

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (3) :276 - 284; 4 March 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.004

飞龙斩血内生菌种群分布及抑菌活性检测

杨本寿^{1,2,3}, 苗翠苹⁴, 张建华³, 姜国银³, 杨德^{1*}, 虞泓^{2*}

¹ 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650091

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

³ 曲靖医学高等专科学校微生物研究所, 云南 曲靖 655000

⁴ 云南大学, 云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091

摘要: 【目的】研究药用植物飞龙斩血内生菌的种群组成及其抑菌活性, 以了解飞龙斩血内生菌的种群分布状态和得到抗菌活性菌株。【方法】采用严格的表面消毒程序、添加抑菌剂的方法分离、培养内生菌株。利用表型和分子技术相结合的方法对内生菌进行分类鉴定。纸片扩散法对分离获得的内生菌进行抑菌活性试验。【结果】从飞龙斩血植株内分离得到了3株内生细菌, 1株内生放线菌和82株内生真菌。分类鉴定为14目16科27属, 镰孢属 (*Fusarium*)、拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 为飞龙斩血内生真菌中的优势种群。通过对30株病原指示菌的抑菌活性检测, 18株内生菌对多种指示菌有明显的抑制作用。16株是内生真菌, 分属11属。【结论】本试验研究了飞龙斩血内生菌的种群分布, 获得了一些具有抗菌活性的内生菌, 为飞龙斩血内生菌资源的开发利用提供了基础。

关键词: 飞龙斩血, 内生菌, 种群分布, 鉴定, 抑菌活性

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 03-0276-09

内生菌普遍存在于药用植物内, 广泛分布在植物各器官、组织的细胞内及细胞间隙^[1-3]。具有宿主植物种类多样性以及在宿主植物组织中分布的多样性。此外, 内生菌自身种类多样, 包括内生细菌、内生放线菌和内生真菌^[4]。由于内生菌的生境相对隐蔽, 是一大类尚未充分认识和研究开发的微生物资源, 具有潜在的新物种、新基因、新的活性次生代谢产物的多样性。当前, 随着抗生素药物广泛应用于临床, 越来越多的病原菌产生了不同程度的耐药性。临床上大量耐药性菌株的出现, 导致原本有

效的抗菌药物疗效降低甚至失去作用, 过去已经控制的疾病如肺结核等再度流行。病原菌耐药性成为全球关注的严峻问题, 而新药研发的速度远远落后于病原菌产生耐药性的速度^[5], 人们开始从天然药物特别是中草药植物中寻求抗菌感染的新药。植物内生菌的代谢产物具有抑菌、杀虫、调节植物生长、抗肿瘤等多种活性^[6-9]。而药用植物中个别内生菌可以产生与宿主相同或相似的生物活性物质^[10-13], 从而可以替代濒危、珍稀药用植物, 减少天然药用植物多样性的破坏。由于自然资源的限制和植物本身

基金项目: 云南省教育厅科学研究重点项目基金 (2012Z148C); 云南省教育厅科学研究基金 (2012Y209)

* 通信作者。杨德, E-mail: yangde99@qq.com; 虞泓, E-mail: hongyu@ynu.edu.cn

作者简介: 杨本寿 (1971 -), 男, 河南获嘉人, 博士研究生, 研究方向为植物资源评价与利用方向。E-mail: yangbenshou@163.com

收稿日期: 2013-07-19; **修回日期:** 2013-11-28

条件的限制,人们把目光转向了寄生于药用植物并能够产生与宿主相同或相似次生代谢产物的内生菌。因此,研究药用植物内生菌具有重要的生态、经济和社会意义,是植物微生物学科基础及应用的挑战性领域^[14]。

芸香科箬钩属植物飞龙斩血^[15] (*Toddalia asiatica*),又名飞龙掌血,木质藤本,以根或叶入药。具有散瘀,止血,定痛的功效。近年来,随着需求量增加和有序采挖,野生飞龙斩血资源日益减少,环境和生态受到破坏。为了保护野生飞龙斩血资源,研究飞龙斩血内生菌的种群组成,以了解飞龙斩血内生菌与宿主之间的关系,对深入探究内生菌在植物体内的生命活动现象提供依据。同时,为获得抗菌活性菌株特别是对临床多重耐药菌株有抑制的活性菌株以寻求具有新颖结构性质的天然产物,为研发新型抗菌药物提供基础。

本试验对在云南昭通盐津县境内 2010 - 2012 年冬、春、秋三季定点随机采挖的飞龙斩血根、茎进行了严格的表面消毒和分离。比较系统、全面的研究了飞龙斩血内生细菌、放线菌、真菌的分离、分类鉴定和活性检测,分析并检测了飞龙斩血内生菌的种群组成及其抑菌活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物:健康植株 *T. asiatica* 随机定点采挖于云南省昭通市盐津县。

1.1.2 菌株和质粒:表 1 为试验中所用到的菌株、质粒的特性及来源。其中,临床多重耐药菌株以所采集的病人标本号为编号。药敏试验显示,大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 1310a400 对头孢唑林、头孢他啶等 9 种药物、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 50 对庆大霉素、头孢唑林等 16 种药物、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* MRS, 耐甲氧西林) 1310a494 对头孢西丁、氨苄西林等 8 种药物、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 0013100172 对复方新诺明、青霉素等 6 种药物、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 0013100173 对氨苄西林、哌拉西林等 5 种药物多重耐药。

1.1.3 培养基和培养条件:细菌培养用 Nutrient Agar 培养基,发酵用 LB 培养基。内生放线菌培养

表 1. 供试菌株和质粒

Table 1. The strains and plasmids used in this work		
strains and plasmids	characterization	source
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lac U169</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA 92008, USA)
	(Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15)	
	<i>hsdR17 recAI endAI</i> <i>gyrA96 thiIrelAI</i>	
gram positive bacteria (G ⁺)		
<i>Bacillus cereus</i> Ym1004	wild type	1
<i>Bacillus subtilis</i> CMCC27853	wild type	2
<i>Staphylococcus albus</i> Ym1029	wild type	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	wild type	2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Ym1033	wild type	1
<i>Mycobacterium smegmatis</i> Ym1037	wild type	1
<i>Sardine lutea</i> Ym1028	wild type	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Ym1077	wild type	1
gram negative bacteria (G ⁻)		
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	wild type	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	wild type	2
<i>Sigel sonnei</i> Ym1046	wild type	1
plant pathogenic fungi		
<i>Aspergillus niger</i> Ym3029	wild type	1
<i>Botrytis cinerea</i> Ym3061	wild type	1
<i>Chaetomium</i> sp. Ym3040	wild type	1
<i>Fusarium avenaceum</i> Ym3065	wild type	1
<i>Isaria</i> sp. Ym3032	wild type	1
<i>Helminthosporium maydis</i> Ym3076	wild type	1
<i>Ophiostoma minus</i> Ym3429	wild type	1
<i>Gibberella fujikuroi</i> Ym3215	wild type	1
dermatophytes		
<i>Hormodendrum compactum</i> Ym3077	wild type	1
<i>Hormodendrum dermatitidis</i> Ym3078	wild type	1
<i>Hormodendrum pedrosoi</i> Ym3079	wild type	1
<i>Microsporium gypseum</i> Ym3080	wild type	1
<i>Trichophyton gypseum</i> Ym3092	wild type	1
<i>Trichophyton verrucosum</i> Ym3096	wild type	1
clinical multi-drug resistant bacteria		
<i>Escherichia coli</i> 1310a400		3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 50		3
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRS) 1310a494		3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 0013100172		4
<i>Escherichia coli</i> 0013100173		4
plasmids		
pMD18-T	T-vector, 2.7 kb, Amp ^R , lacZ	TaKaRa Co.

1: Purchased from Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, 2: Purchased from Beinuo Life Science, 3: Provided by the Laboratory Department of Qujing First People's Hospital of Yunnan Province, 4: Provided by the Laboratory Department of Qujing Second People's Hospital of Yunnan Province.

用 TSA^[16], 分离培养基用 TSA + 萘啶酸 (nalidixic acid, 25 μ g/mL) + 制霉菌素 (fungicidine, 50 μ g/mL), 产孢培养基用 MS agar^[16], 发酵用 ISP2 培养基。真菌用 PDA 培养基培养。种子和发酵培养基用 PDB 液体培养基, 分离培养基用 PDA + 氨

芞青霉素 (ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。真菌鉴定用 PDA 固体培养基、促孢培养基。皮肤致病真菌用沙搏弱氏培养基培养。分离培养温度为 28 $^{\circ}\text{C}$, 菌株纯化后, 真菌培养温度为 28 $^{\circ}\text{C}$, 细菌及皮肤致病真菌培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 植物致病真菌及内生细菌、内生放线菌培养温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.1.4 引物:用来扩增细菌、放线菌 16S rDNA 基因的引物^[17]是: PrimerF: 5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3'; PrimerR: 5'-AAGTCGTAACAAGGTAAC C-3'。扩增 23S rDNA 基因特异插入片断的引物^[18]是: 23Ins F: 5'-MADGCGTAGNCGAWGG-3'; 23Ins R: 5'-GTGWCGGTTTBNBGTA-3'。用来验证放线菌。扩增真菌 ITS 序列的引物^[19]是: ITS1: 5'-TCCGTA GGTGAACCTGCCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3'。引物由上海生工公司合成。

1.1.5 主要试剂:连接酶、培养基成分等购自上海生工或北京百泰克公司; 抗生素购自 Sigma 公司, 抗生素使用浓度及配制为制霉菌素 (fungicidin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氨芞青霉素 (ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶于双蒸水, 萘啶酸 (nalidixic acid, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶于 0.15 mol/L 的 NaOH。

1.2 表面消毒、分离、纯化

将健康飞龙斩血植株的根和茎洗净、晾干, 削去外皮层, 将部分木质部、韧皮部、内皮层一同切成小块, 用 75% ethanol 溶液消毒 60 - 120 s 或 0.5% KMnO_4 溶液消毒 30 - 120 s^[20]。采用贴组织块培养法^[21], 将小块样品切口面紧贴 Nutrient Agar、TSA 或 PDA 培养基平板上进行培养。待长出菌落后, 挑取尖端菌丝转接到含有抗生素的新的培养基斜面上进行纯化, 定向筛选和纯化菌株。

纯化后的菌株分别接种到含和不含一定量植物组织液(榨取的飞龙斩血新鲜叶片的液体, 0.22 μm 滤膜除菌)的 Nutrient Agar、PDA 或 TSA 培养基斜面上, 含植物组织液的斜面培养基上出现较早的菌株往往就是植物内生菌而非污染菌。

1.3 表型分类鉴定

1.3.1 KOH 裂解法快速判定革兰氏染色反应^[22]:在洁净的载玻片上滴 1 - 2 滴 3% (W/V) KOH 溶液, 用竹签挑取较多菌体涂在 KOH 溶液中, 充分搅动至完全溶解。30 - 60 s 后, 用竹签挑起菌体 5 - 8 cm 高度观察有无丝状物出现, 有则为革兰氏阴性菌; 无则为革兰氏阳性菌。

1.3.2 内生细菌、放线菌形态鉴定:用半固体琼脂穿刺培养实验进行动力检测, 验证细菌鞭毛的有无。细菌菌株垂直接种于用 0.35% 的 LB、TSB 半固体琼脂培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 每 24 h 观察一次, 记录结果。只沿穿刺线生长的动力阴性菌为无鞭毛菌株, 而弥漫性生长的动力阳性菌则为有鞭毛菌株。

对内生细菌和放线菌进行革兰氏染色, 将其制备成染色标本。油镜观察菌落、细胞的形态以及芽孢、荚膜和鞭毛等细胞器的特征情况。

1.3.3 内生真菌的形态分类鉴定:采用直接挑取菌丝法和插片培养法, 使用促孢培养基培养、黑白光线交替培养、紫外照射等方法诱导真菌产孢。镜检观察真菌孢子、菌丝体、产孢结构、菌核等显微特征, 根据文献 [23 - 24] 进行分类鉴定。

1.4 分子鉴定

1.4.1 内生菌株基因组总 DNA 的提取:内生细菌用 LB 培养基摇床培养 1 d, 采用 SDS 方法^[25]提取 DNA; 内生放线菌用 TSB 培养基摇床培养 3 - 5 d, 盐析法^[16]提取 DNA; 扩增细菌、放线菌的 16S rDNA 基因和 23S rDNA 基因特异插入片断。检测试验菌株的 23S rDNA 基因特异性插入片段的 PCR 扩增产物, 在电泳图谱上只有 380 bp 大小条带的实验菌株通常就是高 G + C 含量的放线菌^[18]。内生真菌用 PDB 液体摇床培养 3 - 5 d 后, 收集新鲜菌丝, 采用 CTAB 法^[26]提取 DNA, 扩增 ITS 序列, 建立分子进化发育系统树, 确立菌株种属关系。

1.4.2 测序:采用 50 μL PCR 扩增反应体系, 扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 54 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。条带单一、浓度高的 PCR 扩增产物胶纯化后直接测序。有多个条带的 PCR 扩增产物, 胶纯化得到目的条带, 与载体连接转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。相关 DNA 操作参考文献 [25]。测序由上海生物工程公司完成。

1.5 抗菌活性检测

少量发酵内生菌株, 放线菌、真菌 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 摇床培养 5 d, 细菌 37 $^{\circ}\text{C}$, 3 d。在发酵液中加入等体积的乙酸乙酯, 浸提 48 h 后, 吸取上层浸提液, 旋蒸、浓缩至干, 加入 2 mL 甲醇制成发酵样品。液体摇床培养各种病原指示菌, 取菌悬液 0.2 mL, 无菌条件下涂布到相应的固体培养基上制成含菌平板。设置甲醇的空白对照组, 采用滤纸片

扩散法(直径6 mm, 3片叠加)检测各内生菌株的抗菌活性, 每个样品重复3次。十字交叉法测量抑菌圈直径的大小。

1.6 分子系统发育分析

采用 BLAST 和 DNAMAN 序列分析软件对测序结果进行序列一致性分析。在 GenBank 中搜索同源序列, 调出相关菌株的 ITS 序列片段, 利用 MEGA 5 进行多序列比对, 用 Neighbor-Joining 法, Maximum Composite Likelihood 模型构建系统进化发育树。Bootstrap(1000次)重复检验。

2 结果

2.1 内生菌分离

对飞龙斩血组织块样品进行严格的表面消毒, 采用在不同培养基中加入适当浓度的限制性生长抑制剂的方法。3次分离共获得菌株296株。其中细菌11株, 放线菌3株, 真菌282株。对形态相同的菌株进行归类, 选择代表性菌株, 共得到86株内生菌, 包括3株内生细菌、1株内生放线菌和82株内生真菌。菌株命名根据采集时间以 F-1, F-2, F-3 开头。

2.2 飞龙斩血内生细菌、放线菌的形态鉴定和分布

2.2.1 KOH 裂解法快速判定革兰氏染色反应: 纯化后的内生细菌、放线菌确定为4株, 分别是菌株

F-1-007、F-1-29、F-1-31、F-3-003。用竹签挑取菌体涂 KOH 溶液中至完全溶解30-60 s后, 观察到菌株 F-1-007、F-1-31 在 >8 cm 高度处出现了丝状物, 而菌株 F-1-29、F-3-003 没有出现。因此, 菌株 F-1-007、F-1-31 为革兰氏阴性菌, 而菌株 F-1-29、F-3-003 为革兰氏阳性菌。

2.2.2 内生细菌、放线菌形态鉴定: 4株菌株在半固体琼脂培养基穿刺线周围均成弥漫性生长, 均为动力阳性菌, 均具有鞭毛。革兰氏染色观察结果显示, F-1-007 菌落圆形, 突起, 半透明, 有粘液; 细胞杆状, 胞内无芽孢, 有颗粒; 革兰氏阴性。F-1-29 细胞直杆状, 成对或链状排列, 周生鞭毛; 胞内有芽孢, 芽孢呈椭圆或圆形; 革兰氏阳性。F-1-31 细胞杆状, 革兰氏染色阳性、阴性可变; 周生鞭毛; 椭圆形芽孢。F-3-003 气生菌丝呈淡紫色, 基内菌丝褐色。孢子丝顶端紧密, 螺旋形, 具长柄, 孢子椭圆形或柱形, 能形成孢子链。

2.2.3 内生真菌的形态鉴定: 分离得到的内生菌中, 内生真菌种类、数量最多, 且分布广泛, 遍及各个分离组织。3次采样, 共获得282株内生真菌。通过镜检观察, 发现镰孢属 *Fusarium*、拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、曲霉属 *Aspergillus* 数量最多, 为飞龙斩血内生真菌中的优势种群。此外, 生赤壳属 *Bionectria*、毛霉属 *Rhizopus*、汉斯霉属 *Hansfordia* 也较为常见。3种内生真菌代表属的显微图见图1。

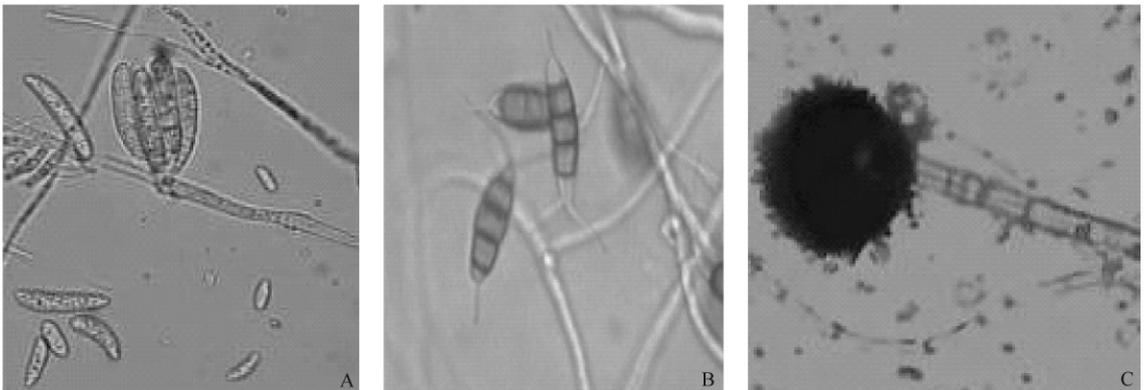


图1. 飞龙斩血代表属的显微形态

Figure 1. The microscopic shape charts of representative genus in *T. asiatica*. A: *Fusarium* F-3-51; B: *Pestalotiopsis* F-3-21; C: *Aspergillus* F-1-001.

2.2.4 分子鉴定: PCR 扩增 F-1-007、F-1-29、F-1-31、F-3-003 菌株的 23S rDNA 基因特异插入片段, 结果只有菌株 F-3-003 的 23S rDNA 基因特异插入片

段得到380 bp左右大小的条带, 由此判断出菌株 F-3-003 是放线菌。而菌株 F-1-007、F-1-29、F-1-31 都没有扩增出相应的条带。扩增4株菌株的16S

rDNA 基因序列,得到 4 条 1600 bp 左右的条带。序列上传到 GenBank,菌株 F-1-007、F-1-29、F-1-31、F-3-003 的基因登录号分别为 KF751663、KF751669、KF751662 和 KF751667。扩增内生真菌的 ITS 序列,得到了 560 bp 左右的条带。根据测序结果,建立分子进化发育系统树,结合菌株形态,确立了各菌株的种属关系。

2.2.5 飞龙斩血内生菌的种群分布:通过表型分类结合分子生物学技术鉴定,将飞龙斩血内生菌分为 14 目 16 科 27 属。其中,内生细菌鉴定为 2 目 2 科 3 属,内生放线菌为 1 目 1 科 1 属,内生真菌为 11 目 13 科 23 属。具体分布见表 2。结果表明,飞龙斩血植物内生菌在种群、种类上具有多样性的特点,为进一步筛选具有生物活性天然产物的真菌菌株提供了丰富的菌种资源。此外,分离得到的飞龙斩血内生真菌优势类群在属级水平上存在相似性,因为时节不同存在一定的区别。

表 2. 飞龙斩血内生菌种群分布

Table 2. The distribution of endophytes isolated from *T. asiatica*

order	family	genera
<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Eubacteriales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> <i>Paenibacillus</i>
<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Moniliales</i>	<i>Moniliaceae</i>	<i>Penicillium</i> <i>Trichothecium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Trichoderma</i> <i>Hansfordia</i> <i>Nigrospora</i> <i>Fusarium</i> <i>Myrothecium</i>
<i>Sphaeropsidales</i>	<i>Discellaceae</i>	<i>Phymatotrichum</i>
<i>Melanconiales</i>	<i>Melanconiaceae</i>	<i>Pestalotia</i> <i>Pestalotiopsis</i> <i>Melanconium</i> <i>Monochaetia</i>
<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Rhizopus</i> <i>Mucor</i>
<i>Sphaeropsidales</i>	<i>Sphaeropsidaceae</i>	<i>Phomopsis</i>
<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Pleospora</i>
<i>Hypocreales</i>	<i>Bionectriaceae</i>	<i>Bionectria</i>
<i>Xylariales</i>	<i>Xylariaceae</i>	<i>Xylaria</i>
<i>Onygenales</i>	<i>Onygenaceae</i>	<i>Auxarthron</i>
<i>Diaporthales</i>	<i>Schizoparmaceae</i>	<i>Pilidiella</i>
<i>Agonomycetales</i>	<i>Mycelia Sterilia</i>	<i>Rhizoctonia</i> <i>Sclerotium</i>

2.3 抗菌活性检测实验

滤纸片法检测 86 株飞龙斩血内生菌的抑菌活

性,结果 1 株内生细菌、1 株内生放线菌和 16 株内生真菌,共计 18 株内生菌株的发酵甲醇浸提液对所测定的 30 株病原指示菌表现出对 2 种以上或多种指示菌有活性抑制作用,结果见表 3。抑菌活性菌株多样,抑菌活性菌株数占到了内生菌总数的 20.9%。抑菌效果最为明显的是内生真菌 F-1-001、F-2-24、F-2-46、F-3-KONG、F-3-GBY,而且 5 株内生真菌发酵产物的抑菌范围都较广,均具有广谱抑菌活性。其中菌株 F-GBY 对所检测的 30 株病原指示菌均具有较强的抑菌活性,抑菌圈直径最大可达 55 mm,最小也达到了 12 mm。具广谱、高度抑菌活性。菌株 F-3-KONG 对 30 株指示菌中的 29 株具有较强的抑菌活性。

2.4 构建抑菌活性真菌进化系统发育树

18 株抑菌活性菌株中有 1 株细菌 1 株放线菌和 16 株真菌,真菌居多。将 16 株真菌 ITS 区序列上传到 GenBank,菌株后括号内的序号即为所获得的基因登录号。这些抑菌活性内生菌都来自同一宿主,建立进化系统发育树便于进一步了解它们在同一宿主内的进化多样性及其彼此间的关系。登陆 GenBank 对 16 株抑菌活性菌株的 ITS 序列进行 BLAST 比对、分析,选用 *Amanita cinereopannosa* FJ596838 作为外类群,构建系统发育树。从图 2 中可以看出,16 株活性菌株在进化发育上,分属 11 属,在遗传上、类群上表现出多样性的特征。

3 分析和讨论

药用植物内生菌普遍存在于药用植物内部,分布广泛,是植物微生态系统的重要组成部分。对宿主的生长发育起着多种有益或者有害的生物学作用。本次试验对药用植物飞龙斩血内生细菌、放线菌、真菌的种群组成进行了研究,较为系统、全面地分析了飞龙斩血内生菌的种群组成。为进一步了解飞龙斩血内生菌与宿主之间的关系,深入探究内生菌在植物体内的生命活动现象提供了依据,丰富了药用植物内生菌资源。

药用植物内生菌分离的数量和种类受季节、区域、树龄以及宿主植物生长的环境等因素的影响。本试验定点随机采样,保证了飞龙斩血内生菌分离、培养的多样性和稳定性。在植物内生菌分离、培养的过程中,排除污染菌,定向筛选到特定的内生菌,

表 3. 飞龙斩血内生菌株的抑菌试验结果

Table 3. The results of antimicrobial activity of endophytes isolated from *T. asiatica*

indicator bacteria	strains (number) endophy-F-																		
	1-001	1-007	1-18	1-26	1-30	1-60	1-64	1-99	2-24	2-30	2-46	2-52	2-71	3-003	3-21	3-51	3-KO	3-NG	3-GBY
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	18	15	-	11	12	15	11	26	22	16	11	11	-	-	14	-	20		28
<i>Bacillus cereus</i> Ym1004	19	14	-	13	-	-	14	-	13	-	17	12	-	-	-	-	19		29
<i>Bacillus subtilis</i> CMCC27853	18	13	10	10	15	12	11	10	15	12	15	14	10	-	-	-	17		39
<i>Staphylococcus albus</i> Ym1029	20	14	10	-	15	-	12	-	15	-	17	15	10	-	-	-	18		33
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Ym1033	18	14	-	-	14	-	-	13	18	10	13	-	-	-	-	-	11		50
<i>Sardine lutea</i> Ym1028	10	-	-	-	-	-	-	-	18	-	10	-	-	14	-	-	20		50
<i>Mycobacterium smegmatis</i> Ym1037	15	15	-	14	12	-	-	20	14	-	15	-	-	12	-	12	14		28
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Ym1077	22	11	-	-	13	13	10	11	11	-	20	-	-	13	13	-	18		30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	18	13	-	14	10	-	13	9	13	-	15	13	-	-	-	-	20		42
<i>Sigel sonnei</i> Ym1046	15	14	12	14	14	-	-	11	19	14	18	13	11	-	-	-	16		38
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	12	13	12	-	11	-	-	18	19	12	14	-	-	-	-	-	15		46
<i>Hormodendrum compactum</i> Ym3077	+	-	-	10	-	-	13	-	13	-	14	-	-	-	-	9	18		35
<i>Microsporium gypseum</i> Ym3080	18	-	-	-	-	10	-	-	-	-	13	-	-	-	-	13	33		55
<i>Hormodendrum dermatitidis</i> Ym3078	19	13	10	-	13	10	16	11	21	-	-	-	-	-	-	-	22		22
<i>Hormodendrum pedrosoi</i> Ym3079	18	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-	15	11	35		45
<i>Trichophyton gypseum</i> Ym3092	24	-	12	11	13	-	-	-	15	14	13	-	-	-	-	-	26		45
<i>Trichophyton verrucosum</i> Ym3096	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14		19
<i>Botrytis cinerea</i> Ym3061	20	11	16	-	15	-	-	-	16	-	12	-	-	-	-	-	33		33
<i>Isaria</i> sp. Ym3032	21	13	11	-	-	-	-	10	11	-	15	13	10	-	-	-	17		40
<i>Helminthosporium maydis</i> Ym3076	14	16	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	12	-	12	17		32
<i>Ophiostoma minus</i> Ym3429	23	14	-	11	12	-	17	12	-	9	12	14	-	-	-	14	23		46
<i>Aspergillus niger</i> Ym3029	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11		17
<i>Chaetomium</i> sp. Ym3040	19	7	12	-	-	-	16	11	-	-	12	-	-	-	-	-	15		31
<i>Fusarium avenaceum</i> Ym3065	14	12	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	17	-	-	12	16		46
<i>Gibberella fujikuroi</i> Ym3215	9	11	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	13		32
<i>Escherichia coli</i> 1310a400	-	-	8	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	13		25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 50	13	8	-	9	-	11	10	13	-	-	-	18	-	-	-	-	26		12
<i>Staphylococcus aureus</i> 1310a494	-	-	-	-	-	-	-	-	9	10	8	9	-	-	-	-	12		28
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 0013100172	18	-	-	-	-	11	-	11	11	-	9	-	-	-	-	-	-		29
<i>Escherichia coli</i> 0013100173	8	9	8	-	-	-	-	-	9	10	-	-	-	-	-	-	13		26

The average value of three repeats “-”: No inhibition.

不同的表面消毒程序的比较分析^[27-28]和限制性生长抑制剂的选用非常关键^[29]。选用 75% ethanol 溶液 60 - 120 s 或 0.5% KMnO₄ 溶液 30 - 120 s 进行严格的表面消毒。筛选时,在培养基中加入抗生素,并与含有植物组织提取液的培养基进行培养比对,很好的排除了污染菌和随机附着于样品的其它菌,起到了定向筛选的作用。

传统的微生物鉴定分类中,主要以形态、生理生化、生态特征为依据,真菌的鉴定尤其以有性阶段的形态特征为主要依据。在实践操作中,即使采取了一定的方法比如紫外照射、促孢培养等,仍然有一些真菌不能或者不易形成有性态。一些近似种和疑难种在形态鉴定中也往往会受到人为因素的干扰。与传统分类鉴定的方法相比,采用表型和分子技术相

结合进行分类的方法^[30-31],更为准确、快速、可靠。

通过抑菌活性检测试验,得到了 18 株抑菌活性菌株,分属于 13 属。抑菌活性菌株多样化,为深入研究抑菌活性物质及其开发利用奠定了基础。特别是在抑菌试验检测中,选用了多株临床多重耐药菌进行活性检测,为进一步研发微生物源创新药物、解决耐药性问题提供了资源。试验中,菌株 F-1-001、F-2-24、F-2-46 的抑菌活性多次传代后,出现了活性丢失现象,有的难以恢复。而菌株 F-3-KONG、F-3-GBY 多次传代,活性稳定。抑菌活性丢失现象是继代培养造成的菌株退化引起的,菌株自身存在的自发突变和培养条件的改变都会造成菌株的退化。最根本的原因是菌株自身的自发突变引起的。传代次数越多,菌株发生变异的几率越高,控制抑菌活性性

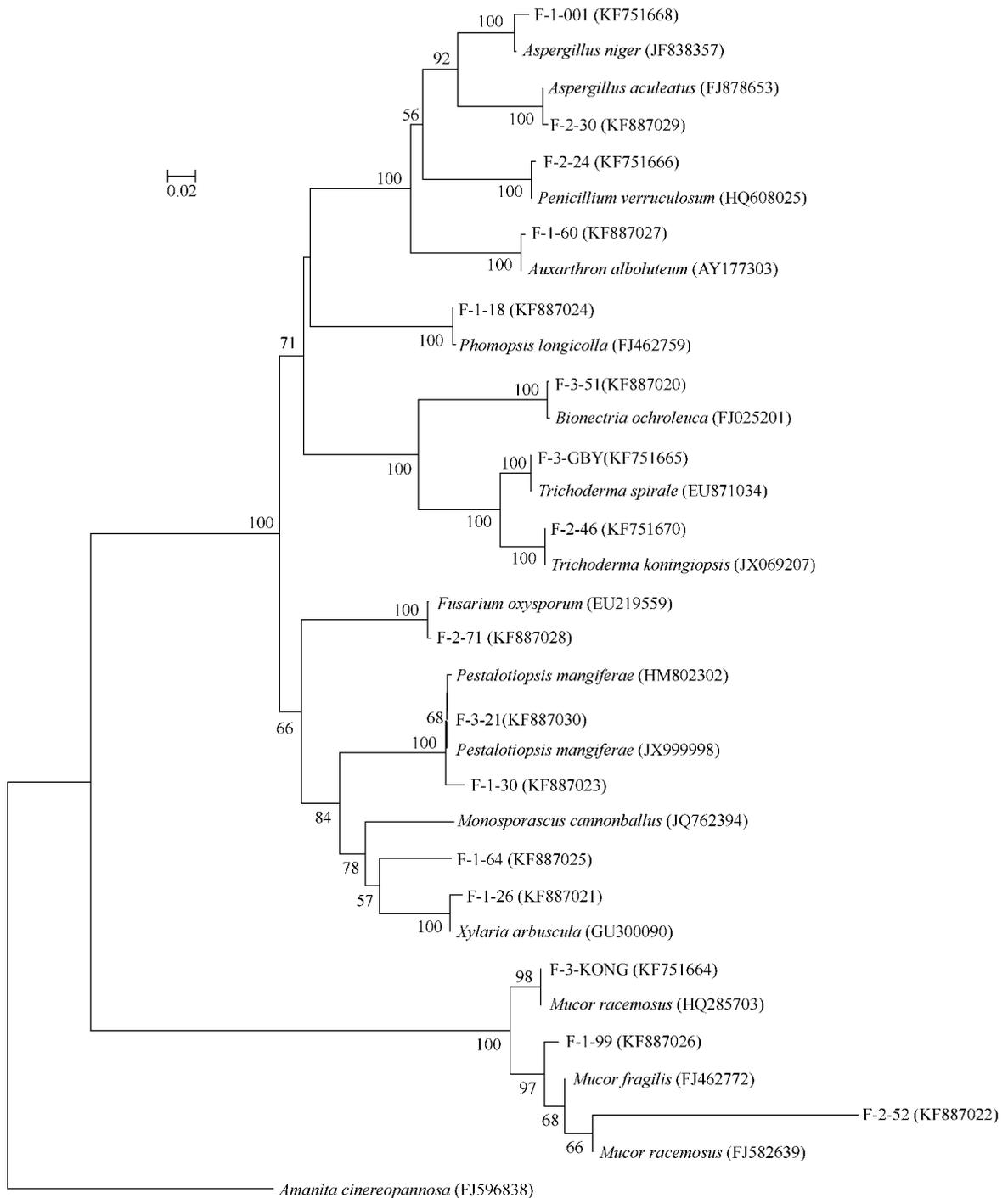


图 2. 邻接法分析 ITS 区序列构建的系统树

Figure 2. Neighbour-joining distance-based phylogenetic analysis of the ITS region sequences, Using *Amanita cinereopannosa* FJ596838 as root, showing the phylogenetic relationships among the endophytes and other related strains downloaded from GenBank. Nucleotide: Kimura 2-parameter, complete deletion, bootstrap = 1000, and the numbers lower than 50 were not shown, Genetic distance scale = 0.02. The serial numbers in parentheses represents GenBank accession numbers.

状的基因发生突变的可能性就越高, 从而造成抑菌活性的丢失。通过改变菌种保藏方法、培养条件和控制传代次数等措施可以控制菌株退化的速度, 但

却无法从根本上解决菌株退化的问题。最有效的办法是寻找到抑菌活性基因, 通过基因工程技术如遗传转化, 原生质体融合技术, 接合转移技术等遗传操

作手段在稳定性菌株中克隆表达。

参考文献

- [1] Aly AH, Debbab A, Proksch P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90 (6): 1829-1845.
- [2] Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14 (4): 435-443.
- [3] Rodriguez R, White Jr J, Arnold A, Redman R. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 2009, 182 (2): 314-330.
- [4] Azevedo JL, Maccheroni Jr W, Pereira JO, de Araújo WL. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2000, 3 (1): 15-16.
- [5] Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 48 (1): 1-12.
- [6] Gimenez C, Cabrera R, Reina M, Gonzalez-Coloma A. Fungal endophytes and their role in plant protection. *Current Organic Chemistry*, 2007, 11 (8): 707-720.
- [7] Gunatilaka AL. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, 2006, 69 (3): 509-526.
- [8] Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, Stierle A, Stierle D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural Product Reports*, 2011, 28 (7): 1208-1228.
- [9] Turbyville TJ, Wijeratne EK, Liu MX, Burns AM, Seliga CJ, Luevano LA, David CL, Faeth SH, Whitesell L, Gunatilaka AL. Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: isolation and SAR studies of radicicol and monocillin I from two plant-associated fungi of the sonoran desert 1. *Journal of Natural Products*, 2006, 69 (2): 178-184.
- [10] Helander M, Neuvonen S, Sieber T, Petrini O. Simulated acid rain affects birch leaf endophyte populations. *Microbial Ecology*, 1993, 26 (3): 227-234.
- [11] Jetyanon K, Kloepper JW. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control*, 2002, 24 (3): 285-291.
- [12] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, 260 (5105): 214-216.
- [13] Zhang S, Reddy M, Kloepper JW. Development of assays for assessing induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control*, 2002, 23 (1): 79-86.
- [14] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ER, Taghavi S, Mezgey M, der Lelie Dv. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2002, 21 (6): 583-606.
- [15] 赵国平, 戴慎, 陈仁寿, 南京中医药大学. 中药大辞典. 上海: 上海科学技术出版社, 2009.
- [16] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Oslo: John Innes Foundation Norwich, 2000.
- [17] Tokajian S, Al-Medawar S, Hashwa F. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region for the molecular typing of sphingomonads. *Canadian Journal of Microbiology*, 2008, 54 (8): 668-676.
- [18] Yu L, Takahashi Y, Matsumoto A, Seino A, Iwai Y, Omura S. Application of PCR for selection of gram-positive bacteria with high DNA G + C content among new isolates. *Actinomycetologica*, 2002, 16 (1): 1-5.
- [19] Barrocas EN, Machado JdC, Almeida MFd, Botelho LS, Pinho ÉVdRV. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp. associated with maize seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 2012, 34 (2): 218-224.
- [20] Jiang G, Yang B, Yu H. Research on the influence factors on isolation of endophytes in two medicinal plants. *Journal of Yunnan University*, 2011, 33 (5): 610-614, 620. (in Chinese).
姜国银, 杨本寿, 虞泓. 两种植物内生菌分离的影响因素研究. 云南大学学报 (自然科学版), 2011, 33 (5): 610-614.
- [21] Lan Q, Ji Z, Gu A, Shi B, Wu W. Preliminary study on the insecticidal and fungicidal components of endophytic fungus in *Celastrus angulatus*. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 2004, 32 (10): 79-84. (in Chinese).
兰琪, 姬志勤, 顾爱国, 师宝君, 吴文君. 苦皮藤内生真菌中杀虫杀菌活性物质的初步研究. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2004, 32 (10).
- [22] Cerny G. Studies on the aminopeptidase test for the distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1978, 5 (2): 113-122.
- [23] Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 1972 (3rd ed).
- [24] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.

- [25] Miller JH. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.
- [26] Murray M, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8 (19) : 4321-4326.
- [27] Bissegger M, Sieber TN. Assemblages of endophytic fungi in coppice shoots of *Castanea sativa*. *Mycologia*, 1994: 648-655.
- [28] Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust H-J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 1993, 97 (12) : 1447-1450.
- [29] Stone JK, Polishook J, White J. Endophytic Fungi. Burlington: Elsevier Academic Press, 2004: 241-270.
- [30] Jbara I, Baysallar M, Kiliç A, Yetişer S, Unay B, Acikel C, Yapar M, Doğancı L. Comparison of culture and polymerase chain reaction methods for the detection of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* in cerebrospinal fluids and middle ear effusions. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2007, 41 (4) : 495.
- [31] Reesink HW, Mohammadi T, Pietersz RN, Savelkoul PH. Rapid screening by real-time 16S rDNA PCR for bacterial contamination of blood products. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2008, 46 (7) : 954-962.

Population distribution and antimicrobial activities of endophytes in *Toddalia asiatica*

Benshou Yang^{1,2,3}, Cuiping Miao⁴, Jianhua Zhang³, Guoyin Jiang³, De Yang^{1*}, Hong Yu^{2*}

¹ Landscape Gardening Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650091, Yunnan Province, China

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

³ Institute of Microbiology, Qujing Medical College, Qujing 655000, Yunnan Province, China

⁴ Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan Province, China

Abstract: [Objective] To study the population composition and antimicrobial activities of endophytes in medicinal plant *Toddalia asiatica*. [Methods] Endophytes were isolated from *T. asiatica* by using an exterior sterilization method, in combination with adding antimicrobial agents. Endophytes were classified and identified by morphological and molecular characters. Antimicrobial activities of endophytes were measured by using paper disc diffusion method. [Results] Three strains of endophytic bacteria, one strain of endophytic actinomyces and 82 strains of endophytic fungi were isolated from *T. asiatica*. *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, and *Aspergillus* were the dominant populations in *T. asiatica*. Antimicrobial activities of these endophytes were measured against 30 pathogenic microbes, and 18 strains possess substantial inhibitory activities, of which 16 strains were endophytic fungi belonging to 11 genera. [Conclusion] Endophytic strains with antimicrobial activities were obtained to explore the application of endophytic resources from *T. asiatica*.

Keywords: *Toddalia asiatica*, endophytes, population distribution, identification, antimicrobial activity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Scientific Research Key Project Fund of Yunnan Provincial Department of Education (2012Z148C) and by the Scientific Research Fund of Yunnan Provincial Department of Education (2012Y209)

* Corresponding author. De Yang, E-mail: yangde99@qq.com; Hong Yu, E-mail: hongyu@ynu.edu.cn

Received: 19 July 2013/Revised: 28 November 2013