

一株具有脱胶功能大麻内生真菌的分离和鉴定

汪学军^{1,2}, 闵长莉^{1,2}, 殷智超^{1,2}

(1 皖西学院 生物与制药工程学院, 安徽六安 237012; 2 皖西学院 大别山植物内生真菌资源研究中心, 安徽六安 237012)

摘要: 采用组织块法对大麻(*Cannabis sativa*)根、茎、叶等组织中的内生真菌进行分离, 利用平板透明圈法筛选具有脱胶功能的菌株, 对获得的脱胶菌株进行形态学鉴定和分子生物学鉴定。结果表明: (1) 从大麻根、茎、叶的组织部位共分离得到内生真菌 16 株, 茎部分离到 9 株真菌, 叶部 5 株, 根部 2 株。(2) 编号为 DM6 的内生真菌具有较强的果胶分解能力, 其透明圈直径为 2.49 cm。(3) 形态学鉴定发现, 内生真菌 DM6 不能产生孢子, 菌丝较为粗壮、分支较少、有明显的隔; 分子学鉴定表明, 内生真菌 DM6 与 *Phoma aliena* (KC311486) 序列的相似性最高, 为 99%, 并且在系统发育树上位于同一分支上。因而内生真菌 DM6 可以鉴定为茎点霉属一种(*Phoma* sp.)。

关键词: 大麻; 微生物脱胶; 果胶分解菌; 茎点霉属一种

中图分类号: Q93-331

文献标志码: A

Isolation and Identification of an Endophytic Fungus for Microbial Degumming of *Cannabis sativa* L.

WANG Xuejun^{1,2}, MIN Changli^{1,2}, YIN Zhichao^{1,2}

(1 College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, China; 2 Research Center for Endophytic Fungi Resources of Dabie Mountain, West Anhui University, Lu'an 237012, China)

Abstract: Endophytic fungi were isolated from the roots, stems and leaves of *Cannabis sativa* L. by tissue block method, and degumming strains were screened by transparent circle method, and then identified by morphology and molecular biology methods. The results indicated that: (1) A total of 16 endophytic fungi were isolated from different tissues of the *C. sativa*, nine of them were from the stems, five then from the leaves and two from the roots (2). (2) For the isolated strains, one of them named DM6 was more effective in decomposing the pectin of the *C. sativa*, and the transparent circle diameter is 2.49 cm. (3) Morphological identification showed that strain DM6 was non-sporulating and the hyphae was more stout, fewer branches with a distinct septum. Molecular identification indicated that the sequence of strain DM6 was found to share 99% similarity with *Phoma aliena* (KC311486). Strain DM6 was shown to be close to the genus *Phoma*. So the isolate was further identified as *Phoma* sp.

Key words: *Cannabis sativa*; microbial degumming; microbes of pectin decomposing; *Phoma* sp.

大麻(*Cannabis sativa* L.)属于荨麻目(Urticales)、大麻科(Cannabinaceae)、大麻属(*Cannabis*),是一年生直立的草本植物,俗名汉麻、线麻及花麻等,主要分布在亚洲及欧洲地区^[1]。大麻在中国具有悠久的栽培历史,且种质资源丰富^[2],近年来

中国大麻产量已占世界大麻产量的 1/3 左右,位居世界首位^[3]。现代研究表明,大麻纤维具有吸湿透气、抗菌防臭、抗静电以及防紫外线等优良的性能,被广泛用于服装、汽车、建筑等行业中,被认为是未来最具潜力的天然环保型纤维之一^[4]。由于大麻纤

收稿日期: 2013-12-10; 修改稿收到日期: 2014-01-07

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(KJ2011Z398); 六安市定向委托皖西学院市级研究项目(2012LWA019); 安徽省高等学校省级自然科学基金重点项目(KJ2013A266)

作者简介: 汪学军(1973-),男,副教授,主要从事微生物及代谢产物研究。E-mail: xjwang0917@163.com

维存在于大麻原茎的韧皮部,去除胶质后才能作为纺织纤维使用,因此,脱胶是大麻纤维生产加工过程中非常重要的一道关键工序,脱胶已成为连接大麻种植业及其加工企业的重要纽带,它能直接影响纤维的产量及其应用价值^[5]。

目前国内外大麻企业通常采用的脱胶方法主要有两种,化学脱胶法和微生物脱胶法。化学脱胶法主要是使用碱煮等化学方法去除大麻胶质成分,从而得到能纺织用的纤维材料。但该方法存在产量低、成本高、质量不稳定以及环境污染严重等弊端^[6],故有关大麻微生物的脱胶研究得到广泛关注。微生物脱胶法是用微生物或者微生物产生的酶来分解大麻的胶质成分,同时对大麻纤维不产生损伤,处理条件相对温和,生产过程中环境污染较少,对纤维损伤小,可以提高麻的加工质量,得到品质优良的精干麻^[7]。目前,国内外学者们对脱胶菌株的分离筛选及其对麻类的脱胶研究工作主要集中在细菌及某些真菌方面,但是有关大麻内生真菌的脱胶研究至今未见有文献报道。本研究主要试图从大麻植株中筛选出具有脱胶功能的内生真菌,并采用形态学和分子生物学相结合的方法对该菌株进行了菌种鉴定,为脱胶菌株的筛选提供了一条新的研究思路,也为中国大麻纤维的研究与开发奠定了一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大麻样品材料于2012年8月采自六安市苏埠镇大麻种植基地,选健康无病害的大麻植株,取其根、茎、叶三个部位组织材料,放入无菌的纸袋中带回实验室立即进行内生真菌的分离。

1.2 方法

1.2.1 培养基 内生真菌分离、纯化培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基^[8],培养基融化后冷却至不烫手时向其中加入0.1%的脱氧胆酸钠和0.01%氯霉素,迅速混匀制备成平板;脱胶菌筛选为果胶培养基,融化后冷却至不烫手时向其中加入0.1%的脱氧胆酸钠。

1.2.2 大麻内生真菌的分离、纯化 将大麻根、茎、叶新鲜的组织材料在自来水下进行清洗,除去表面的污物和泥土;放置于超净工作台上,利用风机吹出无菌空气吹干,用剪刀剪成长度各为2 cm的小段,分别放在无菌培养皿中进行表面消毒,先用75%的乙醇浸洗30 s,无菌水冲洗3~4次,5%次氯酸钠溶液消毒5 min(消毒时间视材料可微调),无菌水冲

洗3~4次,再用75%的乙醇浸洗30 s,无菌水冲洗5次后用无菌的滤纸吸干表面的水分。无菌剪刀将消毒后的根、茎、叶分别剪成长约5 mm小块。将上述组织块斜插于PDA平板上,每皿放置组织块3~4个,采用封口膜沿皿底和皿盖交接处缠绕1圈(减小染菌概率),于28℃恒温恒湿培养。同时,将上述消毒过程中最后一次冲洗组织块的无菌水滴在PDA培养基上以同样条件加以培养,用来检测消毒是否完全彻底。培养3~7 d后及时采用尖端菌丝挑取法,挑取形态不同的菌丝接种到新鲜PDA培养基上继续培养纯化,直至得到形态完全一致纯化的内生真菌,转接于PDA斜面中编号保藏^[8]。

1.2.3 脱胶菌的筛选 在培养皿中倒入约10 mL的2%琼脂培养基作为下层;待其凝固后再向其中倒入约10 mL果胶培养基作为上层,制备成双层平板。分别取1.2.2中分离得到的内生真菌点种于果胶平板中央,28℃倒置培养3 d。

采用透明圈水解法对所分内生真菌进行筛选:在培养3 d后的脱胶平板中倒入卢戈氏碘液至浸没菌落,静置染色5 min后倒去碘液,缓慢用双蒸水漂洗平板至流出的水无色为止。因为果胶酶可以水解培养基中的果胶,因而碘液不能把它染上颜色形成透明圈,而果胶酶浓度较低处由于果胶未被水解因而形成背景颜色-红褐色,透明圈的有无和大小与菌株产酶能力呈正相关,分别测量和计算透明圈直径与菌落直径,计算HC值^[9]。

$$HC \text{ 值} = \text{透明圈直径} / \text{菌落直径}$$

1.2.4 脱胶菌的形态学鉴定 接种脱胶功能较好的内生真菌于PDA平板中央,28℃倒置培养3~7 d。每天观察并记录内生真菌的菌落大小、颜色变化、有无产生色素、致密程度等菌落特征。显微观察采用透明胶带法:用透明胶带轻轻触菌落,使得菌丝或孢子粘到胶带上,把透明胶带置于载玻片上进行显微观察,记录菌丝形态结构、孢子梗形态、孢子形状以及孢子的着生方式等显微特征,参考相关文献资料进行分类^[10]。

1.2.5 脱胶菌的分子鉴定 采用改进SDS法提取内生真菌基因组DNA,真菌的保守序列ITS通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增。PCR扩增条件:94℃预变性1 min,93℃变性1 min,52℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环,最后72℃延伸10 min^[11]。测序工作由上海生工完成。

测序后,将该菌株序列在 NCBI 数据库中 Blastn 程序比对,对核酸数据库进行搜索,选择同源性较高的参比菌株及序列。使用 Clustal X 和 Mega 5.0 软件方法构建系统发育树(N-J法,Bootstrap 重复 1 000 次, Kimura 2 parameter)。

2 结果与分析

2.1 大麻内生真菌分离纯化结果

从大麻根、茎、叶等不同的组织部位共分离得到内生真菌 16 株,编号依次为 DM1- DM16(图 1),其中大麻茎中分离到内生真菌数量最多,达到 9 株,叶

中分离得到 5 株内生真菌,而根中分离得到内生真菌数量较少,仅为 2 株。上述研究结果表明内生真菌在宿主植物中具有一定的组织选择性。在最后一次无菌水清洗组织的对照平板上无微生物长出,表明整个消毒过程彻底,所分离到的真菌均为内生的,而非附生或环境中污染的真菌。

2.2 脱胶功能大麻内生真菌的筛选

由于在果胶平板中加入脱氧胆酸钠,可有效抑制真菌的生长,方便结果的观察,形成真菌菌落相对较小。16 种内生真菌 28 °C 培养,经过卢戈氏碘液染色后,有 4 种内生真菌可以产生透明圈(图 2),其

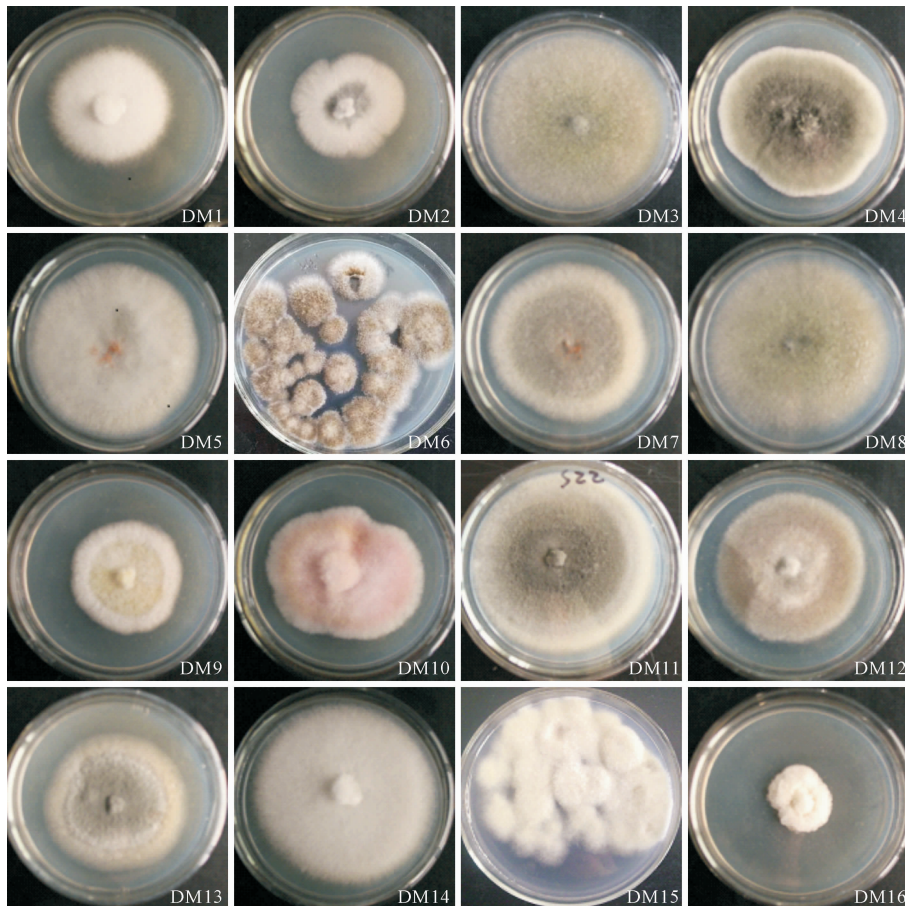


图 1 大麻组织中分离到的 16 株内生真菌菌落

Fig. 1 Colony characteristics of *C. sativa* on PDA medium

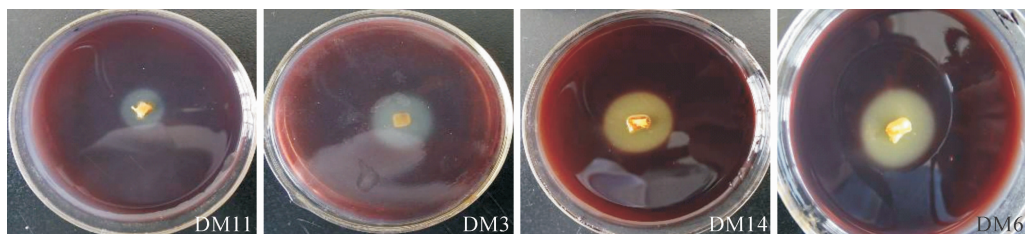


图 2 大麻 4 种内生真菌的水解圈

Fig. 2 Hydrolyzed circle secreted by four endophytic fungi of *C. sativa*

中内生真菌 DM6 效果较好,形成透明圈直径 2.49 cm,菌落直径为 1.23 cm,HC 值(D/d)为2.02;而内生真菌 DM11 效果较差,仅围绕着菌落形成一个较小的透明圈,HC 值(D/d)为 1.11。DM6 于大麻茎部材料分离得到,各种内生真菌的菌落大小和透明圈的形成情况详见表 1。

2.3 脱胶功能大麻内生真菌的形态学特征

将脱胶能力较好的内生真菌 DM6 接种于 PDA 平板上培养,菌落生长速度较慢,形成菌落较小,培养 3 d 菌落生长直径仅为 1.63 cm,表面灰白色,菌落中央生长较为致密,边缘相对蓬松;6 d 后菌落直径为 2.78 cm,表面颜色变为灰褐色,并且产生黑色色素(图 1,DM6)。3~7 d 每天取样制片进行显微观察,发现内生真菌 DM6 不能产生孢子;菌丝较为粗壮、分支较少、有隔。

2.4 脱胶功能大麻内生真菌的分子鉴定

菌株 DM6 的 PCR 产物经扩增、纯化、测序后,得到长为 522 bp 的 ITS 序列。将 DM6 测定的序列提交到 NCBI 的 Bankit 入口提交到 GenBank 数据库中,在 GenBank 中得到的 Accession numbers 为 KF790690。经 Blastn 检索比对后,下载与 DM6 相似性较高的序列,用 Clustal X 软件进行分析比对,采用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树,得到 DM6

表 1 大麻内生真菌代谢物产生透明圈大小

Table 1 The transparent zone size of endophytic fungus from *C. sativa*/cm

菌株编号 Strain number	透明圈直径 Transparent zone diameter(D)	菌落直径 Colony diameter(d)	HC 值 HC value (D/d)
DM1	—	3.12	—
DM2	—	2.89	—
DM3	2.02	1.63	1.24
DM4	—	3.14	—
DM5	—	2.65	—
DM6	2.49	1.23	2.02
DM7	—	1.46	—
DM8	—	3.21	—
DM9	—	2.13	—
DM10	—	1.09	—
DM11	1.38	1.24	1.11
DM12	—	1.86	—
DM13	—	2.22	—
DM14	2.16	1.62	1.33
DM15	—	2.41	—
DM16	—	1.69	—

注:—表示无水解效果或是 HC 值为 0。

Note:— means none or HC value was 0.

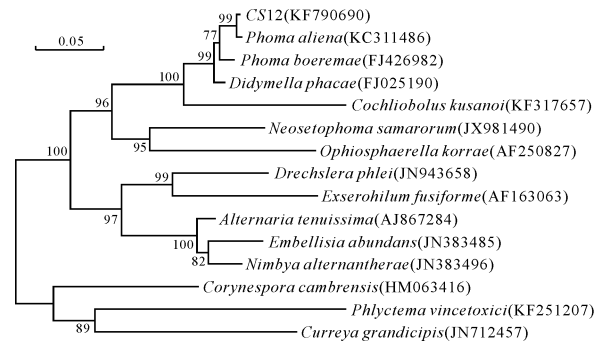


图 3 内生真菌 DM6 的 ITS 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of endophytic fungus DM6 based on ITS region sequences (Neighbor-Joining)

的进化树(图 3)。结果表明,内生真菌 DM6 与 *Phoma aliena* (KC311486) 序列的相似性最高,为 99%,并且在系统发育树上位于同一分支上,因而可以鉴定为茎点霉属(*Phoma* sp.) 一种。

3 讨论

自 Hauman 等于 1902 年从浸渍的亚麻上分离得到某些脱胶细菌后,大量的具有脱胶功能的微生物被分离得到,主要包括细菌(*Clostridium*, *Bacillus* 等)和真菌(*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*)两大类,如:费新尼亚梭菌(*Clostridium felsineum*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),芽孢杆菌属(*Bacillus* sp. MG-cp-2, *Bacillus* sp. NT-39 and 53),不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.);杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*),黑管菌属(*Bjerkandera* sp.),微小根毛霉(*Rhizomucor pusillum*),桔青霉(*Penicillium citrinum*)等^[12-13],显示了脱胶菌具有丰富的种类多样性,而麻的产地及生态环境是影响脱胶菌数量和种类的主要因素,故人们从特殊的生境中很有可能筛选出特异的具有脱胶功能的内生真菌。

本研究以六安市苏埠镇大麻种植基地的大麻为对象,通过 PDA 培养基进行其内生真菌的分离,共获得内生真菌 16 株;接着在培养基中加入果胶作为仅有碳源的培养基,以内生真菌在果胶平板上形成透明圈的有无及能力大小作为判断指标,筛选得到 1 株具有较强脱胶功能的真菌,该菌株经过形态学和分子分类学相结合的方法被鉴定为茎点霉属。茎点霉属是紫花苜蓿、柠檬、桑椹、柑橘以及冬枣^[14-18]等植物的病原真菌,但是这并不意味着茎点霉属是不可利用的一类资源菌。Hoffman 等^[19]从植物锥序蜜心果(*Saurauia scaberrinae*)中分离出一株茎

点霉属内生真菌,进一步的研究发现其代谢产物为具有抗菌活性的地衣酸衍生物 Phomodione;王维等^[20]从 1 株杜仲内生茎点霉的代谢产物中分离纯化出杜仲的主要降压成分松脂醇二葡萄糖苷,并对该产物进行了培养条件的优化;张礼萍等^[21]发现 1 株茎点霉 299 的代谢产物 Verrucarins A、B 均对混合淋巴细胞具有很强的免疫抑制活性;武文斌等^[22]

从药用植物蒺藜中筛选出的 3 株茎点霉内生真菌具有较强的抗肿瘤活性。故茎点霉属是一类可被人类利用的微生物资源,在生物环保、农业生产、食品及医药等领域具有潜在的开发应用价值。尽管如此,到目前为止,有关茎点霉属真菌具有脱胶功能方面的研究还未见有文献报道,表明内生真菌的代谢产物具有多样性。

参考文献:

- [1] ZHANG L G(张利国). RAPD cluster analysis of 27 hemp cultivars[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences* (黑龙江农业科学), 2009, 2: 14-16(in Chinese).
- [2] CHEN Q B(陈其本), YU L H(余立惠), YANG M(杨 明), et al. Chemotypes in *Cannabis sativa* cultivated in Yunnan[J]. *Guihaia* (广西植物), 1993, 13(2): 184-187(in Chinese).
- [3] SUN X Y(孙小寅), YING T(映 亭), WEN G Q(温桂清), et al. Hemp fiber performance and its application[J]. *Journal of Textile Research* (纺织学报), 2001, 22(4): 34-36(in Chinese).
- [4] YANG Y(杨 阳), ZHANG Y Y(张云云), SU W J(苏文君), et al. Fiber properties and development and utilization of industrial hemp [J]. *Plant Fiber Science in China* (中国麻业科学), 2012, 34(5): 237-240(in Chinese).
- [5] CHAUDHURY S D. A short review of biochemical study of jute retting[J]. *Pakist. Jour. Sci.*, 1953, 5: 11-17.
- [6] QUAN Q Y(全琼瑛). Hemp degumming mechanism and optimization methods[J]. *China Fiber Inspection* (中国纤检), 2013, (1): 87-88 (in Chinese).
- [7] QIAN W J(钱微君), CHEN H A(陈海敏), CHEN J Y(陈建勇), et al. Separation and identification of microbes of pectin decomposing in hemp retting[J]. *Journal of Textile Research* (纺织学报), 2006, 27(11): 52-54(in Chinese).
- [8] MIN CH L(闵长莉), WANG X J(汪学军), LIU W B(刘文博). Preliminary study on isolation of endophytic fungi from *Cymbidium georgii* and its antimicrobial activity[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2012, 32(3): 596-599(in Chinese).
- [9] XU H(徐 红), BAI L(白 璐), LI Y(李 毅), et al. Bioenzyme degumming and combing of apocynum fiber[J]. *Journal of Textile Research* (纺织学报), 2006, 27(12): 102-104(in Chinese).
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [11] LI Y L(李艳玲), WANG D C(王德才), SHI R J(史仁玖), et al. Isolation and identification of endophytic fungi from *Polygonatum sibiricum* in Mountain Tai and study on their antimicrobial activity[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2013, 44(11): 1 490-1 494(in Chinese).
- [12] HE SH J(何绍江), WANG Y J(王炎江). Study on ramie by anaerobic bacteria degumming II. degumming condition experiment[J]. *China's Fiber Crops* (中国麻作), 1995, 17(4): 27-32(in Chinese).
- [13] CHEN Y D(陈杨栋), CHEN T(陈 婷), LI L J(李力炯), et al. Isolation and screening of microbial strains for biological degumming of ramie and evaluation of its effects[J]. *Journal of Textile Research* (纺织学报), 2010, 31(5): 69-73(in Chinese).
- [14] HOLLINGSWORTH C R, GRAY F A. First report of brown root rot on alfalfa caused by *Phoma sclerotoides* in the continental United States[J]. *Plant Disease*, 1999, 83(11): 1 071.
- [15] HE L(贺 磊), HU J H(胡军华), XU L(徐 立), et al. Identification and biological characteristics of pathogen of Mulberry disease[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* (西南农业学报), 2010, 23(3): 760-763(in Chinese).
- [16] NACHMIAS A, BARASH I, BUCHNER V, et al. A phytotoxic glycopeptide from lemon leaves infected with *Phoma fracheiphila*[J]. *Physiological Plant Pathology*, 1979, 14(2): 135-140.
- [17] TUZCU O, CINAR A, DENG C L(邓崇岭), et al. Citrus species and hybrids on the Malsecco resistance[J]. *Zhejiang Citrus* (浙江柑桔), 1992, 1: 46-47(in Chinese).
- [18] TIAN Y H(田蕴慧), XUE M L(薛梦林), ZHAO G ZH(赵国柱), et al. Morphological and molecular identification of pathogenic fungal strains on postharvest Dongzao jujube fruit during cold storage[J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2010, 27(3): 422-426(in Chinese).
- [19] HOFFMAN ANGELA M, MAYER STEVEN G, STROBEL GARY A, et al. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(4): 1 049-1 056.
- [20] WANG W(王 维), SHI J L(师俊玲), YANG B W(杨保伟). Optimization of conditions for production of pinoresinol diglucoside by a strain of *Phoma* sp. [J]. *Transactions of the CSAE* (农业工程学报), 2008, 24(6): 287-290(in Chinese).
- [21] ZHANG L P(张礼萍), GONG B Y(龚炳永), HAO W Y(郝伟月). Immunosuppressants isolated from a *Phoma* sp. 299 I. Studies on compounds SIPI-299-B and 299-O[J]. *Chinese Journal of Antibiotics* (中国抗生素杂志), 2000, 25(1): 9-11, 67(in Chinese).
- [22] WU W B(武文斌), LIU Y L(刘雅莉), YUE G CH(岳高超), et al. Antagonism on microorganisms and cancer cells by the fermentation broth of endophytic fungi from *Tribulus terrestris* L. [J]. *Microbiology China* (微生物学通报), 2013, 40(12): 2 280-2 287(in Chinese).