

药用植物三尖杉内生真菌的分离鉴定及抗菌活性

刘兆迪¹, 解修超^{1,2}, 陈文强^{1,2*}, 阮昌应¹, 彭浩^{1,2}, 邓百万^{1,2}

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001;

2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723001)

[摘要] 目的: 研究药用植物三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* 内生真菌的分离鉴定及抗菌活性。方法: 用组织培养方法从野生三尖杉的根、茎、叶中分离内生真菌, 采用滤纸片扩散法对分离得到的内生真菌的代谢产物做抑菌活性研究。结果: 分别从三尖杉根、茎、叶中共分离得到30株内生真菌; 抑菌活性研究显示, 有20株内生真菌的代谢产物至少对1种靶标菌有抑制活性, 占总分离菌株的66.7%, 其中菌株CFEF013对所有靶标菌均有抑制作用; 经形态学和分子生物学鉴定, 对7株具有较强抑菌活性的菌株分属镰孢菌属 *Fusarium* 4株, 壳孢属 *Cytospora* 1株, 拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 1株, 毛霉菌属 *Mucor* 1株。结论: 药用植物三尖杉内生真菌种类具有一定的多样性, 内生真菌代谢产物抑菌活性良好。

[关键词] 三尖杉; 内生真菌; 分离; 鉴定; 抗菌活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)09-0128-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014090128

Isolation, Identification and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi from Medical Plant *Cephalotaxus fortunei*

LIU Zhao-di¹, XIE Xiu-chao^{1,2}, CHEN Wen-qiang^{1,2*}, RUAN Chang-ying¹, PENG Hao^{1,2}, DENG Bai-wan^{1,2}

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China;

2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong 723001, China)

[收稿日期] 20130624(002)

[基金项目] 陕西省教育厅专项科研计划基金项目(08JK247); 陕西理工学院人才引进科研启动项目(SLGQD0717)

[第一作者] 刘兆迪, 在读硕士, 从事植物内生菌的资源开发利用研究, E-mail: seven9870@126.com

[通讯作者] * 陈文强, 教授, 从事微生物资源保护与开发利用研究, E-mail: wenqiange@126.com

3 小结

由结果可知, 各样品中所含氨基酸成分均以谷氨酸含量最高, 而谷氨酸具有益智、活跃思维等作用。亮氨酸可以缓解偏头痛, 缓和焦躁及紧张情绪, 色氨酸有促进睡眠的作用, 二者在柏子仁中所占比例也较高, 这些与柏子仁所具有的益智、宁心安神的功效是相一致的。研究结果还发现, 不同产地柏子仁中所含上述3种氨基酸含量、总氨基酸含量及必需氨基酸含量均以安徽亳州(S3)的含量最高, 以贵州贵阳(S6)的含量最低, 而且未检出蛋氨酸和半胱氨酸。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

京: 中国医药科技出版社, 2010: 231.

[2] 罗兰, 张素中, 黄月纯, 等. 玉屏风煎剂中氨基酸类成分 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 64.

[3] 王殿波, 陈斌, 单舒筠, 等. 不同生境及地区哈蟆油药材中氨基酸成分比较分析[J]. 中国现代中药, 2012, 14(2): 8.

[4] 肖培云, 杨永寿, 施贵荣, 等. 美洲大蠊药材中氨基酸含量的柱前衍生化高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 525.

[5] 欧金秀, 谷陟欣, 张妮瑜, 等. 柱前衍生 HPLC 同时测定驴胶补血颗粒中6种水解氨基酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 93.

[责任编辑 邹晓翠]

[Abstract] Objective: To isolate the endophytic fungi from *Cephalotaxus fortunei* and investigate their antimicrobial activities. **Method:** Endophytic fungi were isolated by tissue-culture method and antimicrobial activities of endophytic fungi were investigated by using filter paper method and the active strains were preliminarily identified by morphological and molecular method. **Result:** Thirty strains of endophytic fungi were isolated from the roots, stems and leaves of wild *C. fortunei* in Qinba mountain. 20 strains (66.67%) showed antimicrobial activity against one or more of the tested microbes, and the strain CFEF013 has strong inhibition activity to all target strains. By morphological and molecular identification, 7 strains with strong antimicrobial activity were classified into genera of *Fusarium* (4 strains), *Cytospora* (1 strains), *Pestalotiopsis* (1 strain) and *Mucor* (1 strain). **Conclusion:** There are multiple endophytic fungi in *C. fortunei*, and their metabolites have good antimicrobial activities.

[Key words] *Cephalotaxus fortunei*; endophytic fungi; isolation; identification; antimicrobial activity

三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* 为三尖杉科三尖杉属植物,小乔木或灌木,树皮灰色或灰褐色,裂成薄片状脱落,分布于我国陕西南部、甘肃南部、华东、华南、西南地区,散生于海拔 800~2 000 m 的山林边缘、路旁及山涧潮湿地带^[1-2]。三尖杉属的植物中含有多种生物碱,三尖杉酯碱就是从三尖杉属植物中提出的具有抗癌作用的生物酯碱^[3]。从其根、树皮、种子等部位中提取的多种生物碱被临床证明是有效的抗癌药物,特别是在白血病治疗方面具有较高的应用价值和润肺、止咳、消积、杀虫等功效^[4-7]。所以,其价值越来越引起人们的关注,但这也给三尖杉野生资源带来灾难性的破坏。

植物内生真菌(*Endophytic fungi*)是指在植物生活中某一阶段可以存在于健康组织内部,但不引起宿主明显病症或者不对宿主造成明显伤害的真菌^[8]。内生真菌产生的活性物质具有复杂的多样性,如抗虫、抗细菌、抗病毒、抗肿瘤等^[9]。由此表明内生真菌能够产生一些次生代谢产物,对新化合物,尤其是新药物的开发具有极其重要的应用前景。目前许多药物是天然产物或是以天然产物为先导化合物衍生获得的,而许多来自植物的天然化合物与植物的内生真菌有密切关系,甚至是内生真菌的次生代谢产物。因此从药用植物内生真菌的次生代谢产物中筛选出具有药用价值的活性物质,将在很大程度上丰富人类的药物宝库^[10]。与植物比较,内生真菌具有生长迅速、易于大量培养的特点,因此开发珍惜的抗菌、抗癌药用植物的内生真菌无疑是解决植物资源短缺的有效途径。

本研究以秦巴山区药用植物三尖杉为材料,对内生真菌进行分离、鉴定,并对其代谢产活性物质进行研究,旨在发现新的或具有良好生物学活性的菌株。

1 材料

1.1 供试材料 三尖杉于 2012 年 4 月采自陕西汉中市褒河森林公园,经陕西理工学院生物科学与工程学院杨培君教授鉴定。

1.2 仪器设备 LS-B50L 型高压蒸气灭菌锅(上海申安医疗器械厂),ZHWY-210 2C 型数显式恒温摇床(上海志成公司),E600 型高级研究显微镜(日本 Nikon 公司),Mycycler 型 PCR 扩增仪(美国 Bio-rad 公司),Gel Doc 型凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司),Allegra6 型低温高速离心机(美国 Beckman 公司)。

1.3 培养基 分离采用 CPDA 培养基(加 100.0 mg·L⁻¹青霉素),纯化采用 PDA 培养基,发酵采用 PDA 液体培养基,病原菌培养采用 LB 和 YPD 培养基。

1.4 靶标菌株 桔青霉菌 *Penicillium citrinum*、黑曲霉菌 *Aspergillus niger*、大肠埃希菌 *Escherichia coli*、沙门氏菌 *Salmonella typhi*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 和白色念珠菌 *Monilia albican*,均由陕西省食药菌工程技术研究中心提供。

2 方法

2.1 内生真菌的分离纯化 组织分离法:取三尖杉健康的根、茎和叶,洗净晾干后在无菌条件下用无菌水漂洗,然后用 75% 乙醇浸泡 1 min,无菌水冲洗 3 次,再用 0.1% HgCl₂ (加有 1% Tween-80)溶液浸泡 5 min,无菌水洗 5 次,最后用无菌滤纸吸干水分。分别将其剪成 0.5 cm × 0.5 cm 左右的小块,接种到 CPDA 培养基上,于 28 °C 恒温箱中培养 7~10 d,待切口处长出菌丝后,挑取形态不同的菌落,转入 PDA 固体培养基中,采用菌丝顶端纯化法逐步纯化。最后接种至试管斜面上,于 4 °C 冰箱中保藏备用。

组织研磨法:表面消毒方法同组织分离法,后将组织剪碎,置于研钵中充分研磨。以 1:10 的比例加入无菌水,制备匀浆液,吸取 100 μL 加入到分离平板中涂布。待菌丝长出后,挑取单菌落接种于 PDA 固体培养基中。纯化结束后接种至试管斜面上,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保藏备用。

2.2 表面消毒检验 取最后一次冲洗用无菌水 100 μL 涂布到分离培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 10 d,观察消毒结果。

2.3 内生真菌的鉴定 将分离纯化的内生真菌转接至 PDA 固体培养基上,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 观察,记录菌落大小、颜色、表面特征等;用透明胶带粘取菌丝并用美蓝染色制作临时装片,显微镜下观察并拍照,记录菌丝、孢子和分生孢子梗形态等特征,并对其初步鉴定^[11-12]。

2.4 菌株发酵液抑菌活性检测 将纯化好的菌株接种于摇瓶发酵培养基中(250 mL 培养基置于 500 mL 摇瓶中),28 $^{\circ}\text{C}$,170 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 发酵 7~10 d。然后用 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度离心 15 min,得上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后得原始滤液,用直径 6 mm 的圆形无菌滤纸片蘸取滤液,放于含相应靶标菌(桔青霉菌、大肠埃希菌、黑曲霉菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、沙门氏杆菌和铜绿假单胞杆菌)的平板上,24 h 培养后测定抑菌圈直径的大小,并设置空白对照^[13]及重复试验。

2.5 分子生物学鉴定 将上述筛选出抑菌活性较好的菌株置于 PDA 液体培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$,170 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下振荡培养 5~7 d,抽滤、收集菌丝,采用 CTAB 法^[9]提取内生真菌 DNA,用质量分数为 1% 的琼脂糖进行凝胶电泳检测 DNA。用 P1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',P2:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'为特异性引物(上海生物工程有限公司合成)。PCR 反应体系(25 μL)包括模板 DNA 1 μL ,引物(P1/P2)各 1 μL ,2 \times Taq PCR Master Mix 12 μL ,无菌水 10 μL 。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,33 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳检测。

3 结果与分析

3.1 三尖杉表面消毒 试验采用 75% 乙醇浸泡 1 min,后用 0.1% HgCl_2 消毒 5 min,在最后一次冲洗用无菌水涂布的分离平板上未见菌落长出(28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 10 d),表明经表面消毒后,样品表面附生菌的影响已消除,所分得菌株均为三尖杉内生真菌。

3.2 菌株发酵液抑菌活性筛选 采用滤纸片扩散

法对 30 株内生真菌的发酵液进行抑菌活性检测,结果见表 1。

表 1 结果表明,采用滤纸片扩散法对所分离的 30 株植物内生真菌的发酵液进行抑菌活性检测,共有 20 株内生真菌具有不同程度的抗菌活性,占分离菌株的 66.7%,其中对桔青霉菌、黑曲霉菌、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏杆菌和铜绿假单胞杆菌有抑制作用的菌株分别为 9,7,7,14,9,15,12,8 株,占总株数的 30%,23.3%,23.3%,46.7%,30%,50%,40%,27%。所有具抗菌活性的菌株对革兰阳性靶标菌(金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌)的抑制作用比革兰阴性靶标菌(大肠埃希菌、沙门氏菌和铜绿假单胞菌)的抑菌作用强,对靶标细菌的抑制作用较靶标真菌(桔青霉菌、黑曲霉菌、白色念珠菌)的强。其中 CFEF003,CFEF005,CFEF012,CFEF013,CFEF017,CFEF020,CFEF025 抗菌谱最广。CFEF013 对所有靶标菌均有抑制作用。CFEF018 对供试菌株中的病原真菌无抑制作用,仅对 1 株靶标细菌有一定的拮抗作用。

3.3 7 株内生真菌的系统发育树 试验挑选抑菌活性较好的菌株进行 DNA 提取,PCR 扩增,序列检测,将所测序列提交到 NCBI 进行 Blast 检索。利用 MEGA5 软件,选择近邻结合法(neighbor-joining)构建系统发育树并进行分析。结果如图 1。

图 1 结果显示,菌株 CFEF003(登录号 KF158219)、CFEF005(登录号 KF158220)分别与模式菌株 *Fusarium redolens*,*Mucor fragilis* 聚类在同一进化分支上;菌株 CFEF017(登录号 KF158221)、CFEF020(登录号 KF158223)分别与模式菌株 *F. oxysporum*,聚类在同一进化分支上,自展支持率达到 100,可以确定它们为同一种真菌;菌株 CFEF013(登录号 KF158224)、CFEF012(登录号 KF158222)、CFEF025(登录号 KF158218)分别与模式菌株 *F. tricinctum*、*Cytospora chrysosperma*,*Pestalotiopsis oxyanthi* 处于同等发育地位,自展支持率达到 99%,亲缘关系极为相近。经 NCBI 序列比对,5 株内生真菌与模式菌株的相似度均在 98% 以上。结合形态学和分子生物学方法,初步将菌株 CFEF017,CFEF013,CFEF020 鉴定为镰孢菌属;菌株 CFEF012 鉴定为壳囊孢属;菌株 CFEF025 鉴定为拟盘多毛孢属。

4 讨论

内生真菌普遍存在于植物中,其种类和数量也因植物的不同而不同,即使是同一种植物,也会因品

表 1 三尖杉内生真菌发酵液对靶标菌株的拮抗作用

Strain No.	<i>P. citrinum</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhl</i>	<i>P. aeruginosa</i>
CFEF001	-	-	-	+	+	-	-	-
CFEF003	+	-	+	+++	-	+	+	-
CFEF005	+	-	+	++	++	+	+	++
CFEF006	-	+	-	+	+	-	-	-
CFEF009	-	-	-	-	+	-	+	+
CFEF010	-	-	-	+	-	+	+	-
CFEF012	+	++	-	+	+	+	+	+
CFEF013	+	+	+	+++	+	++	++	+
CFEF017	+	+	-	++	++	+	+++	-
CFEF018	-	-	+	-	-	-	+	-
CFEF020	++	+	++	+	++	-	+	+
CFEF021	-	-	-	-	+	-	-	-
CFEF023	+	-	-	-	+	-	-	-
CFEF024	+	-	-	-	+	-	+	-
CFEF025	++	+++	+	+	+	-	+	+
CFEF026	-	-	-	+	-	-	-	+
CFEF027	-	+	+	+	+	+	-	-
CFEF028	-	-	-	-	-	+	+	-
CFEF029	-	-	-	+	+	+	-	+
CFEF030	-	-	-	+	+	+	-	-

注：“+++”：抑菌直径为 19 ~ 24 mm；“++”：抑菌直径为 13 ~ 18 mm；“+”：抑菌直径为 8 ~ 12 mm；“-”：无抑菌活性。

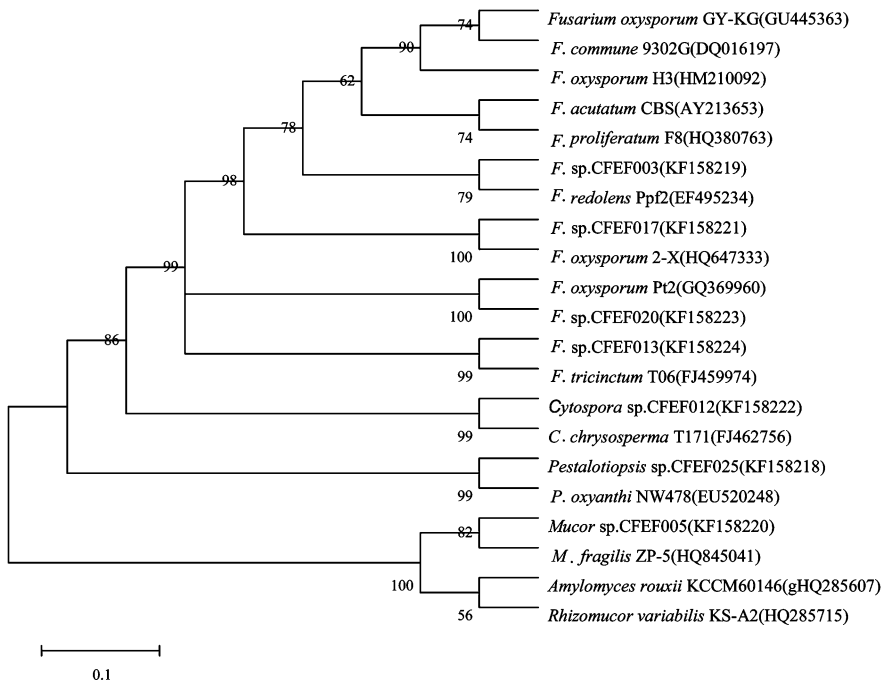


图 1 依据 ITS 序列构建的 7 株代表菌株及其相关种、属的系统发育树

种、生境和年龄等不同而分离出不同的内生真菌,加上不同实验室采取不同的表面消毒方法和不同的培养基,也会造成一定的差异。刘果等^[14]从秦岭太白山地区三尖杉中共分离出了61株内生真菌,经鉴定分属曲霉属、青霉属和链格孢属。蔡坤等^[15]从中国海南和泰国海南粗榧的树皮样品中共分离出了213株内生真菌,经鉴定,其中的优势菌主要分属根霉属、青霉属、酵母属和毛霉属。

本研究从秦巴山区药用植物三尖杉植物中共分离了30株内生真菌,其中有7株抑菌活性较强,占总分离菌株的23.3%,经鉴定为镰孢菌属、壳囊孢属、拟盘多毛孢属、毛霉属,而所分离出的壳囊孢属未见相关文献报道,这说明生境和品种不同的三尖杉,内生真菌种类和数量存在一定差异。因此,研究不同生境下及不同品种的药用植物内生真菌是非常必要的,这对新菌种的发现及植物资源的补充利用都是极为有益的。

三尖杉内生真菌的发酵液具有抗菌活性。李桂玲等^[16]对福建武夷山三尖杉内生真菌抗霉菌活性的研究发现,活性菌株主要分布在拟青霉属中。而本研究发现来自秦巴山区三尖杉的7株菌对桔青霉菌靶标菌株具有显著的抗菌效果。其中菌株CFEF013对8种靶标菌均具有活性,这说明秦巴山区三尖杉内生真菌可以作为抗菌活性物质研究的重要资源,在7株植物的内生真菌中,存在着较罕见的抗菌活性菌株,如壳囊孢属,有必要对其代谢产物继续进行研究。

[参考文献]

[1] 傅立国. 三尖杉属的研究[J]. 植物分类学报, 1984, 22(4):277.
[2] 解修超,陈文强,邓百万,等. 三尖杉种仁挥发油的化学成分及生物活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(10):76.
[3] 李因刚,周志春,金国庆. 三尖杉种源遗传多样性

[J]. 林业科学, 2008, 44(2):64.
[4] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:235.
[5] Barnett H L, Hunter B B. 半知菌属图解[M]. 北京:科学出版社,1997:56.
[6] 赵莉莉,李秋萍,魏玉珍,等. 以 SecA 为靶点的新型抗绿脓杆菌药物细胞水平筛选模型的建立和应用[J]. 微生物学通报,2008,35(12):1926.
[7] MURRAR M C, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8(7):4321.
[8] 王雪松,孙剑秋,臧威,等. 从 Strobel 的发现看植物内生真菌研究的未来[J]. 生物学通报, 2012, 47(10):1.
[9] 林燕青,洪伟. 植物内生真菌研究及应用前景[J]. 福建林业科技, 2012, 39(3):186.
[10] 郑万钧,傅立国. 中国植物志. 第7卷[M]. 北京:科学出版社,1978:426.
[11] 黄芳,韩婷,秦路平. 牡荆内生真菌的分离与鉴定[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(14):1945.
[12] Lenka Beranova, Antonio R Pombinho, Jarmila Spigarova, et al. The plant alkaloid and anti-leukemia drug homoharringtonine sensitizes resistant human colorectal carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via multiple mechanisms[J]. Apoptosis, 2013, 18:739.
[13] 马养民,田从丽,张弘弛. 杜仲内生真菌的分离鉴定及抗菌活性筛选[J]. 时珍国医国药, 2011, 33(3):552.
[14] 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.
[15] 蔡坤,袁牧,刘四新,等. 海南粗榧树皮内生真菌的初步鉴定[J]. 中国药学杂志, 2010, 31(7):1167.
[16] 李桂玲,王建锋,黄耀坚,等. 几种药用植物内生真菌抗真菌活性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6):64.

[责任编辑 邹晓翠]