

刺五加内生真菌分离鉴定及抗菌活性研究

刘悦¹, 张爽¹, 李佳宾¹, 沈宏伟¹, 崔红花², 王振月^{1*}

¹黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; ² 广东药科大学中药学院, 广州 510006

摘要:为开发利用刺五加内生真菌资源,寻找新型抗菌物质,从刺五加根茎叶中分离纯化得到内生真菌71株,经菌落形态和显微形态去重后进行ITS序列分子鉴定为18个种,来自于4目、8科、11属,其中链格孢属与镰孢霉属为优势属。根、茎、叶中内生真菌多样性指数分别为1.112 31、1.523 658、0.264 1。18种刺五加内生真菌中,16种内生真菌至少对一种指示菌有抗菌活性。CWJ-5(镰孢霉属 *Fusarium oxysporum*)对金黄色葡萄球菌抑菌效果显著,抑菌直径 27.17 ± 0.07 mm;CWJ-6(链格孢属 *Alternaria alternata*)对大肠埃希菌抑菌效果显著,抑菌直径 18.07 ± 0.01 mm。结果表明刺五加内生真菌资源丰富,有很大的开发利用空间,部分菌种抑菌活性显著,值得进一步研究。

关键词:刺五加;内生真菌;鉴定;多样性指数;抗菌性

中图分类号:R284;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)1-0030-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.1.005

Isolation and identification of endophytic fungi from *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms and their antibacterial activity

LIU Yue¹, ZHANG Shuang¹, LI Jia-bin¹, SHEN Hong-wei¹, CUI Hong-hua², WANG Zhen-yue^{1*}

¹Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

²School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: In order to develop and use the endophytic fungi resources of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms and to find novel antibacterial substances, 71 strains of endophytic fungi were isolated and purified from the roots, stems and leaves of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms. Molecular identification of ITS sequences after decontamination by colony morphology and microscopic morphology, we got 18 species from 4 orders, 8 families and 11 genera, of which *Alternaria* and *Fusarium* are dominant genera. The endophytic fungi diversity index in roots, stems and leaves were 1.123 31, 1.523 658, 0.264 1, respectively. Among the 18 species of endophytic fungi of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms, 16 endophytic fungi have antibacterial activity against at least one indicator bacteria. CWJ-5 (*Fusarium oxysporum*) has a significant antibacterial effect against *Staphylococcus aureus*, with a bacteriostasis diameter of 27.17 ± 0.07 mm; CWJ-6 (*Alternaria alternata*) has significant antibacterial effect against *Escherichia coli*, and its antibacterial diameter can reach 18.07 ± 0.01 mm. The results showed that the endophytic fungi of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms was rich in resources, and there was a great deal of space for development and utilization. Some of the strains had significant antibacterial activity and deserved further study.

Key words: *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.); endophytic fungi; identification; diversity index; antibacterial

内生真菌指在植物生活史中某一阶段生活在植物组织中,且没有引起植物明显病害症状的微生物^[1,2]。研究发现许多内生真菌对寄主植物生长起

到积极调控的作用,具有促进药用植物生长、增强抗逆性、促进活性代谢物累积、替代药用植物有效成分等作用^[3-6]。近年来随着抗生素的大量使用,细菌耐药性日益加重,寻找新型抗菌药迫在眉睫^[7]。已发现许多药用植物的内生真菌可产生萜类及其皂苷、甾体、生物碱、肽类、芳香类^[8]等抗菌活性物质。因此,开发药用植物内生真菌为寻找新型抗菌药提供丰富资源。

收稿日期:2018-06-25 接受日期:2018-11-19

基金项目:“十三·五”国家重点研发计划(2016YFC0500303)东北森林区道地林药资源生态开发利用技术研发与示范,黑龙江省国家科技重大专项和重点研发项目(GX17C006);黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z17208)

*通信作者 Tel:86-451-87266873; E-mail: wangzhen_yue@163.com

刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms 的干燥根和根茎或茎入药,性甘、微苦,温,归脾、肺、心、肾经^[9]。具有益气健脾、补肾安神的功效。刺五加作为国家二级濒危保护植物,近年来为高效利用其资源,对其化学成分药理作用研究较多,其主要含有木质素类、黄酮类、三萜皂苷、香豆素、多糖类化学成分,具有抗肿瘤、抗疲劳、保护心脑血管、降血糖等药理作用^[10-12]。本实验以药用植物刺五加为实验材料,分离鉴定其内生真菌,并对根、茎和叶中内生真菌多样性进行系统分析,丰富了药用植物内生真菌资源;以金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌为指示菌分别代表革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌,首次从刺五加中筛选得到具有显著抗菌活性的镰孢霉属 *Fusarium oxysporum* 与链格孢属 *Alternaria alternata* 内生真菌,为进一步开发利用刺五加内生真菌资源提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

光照培养箱(杭州汇尔仪器设备有限公司);电热鼓风干燥箱 BGZ-240(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);立式压力灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);洁净工作台 BJ-1CD(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);DNA 抽提试剂盒 SK8259/SK8260(上海生工生物工程有限公司)。

1.2 植物材料

刺五加新鲜植株,来源于黑龙江中医药大学药用植物园,经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms。

1.3 培养基

1.3.1 分离纯化培养基

PDA 培养基:马铃薯葡萄糖粉 25 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 L。

1.3.2 鉴定培养基

察氏培养基:硝酸钠 3 g,硫酸镁 0.5 g,磷酸氢二钾 1 g,硫酸亚铁 0.01 g,氯化钾 0.5 g,蔗糖 30 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 L。

1.3.3 抑菌培养基

牛肉膏蛋白胨:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,琼脂 16 g,蒸馏水 1 L,加热煮沸,pH7.0~7.2。

1.4 供试菌种

金黄色葡萄球菌 CMCC (B)26003、大肠埃希菌 ATCC25922,购自于上海鲁微科技有限公司。

2 实验方法

2.1 内生真菌分离纯化

将刺五加根、茎、叶用流水冲洗干净,在无菌操作台中用 75% 酒精漂洗 3 min,蒸馏水冲洗 5 次,再用 10% NaClO 分别漂洗根 10 min、茎 8 min、叶 4 min,漂洗后用蒸馏水冲洗 5 次,用无菌滤纸吸干表面水分。将根和茎分别切割成 1 cm 长的小段、叶切割成 1×1 cm 的小块,平贴在 PDA 培养基上,最后一次漂洗液在平板上划线作为空白对照检验消毒效果,置 28 ℃ 避光培养 3~7 天,待组织边缘长出菌丝,将其挑出转入平板,纯化,得到单一菌种,转移至 PDA 斜面保存备用。

2.2 内生真菌形态学鉴定

挑取菌丝尖端置于 PDA 平板中心,28 ℃ 避光培养 7 天,观察菌落生长速度、颜色、质地等变化。挑取菌丝于察氏培养基平板中,夹取无菌盖玻片倾斜 45°角插在该菌的周围,置于 28 ℃ 培养。待该菌长至盖玻片上,用镊子轻轻取出盖玻片,用火焰固定,滴加乳酚棉蓝染色液,50 min 后,于水中轻柔漂洗,晾干封片,显微镜下观察照相。参考《真菌鉴别手册》进行鉴别。

2.3 内生真菌分子鉴定

用 DNA 提取试剂盒^[13]法提取菌株 DNA 作为 PCR 扩增模板。选用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增菌株的 r DNA ITS 区。反应条件:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 复性 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物电泳凝胶放入凝胶成像仪中紫外光下观察条带位置,确定扩增成功后将扩增产物送至上海生工生物工程服务技术有限公司测序,得到序列在 Gen Bank (<http://www.ncbi.nih.gov>) 中寻找同源性高的序列,比对序列输入 Mega5.05 软件,剪切掉开头和尾端长短不一的序列,采用邻近法 (Neighbor-Joining),构建系统发育树,自检重复数 1000,比对确定菌种类别。

2.4 计算内生真菌多样性指数

根据 Shannon-Weiner 公式 $H' = - \sum P_i \times \ln P_i$ ^[14], P_i 代表该植物中某种内生真菌分离得到的数量占总菌数的百分比。

2.5 内生真菌抗菌性筛选

无菌环境下,用接菌环挑取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌于 10 mL 蒸馏水中摇匀,滴一滴于血球计数板,显微镜下计数,稀释至 1×10^6 个/mL,每 1 mL 加到 9 mL 37 °C 融化的牛肉膏蛋白胨培养基中摇匀,倒入培养皿,制成指示菌培养基,待放凉凝固后,用 7 mm 打孔器在刺五加内生真菌平板中切取菌饼放在指示菌培养基中,每组三个重复,28 °C 培养 24 h,测量抑菌圈大小。大肠埃希菌以硫酸卡那霉素为

阳性对照,金黄色葡萄球菌以氨苄青霉素为阳性对照。

3 实验结果与分析

3.1 内生真菌鉴定结果

从刺五加根茎叶分离纯化得到 71 株菌种,经群落形态、显微形态(如图 1~6)去重后,对剩余菌种分子鉴定得到 ITS 序列在 genbank 中比对结果(见表 1),共 18 种,来自于 4 目、8 科、11 属。

表 1 刺五加内生真菌 ITS 序鉴定结果

Table 1 The identification of ITS sequence of endophytic fungi from *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms

目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	菌株编号 Strain number	登录号 Accession	一致性 Ident					
Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>	CWJ-6	KF813070.1	100%					
			<i>Alternaria</i> sp.	CWJ-15	KX839282.1	100%					
			<i>Alternaria destruens</i>	CWJ-14	MG182675.1	100%					
	Didymellaceae	<i>Leptosphaerulina</i>	<i>Leptosphaerulina australis</i>	CWJ-2	KT192207.1	100%					
			<i>Nothophoma</i>	<i>Nothophoma quercina</i>	CWJ-3	KU973713.1	100%				
			<i>Phoma</i>	<i>Phoma</i> sp. G375	CWJ-11	KR094455.1	99%				
	Phaeosphaeriaceae	<i>Paraphoma</i>	<i>Paraphoma chrysanthemicola</i>	CWJ-7	LC126022.1	99%					
			<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	CWJ-10	KX664373.1	100%				
	Capnodiales	Cladosporiaceae									
	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium tricinctum</i>	CWJ-16	KX058066.1	99%				
<i>Fusarium acuminatum</i>				CWJ-17	KY365571.1	99%					
<i>Fusarium oxysporum</i>				CWJ-5	KX058060.1	99%					
<i>Fusarium</i> sp. 2 MSD-2017				CWJ-8	LT746245.1	99%					
<i>Cylindrocarpon olidum</i>				CWI-13	KC427019.1	99%					
<i>Diaporthe</i>				<i>Diaporthe</i>	<i>Phomopsis vaccinii</i>	CWJ-1	KC488259.1	100%			
Eurotiales				Trichocomaceae	<i>Talaromyces</i>	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	CWJ-4	LT558955.1	99%		
						Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	CWJ-18	KX664330.1	100%
								<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>	CWJ-9	KX674635.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>				CWJ-12	KY352035.1	100%					

71 株内生真菌中,在根中分离得到 23 株内生真菌,占总菌株数的 32.39%,鉴定为 3 目、5 科、6 属、11 个种,分别为链格孢属 *Alternaria alternata*、*Alternaria* sp.、*Alternaria destruens*、小光壳属 *Leptosphaerulina australis*、茎点霉属 *Phoma* sp. G375、异茎点霉属 *Paraphoma chrysanthemicola*、镰孢霉属 *Fusarium tricinctum*、*Fusarium oxysporum*、*Fusarium* sp. 2 MSD-2017、*Cylindrocarpon olidum*、间座壳属 *Phomopsis vaccinii*。茎中分离得到 37 株内生真菌,占总菌株数的 52.11%,鉴定为 3 目、6 科、9 属、14 个种,包括链格

孢属 *Alternaria destruens*、*Alternaria alternata*、*Alternaria* sp.、小光壳属 *Leptosphaerulina australis*、*Nothophoma* 属 *Nothophoma quercina*、茎点霉属 *Phoma* sp. G375、镰孢霉属 *Fusarium tricinctum*、*Fusarium acuminatum*、*Cylindrocarpon olidum*、间座壳属 *Phomopsis vaccinii*、踝节菌属 *Talaromyces amestolkiae*、曲霉属 *Aspergillus fumigatus*、青霉属 *Penicillium oxalicum*、*Penicillium chrysogenum*。叶中分离得到 11 株内生真菌,占总菌株数的 15.49%,鉴定为 3 目、4 科、4 属的 5 个种,分别为链格孢属 *Alternaria alternata*、

Nothophoma 属 *Nothophoma quercina*、枝孢属 *Cladosporium cladosporioides*、青霉属 *Penicillium oxalicum*、*Penicillium chrysogenum*。链格孢属 (*Alternaria*) 的菌

株共有 20 株, 占总菌株数的 28.17%, 镰孢霉属 (*Fusarium*) 有 20 株, 占总菌株数的 28.17%, 这两属内生真菌为刺五加优势属内生真菌。

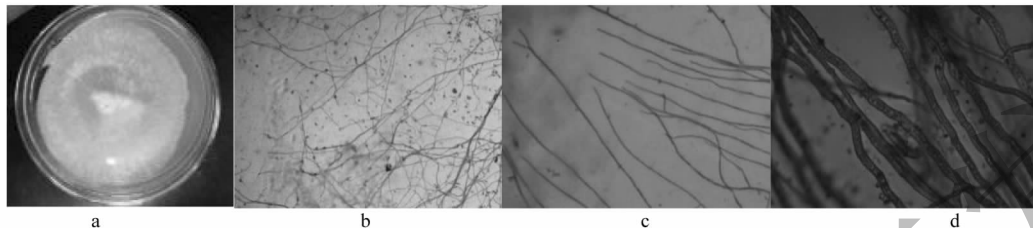


图 1 内生真菌 CWJ-5 菌落形态及显微形态图

Fig. 1 The colony morphology and microscopic structure of endophytic fungi CWJ-5

注: a: CWJ-5 菌落形态; b: CWJ-5 显微形态(10×4); c: CWJ-5 显微形态(10×10); d: CWJ-5 显微形态(10×40)。

Notes: a: the colony morphology of CWJ-5; b: the microscopic structure of CWJ-5 (10×4); c: the microscopic structure of CWJ-5 (10×10); d: the microscopic structure of CWJ-5 (10×40).

```
CCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTAACTCCCAAACCCTGTGAACATACCTTTAATGTTGCCTCG
GCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAACGGGACGCCCCGCCAGAGGACCCAACTCTAATGTTCTTATT
GTAACCTCTGAGTAAAAACAATAAATCAAACTTCAACAACGGATCTCTGGGTCTGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATGAATCTTGA
ACGCACATTGCGCCCGCTGTAATCCGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCC
CCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCCTTCTGGGCGGTGCCGCCCCGAAATACATTGGCGGTC
TCGCTGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAACGCGGGCGGCCATGCCGTA
ACCCCAACTTCTGAATGTGACCT
```

图 2 CWJ-5 rDNA ITS 序列

Fig. 2 rDNA ITS Sequences of CWJ-5

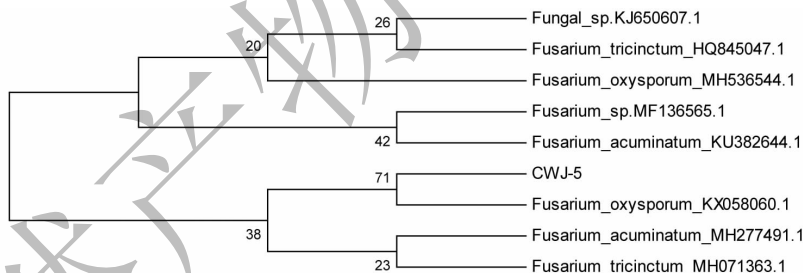


图 3 CWJ-5 序列鉴定系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of CWJ-5

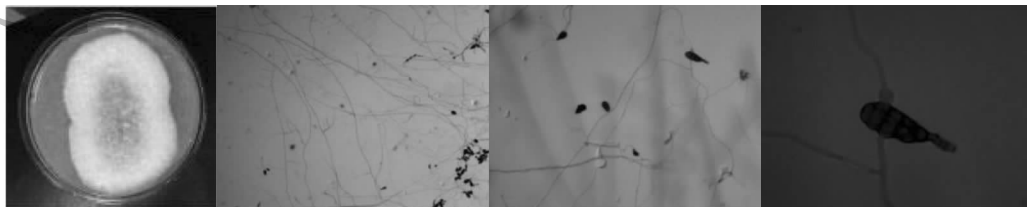


图 4 内生真菌 CWJ-6 菌落形态及显微形态图

Fig. 4 The colony morphology and microscopic structure of endophytic fungi CWJ-6

注: a: CWJ-6 菌落形态; b: CWJ-6 显微形态(10×4); c: CWJ-6 显微形态(10×10); d: CWJ-6 显微形态(10×40)。

Notes: a: the colony morphology of CWJ-6; b: the microscopic structure of CWJ-6 (10×4); c: the microscopic structure of CWJ-6 (10×10); d: the microscopic structure of CWJ-6 (10×40).

CCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
 TTATTCACCCTTGTCTTTTGGCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTCCGCCACCACTAGGACAAACATAA
 ACCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG
 TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
 CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTGTGAC
 CCTCAAGCTTTGCTGGTGTGGGGCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGG
 CAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCAT
 TAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAA

图5 CWJ-6 rDNA ITS 序列

Fig. 5 rDNA ITS Sequences of CWJ-6

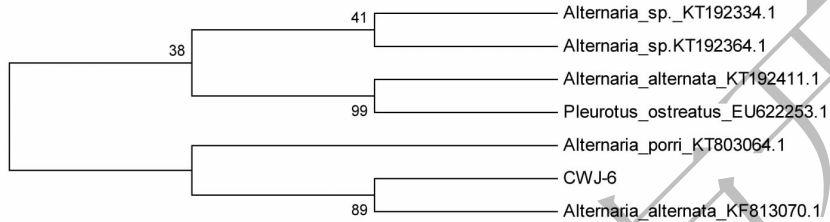


图6 CWJ-6 序列鉴定系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of CWJ-6

计算刺五加根、茎、叶中内生真菌多样性指数分别为 1.112 31、1.523 658、0.264 1,根、茎明显高于叶片,根及茎中分离得到的内生真菌种类和数量都较叶多。其中,根、茎和叶中均存在的菌株为 *Alternaria alternata* (CWJ-6),仅存在于根中的内生真菌为镰孢霉属 *Fusarium oxysporum*、*Fusarium* sp. 2 MSD-2017、和异茎点霉属 *Paraphoma chrysanthemico-*

la,仅存在于茎中的内生真菌有踝节菌属 *Talaromyces amestolkiae*、镰孢霉属 *Fusarium acuminatum*、曲霉属 *Aspergillus fumigatus*,仅在叶中分离得到的内生真菌为枝孢属 *Cladosporium cladosporioides* (见表 2)。

3.2 内生真菌抗菌性结果

18 种刺五加内生真菌中,抗金黄色葡萄球菌的有 14 种,占内生真菌总数的 78%,抗大肠杆菌的菌

表 2 刺五加不同部位不同内生真菌数量

Table 2 Numbers of different endophytic fungi in different parts of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms

内生真菌菌株 Endophytic fungi strain	真菌数量 Number of fungi			
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	合计 Total
<i>Alternaria alternata</i>	2	2	4	8
<i>Alternaria</i> sp.	3	3	0	6
<i>Alternaria destruens</i>	1	5	0	6
<i>Leptosphaerulina australis</i>	1	5	0	6
<i>Nothophoma quercina</i>	0	2	1	3
<i>Phoma</i> sp. G375	1	2	0	3
<i>Paraphoma chrysanthemicola</i>	2	0	0	2
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0	0	4	4
<i>Fusarium tricinctum</i>	2	2	0	4
<i>Fusarium acuminatum</i>	0	5	0	5
<i>Fungal</i> sp.	2	0	0	2
<i>Fusarium</i> sp. 2 MSD-2017	4	0	0	4
<i>Cylindrocarpon olidum</i>	3	2	0	5

续表 2(Continued Tab. 2)

内生真菌菌株 Endophytic fungi strain	真菌数量 Number of fungi			
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	合计 Total
<i>Phomopsis vaccinii</i>	2	1	0	3
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	0	3	0	3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	3	0	3
<i>Penicillium oxalicum</i>	0	1	1	2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0	1	1	2
共计 Total	23	37	11	71

株也为 14 种,占内生真菌总数的 78% (见表 3)。金黄色葡萄球菌阳性对照抑菌直径 19.97 ± 0.1 mm,大肠埃希菌阳性对照抑菌直径 16 ± 0.02 mm。相比于对照组(见图 7、8),刺五加内生真菌中,对金黄色葡萄球菌抑菌效果显著的有 CWJ-5(镰孢霉属 *Fusarium oxysporum*.) 抑菌直径 27.17 ± 0.07 mm、CWJ-8(镰孢霉属 *Fusarium* sp. 2 MSD-2017) 抑菌直

径 21.33 ± 0.14 mm、CWJ-17(镰孢霉属 *Fusarium acuminatum*) 抑菌直径 21.1 ± 0.24 mm。对大肠埃希菌抑菌效果显著的有 CWJ-6(链格孢属 *Alternaria alternata*) 抑菌直径 18.07 ± 0.01 mm、CWJ-14(链格孢属 *Alternaria destruens*) 抑菌直径 16.03 ± 0.08 mm。对两种指示菌都有抑制效果的共有 12 种,占总菌种数的 67%。

表 3 刺五加内生真菌抗菌性结果

Table 3 Antibacterial effects of endophytic fungi from *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms

菌株号 Strain No.	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	大肠埃希菌 Escherichia coli.	菌株号 Strain number	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	大肠埃希菌 Escherichia coli.
CWJ-1	-	-	CWJ-10	+	+
CWJ-2	-	-	CWJ-11	-	++
CWJ-3	+	+	CWJ-12	++	++
CWJ-4	-	+	CWJ-13	++	++
CWJ-5	++++	+	CWJ-14	++	+++
CWJ-6	+++	+++	CWJ-15	+	+
CWJ-7	+	+	CWJ-16	+	+
CWJ-8	++++	-	CWJ-17	++++	-
CWJ-9	+	+	CWJ-18	+	+

注:“-”表无活性;“+”表活性较弱,抑菌圈直径 < 11 mm;“++”表活性中等,抑菌圈直径 $11 \sim 15$ mm;“+++”表活性较强,抑菌圈直径 > 15 mm;“++++”表活性极强,抑菌圈直径 > 20 mm。

Notes:“-” indicates no activity;“+” indicates weak activity, the bacteriostasis diameter < 11 mm;“++” indicates medium activity, the bacteriostasis diameter is in $11 \sim 15$ mm;“+++” indicates strong activity, the bacteriostasis diameter > 15 mm;“++++” indicates extremely strong activity, the bacteriostasis diameter > 20 mm.

4 结论

本实验分离纯化得到内生真菌中链格孢属与镰孢霉属为优势属,与陈红军^[15]分离鉴定的刺五加内生真菌结果相似。近年来,其他学者在刺五加中分离得到的内生真菌有串珠霉属、青霉属、木霉属、小节串孢霉属、曲霉属、头孢霉属、串孢霉属、炭疽菌属、痂圆孢属、丝核菌属、长蠕孢属、枝顶孢酶属、链格孢属、镰孢属、红曲霉属、根霉属等^[15-17],与本实验分离结果不尽相同。造成其差异性原因猜想可能为:(1)同种植物相同组织受环境影响,其生理状况

和化学组成发生变化,导致内生真菌种类数量不同;(2)采样季节不同,吕立新等^[18]研究发现茅苍术夏季内生真菌的多样性高于春季和秋季;(3)植物体内环境复杂,内生真菌与宿主相互作用协同进化,体外培养条件难以达到内生真菌在植物体内的生长环境,无法全部获得植物体内内生真菌^[19]。不同环境、不同采样季节以及不同培养条件都可能导致分离得到的刺五加内生真菌种类数量不同,这说明刺五加体内可能仍有许多尚未被发现的菌种。刺五加植株生长缓慢,生长年限长,而内生真菌则具有繁殖

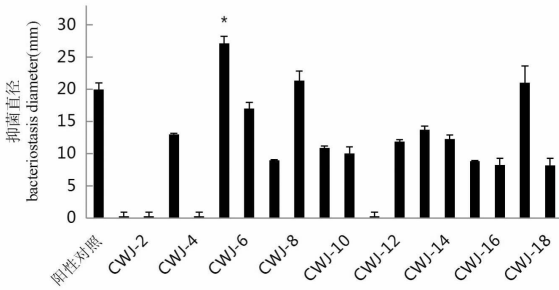


图7 刺五加内生真菌抗金黄色葡萄球菌活性对比图

Fig. 7 Antibacterial effects against *Staphylococcus aureus* of endophytic fungi from *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms

注：“*”表示 $P < 0.05$ ($n = 3$) 与阳性对照组差异显著。

Note: “*” indicates $P < 0.05$ ($n = 3$), the difference was significant compared with the positive control group.

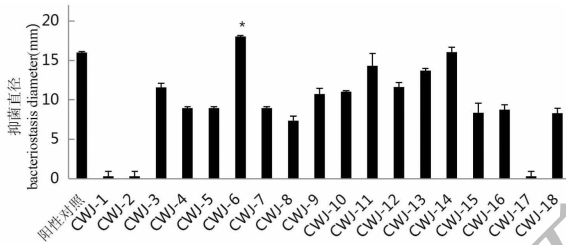


图8 刺五加内生真菌抗大肠埃希菌活性对比图

Fig. 8 Antibacterial effects against *Escherichia coli* of endophytic fungi from *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms

注：“*”表示 $P < 0.05$ ($n = 3$) 与阳性对照组差异显著。

Note: “*” Indicates $P < 0.05$ ($n = 3$), the difference was significant compared with the positive control group.

快、易存活、可持续发展、不破坏自然资源、不受地理条件自然条件制约^[6]的优势。因此,研究刺五加内生真菌多样性,丰富药用植物内生真菌资源,从中发掘更多具有药用价值的成分,具有广阔的发展前景。

根据美国疾控中心统计,由大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌两种病原菌引起的感染分别为第一位和第二位^[21],本实验分离得到的链格孢属 *Alternaria alternata* 抗大肠埃希菌抑菌直径 18.07 ± 0.01 mm,镰孢霉属 *Fusarium oxysporum* 抗金黄色葡萄球菌抑菌直径达到 27.17 ± 0.07 mm,相较于对照组效果显著,具有良好的抑菌效果,可能成为新型抗菌剂来源。分离得到的刺五加内生真菌中,抗金黄色葡萄球菌的有 14 种,占内生真菌总数的 78%,抗大肠杆菌的菌株也为 14 种,占内生真菌总数的 78%,说明刺五加体内内生真菌活性较强,存在许多尚待开发

的有价值的成分。对两种指示菌都有抑制效果的共有 12 种,占总菌种数的 67%,这些内生真菌为广谱抗菌活性菌种,具有很大的研究利用空间。目前对刺五加内生真菌抗菌机制的研究未见报道,其他学者对内生真菌抗菌机制研究^[20]一般从内生真菌发酵液对指示菌细胞壁、细胞膜、菌体蛋白合成、核酸结构及抑菌时效特性等方面进行研究,孟素香等^[23]发现绞股蓝内生真菌 JY25 通过破坏金黄色葡萄球菌细胞膜并抑制其蛋白质合成从而起到抑菌效果。CWJ-5(镰孢霉属 *Fusarium oxysporum*)、CWJ-6(链格孢属 *Alternaria alternata*) 分别对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌抑菌效果显著,下一步将对 CWJ-5、CWJ-6 次生代谢产物成分进行分离研究,确定其有效抗菌部位,探究抗菌机制,测试细胞毒性,寻找增效减毒的新型抗菌剂。

参考文献

- Hyde KD, Soyong K. The fungal endophyte dilemma [J]. *Fungal Divers*, 2008, 33: 163-173.
- Cui JL, Guo SX, Xiao PG. Interaction between endophytes and host plant and the role of endophytes in genuineness analysis of medicinal plant [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 214-221.
- Stone JK, Bacon CW, White JF. An overview of endophytic microbes: endophytism defined, 3 [M]. New York: Marcel Dekker, 2000; 267-274.
- Guo SX. The recent progress and prospects of research on endophytic fungi in medicinal plants [J]. *Mycosystema (菌物学报)*, 2018, 37(1): 1-13.
- Qiu DY, Huang MJ, Fang XH, et al. Isolation of an endophytic fungus associated taxus yunnanensis et L. K. Fu [J]. *Aeta Myeologia Sin (真菌学报)*, 1994, 4: 314-316.
- Li J, Zhang HR, Liu NY, et al. Study on isolation and identification endophytic fungi and antibacterial activity of Flos Lonicerae [J]. *J Chin Antibiotics (中国抗生素杂志)*, 2010, 35: 236-237.
- Zhu YG, Ouyang WY, Wu N, et al. Antibiotic resistance sources and mitigation [J]. *Bull Chin Acad Sci (中国科学院院刊)*, 2015, 30: 509-516.
- Shi QY, Chen XM, Guo SX. Research progress of antibacterial active substance derived from endophytic fungi from plants [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)* 2007, 11: 804-807.
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典: 第一部)* [M]. Beijing: China Medical

- Science Press, 2015; 206-207.
- 10 Yang XD, Jing YE, Lu F. Research progress on chemical components of *Acanthopanax senticosus*[J]. Chin Arcs Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2015, 33: 316-318.
 - 11 Bai X, Hu WZ, Jiang AL, et al. Research advance on main active substance and pharmacological action of *Acanthopanax* [J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2016, 37: 396-399.
 - 12 Huang J, Shao Q, Xiang YH, et al. Identification of phenylpropanoids in Ciwujia injection by HPLC-MS [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39: 2513-2520.
 - 13 Zheng P, Tan DG, Sun PX, et al. Morphology and phylogenetic position of an endophytic fungus ITBB2-1 from rubber tree [J]. Chin J Trop Crops(热带作物学报), 2009, 30: 314-319.
 - 14 Pielou EC. Ecological diversity[M]. New York: John Wiley and Sons Inc, 1975.
 - 15 Chen HJ. Isolation and identification of endophytic fungi from wild *Acanthopanax*[J]. J Pract Tradit Chin Med(实用中医药杂志), 2016, 32: 740-741.
 - 16 Liu J, Gao Y, Luo JH. Isolation and identification of endophytic fungi from wild *Acanthopanax Senticosus* [J]. Heilongjiang Med and Pharm(黑龙江医药科学), 2011, 34(4): 8-9.
 - 17 Xiong YN, Xing ZB, Wu P, et al. Study on isolation and distribution of endophytic fungus in *Eleutherococcus senticosus* Harms [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2009, 37: 11347-11348.
 - 18 Lyu LX, Wang HW, Liang XF, et al. Effects of different chemotypes and seasonal dynamic variation on the species diversity of endophytic fungal communities harbored in *Atractylodes lancea* [J]. Acta Ecol Sin(生态学报), 2014, 34: 7300-7310.
 - 19 Li JB, Ding CH, Zhang S, et al. Preliminary study on the growth-promoting effect of endophytic fungi from rumex gmelini turcz [J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息), 2018, 35(1): 6-9.
 - 20 Li ZY, Chen YW, Yang LY, et al. Antipathogenic activity of endophytic fungi in *Radixaconiti* plant [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2009, 21: 676-678.
 - 21 Meng SX, Cao J, Zhang HR, et al. Antibacterial mechanisms of endophytic fungi from *Gynostemma pentaphyllum* on *Staphylococcus aureus* [J]. J Chin Antibiotics(中国抗生素杂志), 2015, 40: 268-273.
-
- (上接第 99 页)
- 13 Valentina RN, Tom HWH, Van HT, et al. Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Phyto Chem Rev, 2005, 4: 197-219.
 - 14 Carey AM, Lombi E, Donner E, et al. A review of recent developments in the speciation and location of arsenic and selenium in rice grain [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402: 3379-3379.
 - 15 Kang SM, Heo SJ, Kim KN, et al. Isolation and identification of new compound 2,7-phloroglucinol-6,6-bieckol from brown algae eckloniacava and its antioxidant effect [J]. J Func Foods, 2012, 4: 158-166.
 - 16 Feng YC. Studies on tyrosinase inhibition and antioxidant activity of *Glycyrrhiza uralensis* and figs aqueous extract [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology(华中科技大学), 2013.
 - 17 Zhang SN, Ma DX, Zhang J. Luo Shen Hua Hua calyxpolyphenol extraction and antioxidant, tyrosinase inhibition study [C]. Shanghai: China perfume essence Cosmetics Industry Association, 2016.
 - 18 Zhao CM. Tyrosinase inhibitor screening and antioxidant activity of *Zanthoxylum bungeanum* and tyrosinase inhibitory activity [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology(兰州理工大学), 2014.