

【药效学评价】

穿龙薯蓣内生真菌分离鉴定及其抑菌活性研究

孟凡佳¹, 刘彦², 罗周良², 于丹², 都晓伟^{2*}

1. 黑龙江中医药大学教学实验中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 分离纯化穿龙薯蓣内生真菌, 并对分离得到的内生真菌进行抑菌活性筛选及分类鉴定。方法 采用组织分离法纯化穿龙薯蓣内生真菌, 采用载片培养法、挑片培养法、插片培养法, 对照《真菌鉴定手册》和《半知菌纲手册》进行初步鉴定; 以金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、白色葡萄球菌 *Staphylococcus albus*、柠檬色葡萄球菌 *Staphylococcus citreus*、四联球菌 *Micrococcus tetragenus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、伤寒杆菌 *Salmonella typhi*、铜绿色假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、变形杆菌 *Bacterium termo*、肺炎杆菌 *Bacillus endocarditidis capsulatus*、福氏痢疾杆菌 *Shigella flexneri*、乙型副伤寒杆菌 *Bacterium paratyphosum B* 作为受试对象, 检测内生真菌菌株发酵液以及菌丝提取物的抑菌活性, 应用分子生物学方法对筛选出的活性菌株进行分类鉴定。结果 从穿龙薯蓣叶片中分离得到 52 株内生真菌, 根据形态学特征将 10 株产孢子的内生真菌初步鉴定为 2 个目、3 个科、9 个属; 其中有 3 株内生真菌的菌丝提取物具有广谱抗菌活性, 结合形态学和分子生物学特征鉴定 C37 菌为赤霉属 *Gibberella* 真菌, C30 和 C50 菌为链格孢属 *Alternaria* 真菌。结论 穿龙薯蓣叶片中存在具有抑菌活性的内生真菌, 具有开发抑菌生物制剂的潜力。

关键词: 穿龙薯蓣; 内生真菌; 分离; 鉴定; 抑菌活性

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)10-1418-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.10.010

Isolation, identification and antimicrobial activity of endophytic fungi from *Dioscorea nipponica*MENG Fan-jia¹, LIU Yan², LUO Zhou-liang², YU Dan², DU Xiao-wei²

1. Centre of Teaching Laboratory, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To isolate endophytic fungi from the fresh leaves of *Dioscorea nipponica* Makino, and to determine their antimicrobial activities. **Methods** Endophytic fungi from the fresh leaves of *Dioscorea nipponica* Makino were isolated by tissue isolation method, and the preliminary identification was carried out by slide plate culture, tissue culture, and plug culture. After isolating the endophytic fungi, the antimicrobial activity from the isolated endophytic fungi was detected using filter paper method with *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus citreus*, *Micrococcus tetragenus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterium termo*, *Bacillus endocarditidis capsulatus*, *Shigella flexneri*, *Bacterium paratyphosum B* indicator microorganisms. **Results** A total of 52 strains of the endophytic fungi were isolated. According to morphological characteristics, 10 endophytic fungi producing spores were identified as two orders, three families, and nine genera. The extracts of fungal mycelium had the antibiotic activity of strains of C37, C30, and C50. With the identification by morphology and molecular biology, strain C37 was determined to belong to the genus *Gibberella*, and C30, C50 to *Alternaria*. **Conclusion** The antibacterial activity of these endophytes in the leaves of *Dioscorea nipponica* Makino could be exploited for the development of new antibacterial

收稿日期: 2017-05-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81373902)

作者简介: 孟凡佳 (1982—), 女, 博士研究生, 实验师, 现从事中药学研究。E-mail: 41588281@qq.com

*通信作者 都晓伟 (1962—), 女, 博士研究生导师, 现从事药材生物学和中药质量研究。E-mail: xiaoweidu@hotmail.com

biological agents.

Keywords: *Dioscorea nipponica* Makino; endophytic fungi; isolation; identification; antimicrobial activity

穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino, 为薯蓣科多年生缠绕草质藤本植物, 作为穿山龙药材使用^[1], 具有抗肿瘤、抗心血管疾病、抗菌等作用^[2-3]。内生真菌是一类存在于植物组织内, 长期与宿主植物生活在一起并不引起明显病害症状的真菌^[4-5]。研究发现, 内生真菌对病原菌具有显著的抑制作用^[6-10], 是筛选新药的微生物资源。本文从穿龙薯蓣叶片中分离提取内生真菌, 对其分别进行抑制革兰阳性菌和革兰阴性菌的抑菌作用筛选, 获得具有抑菌活性的功能菌株, 并进行真菌分类鉴定。为穿龙薯蓣植物资源的开发利用以及活性内生真菌的发现提供实验依据^[12-13]。

1 材料

1.1 菌种

革兰阳性菌: 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、白色葡萄球菌 *Staphylococcus albus*、柠檬色葡萄球菌 *Staphylococcus citreus*、四联球菌 *Micrococcus tetragenus*; 革兰阴性菌: 大肠杆菌 *Escherichia coli*、伤寒杆菌 *Salmonella typhi*、铜绿色假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、变形杆菌 *Bacterium termo*、肺炎杆菌 *Bacillus endocarditidis capsulatus*、福氏痢疾杆菌 *Shigella flexneri*、乙型副伤寒杆菌 *Bacterium paratyphosum B*, 均由黑龙江中医药大学实验中心分子生物室提供。

1.2 药材及主要试剂

穿龙薯蓣健康植株于2007年6月分别采自帽儿山、青河、长白山、南岔、黑龙江中医药大学药园。经黑龙江中医药大学药学院都晓伟教授鉴定为薯蓣科植物穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino。

分离培养基 (PDA 培养基): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值自然。发酵培养基 (PD 液体培养基): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值自然。

引物 W0508077 ITS1、W0508078 ITS4 (北京三博远志生物技术有限责任公司); 琼脂糖、EB (北京鼎国生物技术有限公司); Tris-饱和酚 (生物级, 哈尔滨市德美生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器

HZQ-F160 型全温震荡培养箱 (哈尔滨东联科技有限公司); BJ-CD 型洁净工作台、SPX-150C 型

恒温恒湿箱 (上海博迅实业有限公司设备厂); Thermal Cycler PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf 公司); Motic BA-400 数码显微图像系统 (麦克奥迪公司)。

2 方法

2.1 内生真菌的分离与纯化

在采集的样本中, 选取新鲜健康无病的穿龙薯蓣完整叶片。用自来水冲洗干净, 自然晾干。按下列程序进行表面消毒: 75%乙醇漂洗 2~3 min, 3.5%次氯酸钠水溶液浸泡 3~4 min, 无菌水冲洗 3 次, 用灭菌滤纸吸干多余水分, 无菌剪刀将叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm 小片。将上述组织片接种于 PDA 培养基中, 每皿 6 块, 28 °C 恒温培养 3~7 d。观察并及时将叶片材料周围长出的菌丝挑取到新鲜的 PDA 培养基上, 反复纯化, 直至得到纯菌株后转接到斜面 PDA 培养基上, 液体石蜡密封, 4 °C 保存。

同时, 将上述经表面灭菌的叶片不剪切直接放置于 PDA 培养基表面, 在相同条件下培养作为对照; 并将上述最后一次冲洗叶片材料的无菌水涂布于 PDA 培养基表面, 在相同条件下培养作为对照, 以检查表面消毒是否彻底。完整叶片对照培养基和无菌水对照培养基均无真菌生长, 证明表面消毒彻底, 所分离得到的真菌为植物内生真菌。

2.2 内生真菌的液体培养及培养液预处理

挑取经活化的内生真菌菌丝接种于 PD 液体培养基中, 于 28 °C、130 r/min 培养 7 d; 3 000 r/min, 离心 10 min, 收集菌丝体和发酵液。菌丝体 40 °C 干燥后磨成粉末, 各取 1 g 菌丝体, 分别用石油醚、95%乙醇、正丁醇、醋酸乙酯超声提取, 每次 20 mL 有机溶剂, 提取 3 次, 合并溶剂, 浓缩至 5 mL 制成菌丝体样品 (主要为皂苷类成分); 发酵液原液直接进行抑菌实验^[11]。

2.3 抑菌实验

采用滤纸片扩散法: 分别吸取发酵液和菌丝提取液 50 μL, 置于已经灭菌的滤纸片上 ($\Phi=8$ mm), 稍风干后, 平放在含有测试病原菌的牛肉膏蛋白胨培养基中, 以空白溶剂做对照, 每个样品重复 5 次。37 °C 培养 16~24 h, 观察细菌生长情况, 测量抑菌圈大小。

2.4 内生真菌的形态鉴定

采用载片培养法、挑片培养法、插片培养法,

对照《真菌鉴定手册》^[14]和《半知菌纲手册》^[15]进行初步鉴定。

2.5 内生真菌的分子鉴定

内生真菌液体发酵3 d, 抽滤收集菌丝体。用无菌水冲洗2遍, 灭菌生理盐水冲洗2遍, 再用无菌水冲洗2遍。无菌滤纸吸干水分, 获得菌丝体。采用SDS法^[16]提取内生真菌基因组DNA, 通用引物对ITS1/ITS4进行PCR扩增: ITS1 (5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3')和ITS4 (5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3')。扩增体系为50 μL反应体系, 其中10×PCR缓冲液0.5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 3 μL、2.5 mmol/L dNTP 0.4 μL、0.5 U/μL Taq酶 0.5 μL, 引物10 mmol/L ITS 2 μL、引物10 mmol/L ITS 42 μL。PCR反应程序: 预变性94℃、5 min, 变性94℃、30 s, 复性55℃、30 s, 延伸72℃、1 min, 20个循环, 后延伸72℃、10 min。反应结束后取5 μL PCR产物, 通过1%琼脂糖凝胶电泳检测。PCR反应产物纯化后送上海英骏生物技术公司北京测序部进行测序。

根据测序结果, 在GenBank数据库中进行BLAST比对, 搜索相关种属的ITS序列。应用Clustal X1.83软件进行多序列比对, 将计算结果导入PHYLIP软件, 构建系统进化树。

3 结果与分析

3.1 穿龙薯蓣内生真菌多样性

从不同产地的穿龙薯蓣叶片中共分离得到52株内生真菌, 其中6株分离于黑龙江中医药大学药园(占总分离菌株的11.54%)、6株分离于清河栽培基地(占总分离菌株的11.53%)、10株分离于帽儿山(占总分离菌株的19.23%)、12株分离于南岔(占总分离菌株的23.08%)、18株分离于长白山(占总分离菌株的34.62%)。由此可见, 穿龙薯蓣中存在着丰富的内生真菌资源, 且野生植株中分离出的内生真菌数量多于栽培植株。

根据形态学特征将10株产孢子的内生真菌初步鉴定为2个目、3个科、9个属, 见表1; 10株产孢子的内生真菌种类和菌落形态见表2、图1, 表明穿龙薯蓣内生真菌种群在组成上具有多样性。

表1 穿龙薯蓣产孢子的内生真菌种群组成

Table 1 Composition of spore producing endophytic fungi isolated from *Dioscorea nipponica* Makino

目	科	属
球壳孢目 <i>Sphaeropsidales</i>	球壳孢科 <i>Sphaerioidaceae</i>	刺茎点菌属 <i>Chaetophoma</i>
丛梗孢目 <i>Moniliales</i>	暗色孢科 <i>Dematiaceae</i>	林柄霉属 <i>Paathramaya</i>
		刺葡萄孢霉属 <i>Echinobotryum</i>
		束梗孢霉属 <i>Meria</i>
	丛梗孢科 <i>Moniliaceae</i>	筒梗孢霉属 <i>Chromosporium</i>
		链格孢属 <i>Alternaria</i>
		赤霉属 <i>Gibberella</i>
		单梗双孢霉属 <i>Didymaria</i>
		枝顶孢霉属 <i>Acremonium</i>

表2 穿龙薯蓣分离的10株产孢子的内生真菌种类和菌落形态

Table 2 Species and colony morphologies of 10 endophytic fungi of *Dioscorea nipponica* Makino

编号	真菌 种属	菌落形态				植物来源
		正面菌落	背面菌落	菌丝性状	菌落边缘	
C1	刺茎点菌属	白色	蜡黄色	平伏、致密	整齐	卵圆形, 生于分生孢子器内
C7	单梗双孢霉属	白色	墨绿色	绒状、浓密	整齐	拟卵圆形、长圆形
C28	林柄霉属	白色	白色	棉絮状	整齐	圆形, 着生在菌丝上
C32	刺葡萄孢霉属	白色	白色	短绒毛状、致密	整齐	圆形, 聚成葡萄串状
C27	束梗孢霉属	白色	深绿色	绒状、致密、呈放射状	整齐	卵圆形、球形, 单生
C35	筒梗孢霉属	白色	粉红色	绒状、致密	整齐	卵圆形、球形、光滑散生
C50	链格孢属	白色	灰色	绒状、致密	整齐	卵圆形, 无色, 顶生
C37	赤霉属	粉红色	紫红色	绒状、致密, 渗出物	整齐	卵圆形、球形、光滑散生
C30	链格孢属	灰色	黄褐色	绒状、致密	整齐	倒棍棒型、卵圆形纵横隔膜
C36	枝顶孢霉属	灰绿色	土黄色	绒状、致密	整齐	球形或椭圆形

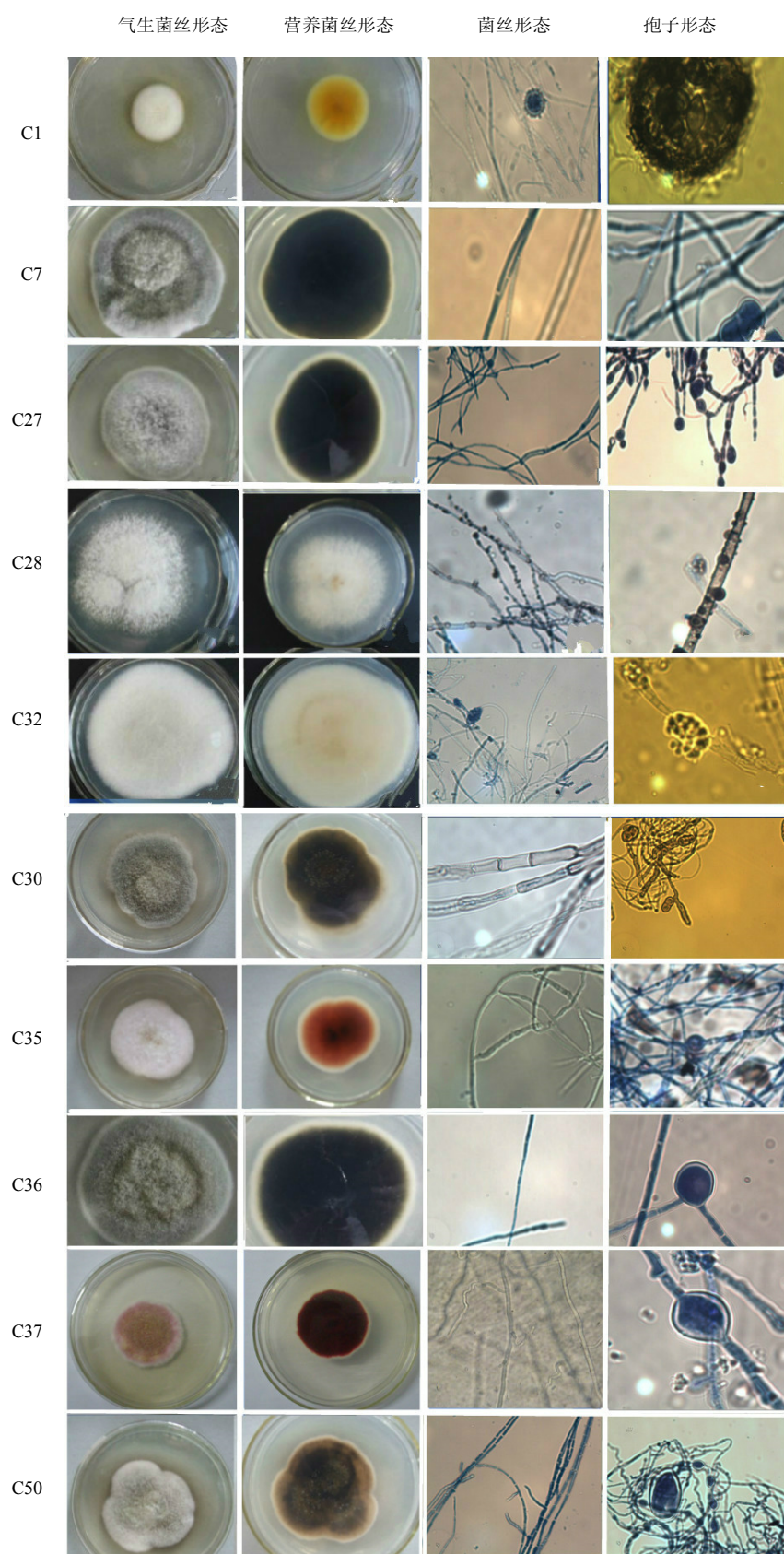


图2 穿龙薯蓣分离的10株产孢子的内生真菌形态图

Fig. 2 Morphology of endophytic fungal isolated from *Dioscorea nipponica*

3.2 穿龙薯蓣内生真菌的抑菌活性

对上述 52 株内生真菌发酵液和菌丝体不同溶剂提取液分别进行抗菌活性筛选, 结果见表 3。其中有 3 株真菌的不同溶剂提取物对多种供试菌株有抑菌活性。C37 菌的 95%乙醇提取物、正丁醇提取物、醋酸乙酯提取物、石油醚提取物对乙型副伤寒杆菌、柠檬色葡萄球菌均有抑制作用, 其醋酸乙酯

提取物和正丁醇提取物可分别抑制白色葡萄球菌和福氏痢疾杆菌; C30 菌的 95%乙醇提取物具有抑制柠檬色葡萄球菌作用, 其正丁醇提取物可抗大肠杆菌和四联杆菌; C50 菌的 95%乙醇提取物能够抑制乙型副伤寒杆菌, 其正丁醇提取物可抑制柠檬色葡萄球菌和白色葡萄球菌。3 株内生真菌表现出了广谱的抑菌活性, 有必要对其进行进一步的鉴定。

表 3 三种抑菌菌株不同溶剂提取物的抑菌活性

Table 3 Antimicrobial activity of cultures from endophytic fungi of *Dioscorea nipponica* Makino

菌株 编号	所属类群	提取溶剂	抑菌圈/mm					
			乙型副伤寒杆菌	柠檬色葡萄球菌	白色葡萄球菌	福氏痢疾杆菌	大肠杆菌	四联球菌
C37	赤霉属	95%乙醇	4.07±0.33	5.47±0.81	—	—	—	—
		正丁醇	3.03±0.20	4.14±1.83	—	3.70±0.59	—	—
		醋酸乙酯	4.73±0.46	2.93±1.22	4.73±0.64	—	—	—
		石油醚	7.73±0.58	5.06±0.12	—	—	—	—
C30	链格孢属	95%乙醇	—	3.49±0.70	—	—	—	—
		正丁醇	—	—	—	—	6.35±0.52	6.60±0.72
C50	链格孢属	95%乙醇	4.10±0.30	—	—	—	—	—
		正丁醇	—	4.10±0.10	3.40±0.69	—	—	—

3.3 抗菌活性菌株 C37、C30、C50 的鉴定

利用 ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 经 PCR 分别从内生真菌 C37、C30、C50 的基因组 DNA 中扩增出长度约为 700 bp 的单一 DNA 条带, 利用 GenBank 进行 BLAST 检索, 结果表明, C30、C50 穿龙薯蓣内生真菌 ITS 序列与 GenBank 中链格孢属真菌序列相似度均为 100% (Blast 结果), 因此将菌株 C30、C50 归入链格孢属 (*Alternaria*); C37 穿龙薯蓣内生真菌 ITS 序列与 GenBank 中赤霉属真菌序列相似度均为 100% (Blast 结果), 将 C37 归入赤霉属 (*Gibberella*) 真菌。

4 讨论

本文首次从穿龙薯蓣的叶片中分离出 52 株菌落形态不同的内生真菌, 从内生真菌的数量上, 反映出穿龙薯蓣植物组织中内生真菌的丰富程度, 且野生植株中提取的内生真菌数多于栽培植株。共筛选出 3 株具有广谱抗菌活性的内生真菌, 对大肠杆菌、乙型副伤寒杆菌、柠檬色葡萄球菌等多种病原菌具有抑制作用, 可作为生产抗菌活性物质的备选菌种。在传统形态分类的基础上, 所分离得到的产孢内生真菌分布于 2 个目, 3 个科, 9 个属。抑菌活性菌株分布于链格孢属和赤霉属。这说明来源于不同生长环境的植株, 分离到的内生真菌种类存在差

异, 这对内生真菌的功能研究具有重要的参考价值。由于微生物发酵易培养, 生长快, 节省能源, 还可以通过分子生物、基因工程等手段改良菌种, 从而更多的提高有效成分产量。因此植物内生真菌是筛选抗菌活性成分的重要资源, 具有较高的开发应用潜力。

参考文献

- [1] 张数鑫, 周录英, 于元杰. 穿龙薯蓣研究进展 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 107-111.
- [2] 丁小林, 李 卿. 中药穿山龙的研究进展 [J]. 重庆中草药研究, 2003, (2): 55-57.
- [3] 张 宁, 于栋华, 周 琦, 等. 穿山龙药理作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2015, (4): 547-549.
- [4] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves [J]. In: Andrews J H, Hirano S S eds. Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer-Verlag. 1991, 179-197.
- [5] Bacon C W, White J F. Microbial Endophytes [M]. New York: Marce Deker Inc, 2000.
- [6] Kaminski M M, Ohnemus A, Staeheli P, et al. Pandemic 2009 H1N1 influenza a virus carrying a Q136K mutation in the neuraminidase gene is resistant to zanamivir but exhibits reduced fitness in the guinea pig transmission model [J]. J Virol, 2013, 87(3): 1912-1915.
- [7] Bottini A, De S K, Baaten B J, et al. Identification of

- small molecules that interfere with H1N1 influenza a viral replication [J]. *Chem Med Chem*, 2012, 7(12): 2227-2235.
- [8] Tsung J W, Kessler D O, Shah V P. Prospective application of clinician-performed lung ultrasonography during the 2009H1N1 influenza a pandemic: distinguishing viral from bacterial pneumonia [J]. *Crit Ultrasound J*, 2012, 4(1): 16.
- [9] Strobel G A, Miller R V, Miller C, et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 1919-1926.
- [10] 张维瑞, 郭秀春, 李 钦, 等. 杜仲叶和果实中内生真菌的分离及抑菌活性 [J]. *中草药*, 2016, 47(16): 1921-1926.
- [11] 刘 果, 马养民, 张弘弛. 三尖杉内生真菌分离鉴定及其抗菌活性研究 [J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(3): 165-170.
- [12] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 491-502.
- [13] 王艳红, 朱艳萍, 杨信东, 等. 温郁金抗炎抗氧化活性内生真菌的筛选 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(9): 90-94.
- [14] 巴尼特 H L, 亨特 B B 著. 沈崇尧 译. 半知菌图解 [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [15] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 北京: 上海科学技术出版社, 1979.
- [16] 程 度, 黄翔宇, 李宝健. 药用真菌高质量总 DNA 的制备及基因组文库的构建 [J]. *菌物系统*, 2002, 21(1): 137-139.