

金莲花内生真菌的分离与初步鉴定

Study on isolation and preliminary identification of endophytic fungi in *Trollius chinensis*

陆俊^{1,2} 秦培祯¹ 单齐冀¹ 李忠海^{1,2}

LU Jun^{1,2} QIN Pei-zhen¹ SHAN Qi-ji¹ LI Zhong-hai^{1,2}

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004;

2. 稻谷及副产物深加工国家工程实验室, 湖南 长沙 410004)

(1. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. National Engineering Laboratory of Rice and By-product Deep Processing, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要: 从内蒙古采集新鲜的金莲花植株, 在确定了该植株内生菌分离的最佳表面消毒方法后, 对其根部、茎部和叶部的内生真菌进行分离。通过分析菌落表面形态, 从中分离得到 6 株内生真菌, 其中叶中 4 株, 茎中 1 株, 根中 1 株, 并用乳酸酚棉兰液染色镜检观察, 经形态学鉴定均为子囊菌亚门(*Ascomycotina*), 青霉属(*Penicillium*)。

关键词: 金莲花; 内生真菌; 分离; 鉴定

Abstract: Fresh plants of *T. chinensis* collected from Inner Mongolia were used to isolated the endophytic fungi from their roots, stems and leaves after superficial disinfection. According to the morphological characteristics observation and microscopy examination, 6 endophytic fungi strains were isolated from the *T. chinensis*, including four strains from the leaves, one from the stems, and one from the roots. All the separated fungi strains were identified as penicillium genus (*Penicillium*).

Keywords: *Trollius chinensis*; endophytic fungi; isolation; identification

植物内生菌是指其生活史中的某一段时期或全部阶段生活于健康植物的各组织和器官内部, 不引起被感染的宿主植物组织明显症状改变的细菌、真菌或放线菌等微生物^[1-2]。内生菌能够参与植物活性成分的合成, 产生与宿主植物相同或者相似具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤作用的次级代谢产物^[3]。近些年来, 从红豆杉、冷杉、栎树、大蒜及海洋生物中分离鉴定出包括镰刀菌属、青霉属、根霉属在内的十余种内生真菌^[4-6]。利用植物内生真菌生产抗癌药物^[7-9]、杀虫剂^[10-11]、抗氧化剂^[12-13]、抑菌剂^[14-15]等均有研究报道。

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目基金(编号: 13C1158)

作者简介: 陆俊, 男, 中南林业科技大学副教授, 博士研究生。

通讯作者: 李忠海(1960—), 男, 中南林业科技大学教授, 博士。

E-mail: lizh11@163.com

收稿日期: 2015-11-27

研究^[16]表明约 30% 的内生真菌具有抗细菌和抗真菌活性, 有望成为临床抗菌药物、天然防腐剂、生物农药研究与开发的新资源。中国植物种类和数量极其丰富, 但至今被研究过的内生菌不到 15%^[17]。因此, 植物内生菌研究有很好的开发利用潜力, 它为发现新的先导化合物, 开发新药及保护濒危植物提供了重要的开发利用途径。

金莲花又名旱金莲、金芙蓉等, 为毛茛科金莲花(*Trollius chinensis* Bunge)的干燥花及花蕾。现代药理学研究^[18]表明, 金莲花所含的主要成分黄酮类具有抗炎、抗病毒等药理作用。目前对金莲花的研究^[19-23]主要集中在金莲花化学成分的研究及金莲花药理的不同药理作用。尽管金莲花有良好的药用价值并且广为利用, 但对其内生菌的研究还未见报道, 本研究拟从金莲花内生菌的分离鉴定着手, 旨在分离出金莲花内可能存在的有利用价值的内生真菌, 为深入了解并从中寻找产活性成分的菌种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜金莲花植株(除花朵): 2013 年 8 月采于内蒙古呼伦贝尔草原, 除去灰尘、泥土、死叶。

1.2 试剂与主要仪器

真菌分离培养基、马铃薯琼脂培养基(PDA): 北京路桥技术有限公司;

乳酸酚棉兰染色: 青岛海博生物技术有限公司;

电子显微镜: Cx31rtsf-5 型, 日本奥林巴斯株式会社。

1.3 试验方法

1.3.1 金莲花内生菌的分离 消毒前处理: 取无菌水冲洗新鲜金莲花根、茎、叶组织的表面部分, 无菌滤纸吸干表面水分并采取三步消毒法进行表面消毒: 乙醇—次氯酸钠—乙醇, 即 75%乙醇冲洗 1 min, 无菌水冲洗 3 遍, 随后按表 1 用次氯酸钠和乙醇处理后, 无菌水冲洗 3~4 遍。

取 0.2 mL 最后一次清洗样本组织所用的无菌水涂布于

表 1 金莲花植株不同的表面消毒方法

Table 1 Different ways of superficial disinfection for *Trollius chinensis* bunge

消毒方法	处理
方法 1	0.1%次氯酸钠浸泡 1.0 min
方法 2	0.5%次氯酸钠浸泡 1.0 min,75%乙醇冲洗 0.5 min
方法 3	1.0%次氯酸钠浸泡 0.5 min

约 1 cm×1 cm 大小,贴置于真菌分离培养基上,倒置在 28 ℃恒温培养箱中进行培养。若对照中没有观察到菌落,则培养基上,在恒温培养箱中培养作为对照验证样品组织表面消毒处理是否彻底,无菌金莲花样本组织用无菌解剖刀切成可以将样品组织培养中切口边缘长出的各个菌落划线接种于相应标注的含 PDA 培养基的平板上进行分离纯化,观察记录菌落形态特征。并将得到的单菌落保存在含 PDA 培养基的相应斜面试管中,4 ℃冰箱保存。

1.3.2 金莲花内生真菌的初步鉴定 采用真菌经典分类法。根据文献[24~26]分别从菌落特征和个体特征入手,对所培养真菌进行分类和鉴定。常规镜检用乳酸酚棉兰液染色镜检并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 最佳表面消毒方法的选择

表面消毒是否到位对内生菌的分离效果起着决定性作

用,因此选择合适的消毒方法对分离结果来说极其重要。通过漂洗液检验法,发现消毒方法 1 由于使用次氯酸钠浸泡的浓度较低,未能起到较好的消毒效果,导致空白培养基长出较多杂菌。消毒方法 3 的次氯酸钠溶液浓度高、浸泡时间短,虽然空白培养基上未长出杂菌,但从根、茎、叶等组织中只能分离1~2 株内生菌,这可能是过高的次氯酸钠浓度杀死了较多组织细胞和细胞间隙的内生菌所导致。消毒方法 2 处理后得到较多的内生菌,且空白培养基上没有杂菌污染,所以初步判定方法 2 为最佳表面消毒方法,即 75%乙醇冲洗 1.0 min,无菌水冲洗 3 遍,再用 0.5%次氯酸钠浸泡 1.0 min,75%乙醇冲洗 0.5 min,无菌水冲洗 3~4 遍。

2.2 金莲花内生真菌的分离纯化结果

通过方法 2 进行消毒并进一步分离纯化,根据肉眼观察结果分析菌落的颜色、形状、质地、高度、边缘形态和表面纹饰,从金莲花叶中共获得内生真菌 4 株,分别命名为 ZY₂1、ZY₂2、ZY₂3、ZY₂4,茎、根中各分离到 1 株,分别命名为 ZJ₂、ZG₂3,其菌落特征描述见表 2。

2.3 金莲花内生真菌的初步鉴定

采用直接挑取制片法,将分离出的 6 株内生真菌进行了综合菌落表面形态观察(表 2)和显微形态观察(图 1、表 3)。根据菌核的特征及结构,孢子着生部位及孢子的形态、大小、排列方式等显微特征,参照文献[27]将其初步鉴定为青霉属真菌。

表 2 金莲花内生菌菌落特征描述

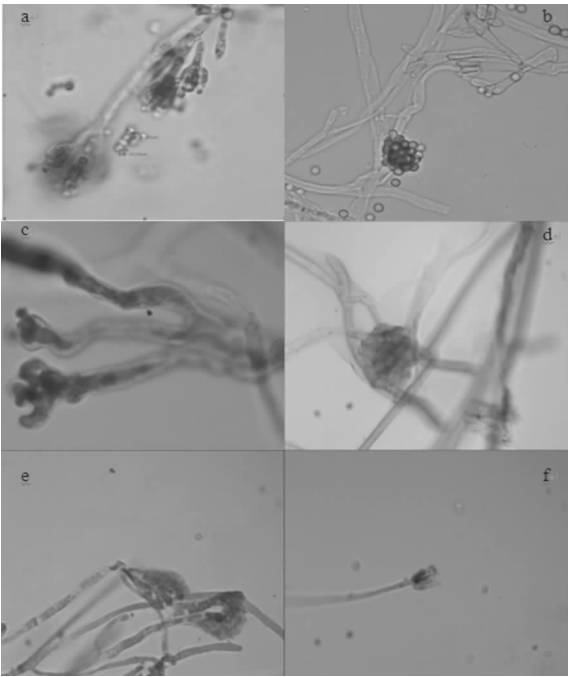
Table 2 Description of colony characteristics of endophyte of *Trollius chinensi*

菌种	菌落颜色		菌落形状	表面纹饰	菌落质地	菌落边缘
	正面	反面				
ZY ₂ 1	中心棕,边缘白	中心棕,边缘黄	小山包状,中心、边缘低,中间环带高	无明显纹饰	绒毛状	较整齐
ZY ₂ 2	绿	黑绿	草帽状,中间凸起,边缘平铺	同心环	绒毛状	较整齐
ZY ₂ 3	中心黄,外周白	中心黄,外周灰黄	草帽状,中心边缘低,中间环带高	同心环	绒毛状	较整齐
ZY ₂ 4	中心灰,边缘白	中心黄,外周黄	草帽状,菌落平铺	无明显纹饰	毡状	较整齐
ZJ ₂	灰白	灰黄	平铺	无	无	较整齐
ZG ₂ 3	中心灰,环带依次为灰绿白	中心灰绿,边缘白	小山包状,扁平	多条同心环	毡状	较整齐

表 3 金莲花内生真菌显微镜检描述

Table 3 Description of microscopy of endophytic fungi of *Trollius chinensis* (n=3)

菌种	菌丝	菌丝直径/μm	细胞核	有无隔膜	孢子着生部位	孢子排列方式	孢子形态	孢子直径/μm	孢子能动否
ZY ₂ 4	有	18.53	多核	有	顶部	成簇	圆形	19.23	否
		19.77						20.87	
		19.96						19.77	
ZY ₂ 3	有	18.52	多核	有	顶部	成簇	椭圆	20.09	否
		19.82						20.62	
		24.58						20.52	
ZY ₂ 2	有	22.51	多核	有	顶部	成簇	圆形	31.98	否
		21.51						31.59	
		20.22						31.64	
ZY ₂ 1	有	28.16	多核	有	顶部	成簇	椭圆	26.00	否
		25.50						24.10	
		20.43						29.00	
ZJ ₂	有	18.87	多核	有	顶部	成簇	圆形	20.59	否
		22.03						22.80	
		20.06						22.36	
ZG ₂ 3	有	24.90	多核	有	顶部	成簇	圆形	35.40	否
		23.28						35.63	
		27.32						35.72	



a~f 分别为 ZY₂4、ZY₂3、ZY₂2、ZY₂1、ZJ₂、ZG₂3

图 1 金莲花内生真菌显微镜检

Figure 1 Microscopy and colony characteristics of endophytic fungi of *Trollius chinensis* (400×)

3 结论

试验结果表明,金莲花体内含有较丰富的内生真菌,主要分布在叶和茎中,根中很少,可能与其营养成分有关。本试验从金莲花分离得到 6 株内生真菌(叶中 4 株,茎、根中各 1 株),通过菌落表面形态观察及显微形态观察其特征,经形态学鉴定均为子囊菌亚门(*Ascomycotina*),青霉属(*Pinicium*)。但以下几个方面还有待于进一步深入研究:① 生物学信息的鉴定研究;② 菌株的抗菌活性以及是否具有药用活性的研究;③ 菌株产生的代谢产物如生物碱及黄酮类成分构效关系的研究;④ 菌株中有效成分的提取、纯化、制备及综合开发利用。

参考文献

[1] 王莉衡. 植物内生菌的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2011, 28 (3): 5-8.

[2] 官珊, 钟国华, 孙之潭, 等. 植物内生真菌的研究进展[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(1): 61-66.

[3] 史长东. 植物内生菌活性代谢产物的研究进展[J]. 现代园艺, 2010(21): 13-13.

[4] 肖淑贤. 植物内生菌的研究概况及应用进展[J]. 农业技术与装备, 2011(2): 74-77.

[5] 赵宇, 刘浩舶, 李振, 等. 海带内生菌 HSN2 胞外蛋白对粉红单端孢霉的影响[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 31-34.

[6] 贾栗, 陈疏影, 翟永功, 等. 近年国内外植物内生菌产生物活性物质的研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(11): 1 751-1 754.

[7] 赵凯, 平文祥, 周东坡. 内生真菌发酵生产紫杉醇的研究现状与展望[J]. 微生物学报, 2008, 48(3): 403-407.

[8] BHATIA D R, DHAR P, MUTALIK V, et al. Anticancer activity of Ophiobolin A, isolated from the endophytic fungus *Bipolaris setariae*[J]. *Natural Product Research*, 2016, 30(12): 1 455-1 458.

[9] LIN Zhen-jian, ZHU Tian-jiao, FANG Yu-chun, et al. Polyketides from *Penicillium* sp. JP-1, an endophytic fungus associated with the man-grove plant *Aegiceras corniculatum*[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(5): 1 273-1 278.

[10] WANG Xiao-peng, ZHONG Jia, WANG Xing-hong et al. Study on the bioactivity of the endophytic fungi isolated from *SinoPo Dophyllumh exandum* and *Diphylleia sinensis*[J]. *Nat. Prod. Res. Dev.*, 2006, 18(1): 152-191.

[11] STROBEL G, DAISY B, CASTILLO U, et al. Natural products from endophytic microorganisms [J]. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(2): 257-268.

[12] 郑丹, 刘占华, 张剑, 等. 4 株抗肿瘤活性物质喜树内生真菌的鉴定及其主要代谢产物 HPLC 初步比较[J]. *药物生物技术*, 2007, 14(3): 190-195.

[13] 侯奎, 刘玉军, 陆荣, 等. 葛内生真菌次生代谢产物清除自由基活性的研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2008, 35(2): 262-265.

[14] 刘霞, 党峰峰. 陕北野生甘草内生菌的分离及抑菌活性筛选[J]. *西北植物学报*, 2010(10): 2 110-2 115.

[15] BHIMBA B V, FRANCO D A A D, MATHEW J M, et al. Anticancer and antimicrobial activity of mangrove derived fungi *Hypocrea lixii*, VB1 [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2012, 10(1): 77-80.

[16] 李青连, 苏红, 池维丹, 等. 野生黄芩内生真菌的分离鉴定及抗菌活性筛选[J]. *微生物学通报*, 2010(3): 381-388.

[17] 江军山, 张鑫. 产抗菌活性物质植物内生菌的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2011, 38(22): 1 704-1 705.

[18] 袁勤洋. 中药金莲花药理作用研究进展[J]. *人民军医*, 2011, 54(9): 825-826.

[19] 吴新安, 秦峰, 都模勤. 短瓣金莲花挥发油成分的气相色谱—质谱联用分析[J]. *解放军药学学报*, 2011, 27(6): 519-520

[20] 魏金霞, 李丹毅. 金莲花化学成分分离与鉴定(Ⅱ)[J]. *沈阳药科大学学报*, 2012, 29(1): 12-15.

[21] 王书华, 杨国栋, 饶娜, 等. 金莲花中荜苳苳和牡荳荳对 D-半乳糖致小鼠体内抗氧化作用的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(24): 4 818-4 820.

[22] 杨国栋, 饶娜, 田嘉铭, 等. 金莲花中荜苳苳和牡荳荳抗氧化作用的研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(9): 2 172-2 173.

[23] LI Hai-ping, ZHANG Ming-ming, MA Gui-ji. Radical scavenging activity of flavonoids from *Trollius chinensis* bunge [J]. *Nutrition*, 2011, 27(10): 1 061-1 065.

[24] 刘金花, 吴玲芳, 章华伟. 黄花蒿内生菌的分离与初步鉴定[J]. *氨基酸和生物资源*, 2011, 33(4): 27-30.

[25] 杨国栋. 瑞香狼毒内生真菌对原植物成分降解作用的研究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2009: 30-32.

[26] 刘建玲, 陈宝宝, 刘永红, 等. 半夏内生菌的分离与初步鉴定[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(18): 2 305-2 307.

[27] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 133-134.