

青霉属银杏内生菌的筛选及鉴定

邹小明¹, 肖春玲¹, 陈丹萍¹, 周群燕² (1. 井冈山学院生命科学学院, 江西吉安 343009; 2. 井冈山学院附属中学, 江西吉安 343007)

摘要 对银杏的不同组织部位进行了内生菌的筛选及鉴定工作, 利用酒精消毒法在银杏的干、枝、叶不同组织部位中分离到 29 株内生菌。抑菌试验结果表明, 其中的 18 株具有抑菌活性, B1、B6 的抑菌能力最强; 对 2 菌株的培养形态和生理特征进行鉴定, 结果表明它们均属于青霉属。

关键词 内生菌; 银杏; 筛选; 抑菌

中图分类号 Q948.12:2.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)20-5255-01

Isolation and Detection of Penicillium in Ginkgo

ZOU Xiao-ming et al (Department of Life Science, Jinggangshan University, Jian, Jiangxi 343009)

Abstract To obtain the active ingredients of ginkgo (*Ginkgo Biloba* L), the isolation and screening of Endophytes were carried out. 29 strains, which were isolated from trunk, branch and leaf of ginkgo, were used to do the anti-microbial experiments. The results showed that only 18 strains had anti-microbial function. B1 and B6, which had the best antimicrobial function, were identified as *Penicillium*.

Key words Endophytes; *Ginkgo Biloba* L; Screening; Anti-microbial function

植物内生菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌或细菌, 包括内生真菌和内生细菌^[1]。近年来, 国内陆续报道了从多种药用植物中已分离获得了产生多种药理活性物质的内生菌。银杏作为一种古老的药用植物, 素有“活化石”之称, 其体内银杏多糖、白果素、双黄酮类等组分, 也具有抗肿瘤等多种药理活性^[2]。目前, 银杏等其他物种资源都非常匮乏, 如果大量地采伐又涉及到生态和环境等领域的问题。因此, 寻找一种可以高效低耗地开发利用天然药物的方法日益重要, 药用植物内生菌也因此成为研究热点。笔者以抑菌性能为考察指标对银杏植物组织的内生菌进行筛选, 并对优良菌株进行鉴定, 旨在为微生物源生物活性成分的分离等后续工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源 银杏取于井冈山学院。取银杏树主干内层树皮、侧枝及叶等部位, 采样后立即带回实验室备用。

1.2 培养基配方 马铃薯 200 g; 葡萄糖 20 g; 琼脂 20 g; 水 1 000 ml; pH 值自然。

1.3 试验方法

1.3.1 分离纯化^[3]。将材料洗净, 带入无菌操作室后用浓度为 75% 的酒精浸泡 2~3 min→无菌水冲洗 3~5 次→浓度为 0.1% 的升汞漂洗 2~3 min→无菌水冲洗 4~5 次。按无菌操作法将上述处理过的材料剪切成 0.5 cm×0.5 cm 的 2 个小片, 种植于 PDA 培养基平板上, 置于 28℃ 培养箱中培养 5~7 d, 当观察到试验材料边缘有菌丝长出后, 转接到 PDA 斜面上待测。

1.3.2 对照试验。将表面消毒过的上述材料不做任何剪切, 直接种植于 PDA 培养基平板上, 置于 28℃ 培养箱中培养 5~7 d, 每个样品重复 3 次, 检查是否有微生物生长。

1.4 生物检测

1.4.1 菌体发酵^[4]。将上述所得到的菌种接种于液体 PDA 培养基上, 25℃, 160 r/min, 培养 48 h 后, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。

1.4.2 抑菌能力测定^[5]。将斜面培养的大肠杆菌作为指示菌, 与适量培养基混合(菌体浓度约为 10⁶ 个/ml) 倒平板, 待培养基凝固后, 将无菌滤纸片(直径为 5 mm) 用上述菌体发酵液浸湿, 贴放于培养基上, 37℃ 恒温培养箱培养 48 h, 观察并测量抑菌圈直径。

1.4.3 菌株的鉴定^[6]。先观察菌株在固体培养基中的生长状态, 载片培养后进行进一步的种属鉴定。

2 结果与分析

2.1 对照试验结果 所有的样品均无任何微生物生长, 这表明酒精消毒法分离内生菌是可行的。

2.2 菌株的生理形态及抑菌活性 银杏不同部位内生菌的筛选结果见表 1。由表 1 可知, 这些内生菌的基本形态都不完全相同, 其中白色居多, 多为不透明的边缘整齐的菌

表 1 银杏内生菌的生理指标

	菌号	颜色	边缘	形态	抑菌圈直径/mm	
树干	B1	浅绿色	整齐	圆形	18	
	B2	白色	整齐	椭圆形	11	
	B3	白色	不整齐	不规则	0	
	B4	白色	整齐	圆形	4	
	B5	白色	整齐	弧形	3	
	侧枝	B6	绿色	整齐	圆形	17
		B7	乳白色	不整齐	不规则	0
		B8	白色	整齐	圆形	0
		B9	白色	整齐	圆形	13
		B10	白色	整齐	圆形	5
B11		绿色	整齐	圆形	5	
B12		白色	整齐	镰刀	12	
B13		白色	整齐	镰刀	11	
B14		灰白色	整齐	圆形	5	
B15		白色	整齐	半圆形	6	
树叶	B16	乳白色	整齐	葫芦形	0	
	B17	灰白色	整齐	半圆形	0	
	B18	黄色	不整齐	不规则	0	
	B19	白色	整齐	圆形	4	
	B20	白色	整齐	丝状	5	
	B21	白色	不整齐	不规则	13	
	B22	白色	整齐	毛絮状	0	
	B23	红色	整齐	棒状	0	
	B24	橙色	整齐	不规则	0	
	B25	白色	整齐	圆形	5	
	B26	褐色	整齐	条形	12	
	B27	淡黄色	整齐	圆形	0	
	B28	红色	整齐	圆形	0	
	B29	白色	整齐	毛絮状	5	

注: B1~B29 菌株的干湿状况均为干。

(下转第 5264 页)

作者简介 邹小明 (1980-), 男, 江西信丰人, 硕士, 讲师, 从事微生物技术及天然资源利用研究。

收稿日期 2006-06-09

(上接第 5255 页)

种,在试验过程中还发现很多菌株具有产生色素的现象;同时内生菌的数量在不同的组织中也有较大的差异,其中以侧枝的数量最多,树叶部位次之。

银杏的主干,侧枝及叶所产生的内生菌大都具有抑菌性,即可以产生具有抑菌活性的次生代谢产物,可以作为对多种病原物具有抑菌活性物质筛选的资源;29 株被测菌株中有 18 株具有抑菌性,占总数的 62%;所筛选的菌株抑菌性能较弱,多数在 15 mm 以下,B1、B6 菌株的抑菌性能较佳。

2.4 菌株的鉴定 对 B1、B6 菌株进行鉴定,发现它们有共同的培养特征。载片镜检时发现,分生孢子梗从菌丝垂直生出,无足细胞,分生孢子梗有横隔膜,顶端排列成帚状间枝,分枝多次;分生孢子串呈不分枝的链状,单个孢子呈卵圆形,浅绿色,光滑,无菌核。因此初步鉴定为真菌门(Fungi)半知菌类(Fungi Imperfecti)从梗孢目(Moniliales)丛梗孢科(Dematiaceae)青霉属(Penicillium)。

3 结论与讨论

内生菌不仅能够参与植物次生成分的合成或对植物次生代谢产物进行转化,而且还能够独立产生丰富的次生代谢产物,是天然产物的重要来源。通过对药用植物内生真菌的研究,可找到能产生与宿主相同或相似的活性成分。该研究表明银杏不同组织内含有丰富的内生菌资源,筛选到的 29 株内生菌中有 18 株具有抑菌性;抑菌性能较好的 B1、B6 菌株,经过鉴定表明均为青霉属的内生真菌。

参考文献

- [1] 刘蕴哲,何劲,张杰,等.植物内生真菌及其活性代谢产物研究进展[J].菌物研究 2005,3(4):30-36.
- [2] 郭建新,孙广宇,张容,等.银杏内生真菌抗真菌活性菌株的分离和筛选[J].西北农业学报,2005,14(4):14-17.
- [3] 李雪玲.八角莲植株地下茎内生真菌的分离[J].云南师范大学学报,2005,25(2):49-52.
- [4] 李桂玲,王建锋,黄耀坚,等.几种药用植物内生真菌抗真菌活性的初步研究[J].微生物学通报,2001,28(6):64-68.
- [5] 杨文博,冯波,佟树敏.链霉菌 S01 菌株几丁质酶对植物病原真菌的拮抗作用[J].微生物学通报,1997,24(4):224-226.
- [6] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科技出版社,1979.