

远志内生真菌分离鉴定及活性筛选

崔晋龙¹ 郭吉刚² 范 黎^{1*}

(首都师范大学生命科学学院 北京 100037) (山西生物应用职业技术学院 太原 030031)

摘要 从两个不同生长时期野生远志中分离内生真菌菌株 88 株,隶属于 28 个属,研究了各菌株对 3 种指示菌的拮抗作用。结果表明,远志不同生长时期不同部位的内生真菌数量、分布、种群存在差异,其优势属为 *Alternaria* Nees。茎中内生真菌种类较多。88 株内生真菌中有 73 株菌至少能拮抗 1 种指示菌,占总菌数的 83.0%。4 株抗性较强的菌株分别隶属于 *Trichothecium* Link、*Cephalosporium* Corda、*Alternaria* Nees、*Dactuliophora* C.L.等。

关键词 远志,内生真菌,分离,鉴定,活性筛选

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0839-04

**Isolation, Identification and Bioactivity Screening of Endophytic Fungus
Associated with *Polygala tenuifolia* Willd**

CUI Jin-Long¹ GUO Ji-Gang² FAN Li^{1*}

(College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100037)

(Shanxi Biological Application Vocational Technical College, Taiyuan 030031)

Abstract Eighty-eight strains of endophytic fungus, belonging to 28 genera, were isolated from wild *Polygala tenuifolia* Willd of two different growth stage and the inhibitory activities screening to three species of microbe were conducted research. The results showed that the quantity, population and distribution of the endophytic fungi varied in different tissue and different growth stage of *P. tenuifolia*. The species of endophytic fungus distributed in stem were more than in root and leaf, and the dominant genus was *Alternaria* Nees. Seventy-three strains, accounting for 83.0% of all the isolates, presented antimicrobial activities to the tested indicators. High antimicrobial activities were found in four strains, which seperatedly belonged to the genera as follows: *Trichothecium* Link, *Cephalosporium* Corda, *Alternaria* Nees, *Trichosporiella* Kamyschko. et al.

Key words *Polygala tenuifolia*, Endophytic fungus, Isolation, Identification, Bioactivity screening

中药远志(*Radix Polygalae*)系远志科远志属植物远志(*Polygala tenuifolia* Willd)或宽叶远志(*Polygala sibirica* L.)的干燥根,始收载于《神农本草经》列为上品,被视为养命之要药。主要用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸、神志恍惚、咳痰不爽、疮疡肿毒、乳房肿痛等^[1]。它的主要有效成分是远志皂苷类化合物,国内外越来越多的研究表明,其在抗衰老、益智、抗氧化及降压等方面有广泛的生物活性。^[1]

植物内生真菌(endophytic fungus)是指生活在健康植物组织内部、但不引起植物体病害的真菌^[2],这类菌资源十分丰富,是目前开发极少的微生物类群,已经发现它们可能产生在微生物-宿主关系中

发挥作用的生理活性物质,它们的次生代谢产物在生物制药、农业生产、工业发酵等领域越来越受到人们的关注^[3],然而对于远志内生真菌的研究,国内外尚无报道。本文对野生远志内生真菌进行分离鉴定,确定了它们的属别,并对发酵培养产生的次生代谢产物进行了活性筛选,为进一步研究远志内生真菌的活性物质及生物学特性提供依据。

1 材料

1.1 供试药材

远志(*Polygala tenuifolia* Willd)采自山西省长治县雄山林场。由山西省中药药材监督所、山西生物应用职业技术学院郭吉刚鉴定。

* 通讯作者 Tel 010-68902964, E-mail: clifan@public3.bta.net.cn

收稿日期:2006-12-14,修回日期:2007-05-25

1.2 拮抗测定指示菌

革兰氏阳性细菌:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);革兰氏阴性细菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*);真菌:深红酵母(*Rhodotorula rubra*)。以上菌种由首都师范大学微生物系菌种保藏室提供。

2 方法

2.1 内生真菌的分离与纯化

将采集的新鲜远志用自来水洗净泥土等脏物,去腐叶,根、茎、叶分别切成约 0.5cm 的小段(片)。无菌条件下,按下列程序进行表面消毒:75%乙醇(3s~5s)→无菌水(3次~4次)→0.1%的升汞(3min~5min)→无菌水(4次~5次),叶片等幼嫩组织处理时间稍短。同样无菌条件下将上述表面消毒的样品切成 0.2cm×0.2cm 长段(片)接种于含 0.04%氯霉素的马铃薯固体培养基(PDA)中,置 25℃恒温培养箱中培养,5d 左右长出适当大小的菌落后,根据菌落形态的不同用接种铲切取菌落边缘 0.2cm² 的小块分别转接于新的上述培养基上,反复转接至纯培养,保藏待用。消毒后不做切割的样品作为对照。

2.2 内生真菌液体培养及发酵液处理

液体培养采用 PDA 液体培养基。在 100mL 的三角瓶中分装 20mL 培养基,放入 10 粒玻璃珠,切取 0.2cm² 的菌种块接入瓶中,25℃,180r/min 条件下摇瓶发酵培养 5d。无菌条件下取发酵液 1mL 于 Eppendorf(EP)管中,离心去菌丝和孢子,上清作抑菌试验。不接种的液体培养基作同样处理,作为阴性对照。

2.3 指示菌培养

大肠杆菌和枯草芽孢杆菌分别用牛肉膏蛋白胨液体培养基在 37℃条件下恒温培养 18h,深红酵母用酵母膏葡萄糖液体培养基 30℃条件下恒温培养 48h。

2.4 抑菌实验

采用双层平板法,混菌法倒平板制备指示菌平板,在平板上放置无菌牛津杯,按菌种编号分别将发酵液上清 120μL 加入牛津杯。每个菌株做 3 个重复。大肠杆菌和枯草芽孢杆菌平板置 37℃恒温培养,深红酵母平板置 30℃恒温培养。以阴性发酵液作对照。48h 后观察结果,测量并记录抑菌圈直径。

2.5 菌种鉴定

分类鉴定参照文献[4,5,6],其中一些不易产生孢子的菌株,采用数十天冷(4℃)、热(37℃)、弱光、水培养等多种刺激诱导其产孢。

3 结果与分析

3.1 远志内生真菌的抑菌活性

从生长期的远志中分离到 36 株内生真菌,其中根、茎、叶分别为 9、18、9 株。在 36 株内生真菌中,有 24 株至少能拮抗 1 种指示菌,占总数的 66.7%。抑菌圈大小取 3 个重复的平均值,实验结果见表 1。从表 1 可以看出,拮抗大肠杆菌的有 7 株,拮抗枯草芽孢杆菌的有 19 株,拮抗深红酵母的有 3 株。其中叶中分离的菌株 L₁ 拮抗枯草芽孢杆菌最强,拮抗大肠杆菌最强的是从根中分离的菌株 R₃,有 3 株拮抗深红酵母。同时拮抗 3 种指示菌的内生真菌菌株在生长期未分离到。

表 1 生长期远志内生真菌的抗菌活性

菌株 编号 /分离 部位	大肠 杆菌	枯草芽 孢杆菌	深红 酵母	菌株 编号 /分离 部位	大肠 杆菌	枯草芽 孢杆菌	深红 酵母
L ₁	-	+++	-	S ₁₀	-	-	-
L ₂	-	+	-	S ₁₁	-	++	-
L ₃	-	+	-	S ₁₂	-	+	-
L ₄	-	++	-	S ₁₃	-	-	-
L ₅	-	+	-	S ₁₄	-	-	-
L ₆	-	+	-	S ₁₅	-	+	-
L ₇	-	+	-	S ₁₆	-	-	-
L ₈	-	-	-	S ₁₇	-	-	-
L ₉	+	+++	-	S ₁₈	-	+	-
S ₂	-	+	-	R ₂	++	-	-
S ₃	-	+	-	R ₃	+++	-	-
S ₄	-	-	+	R ₄	-	-	-
S ₅	-	+	+	R ₅	-	-	+
S ₆	+	-	-	R ₆	-	-	-
S ₇	+	+	-	R ₇	-	-	-
S ₈	-	-	-	R ₈	-	+	-
S ₉	-	-	-	T ₉	-	-	-
对照	-	-	-				

注:L:叶子,S:茎,R:根,1,2,3...编号,++ 抑菌圈直径<10mm,++ 抑菌圈直径 10mm~12mm,+++ 抑菌圈直径>12mm,- 无拮抗性

株至少能拮抗 1 种指示菌 , 占总数的 94.9%。其中 42 株拮抗大肠杆菌 ,48 株拮抗枯草芽孢杆菌 ,3 株拮抗深红酵母 ,同时拮抗 3 种指示菌的菌株是 R₁₃、R₁₅ 二株菌。根、茎、叶相比较而言 ,前两者菌株数量多 ,抗菌活性高的菌株亦多 ,抗真菌的 3 个菌株都分布于根中 ,拮抗细菌最强的菌株 S₁₆ 见于茎中。见表 2。

表 2 成熟期远志内生真菌的抑菌活性							
菌株 编号 /分离 部位	大肠 杆菌	枯草芽 孢杆菌	深红 酵母	菌株 编号 /分离 部位	大肠 杆菌	枯草芽 孢杆菌	深红 酵母
L ₁	+++	+++	-	S ₁₈	+++	+++	-
L ₂	+++	+++	-	S ₁₉	+++	+++	-
L ₃	+++	+++	-	S ₂₀	+++	+++	-
L ₄	+++	+++	-	S ₂₁	+	+++	-
L ₅	-	+++	-	R ₁	++	-	++
L ₆	+++	+++	-	R ₂	++	++	-
L ₇	+++	+++	-	R ₃	+++	+++	-
L ₈	+++	+++	-	R ₄	+++	+++	-
L ₉	+++	+++	-	R ₅	-	+	-
L ₁₀	-	+++	-	R ₆	-	++	-
S ₁	+++	+	-	R ₇	+++	++	-
S ₂	+++	+++	-	R ₈	-	+	-
S ₃	++	+++	-	R ₉	+++	++	-
S ₄	+	++	-	R ₁₀	-	-	-
S ₅	++	++	-	R ₁₁	-	+++	-
S ₆	+++	++	-	R ₁₂	+++	+++	-
S ₇	-	-	-	R ₁₃	+++	+++	++
S ₈	-	-	-	R ₁₄	++	+++	-
S ₉	+++	++	-	R ₁₅	+++	++	+
S ₁₁	+++	+++	-	R ₁₅	+++	+	-
S ₁₂	+++	++	-	R ₁₇	++	+++	-
S ₁₃	+++	+++	-	R ₁₈	+++	++	-
S ₁₄	+++	+++	-	R ₁₉	+++	+++	-
S ₁₅	+++	+++	-	R ₂₀	+++	+++	-
S ₁₆	+++++	+++++	-	R ₂₁	-	+	-
S ₁₇	+++	+++	-	对照	-	-	-

注 :L 叶子 S 茎 R 根 ;1 2 3... 编号 ;+ 抑菌圈直径 < 10mm ,++ 抑菌圈直径 10mm ~ 12mm ,+++ 抑菌圈直径 > 12mm , - 无拮抗性

上述实验结果表明 ,两个时期的远志均分离到 3 株抗真菌菌株 ,茎中内生真菌活性普遍较高 ,相比较而言 ,成熟期远志根、茎、叶中分离的内生真菌数

量偏多 ,拮抗细菌和真菌的活性高。见图 1。

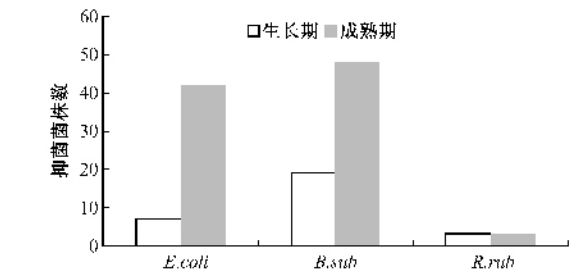


图 1 生长期与成熟期远志内生真菌抗菌菌株数比较
注 :E. coli 大肠杆菌(*Escherichia coli*) , B. sub 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) , R. rub 深红酵母(*Rhodotorula rubra*)

3.2 远志内生真菌鉴定结果

从两个时期的远志中分离到内生真菌共 88 株 ,经鉴定后 ,发现它们分布在 28 个属中。其中 *Alternaria* Nees 属菌株较多 ,共计 27 株 ,为优势属 ,主要分布在茎中 ,根中未见。6 个属在两个时期中都存在 ,7 个属在生长期中存在 ,15 个属在成熟期中被分离。生长期活性较高的菌株 L₁、R₃ 分别隶属于 *Trichothecium* Link、*Cephalosporium* Corda ,成熟期活性较高的菌株 S₁₆ 隶属于 *Alternaria* Nees ,菌株 R₁ 隶属于 *Trichosporiella* Kamyschko ,同时拮抗 3 种指示菌。具体分布见表 3。

4 讨论

植物内生真菌在长期的进化过程中与宿主建立了和谐的关系 ,产生许多有用的次生代谢物 ,是天然产物的重要来源^[7 8 9 ,10]。在分离到的 88 株菌中发现有产生色素的真菌 ,产生特殊气味及其它特性的菌株 ,需进一步进行化学分析及相关试验才能确定其代谢物的性质及化学组成 ,为进一步挖掘中药资源中的新物质 ,了解它们与远志的关系提供依据。

本次实验除对单株真菌进行了 3 种指示菌的抑菌实验外 ,还分别研究了根、茎、叶中分离到的各自所有菌株的混合发酵实验。在生长期中 ,3 组织各自的混合菌株发酵结果表明 ,发酵液中菌丝体的得率并不比单株菌高 ,说明内生真菌之间有相互抑制作用 ,但不知是否产生了新的代谢物。生长期 3 组织各自内生真菌的混合发酵液没有抑菌圈出现 ,成熟期混合发酵液则抑菌明显。上述这种现象还需更多的实验探索。

表 3 生长期和成熟期远志内生真菌的鉴定及分布(单位: 株)

属名	生长期			成熟期			属名	生长期			成熟期		
	根	茎	叶	根	茎	叶		根	茎	叶	根	茎	叶
<i>Alternaria</i>	0	9	1	0	11	6	<i>Sirodothis</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Trichothecium</i>	0	2	2	0	1	0	<i>Sclerotium</i>	0	0	0	0	1	2
<i>Minimedusa</i>	0	0	1	2	2	0	<i>Gliocephalis</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Fusarium</i>	3	0	3	2	0	0	<i>Amerosporium</i>	0	0	0	0	2	0
<i>Arbuscula</i>	0	3	1	2	0	1	<i>Acremonium</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Aspergillus</i>	1	0	0	1	0	0	<i>Papulaspora</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Asteromella</i>	0	0	1	0	0	0	<i>Phizoctonia</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Zythia</i>	0	1	0	0	0	0	<i>Trichosporiella</i>	0	0	0	2	0	0
<i>Mucor</i>	0	1	0	0	0	0	<i>Paecilomyces</i>	0	0	0	2	0	0
<i>Cephalosporium</i>	1	0	0	0	0	0	<i>Penicillum</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Dendrodochium</i>	2	0	0	0	0	0	<i>Malbranchea</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Gerlachia</i>	0	1	0	0	0	0	<i>Aphanocladium</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Cylindrocarpon</i>	2	1	0	0	0	0	<i>Nalanthamala</i>	0	0	0	4	0	0
<i>Mariannaea</i>	0	0	0	1	0	0	<i>Phamatotrichum</i>	0	0	0	1	0	0

致谢 本实验得到本校吕萧、刘晶晶、刘少伟、王玉君等同学的大力支持和帮助,在此表示衷心感谢。

参考文献

[1] 姜 勇. 屠鹏飞. 中草药, 2001, 32(8) : 759 ~ 761.
[2] 郭良栋. 菌物系统, 2001, 20(1) : 148 ~ 152.
[3] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 生态学杂志, 2004, 23(2) : 86 ~ 91.
[4] H L 巴尼特, B B 亨特著(沈崇尧译). 半知菌属图解. 北京: 科学出版社, 1977. pp. 64 ~ 210.
[5] J A VON ARX. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. A.

R. Gantner Verlag Kommandi tgesellschaft, 1981. pp. 234 ~ 358.
[6] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社. 1979. pp. 406 ~ 649.
[7] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Journal of Natural products , 2004, 67(2) 257 ~ 268.
[8] 聂立影, 陈 磊, 任安芝, 等. 微生物学通报, 2005, 32(1) : 10 ~ 14.
[9] 秦 盛, 邢 珂, 吴少华, 等. 中草药, 2006, 37(6) : 917 ~ 921.
[10] 周文文, 敖常伟, 牛天贵. 微生物学通报, 2006, 33(2) : 90 ~