

古银杏内生真菌的分离及其抑菌活性

刘小莉¹ 周剑忠¹ 黄开红¹ 董明盛^{2*}

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所 江苏 南京 210014)

(2. 南京农业大学食品科技学院 江苏 南京 210095)

摘要: 采用组织分离法从古银杏健康组织中分离得到 55 株内生真菌, 其中 28 个分离菌株在 PDA 培养基上不产孢子, 占总分离菌株的 50.9%, 其它菌株根据其在 PDA 培养基上的培养特征, 10 株被鉴定为青霉、6 株为曲霉、4 株为交链孢霉、3 株为简梗孢霉, 另外酵母、毛霉、小单头孢霉、镰孢霉各 1 株。考察内生真菌培养上清对 7 种受试指示菌的抑制作用, 共筛选得到 23 株至少对一种指示菌的生长有抑制作用的菌株, 其中 11 株为不产孢真菌, 占活性菌株的 47.83%。对活性最强的一株菌进行形态学和分子生物学鉴定, 将其确定为 *Xylaria venosula* Speg.。银杏内生真菌作为新型的抑菌生物制剂具有潜在的应用前景。

关键词: 银杏, 内生真菌, 分离, 鉴定, 抑菌活性

Isolation and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi from *Ginkgo biloba* L.

LIU Xiao-Li¹ ZHOU Jian-Zhong¹ HUANG Kai-Hong¹ DONG Ming-Sheng^{2*}

(1. Institute of Farm-product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

(2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Endophytic fungi inhabited in *Ginkgo biloba* L. were isolated, and 55 endophyte strains were obtained. Among the strains, 28 produced sterile mycelia on PDA plates, accounting for 50.9% of the total fungi. In addition, there were ten *Penicillium* spp., six *Aspergillus* spp., four *Alternaria* spp. and three *Chromosporium* spp., and one yeast, *Mucor*, *Acremoniella*, and *Fusarium*, respectively. Antimicrobial activity of fermentation cultures of these 55 strains were investigated against seven tested microorganisms. Twenty-three strains with antimicrobial activity were obtained, among which eleven produced sterile mycelia, accounting for 47.83% of the fungi with antimicrobial activity. The strain with the highest antimicrobial activity was determined to be *Xylaria venosula* Speg., according to its morphological features and molecular analysis. As a novel antimicrobial resource, endophytic fungi in *G. biloba* have a potential prospect.

Keywords: *Ginkgo biloba* L., Endophytic fungi, Isolation, Identification, Antimicrobial activity

内生真菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织和器官内部, 但不会使

被感染的宿主植物(至少是暂时)表现出外在病症的真菌^[1]。已有的研究表明, 生活在植物体内这一特殊

基金项目: 江苏省博士后科学基金(No. 0802022B)

* 通讯作者: Tel: 86-25-84399090; ✉: dongms@njau.edu.cn

收稿日期: 2009-03-13; 接受日期: 2009-05-06

环境中的内生真菌与相应宿主协同进化,能产生与宿主相同或相似的具有生理活性的代谢产物^[2]。随着抗生素和防腐剂的大量使用,耐药性菌株大量产生,因此开发新的抑菌活性物质已迫在眉睫。有多项研究表明植物内生真菌能产生新型的对耐药性菌株有抑制活性的物质^[3,4]。

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是中国特有的珍贵树种,它能经历两百多万年的地质变迁仍能子遗下来,并且在漫长的逆境中几乎不感染任何病虫害,寿命极长。根据内共生理论推断,银杏中很有可能存在着特殊的内生真菌,通过产生特殊的次生代谢产物帮助增强银杏的抗病害能力。关于银杏内生真菌的分离、鉴定及其抑菌活性的研究,国内外还很少有报道。本文从银杏中分离到 55 株内生真菌,发现其培养物中含有对细菌、酵母、霉菌,特别是对金黄色葡萄球菌有强力抑制作用的活性成分。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 银杏样品来源和采集方法: 采样时间为 2006 年 10 月,选用江苏省泰兴市和徐州市健康银杏树,树龄在 500~1500 年,取其上直径为 2 cm~3 cm 左右的健康树枝,经 70%酒精表面擦洗消毒后在火焰上灼烧 10 s 左右,标号,放于灭菌纸袋中。存放于冰盒中,5 h 内运输回实验室进行菌株分离。

1.1.2 抑菌实验指示菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli* As1.2420)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* As1.2465)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* CGMCC1.1628)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* CICC1358)、小红酵母(*Rhodotorula minuta* CGMCC2.1520)、扩展青霉(*Penicillium expansum* CGMCC3.5761)、黑曲霉(*Aspergillus niger* CGMCC3.6328)。以上供试菌种均由本研究室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 内生真菌分离方法: 将树枝样品锯成 0.5 cm~1 cm 长的小段,依次用 0.2%升汞液和 70%酒精各浸泡 1 min,无菌水冲净,并于酒精灯火焰上灼烧 10 s,进行表面消毒处理,然后置于 PDA(添加 40 μg/mL 孟加拉红)培养基平板上,25°C±1°C 黑暗培养。培养 7 d 左右后样品表面或边缘出现菌丝生长,挑取菌丝转接到新鲜 PDA 琼脂平板上培养,待纯化后制成斜面 4°C 保存。对分离得到的银杏内生真菌进行显微

形态特征的观察,初步分类^[5]。

1.2.2 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,25°C±1°C、120 r/min 摇瓶培养 2 d~3 d,至有大量菌丝颗粒出现后作为种子液以 10%接种量接入 PDA 液体中,静置培养 7 d。5000 r/min 离心 15 min 去除菌丝体,收集上清液,冷冻干燥。用适量无菌水洗下冷冻干燥的残留物,制成 20 倍的浓缩液,4°C 保存待用。

1.2.3 抑菌试验: 采用平板孔阱扩散法^[6]。斜面保存的抑菌试验指示菌种接种于 NA(用于细菌)或 PDA(用于真菌)液体培养基中活化,130 r/min 摇瓶培养,细菌 37°C 培养 24 h、真菌 25°C 培养 96 h。用相应的融化后冷却的固体培养基稀释菌种至 10⁶ CFU/mL(细菌)或 10⁶ 个孢子/mL(真菌)以上,倒平板。待培养基冷凝后,用打孔器于平板上均匀打 3 个孔。分别吸取处理好的真菌发酵液 100 μL 注入孔中,37°C(细菌)或 25°C(真菌)培养,48 h 后测量抑菌圈大小,计算平均值。

1.2.4 内生真菌的分子生物学鉴定: 采用改良的氯化苜法^[7]提取真菌基因组总 DNA。采用通用引物:ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')和 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')扩增 ITS 序列^[8]。PCR 反应体系为:模板 DNA 2 μL、10×PCR buffer 5 μL、Taq DNA 聚合酶 2.5 Unit、dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL、引物各 3 μL,补充去离子水至 50 μL。反应条件:94°C 5 min;94°C 40 s,60°C 40 s,72°C 40 s,34 个循环;72°C 5 min。PCR 产物用 1%凝胶电泳进行检测,送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序,序列提交到 GenBank 核酸序列数据库并得到登录号。

应用 Blast 程序对所测得的内生真菌 ITS 序列进行相似性比对。采用软件 ClustalX 1.81 进行多序列的比较,比对结果采用 MEGA 3.1 软件进行系统进化树的构建。

2 结果和分析

2.1 银杏内生真菌的多样性

共分离纯化得到菌株 55 株,根据形态学特征进行初步鉴定。在分离所得的 55 株菌中有 50.9%在 PDA 培养基上为不产孢真菌,几乎占总分离菌株的 1/2。其它分离菌株均为产孢真菌,且交链孢霉属、

曲霉属和青霉属等较普遍, 分别占总分离菌株的 7.27%、10.91%和 18.18%(表 1)。

2.2 银杏内生真菌的抑菌活性

对 55 株内生真菌发酵液进行抑菌试验, 共筛选得到 23 株至少对一种指示菌的生长有抑制作用的菌株(表 2)。具有抗菌活性的菌株占总分离菌株的 41.82%, 其中 3 株为交链孢霉, 5 株为青霉, 2 株为曲

霉, 1 株为筒梗孢霉, 1 株为小单头孢霉, 其它 11 株为不产孢真菌, 占活性菌株的 47.83%。

选用的 7 株指示菌中, 金黄色葡萄球菌的敏感性最强, 共有 20 株内生菌发酵物对其生长有抑制作用, 而其它指示菌相对不及金黄色葡萄球菌敏感, 活性菌株分别有 5 株对大肠杆菌、2 株对枯草芽孢杆菌、4 株对酿酒酵母、5 株对红酵母、3 株对扩展

表 1 55 株银杏内生真菌类群表
Table 1 Fungal taxa of 55 endophyte strains in *Ginkgo biloba*

分类群 Taxa	株数 Numbers	占总数的比例(%) Percentage	分类群 Taxa	株数 Numbers	占总数的比例(%) Percentage
不产孢真菌 <i>Sterile mycelia</i>	28	50.90	青霉属 <i>Penicillium</i>	10	18.18
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	6	10.91	交链孢霉属 <i>Alternaria</i>	4	7.27
筒梗孢霉属 <i>Chromosporium</i>	3	5.45	酵母 <i>Yeast</i>	1	1.82
毛霉属 <i>Mucor</i>	1	1.82	小单头孢霉属 <i>Acremoniella</i>	1	1.82
镰孢霉属 <i>Fusarium</i>	1	1.82			

表 2 银杏内生真菌培养物的抗菌活性
Table 2 Antimicrobial activity of culture broth of endophytic fungi

菌株编号 No.	所属类群 Taxa	大肠杆菌 <i>E. coli</i> As1.2420	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> As1.2465	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> CGMCC 1.1628	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i> CICC1358	小红酵母 <i>R. minuta</i> CGMCC 2.1520	扩展青霉 <i>P. expansum</i> CGMCC 3.5761	黑曲霉 <i>A. niger</i> CGMCC 3.6328
M-1	交链孢霉	-	19.00	-	-	-	-	-
M-6	青霉	-	17.00	-	-	-	-	-
M-7	青霉	-	17.00	-	-	-	-	-
M-8	青霉	-	17.00	-	-	-	-	-
M-11	青霉	-	-	-	-	15.00	-	-
M-13	青霉	-	27.00	-	-	-	-	-
M-14	曲霉	-	17.00	-	15.00	13.00	-	13.00
M-17	曲霉	-	17.00	-	17.00	11.00	20.00	-
M-20	不产孢真菌	-	-	-	-	-	-	18.00
M-23	不产孢真菌	24.00	-	-	-	15.00	-	-
M-25	不产孢真菌	-	16.00	-	-	-	-	-
M-27	不产孢真菌	-	21.00	-	-	-	-	-
YX-2	筒梗孢霉	-	20.64	16.00	-	-	-	-
YX-9	小单头孢霉	19.00	32.00	14.00	-	-	-	-
YX-13	不产孢真菌	-	17.00	-	-	-	13.00	-
YX-16	不产孢真菌	-	14.00	-	-	-	-	-
YX-27	不产孢真菌	-	23.00	-	-	-	-	-
YX-28	不产孢真菌	23.50	26.00	-	22.20	-	15.28	16.68
YX-30	交链孢霉	-	22.00	-	-	-	-	-
YX-41	不产孢真菌	26.00	17.00	-	19.80	-	-	17.26
YX-44	不产孢真菌	-	14.50	-	-	-	-	-
YX-45	交链孢霉	18.00	16.00	-	-	-	-	-
YX-47	不产孢真菌	-	22.00	-	-	16.32	-	-

注: -: 无抑菌活性; 单位: mm.

Note: -: Without antimicrobial activity; Unit: mm.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

青霉、4株对黑曲霉有抑制作用。

2.3 菌株 YX-28 的鉴定

由表 2 可看出, 菌株 YX-28 的抗菌活性明显高于其它菌株, 而且抑菌谱广, 因此对菌株 YX-28 进行深入、系统的分类鉴定。YX-28 在 PDA 平板上的菌落为白色、绒毛状(如图 1A), 培养 15 d 左右, 白色疏松的菌丝逐渐变为黑色, 致密(如图 1B)。不产生孢子, 菌丝透明且高度分枝, 直径 $2.23\ \mu\text{m}$ ~ $3.47\ \mu\text{m}$ (如图 1C)。

YX-28 在 PD 液体中静置生长 20 d 左右, 在液面菌膜上开始出现黑色棍棒状子座组织(如图 2A), 高 2 cm~6 cm, 顶端为白色且略膨胀, 少数有分支(图 2B), 外层炭化为黑色, 内部仍为白色菌丝(图 2C), 随着培养时间的延长, 不断变长变细, 顶端白色消失, 培养 5 个月后, 子实体完全变为黑色, 且中心白色菌丝部分消失, 形成空心结构, 生长过程中未观察到子囊孢子的产生。YX-28 子座经近紫外线照射、菌体扫描、寄主接种、温差培养等诱孢处理, 都没有产生子囊孢子。

扩增 YX-28 的 ITS 序列, PCR 产物经 DNA 测

序长度为 596 bp, 提交至 GenBank 获得 Accession number 为 DQ022415。通过 Megablast 程序在 GenBank 核酸序列数据库中搜索高度相似的序列, 筛选与 YX-28 同源性高于 94% 的菌株用于系统发育分析。基于邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统进化树, 可以看出 YX-28 与炭角菌属具有相当高的亲缘关系(如图 3), 而且与多种内生真菌处于一个大的分支中, 已鉴定到种水平的菌株中与 YX-28 进化距离最近的为 *X. venosula*, 与 2 株参考序列 AB462754、EF026149 分别只有 8 个和 7 个碱基的差异。因此, YX-28 应该属于 *X. venosula*。

3 讨论

从抑菌实验结果可看出, 银杏内生真菌中具有抑菌活性的菌株普遍存在, 活性菌株大多集中于无孢菌群中, 这个结果与相关研究一致^[6]。内生真菌在宿主体内产生特定的生物活性化合物, 既可以有助于它在植物体生境中形成优势地位, 也可以保护植物免受病原菌侵袭, 因此, 素有“活化石”之称的银杏几乎不感染任何病虫害的特性, 不能排除是其内

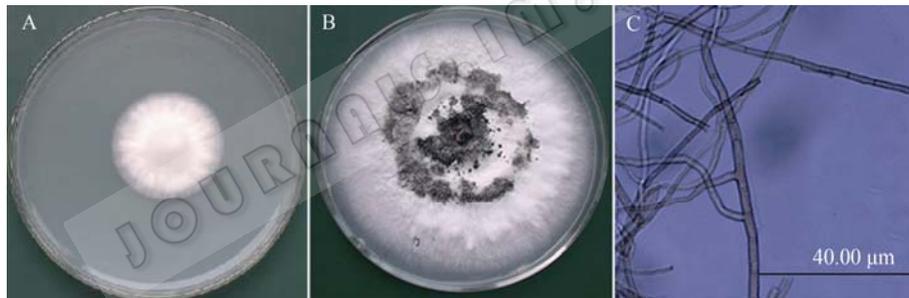


图 1 分离菌株 YX-28 的菌落(A、B)和菌丝(C)形态

Fig. 1 Colony (A and B) and mycelia (C) of endophyte strain YX-28



图 2 分离菌株 YX-28 的子座

Fig. 2 Stromata of the endophyte strain YX-28

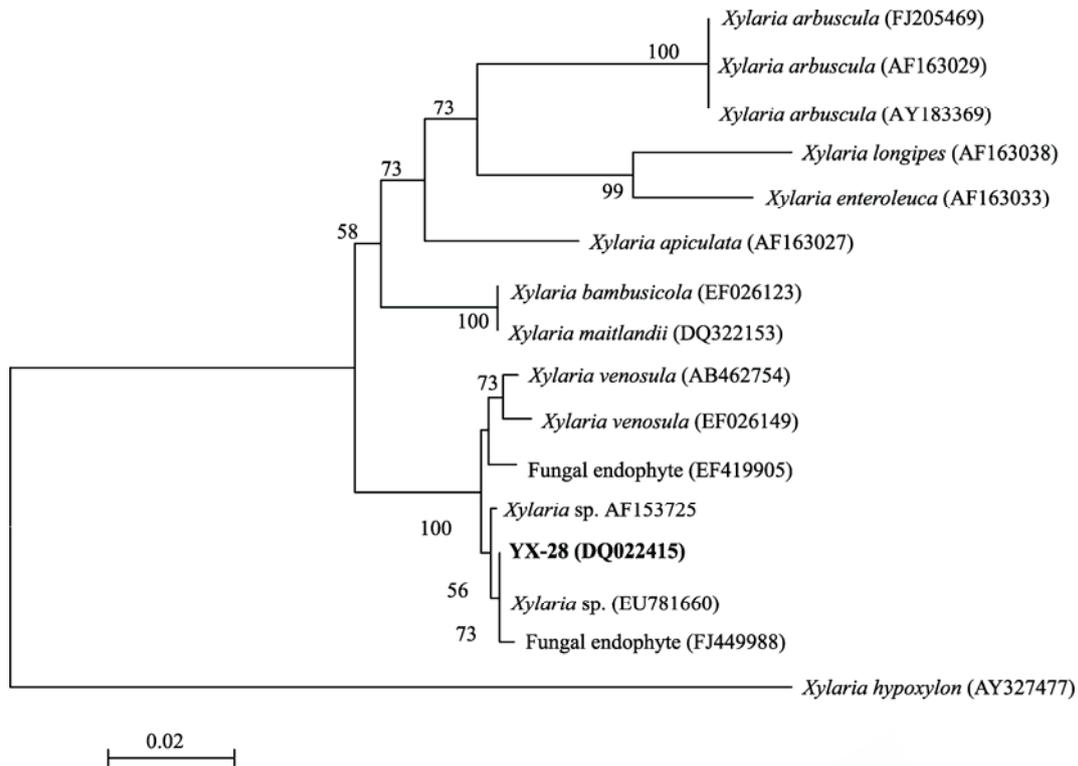


图 3 基于 ITS 序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of endophytic fungus YX-28 based on the sequence of ITS

Note: Data in parentheses are the GenBank accession numbers. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resampled data sets. The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide position.

生真菌在发挥作用。

内生菌是栖生于高等植物体内的微生物, 其独特生境极有可能使它成为新型次生代谢产物的来源, 从而在医药、农业、食品等行业具有开发潜力^[9]。同时, 植物内生菌作为一种新兴的微生物资源同样具备微生物资源的独特优势, 包括代谢类型多样化、生长繁殖速度快、调控系统相对简单、不存在开发过度问题等, 因此内生菌作为新型抗菌剂的开发极具前景。但是我们的研究也表明内生菌发酵产生活性物质的速度较慢、产量不高, 这也是内生菌研究领域普遍存在的问题和发展障碍, 我们在今后的工作中将会继续研究内生真菌菌株的具体活性成分, 并对其发酵生产进行优化, 使其具有更高的实际应用价值。

炭角菌属 *Xylaria* 最重要的分类特征就是外子座的产生。但是该属真菌形态各异, 目前关于炭角菌的描述报道资料很少, 许多种的培养特征还不是太明确, 而且实验室培养产生的菌落和子实体与自然界也有差异, 利用形态学特征在较低水平上精确

鉴定菌株非常困难, 因此可利用分子生物学技术来推断属内的分类关系 (JD Rogers, 个人交流)。本研究中 YX-28 产生典型的炭角菌子座, 但是即使采用诱孢处理也不产生孢子, 根据 ITS 序列的分析, YX-28 可鉴定为 *Xylaria venosula* Speg.。 *X. venosula* 还未见其相应的中文名称, 国外资料也很少。张禧庆等^[10]从石斛中分离到 2 株内生真菌, 经鉴定为 *X. venosula*, 其菌落形态和子实体形态与 YX-28 基本相同。已有的研究表明, 植物内生真菌长期与宿主共存, 在人工培养条件下通常为无孢菌群^[6], 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, 而且新的物种也在不断出现, 因此内生真菌的鉴定通常比较困难。Fisher 等^[11]对英格兰、马略卡岛、瑞士三地的 *Quercus ilex* L. 叶子和树枝中的内生真菌进行分离, 结果发现无孢菌群占总分离菌株的 41.3%。Petrini 等^[12]报道从俄勒冈州西部常绿灌木中分离出的内生真菌中有 15% 左右不产生孢子。Espinosa-Garcia 和 Langenheim^[13]发现从沿海红杉中分离出的内生菌

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

大约有 26.9% 属于无孢菌群。陈苹等^[14]从海南粗榧中分离得到了 72 株内生真菌, 其中有 34 株为无孢菌群。

随着分子生物学技术的发展、真菌基因数据库的扩大以及种群研究的深入, 可以在更准确的分类水平上对 YX-28 进行鉴定。

参 考 文 献

- [1] Stone JK, Bacon CW, White JF. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. Bacon CW, White JF Jr. *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker, 2000, pp. 3–29.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Tanomyces andreanea*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, **260**: 214–216.
- [3] Strobel G, Li JY, Sugawara F, et al. Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 1999, **145**: 3557–3564.
- [4] Zou WX, Meng JC, Chen GX, et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Product*, 2000, **63**(11): 1529–1530.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 科学技术出版社, 1979, p.9.
- [6] 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. *Mycological Research*, 1998, **102**: 755–761.
- [7] Zhu HJ, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Research*, 1993, **21**: 5279–5280.
- [8] Jin SL, Kwan SK, Hack SJ. Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **187**: 89–93.
- [9] Strobel G. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 2003, **5**: 535–544.
- [10] 张禧庆, 康冀川, 何 劲, 等. 两株石斛内生炭角菌的鉴定及活性成分初步研究. *西南农业学报*, 2008, **21**(2): 317–322.
- [11] Fisher PJ, Petrini O, Petromo LE, et al. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Marjorca and Switzerland. *New Phytologist*, 1994, **127**: 133–137.
- [12] Petrini O, Stone JK, Carroll FE. Endophytic fungi in evergreen shrubs in Western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany*, 1982, **60**: 789–796.
- [13] Espinosa-Garcia FJ, Langenheim JH. The endophytic fungal community of a coastal redwood population—diversity and spatial patterns. *New Phytologist*, 1990, **116**: 89–97.
- [14] 陈 苹, 戴好富, 解修超, 等. 海南粗榧内生真菌的分离与初步鉴定. *微生物学通报*, 2008, **35**(9): 1455–1460.

栏目介绍

教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩, 总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果, 增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系, 共谋发展, 决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目, 现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

- 1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版, 刊登科研、开发、教学单位介绍, 展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等, 图文并茂, 生动活泼, 每页内容要求: 图片 2~5 张, 文字 1000 字以内。
- 2、参加单位将获赠刊有本单位宣传内容的本期《微生物学通报》刊物 5 本; 获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘版 (1974~2006) 一张。
- 3、参加单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站的“科研单位成果展示”等栏目免费发布一年, 并可将主页网址与我刊友情链接。
- 4、参加单位应保证宣传材料真实客观、数据翔实、文责自负, 来稿请加盖公章, 以示负责。
- 5、本栏目将适当收取版面制作及网页维护费。
- 6、本栏目联系方式:

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王 闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>