223.
- [16] Yang XZ, Zhang LQ, Guo B, et al. Preliminary study of a vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. Chinese Traditional Herbal Drug, 2004, 35: 79–81 (in Chinese). 杨显志, 张玲琪, 郭波, 等. 一株产长春新碱内生真菌的初步研究. 中草药, 2004, 35: 79–81.
- [17] Gao XL, Lin H, Zhao W, et al. JA, a new type of polyunsaturated fatty acid isolated from *Juglans mandshurica* Maxim, limits the survival and induces apoptosis of hepatocarcinoma cells.

- Apoptosis, 2016, 21(3): 340–350.
- [18] Ruijun W, Shi W, Yijun X, et al. Antitumor effects and immune regulation activities of a purified polysaccharide extracted from *Juglan regia*. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72: 771–775.
- [19] Nian X, Murtaza H, Wei L, et al. *Juglans mandshurica* Maxim extracts exhibit antitumor activity on HeLa cells *in vitro*. *Mol Med Rep*, 2014, 9(4): 1313–1318.
- [20] Wu YW, Li MY, Zhang T, et al. Study on the identification of one endophytic fungus isolated from *Catalpa bungei* and the anti-cancer activity of metabolites produced by the fungus. *J Northeast Agric Univ*, 2010, 41(6): 90–93 (in Chinese).
吴运帷, 李美芽, 张田, 等. 一株楸树内生真菌的鉴定及其发酵产物抗肿瘤特性研究. *东北农业大学学报*, 2010, 41(6): 90–93.
- [21] Miao Z, Wang Y, Yu X, et al. A new endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. *Appl Biochem Micro*, 2009, 45(1): 81–86.
- [22] Walker KD, Klettke K, Akiyama T, et al. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in taxol biosynthesis. *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 53947–53954.
- [23] Wu YW. Studies on antitumor agents of endophytic fungi isolated from *Juglans mandshurica* maxim[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2008 (in Chinese).
吴运帷. 胡桃楸内生真菌的分离及高抗癌活性菌株筛选[D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [24] Li MY, Wu YW, Jiang FS, et al. Isolation, identification and anticancer activity of an endophytic fungi from *Juglans mandshurica*. *China J Chin Mater Med*, 2009, 34(13): 39–43 (in Chinese).
李美芽, 吴运帷, 蒋福升, 等. 一株具有抗 HepG2 活性的胡桃楸内生真菌的分离及研究. *中国中药杂志*, 2009, 34(13): 39–43.
- [25] Liang Y, Lu WY, Wen JP, et al. Improvement of *Saccharopolyspora spinosa* and the kinetic analysis for spinosad production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 152(3): 440–448.
- [26] Jin ZH, Xu B, Lin SZ, et al. Enhanced production of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* by genome shuffling. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 159(3): 665–663.
- [27] Zhang YQ, Lu DX, Wang YJ. Effects of ultraviolet radiation on the protein contents of three marine micro-algae species. *J Anhui Agric Sci*, 2009, 37(20): 9350–9351 (in Chinese).
张跃群, 陆德祥, 王勇军. 紫外线辐照对 3 种海洋微藻蛋白质含量的效应. *安徽农业科学*, 2009, 37(20): 9350–9351.
- [28] Yu XL, Zhao JY, Zhang LD, et al. Study on the anti-cancer activity of endophytic fungi isolated from *Juglans mandshurica* Maxim. *Shanghai Med Pharmaceut J*, 2012, 33(13): 49–52 (in Chinese).
于湘莉, 赵静雅, 张利达, 等. 楸树内生真菌抗癌性能研究. *上海医药*, 2012, 33(13): 49–52.
- [29] Jin P. Screening of enramycin producing strain and optimization of fermentatipon conditions[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang Univ, 2012 (in Chinese).
金萍. 恩拉霉素生产菌的选育及其发酵条件优化[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012.
- [30] Liu CL, Wen JZ, Yang MX, et al. Application of rDNA-ITS in molecular test of phytopathogenic fungi. *J Northeast Agric Univ*, 2007, 38(1): 101–106 (in Chinese).
刘春来, 文景芝, 杨明秀, 等. rDNA-ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用. *东北农业大学学报*, 2007, 38(1): 101–106.

(本文责编 陈宏宇)