

## 一株仙人掌植物内生真菌的分离鉴定及活性研究\*

秦 盛<sup>1</sup> 陈有为<sup>1\*\*</sup> 邢 珂<sup>1</sup> 张 琦<sup>1</sup> 吴少华<sup>1</sup>(云南大学云南省微生物研究所 昆明 650091)<sup>1</sup> (夏翰生物工程(上海)有限公司 上海 200051)<sup>2</sup>

**摘要:** 从元江仙人掌的茎中分离到一株产广谱、高活性抑菌物质的内生真菌, 经测定对细菌、植物病原真菌和皮肤致病真菌共 21 种病原微生物有较为明显的抑制作用。形态特征表明, 该菌株与曲霉属 (*Aspergillus*) 中的土生曲霉 (*Aspergillus terreus*) 的特征基本一致, 18S rDNA 序列分析显示本菌株与土生曲霉的同源性高于 99%, 但该菌株的分生孢子梗上有明显的瘤状突起, 不同于模式菌株。因此认为该菌株为土生曲霉的一个变种, 命名为土生曲霉云南变种 (*Aspergillus terreus* var. *yunnanensis*)。并对其活性物质的生产条件进行了初步摸索, 确定用查氏培养基为最佳种子培养基, PDA 培养基为最佳发酵培养基, 4d 为最适发酵时间。

**关键词:** 内生真菌, 土生曲霉, 抑菌活性

**中图分类号:** Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0095-05

**Isolation, Identification and Bioactivity Screening of Endophytic Fungus  
Associated with *Opuntia ficusindica* Mill<sup>\*</sup>**

QIN Sheng<sup>1</sup> CHEN You-Wei<sup>1\*\*</sup> XING Ke<sup>1</sup> ZHANG Qi<sup>1</sup> WU Shao-Hua<sup>1</sup>(Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)<sup>1</sup>(XiaHan Biotech (Shanghai) CO., LTD, Shanghai 200051)<sup>2</sup>

**Abstract:** An endophytic fungus YM39661 producing broad-scope, high activities and antipathogenic substances was isolated from the stem of *Opuntia ficusindica* Mill., which has strong activity against twenty-one pathogenic microorganisms related to human and plants. The morphological characteristics of this strain are similar to *Aspergillus terreus* and the 18S rDNA sequence homology between strain YM39661 and *Aspergillus terreus* is more than 99%. But the conidiophore have obvious strumae, different to the model strain. The name *Aspergillus terreus* var. *yunnanensis* is proposed for strain YM39661. The fermentation conditions of this strain were investigated for the biosynthesis of bioactive metabolites.

**Key words:** Endophytic fungi, *Aspergillus terreus*, Inhibiting activity

植物内生真菌能够产生结构新颖、功能特殊的次生代谢产物, 是新化合物、新药物的潜在资源<sup>[1]</sup>。仙人掌 (*Opuntia*) 作为药用植物具有悠久的历史, 仙人掌含有有机酸、甾醇、生物碱、黄酮和萜类等成分, 具有抑菌、消炎、镇痛、降血糖等多种药理作用及多种临床用途<sup>[2]</sup>。目前尚未见仙人掌植物内生真菌的研究报道, 本文在研究仙人掌植物内生真菌的过程中, 分离得到一株曲霉 YM39661, 现将其鉴定和活性研究结果报道如下。

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 20502021)

其他作者: 李治瑾<sup>1</sup> 李绍兰<sup>1</sup> 杨丽源<sup>1</sup> 夏国兴<sup>2</sup>

\*\* 通讯作者 Tel: 0871-5033539, E-mail: ywchen@ynu.edu.cn

收稿日期: 2005-11-07, 修回日期: 2006-01-18

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物样品来源: 元江仙人掌 (*Opuntia ficusindica* Mill.) 采自云南省元江县。

1.1.2 培养基: 种子培养基: 液体 PDA 培养基、查氏培养基、麦芽膏-酵母膏培养基、液体 PDA 培养基+10% 仙人掌汁。发酵培养基: (1) 查氏培养基; (2) PDA 液体培养基; (3) 葡萄糖黄豆饼粉培养基: 葡萄糖 100g、豆饼粉 25 g、玉米浆 1g, 氯化钠 5g, 磷酸二氢钾 0.2g, 硝酸铵 2g、蒸馏水定容至 1,000 mL、pH 自然; (4) 葡萄糖玉米浆培养基: 葡萄糖 100g、豆饼粉 20g、玉米浆 2 g、磷酸二氢钾 0.25g、硝酸钠 2g、氯化钠 5g、碳酸钠 8g、蒸馏水定容至 1,000 mL、pH 自然; (5) 淀粉玉米浆培养基: 淀粉 30g、糊精 10g、玉米浆 8g、硫酸锌 13g、尿素 1g、磷酸二氢钾 9g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3g、硫酸锰 0.02g、碳酸钙 8 g、蒸馏水定容至 1,000mL、pH 自然。

### 1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离: 预先取仙人掌健康植株用自来水冲洗干净、晾干水分后, 切取仙人掌肉质茎并去皮, 采用下述方法进行表面消毒: 75% 酒精漂洗 (20 ~ 30s) → 无菌水冲洗 → 0.2% 氯化汞漂洗 (10 ~ 20s) → 无菌水冲洗数次。上述仙人掌原植物样品经处理完毕在无菌状态下切成 0.2cm × 0.2cm 长段 (片) 置于培养基内, 于  $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  条件下静置培养。培养 5 ~ 10d 后, 培养基中可见有菌落形成, 挑取植物组织周围的菌落转接入 PDA 斜面中并纯化。采用组织印迹法<sup>[3]</sup> 进行灭菌效果的检验。即用灭菌镊子取供试材料, 使其表面与固体平板培养基接触 3 ~ 5min 取出, 培养 3 ~ 5d 无菌落出现。

1.2.2 抗菌活性测定: 抗菌活性测定培养基细菌类采用牛肉膏蛋白胨培养基; 皮肤致病真菌采用沙氏培养基; 植物病原真菌采用 PDA 培养基。将 YM39661 接入 7mL PDA 液体培养基, 置于  $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  摇床上 (200r/min) 旋转培养 5d, 无菌条件下过滤除去菌丝体, 取发酵液加入等体积 95% 乙醇, 浸提 48h 后浓缩至干, 加入无菌水制成发酵液样品。采用杯碟法测定抗菌活性, 每个牛津杯加入 200 $\mu\text{L}$  发酵液样品, 细菌置于  $37^\circ\text{C}$  培养 24h, 真菌置于  $28^\circ\text{C}$  培养 48h, 测量抑菌圈直径的大小。供试菌株为细菌、皮肤致病真菌、植物病原真菌共 30 株指示菌。

1.2.3 菌株鉴定: (1) 形态观察: 从斜面上蘸少量孢子, 分别点植于 PDA 培养基、查氏培养基、麦芽汁培养基的平板上, 培养后观察菌落的特征, 培养特征观察参照文献 [4]; 菌株形态特征在 Olympus BH-2 光学显微镜及 JSM-5600LV 型扫描电镜、JEM-1011 型透射电镜下观察。(2) 18S rDNA 序列分析: 将待测菌株培养新鲜菌株, 提取总 DNA, 采用通用引物进行 18S rDNA 基因扩增, PCR 产物测序。将所测定的 18S rDNA 序列提交 NCBI 数据库, 应用 BLAST 程序与数据库中相关种、属的序列进行比较分析。系统发育分析采用 Mega2.1 软件进行。

1.2.4 发酵条件的优化: (1) 种子培养基选择: 用 500 mL 的三角烧瓶, 每瓶中装入 100 mL 种子培养基, 将培养好的斜面转入种子培养液中,  $28^\circ\text{C}$ 、200r/min 下摇床培养 5d。采用测菌体干重法测生物量: 在发酵过程中, 每 24h 取一瓶发酵液下摇床, 用已称重的干燥滤纸进行抽滤, 然后将菌体在  $80^\circ\text{C}$  烘箱至恒重, 称重, 并换算成 g/L 干重。(2) 发酵培养基确定: 将菌株 YM39661 接入选择好的液体种子培养基 (100mL 培养基/500mL 三角瓶), 然后按 10% 接种量计, 将培养好的种子液接入不同的发酵培养基,

置于摇床 200r/min 震荡培养 (28℃、100mL 培养基/500mL 三角瓶)。每 24h 取样, 以金黄色葡萄球菌为指示菌, 杯碟法测定抗菌活性。

2 实验结果

2.1 菌株 YM39661 的抑菌实验

采用杯碟法对仙人掌植物内生真菌 YM39661 发酵液的 95% 乙醇浸提液进行抑菌试验, 发现发酵液 95% 其乙醇浸提液对所测定的 30 种指示菌中的 16 种细菌、2 种皮肤致病真菌和 3 种植物病原真菌有显著的抑制作用 (抑菌谱见表 1)。

表 1 菌株 YM39661 杯碟法测定抑菌谱结果

指示菌株	抑菌圈直径 (mm)	指示菌株	抑菌圈直径 (mm)
<i>Escherichia coli</i>	1.4	<i>Sardine lutea</i>	2.3
<i>Bacillus subtilis</i>	2.2	<i>Staphylococcus albus</i>	2.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.5	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.6
<i>Prate vulgaris</i>	2.7	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1.3
<i>Bacillus cereus</i>	2.2	<i>Shigella sonnei</i>	1.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.0	<i>Candida albicans</i>	1.1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.9	<i>Microphyton gypseum</i>	2.9
<i>Salmonella typhi</i>	1.8	<i>Botrytis cinerea</i>	2.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.5	<i>Isaria</i> sp.	2.0
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	2.0	<i>Bipolaris maydis</i>	2.7
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	1.5	<i>Hormodendrum compactum</i>	-
<i>Fusarium avenaceum</i>	-	<i>Hormodendrum dermatitidis</i>	-
<i>Chaetomium</i>	-	<i>Hormodendrum pedrosoi</i>	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	<i>Trichophyton gypseum</i>	-
<i>Ophiostoma minus</i>	-	<i>Microsporium canis</i>	-

Symbols: — No inhibition, Note: The average value of three repeats

2.2 内生真菌 YM39661 的鉴定

2.2.1 形态培养特征: 在查氏琼脂平板上, 28℃ 培养 7d 后, 菌落直径达 2.5cm, 质地致密, 菌落平坦, 中央部分有白色凸起, 分生孢子结构较多, 初为浅黄色, 老后变深呈黄褐色, 菌落反面暗黄色, 较淡; 在 PDA 琼脂平板上, 28℃ 培养 7d 后, 菌落直径达 3.8cm, 10d 达 5.0cm, 质地较薄, 中央有凸起, 开始有少量同心环, 中央为淡黄色, 四周近白色, 老后菌落呈土褐色, 气生菌丝较少, 背面淡黄色至黄褐色; 在麦芽汁培养基上, 28℃ 培养 7d 菌落直径达 3.5cm, 10d 为 4.5cm, 质地致密略呈絮状, 菌落较薄, 中央部分稍凸起, 气生菌丝少, 反面近无色。

2.2.2 显微特征: 分生孢子梗较长, 具有足细胞; 分生孢子梗顶端膨大成近球形, 顶囊较小, 半球形, 约 2/3 表面可育, 直径 6μm ~ 15μm; 产孢结构双层, 梗基 5μm ~ 7μm × 2μm ~ 3μm, 瓶梗 2.7μm ~ 5.5μm × 1.2μm ~ 2.0 μm; 分生孢子头致密直柱状, 颜色土黄略显橙褐色, 直径 30μm ~ 110μm × 25μm ~ 50 μm; 分生孢子呈球形, 大小约 2 μm, 壁光滑。根据以上特征, 菌株 YM39661 初步定为曲霉属中的土生曲霉 *Aspergillus terreus*, 但显微形态最显著的特征是分生孢子梗壁在光学镜下近平滑, 在电镜下有明显较密的瘤状突起, 透射电镜显示分生孢子梗外壁粗糙 (图 1~3)。

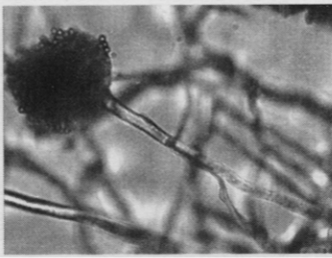


图 1 曲霉 YM39661 在光学显微镜下的形态特征(×400)

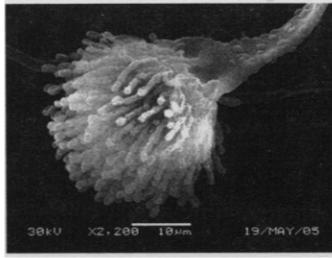


图 2 曲霉 YM39661 在扫描电镜下的形态特征(×2,200)

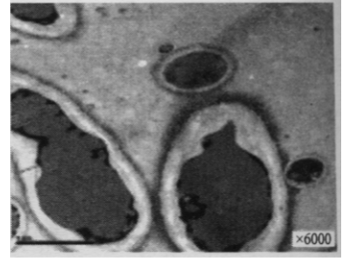


图 3 曲霉 YM39661 在透射电镜下的分生孢子梗结构(×6,000)

**2.2.3 分子鉴定结果:** 内生真菌 YM39661 的 18S rDNA 序列测定结果已经提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中, Accession numbers 是 DQ173743。菌株 YM39661 的 DNA 序列与 GenBank 中相关序列 BLAST 比较, 与目前已发表的相关菌株比较 YM39661 菌株属于曲霉属, 而且与土生曲霉的序列同源性高于 99%。采用 Mega2.1 软件, 用 N-J 法建立系统发育树, 如图 4 所示, 对其进行分析, 菌株 YM39661 与土生曲霉 (*Aspergillus terreus*) 的进化距离最近。

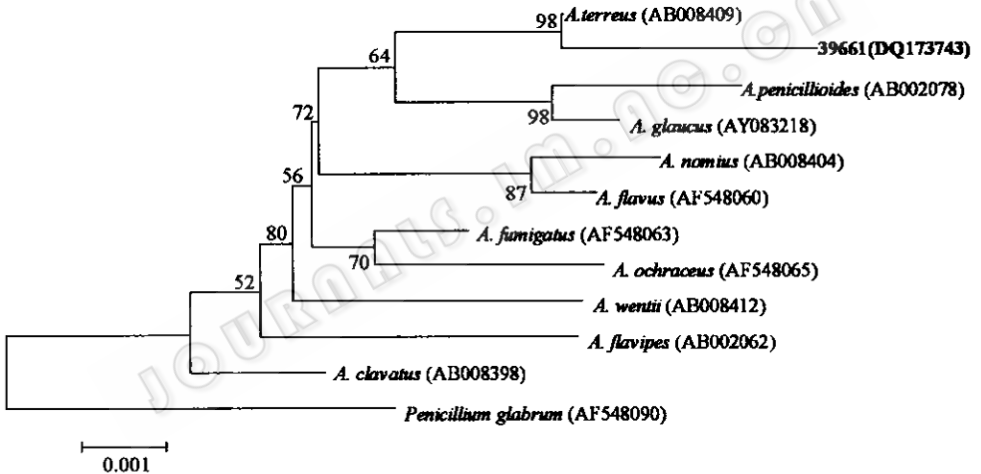


图 4 菌株 YM39661 及从 GenBank 数据库中调集的相关种构建的以 18S rDNA 序列为基础的系统发育树

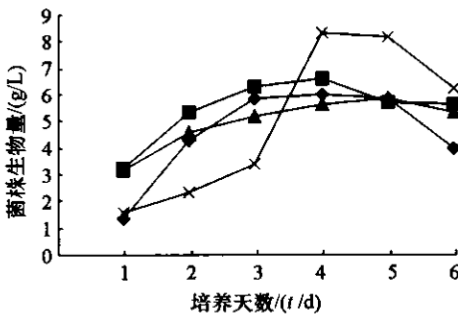


图 5 菌株 YM39661 的生长曲线  
◆ PDA, ■ 酵母膏麦芽汁,  
▲ PDA + 10% 仙人掌汁, × 查氏

### 2.3 发酵条件的优化

分别就 4 种不同成分液体种子培养基进行仙人掌植物内生真菌对比试验 (图 5), 结果表明, 采用查氏培养基, 培养 4d 后, YM39661 菌株的生物量可达最高, 其生长曲线正常。另外, 从图 6 可以看出, 在对 YM39661 发酵采用各种发酵培养基效果差别不是太大。在各种培养基中, 以液体 PDA 培养基为最佳, 在发酵的第 4d, YM39661 的发酵液中的抑菌活性物质的量最高, 此时为最佳发酵时间, 然后就进入菌体生长滞后

期, 活性物质的合成开始减少。

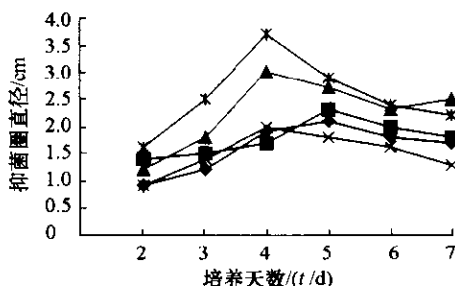


图 6 菌株 YM39661 的抑菌曲线

—◆— 酵母膏-麦芽汁, —■— 葡萄糖黄豆饼粉, —▲— 葡萄糖玉米浆,  
—×— 淀粉玉米浆, —\*— PDA

### 3 讨论

自 Strobel 等<sup>[5]</sup>从短叶红豆杉的韧皮部分离到一株产抗癌药物紫杉醇内生真菌以来, 不断有从植物内生真菌中发现抗菌、抗肿瘤等活性物质的报道<sup>[6,7]</sup>, 尤其是某些内生真菌还可以产生和宿主植物相同或相似的生理活性成分。产生的机制很可能是宿主植物将其遗传物质或信息传递给了内生真菌, 使内生真菌具有和宿主相同或相似的代谢途径, 导致其产生某些特定的物质。

在将所测得的 18S rDNA 序列提交到 NCBI 数据库进行 Blast 分析, 序列同源性比较结果表明: YM39661 与土生曲霉 (*Aspergillus terreus*) 的 18S rDNA 序列同源性达到 99.7%, 有 3 个碱基的差异。形态特征与土生曲霉较相似, 但菌株 YM39661 的显微形态表明分生孢子梗壁上有很明显的瘤状突起, 这与土生曲霉的模式菌株及其已记载的变种: 土生曲霉原变种 (*A. terreus* var. *terreus*) 与土生曲霉金色变种 (*A. terreus* var. *aureus*) 都不相同, 因此认为该菌属土生曲霉的一新变种, 定名为土生曲霉云南变种 (*Aspergillus terreus* var. *yunnanensis*)。目前真菌的传统分类方法比较混乱, 而真菌 rDNA 又相当保守, 其分类鉴定应结合形态特征、生理生化测定、化学和分子生物学方法共同完成。又据报道, 土生曲霉具有产生降血脂药物洛伐他汀 (lovastatin)<sup>[8]</sup> 和重要的有机化工原料衣康酸 (Itaconic acid)<sup>[9]</sup> 的能力, 内生真菌 YM39661 是否能产生这样的物质有待继续研究; 而在该菌的活性探索方面, YM39661 显示了较强的抑菌活性, 且抑菌谱较广, 尤其是具有抑制多种病原细菌的能力, 可能与产生抗生素类物质有关。关于该菌代谢产物的研究将继续给予报道。

### 参考文献

- [1] 皱文欣, 谭仁祥. 植物学报, 2001, 43 (9): 881 ~ 892.
- [2] 周立刚, 杨成宗, 吴建勇. 中草药, 2004, 35 (1): 103 ~ 105.
- [3] Lu H, Zou W X, Meng J C, et al. Plant Science, 2000, 151: 67 ~ 73.
- [4] 齐祖同, 孔华忠, 孙曾美. 中国真菌志 (第 5 卷). 北京: 科学出版社, 1997.
- [5] Strobel G, Stierle A, Stierle D. Mycotaxon, 1993, 38 (3): 214.
- [6] Sturz A V. Plant Pathology, 1997, 48: 360 ~ 369.
- [7] Wagenaar M M, Corwin J, Strobel G, et al. J Nat Prod, 2000, 63 (12): 1692 ~ 1695.
- [8] Alberts A W. Natl Acad Sci USA, 1980, 77 (7): 3957 ~ 3961.
- [9] Vassilev N, Kautola H. Biotechnology Letters, 1992, 14 (3): 201 ~ 206.