

银杏内生真菌多样性与产黄酮类物质真菌的分离和鉴定^①

张海龙¹, 李善春^{2,3}, 卢维浩¹, 雷燕萍¹, 曹福亮², 曹 慧^{1*}

(1 南京农业大学 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095; 2 南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037;

3 南京市园林科学研究所, 南京 210037)

摘 要: 采用传统组织培养法从银杏根、叶片和茎中分离内生真菌, 以相对频率作为指标分析其多样性, 通过显色反应、薄层层析(TLC)、高效液相色谱(HPLC)等方法对内生真菌的发酵产物进行初步分析, 筛选能够产黄酮类物质的内生真菌, 并通过分光光度法测定总黄酮产量; 同时根据菌株的形态学特征, 结合真菌 rDNA 的居间序列(internal transcribed spacer, ITS)的系统进化分析进行菌株鉴定。结果表明: 共分离得到 217 株内生真菌, 分属于 5 纲、8 目、10 科、13 属; 经初步筛选, 2 株分离自根组织的内生真菌 GF111 和 GF521 具有产黄酮类化合物的能力, 发酵液总黄酮产量分别为 (14.50 ± 1.30) mg/L 和 (21.10 ± 1.30) mg/L; 初步鉴定 2 株产黄酮内生真菌 GF111 和 GF521 分别为卷枝毛霉 *Mucor circinelloides* 和尖镰孢菌 *Fusarium oxysporum*。可见, 内生真菌在银杏不同部位在数量、种群及其组成上存在着较大差异, 并且菌株 GF111 和 GF521 产黄酮能力较高, 可作为生物发酵生产黄酮类物质的备选菌株。本研究为更好地开发和保护银杏资源提供了依据。

关键词: 银杏; 黄酮; 内生真菌; HPLC

中图分类号: Q939.9; Q938.1

植物内生菌是指生活史部分或全部定殖于活体健康植物组织内, 而不引起植物明显病害的微生物^[1]。植物内生菌广泛分布于植物体的根、茎、叶、花、果实和种子等器官组织的细胞或细胞间隙中。在不同环境条件和生长阶段的植物组织中, 内生菌的种类、数量不同, 而且在植物中的分布也不相同。植物内生菌不仅将植物作为其栖息场所, 而且对宿主植物具有多种有益作用, 例如, 固氮(主要是内生细菌)、促生长(如分泌 IAA 等植物生长激素物质)、抗逆境(如干旱等)^[2]、抗动物(昆虫、线虫、食草哺乳动物等)摄食^[3]、抗病原真菌和细菌以及他感^[4]等作用。近些年来, 内生菌不仅在农牧业生产和环境净化领域有良好应用效果, 而且在植物病虫害防治、新型无公害农药研发、保持植物微生态系统的生物多样性以及维护农田生态平衡等方面都得到了广泛应用^[5]。

银杏 *Ginkgo biloba* L., 又名白果, 是仅存的子遗植物之一, 也是世界上传统而珍贵的药用植物资源。银杏中的药用成份主要是黄酮类和内酯类化合物^[6]。黄酮类化合物是一类天然多酚化合物, 具有抗氧化、

清除自由基的功效, 目前已证实其对动脉粥样硬化、骨质疏松症、糖尿病和某些癌症都有一定的治疗效果^[7]。研究表明, 植物内生菌能够产生与宿主相同或相似成分的活性物质^[8]。近几年, 钱龙等^[9]、韩晓丽等^[10]及 Qiu 等^[11]都从银杏中分离出多株产黄酮类物质的内生真菌, 但黄酮类物质的产量较低。本研究以药用植物银杏为研究对象, 拟从其各部位分离内生真菌, 并筛黄酮类物质产量较高的菌株, 为最终利用发酵法大规模生产黄酮类物质提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 采自江苏省泰兴市银杏基地, 选取健康的银杏植株, 剖开土壤采集离地表 20 cm 处的侧根, 剪取长势良好的枝条并收集其叶片, 用 75% 乙醇对采集到的根、茎和叶进行简易消毒处理, 放入保鲜袋, 48 h 内进行内生菌分离。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 水补足 1 000 ml;

基金项目: 国家“十二五”科技攻关项目(2012BAD21B04)资助。

* 通讯作者(hcao@njau.edu.cn)

作者简介: 张海龙(1986—), 男, 河北承德人, 硕士研究生, 主要从事微生物分子生态学研究。E-mail: zhlong2013@126.com

马丁氏(MMN)培养基:葡萄糖 10 g,胰蛋白胨 5 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,孟加拉红 0.033 g,琼脂 15 g,调节 pH 至 5.1,补水至 1 000 ml;两种培养基用前按 30 mg/L 加入链霉素。

1.2 方法

1.2.1 银杏内生真菌分离 方法参照杨瑞先等^[12]的方法,略有改进:将采集的新鲜银杏根、茎和叶样品用流水冲洗,风干表面水分,无菌水漂洗 3 次,75%酒精浸泡 1 min,无菌水漂洗 3 次,再在 0.03 g/ml $NaClO$ 溶液中分别浸泡 1、2、3、4、5 min,无菌水漂洗 3 次,转入 75%酒精中浸泡 30 s,接着用无菌水漂洗 3 次,待水干后将样品剪成 0.5 cm 的小段平放于 PDA 和 MMN 平板上,28℃培养 3~7 天。同时,取最后一次漂洗液涂布于 PDA 和 MMN 平板上作为空白对照,与其他平板相同条件培养,验证表面消毒是否彻底。参照 Lacap 等^[13]的方法进行菌株的分离与纯化。

1.2.2 内生真菌菌株初步鉴定 挑取纯化的菌株前端菌丝,接种于 PDA 培养基上,培养一段时间后观察菌落特征;取 PDA 上培养的菌体制片^[14],置显微镜(OLYMPUS, CX21)下观察菌丝体和分生孢子的形态等特征,参考《真菌鉴定手册》^[15]和《中国真菌志》^[16]对真菌形态进行初步鉴定。

1.2.3 银杏内生真菌多样性分析 以菌株总数和相对频率(relative frequency, RF)为参考指标,初步分析银杏内生真菌的多样性。相对频率(RF)是指分离到的某一指定类型内真菌的菌株数占分离得到的内生菌的菌株总数的百分率,用来判断该类型内生菌是否为植物内生的优势菌群^[17]。

1.2.4 检测样品的制备 将制备的 100 ml PDA 培养基装入 250 ml 三角瓶中,用直径 8 mm 的打孔器在长满菌丝的 PDA 培养基上打孔,每瓶接入 3 块菌丝块,28℃,180 r/min 条件下培养 5~7 天,抽滤分离菌体和发酵液。取 50 ml 发酵液,用 20 ml 氯仿:甲醇($v:v$, 10:1)溶液萃取,后将萃取液于 45℃旋转蒸发浓缩至干,加入 2 ml 甲醇溶解,过 0.22 μm 滤膜,待用;菌丝于 55℃烘干,取 2 g 于 50% 甲醇溶液中充分研磨,20 ml 氯仿:甲醇($v:v$, 10:1)溶液萃取,45℃旋转蒸发浓缩至干,2 ml 甲醇溶解,过 0.22 μm 滤膜,待用。

1.2.5 显色反应^[18] 三氯化铝($AlCl_3$)反应:取样品 40 μl 点于滤纸上,喷洒 0.02 g/ml 的 $AlCl_3$ 乙醇溶液,吹干后,放在紫外灯下观察;盐酸-镁粉(HCl-Mg)反应:取样品 1 ml 置于试管中,加入适量镁粉,然后滴加浓盐酸数滴,看有无颜色变化;浓氨水反应:取样品 40 μl 点于滤纸上,放在浓氨水上

熏蒸 1~10 min,立即放在紫外灯下观察;三氯化铁($FeCl_3$)反应:取样品 1 ml 置于试管中,加入 0.02 g/ml 的 $FeCl_3$ 溶液数滴,看有无酒红色出现;氢氧化钠(NaOH)反应:取样品 1 ml 置于试管中,加入 0.04 g/ml 的 NaOH 溶液数滴,看有无黄色出现。

1.2.6 薄层层析(TLC) 将颜色反应为阳性的样品点于硅胶板上进行薄层层析。展开系统:展开剂为 $v_{\text{甲醇}}:v_{\text{醋酸}}:v_{\text{水}}=90:5:5$;显色剂为 0.02 g/ml 三氯化铝乙醇溶液,紫外灯下观察结果。对照品为 0.2 mg/ml 的槲皮素和山奈酚标准品(购自中国食品药品检定研究所)。

1.2.7 高效液相色谱(HPLC) 色谱条件:色谱柱 C18 柱(25 cm $\times$ 4 mm ID)柱温 50℃;检测波长 360 nm,流动相为 $v_{\text{甲醇}}:v_{\text{水}}:v_{\text{磷酸}}=45:55:0.1$ 流速 0.8 ml/min;进样量 20 μl 。对照品为芦丁、槲皮素和山奈酚标准品(购自中国食品药品检定研究所)。

1.2.8 内生真菌黄酮类物质总量的测定 采用氯化铝比色法对内生真菌中黄酮类化合物总量进行测定。吸取供试发酵液 1.0 ml,加 0.01 g/ml $AlCl_3$ 水溶液至 10 ml,摇匀,10 min 后在 Specord 紫外分光光度计测定 420 nm 处的吸光度(OD_{420}),重复 3 次,以 0.01 g/ml $AlCl_3$ 为对照。计算公式:

$$\text{黄酮苷}(\text{mg}) = \frac{OD_{420} \times 320}{1\ 000} \times \frac{V_{\text{总}}}{V} \quad (1)$$

式中: $V_{\text{总}}$ 为样品溶液总体积, V 为吸取样品体积,320 为系数,即吸光度值为 1.0 时,相当于黄酮苷含量 320 μg ^[19]。

1.2.9 rDNA-ITS 序列分析 采用 CTAB 法提取真菌基因组总 DNA^[20],以 ITS1:5'-TCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3'、ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 为特异性引物(上海英维捷基生物科技有限公司合成)。PCR 反应体系(25 μl): 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μl , dNTP (2.5 mmol/L)2.5 μl , Mg^{2+} (25 mmol/L)2.5 μl , 引物 ITS1/ITS4(25 pmol/ μl)各 0.5 μl , Taq DNA 聚合酶 (5U/ μl)0.5 μl ,模板 DNA 10~200 ng,三蒸水加至 25 μl 。PCR 扩增条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环,72℃终末延伸 10 min,10℃保温 10 min。扩增片段用 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物工程技术服务公司)回收后,与 pMD19-T 载体(TaKaRa,大连)16 连接过夜。将酶连产物转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α (实验室自备),阳性克隆经菌落 PCR 和质粒提取鉴定正确后,交由南京金斯瑞生物科技有限公司完成序列测定。测序结果提交 GenBank 进行序列比对分析,选取同源性较高的序列,利用 MEGA5.0 软件,基于邻

接法(neighbor joining method)构建菌株系统发育进化树，bootstrap 检验值 $\geq 50\%$ ，1 000 次重复。

2 结果与分析

2.1 银杏内生真菌的分离

空白对照平板上无真菌生长，表明表面消毒彻底，所分离的真菌为内生真菌。通过空白平板上有无真菌的生长，确定次氯酸钠对根、茎和叶样品的最佳消毒时间分别为 5、3 和 1 min。从银杏根、茎和叶片中共分离出内生真菌 217 株，其中根、茎、叶中分

别为 60、85 和 72 株。

2.2 银杏内生真菌多样性分析

对分离到的 217 株内生真菌进行菌落以及菌丝和孢子形态等特征观察，鉴定其分属于 5 纲、8 目、10 科、13 属(表 1)，少数真菌没有明显特征没有鉴定出，未列在表 1 中。从目的分类水平看，从梗孢目 Moniliales 为优势菌群，RF 值为 22.60%；从属的分类水平上看，镰刀菌属 *Fusarium*、链格孢属 *Alternaria* 和拟茎点霉属 *Phomopsis* 为优势菌群，分别为 49、35 和 27 株，RF 值为 22.58%、16.13% 和 12.44%。

表 1 银杏内生真菌种群组成
Table 1 Components of endophytic fungi in *Ginkgo biloba* L.

纲	目	科	属	RF(%)
半知菌纲	丛梗孢目	瘤座孢科	镰刀菌属	22.58
		黑霉科	棒孢属	16.13
			链格孢属	4.608
	壳霉目	杯霉科	腐皮镰孢属	12.44
			匍柄霉属	0.461
子囊菌纲		球壳孢科	拟茎点霉属	0.922
	肉座目	丛赤壳科	丛赤壳菌属	0.461
	煤炱目	球腔菌科	假尾孢菌属	1.843
			尾孢属	5.069
			球座菌属	0.922
接合菌纲	座囊菌目	小球座科	毛霉属	1.843
担子菌纲	毛霉目	毛霉科	腐皮壳属	1.382
卵菌纲	球壳目	腐皮壳科	林栖腐霉	0.461
	霜霉目	腐霉科		

从根部组织共分离出 60 株真菌，占菌株总数的 27.65%，有 6 属，其中优势菌群为镰刀菌属，占根部组织分离总株数的 31.67%，其中从赤壳菌属(*Nectria*)、毛霉属(*Mucor*)、腐皮镰孢属(*Fusariumsolani*)为根中所特有的菌种；从茎部组织中分离到内生真菌 85 株，占总株数的 39.17%，有 5 属，以镰刀菌属(*Fusarium*)和拟茎点霉属(*Phomopsis*)为优势菌属，分另占茎部总株数的 33.33% 和 30.56%，其中棒孢属(*Corynespora*)和腐皮壳属(*Diaporthe*)为茎中特有菌属；叶组织部位分离到 72 株内生真菌，占总株数的 33.18%，有 7 属，其优势菌群为链格孢属(*Alternaria*)，占叶组织总菌数的 29.41%，其中尾孢属(*Cercospora*)和匍柄霉属(*Stemphylium*)为其特有菌属(图 1)。

从分离得到的内生菌的总数来看，茎部组织>叶部组织>根部组织，这一结果与甘金莲^[21]等的研究有差异，可能原因有：不同的采样地点、不同的采样时间以及内生菌分离过程中人为因素等。随采样地域的不同、季节差异银杏内生菌的组成表现出很大的差异性^[22]。

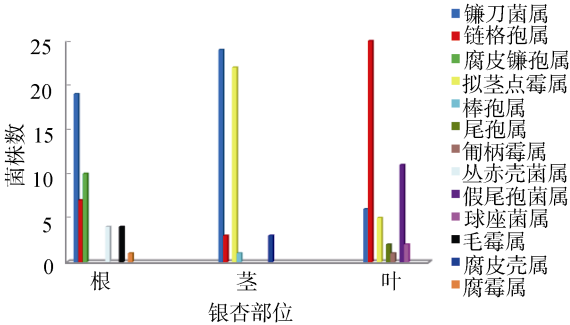


图 1 银杏不同部位内生真菌数量及种类分布
Fig.1 Quantities and distributions of endophytic fungi from different parts of *Ginkgo biloba* L.

2.3 产黄酮内生真菌的筛选

经显色反应只有 2 株从根中分离得到的菌株 GF111 和 GF521 的发酵液 5 种反应均为阳性，可能含有黄酮类物质。薄层层析发现菌株 GF111 和 GF521 的发酵液和菌体样品与标准品在紫外光下具有迁移率相同、颜色一致的黄绿色荧光斑点(图 2)，表明这 2 株内生真菌可产黄酮类物质。进一步进行 HPLC 验证，结果显示，菌株 GF521 的发酵液和菌丝的提取液有

与芦丁和山奈酚相对应的峰,说明菌株 GF521 可产芦丁和山奈酚两种黄酮苷元,而菌株 GF111 的菌丝和发酵液的提取液均有与芦丁和槲皮素相对应的峰,说明其能产芦丁和槲皮素苷元(图 3、图 4)。另外,HPLC 图谱上还显示有除标准品以外的吸收峰,表明发酵液中还含有其他的苷元。紫外分光光度法测定菌株 GF521 和 GF111 发酵液黄酮类物质总量分别为 (21.10 ± 1.30) mg/L 和 (14.50 ± 1.30) mg/L。

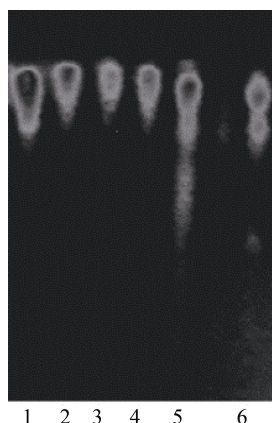
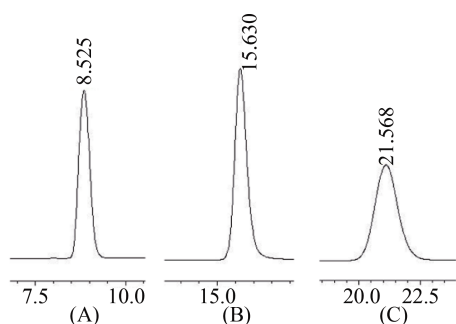


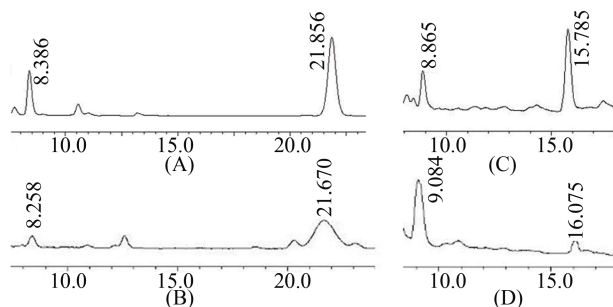
图 2 两株内生真菌样品薄层层析法显色反应
Fig. 2 Chromatogram of thin-layer chromatography



(A: 芦丁标准品; B: 槲皮素标准品; C: 山奈酚标准品)

图 3 3 种标准样品 HPLC 图谱

Fig. 3 Profile of HPLC of the flavonoids makers



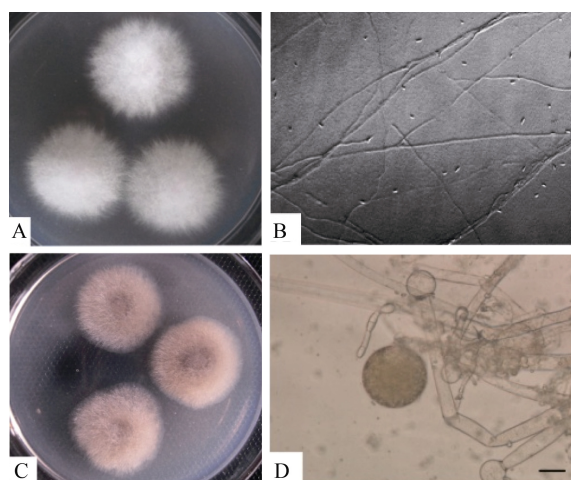
(A: 菌株 GF521 发酵液提取物; B: 菌株 GF521 菌丝提取物; C: 菌株 GF111 菌丝提取物; D: 菌株 GF111 发酵液提取物)

图 4 产黄酮内生真菌菌株 HPLC 图谱

Fig. 4 Profile of HPLC of the flavonoids produced by endophytic fungi

2.4 产黄酮内生真菌的鉴定

2.4.1 两株产黄酮真菌的形态观察 菌株 GF521 在 PDA 培养基中生长较快,菌落圆形,气生菌丝白色絮状(图 5A),分枝不规则或着生一圈小梗,在孢子座上单生或成群,分生孢子顶端细胞较长渐尖,为典型镰刀形;小型分生孢子单胞,卵圆形或长圆形,假头状着生(图 5B),初步鉴定为镰刀属;菌株 GF111 生长较快,菌落无固定形状,初为白色菌丝薄层,后菌丝逐渐边缘生长密集,且颜色逐渐变成浅黄色(图 5C),孢子成熟后菌落呈浅黄带褐色茸毛状,菌落反面黄色;菌丝无横隔,分枝;孢子梗直立无色,不分枝,梗上无菌丝孢子;孢子囊顶生,含大量孢子,顶端着生球形孢子囊,无囊托(图 5D),孢子呈椭圆形,初步鉴定为毛霉属。

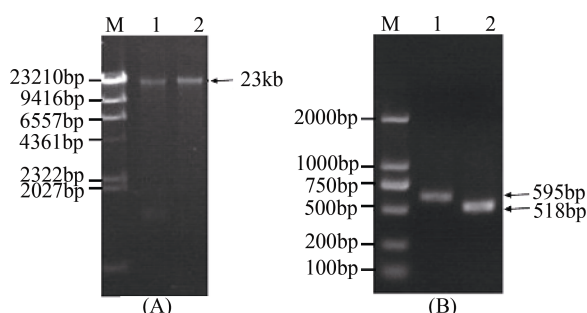


(A: 菌株 GF521 菌落形态; B: 菌株 GF521 菌丝和分生孢子; C: 菌株 GF111 菌落形态; D: 菌株 GF111 分生孢子(标尺=25μm))

图 5 产黄酮内生真菌菌落与菌丝体形态(放大倍数:640 倍)

Fig. 5 Colonies and microscopic characters of strain GF521 and GF111

2.4.2 两株产黄酮内生真菌基于 ITS 序列的系统发育分析 以内生真菌基因组 DNA 为模板,ITS1/ITS4 为特异性引物,扩增 2 株内生真菌的 rDNA-ITS 序列,其中包括 5.8S rDNA。琼脂糖凝胶电泳图谱显示总 DNA 大小为 23 kb 左右(图 6A),分别在 500 bp 和 600 bp 附近有清晰单一的条带(图 6B),克隆、测序结果表明 GF111、GF521 通过 PCR 扩增得到的 ITS-5.8S 序列长度分别为 595 bp 和 518 bp(图 6B),将两条序列提交 GenBank 获得登录号分别为 KJ130049、KJ130050。将两株真菌的 ITS 碱基序列与 GenBank 上已知真菌的 ITS 序列进行聚类分析,结果显示,菌株 GF111 与卷枝毛霉 *Mucor circinelloides* 关系最近,相似性为 99%(图 7);菌株 GF521 的 ITS 序列与尖镰孢菌 *Fusarium oxysporum* 关系最近,其相似性高



(A :总 DNA ;B :ITS-5.8S rDNA ;1 :菌株 GF521 ;2 :菌株 GF111 ;
M : Hind Marker、DL2000 Marker)

图 6 2 株内生真菌总 DNA 与 ITS-5.8S rDNA 序列凝胶电泳图

Fig. 6 Total DNA and ITS-5.8S rDNA gene of 2 strains of endophytic fungi

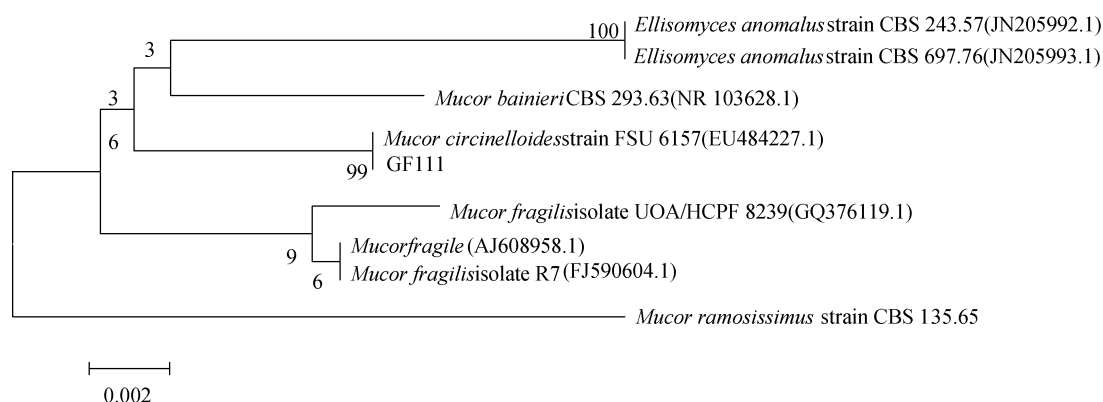


图 7 基于 rDNA ITS 序列采用邻接法构建的银杏内生真菌 GF111 菌株与相关种的系统发育树

Fig. 7 ITS-rDNA phylogenetic tree of endophytic GF111 isolated from *Ginkgo biloba* L. by neighbor-joining method

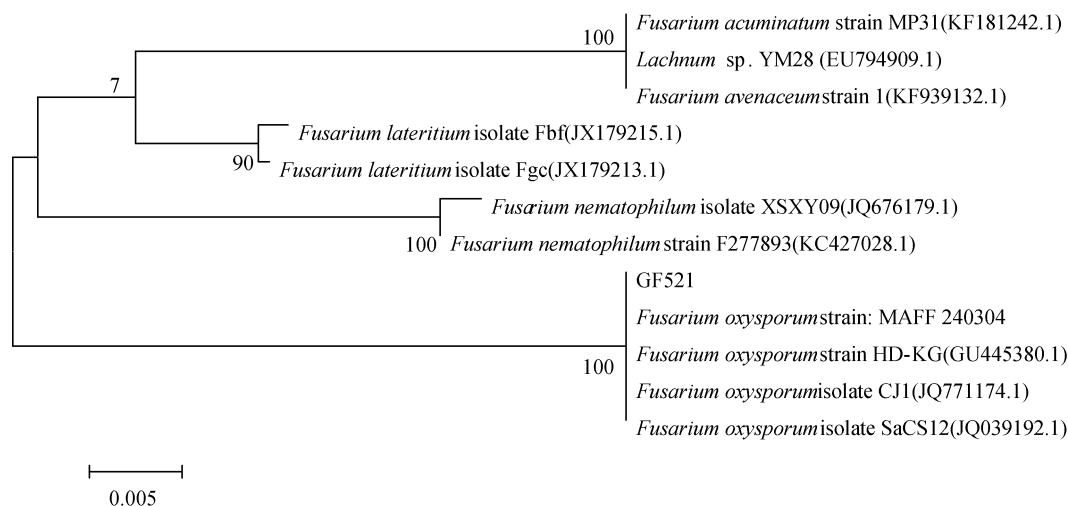


图 8 基于 rDNA ITS 序列采用邻接法构建的银杏内生真菌 GF521 菌株与相关种的系统发育树

Fig. 8 ITS-rDNA phylogenetic tree of endophytic GF521 isolated from *Ginkgo biloba* L. by neighbor-joining method

3 讨论

1993 年, Stierle 等^[24]从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 中分离出 1 株能产生新型抗癌药物紫杉醇的内生真菌——安德鲁紫杉菌 *Taxomyces andreanae*, 从此人们对植物内生菌的研究产生了极大的兴趣。

达 100%(图 8)。

Renske 等^[23]提出, 在进行 ITS 的同源性比对时, 序列相似性 $\geq 99\%$, 可鉴定为相同种; 序列相似性在 95%~99%, 可鉴定为相同属; 序列相似性 $\leq 95\%$, 可鉴定为相同科。因此, 根据 2 株内生真菌菌落的生长速度、菌丝、分生孢子等的形态学特征, 结合 ITS 碱基序列的聚类分析结果, 初步确定菌株 GF521 属于瘤座孢目 Tuberculariales、瘤座孢科 Tuberculariaceae、镰孢属 *Fusarium*、尖镰孢菌 *F. oxysporum*; 菌株 GF111 属于毛霉目 Mucorales、毛霉科 Mucoraceae、毛霉属 *Mucor*、卷枝毛霉 *M. circinelloides*。

目前已从珙桐 *Davidia involucrata* Baill.^[25]、喜树 *Camptotheca acuminata* Decne.^[26]和绶草 *Spiranthes sinensis*^[27]等多种药用植物中分离出具有产黄酮能力的内生真菌。真菌不仅能在简单的培养基上良好生长, 发酵周期短, 能产生大量的发酵产物, 还可以在生物

反应器中人为控制各种参数,并可通过诱变育种等手段来提高菌种性能^[28]。银杏黄酮类物质主要从银杏叶中提取,对珍贵的银杏资源消耗较大,而且对满足市场需求不利^[29]。如果能利用内生真菌,实现银杏黄酮的微生物体外发酵,则可使银杏黄酮的工业化生产不受植物资源的限制,并可防止银杏资源的日益短缺。

研究表明,银杏内生真菌在不同组织部位的种类和数量组成不同,这与王梅霞^[30]和郭建新等人^[31]的研究一致,导致这种差异可能与气候、环境、降雨量等外在条件的地域差异有关。但是决定植物内生真菌菌群分布、组成特征和演替变化的因素和作用机制较为复杂,还需继续深入研究。

本研究从银杏中分离出 2 株具有产生黄酮类物质能力的内生真菌,经形态学与分子生物学初步鉴定菌株 GF111、GF521 分别为卷枝毛霉 *M. circinelloides* 和尖镰孢菌 *F. oxysporum*。菌株 GF111 是首次从银杏中分离出的能够产黄酮类物质的毛霉属真菌,其发酵液和菌丝中均含有芦丁和槲皮素两种苷元,总黄酮产量达到 (14.50 ± 1.30) mg/L。韩晓丽等^[10]分离出的 3 株镰孢属内生真菌,总黄酮产量最高达到 6.20 mg/L, Qiu 等^[11]分离到的 2 株曲霉真菌,其总黄酮产量最高达 12.50 mg/L,而本试验分离得到的菌株 GF521 其总黄酮的产量高达 (21.10 ± 1.30) mg/L。本研究获得的 2 株银杏内生真菌的黄酮产量相对较高,可作为黄酮类物质体外发酵的备选菌株,具有一定的潜在应用价值。

目前 PDA 培养基被广泛应用于银杏内生真菌的分离,因其营养成分丰富,大部分真菌在其中都能生长良好。但 PDA 培养基成分不明确,真菌在不同的培养基和培养条件下,其次级代谢产物的种类及其产量也不相同。王梅霞等^[32]对其分离到的 1 株产黄酮银杏内生真菌 EG4 培养发现,以乳糖为碳源、亚硝酸盐为氮源能明显提高内生真菌的黄酮产量。赵庆云^[33]研究银杏产黄酮内生真菌 A2 的培养基条件时发现,其最佳碳源、氮源、生长因子分别为葡萄糖、硝酸铵和 Vc。因此有必要对产黄酮内生真菌菌株 GF111 和 GF521 的最佳培养基以及其培养条件进行优化。

已报道的可产黄酮类物质的内生真菌还有刺盘孢属^[34]、青霉属^[27]、曲霉属和茎点霉属^[9]等,但菌株的传代稳定性差,黄酮类物质的产量都比较低,严重限制了液体发酵。因此,要继续筛选产量较高并且体外传代稳定的内生菌,研究其黄酮类物质的代谢途径,并通过诱变育种,优化培养基配方,优化发酵条

件等方法,提高内生菌体外培养的传代稳定性,进一步提高黄酮类物质的产量,使利用菌种发酵生产黄酮类物质真正成为可能。

参考文献:

- [1] Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont[J]. Ecology, 1988, 69(1): 2-9
- [2] Ravel C, Courty C, Coudret A, Charmet G. Beneficial effects of *Neotyphodium lolii* on the growth and the water status in perennial ryegrass cultivated under nitrogen deficiency or drought stress[J]. Agronomy, 1997, 17(1): 173-181
- [3] Wilkinson HH, Siegel MR, Blankenship JD, Mallory AC, Bush LP, Schardl CL. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(10): 1 027-1 033
- [4] Sutherland BL, Hume DE, Tapper BA. Allelopathic effects of endophyte-infected perennial ryegrass extracts on white clover seedlings[J]. New Zealand Journal of Agricultural Research, 1999, 42(1): 19-26
- [5] 王利衡. 植物内生菌的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(3): 5-7
- [6] Chen P, Ozcan M, Harnly J. Chromatographic fingerprint analysis for evaluation of *Ginkgo biloba* products[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 89(3): 251-261
- [7] Cermak R. Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism[J]. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2008, 4(1): 17-35
- [8] Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H, Sun M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants[J]. Fungal Diversity, 2008, 33: 61-75
- [9] 钱龙, 杨明飞, 冉雪琴, 王嘉福. 银杏产黄酮内生真菌的分离与鉴定[J]. 山地农业生物学报, 2007, 26(4): 305-310
- [10] 韩晓丽, 康冀川, 何劲, 张禧庆, 黄庆华. 银杏产黄酮内生真菌的分离与鉴定[J]. 菌物研究, 2008, 6(1): 40-45
- [11] Qiu M, Xie RS, Shi Y, Zhang HH, Chen HM. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L.[J] Annals of Microbiology, 2010, 60(1): 143-150
- [12] 杨瑞先, 孙广宇, 张荣, 陈立军. 油菜内生细菌 16S 核糖体 DNA 的 RFLP 分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 606-609
- [13] Lacap DC, Liew EY, Hyde KD. An evaluation of the fungal "morphotype" concept based on ribosomal DNA sequences[J]. Fungal Diversity, 2003, 12: 53-66
- [14] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4
- [15] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 560-580

- [16] 孔华忠, 王龙. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 1-500
- [17] 庞蕾. 银杏、厚朴内生真菌的初步研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2005
- [18] 中国科学院上海药物研究所植物化学研究室编译. 黄酮体化合物鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1981: 394-601
- [19] 何照范, 张迪清. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 112-114
- [20] Guo LD, Hyde KD, Hew EC. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi with in frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 20: 1-13
- [21] 甘金莲, 陈晔, 刘瑜琦, 彭琴, 樊有赋, 徐同. 银杏内生真菌的生态分布[J]. 菌物研究, 2007, 3(5): 137-141
- [22] 杜少康, 陈双林, 林岱, 吴鸣谦, 王梅霞. 银杏叶部内生真菌多样性的研究[J]. 菌物学报, 2009, 28(4): 504-511
- [23] Renske L, Paula L, Thom WK, Ellis H, Anna R, Karel R, Eric S. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 327-333
- [24] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216
- [25] 何映霞, 冉雪琴, 王嘉福. 珙桐产黄酮内生真菌的分离和鉴定[J]. 贵州农业科学, 2008, 36(3): 3-6
- [26] 颜霞, 李希尧, 李伟国. 喜树内生真菌的分离及其代谢产物的初步研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 315-318
- [27] 刘紫英. 产黄酮成分的绶草内生真菌的鉴定[J]. 菌物学报, 2011, 30(1): 133-137
- [28] 王世伟, 马玺, 平文祥, 周东坡. 微生物发酵生产紫杉醇研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 561-565
- [29] 韩学哲, 王东双, 安晓东, 连运河. 银杏黄酮提取和精制工艺的研究[J]. 化学工程师, 2011, 187(4): 60-62
- [30] 王梅霞. 产黄酮类物质银杏内生真菌菌株的初步研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2003
- [31] 郭建新, 孙广宇, 张荣. 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
- [32] 王梅霞, 陈双林, 霍娟. 一株产黄酮银杏内生真菌的分离鉴定与培养介质的初步研究[J]. 南京师范大学学报, 2003, 26(1): 106-108
- [33] 赵庆云. 产黄酮银杏内生菌的分离、纯化与液态培养[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007
- [34] 王梅霞, 陈双林, 霍娟. 一株银杏内生真菌的分离及其产黄酮类物质的初步研究[J]. 工业微生物, 2004, 34(2): 15-18

Distribution and Identification of Flavonoid-producing Endophytic Fungi in *Ginkgo biloba* L.

ZHANG Hai-long¹, LI Shan-chun^{2,3}, LU Wei-hao¹, LEI Yan-ping¹, CAO Fu-liang², CAO Hui^{1*}

(1 Key Laboratory of Microbiology Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3 Nanjing Landscape & Garden Science Institute, Nanjing 210037, China)

Abstract: In order to reserve the resource of *Ginkgo biloba* L. and to seek for alternatives of flavonoids, the flavonoid-producing endophytes were isolated and selected from the root, stem and leaf samples of *Ginkgo biloba*. Firstly, endophytic fungus was obtained through the PDA and Martin medium. Secondly, their diversities were analyzed. Thirdly, whether these strains could yield flavonoid were tested by the ways of characteristic color reaction of flavonoid, thin layer chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). In the end, the production of flavonoids was measured by UV-spectrophotometry, and these strains according to the morphological characteristic and the similarity of the nucleotide sequence of internal transcribed spacer (ITS) between rDNAs were identified. The results showed that 217 strains were isolated from the samples, which were classified into 8 orders, 10 families and 13 genera by morphological study. Among the strains, the strains named GF111 and GF521 were proved to produce flavonoids. The amounts of total flavonoids in GF111 and GF521 were (14.50 ± 1.30) mg/L and (21.10 ± 1.30) mg/L, respectively. The strains named GF111 and GF521 were classified as *Mucor circinelloides* and *Fusarium oxysporum*. The results indicated the distribution of the endophytic fungi varied with different parts of *Ginkgo biloba*. The strains named GF111 and GF521 had a higher production of flavonoids, so these strains could be used as the alternative fungus for bio-fermentation of flavonoids.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; Flavonoid; Endophytic fungus; HPLC