

## 葛内生真菌抑菌活性菌株的筛选及鉴定

万陕宁, 麻玉萍, 王家稳, 魏希颖\*

陕西师范大学生命科学院教育部药用植物资源与天然药物化学重点实验室, 西安 710119

**摘要:** 对药用植物葛的 112 株内生真菌进行抑菌活性的观察, 结果显示: J5-2、J100-2、J31-3 这 3 株菌对细菌及植物病原真菌具有较好的抑制作用, 其中 J100-2 对苹果树腐烂病菌 (*Valsa mali*) 等 5 种植物病原真菌均有不同程度的抑制作用, 抗菌谱较广。通过形态学特征观察和 rRNA 基因 ITS 序列系统发育分析对 J100-2 进行鉴定, 可知 J100-2 为半知菌门, 球壳孢目, 球壳孢科, 茎点霉属, 巨腔茎点霉 (*Phoma macrostoma*)。

**关键词:** 葛; 内生真菌; 抑菌活性; 鉴定

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

Identification and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi from *Pueraria lobata*

WAN Shan-ning, MA Yu-ping, WANG Jia-wen, WEI Xi-ying\*

College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China

**Abstract:** A total of 112 strains of endophytic fungi were isolated from the medicinal plant *Pueraria lobata*, their antimicrobial activity were investigated. The results showed that endophytic fungi J5-2, J100-2 and J31-3 had remarkable antimicrobial activities to bacteria and plant pathogenic fungi. J100-2 had varying degrees of antimicrobial activities against 5 plant pathogenic fungi including *Valsa mali*. It showed that J100-2 had a wide antimicrobial spectrum. J100-2 was identified by its morphological features and phylogenetic analysis based on internal transcribed spacer of rRNA gene sequence comparison. Fungal morphological and molecular identification demonstrated that J100-2 represented *Phoma macrostoma*.

**Key words:** *Pueraria lobata*; endophytic fungi; antimicrobial activity; identification

研究报道, 植物内生菌具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化等多种生物活性, 对于植物内生真菌抗菌活性的研究是内生真菌研究的主要内容<sup>[1,2]</sup>, 也是人们目前寻找新型药物的重要来源<sup>[3]</sup>。

葛 (*Pueraria lobata*), 是我国卫生部首批批准的药食两用植物, 其根、茎、叶、花均可入药, 临床上常用单味药或复方制剂治疗冠心病、心肌梗塞和高血压病, 现已广泛用于食品、药品、化妆品等领域<sup>[4]</sup>。本研究在实验室前期研究的基础上, 对分离自葛的 112 株内生真菌的抗菌作用进行研究, 以期抗菌药物的获得找到新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

内生真菌: 陕西师范大学应用微生物实验室保

存的 112 株葛内生真菌。

供试指示细菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* 26003)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* A70)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* A18)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium* A20)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans* A89)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* A99)、白色葡萄球菌 (*Staphylococcus white* A113)、藤黄八叠球菌 (*Sarcinaluteu* A119)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis* 2429)、肺炎链球菌 (*streptococcus pneumoniae* 1692)。

指示植物病原真菌: 番茄灰霉菌 (*Botrytis cinerea*)、苹果树腐烂病菌 (*Valsa mali* Var)、葡萄炭疽病菌 (*Colletotrichum*)、油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、玉米大斑病菌 (*Helminthosporium maydis*)、辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum capsici*)、小麦根腐病菌 (*Bipolaris sorokiniana*)。供试菌株均由陕西省微生物研究所提供, 陕西师范大学应用微生物实验室保存。

收稿日期: 2013-08-21 接受日期: 2013-12-10

基金项目: 陕西省自然科学基金项目 (2013JM3006)

\* 通讯作者 Tel: 86-013379257603; E-mail: xiyingwei@snnu.edu.cn

### 1.1.2 试剂

青霉素钠(哈药集团制药厂生产,批号:A061115207);链霉素(Amresco,批号:LOTZO10/07);氟康唑(山东康宁药业有限公司,批号:H44023370);两性霉素(AmB)(武汉远成共创制药有限公司,批号:H20070816);Taq聚合酶、扩增缓冲液、DNA Marker DL2000,购自上海生工生物公司。

### 1.1.3 培养基<sup>[5]</sup>

细菌培养基:牛肉膏蛋白胨培养基;真菌培养基:PDA培养基。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌种活化

细菌的活化:将指示菌接种到牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上,37℃恒温培养18~24h,备用。

真菌的活化:将指示真菌接种到PDA斜面培养基上,28℃的恒温培养48~72h,备用。

### 1.2.2 葛内生真菌抗细菌活性观察<sup>[6]</sup>

吸取200μL指示菌悬液,涂布于牛肉膏蛋白胨培养基表面,制成含菌平板,其上放置3个无菌牛津杯,用移液枪加入200μL葛内生真菌的发酵液,等量的青霉素钠(80 IU/mL)和链霉素(50 mg/mL)作为阳性对照,无菌水做阴性对照,以上均在37℃培养24h,用游标卡尺测量抑菌圈直径,抑菌圈的边缘以肉眼见不到菌明显生长为限。选取抑菌作用较好的菌株继续进行下一步研究。

### 1.2.3 葛内生真菌抗植物病原真菌活性的观察

将抗细菌效果较好的内生真菌,运用皿内对峙法<sup>[7]</sup>进行抗真菌活性观察,即将内生真菌和指示真菌分别用5mm的打孔器制成菌饼,内生真菌菌饼放在固体培养基的中央,在其周围等径放置4个指示菌的菌饼,28℃恒温培养72h,用PDA培养基上正常培养的植物病原菌作为对照,选出有抑菌带的菌株。

将上述实验中具有明显抑菌带的菌株,参照郭建新报道的纸片扩散法<sup>[8]</sup>进行复筛,方法如下:将

植物病原菌悬液稀释至浓度为 $10^8$  CPU/mL,吸取200μL涂布到PDA平板上,制成含菌板。将直径为5mm的无菌滤纸片放在含菌板上,其上加20μL真菌发酵液,做3个重复,28℃恒温培养72h,记录菌株发酵液抑菌圈的直径,结果取平均值。两性霉素AmB(1 mg/mL)和氟康唑(1 mg/mL)作为阳性对照,无菌水作为阴性对照,挑选出抑菌圈直径最大的菌株。

### 1.2.4 广谱抗菌菌株的形态学鉴定

采用真菌插片培养方法对高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>[9]</sup>和《现代医学真菌鉴定手册》<sup>[10]</sup>进行鉴定。

### 1.2.5 广谱抗菌菌株分子生物学鉴定:

用真菌通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAAC-CTGCGG-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℃5min;95℃1min,51℃1min,72℃1min,35个循环;72℃10min。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 结果与讨论

### 2.1 葛内生真菌抗细菌活性测试结果

葛内生真菌抗细菌活性测试结果如表1及表2所示。从表1中可以看出,在所有内生真菌中,抗菌活性菌株有74株,占分离到内生真菌的66%。其中根中得到22株,茎中有47株,叶中有5株。其中高活性菌株(抑菌圈 $\Phi \geq 15$  mm)有39株,占抗菌活性菌株的42%。

从表2中可看出,在39株高活性菌株中,J1-3、J5-2、J24-1、J25-2、J31-3、J100-2、GG9这7株菌对8种以上指示菌均有抑制作用,且抑菌效果较好。

表1 葛内生真菌的次生代谢产物的抑菌活性及其分布

Table 1 The antimicrobial activities and distribution of endophytic fungi metabolites in *Pueraria lobata*

存在部位 Position	测试株数 Strains	活性株数 Activity strain	抑菌活性 Antifungal activity		
			低活性 Low activity	中等活性 Middle activity	高活性 High activity
根 root	31	22	5	4	13
茎 stem	61	47	14	8	25

叶 leaf	20	5	3	1	1
合计 total	112	74	22	13	39

注:低活性:抑菌圈  $\Phi < 10$  mm,中等活性:抑菌圈  $10 \text{ mm} \leq \Phi < 15$  mm,高活性:抑菌圈  $\Phi \geq 15$  mm

Note: Low activity:  $\Phi < 10$  mm; Middle activity:  $10 \text{ mm} \leq \Phi < 15$  mm; High activity:  $\Phi \geq 15$  mm.

表 2 39 株高活性葛内生真菌代谢产物抑菌实验结果

Table 2 Antimicrobial experiment of high active 39 strains

菌株编号 No.	测试细菌 Tested bacteria									
	A70	26003	A18	A21	A89	A99	A113	A119	1692	2429
GG4	-	+	-	++	-	+	+	++	-	-
GG6	-	-	+	+	++	-	+	+	++	+
GG8	-	+	+	++	-	-	+	-	-	+
GG9	+	+	+	++	+	++	++	-	-	+
GG10	-	-	+	-	+	+	++	-	-	-
GG11	-	+	-	-	++	-	+	-	-	-
GG12	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-
GG14	-	+	++	-	+	-	++	++	-	+
GG16	-	-	+	-	+	-	-	++	-	-
G4-1	++	+	-	+	+	-	-	-	-	-
G7-1	-	+	+	++	+	-	-	-	-	-
G10-1	-	+	+	-	++	-	++	-	-	-
G12-1	+	++	-	-	+	-	-	-	+	-
J2-1	+	++	-	-	+	++	+	-	+	+
J1-3	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++
J3-1	-	-	-	-	-	++	+	+	+	-
J4-4	-	+	-	++	-	+++	-	-	-	-
J5-2	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++
J6-1	-	++	+	+	-	++	-	-	-	-
J7-1	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-
J9-3	-	+	-	++	++	-	-	-	-	-
J12-1	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-
J10-2	-	+	+	-	-	-	-	++	-	-
J15-2	-	+	++	-	++	-	-	-	-	-
J11-5	-	-	-	-	++	-	-	+	-	-
J8-1	-	+	-	-	+++	-	-	-	-	-
J8-4	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
J11-3	-	++	-	++	-	++	-	++	-	-
J22-2	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
J24-1	+	++	++	+	+	++	++	-	-	+
J25-2	+	++	+	+	+	++	+	-	-	+
J29-1	-	-	-	++	++	++	++	++	+	++
J29-2	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-
J31-3	++	++	++	++	++	-	+	+	++	++

J31-4	-	+	+	++	-	-	+	++	+	++
J31-5	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-
J32-1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
J36-2	-	++	+	-	-	++	-	-	-	-
J100-2	-	++	++	+	+	++	-	++	+	++
Y16-4	+	-	+	-	++	-	-	-	-	+
DS	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DL	+++	+++	++	+++	+++	-	+++	+++	+++	++
DQ	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++

注:①G表示根部;J表示茎部;Y表示叶部。

②-:Φ<10 mm;+:10 mm<Φ<15 mm;+:15 mm<Φ<20 mm;+:+:Φ>25 mm。

③ DS:阴性对照无菌水;DL:阳性对照链霉素(50 mg/L);DQ:对照青霉素(80 IU/mL)。

Note:①G—Root,J—Stem,Y—Leaf.

②-:Φ<10 mm;+:10 mm<Φ<15 mm;+:15 mm<Φ<25 mm;+:+:Φ>25 mm.

③DS:sterile water (negative control);DL:streptomycin (50 mg/L) (positive control);DQ:penicillin(80 IU/mL) (positive control).

### 2.2 葛植物内生真菌抗植物病原菌活性测试结果

对7株具有较好抗细菌活性的菌株,进行抗植物病原菌活性测试,结果见表3。从表3中可发现,J15-2、J31-3、J100-2对几种不同的病原真菌有较广泛

的抑制作用。其中J100-2对5株病原真菌(苹果树腐烂病菌、番茄灰霉菌、油菜菌核病菌、玉米大斑病菌、辣椒炭疽病菌)均有抑制作用,是一株广谱的抗菌活菌性菌株。

表3 葛内生真菌代谢产物抗真菌实验

Table 3 Antimicrobial experiment of *Pueraria lobata*

测试菌 Tested strains	番茄灰霉菌 <i>Botrytis cinerea</i>	苹果树腐烂菌 <i>Valsa mali</i>	葡萄炭疽菌 <i>Colletotrichum</i>	油菜菌核 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	玉米大斑病菌 <i>Helminthosporium maydis</i>	辣椒炭疽菌 <i>Colletotrichum capsici</i>	小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>
GG9	F -	-	-	-	-	-	-
	J -	-	-	-	-	-	-
J1-3	F 14.70	-	-	-	-	-	-
	J 15.78	-	-	-	-	-	-
J5-2	F 13.02	12.06	-	-	-	-	-
	J 12.11	13.08	-	-	-	-	-
J24-1	F -	15.19	-	-	-	-	-
	J -	10.10	-	-	-	-	-
J25-2	F -	-	-	-	-	-	-
	J -	-	-	-	-	-	-
J31-3	F 15.00	9.65	8.04	-	-	-	-
	J 13.25	9.45	9.12	-	-	-	-
J100-2	F 11.04	16.04	-	9.04	8.04	12.53	-
	J 12.09	15.30	-	13.08	9.05	16.23	-
AmB	23.04	-	-	20.10	-	-	-
KFC	-	-	-	-	-	-	-

注:①AmB:阳性对照两性霉素B(1mg/mL),KFC:阳性对照氟康唑(1mg/mL)。

②F:发酵液,J:菌丝体。

Notes:①AmB:Amphotericin B (1mg/mL) as positive control ,KFC:fluconazol (1mg/L) as positive control.

②F:Fermentation broth,J:Mycelia.

### 2.3 广谱抗菌菌株J100-2的形态学鉴定

经培养观察发现J100-2菌株在PDA培养基上

培养3天后,菌落呈直径为3~4cm的圆形,表面干燥,中央凸起呈褐黑色,四周较松散成黑色厚绒状,

边缘为白色,菌丝呈放射状向四周生长,菌落背面为黄色。经显微观察发现其菌丝较细,有隔,分生孢子囊呈球形。结果见图1和2。根据菌株J100-2的菌落形态和显微特征,初步将其鉴定为茎点霉属真菌 *Phoma macrostoma*。

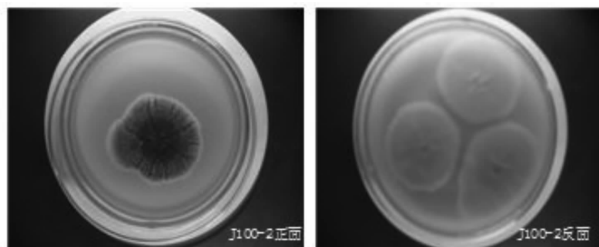


图1 J100-2的菌落形态特征

Fig. 1 colonial characteristics of J100-2

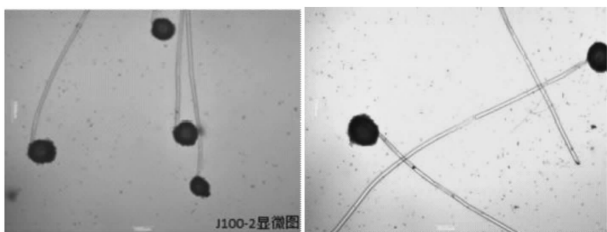


图2 J100-2的菌丝体和孢子(10×40)

Fig. 2 Spore and hgphae morphology of J100-2 (10×40)

## 2.4 广谱抗菌菌株 J100-2 的 ITS 序列分析

利用 ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 经 PCR 从内生真菌 J100-2 基因组 DNA 中扩增出长约 700bp 的单一 DNA 条带,对纯化的 PCR 产物进行 DNA 测序分析。结果表明,J100-2 的 ITS 序列长 750bp,将其序列与 GenBank 数据库进行 BLAST 比对分析,对菌株的 18SrRNA 序列采用 Clustalx 软件进行序列比对,然后利用 MEGA 4.0 软件的最大可能性法(Maximum Likelihood methods),构建了分离得到的产活性菌株及同源性较高的系统发育树。并且绘制出 18SrRNA 序列系统发育树(图3)。

结果表明:该序列与茎点霉属的真菌 *Phoma macrostoma* 的 ITS 序列(序列号为 HM755951.1)同源性为 99%,由图3看出菌株 J100-2 与 HM755951.1 处于一个最小的分枝内,进化上距离最近。结合前面进行的形态学特征的鉴定,从而进一步验证菌株 J100-2 与 *Phoma macrostoma* 是同一个种,根据最新版的《真菌词典》将其无性阶段归于巨腔茎点霉。其分类地位如下:半知菌(*Deuteromycotia*)腔胞纲(*Coelomycetes*)球壳孢目(*Sphaeropsidales*)茎点霉属

(*phoma*)巨腔茎点霉(*P. macrostoma*)

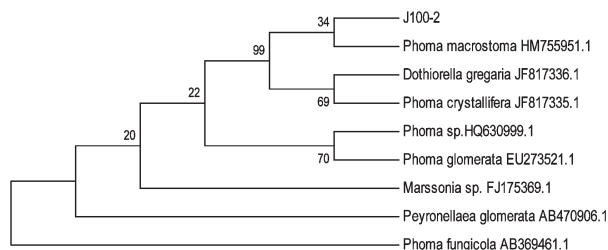


图3 J100-2 内生真菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of endophytic fungus J100-2

## 2.5 讨论

植物内生菌作为抗生素来源的一个新的研究领域,发展潜力巨大。其产生的抗菌物质往往是新颖的,研究显示,51%的从植物内生真菌分离的生物活性物质是以前没有发现的化合物<sup>[11]</sup>;且大多数对动、植物细胞无毒;内生真菌的次级代谢产物:生物碱、环肽类、萜类、甾体类、醌类化合物、脂类、酚类及有机酸等都具有一定抗菌活性<sup>[12]</sup>,它们的天然产物都可以杀灭或抑制很多病原微生物。

本实验对葛的不同组织分离到的内生真菌进行抗菌活性菌株的大规模的筛选,得到 39 株活性较高的菌株,说明葛内生真菌中抑菌活性菌株的普遍性;有 7 株菌对细菌具有良好的抑制作用,其中 5 株菌对植物病原菌具有不同程度的抑制作用,尤其是 J100-2 对多种病原菌具有抑制作用,结果表明葛内生真菌在果树病害防治领域具有进一步开发的价值,以后可开展活性代谢产物的提取及抑菌活性物质成分分析的进一步研究。

## 参考文献

- 1 Zhou SL(周松林),Chen SL(陈双林),Tan GH(谭光宏), et al. Antibacterial substances of endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2010,22:193-196.
- 2 Luo JH(罗江华),Li K(李科),Yao FC(姚福成), et al. Isolation and antimicrobial activity of endophytic fungi from *Paulownia fortunei*. *Microbiol China*(微生物学通报),2010,37:1481-1485.
- 3 Carroll M,Colombo AL,Fedeli L, et al. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. *Ann Microbiol*,2000,50:3-13.
- 4 Yin W(尹巍),Wang SH(王帅). separation and purification of pueraria starch and medicinal value analysis. *Grain Proc*(粮食加工),2008,33:84-86.