

银杏内生真菌 No. 1028 代谢产物的抗真菌 活性及其培养生物学特性

申屠旭萍¹ 陈列忠² 俞晓平^{1, 2*}

(1. 中国计量学院生命科学学院, 杭州 310018; 2. 浙江省农业科学院
植物保护与微生物研究所, 杭州 310021)

摘要: 采用无菌技术从银杏茎中分离到一株内生真菌(No. 1028), 经形态分类学和 rDNA ITS 序列分析研究鉴定为黑孢属 *Nigrospora* sp., 菌丝生长速率法测定结果表明, 其代谢产物对重要作物真菌病害病原菌具有明显的抑制作用。离体条件下内生真菌发酵液对番茄早疫病菌、黄瓜枯萎病菌、菜豆炭疽病菌、葡萄炭疽病菌、水稻纹枯病菌、黄瓜立枯病菌均有较强的抑制作用, 对上述不同病原菌的抑制率分别为 66.7%、48.3%、64.6%、36.5%、57.1% 和 23.0%。经提取分离得到纯的白色晶体状活性物质。同时也研究了不同碳源、氮源、无机离子对内生真菌 No. 1028 生物学特性和生长的影响, 发现玉米粉、黄豆饼粉比较适合其生长和抑菌代谢产物的合成, Na⁺ 对抑菌代谢产物的合成有较明显的促进作用。

关键词: 内生真菌; 抑制作用; 银杏; 培养特性

Anti-fungi activities and cultural characteristics of ginkgo endophytic fungus No. 1028

SHENTU Xu-ping¹ CHEN Lie-zhong² YU Xiao-ping^{1, 2*}

(1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China;
2. Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural
Science, Hangzhou 310021, Zhejiang Province, China)

Abstract: Endophytic fungus No. 1028, was identified as *Nigrospora* sp. based on morphological study and sequence analysis of rDNA-ITS, isolated from the stem of *Ginkgo biloba* L. by aseptic techniques. The metabolites of this endophytic fungus were found to have strong inhibition effect on several crop pathogenic fungi in terms of inhibition rate in hypha growth. The inhibition rates were 66.7%, 48.3%, 64.6%, 36.5%, 57.1%, 23.0% on pathogenic fungi *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Thanatephorus cucumeris* and *Rhizoctonia solani*, respectively. The active ingredient was separated and purified out from fermentation liquid of endophytic fungus No. 1028. It was white crystalline powder by extraction. The effects of carbon, nitrogen and inorganic ion were studied on the growth and metabolism of this endophytic fungus. Corn starch, soybean starch and Na⁺ could obviously promote its growth and metabolism for significantly producing more active ingredients.

Key words: Endophytic fungus; antifungal activity; *Ginkgo biloba*; cultural characteristics

基金项目: 浙江省重大招标项目(2004C12015, 2006C12032), 浙江省教育厅项目(20050389), 浙江省高校青年教师资助计划项目

作者简介: 申屠旭萍, 女, 主要从事微生物制药研究, email: stxp@cjl.u.edu.cn

* 通讯作者(Author for correspondence), email: yxp@cjl.u.edu.cn

收稿日期: 2006-04-28

植物内生真菌(plant endophytic fungi)是一种新型的微生物资源,有研究表明内生真菌通常会与其宿主植物相同或相似的生理活性物质^[1-3]。近年来,植物内生真菌本身及其次生代谢产物在医药方面应用的研究逐渐成为热点^[4-5]。有关在农业方面应用的研究起步较晚,研究的种类也不多,目前主要集中在内生真菌的分离等方面。

银杏 *Gingko biloba* L. 又名白果,是我国特有的世界珍稀名贵树种,是冰川运动遗留的孑遗植物,被称为活化石,具有极高的研究开发价值。银杏各组织含有抑菌物质,据报道,银杏根、茎、叶、果肉(外种皮)及果仁的提取物对水稻纹枯病菌、黄瓜炭疽病菌和番茄青枯病菌等有明显的抑制生长作用^[6-8]。本研究以银杏为材料,从中分离筛选具有抑菌作用的内生真菌,旨为新型微生物源农药的研制和开发提供优良的出发菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

银杏:采集于浙江省杭州市、富阳市、长兴县。

供试病原菌:水稻纹枯病菌 *Thanatephorus cucumeris*、黄瓜立枯病菌 *Rhizoctonia solani*、黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、菜豆炭疽病菌 *Colletotrichum lindemuthianum*、蕃茄早疫病菌 *Alternaria solani* 和葡萄炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*, 由浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所保藏。

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1000 mL,pH 自然。马铃薯去皮,切成块煮沸 0.5 h,然后用纱布过滤,再加葡萄糖和琼脂,溶化后补足水至 1000 mL。为了抑制细菌和放线菌的生长,待培养基温度降到 50℃ 左右时,在每 100 mL 培养基中加 1% 链霉素液 0.3 mL,使每毫升培养基中含链霉素 30 μg。

液体发酵培养基:黄豆饼粉 10 g,玉米粉 7.5 g,可溶性淀粉 10 g,麸皮 5 g,蛋白胨 4 g, CaCO₃ 2.5 g, NH₄NO₃ 1.5 g, MgSO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 1.5 g, 水 500 mL。

发酵基本培养基:葡萄糖 4%, 黄豆饼粉 2.5%, KH₂PO₄ 0.3%, CaCO₃ 0.5 g, 水 80 mL。

1.2 内生真菌的分离和筛选

取银杏的根、茎、叶、果实,按下列程序进行表面消毒:自来水冲洗,75% 酒精漂洗 3~5 min,无菌水冲洗 3~4 次,再用 0.2% 升汞水浸泡 1~2 min,无菌水冲洗 3~4 次。

将处理过的材料在无菌条件下切割成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小片(茎取韧皮部),然后将小片移植于 PDA 平板上,置 28℃ 恒温箱培养。当样品周围明显长出菌丝时,采用尖端菌丝挑取法,挑取形态不同的菌落,转入到 PDA 斜面培养基上,然后在 22~27℃ 条件下纯化培养,保藏备用。

为检查材料表面的消毒效果,设置对照试验。将上述同样条件下处理过的材料不作切割,直接移植于 PDA 平板上作对照培养处理,结果对照材料均无任何菌长出,证明表面消毒彻底,保证分离的真菌是植株上的内生真菌,而不是表面的附生菌。

1.3 内生真菌的液体培养

采用摇瓶发酵法。在 300 mL 三角瓶中装 50 mL 液体发酵培养基,温度 28℃,摇床转速 200 r/min,培养时间 72 h。发酵液在 5000 r/min 下离心 10 min,取上清液用于生物活性测定。每处理 3 次重复。

1.4 生物活性和内生真菌相对代谢量测定方法

取内生真菌发酵液 1 mL 于无菌培养皿内,与 9 mL 冷却至 50℃ 的 PDA 培养基迅速混匀,凝固后在每个培养基平面上放置 1 个供试菌的菌饼(直径为 4 mm),菌饼接于培养皿中央(培养皿直径为 9 cm),置 28℃ 下培养,以无菌水为对照,重复 3 次。采用十字交叉法测定菌落直径,计算抑制率,以发酵液对指示菌菌丝的抑制率表示内生真菌的相对代谢量。

菌丝生长抑制率(%) = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 4)] × 100

1.5 银杏内生真菌 No. 1028 活性物质的提取分离

收集银杏内生真菌 No. 1028 发酵液约 4 L,滤液上 Dianion HP-20 大孔吸附树脂,50% 乙醇洗脱,将活性部分合并,减压除去乙醇,上硅胶柱层析,以氯仿和甲醇(体积比 10%~90%)洗脱,得到纯的白色晶体状活性物质。

1.6 银杏内生真菌 No. 1028 培养生物学特性

1.6.1 不同碳源对银杏内生真菌 No. 1028 生长代谢的影响

以发酵基本培养基为对照,供试碳源分别为葡萄糖、玉米粉、淀粉、蔗糖、乳糖、甘油,在基本培养基中分别加入单一的供试碳源。挑取银杏内生真菌菌丝接种到液体培养基中,每处理 3 次重复,28℃、200 r/min 下培养 72 h 后,将菌丝体滤出,烘干,测其重量,每个处理的发酵液用于供试病原菌抑制作用的测定。

1.6.2 不同氮源对银杏内生真菌 No. 1028 生长代谢的影响

以发酵基本培养基为对照,供试氮源为黄豆饼粉、牛肉浸膏、蛋白胨、酵母膏、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 、 NH_4NO_3 、 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$,在基本培养基中分别加入单一的供试氮源。挑取银杏内生真菌菌丝接种到液体培养基中,每处理 3 次重复,于 28°C 、 200 r/min 下培养 72 h 后,将菌丝体滤出、烘干,测其重量,每个处理的发酵液用于供试病原菌抑制作用的测定。

1.6.3 无机离子对银杏内生真菌 No. 1028 生长代谢的影响

选取 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 为供试无机

离子,以不加上述离子空白培养为对照,测定不同无机离子对银杏内生真菌生长和产抑菌代谢产物的影响。

2 结果与分析

2.1 银杏内生真菌 No. 1028 代谢产物对不同作物病原菌的抑制作用

从银杏的根、茎、叶、果实中共分离到了 1200 余株内生真菌,采用菌丝生长速率法测定了各菌株代谢产物对 6 种不同植物病原真菌的抑制作用。结果表明,658 株内生真菌的代谢产物具有抗菌作用,其中 32 株内生真菌抗菌效果非常明显, No. 1028 菌株表现出最强的抗菌活性(表 1)。

表 1 No. 1028 菌株发酵液对 6 种作物病原菌的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of metabolites of No. 1028 on six plant pathogenic fungi

病原菌 Pathogenic fungus	处理菌落直径 (mm) Diameter of treatment colony	对照菌落直径 (mm) Diameter of CK	抑制率 (%) Inhibition rate
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	5.5	16.5	66.7
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	15.0	29.0	48.3
菜豆炭疽病菌 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	11.5	32.5	64.6
葡萄炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	16.5	26.0	36.5
黄瓜立枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	15.8	20.5	23.0
水稻纹枯病菌 <i>Thanatephorus cucumeris</i>	16.0	37.3	57.1

结果显示,菌株 No. 1028 发酵液对 6 种作物真菌病害病原菌均有不同程度的抑制作用。其中对番茄早疫病菌、菜豆炭疽病菌、水稻纹枯病菌和黄瓜枯萎病菌的抑制率在 50% 左右及 50% 以上,而对葡萄炭疽病菌、黄瓜立枯病菌的抑制率则分别为 36.5% 和 23.0%,表明内生真菌 No. 1028 的发酵液抗菌谱较广,抑制真菌病害的效果较好(表 1)。

2.2 银杏内生真菌 No. 1028 的形态特征

在 PDA 培养基上银杏内生真菌 No. 1028 的菌落最初为白色,后为灰色,气生菌丝发达。菌落铺展、致密、圆形,边缘整齐,在 PDA 固体培养基上生长较快,一般 4~5 天可长满直径 9 cm 的培养皿(图 1)。显微镜下观察菌丝纤细、分枝、无隔,至顶端渐尖,在 PDA 培养基上不产孢子(图 1)。

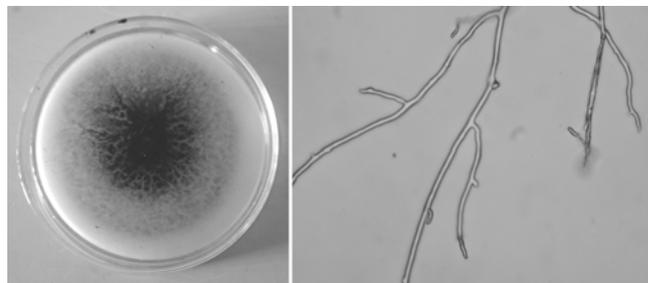


图 1 内生真菌 No. 1028 菌落与菌丝(400 ×)

Fig. 1 The colony and hyphae (400 ×) of No. 1028

在 PDA 培养基中加入高压蒸汽灭菌的银杏枝条和叶片进行产孢诱导培养,菌株在植物组织上产生分生孢子,根据形态分类学与 rDNA ITS (ITS1,

5.8S, ITS2) 片段序列分析相结合的方法,确定银杏内生真菌 No. 1028 为黑孢属 *Nigrospora* sp.。序列测定结果见图 2。

CAGAGTTATCCAACCTCCCAAACCCATGTGAACTTATCTCTTTGTTGCCTCGGCGC
 AAGCTACCCGGGACCTCGCGCCCCGGGGGGCCCGCCGGCGGACAAACCAAACCTCT
 GTTATCTTCGTTGATTATCTGAGTGTCTTATTTAATAAGTCAAAAACCTTCAACAA
 CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
 TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTA
 GTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTAAGCACAGCTTA
 TTGTTGGGACTCTACGGCTTCGTAGTTCCCCAAAGACATTGGCGGAGTGGCAGCA
 GTCCTCTGAGCGTAGTAATTCTTTATCTCGCTTTTGTAGGCGCTGCCCCCCCGG
 CCGTAAAACCCCAATTTTTTCTGGTTGACCTCGG

图2 内生真菌 No. 1028 rDNA-ITS 序列

Fig. 2 The sequence of rDNA-ITS of No. 1028

2.3 银杏内生真菌 No. 1028 活性物质的抑菌作用

按照 1.5 分离提取方法,4 L 银杏内生真菌 No. 1028 发酵液可得到纯白色晶体状活性物质 4.5 g。称量活性物质 0.1 g,用无菌水配制成 2 g/L 溶液,分别稀释到 1.5、1.0、0.50、0.25、0.10、0.05 g/L 测定抑菌活性(表 2)。从原始菌株出发发酵产生抑菌活

性物质,提取率就可达 1.125 g/L,即效价 1125 单位/mL。并且当浓度为 1.5 g/L 时可以完全抑制水稻纹枯病菌和黄瓜立枯病菌的生长。因此,不论从产抑菌活性物质的水平还是从抑制病原真菌的能力考虑,银杏内生真菌 No. 1028 都是开发和研制微生物农药的重要出发菌株。

表 2 活性物质在不同浓度下对水稻纹枯病菌和黄瓜立枯病菌的抑制率(%)

Table 2 Inhibitory effect of active ingredient of No. 1028 on *Thanatephorus cucumeris* and *Rhizoctonia solani*

病原菌 Pathogenic fungus	活性物质浓度 (g/L) Concentration of active ingredient					
	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00	1.50
水稻纹枯病菌 <i>Thanatephorus cucumeris</i>	0	18	33	55	82	100
黄瓜立枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	0	0	22	37	69	100

2.4 碳源对银杏内生真菌 No. 1028 生长代谢的影响

结果显示,银杏内生真菌 No. 1028 在不同碳源的利用上有一定的差异,含有玉米粉或葡萄糖的培养基中菌丝生长量较大,在含有玉米粉、乳糖或蔗糖的培养基中产生的抑菌代谢产物量多,从而对供试病原菌的抑制率高。以玉米粉作为碳源时真菌产生的抑菌代谢产物量最高,形成的生物量最大(图 3)。而作为微生物最易利用的葡萄糖,在本试验中并非最佳碳源,可能是由于葡萄糖能阻遏次生代谢产物的产生。研究结果表明,玉米粉是银杏内生真菌 No. 1028 的最佳利用碳源。

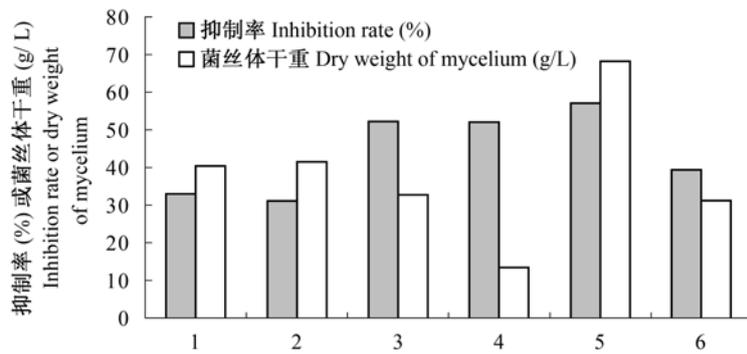
2.5 氮源对银杏内生真菌 No. 1028 生长代谢的影响

结果显示,银杏内生真菌 No. 1028 能较好地利用有机氮源,但几乎不能利用无机氮源(除 NaNO_3 、 KNO_3)。在具有无机氮源的培养基中,真菌发酵液

的过滤速度非常慢,几乎不能实现固液分离,对病原真菌的抑制率也非常低。而在加入有机氮源的培养基中菌丝体生长旺盛,特别是以黄豆饼粉、牛肉浸膏为氮源时真菌产生的代谢产物量最多,抑制率最高(图 4)。从经济角度考虑黄豆饼粉比牛肉浸膏价格便宜,所以可选择黄豆饼粉作为银杏内生真菌 No. 1028 的发酵氮源。

2.6 无机离子对银杏内生真菌 No. 1028 生长代谢的影响

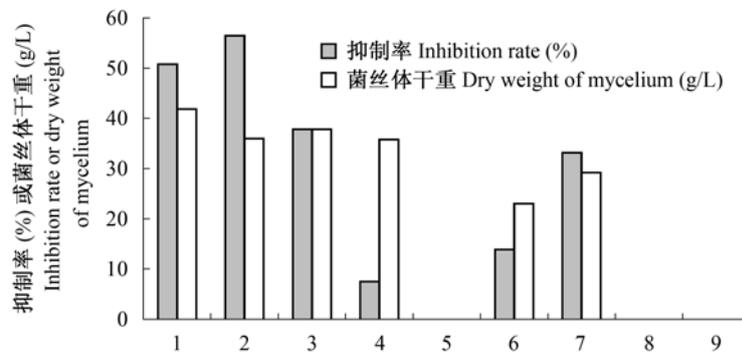
微生物在生长繁殖和合成目的产物的过程中,需要某些无机盐和微量元素来作为其生理活性物质的组成或生理活性物质合成时的调节物,如许多合成酶需要金属离子来激活。本研究结果表明, Na^+ 对该菌的生长有一定的促进作用,而其它供试金属离子对内生真菌 No. 1028 的生长和抑菌代谢产物的合成与对照差异不显著(图 5)。



1. 淀粉 starch, 2. 葡萄糖 glucose, 3. 蔗糖 sucrose, 4. 乳糖 lactose, 5. 玉米粉 corn starch, 6. 甘油 glycerol

图3 碳源对银杏内生真菌 No. 1028 生长代谢的影响

Fig. 3 Effects of carbon source on growth and metabolism of ginkgo endophytic fungus No. 1028



1. 黄豆饼粉 soybean starch, 2. 牛肉浸膏 beef extract, 3. 蛋白胨 peptone, 4. 酵母浸膏 yeast extract, 5. (NH₄)₂SO₄, 6. KNO₃, 7. NaNO₃, 8. NH₄NO₃, 9. NH₃ · H₂O

图4 氮源对银杏内生真菌 No. 1028 生长代谢的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen source on growth and metabolism of ginkgo endophytic fungus No. 1028

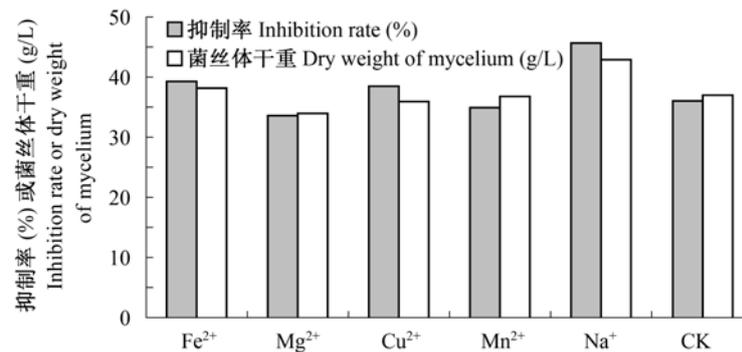


图5 无机离子对银杏内生真菌 No. 1028 生长代谢的影响

Fig. 5 Effects of inorganic ion on growth and metabolism of ginkgo endophytic fungus No. 1028

3 讨论

本研究结果表明,银杏中存在大量能够产农用抗生素的内生真菌,这为微生物农药的研制和开发提供了重要的出发菌株。本研究筛选得到的银杏内生真菌 No. 1028(黑孢属 *Nigrospora* sp.) 的发酵液

对许多重要作物病害的病原菌(番茄早疫病菌、菜豆炭疽病菌、水稻纹枯病菌、黄瓜枯萎病菌)具有较强的抑制作用。因此,内生真菌 No. 1028 是一种具有较大利用价值的生物杀菌剂出发菌种。玉米粉和黄豆饼粉分别是该菌比较合适的碳源和氮源,而 Na⁺ 对内生真菌 No. 1028 的生长和活性物质的合成

有明显的促进作用。

从目前的研究状况看,关于植物内生真菌的研究还不够深入,还有许多问题尚待解决。传统的菌种鉴定是采用经典的形态学方法,即结合菌落形态和孢子、分生孢子梗着生状态等进行鉴定。研究过程中发现,分离筛选到的植物内生真菌一般在 PDA 培养基中不形成孢子,这给菌种的形态鉴定带来一定的难度,甚至有的菌株经诱导后仍不产孢子,只能采用分子生物学技术(如 ITS 序列分析等)进行鉴定,这样既提高工作难度又加大了工作量。其次,由于内生真菌长期生活在寄主植物内部,其菌株的生理活动和代谢息息相关,一旦从寄主植物中分离出来后,自身的一些特性也会随之消失,菌种容易出现退化现象。因此在内生真菌的分离过程中,优化和改良培养条件或者在体外模拟宿主体内的生存环境,可能有助于分离得到更多有生物活性的内生真菌,这是一个值得深入研究的课题。

目前我们正在进行内生真菌 No. 1028 菌种的选育工作,希望该内生真菌能够作为一种新的微生

物资源在重要作物真菌病害的生物防治中发挥一定的作用。

参 考 文 献(References)

- 1 郭良栋. 内生真菌研究进展. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152
- 2 曾松荣,徐成东,王海坤,等. 药用植物内生真菌及其具宿主相同活性成分的机制初探. 中草药, 2000, 31(4): 306-308
- 3 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
- 4 黄午阳. 植物内生真菌的抗菌活性研究. 南京中医药大学学报, 2005, 21(1): 24-26
- 5 杨春平,陈华保,吴文君,等. 植物内生真菌次生代谢产物的多样性及潜在应用价值. 西北农业学报, 2005, 14(2): 126-132
- 6 杨小明,陈钧,钱之玉,等. 银杏酸抑菌效果的初步研究. 中药材, 2002, 25(9): 651-653
- 7 丁之恩. 银杏叶的利用价值及其研究进展. 经济林研究, 2003, 21(4): 128-130
- 8 赵肃清,蔡燕飞,文永新,等. 银杏外种皮提取液对农作物病原菌抑制效应研究. 农业环境保护, 2001, 20(5): 368-369