

· 资源与鉴定 ·

无花果内生真菌分离鉴定及其活性研究

马养民^{1*}, 徐小娜¹, 张弘弛^{1,2}

- (1. 陕西科技大学教育部轻化工助剂化学与技术重点实验室, 西安 710021;
2. 山西大同大学农学与生命科学学院, 山西 大同 037009)

[摘要] 目的: 分离和鉴定无花果 *Ficus carica* 植物内生真菌, 并对其活性筛选。方法: 采用形态学方法对分离菌株进行鉴定, 以金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白菜黑斑病菌、苹果腐烂病菌、小麦赤霉病菌、草莓枯萎病菌、青霉菌为测试菌对分离得到的植物内生真菌进行抗菌活性实验。结果: 从健康的无花果植物的根、茎、叶中分离共获得 61 株内生真菌。属于 5 纲, 7 目, 12 科, 20 属。抗菌活性试验表明有 40 株内生真菌具有抗菌活性, 占总内生真菌的 65.57%。结论: 无花果植物内生真菌多样性丰富, 具有很好的研究和应用价值。

[关键词] 无花果; 内生真菌; 分离; 鉴定; 抗菌活性

[中图分类号] R932 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0086-04

Isolation and Identification of Endophytic Fungi from *Ficus carica* and Their Antimicrobial Activity

MA Yang-min^{1*}, XU Xiao-na¹, ZHANG Hong-chi^{1,2}

- (1. Key Laboratory of Auxiliary Chemistry & Technology for Chemical Industry, Ministry of Education Shaanxi University of Science & Technology, Xi an 710021, China;
2. College of Agronomy and Life Science, Shanxi Datong University, Datong 037009, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to isolate the endophyte of *Ficus carica* and screen of its antibiotic activities. **Method:** The endophytic fungi were indentified by morphology, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Alternaria brassicae*, *Valsa mali*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum* sp. *fragariae*, *Penicillium notatum* were selected as the indicator to test the inhibitory activity of the isolated strains. **Result:** Sixty-one strains of endophytic fungi were isolated from the healthy root, stem and leaf of *F. carice*, which belonged to twenty genera, twelve families, seven orders and five classes. Of them forty strains were antimicrobial. The percentage of antimicrobial strains to tested strains is 65.57%. **Conclusion:** It indicated that the endophyte of *F. carica* were diversity and rich and has the best research and application value.

[Key words] *Ficus carica*; endophytic fung; isolation; identification; antimicrobial activity

[收稿日期] 20100321(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(20772075); 教育部科学技术研究重点资助项目(208144)

[通讯作者] * 马养民, 博士, 教授, 博士生导师, 长期从事天然产物化学研究工作, Tel: (029) 86172822, E-mail: myn63@sina.com

无花果 *Ficus carica* 系桑科无花果属的多年生木本植物^[1], 是中国传统医学中一种重要的药用植物, 全株均可入药, 具有一定的抗高血压作用, 最引人瞩目的是无花果含有多种抗癌活性成分。国内外研究表明, 无花果的果实有提高人体的免疫力、抑制 4 种癌细胞发生发展的神奇功效, 具有抗癌作用, 故有人称其为“抗癌斗士”和“21 世纪人类健康的守护

神^[2]。目前,国内对于无花果内生真菌的研究报道较少^[3-4],为此,笔者对无花果植物内生真菌作了系统的研究,包括菌株分离、种群组成、数量与分布及其抗菌活性等。本研究的目的在于通过重新对无花果植物内生真菌的分离与鉴定及其活性筛选,以便发现一些具有较高生物活性或新的菌株,为无花果内生真菌的进一步的研究开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 葡萄糖(分析纯,天津市滨海科迪化学试剂有限公司);琼脂分析纯,牛肉膏和蛋白胨生化试剂(北京奥博星生物技术有限责任公司);硫酸链霉素(华北制药股份有限公司);SW-CJ-1FD 洁净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);YX280B 手提式压力蒸汽灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司);101-1 型干燥箱(上海市实验仪器总厂);DH5000B 电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司);C204 生物显微镜(重庆光电食品有限公司);BS2202S 电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)。

1.1.2 植物样品 无花果,采自西北农林科技大学校园,无其他病虫害。取材部位为根、茎和叶。

1.1.3 培养基 分离培养基(抗生素培养基)马铃薯 200 g,葡萄糖 10 g,琼脂 20 g,链霉素 200 mg,水 1 000 mL;纯化培养基(PDA 培养基)马铃薯 200 g,葡萄糖 10 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL。

1.1.4 测试菌 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠埃希菌 *Escherichia coli*、植物病原真菌白菜黑斑病菌 *Alternaria brassicae*、苹果腐烂病菌 *Valsa mali*、小麦赤霉病菌 *F. Graminearum*、草莓枯萎病菌 *F. oxysporumf. sp. fragariae* 青霉菌 *Penicillium notatum*。由陕西科技大学生命科学与工程学院实验室提供。

1.2 内生真菌的分离纯化 于 2009 年 11 月初采样,按照文献[4]方法,以无花果的根、茎、叶为材料进行分离。

1.3 内生真菌的分类鉴定 采用形态学法,根据内生真菌主要的群体形态特点(包括菌落大小、颜色、表面特征、质地)和个体形态特点(包括菌丝、子实体和孢子形态),对其进行鉴定和分类^[6-8]。

1.4 内生真菌的抗菌活性筛选

1.4.1 内生真菌的培养 将分离获得的内生真菌

分别接入 PDA 固体培养基中,于培养箱(28 ℃)中培养 3 d,用打孔器制成 6 mm 的菌饼备用。

1.4.2 指示菌的培养 按照文献^[9]的方法,在无菌操作条件下,用划线法将 2 株细菌、5 株植物病原真菌接种制作好的培养基中,置于培养箱(28 ℃)中培养 24 h,取出后放入 4 ℃ 冰箱中保存备用。

1.4.3 抗菌实验 用 5 mL 无菌水直接冲洗测试菌的斜面,摇匀后,滴 1 滴于血球计数器载玻片小室内,盖上盖玻片(注意排除气泡),显微镜下进行计数。然后稀释到浓度为 10^6 个/mL 的菌悬液。将 1 mL 菌悬液快速倒入 30 ~37 ℃ 融化的 9 mL 培养基中,摇匀后迅速装到培养皿中,冷却后得到含有不同测试菌的培养基。将菌饼轻放其上,置于 28 ℃ 培养 24 ~36 h,测量抑菌圈大小。

2 结果与分析

2.1 无花果内生真菌的种群组成及不同部位的分布 从无花果植物中分离获得 61 株内生真菌,经形态学方法观察,分属于 5 纲,7 目,12 科,20 属(表 1),在分离获得的 61 株内生真菌中,链格孢属最多,为 13 株,占 21.31%;其次是镰孢霉属,为 8 株,占 13.11%;青霉属,为 6 株,占 9.84%;拟青霉属为 5 株,占 8.20%。这 4 属为无花果的内生真菌优势属,占总数的 52.46%。其中葡萄孢属、粉孢霉属、拟粉孢霉属、聚端孢霉属、曲霉属、链格孢属、镰孢霉属、瘤座霉属、鲜壳孢属、拟青霉属、丛赤壳属这 12 属在有关无花果植物内生真菌的文献中曾报道过^[4-9],而交链孢属、棒孢霉属、离蠕孢属、丝核菌属、茎点菌属、壳单隔孢属、实球黑粉属、球黑粉菌属这 8 属是我们鉴定出的。

无花果植物内生真菌在不同的部位分布是不相同的(表 2)。从表 1 ~2 还可以看出不同的部位中内生真菌分布并不平均。从无花果茎中分离出 21 株内生真菌,占总菌株的 34.43%,属于 16 个属,其中链格孢属为优势属,占总菌株的 4.92%;根中分离出 20 株内生真菌,占总菌株的 32.79%,镰孢霉属、青霉属为优势属,分别占总菌株的 8.20%,4.92%;叶中分离出 20 株内生真菌,占总菌株的 32.79%,属于 10 个属,其中链格孢属为优势属,占总菌株的 13.11%。青霉属、链格孢属、镰孢霉属、拟青霉属这 4 个属在无花果的根、茎、叶 3 个部位都有分布。说明这 4 个属在无花果中普遍存在。而瘤座霉属只在根中发现。拟粉孢霉属、棒孢霉属仅在

表 1 无花果内生真菌种群的组成

纲	目	科	属	n	占菌株数的比例 / %	根	茎	叶
丝孢纲	丛梗孢目	丛梗孢科	葡萄孢属 <i>Botrytis sp.</i>	2	3.28	1	1	0
			聚端孢霉属 <i>Trichothecium sp.</i>	2	3.28	1	1	0
			拟粉孢霉属 <i>Oidiopsis sp.</i>	2	3.28	0	2	0
		暗梗孢科	粉孢霉属 <i>Oidium sp.</i>	3	4.92	0	1	2
			曲霉属 <i>Aspergillus sp.</i>	3	4.92	2	1	0
			青霉属 <i>Penicillium sp.</i>	6	9.84	3	2	1
			交链孢霉属 <i>Atemana sp.</i>	2	3.28	0	1	1
			链格孢属 <i>Altemaria sp.</i>	13	21.31	2	3	8
			镰孢霉属 <i>Fusarium sp.</i>	8	13.11	5	1	2
			瘤座霉属 <i>Tubercularia sp.</i>	1	1.64	1	0	0
		瘤座孢科	棒孢霉属 <i>Clavispora sp.</i>	1	1.64	0	1	0
			离蠕孢属 <i>Bipolaris sp.</i>	1	1.64	0	0	1
			丝核菌属 <i>Rhizoctonia sp.</i>	1	1.64	0	1	0
	无孢目	无孢科						
子囊菌纲	肉座菌目	肉座菌科	丛赤壳属 <i>Nectria sp.</i>	2	3.28	1	1	0
腔孢纲	球壳孢目	球壳孢科	茎点菌属 <i>Phoma sp.</i>	2	3.28	0	1	1
			壳明单隔孢属 <i>Diplodina sp.</i>	1	1.64	0	0	1
			鲜壳孢属 <i>Zythia sp.</i>	3	4.92	2	1	0
冬孢菌纲	黑粉菌目	黑粉菌科	实球黑粉属 <i>Doassnia sp.</i>	1	1.64	0	0	1
			球黑粉菌属 <i>Tolyposporium sp.</i>	2	3.28	1	1	0
囊菌纲	曲霉目	曲霉科	拟青霉属 <i>Penicillium sp.</i>	5	8.20	1	2	2

茎中分布,离蠕孢属、壳明单隔孢属、实球黑粉属是叶独有的。可见,无花果内生真菌在种类组成上具有多样性。

表 2 不同部位真菌菌株比较

部位	菌株数	涉及属	占总菌株数比例 / %	涉及属占总属数比例 / %
根	20	11	32.79	55
茎	21	16	34.43	80
叶	20	10	32.79	50
总计	61	-	100	-

2.2 无花果内生真菌活菌抑菌活性筛选结果 从无花果中分离到的 61 株内生真菌,通过对 7 种测试菌进行抑菌试验,发现有 40 株对一种以上的测试菌有抑制作用,占总菌株的 65.57%,其中 22 株内生真菌对 5 种以上的测试菌具有抑制作用,占总菌株的 36.07%;32 株内生真菌对 3 种以上的测试菌具有抑制作用,占总菌株的 52.46%。也有菌株对所有测试菌均无抑制作用。见表 3。

从表 3 可以看出,61 株内生真菌对测试菌的抑制作用具有一定差异。从抑菌效果来看,对细菌的抑菌作用效果比较明显,对金黄色葡萄球菌有抑制作用有 32 株,占总菌株的 52.46%;对大肠埃希菌有抑制作用有 29 株,占总菌株的 47.54%,而在植物病原真菌中对草莓枯萎病菌的抑制作用效果最明显,有 33 株,占总菌株的 54.10%;对苹果腐烂病菌的抑制作用最差,有 2 株,占总菌株的 3.28%;对青霉菌有抑制作用

有 31 株,占总菌株的 50.82%;对小麦赤霉病菌有抑制作用有 30 株,占总菌株的 49.18%;对白菜黑斑病菌有抑制作用有 9 株,占总菌株的 14.75%。活性菌株抗菌活性多以高活性为多(抑菌圈直径 > 16 mm),低活性和中等活性的菌株较少。说明无花果内生真菌中存在着广泛的抗菌活性资源。

还可以看出,抗菌活性的真菌主要分布在茎和根中。茎中有 18 株具有抗菌活性,占抗菌活性菌株总数的 45%;根中有 14 株具有抗菌活性,占抗菌活性菌株总数的 35%;叶中有 8 株具有抗菌活性,占抗菌活性菌株总数的 20%。其中 FL03, FL14, FS04, FS05, FS06, FS12, FS16 这 7 株内生真菌对 6 种测试菌都有很明显的抑菌性(抑菌圈直径 19 mm),而 FL03 属于拟青霉属,对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径可达到 24.5 mm; FL14 属于拟青霉属,对大肠埃希菌和白菜黑斑病菌抑菌圈最大,抑菌直径分别为 38, 25 mm; FS16 属于拟粉孢霉属,抑菌性也很明显,对 6 种测试菌的抑菌圈直径在 19 ~25 mm。说明这些菌株有潜在的抗菌物质的存在,值得进一步研究和开发。

3 讨论

内生真菌分离研究中分离培养条件和表面消毒是两个主要的因素。分离培养条件掌握不当,会使植物内生真菌不易辨认、挑取和分离。本实验采取控制温度法,控制温度在 23 以保证真菌能分

表 3 无花果内生真菌的抗菌活性

No.	细菌		植物病原真菌				
	A	B	C	D	E	F	G
FR01	-	+++	+++	-	+++	-	+++
FR03	+++	+++	+++	-	++++	-	++++
FR04	+++	++	+++	-	+++	-	++++
FR05	+++	++++	+++	-	++++	-	++++
FR06	-	++++	++++	-	+++	-	+++
FR07	-	+++	+++	-	+++	-	+++
FR08	-	-	+	-	-	-	-
FR11	+++	+++	++++	-	++++	-	++++
FR12	+++	+++	+++	-	+++	-	+++
FR13	+++	+++	+++	-	+++	-	+++
FR14	++++	++++	+++	-	++++	-	-
FR16	+++	-	-	+++	-	-	-
FR17	+++	++	++	+++	-	-	++
FR18	-	-	-	++++	-	-	-
FL01	+++	+++	++	-	+++	-	+++
FL03	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++
FL06	-	-	-	-	-	-	+
FL09	-	+	-	-	-	-	-
FL13	-	+++	-	-	++	-	-
FL14	++++	+++	+++	+++	+++	-	+++
FL17	+++	++	+++	-	-	-	+++
FL18	++	+++	+++	-	-	-	+++
FS01	+++	+	-	+++	+++	-	-
FS02	+	++	+++	-	+++	-	++
FS03	++	+++	+++	-	+++	-	+++
FS04	++	++	+++	++	++++	-	+++
FS05	+++	++	+++	+++	++++	-	+++
FS06	+	++	+++	+++	++++	-	+++
FS07	+	+	++	-	++	-	+++
FS08	++	-	++	-	+++	-	++
FS10	-	-	++	-	++	-	++
FS11	+++	+++	+++	-	+++	-	+++
FS12	+++	+++	++++	+++	+++	-	+++
FS13	-	++	+++	-	+++	-	++
FS15	+++	+++	+++	-	+++	-	+++
FS16	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++
FS18	++	-	-	-	-	-	-
FS19	++	+	+++	-	+++	-	+++
FS20	+++	++	+	-	+++	-	++
FS21	-	-	+	-	-	-	-

注: F 表示无花果, R 表示根部, L 表示叶部, S 表示茎部;
- : <6 mm; + : 6 < <10 mm; ++ : 10 mm < <16 mm; +++ :
16 mm < <26 mm; ++++ : >26 mm; A. 大肠埃希菌; B. 金黄色葡萄球菌; C. 草莓枯萎病菌; D. 白菜黑斑病菌; E. 小麦赤霉病菌;
F. 苹果腐烂病菌; G. 青霉菌。

批次长出。表面消毒是内生真菌分离研究中最关键的因素,其中消毒液浓度及消毒时间对植物内生真菌的存活有较大的影响。如果消毒液浓度过低、消毒时间过短,就不能有效地杀死植物表面的真菌和

细菌,而消毒液浓度过大、消毒时间过长,则会导致一部分植物内生真菌被杀死。在文献[4]中笔者曾经使用有效氯浓度为 2.5% 次氯酸钠消毒 10 min,后来经过多次的实验发现,有效氯浓度为 2% 的次氯酸钠,消毒 3 min 所得到的消毒效果较好,能有效地杀死植物表层细菌和真菌,又能较大程度的保护植物内生真菌种类及数目的完整性。

内生真菌在植物中分布的种类和活性随季节的不同而发生变化,不同的生长环境也影响内生真菌的种类和它的抗菌活性。在文献[5]中用白菜黑斑病菌、苹果腐烂病菌为测试菌对无花果植物内生真菌进行抗菌实验,其结果与这次实验不同,这与内生真菌的外部因素有关。本研究中所用的无花果植物样品采自于秋季的同一个地方,由于季节和地点的影响,因此所分离的内生真菌的种类和其抗菌活性有可能受到了一定的限制。以后将在不同的季节和不同的采样地采集植物样品,希望得到更多的活性内生真菌菌株。

[参考文献]

[1] 全国中草药组. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 345.
[2] 曹尚银, 杨福兰, 吴顺. 无花果抗癌作用研究新进展[J]. 林业科技开发, 2004, 18(2): 13.
[3] 马养民, 冯成亮, 张弘弛. 无花果内生真菌 FL25 发酵产物中两个吲哚生物碱的研究[J]. 化学研究与应用, 2009, 21(8): 1173.
[4] 苏印泉, 孙奎, 马养民, 等. 无花果内生真菌的分离及其鉴定[J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1281.
[5] 张弘弛, 马养民, 刘瑞, 等. 无花果内生真菌的研究——抗植物病原真菌活性的筛选[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 232.
[6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 129.
[7] H L 巴尼特, B B 亨特. 半知菌属图解[M]. 沈崇尧译. 北京: 科学出版社, 1977: 41.
[8] Barnetthl, Baryb. Hunter illustrated genera of imperfect fungi[M]. New York: Macmillan publishing company, 1986: 41.
[9] 李立顺, 时维静, 李小军, 等. 四倍体蒲公英活性成分比较及体外抑菌作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(6): 55.

[责任编辑 邹晓翠]