

# 白花泡桐内生真菌的分离鉴定及抗菌活性筛选

罗江华<sup>1</sup> 吾鲁木汗·那孜尔别克<sup>1</sup> 李科<sup>1</sup> 姚福成<sup>2</sup> 恩特马克·布拉提白<sup>1\*</sup>

(1. 吉首大学生物资源与环境科学学院 湖南 吉首 416000)

(2. 湘西宏成制药有限公司 湖南 吉首 416000)

**摘要:** 从白花泡桐根、茎、叶中分离出 19 株内生真菌, 对分离出的真菌分别利用琼脂块法和纸片扩散法进行初选和复选, 通过形态学特征观察和 rRNA 基因 ITS 序列系统发育分析对抗菌活性菌株进行鉴定。抑菌试验结果显示 JSD-8、JM-1 和 JM-10 等 3 株内生真菌对枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) CGMCC 1.769、大肠杆菌(*Escherichia coli*) CGMCC 1.1103 和白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10123 均有一定的抗菌活性。鉴定结果表明, JSD-8、JM-1、JM-10 分别属于串珠赤霉菌(*Gibberella moniliformis*)、长柄链格孢菌(*Alternaria longipes*)和托姆青霉菌(*Penicilium thomii*)。  
**关键词:** 白花泡桐, 内生真菌, 抗菌活性, 鉴定

## Isolation and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi from *Paulownia fortunei*

LUO Jiang-Hua<sup>1</sup> NAZIERBIEKE Wulumuhan<sup>1</sup> LI Ke<sup>1</sup> YAO Fu-Cheng<sup>2</sup>  
BORRATHYBAY Entomack<sup>1\*</sup>

(1. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)

(2. Xiangxi Hongcheng Pharmaceutical Co., LTD, Jishou, Hunan 416000, China)

**Abstract:** Nineteen strains of endophytic fungi were isolated from the stems, roots and leaves of *Paulownia fortunei*, their antimicrobial activity against three tested microorganisms were investigated by using the agar diffusion method and the paper disc method. Identification of these strains were determined by their morphological features and phylogenetic analysis based on internal transcribed spacer of rRNA gene sequence comparison. The results showed that endophytic fungi of JSD-8, JM-1 and JM-10 had remarkable antimicrobial activities to *Bacillus subtilis* CGMCC 1.769, *Escherichia coli* CGMCC 1.1103 and *Candida albicans* ATCC 10123, respectively. Fungal morphological and molecular identification demonstrated that JSD-8, JM-1 and JM-10 represented *Gibberella moniliformis*, *Alternaria longipes* and *Penicilium thomii*, respectively.

**Keywords:** *Paulownia fortunei*, Endophytic fungi, Antimicrobial activity, Identification

植物内生真菌(Endophyte fungus)是指在健康植物寄生的, 在各种组织和器官内部或细胞间隙中部

分或全部生活周期而不使宿主表现明显病理症状的一类真菌<sup>[1]</sup>。根据 Strobel 提出内共生理论, 内生真

菌可能产生与宿主相同或相似的次生代谢产物<sup>[2]</sup>。1993年 Stierle 等从短叶红豆杉内生真菌中分离得到紫杉醇后,国内外学者从多种药用植物中陆续分离得到产生活性物质的内生真菌<sup>[3]</sup>。因此具有重要经济价值的药用植物内生真菌已成为筛选新药物的潜在资源。

泡桐属植物(*Paulownia*)有毛泡桐(*P. tomentosa*)、兰考泡桐(*P. elongata*)、楸叶泡桐(*P. catapifolia*)、白花泡桐(*P. fortunei*)、台湾泡桐(*P. kawakamii*)、川泡桐(*P. fargesii*)和南方泡桐(*P. australis*)等7个种,泡桐除东北北部、内蒙古、新疆北部和西藏等地区外全国均有分布,是我国重要的速生用材树种之一<sup>[4]</sup>。赵留振用泡桐叶、花、皮和根有效地治疗人冻疮、下肢溃疡、风鹤膝风、峰螫伤、骨折和肩炎等外科常见病,暗示了泡桐叶、花、皮和根等组织器官可能含有具有治疗作用的次生代谢产物<sup>[5]</sup>。李晓强等采用硅胶色谱层析柱和波谱分析从白花泡桐叶中分离鉴定洋芹素(I)、木犀草素(II)、橙皮素(III)、柚皮素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷(IV)、熊果苷(V)、4-羟苜蓿- $\beta$ -D-葡萄糖苷(VI)、落叶酸(VII)、1-乙酰基-2-(3'2 羟基)十八烷酸甘油酯(VIII)等8种新的化合物<sup>[6]</sup>。张培芬和李冲用硅胶柱色谱和聚酰胺柱色谱从白花泡桐花中分离纯化次生代谢产物,经波谱分析鉴定出11种黄酮类化合物<sup>[7]</sup>。陈保红和李寅超以卵蛋白致敏的引喘小鼠为动物模型,观察泡桐花精油对小鼠哮喘气道的抗炎作用,结果表明泡桐花精油对哮喘气道过敏性炎症具有较好的抗炎作用<sup>[8]</sup>。Hassi 等用 MTT 法、流式细胞术和蛋白印迹等方法检测熊果酸对细胞活性和细胞凋亡的影响,结果表明熊果酸显著地抑制了 PC-3 和 LNCaP 等癌细胞的增殖,并导致了 PC-3 和 LNCaP 等癌细胞的凋亡<sup>[9]</sup>。Kim 等用 ELISA、RT-PCR 和电泳运动转移等技术检测金银花木犀草素对人结肠上皮细胞 HT29 合成 IL-8 的作用,结果表明木犀草素通过封锁结肠上皮细胞有丝分裂原激活蛋白激酶的磷酸化、降解 I- $\kappa$ B 和活化 NF- $\kappa$ B 等途径抑制肠上皮细胞分泌 IL-8 的作用<sup>[10]</sup>。湖南湘西宏成制药有限公司以白花泡桐叶为药材研发“复方桐叶烧伤油”,其国药准字为 Z20063825,临床试验结果表明该药物具有清热解毒,祛腐生肌,抗感染、止痛好、愈合快,深 II 度烧

烫伤一般不留疤,小面积 III 度烧伤可治愈等特点。上述国内外研究结果表明,白花泡桐叶、花、根、花等组织器官含有熊果酸、木犀草素等多种生物活性的次生代谢产物,可制成抗癌、抗菌和抗感染的药品。目前有关白花泡桐内生真菌的研究国内外尚未见报道,本文报道了湖南湘西白花泡桐内生真菌的分离鉴定及其抗菌活性,为寻找新型抗菌物质提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 植物样本:**2008年8月,白花泡桐采集于湖南省湘西土家族苗族自治州宏成制药有限公司中药种子繁殖基地。

**1.1.2 供试指示菌:**大肠杆菌(*Escherichia coli*) CGMCC 1.1103 株,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CGMCC 1.769 株和白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10123 株均由吉首大学生物资源与环境科学学院微生物实验室保存。

**1.1.3 主要试剂和培养基:**TaqDNA 聚合酶、DNA 凝胶纯化试剂盒和 DNA marker DL2000 均为大连宝生物工程公司产品;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯去皮,切成小块称取 200 g,加水 1 L 煮沸 30 min,用双层纱布过滤,取其过滤液加葡萄糖 20 g,定容至 1 L,琼脂 20 g,自然 pH 值;马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB):不加琼脂的马铃薯葡萄糖培养基;牛肉膏蛋白胨培养基:培养大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 内生真菌的分离:**将采集的新鲜白花泡桐经自来水洗净泥土等脏物,根、茎、叶分别切为 0.5 cm 的小片。在无菌条件下,按照 Carroll 等报道的表面消毒方法<sup>[11]</sup>对样本进行表面消毒,具体步骤如下:无菌水冲洗 3 次, Tween-20 处理 30 s, 8%次氯酸钠溶液消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次, 75%酒精浸泡 5 min, 无菌水洗涤 3 次。同样无菌条件下将样本切成 0.2 cm  $\times$  0.2 cm 大小接种于 PDA 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养至出现菌落,从菌落边缘取菌丝分别接种于新鲜 PDA 平板,经反复转接得到纯化菌株,保藏待用。

**1.2.2 指示菌培养:**将枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的

单菌落接种于 5 mL 的牛肉膏蛋白胨液体培养基, 37°C 培养 18 h, 将白色念珠菌的单菌落接种于 10 mL 的 PDB 液体培养基, 35°C 培养 48 h, 用无菌水制备浓度约为  $2.2 \times 10^5$  CFU/mL 的菌悬液, 取 100  $\mu$ L 菌悬液接种于 PDA 固体培养基上, 用玻璃环进行涂抹, 用于抑菌试验。

**1.2.3 抗菌活性菌株的初选:** 采用林敏和宁喜斌报道的琼脂块法<sup>[12]</sup>对所分离得到的内生真菌进行抗菌活性的初选。具体步骤如下: 用打孔器从在 PDA 平板上生长的菌落上截取直径为 6.0 mm 的琼脂块, 用无菌镊子将琼脂块放置于涂有指示菌的 PDA 平板上, 28°C 培养 3 d, 观察及测量抑菌圈直径。

**1.2.4 抗菌活性菌株的复选:** 参照郭建新等报道的纸片扩散法<sup>[13]</sup>检测活性菌株发酵液的抑菌活性。具体步骤如下: 将初选菌株接种于 100 mL 的 PDB 液体培养基中, 28°C 摇床培养 15 d, 4000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 过滤除菌, 用旋转蒸发器将 90 mL 发酵液缩至 1 mL。将纸片放在涂有指示菌的 PDA 平板上, 点入 20  $\mu$ L 发酵液在纸片上, 28°C 培养 3 d, 观察并测量抑菌圈的直径。

**1.2.5 内生真菌形态特征观察:** 采用真菌插片培养方法对抗菌活性内生真菌的菌落、菌丝和孢子等特征进行显微镜观察, 参照《真菌鉴定手册》<sup>[14]</sup>和《现代医学真菌鉴定手册》<sup>[15]</sup>进行鉴定。

**1.2.6 ITS 序列系统发育分析:** 用真菌通用引物 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 经 PCR 从真菌基因组 DNA 中扩增出 rRNA 基因的内部转录间隔区(ITSs)。反应条件: 95°C 5 min; 95°C 1 min, 51°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物的纯化: PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用 DNA 凝胶纯化试剂盒回收琼脂糖凝胶中的 PCR 产物。纯化后的 PCR 产物由上海生工生物技术有限公司进行测序。

## 2 结果

### 2.1 抗菌活性内生真菌初选

采用组织分离法从泡桐叶、茎、根中共分离得到 19 株菌落形态特征有差异的内生真菌, 用琼脂块法从 19 株内生真菌中初选抗菌活性较强的菌株。结果表明, JSD-8、JM-1 和 JM-10 等 3 株内生真菌对枯

草芽孢杆菌、大肠杆菌和白色念珠菌均有一定的抑菌活性。

### 2.2 抗菌活性内生真菌的复选

用纸片扩散法测定菌株 JSD-8、JM-1 和 JM-10 发酵液对 3 种指示菌的抗菌活性。结果(图 1)显示: 菌株 JSD-8 对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和白色念珠菌的抑菌圈直径分别为 20 mm、6 mm 和 16 mm, 菌株 JM-1 对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和白色念珠菌的抑菌圈直径分别为 6 mm、18 mm 和 10 mm, 菌株 JM-10 对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和白色念珠菌的抑菌圈直径分别为 16 mm、14 mm 和 10 mm。结果表明, 白花泡桐内生真菌 JSD-8、JM-1 和 JM-10 具有较广谱的抑菌活性。

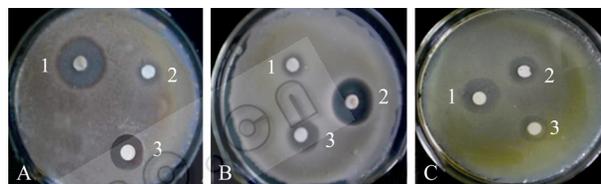


图 1 白花泡桐内生真菌对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌及白色念珠菌的抑菌作用

Fig. 1 Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Paulownia fortunei*

Note: A: *Bacillus subtilis* CGMCC 1.769; B: *Escherichia coli* CGMCC 1.1103; C: *Candida albicans* ATCC 10123; 1: Fermentation broth of JSD-8; 2: Fermentation broth of JM-1; 3: Fermentation broth of JM-10.

### 2.3 抗菌活性内生真菌的形态特征

上述抑菌试验结果表明, JSD-8、JM-1 和 JM-10 具有较广谱的抗菌活性, 因此用光学显微镜对这 3 株内生真菌进行形态特征观察和鉴定。结果显示: JSD-8 的菌落呈白色, 菌丝稀疏、长绒毛状, 菌体丝状, 梗分枝顶端成散状, 分生孢子梗轮生, 顶端着生分生孢子, 分生孢子梭形, 子囊丛集或散生(图 2A 中 1 和 2); JM-1 的菌落初为白色后逐渐变为绿色, 菌丝长, 分生孢子梗轮生, 顶端分枝, 有隔膜, 分生孢子着生于顶端, 长椭圆形(图 2B 中 1 和 2); JM-10 的菌落初为白色后变为青色, 有青褐色颗粒, 基质初白色、时间长则淡暗黄色, 梗分枝、轮生、有隔膜、菌体丝状, 孢子呈梗着生顶端、枝帚状, 孢子梗轮生、孢子无色、椭圆形(图 2C 中 1 和 2)。基于形态特征比较, 将菌株 JSD-8、JM-1 和 JM-10 分别初步鉴定为赤霉菌属、链格孢属和青霉菌属的成员。

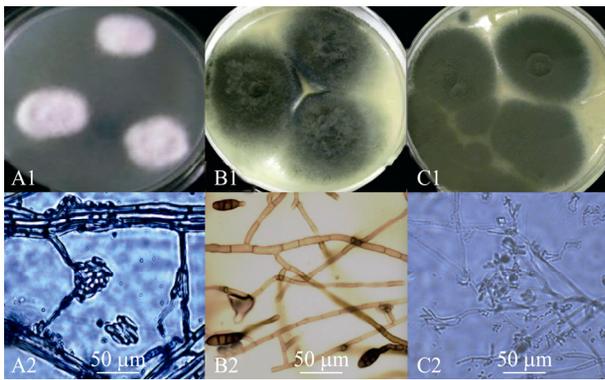


图2 抗菌活性内生真菌 JSD-8、JM-1 和 JM-10 的形态特征

Fig. 2 Morphological traits of the endophytic fungi JMD-8, JM-1 and JM-10

Note: A1 and A2: Colonies and mycelia of JSD-8; B1 and B2: Colonies and mycelia of JM-1; C1 and C2: Colonies and mycelia of JM-10.

#### 2.4 抗菌活性内生真菌的 ITS 序列分析

利用 ITS 通用引物 ITS5 和 ITS4 经 PCR 分别从内生真菌 JSD-8、JM-1 和 JM-10 基因组 DNA 中扩增出长约 500 bp 的单一 DNA 条带, 对纯化的 PCR 产物进行 DNA 测序分析。结果表明, JSD-8、JM-1 和 JM-10 的 ITS 序列长度分别为 519、559 和 546 bp, ITS 序列提交 GenBank 数据库, 登录号分别为 GQ389621、GQ389617 和 GQ389620, 并进行 BLAST 检索, 调取同源性较高的数据, 用 ClustalX 8.1 软件进行多序列对比并进行人工校正, 运用软件 MEGA 3.0 按照 N-J 法聚类构建系统发育树(图 3)。结果表明: JSD-8 被聚类在 *Gibberella* 这个组内, JSD-8 与 *Gibberella moniliformis* Fm-X.1.7-030527-31(EU364864)被分在一个分支中, 它们 ITS

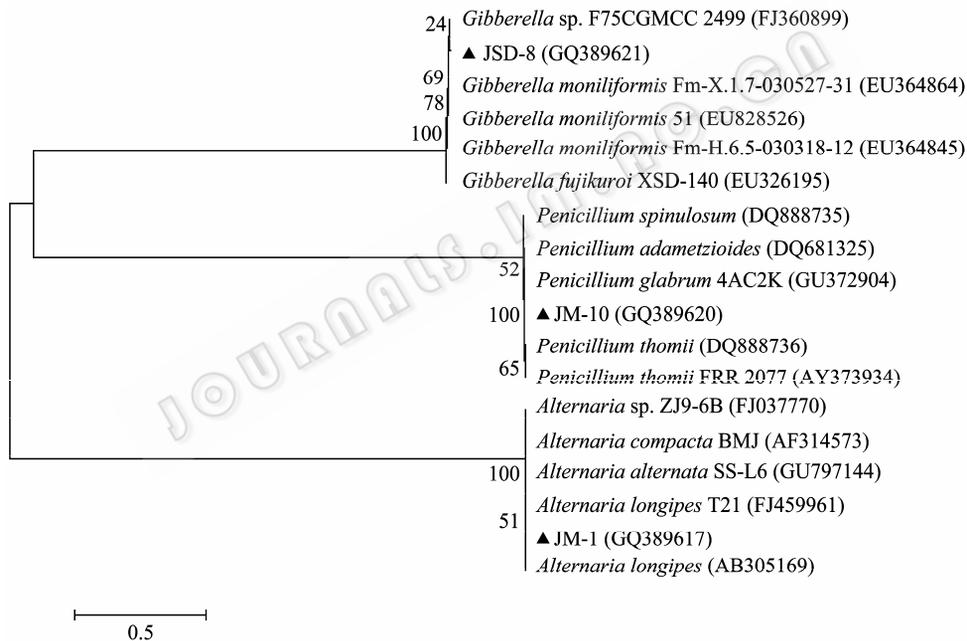


图3 基于 ITS 序列的白花泡桐内生真菌的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of ITS sequences in endophytic fungi isolated from *Paulownia fortunei*

序列的相似性达到98%; JM-1被聚类在 *Alternaria* 组内, JM-1与 *Alternaria longipes* T21(FJ459961)被分在一个分支中, 它们 ITS 序列的相似性达到99%; JM-10被聚类在 *Penicillium* 组内, JM-10与 *Penicillium thomii* DQ888736被分在一个分支中, 它们 ITS 序列相似性达到99%。因此, 将 JSD-8、JM-1和 JM-10分别鉴定为串珠赤霉菌(*Gibberella moniliformis*)、长柄链格孢菌(*Alternaria longipes*)和托姆青霉菌(*Penicillium thomii*)。

### 3 讨论

王玉君等从栽培和野生远志的根、茎、叶中分离到85株内生真菌, 并对这些分离菌株进行了鉴定和抑菌活性检测, 结果发现它们隶属于23个真菌属, 其中交链孢霉属占总数的35.6%, 抑菌试验结果显示远志内生真菌对枯草芽胞杆菌、宋内氏痢疾杆菌、大肠杆菌、白色念珠菌和九州镰孢霉等5种指示菌均具有较强的抑菌活性<sup>[16]</sup>。刘小莉等采用

组织分离法从银杏健康组织中分离得到55株内生真菌, 其中28株不产孢子, 将其它菌株分别被鉴定为青霉、曲霉、交链孢霉和筒梗孢霉等真菌, 其中交链孢霉只对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有较强抑菌活性<sup>[17]</sup>。上述研究表明, 药用植物内生真菌不仅能作为对环境无害农药的新的微生物资源, 还可以产生一些重要的抗人类疾病的药物, 具有一定的开发利用价值。

本研究采用组织分离法从泡桐叶、茎、根中分离得到19株菌落形态有明显差异的内生真菌, 通过琼脂块法从中筛选得到了具有抗菌活性的内生真菌JSD-8、JM-1和JM-10菌株。采用纸片扩散法测定JSD-8、JM-1和JM-10发酵液的抗菌活性, 结果显示: 菌株JSD-8对枯草芽胞杆菌和白色念珠菌的抗菌活性较强, 但对大肠杆菌的抗菌活性较弱; 菌株JM-1对大肠杆菌和白色念珠菌的抗菌活性最明显, 但对枯草芽胞杆菌的抗菌活性较弱; 菌株JM-10对枯草芽胞杆菌、大肠杆菌和白色念珠菌均具有较好的抑菌活性。本试验结果表明, 白花泡桐内生菌JSD-8、JM-1和JM-10对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和真菌的抗菌活性有一定的差异。

根据3株抗菌活性菌株的菌落、菌丝和孢子的形态学特性, 将JM-1、JM-10和JSD-8分别鉴定为赤霉菌属、链格孢属和青霉属的真菌, 对这3株抗菌活性菌株进一步进行ITS序列系统发育分析, 结果表明JSD-8、JM-1和JM-10分别为串珠赤霉菌、长柄链格孢菌和托姆青霉菌。

## 参 考 文 献

- [1] Sturz AV, Nowak J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 2000, **15**(2): 183-190.
- [2] Strobel GA. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2002, **22**(4): 315-333.
- [3] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, **260**(5105): 214-216.
- [4] 祁承经. 湖南植物名录. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1987: 36-37.
- [5] 赵留振. 泡桐的临床外用. 中医外治杂志, 2003, **12**(2): 48.
- [6] 李晓强, 武静莲, 曹斐华, 等. 白花泡桐叶化学成分的研究. 中药材, 2008, **31**(6): 850-852.
- [7] 张培芬, 李冲. 白花泡桐花黄酮类化学成分研究. 中国中药杂志, 2008, **33**(22): 2629-2632.
- [8] 陈保红, 李寅超. 泡桐花精油抗哮喘气道炎症的实验研究. 中医研究, 2007, **20**(10): 16-18.
- [9] Kassi E, Papoutsi Z, Pratsinis H, et al. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2007, **133**(7): 493-500.
- [10] Kim JA, Kim DK, Kang OH, et al. Inhibitory effect of luteolin on TNF- $\alpha$ -induced IL-8 production in human colon epithelial cells. *International Immunopharmacology*, 2005, **5**(1): 209-217.
- [11] Carroll GC, Carroll FE. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany*, 1978, **56**(24): 3034-3043.
- [12] 林敏, 宁喜斌. 具抑菌活性海洋微生物的筛选. 微生物学杂志, 2005, **25**(5): 23-25.
- [13] 郭建新, 孙广宇, 张荣, 等. 银杏内生真菌抗真菌活性菌株的分离和筛选. 西北农业学报, 2005, **14**(4): 14-17.
- [14] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科技出版社, 1979: 9-20.
- [15] 吴绍熙. 现代医学真菌鉴定手册. 北京: 中国协和医科大学联合出版, 1998: 17-301.
- [16] 王玉君, 崔晋龙, 苏红, 等. 远志内生真菌抑菌活性筛选. 微生物学通报, 2009, **36**(3): 404-411.
- [17] 刘小莉, 周剑忠, 黄开红, 等. 古银杏内生真菌的分离及其抑菌活性. 微生物学通报, 2009, **36**(10): 1513-1518.