

- 植物学报, 1997, 17(1): 49-55.
- [9] 李 昂, 葛 颂. 植物保护遗传学研究进展 [J]. 生物多样性, 2002, 10(1): 61-71.
- [10] 肖 猛. 濒危植物桃儿七的遗传多样性研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [11] 马绍宾, 胡志浩. 桃儿七分布格局与生态适应的初步研究 [J]. 武汉植物学研究, 1996, 14(1): 47-54.
- [12] 田 英, 郭 帅, 彭 励, 等. 宁夏六盘山濒危植物桃儿七的生存现状及保护对策研究 [J]. 农业科学研究, 2006, 27(2): 82-85.

见血封喉内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究

戴文君¹, 张秀环¹, 黄贵修², 戴好富¹, 梅文莉^{1*}

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南 海口 571101; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:目的 分离和鉴定见血封喉 *Antiaris toxicaria* 根韧皮部中的内生真菌, 并检测其抑菌活性。方法 以金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 和白色念珠菌 *Candida albicans* 作为指示菌, 采用杯碟法对内生真菌发酵上清液进行抑菌试验。结果 从见血封喉根的韧皮部中分离出 6 株内生真菌, 经形态鉴定分属于聚端孢霉属 (*Trichothecium* L K ex Fr.)、枝顶孢霉属 (*Acremonium* L K ex Fr.) 和丝核菌属 (*Rhizoctonia* DC ex Fr.)。其中内生真菌 J6 的发酵上清液对 MRSA 有抑菌活性, 抑菌圈直径为 18 mm。结论 首次对见血封喉内生真菌进行了研究, 内生真菌 J6 对 MRSA 有明显的抑菌活性, 其抑菌活性成分值得进一步研究。

关键词: 见血封喉; 内生真菌; 抑菌活性

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)06-0955-03

Isolation, identification, and antimicrobial activity of endophytic fungi from *Antiaris toxicaria*

DAI Wen-jun¹, ZHANG Xiu-huan¹, HUANG Gui-xiu², DAI Hao-fu¹, MEI Wen-li¹

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract : Objective To isolate and identify endophytic fungi from the phloem in the root of *Antiaris toxicaria* and detect the antimicrobial activity of these strains. **Methods** *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and *Candida albicans* were selected as indicators. The antimicrobial activities of the fermentation filtrate of endophytic fungi were tested by cylinder plate method. **Results** Six endophytic fungi were isolated from the phloem in the root of *A. toxicaria*. These strains were morphologically identified to genus of *Trichothecium* L K ex Fr., *Acremonium* L K ex Fr. and *Rhizoctonia* DC ex Fr. The fermentation filtrate of endophytic fungus J6 showed the antimicrobial activity against MRSA. The diameter of inhibition zone was 18 mm. **Conclusion** It is the first report about the endophytic fungi from *A. toxicaria*. Endophytic fungus J6 exhibits strong antimicrobial activity against MRSA, its active components are of worth to further study.

Key words : *Antiaris toxicaria* (Pers.) Lesch.; endophytic fungi; antimicrobial activity

植物内生真菌是指生长于植物的根、茎、叶等组织和器官内的一类真菌, 是植物微生态系统中的重

要组成成分, 在进化过程中与植物宿主建立了和谐的共生关系, 其次代谢产物十分丰富, 是新化合

* 收稿日期: 2008-09-18

基金项目: 973 计划前期研究专项 (2007CB116306); 海南省自然科学基金资助项目 (30608); 海南省自然科学基金指导性项目 (80671)

作者简介: 戴文君 (1984—), 女, 湖北武汉人, 硕士研究生, 现主要从事微生物学研究。

Tel.: (0898) 66968572 E-mail: daishu19842003@yahoo.com.cn

*通讯作者 梅文莉 Tel.: (0898) 66988061 E-mail: meiwenli@yahoo.com.cn

物、新药源的潜在资源^[1]。Strobel 等^[2]认为,那些生长于独特生态环境的植物、有着民族药用历史的植物、树龄较长或者当地特有的植物往往具有特殊的内生真菌,这些内生真菌的次生代谢产物往往很特别,可用于新药开发。近年来,我国药用植物内生真菌及其活性成分的研究成为了药物开发的热点^[3,4]。见血封喉 *Antiaris toxicaria* (Pers.) Lessch. 为桑科见血封喉属植物,别名箭毒木、剪刀树、加布,在我国已被列为三级濒危珍稀植物。见血封喉属植物有 4 个种 3 个变种,主要分布于东南亚。我国仅产 1 种,即见血封喉,分布于海南、广东、广西等地。其鲜树汁乳白色,有剧毒,入药用于催吐、泄泻、强心,还可用作麻醉剂;种子也有毒,入药解热止泻,用于治疗痢疾^[5,6]。目前,对见血封喉内生真菌的研究国内外尚未见报道。本课题组对见血封喉内生真菌进行了分离鉴定及其抑菌活性研究,旨在为进一步研究抑菌活性菌株的活性成分奠定基础。

1 材料

1.1 供试材料:内生真菌分离自见血封喉健康地上部分的板状根韧皮部。植物材料于 2007 年 3 月来自中国热带农业科学院热带植物园,由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所王祝年研究员鉴定,植物标本和菌株保存在中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

1.2 培养基:PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,定容至 1 L,pH 值自然,121 灭菌 20 min,第一次分离时在培养基中加链霉素(50 U/mL)抑制细菌生长。

马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,定容至 1 L,pH 值自然,121 灭菌 20 min。

NA 培养基(牛肉膏蛋白胨琼脂):牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,定容至 1 L,pH 7.4~7.6,121 灭菌 30 min;

YPD 培养基(酵母粉胨葡萄糖琼脂):葡萄糖 20 g,胰蛋白胨 20 g,酵母粉 10 g,定容至 1 L,pH 7.0,121 灭菌 30 min。

1.3 指示菌:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) ATCC 9551 由英国 Heriot Watt 大学 Grant J Burgess 博士提供;金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC 51650 和白色念珠菌 *Candida albicans* ATCC 10231 均购于海南省药品检验所。

1.4 仪器:SW-40 洁净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);HVE-50 灭菌锅(今日仪器

股份有限公司);ZD-8802D 摇床(太仓市华利达实验设备有限公司);HHB 11360-S 普通培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

2 方法

2.1 内生真菌的分离与纯化^[7]:将刚采集的新鲜见血封喉的板状根韧皮部用自来水洗净泥土及灰尘,沥干水分。再将材料放进经过紫外线消毒的超净工作台内,切割成 1.0 cm × 2.0 cm 小段,按常规无菌操作进行表面消毒处理:75%乙醇浸泡 3 min 无菌水冲洗 3 遍 0.1%升汞浸泡 8 min 无菌水冲洗 3 遍。

将上述处理过的材料经滤纸吸干水分后,在无菌条件下切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,放置于新鲜的 PDA 平板培养基上,每个平板放置 4 块,28 恒温培养 3~7 d。待切口边缘长出真菌菌丝,及时转接至新鲜 PDA 培养基上培养,采用菌丝顶端纯化法逐步纯化。同时,以消毒后不做切割的材料作为空白对照,同样条件下观察是否有菌长出,结果对照材料周围无任何菌长出,证明表面消毒彻底。

2.2 内生真菌的鉴定:采用真菌学插片培养方法,对分离获得的见血封喉内生真菌进行显微形态特征(菌丝、孢子形态等)的观察、分类鉴定。分类检索参照文献报道^[8]。

2.3 内生真菌的发酵上清液制备:将分离得到的菌株,切取黄豆粒大小的菌丝块,接种于 PDB 培养基中。1 L 三角瓶装 400 mL 培养液,室温,164 r/min 振荡培养 7 d,同时以纯培养基作空白对照。无菌条件下取发酵液 15 mL 于离心管中,12 000 r/min 离心 30 min 后取上清液,用 0.2 μm 微孔滤膜滤过除菌,-20 保存备用。

2.4 抑菌活性测定:采用杯碟法测定样品抑菌活性。金黄色葡萄球菌和 MRSA 采用 NA 培养基,白色念珠菌采用 YPD 培养基。将金黄色葡萄球菌、MRSA 和白色念珠菌分别制成一定浓度的菌悬液($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ cfu/mL),用棉签将其均匀涂布在供试无菌培养皿中,制成含菌平板,然后在每个平板放入 3 个牛津杯,分别取样品 200 μL 加入其内,同时以发酵纯培养基作阴性对照。金黄色葡萄球菌和 MRSA 在 37 下恒温培养,白色念珠菌在 28 下恒温培养。24 h 后观察结果,测量并记录抑菌圈直径。每个样品做 3 个重复,以抑菌圈直径的平均值为试验结果。

3 结果与分析

3.1 内生真菌的分离结果:本实验共分离获得 6 株

内生真菌(J1~J6),经显微形态观察,初步鉴定分别为聚端孢霉属、枝顶孢霉属和丝核菌属(表 1),其显微形态特征见图 1。

表 1 见血封喉根韧皮部内生真菌的种群组成

Table 1 Distribution of endophytic fungi isolated from phloem in root of *A. toxicaria*

纲	目	科	属	菌株数目	编号
半知菌类	从梗孢目	从梗孢科	聚端孢霉属	3	J3, J4, J6
			枝顶孢霉属	2	J1, J2
			丝核菌属	1	J5
无孢菌群					

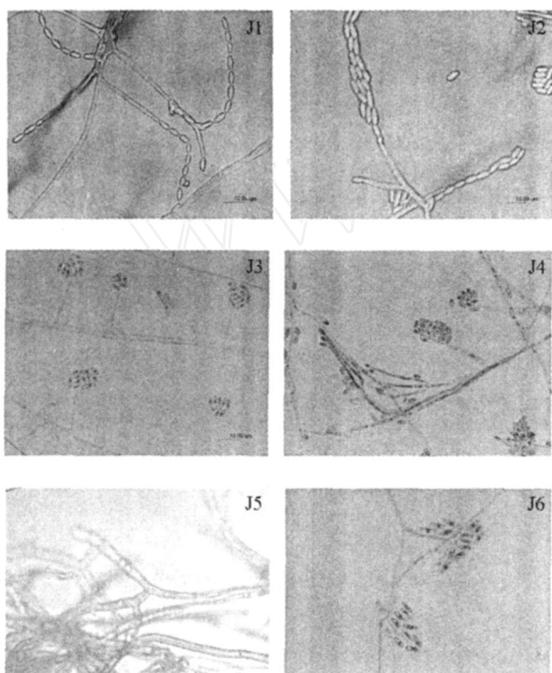


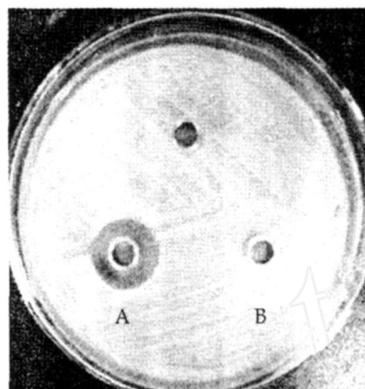
图 1 见血封喉内生真菌显微形态特征

Fig 1 Microscopical morphological characters of endophytic fungi from *A. toxicaria*

3.2 内生真菌的抑菌活性:采用杯碟法对所分离到的见血封喉内生真菌的发酵上清液进行了 3 种人体病原菌的抑菌活性试验,结果表明内生真菌 J6 的发酵上清液对 MRSA 有明显的抑制作用,抑菌圈直径为 18 mm(图 2)。

4 讨论

本实验首次从见血封喉的板状根韧皮部分离获得 6 株内生真菌,经初步鉴定,分别为聚端孢霉属、枝顶孢霉属和丝核菌属,此次分离获得的内生真菌种类和数量均较少。已有报道指出内生真菌之间存在占位效应,一种优势种进入植物内部,建立共生关系,往往影响其他菌的进入^[9]。本实验在分离见血封喉内生真菌时,曾发现消毒完全的组织块周围有大量的酵母菌长出,由此推测,酵母菌大量存在于



A-J6 的发酵上清液 B-阴性对照

A-fermentation filtrate of J6 B-negative control

图 2 J6 对 MRSA 的抑制作用

Fig 2 Inhibition of J6 on MRSA

宿主体内,可能是见血封喉内生真菌种类较少的原因之一。由于本试验主要针对丝状真菌,则未对其进行分离。

抑菌活性试验结果表明内生真菌 J6 的发酵上清液对 MRSA 有明显的抑制作用。J6 为聚端孢霉属真菌,有报道^[10]显示该属中有的种作为菌寄生真菌,能有效地抑制病原菌的扩展和危害,甚至杀死病原菌。目前,本课题组正在对内生真菌 J6 的抑菌活性成分进行研究。

致谢:本研究在内生真菌的分类鉴定方面得到了中国医学科学院药用植物研究所邢晓科副研究员的大力支持和帮助!

参考文献:

- [1] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生真菌研究进展 [J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.
- [2] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 491-502.
- [3] 秦盛,邢珂,吴少华,等. 3 种仙人掌植物内生真菌抑菌活性的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 917-921.
- [4] 曾松荣,徐倩雯,叶保童,等. 虎杖内生真菌的分离及产抗菌活性物质的筛选 [J]. 菌物研究, 2005, 3(2): 24-26.
- [5] 戴好富,梅文莉. 海南药用植物现代研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [6] 梅文莉,干玉娟,戴好富. 见血封喉化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 151-154.
- [7] 方中达. 植物研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [9] 戴传超,余伯阳,赵玉婷,等. 大戟科 4 种植物内生真菌分离与抑菌研究 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2006, 30(1): 79-83.
- [10] 张世宏,李多川,魏毅,等. 粉红聚端孢菌胞外几丁质酶纯化、特性及抗菌活性 [J]. 植物病原学报, 2002, 32(3): 262-266.