

泰山黄精内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究

李艳玲*, 王德才, 史仁玖, 苗增民, 廉立慧

泰山医学院生物科学学院, 山东 泰安 271016

摘要: 目的 研究泰山黄精内生真菌的分布及其多样性, 并筛选具有抑菌活性的内生真菌。方法 采用平板分离法分离黄精内生真菌, 采用滤纸片扩散法测试黄精内生真菌培养物抗耐药菌活性, 同时采用分子生物学方法对筛选出的活性菌株进行鉴定。结果 从泰山野生黄精的根、茎、叶和果实中共分离出 32 株内生真菌, 分属于 7 个属, 分布最广的类群是镰刀菌属 *Fusarium* sp., 占总菌株的 31.3%, 其次是不产孢真菌 *Sterile mycelia* (28.1%) 和链格孢属 *Alternaria* sp. (21.9%)。各组织中内生真菌的分布存在一定的组织差异性, 根中内生真菌的分离率最高, 茎和叶中次之, 果实中最少。共有来自 5 个属的 14 株内生真菌至少对 1 种供试菌株有抗菌活性, 其中 8 株具有广谱抗耐药菌活性。对活性最强、抑菌谱最广的不产孢菌株 HJG-10 进行分子生物学鉴定, 将其确定为裂褶菌 *Schizophyllum commune*。结论 泰山黄精中蕴含着大量具有抑菌活性的内生真菌, 为寻找和开发新型抑菌生物制剂开辟了一条新途径。

关键词: 泰山黄精; 内生真菌; 分离; 鉴定; 抑菌活性

中图分类号: R282.15 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)11-1490-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.025

Isolation and identification of endophytic fungi from *Polygonatum sibiricum* in Mountain Tai and study on their antimicrobial activity

LI Yan-ling, WANG De-cai, SHI Ren-jiu, MIAO Zeng-min, LIAN Li-hui

Department of Biological Sciences, Taishan Medical College, Taian 271016, China

Abstract: Objective To study the diversity of endophytic fungi from *Polygonatum sibiricum* growing in Mountain Tai and screen the endophytic fungi with antimicrobial activity. **Methods** Endophytic fungi were isolated with the conventional method and their antimicrobial activities against tested microorganisms were investigated by using the paper disc method. The endophytic fungi with higher antimicrobial activity were identified based on ITS sequence analysis. **Results** A total of 32 endophytic fungi strains were isolated from the roots, stems, leaves, and fruits of *P. sibiricum* belonging to seven genera. The most widely distributed genera is *Fusarium* sp. (31.3%), followed by *Sterile mycelia* (28.1%) and *Alternaria* sp. (21.9%). Some endophytic fungi showed a certain degree of tissue preference. More species and strains were isolated from the roots, followed by those in the stems and leaves but those in the fruits were the least. Fourteen strains from five genera with the antimicrobial activity were obtained, among which eight strains showed broad-spectrum antimicrobial activity. The strain HJG-10 with the highest antimicrobial activity was determined to be *Schizophyllum commune*, according to its molecular analysis. **Conclusion** The research not only provides the theoretical basis for developing and utilizing the resources of endophytic fungi in *P. sibiricum* in Mountain Tai but also shows a new path for searching novel antimicrobial resource.

Key words: *Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute; endophytic fungi; isolation; identification; antimicrobial activity

泰山黄精 *Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute, 又名鸡头精, 属百合科多年生草本植物, 是泰山四大名药之一^[1]。黄精富含多糖、甾体皂苷、黄酮、生物碱、萜醌类化合物、木脂素及多种氨基酸等有效化学成分^[2]。药理研究发现, 黄精具有抗衰老、降血糖、调血脂、提高和改善记忆、抗肿瘤、

调节免疫、抗病毒、抗炎等作用^[3], 具有很好的开发与应用价值。由于黄精市场需求量高, 长期以来被人类过度采挖, 自然繁殖率低, 使得黄精的野生资源越来越匮乏。

植物内生真菌是一类在其生活史中的某阶段或全部阶段生活在植物组织内、并不引起明显病害症

收稿日期: 2012-08-31

*通信作者 李艳玲 (1977—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事药用植物内生真菌研究工作。E-mail: lingl816@163.com

网络出版时间: 2013-04-22 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130422.0919.006.html>

状的真菌^[4]。研究发现,内生真菌在进化过程中与植物宿主建立了和谐的共生关系,其次生代谢产物十分丰富,是新化合物、新药源的潜在资源^[5-6]。目前,对泰山黄精内生真菌的研究国内外尚未见报道。本课题组对泰山黄精内生真菌进行了分离鉴定及其抑菌活性研究,旨在筛选出能产生新型抗菌物质的内生真菌,为黄精的资源保护及综合开发利用奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

供试泰山黄精 *Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute 健康植株于2007年6月采自山东省泰山自然保护区海拔800 m处,经泰山医学院药学院苏延友教授鉴定。

大肠埃希菌 *Escherichia coli* ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853、大肠埃希菌(20010413)、金黄色葡萄球菌(20010419)、铜绿假单胞菌(20010538),以上供试菌种均由本实验室保存。

分离培养基(PDA培养基):马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂15 g,蒸馏水1 000 mL,使用时在每100 mL PDA培养基中加8 000单位青霉素以抑制细菌生长。促孢培养基(PA培养基):马铃薯200 g,琼脂15 g,蒸馏水1 000 mL。发酵培养基(PDA液体培养基):马铃薯200 g,葡萄糖20 g,蒸馏水1 000 mL。

1.2 仪器和试剂

QYC—211 摇床(上海福玛试验设备有限公司);SW—CJ—2F 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);GNP—9050 型隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);E—50I 显微图象分析仪(Nikon);Icycler PCR 仪(美国伯乐);通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')由上海生工生物工程技术有限公司合成;聚乙烯基吡咯烷酮(PVP,上海胜普化工有限公司);十二烷基硫酸钠(SDS,北京拜尔迪生物技术公司)。

2 方法

2.1 内生真菌的分离与纯化

采取新鲜健康无病症的黄精完整植株,用自来水冲洗干净,置于滤纸上自然风干,去腐叶。分别将黄精的根、茎、叶等切成约0.5 cm的小段,取完

整的一个果实,置于干净的培养皿中。按下列程序进行表面消毒^[7]:75%乙醇漂(浸)洗2~3 min,无菌水冲洗4~6次,0.1%升汞消毒3~5 min,无菌水冲洗4~6次,用灭菌滤纸吸干多余水分,无菌刀片将材料切成0.2 cm×0.2 cm的小块段(片)。将上述组织块分别置于加青霉素的PDA培养基中,每皿3块,25℃恒温培养,同时将上述经表面灭菌的材料不做任何处理直接种植于PDA培养基中,25℃培养,检查表面消毒是否彻底。培养3~10 d后及时采用尖端菌丝挑取法,挑取形态不同的菌丝或菌落移种到新鲜PDA培养基上进行纯化,纯化后转接到斜面上保存备用。

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或孢子接种于PDA液体培养基中,于25℃、120 r/min培养7 d;5 000 r/min离心20 min,收集菌丝体和发酵液。菌丝体先经超声破碎,再经95%乙醇浸提24 h后减压浓缩成醇浸膏,用适量无菌水45℃温浸,充分混匀制成菌体醇提物样品,发酵液未经浓缩直接进行抑菌实验。

2.3 抑菌实验

采用滤纸片扩散法:将指示细菌菌液(约 1×10^8 cfu/mL)涂布于LB平板,在适当位置贴上已灭菌的滤纸片($\Phi=6$ mm),然后分别吸取发酵液和菌丝醇提液20 μ L置于滤纸片上,无菌水做对照(CK),每个样品重复3次。37℃培养16~24 h,观察细菌生长情况以及抑菌圈大小。

2.4 内生真菌的形态鉴定

产孢的菌株采用插片培养方法,对照《真菌鉴定手册》^[8]进行初步鉴定。部分不产孢的内生真菌按照文献方法^[9]进行促产孢培养:将未产孢菌株接种于PDA培养基中,25℃培养7 d,取5 mm菌饼,转接到PA培养基中,25℃间歇光照培养:12 h光照培养与12 h暗培养交替进行,培养10~15 d后,用接种针在菌落边缘挑取菌丝体少许,置于乳酸苯酚液中,加盖片观察。

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。菌丝体先用无菌水冲洗2遍,再用0.4 mol/L KCl洗涤2遍,最后用无菌水冲洗3遍。将洗涤后的菌丝体用滤纸(下铺硅胶粉)吸干水分,置于-70℃,备用。然后采用改进SDS法^[10]提取内生真菌基因组DNA。采用在真菌遗传研究中被广泛应用的通用引物对

ITS1/ITS4 进行 PCR 扩增: ITS1 (5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCG G-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAT-TGATATGC-3')。扩增体系为 50 μ L 反应体系, 其中 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, 5 U/ μ L TaqDNA 酶 0.5 μ L, 正反向引物 (10 mmol/L ITS1 和 ITS4) 各 2 μ L, DNA 模板 4 μ L, ddH₂O 28.5 μ L。PCR 反应程序: 预变性 94 $^{\circ}$ C, 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C, 1 min, 复性 55 $^{\circ}$ C, 1 min, 延伸 72 $^{\circ}$ C, 1.5 min, 34 个循环, 后延伸 72 $^{\circ}$ C, 10 min。反应结束后取 5 μ L PCR 产物, 通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 反应产物纯化后送上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

根据测序结果, 在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 搜索同源序列。尽量选取有代表性菌株序列作进一步的分析。首先采用 Clustal X 1.81 将序列对齐, 利用 MEGA 3.0 软件进行系统发育分析, 并以自展法 (bootstrap) 进行检测, 共循环 1 000

次, 构建邻接树。

3 结果与分析

3.1 黄精内生真菌的多样性

从野生黄精的根、茎、叶和果实中共分离得到 32 株内生真菌, 其中从根中分离出 15 株, 茎中 9 株, 叶中 5 株, 果实中 3 株。根、茎、叶和果实分离率分别为 46.9%、28.1%、15.6%、9.4%。

根据形态学特征将分离纯化的 32 株内生真菌进行初步鉴定。由表 1 可知, 在分离所得的 32 株菌中有 28.1% 在 PDA 培养基上为不产孢真菌 *Sterile mycelia*, 其他产孢真菌分别为镰刀菌属 *Fusarium* (10 株)、链格孢属 *Alternaria* (7 株)、曲霉属 *Aspergillus* (2 株)、赤霉菌 *Gibberella* (2 株)、炭疽菌属 *Colletotrichum* (1 株) 和青霉属 *Penicillium* (1 株), 其中镰刀菌属为黄精的优势菌, 占分离总菌株的 31.3%; 其次是链格孢属 (21.9%)。

表 1 黄精不同组织中内生真菌的种类和数量

Table 1 Species and amounts of endophytic fungi in different tissues of *P. sibiricum*

编号	真菌种属	植物各组织的菌株数				总数	相对频率 / %
		根	茎	叶	果实		
1	不产孢真菌	4	3	2		9	28.1
2	镰刀菌属	5	2	1	2	10	31.3
3	链格孢属	4	2	1		7	21.9
4	炭疽菌属	1				1	3.1
5	曲霉属			1	1	2	6.3
6	青霉属	1				1	3.1
7	赤霉菌属		2			2	6.3

3.2 黄精内生真菌的抑菌活性

对上述 32 株内生真菌发酵液和菌丝体醇提液分别进行抗菌活性筛选, 结果见表 2。共有 14 株真菌对至少 1 种供试菌株有抗菌活性, 占分离菌株总数的 43.8%。抗大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌耐药菌株的活性菌株分别有 10、10、5 株, 占有活性菌株的 31.3%、31.3%、15.6%; 在活性菌株中, HJG-5、HJG-7、HJG-9、HJG-10、HJG-12、HJG-13、HJJ-6 和 HJY-2 8 株具有广谱的抗菌活性, 占活性菌株的 25%, 其中 4 株为链格孢, 4 株为镰刀菌, 2 株为曲霉, 1 株为青霉, 其他 3 株为不产孢真菌。不产孢菌株 HJG-10 菌丝醇提液的抗菌活性明显高于其他菌株, 而且抑菌谱广, 对 3 种耐药菌均有较好的抑制作用, 抑菌圈分别为

18、18、17 mm, 见表 2。因此, 有必要对菌株 HJG-10 进行进一步鉴定。

3.3 抗菌活性菌株 HJG-10 的鉴定

HJG-10 在 PDA 平板上的菌落为白色、绒毛状。经过诱孢处理后, 仍未有孢子产生。利用 ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 经 PCR 从内生真菌 HJG-10 基因组 DNA 中扩增出长度为 602 bp 的单一 DNA 条带, 提交至 GenBank 获得序列号为 JQ409161, 并进行 BLAST 检索, 筛选与 HJG-10 同源性高于 97% 的菌株用于系统发育分析。基于邻接法构建系统进化树 (图 1), 结果表明, HJG-10 与裂褶菌 1-56 (JF502460.1) 和裂褶菌 MJ03 (HQ327997.1) 被分在同一个分支中, 其 ITS 序列的相似性达到 99%。因此, 将 HJG-10 鉴定为裂褶菌。

表 2 黄精内生真菌培养物的抑菌活性

Table 2 Antimicrobial activity of cultures from endophytic fungi of *P. sibiricum*

菌株编号	所属类群	抑菌样品	抑菌圈 / mm					
			大肠杆菌		金黄色葡萄球菌		铜绿假单胞菌	
			标准株	耐药株	标准株	耐药株	标准株	耐药株
HJG—1	链格孢属	发酵液	11	10	10	—	10	—
		菌丝醇提液	11	13	11	—	11	—
HJG—2	链格孢属	发酵液	10	12	10	—	—	—
		菌丝醇提液	9	—	9	—	—	—
HJG—5	镰刀菌属	发酵液	9	—	10	9.5	—	—
		菌丝醇提液	10	10	9.5	11	11.5	—
HJG—7	镰刀菌属	发酵液	9	—	10	—	—	—
		菌丝醇提液	10	—	—	—	—	—
HJG—9	不产孢真菌	发酵液	11	11	12	12	9	11.5
		菌丝醇提液	10	—	—	—	—	—
HJG—10	不产孢真菌	发酵液	—	—	11	11.5	—	—
		菌丝醇提液	12.5	18	15	18	20	17
HJG—12	不产孢真菌	发酵液	—	—	11	—	—	—
		菌丝醇提液	11.6	13	12	10	—	—
HJG—13	青霉属	发酵液	9	—	9	—	—	—
		菌丝醇提液	10	9	10	11	—	—
HJJ—3	链格孢属	发酵液	10	—	—	—	—	—
		菌丝醇提液	15	—	13	8	12	15
HJJ—6	镰刀菌属	发酵液	12	10	11	—	10	12
		菌丝醇提液	10	9	11	11	11	13
HJJ—8	镰刀菌属	发酵液	—	—	—	—	—	—
		菌丝醇提液	11	9	12	—	—	—
HJY—2	曲霉属	发酵液	10	—	12	12	—	—
		菌丝醇提液	13	14	11	10	10	—
HJY—3	链格孢属	发酵液	—	—	—	—	9	—
		菌丝醇提液	9	—	9	—	—	—
HJGS—3	曲霉属	发酵液	11	—	12	12	10	—
		菌丝醇提液	10	—	11	11	11	—
CK			—	—	—	—	—	—

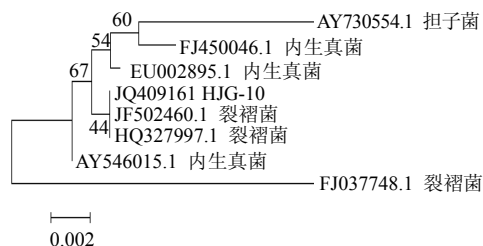


图 1 根据 rDNA-ITS 序列分析构建的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree based on rDNA-ITS sequence

4 讨论

植物内生真菌是一类次生代谢产物丰富、应用前景广阔的微生物资源，在植物中普遍存在。本研究组从泰山野生黄精的根、茎、叶和果实中分离出 32 株菌落形态有明显差异的内生真菌，其不同部位的内生真菌分布量是不一样的，以根中的内生真菌数量占优势，而果实中内生真菌数量较少，与张丽春等^[1]的研究结果相似。通过纸片扩散法共筛选到了 8 株具有广谱抗菌活性的内生真菌，其中的优势

属为镰刀菌、链格孢和不产孢真菌。

镰刀菌是常见的植物内生真菌，具有多种活性成分，在植物中广泛存在。Tayung 等^[12]从红豆杉树皮中分离到 1 株具有抑菌作用的腐皮镰刀菌；Barik 等^[13]从菖蒲根中分离到一株内生尖孢镰刀菌，对临床病原菌具有很好的抑制作用。本实验共分离获得 10 株镰刀菌，其中具有抑菌活性的有 4 株，占总菌株的 25%。链格孢也是常见的植物内生真菌，几乎见于所有植物内生真菌的分离^[14]。已往研究表明，产宿主植物相同或相似活性产物的内生真菌多被鉴定为链格孢，如从喜树中分离到的链格孢能够产抗肿瘤活性物质^[15]，从长春花中分离到的链格孢能够产生长春新碱^[16]。本研究也发现从黄精分离的内生链格孢 HJG-4 可产生三萜皂苷，具有很好的研究价值。无孢菌群是分离频率很高的一类内生真菌。由于其特殊的生长环境，分离的菌株大多数在实验室培养条件下不产生孢子^[13]，有的菌株即使进行相当烦琐费时的产孢诱导处理，在人工培养基上也不产生有性或无性孢子，因此，内生真菌的鉴定通常比较困难。由于 ITS 的序列分析能实质性地反映出属间、种间以及菌株间的碱基对差异，加上片段较小、易于分析，目前已被广泛应用于真菌属内不同种间或近似属间的系统发育研究中^[17]。本研究分离出的不产孢内生真菌 HJG-10 菌株对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌等 3 种耐药菌均具有较好的抑菌活性。通过分子鉴定，将 HJG-10 鉴定为裂褶菌，其抑菌活性成分正在研究中。

参考文献

- [1] 王光辉, 王琦, 时元林. 泰山四大名药 [J]. 山东中医杂志, 2006, 25(3): 203-204.
- [2] 陈兴荣, 王成军, 李龙星, 等. 滇黄精的化学成分及药理研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2002, 13(9): 560-561.
- [3] 陈晔, 孙晓生. 黄精的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(3): 328-330.
- [4] Sturz A V, Nowak J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops [J]. *Appl Soil Ecol*, 2000, 15(2): 183-190.
- [5] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 491-502.
- [6] 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.
- [7] 李艳玲, 史仁玖, 王健美, 等. 泰山产丹参内生真菌的分离鉴定和多样性分析 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(1): 114-117.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 科学技术出版社, 1979.
- [9] 易晓华, 朱明旗, 冯俊涛, 等. 1 株具抑菌活性除虫菊内生真菌的菌种鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(8): 166-169.
- [10] 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.
- [11] 张丽春, 郭顺星. 5 种石斛内生真菌的分离及其抗菌活性研究 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(20): 1540-1543.
- [12] Tayung K, Barik B P, Jha D K, et al. Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew [J]. *Mycosphere*, 2011, 2(3): 203-213.
- [13] Barik B P, Tayung K, Jagadev P N, et al. Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity [J]. *EJBS*, 2010, 2(1): 8-16.
- [14] Pelaez F, Collado J, Arenal F, et al. Endophytic fungi from plant living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity [J]. *Mycol Res*, 1998, 102: 755-761.
- [15] 郑丹, 刘吉华, 张剑. 4 株产抗肿瘤活性物质喜树内生真菌的鉴定及其主要代谢产物 HPLC 初步比较 [J]. 药物生物技术, 2007, 14(3): 190-195.
- [16] 张玲琪, 郭波, 邵华, 等. 长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究 [J]. 中草药, 2000, 31(11): 805-807.
- [17] Guo L D, Hyde K D, Liew E C. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 20(1): 1-13.