

两种植物内生菌分离的影响因素研究^{* 1}

姜国银¹, 杨本寿¹, 虞泓²

(1. 曲靖医学高等专科学校, 云南 曲靖 655000;

2. 云南大学 中草药生物资源研究所 云百草实验室, 云南 昆明 650091)

摘要: 在开展核桃树(*Juglans regia* L.)和飞龙斩血(*Toddalia asiatica*(L.)Lam.)植物内生菌多样性研究过程中,对季节、区域、树龄和采集部位等影响内生菌分离的因素进行研究. 研究表明,在春夏之交宿主植物新陈代谢旺盛时采集的较大树龄材料,分离获得更多的内生菌种类和数量. 采用5种不同的消毒剂,以不同的消毒浓度和消毒时间进行试验,探讨植物内生菌分离培养的最佳条件. 试验表明,选用3.0%的H₂O₂溶液消毒30~120 s,0.5%的KMnO₄溶液消毒30~120 s,75%的乙醇溶液消毒60~120 s,4%的漂白粉消毒30~120 s,对试材进行表面消毒,效果较好. 从而为进一步开发利用药用植物内生菌提供了基础资料.

关键词: 植物内生菌;核桃树;飞龙斩血;表面消毒;影响因素

中图分类号: Q 93-31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2011)05-0610-05

病原菌抗药性是目前全球关注的严峻问题,寻找、开发新的天然药物成为世界医药界研究的热点. 研究表明,药用植物内普遍存在可以产生与宿主相同或相似的生物活性物质的个别内生菌^[1-4]. 同时,植物内生菌普遍具有抗菌活性^[5],从天然中草药植物中筛选出具有药用价值的内生菌的概率非常大,中草药植物内生菌成为天然药物研究和开发的重要资源. 1993年,Strobel等^[6]从短叶紫杉(*Taxus brevifolia* Nutt.)韧皮部分离得到一株内生菌,它能够产生与宿主植物产物一样的肿瘤治疗剂紫杉醇(Taxol),鉴定为安德氏紫杉霉(*Taxomyces andreanaestrobel*), A. Stierle, D. Stierle & W. M. Hess大大激发了人们对植物内生菌资源开发的积极性. 内生菌作为潜在的生物资源库,已成为近年来生物资源领域研究、开发的热点.

民间以核桃(*Juglans regia* L.)树枝为主的两根汤、核车汤、三枝汤治疗肝炎、肝癌、肺癌均有很好疗效^[7-10],而以飞龙斩血(*Toddalia asiatica*(L.)Lam.)全株为主的药用材料对散瘀消肿、祛

风止痛有很好的疗效^[11]. 核桃树、飞龙斩血都是传统的中草药植物,从核桃树内以及资源匮乏的飞龙斩血中分离得到和宿主植物相同和相似的活性物质,获得能够替代中药飞龙斩血、核桃树具有药用价值的内生菌,既可以丰富内生菌资源的多样性,又可以缓解人们对核桃树皮、飞龙斩血需求过多的矛盾,对保护野生自然资源、当地生态、植被和环境都具有重要的意义.

在开展核桃树和飞龙斩血植物内生菌多样性研究过程中,采用5种不同的消毒剂、不同的消毒浓度、消毒时间,对采集部位、季节、区域、树龄等影响内生菌分离培养的因素进行研究,为进一步开发利用植物内生菌资源提供基础资料.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物样品来源 不同季节采集到的核桃树、飞龙斩血植物根、茎. 核桃树采自云南省会泽县、曲靖市麒麟区、罗平县,飞龙斩血采自云南省昭

* 收稿日期:2011-03-20

基金项目:云南省教育厅科学研究基金资助项目(09Y0503);云南省教育厅科学研究基金资助项目(2010Y226).

作者简介:姜国银(1955-),男,云南人,副教授,主要从事微生物资源与利用方面的研究.

通讯作者:虞泓(1962-),男,云南人,教授,博士生导师,主要从事植物学及中草药生物资源方面的研究, E-mail: hongyu@ynu.

edu.cn, herbfish@163.com.

通市盐津县.

1.1.2 表面消毒剂 H_2O_2 , $KMnO_4$, $HgCl_2$, 75% 乙醇, 漂白粉. 均购自曲靖市医药公司生化试剂部.

1.1.3 培养基和培养条件 内生真菌培养基为 PDA 培养基^[12], 分离培养基为 PDA + 氨苄青霉素 (ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 真菌鉴定采用 PDA 固体培养基、察氏培养基、促孢固体培养基 (KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KNO_3 1 g, KCl 0.5 g, 淀粉 0.2 g, 蔗糖 0.2 g, 葡萄糖 0.2 g, 琼脂 20 g, 加蒸馏水至 1 000 mL); 内生放线菌培养用 TSA^[13], 分离培养基为 TSA + 萘啶酸 (nalidixic acid, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 制霉菌素 (fungicidine, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 放线菌鉴定用 TSA 固体培养基、以及产孢培养基 MS 琼脂^[13]; 分离培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 菌株纯化后, 真菌培养温度为 28 $^{\circ}\text{C}$, 细菌、放线菌培养温度为 30 $^{\circ}\text{C}$.

1.1.4 抗生素、化学试剂 抗生素均购自 Sigma 公司; 配制培养基所用生化试剂购自北京百泰克公司; 萘啶酸溶于 0.15 mol/L 的 NaOH, 氨苄青霉素、制霉菌素溶于双蒸水.

1.2 方法

1.2.1 核桃树、飞龙斩血内生菌的分离和纯化 采用组织块培养法^[14]. 取新鲜、健康、无病虫害的核桃树、飞龙斩血植物的根、茎, 用清水冲洗干净并晾干水分后, 在超净工作台上用灭菌的解剖刀削去根和茎的外皮层, 将内皮层、韧皮部、连同部分木质部一起切成 1.5 cm \times 1.0 cm 左右的片段; 表面消毒后, 将小块样品切口面紧贴于 PDA 或 TSA 培养基平板上. 待材料周围长出菌落时, 采用尖端菌丝挑取法对所分离的内生菌进行纯化, 纯化后的菌株转接到 PDA 或 TSA 斜面上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置培养 3 ~ 5 d, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存.

1.2.2 表面消毒 用各种消毒剂 (设置浓度梯度) 对同一材料进行表面消毒, 消毒处理的时间也设置不同的梯度. 消毒剂 H_2O_2 采用的质量分数梯度为 1.0%, 2.0%, 3.0%; $KMnO_4$ 的质量分数梯度为 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%; 医用酒精质量分数为 75%; 漂白粉质量分数梯度为 2%, 4%, 6%; $HgCl_2$ 质量分数梯度为 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%; 消毒的时间梯度均为 30, 40, 50, 60, 90, 120 s.

1.2.3 内生菌的分类鉴定 内生真菌采用插片培养的方法, 对分离获得的内生真菌在鉴定培养基上培养数日, 挑取菌丝或孢子制成玻片, 进行显微

形态特征的观察、分类鉴定. 主要观察菌丝形态、孢子梗形态、孢子形态以及孢子与营养体之间的着生关系, 结合菌落形态特征, 分类检索参照文献 [12, 15].

2 结果

2.1 取材对分离培养内生菌的影响 研究结果表明, 选取健康无虫蛀、光滑、无节、颜色浅处部位的样品材料分离培养出来的内生菌菌株较纯净, 菌丝多为白色; 而选取的材料色深、有节部位分离得到的内生菌菌丝颜色多样. 因此, 样品材料的选取对内生菌的分离培养有较大的影响.

2.2 对同一材料采用不同消毒剂的处理结果 对核桃树、飞龙斩血植株同一部位同一材料采用不同的消毒剂 (设置浓度梯度和消毒时间梯度) 进行表面消毒处理时, 以不出现污染、能获得纯净的内生菌为判断指标. 实验结果 (表 1) 表明: 1.0% 的 H_2O_2 溶液对核桃树 (乔木) 的根、茎消毒 50 ~ 120 s 获得内生菌的数量最多; 3.0% 的 H_2O_2 溶液对飞龙斩血 (灌木) 的根、茎消毒 30 ~ 120 s 获得的内生菌最多; 0.5% $KMnO_4$ 溶液消毒 50 ~ 120 s, 75% 乙醇溶液消毒 60 ~ 120 s, 4%, 6% 漂白粉消毒 30 ~ 120 s 也都能从核桃树以及飞龙斩血植株样品中获得较多的内生菌; 而 0.1% ~ 0.5% $HgCl_2$ 则消毒作用很强, 一般不使用, 但个别菌株在 0.1% $HgCl_2$ 消毒 30 ~ 40 s 2 周后出现.

2.3 不同采集季节对内生菌分离培养结果的影响

采集不同季节的样品进行核桃树、飞龙斩血内生菌的分离培养, 菌株经过形态分类后, 结果表明 (表 2), 季节的变换对植物内生菌的分离培养影响显著. 春、秋季节采集到的样品中, 分离培养得到的内生菌种类与数量相差不大; 夏季采集的样品中内生菌种类和数量最多, 多样性明显; 冬季采集的样品则数量与种类最少. 说明了植物内生菌的分布和数量与宿主植物本身的代谢有密切的关系, 夏季温度高, 宿主植物代谢旺盛, 内生菌种类与数量就多; 反之, 冬季温度低, 代谢缓慢, 则内生菌的种类与数量少.

2.4 同一地域不同地点对内生菌分离培养的影响

在云南省曲靖市辖区 3 处采集不同的核桃树根、茎样品进行内生菌分离培养, 结果表明 (表 3), 同一地域不同地点的样品中内生菌的种类数量差别不大.

2.5 树龄对植物内生菌分离培养的影响 采集新鲜的10 a龄期和50 a龄期的核桃树根和茎进行内生菌分离培养时,发现50 a龄期的核桃树内生菌中的种类数量比10 a龄期的要多7种.说明树龄对植物内生菌的分布和生物多样性有一定的影响.

2.6 核桃树内生菌属的鉴定与分布结果 初步对采集到的139株内生真菌和25株内生细菌或放线菌进行形态上筛选重复菌株,共得到菌株36株.一

株枯草杆菌,4株链霉菌属,31株内生真菌,经显微形态观察,初步鉴定为5目、7科、9个属(无孢类群须进一步鉴定),结果见表4.从最初分离的菌株中,核桃树内生真菌以毛霉属 *Mucor*,青霉属 *Penicillium*,曲霉属 *Aspergillus* 为优势种群,可见,核桃树内生真菌在种类组成上具有多样性特征.也进一步证明了消毒的方法是恰当的.

表1 不同消毒剂、质量分数梯度和消毒时间处理核桃树和飞龙斩血植株样品的内生菌分离与培养结果

Tab. 1 The isolation and cultivation results of endophytes in *Juglans regia* and *Toddalia asiatica* samples disinfected by five disinfectants with different concentrations and time

消毒剂	质量分数/%	消毒时间/s											
		30		40		50		60		90		120	
		核桃树	飞龙斩血	核桃树	飞龙斩血	核桃树	飞龙斩血	核桃树	飞龙斩血	核桃树	飞龙斩血	核桃树	飞龙斩血
H ₂ O ₂	1.0	△	△	△	△	+	+	+	+	+	+	+	+
	2.0	-	△	-	△	-	+	-	+	-	+	-	+
	3.0	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
KMnO ₄	0.1	-	△	-	△	-	△	-	+	-	+	-	+
	0.2	-	△	-	△	-	△	-	+	-	+	-	+
	0.3	-	△	-	△	-	△	-	+	-	+	-	+
	0.4	-	△	-	△	-	+	-	+	△	+	△	+
	0.5	△	△	△	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乙醇	75	+	△	+	△	+	△	+	+	+	+	+	+
	2	△	△	△	△	△	△	△	△	+	+	+	+
漂白粉	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HgCl ₂	0.1	-	S	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- :没有菌生长; + :生长,无污染; △生长,有污染; S:生长极为缓慢,无污染

表2 不同季节的核桃树和飞龙斩血植物内生菌种类与数量

Tabl. 2 The strain number of endophytes isolated from *Juglans regia* and *Toddalia asiatica* in different seasons

采集时间	核桃树		飞龙斩血	
	内生真菌	内生细菌与放线菌	内生真菌	内生细菌与放线菌
2~4月	40	6	34	5
5~7月	55	11	47	8
8~10月	44	7	35	6
11~1月	7	1	8	0

表3 不同地区核桃树根和茎内生菌分离培养情况

Tab. 3 The isolation and cultivation results of endophytes from the stem and root samples in *Juglans regia* from different regions

区域	内生真菌	内生细菌与放线菌
曲靖市麒麟区	46	9
曲靖市罗平县	48	9
曲靖市会泽县	45	7

3 讨论

植物内生菌分离培养实验中,表面消毒程序的选择常常因研究者的喜好、宿主植物的种类以及宿主组织类型不同而不同^[16],也对不同的表面消毒

程序进行了比较分析的报道^[17-18].通过该次实验,在植物内生菌分离培养表面消毒程序中,宜选用3.0%的H₂O₂溶液消毒30~120 s,0.5%的KMnO₄溶液消毒30~120 s,75%的乙醇溶液消毒60~120 s,4%的漂白粉消毒30~120 s对样品材料进行表面消毒.同时,采集样品时,宜在春夏之交宿主植物新陈代谢旺盛时期采集树龄较大的材料,以获得更多的内生菌种类和数量.

植物内生菌分离的研究过程中,同时还受到分离、鉴定、促孢培养基成分及其培养条件的影响.例如在内生真菌的分离培养中,选用各种生物新陈代谢的最基本底物葡萄糖代替蔗糖作为PDA培养基的碳源,分离得到的菌株更纯、多样性也更为丰富.此外,植物内生菌包括内生细菌、内生放线菌和内生真菌,内生菌种类与数量极其繁多.因此,在

表4 核桃植物内生真菌属的分布

Tab. 4 The distribution of endophytic fungi from *Juglans regia*

目	科	属	数量
		青霉属 <i>Penicillium</i>	3
	丛梗孢科 <i>Moniliaceae</i>	曲霉属 <i>Aspergillus</i>	4
		木霉 <i>Trichoderma</i>	2
丛梗孢目 <i>Moniliales</i>	瘤座孢科 <i>Tuberculariaceae</i>	镰孢属 <i>Fusarium</i>	2
	暗梗孢科 <i>Dematiaceae</i>	黑孢属 <i>Nigrospora</i>	3
丝孢菌目 <i>Hyphomycetales</i>	丝孢菌科 <i>Hyphomycetaceae</i>	拟青霉属 <i>Paecilomyces</i>	1
毛霉目 <i>Mucorales</i>	毛霉科 <i>Mucoraceae</i>	根霉属 <i>Rhizopus</i>	1
		毛霉属 <i>Mucor</i>	5
无孢目 <i>Agonomycetales</i>	无孢菌群 <i>Mycelia sterilia</i>		6
内孢霉目 <i>Endomycetales</i>	内孢霉科 <i>Endomycetceae</i>	酵母属 <i>Saccharomyces</i>	4

筛选和鉴定菌株的培养基中加入适当浓度的选择性生长抑制剂^[19],能够定向地筛选到特定的内生菌.在试验中,使用氨苄青霉素(ampicillin,100 μg/mL)和萘啶酸(nalidixic acid,25 μg/mL)起到了较好地定向筛选,而50 μg/mL的制霉菌素(fungicide)没有起到较好地抑制真菌的作用.在分离培养基中加入植物组织提取液,一方面有利于内生菌的生长,从而尽可能多地分离到其中的内生菌;另一方面,将分离到的菌株,在加有组织提取液和没有组织提取液的相同培养基中培养,生长快的可以初步判定为内生菌,否则,很可能不是内生菌,而是随机附着于样品的其它菌或污染的菌.此外,植物内生菌多样性丰富,鉴定菌株,排除重复菌株,确定菌株的种属关系极其重要.仅仅依靠经典的形态学方法对一些菌株是难以鉴定的,比如内生真菌中的不产孢类群以及同一菌株在不同培养基、不同培养条件下,形态和生理特征并不是固定的,这就需要结合分子生物学技术手段才能准确的鉴定.

参考文献:

- [1] PETRINI O. Fungal endophytes of tree leaves[C]//ANDREWS J H,HIRANO S S. Microbial Ecology of Leaves. New York:Springer-Verlag. 1991,179-197.
- [2] FISHER P J,PETRINI O,SUTTON B C. A comparative study of fungal endophytes in leaves,xylem and bark of *Eucalyptus nitens* in Australia and England[J]. *Sydowia*,1993,45:338-345.
- [3] HELANDER M L,NEUVONEN S,SIEBER T, et al. Simulated acid rain affects birch leaf endophyte populations[J]. *Microbial Ecology*,1993,26:227-234.
- [4] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. *菌物系统*,2001,20(1):148-152.
- [5] 孙力军,陆兆新. 植物内生菌抗菌活性物质研究进展[J]. *食品与发酵工业*,2005,31(2):78-82.
- [6] STIERLE A,STROBEL G,STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Paific yew*[J]. *Science*,1993,260(5105):214-216.
- [7] 李天海. 治癌家珍[M]. 北京:人民军医出版社,2002.
- [8] 杨今祥. 抗癌中草药制剂[M]. 北京:人民卫生出版社,1984.
- [9] 刘静宇. 防癌治癌小绝招——民间土单秘验良方妙法[M]. 北京:中国医药科技出版社,1994.
- [10] 中国人民解放军第263医院传染科. 三枝汤治疗急性传染性肝炎(附150例疗效观察)[J]. *赤脚医生杂志*,1973(试刊版):33-34.
- [11] 昆明军区后勤部卫生部. 云南中草药选[Z]. 1970.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [13] KIESER T,BIBB M J,BUTTNER M J, et al. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. Norwich: The John Innes Foundation,2000.
- [14] 兰琪,姬志勤,顾爱国,等. 苦皮藤内生真菌中杀虫杀菌活性物质的初步研究[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*,2004,32(1):79-84.
- [15] 巴尼物 H L,亨特 B B. 半知菌属图解[M]. 沈崇光,译. 北京:科学出版社,1977.
- [16] 王利娟,贺新生. 植物内生真菌分离培养的研究方法[J]. *微生物学杂志*,2006,26(4):55-60.
- [17] SCHULZ B,WANKE U,DRAEGER S, et al. Endophytes from erbaceous plants and shrubs:effectiveness of surface sterilization methods [J]. *Mycological Research*,1993,97:1447-1450.
- [18] BISSEGGER M,SIEBER T N. Assemblages of endophytic fungi in coppice shoots of *Castanea sativa*[J]. *Mycologia*,1994,86:648-655.
- [19] Jeffrey K Stone,pOLISHOOK J D,WHITE J F, et al. *Endophytic Fungi*[M]//Gregory M Mueller,Gerald F Bills,Mercedes S Foster, et al. *Biodiversity of Fungi, Inventory and Monitoring Methods*. New York: Elsevier Academic Press,2004:241-270.

Research on the influence factors on isolation of endophytes in two medicinal plants

JIANG Guo-yin¹, YANG Ben-shou¹, YU Hong²

(1. Qujing Medical College, Qujing 655000, China;

2. Yunnan Herbal Laboratory, Institute of Herb Biotic Resources, Yunnan University, Kunming 650091, China)