

具抑菌活性连翘内生真菌的分离与鉴定

张青苗 魏希颖* 刘清梅

(陕西师范大学 生命科学学院 陕西 西安 710062)

摘要: 【目的】从药用植物连翘内生真菌中筛选抑菌活性菌株, 并对其主要活性成分进行检测分析。【方法】采用常规组织分离法分离内生真菌, 滤纸片法测定其发酵产物对 3 种指示细菌的抑菌活性。TLC、HPLC 和 HPLC-MS 检测活性菌株代谢产物中连翘苷成分。根据形态学特征和 ITS 序列分析鉴定目的菌株。【结果】分离得到的 24 株内生真菌中抑菌圈直径超过 10 mm 的菌株, 发酵液组有 11 株(45.8%), 菌丝体组有 19 株(79.2%), 活性菌株主要集中在果实内生真菌中, 其中 G5、G7 和 G10 表现出较强的抑菌活性。从菌株 G10 的胞内产物中发现活性成分连翘苷, 将其鉴定为胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*。【结论】连翘内生真菌是天然抗菌活性物质的重要筛选来源。

关键词: 连翘, 内生真菌, 抑菌活性, 连翘苷, 胶孢炭疽菌

Isolation and identification of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Forsythia suspensa*

ZHANG Qing-Miao WEI Xi-Ying* LIU Qing-Mei

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to screen antimicrobial fungal strains and to investigate the main active constituent of endophytic fungi isolated from the medicinal plant *Forsythia suspensa*. [Methods] Fungal endophytes were isolated with routine tissue separation methods, and the antimicrobial activities of their fermentation products were detected by filter paper method against 3 bacterial strains. Metabolites of active fungal strains were analyzed by

基金项目: 中央高校基本科研业务费资助项目(No. GK201002008)

*通讯作者: Tel: 86-29-85310266; 信箱: xiyingwei@snnu.edu.cn

收稿日期: 2012-11-12; 接受日期: 2013-01-23

TLC, HPLC and HPLC-MS methods. The final active fungal strains were identified based on morphological characteristics and ITS sequence analysis. **[Results]** Among the 24 isolated strains whose inhibition zone diameters more than 10 mm, group of fermentation broth had 11 (45.8%), group of mycelia had 19 (79.2%). Active fungal strains were mainly isolated from fruit, and G5, G7, G10 showed stronger antibacterial activities. Phillyrin was detected from the intracellular products of isolate G10, which was identified as *Colletotrichum gloeosporioides*. **[Conclusion]** The endophytic fungi in *F. suspensa* were important source for the natural antimicrobial substances.

Keywords: *Forsythia suspensa*, Endophytic fungi, Antimicrobial activity, Phillyrin, *Colletotrichum gloeosporioides*

内生真菌(Endophytic fungi)是指那些在其整个或是部分生活史中寄居在健康植物各种组织和器官内部,并且不会对宿主造成明显病害症状的真菌^[1]。自1993年 Stierle 首次从红豆杉内生真菌中发现抗癌物质紫杉醇后^[2],各国学者相继从植物内生真菌中分离出具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化、杀虫等多种生理作用的活性物质^[3]。研究证明,内生真菌在与宿主植物长期共生和相互影响过程中,不仅能够促进宿主体内某些代谢产物的合成与积累^[4-5],还可以产生与宿主植物相同或相似的生物活性成分^[6-8]。因此,作为具有潜在药用价值的一类特殊微生物资源,药用植物内生真菌已成为获取天然活性产物的重要来源。

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 为木犀科连翘属多年生落叶灌木,主要分布在我国山西、陕西、河南等地,其干燥果实是我国临床传统中药,具有清热解毒、消肿散结等功效^[9]。连翘苷(Phillyrin)是国家药典规定的中药连翘质量控制指标性成分,具有抗菌、抗氧化、保肝、降血脂等多种生理活性^[10-11]。现代药理研究表明,连翘为广谱抗菌药物,对多种革兰氏阳性菌、阴性菌都有抑制作用^[12]。本研究从药用植物连翘中分离内生真菌,从中寻找具有抑菌活性的菌株,以期天然抗菌活性产物的开发提供新的来源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: 连翘(*Forsythia suspensa*)的健康茎、叶和果实,2011年9月采自陕西师范大学长安校区,其中共采集植株8株,每株采集样本数分别为茎2个,叶4个,果实6个;3种指示细菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 26003,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) A99,大肠杆菌(*Escherichia coli*) A70,均来自陕西省微生物研究所。

1.1.2 培养基: PDA培养基(g/L): 马铃薯200,葡萄糖20,琼脂15-20,自然pH,去琼脂为液体培养基;分离培养基:含有青霉素、链霉素各100 mg/L的PDA培养基。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离与纯化: 将新鲜、健康的连翘茎、叶和果实自来水冲洗干净,沥干水分剪成小段(片)后做如下表面消毒处理: 75%酒精漂洗3 min→无菌水冲洗4-5次→3%次氯酸钠溶液漂洗叶3 min、茎5 min、果实7 min→无菌水冲洗4-5次,无菌滤纸吸干水分。将上述表面消毒后的材料剪切成0.5 cm²的小块,每种材料分别剪切60个组织块,放入含有分离培养基的平板

中(4块/每板), 28℃恒温培养3–15 d, 部分材料不做切割处理, 直接置于PDA平板中同条件培养作为对照^[13]。待组织块边缘长出菌丝后及时采用菌丝尖端挑取法将其转入另一PDA平板培养, 重复纯化4次以上4℃PDA斜面保存。

1.2.2 内生真菌代谢产物的制备: 将分离出的内生真菌接种到PDA液体培养基中, 250 mL三角瓶装液量为100 mL, 28℃、160 r/min振荡培养7 d, 离心得菌丝体和发酵液。菌丝体50℃烘干研磨, 加甲醇超声提取20 min, 收集上清液于旋转蒸发仪进行浓缩, 残渣加甲醇溶解得菌丝体提取物, 即胞内产物粗提物; 发酵液用水饱和正丁醇萃取3次, 合并正丁醇提取液旋转蒸干, 残留物加甲醇溶解得胞外产物粗提物。

1.2.3 内生真菌发酵产物抑菌活性的测定: 取供试菌株斜面, 用接种环轻轻刮取斜面将其洗脱至50 mL无菌水中, 振荡摇匀后稀释至 10^{-2} (约 10^5 CFU/mL)作为供试菌悬液。分别吸取20 μ L上述内生真菌发酵产物(发酵液和菌丝体)粗提物于直径6 mm的滤纸片上, 待稍吹干后放入涂布有指示菌悬液的牛肉膏蛋白胨平板中(100 μ L/板), 每个平板放3个滤纸片, 以链霉素(50 mg/L)和青霉素(50 mg/L)作为对照, 37℃恒温培养24 h后观察, 并用十字交叉法测量抑菌圈大小, 测量结果取3次重复平均值。

1.2.4 内生真菌代谢产物中活性成分的检测: (1) 薄层色谱(TLC): 将连翘苷标准品(中国药品生物制品检定所)与样品点样于同一硅胶GF₂₅₄自制板, 以三氯甲烷:甲醇(8:1, V/V)为展开剂展开^[14], 取出晾干后喷以10%硫酸乙醇, 105℃加热至斑点显色清晰, 置日光灯下检视。

(2) 高效液相色谱(HPLC): 色谱仪LC-2010A (日本岛津), 色谱条件: 色谱柱Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相乙腈:水(25:75, V/V)^[15], 流速1.0 mL/min, 检测波长

277 nm, 柱温30℃, 进样量10 μ L。

(3) 高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS): 液质联用仪 Agilent1100-Esquire 6000 (德国布鲁克), 色谱条件同上; 质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 负离子检测模式, 毛细管电喷雾电压4.0 kV, 雾化气压力0.3 Bar, 干燥气流量4.0 L/min, 扫描范围50–800 *m/z*。

1.2.5 产连翘苷内生真菌的形态学鉴定: 将目的菌株接种到PDA平板上, 28℃倒置培养3–5 d, 观察菌落形态和菌株生长速度。采用直接挑取制片法制作临时装片, 在显微镜下观察菌株形态特征, 参考文献[16]对其进行初步形态学鉴定。

1.2.6 产连翘苷内生真菌的分子鉴定: 采用CTAB法对目的菌株进行总DNA的提取^[17], 并将其作为模板, 利用真菌 rDNA 通用引物 ITS1 和 ITS4 对 ITS rDNA 进行 PCR 扩增。扩增程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共30个循环; 72℃ 10 min。PCR扩增产物由上海生工生物工程公司进行测序。将所得序列在GenBank数据库中进行BLAST相似性比对, 下载相似性较高的序列, 经ClustalX软件比对并校正后, 利用MEGA 4.0软件构建系统发育邻接树(Neighbor-Joining)。

2 结果与分析

2.1 内生真菌的分离与纯化

采用常规组织分离法从表面消毒的连翘茎、叶和果实中共分离纯化出24株内生真菌, 其中, 从茎部分离出9株、叶5株、果实10株, 菌株编号分别为J1–J9、Y1–Y5、G1–G10, 表明植物内生真菌在连翘不同部位中是普遍存在的。

2.2 抑菌活性的测定

采用滤纸片法测定24株内生真菌发酵产物对3种指示细菌的抑菌活性(表1)。结果表明, 在所有内生真菌中, 抑菌圈直径超过10 mm的活性

菌株, 发酵液组中有 11 株, 占总菌株数的 45.8%; 菌丝体组中有 19 株, 占总菌株数的 79.2%, 其中两组中共有的菌株数为 11 株; 具抑菌活性的菌株大多集中在果实内生真菌中, 其中菌株 G5、G7

和 G10 的抑菌圈直径已超过 20 mm。
2.3 内生真菌代谢产物中活性成分的检测
TLC 检测发现菌株 G10 的胞内产物在与连翘苷标准品相同 R_f 值处(约 0.62)出现相同的紫色斑

表 1 连翘内生真菌发酵产物的抑菌活性(抑菌圈直径, mm) Table 1 Antimicrobial activities of fermentation products from endophytic fungi in <i>F. suspensa</i> (inhibition zone diameters, mm)						
菌株编号 Fungi code	发酵液 Fermentation broth			菌丝体 Mycelia		
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
J1	—	—	—	—	—	—
J2	18.1	15.3	16.0	13.1	10.3	9.6
J3	—	9.5	—	11.4	—	10.2
J4	10.4	8.5	13.3	15.5	10.6	11.1
J5	—	—	—	15.3	9.9	10.4
J6	—	—	—	—	—	—
J7	—	—	—	9.5	8.6	—
J8	10.2	9.6	10.4	12.2	10.8	14.0
J9	15.5	12.7	10.9	15.2	11.6	9.7
Y1	—	—	—	—	—	—
Y2	—	—	—	11.3	8.5	—
Y3	—	—	—	—	—	—
Y4	9.5	—	—	12.8	13.2	15.4
Y5	—	—	—	10.3	14.4	12.1
G1	—	—	9.8	—	—	10.5
G2	—	—	—	10.2	—	—
G3	—	—	—	15.4	9.8	9.5
G4	—	—	11.8	12.3	10.6	15.2
G5	9.5	9.7	10.3	16.5	19.4	20.7
G6	9.6	10.2	8.5	18.8	15.6	14.5
G7	10.0	10.5	10.3	21.2	16.5	14.3
G8	8.7	7.5	10.8	13.6	11.3	15.0
G9	18.2	15.8	19.5	12.3	12.5	9.8
G10	9.3	10.8	7.6	16.5	15.3	20.4
链霉素 Streptomycin	26.8	25.5	25.7	25.5	25.6	24.8
青霉素 Penicillin	24.4	25.9	24.5	27.1	26.3	24.6

注: 表中数据均为 3 次重复平均值; —: 没有明显的抑菌圈。
Note: Data in the table are average value of three times repeated; —: No evident inhibition zones.

点。HPLC 分析显示在保留时间相近处, G10 的胞内产物(16.796 min)和连翘苷标准品(16.758 min)出现了同样的吸收峰。连翘苷的相对分子质量为 534.56, 液质联用检测结果显示, 连翘苷标准品产生一个 m/z 为 533.558 7 的分子离子峰[M-H]⁻(图 1A), 而菌株 G10 产生了一个 m/z 为 533.556 8 的离子碎片峰(图 1B), 与连翘苷标准品的[M-H]⁻基本一致, 该结果进一步表明连翘果实内生真菌 G10 的胞内产物中含有活性成分连翘苷。

2.4 菌株 G10 的形态学鉴定

菌株 G10 在 PDA 平板中生长速度较快, 培养

至 3 d 时菌落直径已接近 4 cm, 气生菌丝较致密, 菌落正面中部为墨绿色, 外周菌丝浅灰色, 边缘为白色, 背面由中心至边缘依次为褐色、橙黄色、白色, 后期菌落中还会产生一些黑色小点(图 2)。显微镜下菌株 G10 的菌丝较粗, 有隔, 多具分枝, 直径 3.2 μm –8.1 μm , 无色至褐色; 分生孢子梗短, 不分枝, 密集排列; 分生孢子单胞, 长圆柱形或长卵圆形, 表面光滑, (10.8–16.5) μm × (3.05–4.90) μm (图 2)。根据 G10 的菌落特征和显微特征, 初步将其鉴定为炭疽菌属真菌 *Colletotrichum* sp.。

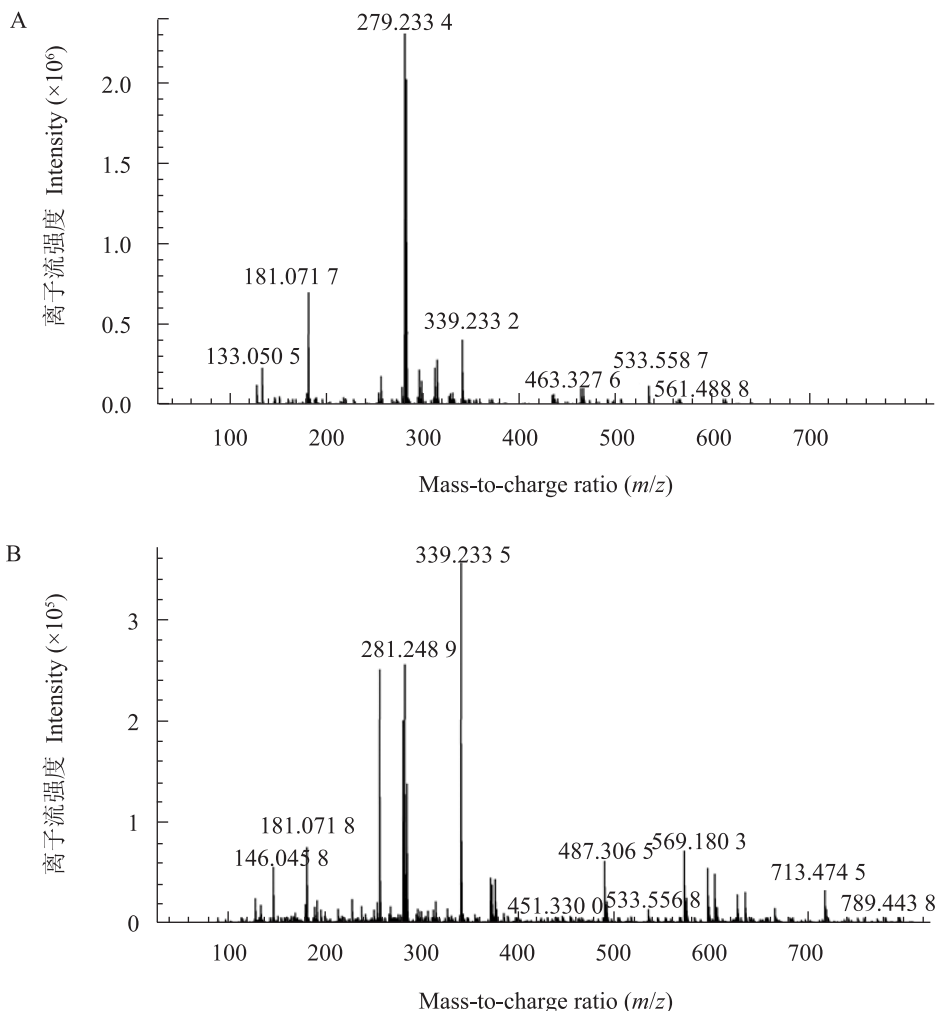


图 1 连翘苷的 HPLC-MS 检测图谱

Fig. 1 HPLC-MS spectra of phillyrin

注: A: 连翘苷标准品; B: 菌株 G10.

Note: A: Authentic phillyrin; B: The sample from isolate G10.

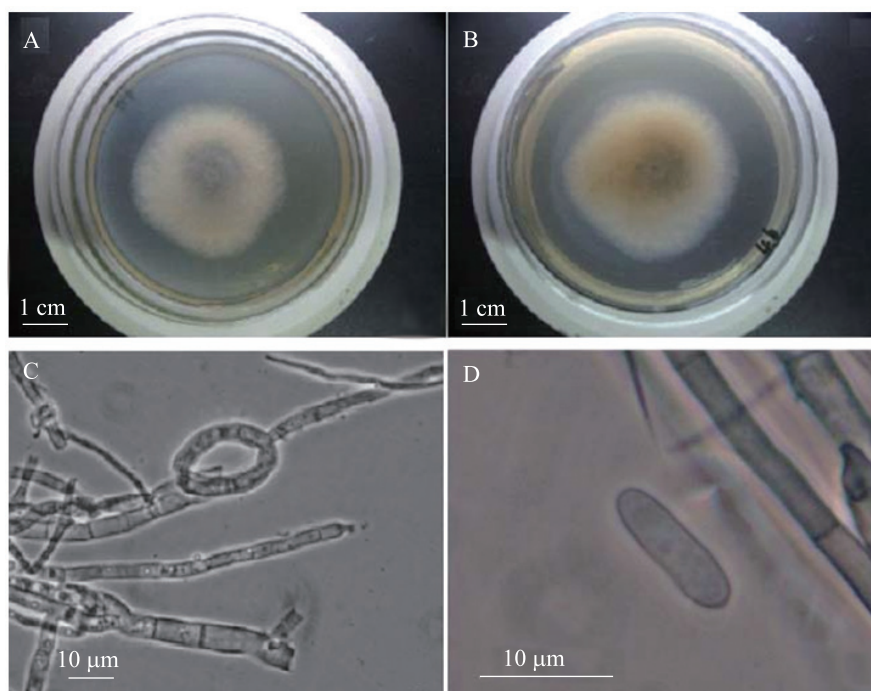


图 2 菌株 G10 的形态学特征

Fig. 2 Morphological characteristics of fungal isolate G10

注: A: 菌落正面. B: 菌落背面; C: 菌丝及分生孢子梗; D: 分生孢子.

Note: A: The front of colony. B: The back of colony; C: Hyphae and conidiophores; D: Conidia.

2.5 菌株 G10 的分子鉴定

菌株 G10 的 PCR 扩增产物经测序分析总长为 553 bp, 将该序列提交至 GenBank 进行 BLAST 序列比对, 选择相似性较高的序列构建系统发育树(图 3)。菌株 G10 在 GenBank 中的收录号为 JX073027, 与已有胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (FJ459921)^[18] 的 ITS 序列相似性

高达 99%, 随机匹配 100%, 形态学鉴定结果亦与此相符, 因此可将菌株 G10 鉴定为炭疽菌属胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*. (Penz.) Penz. et Sacc。

3 讨论

病原体抗药性的发展和普遍导致感染性疾病

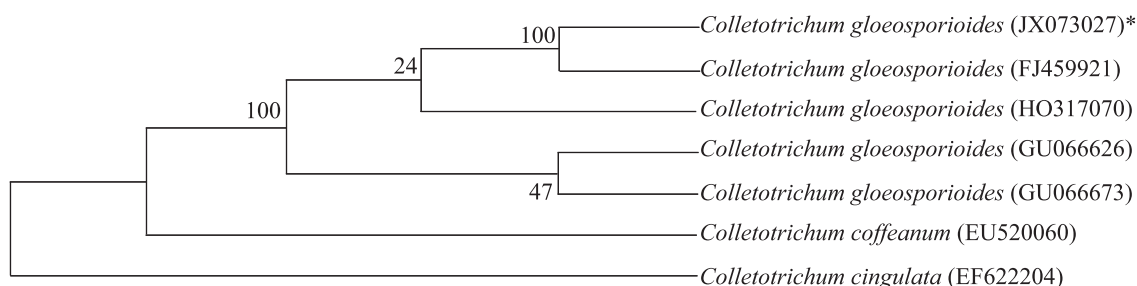


图 3 菌株 G10 的 ITS 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of isolate G10 based on ITS region sequences

注: *: 菌株 G10. 括号内为序列收录号.

Note: *: Isolate G10. GenBank accession numbers are shown in the parentheses.

成为一个全球性问题, 因此天然抗菌活性物质的筛选意义重大。本研究从连翘茎、叶和果实中共分离出 24 株内生真菌, 对其发酵产物抑菌活性的测定结果显示, 连翘内生真菌对 3 种供试细菌均表现出不同程度的抑菌作用, 活性菌株多半集中在菌丝体组中, 表明其抑菌活性物质可能主要存在于胞内产物中, 这与人对连翘内生真菌的研究结果类似^[19]; 抑菌活性菌株多为连翘果实内生真菌, 其中 G5、G7 和 G10 的抑菌活性较强。抑菌实验结果表明连翘内生真菌是天然抗菌化合物的重要筛选来源。

经 TLC、HPLC 和 HPLC-MS 对抑菌活性菌株代谢产物的检测分析, 从连翘果实内生真菌 G10 的胞内产物中发现活性成分连翘苷。连翘传统以果实入药, 连翘中具抑菌活性的内生真菌也在果实部位居多, 这表明连翘中的生物活性菌株所在部位可能与宿主本身的分离部位有一定的关联, 在前人的研究中也有类似的现象, 郭小炜等^[20]从大花金挖耳的花和果实中分离出的内生真菌具有很好的抑菌活性, 而研究证明大花金挖耳的抑菌活性成分主要集中在花部, 但这其中具体的关系还有待于进一步探究。菌株 G10 经鉴定为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*, 分离自其它植物的该菌属真菌也具有某些重要生物活性。印度学者 Dey 等^[21]从药用植物 *Ocimum sanctum* 中分离筛选出一株能产生物柴油的炭疽菌 DM06, 王梅霞等^[22]从银杏中分离得到一株产黄酮类物质的炭疽菌 EG4, 王利娟等^[23]自银杏内获得 2 株抑菌活性很强的胶孢炭疽菌, 王剑文等^[4]自黄花蒿内分离出的胶孢炭疽菌具有促进其宿主产生主要活性成分青蒿素的能力。

本研究结果为从植物内生真菌中寻找天然抑菌活性物质开辟了新途径, 同时也为连翘内生真菌中药用活性化合物的进一步研究提供依据。

参考文献

- [1] 易晓华. 植物内生真菌多样性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13468-13469.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.
- [3] 刘蕴哲, 何劲, 张杰, 等. 植物内生真菌及其活性代谢产物研究进展[J]. 菌物研究, 2005, 3(4): 30-36.
- [4] 王剑文, 郑丽屏, 谭仁祥. 促进黄花蒿发根青蒿素合成的内生真菌诱导子的制备[J]. 生物工程学报, 2006, 22(5): 829-834.
- [5] Li YC, Tao WY. Interactions of taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus* spp.) during taxol accumulation[J]. Cell Biology International, 2009, 33(1): 106-112.
- [6] 耿直, 刘开辉, 赵赟鑫, 等. 一株产紫杉醇中国红豆杉内生真菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 199-203.
- [7] Yin H, Sun YH. Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*[J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2011, 18(8/9): 802-805.
- [8] Cui Y, Yi D, Bai X, et al. Ginkgolide B produced endophytic fungus (*Fusarium oxysporum*) isolated from *Ginkgo biloba*[J]. Fitoterapia, 2012, 83(5): 913-920.
- [9] 李倩, 冯卫生. 连翘的化学成分研究进展[J]. 河南中医学院学报, 2005, 20(2): 78-80.
- [10] Qu H, Zhang Y, Wang Y, et al. Antioxidant and antibacterial activity of two compounds (forsythiaside and forsythin) isolated from *Forsythia suspensa*[J]. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2008, 60(2): 261-266.
- [11] 赵咏梅, 李发荣, 杨建雄, 等. 连翘苷降血脂及抗氧化作用的实验研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(2): 157-159.
- [12] 虹韬, 李德成. 连翘不同提取液对金黄色葡萄球

- 菌体外抑制作用研究[J]. 山西中医学院学报 T&M, 2012, 13(1): 36–38.
- [13] Schulz B, Wanke U, Draeger S, et al. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods[J]. Mycological Research, 1993, 97(12): 1447–1450.
- [14] 中国药典委员会. 中国药典 I 部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 159.
- [15] 汤科, 张伏军, 尹小玲. 高效液相色谱法测定桑菊感冒合剂中连翘苷含量[J]. 中国药业, 2010, 19(11): 15–16.
- [16] Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, et al. Dictionary of the fungi[M]. 10th ed. UK: CABI Publishing, 2008: 159–160.
- [17] Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Molecular Ecology, 1993, 2: 113–118.
- [18] Zhang Z, Tang M, Yu Z, et al. Direct submission, GenBank[Z], 2008.
- [19] 杨润亚, 李艳华, 柳娜娜. 连翘内生真菌的分离及其抑菌活性初步研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(15): 4561–4563.
- [20] 郭小炜, 冯俊涛, 易晓华, 等. 大花金挖耳内生真菌的分离及抑菌活性筛选[J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 377–383.
- [21] Dey P, Banerjee J, Maiti MK. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates—*Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 5815–5823.
- [22] 王梅霞, 陈双林, 霍娟. 一株银杏内生真菌的分离及其产黄酮类物质的初步研究[J]. 工业微生物, 2004, 34(2): 15–18.
- [23] 王利娟, 杨小生, 贺新生. 银杏叶内生真菌抑菌菌株筛选[J]. 四川食品与发酵, 2007, 43(4): 34–36.

科技信息摘录

人体干细胞让老鼠心脏再次跳起来

据英国《每日邮报》8月14日(北京时间)报道, 美国科学家首次将老鼠的心脏移出并将心脏内的细胞移除, 再用从人体皮肤获得的诱导多能干细胞(iPS 细胞)对老鼠剩下的心脏支架进行处理, 使其再次跳动起来。这项发表在《自然·通讯》杂志上的最新研究, 有助于科学家们采用同样的方式制造出可供移植的人体器官。

心脏病是英国最大的“杀手”, 每年导致约 7.4 万人丧生。而在美国, 每 34 秒钟就有 1 人因心脏病死亡, 有 500 多万人罹患心力衰竭。

在此次实验中, 该研究的领导者、匹兹堡大学杨磊(音译)博士团队首先耗时 10 h, 将老鼠心脏中的所有细胞移除。接着利用促进分化的特定生长因子, 得到来源于人体皮肤活组织的诱导多能细胞, 对其编程后, 再将获得的多能心血管前体细胞(MCP)放入剩下的心脏架构内。杨磊说:“这一过程能使 MCP 进一步分化成心脏中使用的心肌细胞、内皮细胞及光滑的肌肉细胞。迄今为止, 还未曾有科学家做到这一点。”

几周后, 老鼠的心脏不仅开始重建, 而且也开始以每分钟 40–50 次的频率进行收缩。不过, 科学家们补充道, 要想使心脏收缩得更强以及重建心脏的导电系统从而使心率能正常地加速和减慢, 还需要进行更进一步的研究。

科学家们表示, 最新发现有望导致个性化的 iPS 细胞被用于器官移植中; 还可用这一模型来对治疗心脏病的新药进行测试, 或者研究胎儿心脏的发育情况。而在未来, 也能用病人的一块皮肤组织获得专门的 MCP, 其能被用作一个生物支架, 再生出一个适合移植的心脏。

——摘自《中国生物技术信息网》2013/8/27
<http://www.biotech.org.cn/information/110746>