

# 一株具有拮抗作用黄精内生菌 HJ-3 的鉴定及抗菌活性研究

吕彩云, 夏娟, 林永翔, 刘小壮, 相爱标, 郑亚文, 柏晓辉\*

黄山学院生命与环境科学学院, 黄山 245041

**摘要:**本研究从安徽道地药材黄精中筛选出一株内生菌 HJ-3,采用五点对峙培养法观察该菌株对 8 种植物病原真菌的拮抗作用,将 HJ-3 菌株的发酵产物经萃取浓缩配制不同浓度,通过滤纸片扩散法检测其对 4 种供试菌的抑菌活性,并用 LC-MS 检测分析。结果表明:内生菌 HJ-3 对 8 种常见植物病原真菌均表现出明显的拮抗活性,其中对立枯丝核菌等 7 种病原真菌拮抗活性很明显,盘长孢状刺盘孢拮抗活性较弱;另外发现,不同浓度的发酵产物对 4 种供试菌均有一定抑菌作用,其中对金黄色葡萄球菌抑菌效果较好。经形态学分析及 16S rRNA 基因测序,将该内生菌 HJ-3 鉴定命名为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。LC-MS 检测分析,获得一种 5,5'-methylenebis(2-tert-butyl-4-methylphenol) 酚类物质以及三种同系列化合物。研究结果为黄精内生菌药物开发奠定基础,也为植物内生菌药物广泛应用提供依据。

**关键词:**内生菌;拮抗;抗菌;黄精

中图分类号:Q939.92

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)3-0399-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.3.006

## Identification and antimicrobial activity of an antagonistic endophytic strain HJ-3 from *Polygonatum cyrtonema*

LYU Cai-yun<sup>1</sup>, XIA Juan, LIN Yong-xiang, LIU Xiao-zhuang, XIANG Ai-biao, ZHENG Ya-wen, BAI Xiao-hui\*

School of Life and Environmental Sciences, Huangshan University, Huangshan 245041, China

**Abstract:** In this study, an endophytic strain HJ-3 was screened from *Polygonatum cyrtonema*, an original medicinal material from Anhui Province. The antagonistic effects of HJ-3 on eight plant pathogenic fungi were observed by five-point confrontation culture method. The activated HJ-3 strain was fermented into fermentation products with different concentrations, its antibacterial activities against four tested bacteria were detected by filter paper diffusion method, and the extracted fermentation products were detected by LC-MS. The results showed that the endophytic bacteria HJ-3 showed obvious antagonistic activities against eight common plant pathogenic fungi, among which the antagonistic activities against seven pathogenic fungi such as *Rhizoctonia solani* Kühn were obvious, and the antagonistic activities against *Collettrichum gloeosporioides* Penz was weak. In addition, it was found that the fermentation products of different concentrations had certain antibacterial effects on the four kinds of tested bacteria, among which the antibacterial effects on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were better. The endophytic strain HJ-3 was identified and named as *Bacillus velezensis* by morphological analysis and 16S rRNA gene sequencing. A 5,5'-methylenebis(2-tert-butyl-4-methylphenol) phenolic substance and three similar compounds were obtained by LC-MS analysis. The results of this study laid a foundation for the development of endophytic bacteria from *Polygonatum cyrtonema*, it also provides the basis for the extensive application of endophytic drugs.

**Key words:** endophytes; antagonism; antibacterial; *Polygonatum cyrtonema*

内生菌是一种栖息于健康植物组织中,在长期

进化过程中,与植物宿主之间建立和谐共生关系。研究发现植物内生菌在植物病害生物防治方面<sup>[1,2]</sup>具有巨大应用潜能。也有研究表明,植物内生菌能够产生与宿主相同或相似的代谢产物,尤其是药用植物内生菌<sup>[3,4]</sup>产生的一些代谢产物对人类疾病有很好的疗效,已被报道作为治疗如癌症,肿瘤以及细

收稿日期:2021-06-03 接受日期:2022-01-27

基金项目:安徽省教育厅重点项目(KJ2019A0611);安徽省林业科技创新研究项目(AHLYCX-2021-10);校级人才启动项目(2019xkj010);安徽省大学生创新创业训练项目(S202010375060)

\*通信作者 Tel:86-559-2546552;E-mail:bxh@hsu.edu.cn

菌和真菌感染治疗剂<sup>[5,6]</sup>。比如 Bos 等<sup>[7]</sup>报道用传统的加拿大药用植物 *Heracleum maximum* 分离的内生菌提取物具有抗分枝杆菌活性, 可作为抗癌天然产物研究; Seo 等<sup>[8]</sup>研究发现萝卜中的内生菌对病原菌具有抗菌活性, 可用作对抗人类和植物病原体的生物防治剂等等。

多花黄精 (*Polygonatum cyrtonema*) 为百合科黄精属植物, 主要成分为甾体皂苷类和黄精多糖, 在增强免疫力、抗肿瘤、降血糖以及抑菌等方面具有非常重要的药理作用<sup>[9]</sup>。作为药食同源植物, 现已广泛应用于药品、食品、化妆品等领域, 但大部分产品处于初加工阶段, 还需对黄精药效成分进行深入研究, 开发更多的黄精精深加工产品。有关黄精内生菌的文献报道并不多, 如 Li<sup>[10]</sup>从泰山黄精中分离到具有抑菌活性的内生真菌; Wang<sup>[11]</sup>从浙江多花黄精中分离到内生真菌进行抗菌代谢产物研究。而植物内生菌因其宿主植物地域不同, 生长阶段不同, 组织部位不同, 内生菌种类也不同。Bai、Zhai 等<sup>[12,13]</sup>从安徽黄精中分别筛选到内生菌株芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌进行了抑菌活性研究。本研究从安徽黄精中分离到另外一株具有拮抗作用的内生菌株 HJ-3, 对其进行分类鉴定、活性研究及代谢产物分析, 以期为丰富黄精内生菌资源及开发利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 植物样品

样品于 2015 年 8 月采集自安徽省牯降自然保护区, 经黄山学院方建新老师和潘健博士鉴定为多花黄精, 采集后于 4 ℃保存备用, 并在 24 h 内完成菌种分离。

#### 1.1.2 供试菌株

供试植物病原真菌: 盘长孢状刺盘孢 (*Collettrichum gloeosporioides* Penz, Cg)、番茄尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Fl)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, Fv)、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum* de Bary, S)、禾生腐霉 (*Pythium gramineacola*, P)、新月弯孢 (*Curvularia lunata*, Cl)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*, Fg)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn, R)。

供试细菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, S)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, E)、苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, Bs); 以上菌株均购于中国典型培养物保藏

中心并保存于黄山学院生命与环境科学学院微生物学实验中心。

#### 1.1.3 主要试剂

细菌基因组抽提试剂盒 (Takara(北京)生物有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO)、乙酸乙酯、丙酮和 75% 酒精等均为分析纯试剂 (上海国药集团); 葡萄糖、蛋白胨、酵母提取物、琼脂等生化试剂 (上海生工生物有限公司); 甲醇、甲酸均为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 纯水为 MilliQ 系统纯化水 (美国 Millipore 公司)。

#### 1.1.4 主要仪器

DSX280B 型高压蒸汽灭菌锅 (上海申安医疗器械有限公司); MQD-B2R 型振荡培养箱 (上海曼泉仪器有限公司); ZGP-2050 型恒温培养箱 (上海智城分析仪器制造有限公司); OSB-2100 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); FST-III-30 超纯水机 (上海富诗特仪器设备有限公司); AERIS-GB096 快速型 PCR 仪 (上海艺思高科技有限公司); BG-gdsAUTO320 凝胶成像系统 (北京百晶生物技术有限公司); S-3400N 型扫描电镜 (日本日立公司); UPLC H-CLASS + QTOF G2-XS 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪 (美国 Waters 公司), 配有电喷雾离子源 (ESI), MassLynx V4.1 软件。

#### 1.1.5 供试培养基

LB 液体培养基: 酵母提取物 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 7.0 ~ 7.2, 用于内生菌的培养。

葡萄糖马铃薯固体培养基 (PDA): 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L、琼脂 20 g/L, 自然 pH。用于病原真菌的培养。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 供试菌株活化培养

挑取保存于斜面培养基上的植物病原菌菌丝体接种于 PDA 培养基, 于 28 ℃ 培养, 转接 2 次, 待菌丝长到培养皿 2/3 时, 作为供试病原真菌, 4 ℃ 保存备用。

挑取保存于斜面培养基上的细菌在固体 LB 培养基平板上划线活化, 接种环挑取单菌落转接至液体 LB 培养基, 37 ℃ 180 rpm 培养 12 h, 作为供试细菌, 4 ℃ 保存备用。

### 1.2.2 内生菌分离纯化

参照文献<sup>[14,15]</sup>方法, 将实验材料经水洗后, 用 5% (V/V) 次氯酸钠溶液处理 5 min; ddH<sub>2</sub>O 漂洗 4

次后用 75% (V/V) 乙醇溶液处理 5 min, ddH<sub>2</sub>O 漂洗 4 次并吸去残留无菌水;再将其无菌切割成 3 mm 左右片段后分别种植于 PDA 和 LB 培养基;同时以随机选取的根茎片段,将其两端切口灼烧后种植于上述培养基作为对照。于 28 ℃ 培养 3~5 天,待切口处长出菌落后,挑取菌体转接至培养基进一步分离纯化,直至纯化为单一纯种菌落;将纯种菌转接到斜面培养基上保存备用。

### 1.2.3 内生菌分类鉴定

依据微生物学常规实验方法对内生菌进行菌落形态特征观察,并用扫描电镜进行菌体观察;同时利用革兰氏染色镜检,结合东秀珠等编写的《常见细菌系统鉴定手册》进行初步鉴定。

采用细菌基因组抽提试剂盒提取内生菌株全基因组 DNA,利用细菌 16S rRNA 通用引物 27F:5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1 492R:5'-TACG-GCTACCTGTTACGACTT-3' 进行扩增<sup>[12]</sup>,PCR 反应条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。将扩增产物利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶纯化后送至上海生工有限公司测序。将测得的序列经过拼接后,利用 NCBI 数据库中的 BLAST 进行比对,检索与其同源序列。选择与待鉴定菌株同源性较高的菌株序列,利用 Clustal X 软件进行比对,再结合 MEGA 6.0 软件中 Neighbor-Joining 算法构建系统进化树,确定该内生菌株的系统发育学地位。

### 1.2.4 内生菌对 8 种植物病原真菌拮抗活性观察

参考文献采用五点对峙培养法<sup>[16]</sup>,观察内生菌对 8 种植物病原真菌的拮抗作用。在 PDA 固体培养基平板正中央接入直径为 6 mm 的供试病原真菌菌饼,同时在平板 4 个距供试真菌菌饼 2.5 cm 处接入相同大小的内生菌菌饼,以只在平板中央接入病原真菌作为空白对照组,于 28 ℃ 恒温培养,每隔 24 h 观察 1 次,每组处理做三个平行,试验重复两次。观察病原真菌的生长状态,测量病原真菌菌落直径,计算病原真菌菌株的抑制率,拍照记录。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组菌落直径} -$$

$$\text{处理组菌落直径}) / \text{对照组菌落直径} \times 100\%$$

### 1.2.5 内生菌发酵产物提取

将活化的单菌落接种于 PD 培养液,于 28 ℃ 180 rpm 培养 12 h 获得种子液。按照 1/40(V/V) 比例将种子液进一步扩大培养,于 28 ℃ 180 r/min 培

养 7 天,定时观察培养液情况。

取发酵 7 天后的培养液,经离心过滤,按照 1:1.5 (V/V) 比例在发酵液中加入乙酸乙酯萃取,萃取 3 次;旋转蒸发仪浓缩,再用丙酮溶解转至干净试剂瓶内,自然风干,获得内生菌发酵产物。用灭菌的 100% 二甲基亚砜(DMSO) 将获得的发酵产物配成 100 mg/mL 贮存浓度,于 4 ℃ 保存备用。

### 1.2.6 观察内生菌发酵产物对 4 种供试菌的抑菌活性

用 LB 液体培养基将供试菌分别培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.2~0.3,取 100 μL 菌液分别均匀涂布到 LB 平板上制备菌平板;将平板 4 等分,在每一部分贴上直径为 6 mm 的无菌滤纸片。将贮存的 100 mg/mL 发酵产物用灭菌的 DMSO 分别稀释至 60、40、20、10 mg/mL 4 个浓度梯度,选择 0.22 μm 针头过滤器除菌后,分别取 10 μL 滴加至上述无菌滤纸片上,同时以滴加 DMSO 到滤纸片为对照,于 37 ℃ 倒置培养 12 h 左右,重复 3 次,观察结果。测定抑菌圈的大小,取均值,拍照并记录。

### 1.2.7 内生菌发酵产物 LC-MS 检测

采用色谱条件:色谱柱 Waters BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流速 0.3 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 1 μL;流动相甲醇(A) 和 0.1% 甲酸水溶液(B);梯度洗脱条件:0~1 min, 5% B;1~10 min, 5% → 90% B;10~15 min, 90% B。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正负离子扫描模式;扫描范围 m/z 50~1 500;毛细管电压 3 kV;锥孔电压 40 V;离子源温度 120 ℃;干燥气温度 550 ℃;干燥气流量 900 L/h。

将按照“1.2.5”所制备的内生菌发酵产物过 0.22 μm 微孔滤膜,待 LC-MS。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生菌鉴定结果

#### 2.1.1 形态学鉴定

经分离纯化所获得内生菌菌株在 LB 培养基上生长情况(见图 1)。可见,该菌株在 LB 培养基上形成的单菌落,均为圆形,菌落较大,表面粗糙隆起,不透明,中间有凹槽,边缘不光滑,呈辐射状。经革兰氏染色呈紫色,疑似革兰氏阳性菌,在油镜下可见部分细菌具有明显芽孢结构。经扫描电镜观察(见图 2),可见该菌体呈杆状、圆端,菌体大小为 1.5~1.9 μm × 0.5~0.6 μm。



图1 菌株 HJ-3 纯化培养情况

Fig. 1 Purification and culture of strain HJ-3

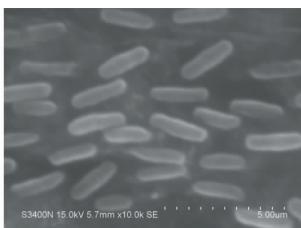


图2 内生菌株 HJ-3 扫描电镜图

Fig. 2 Scanning electron microscopy of endophytic strain HJ-3

### 2.1.2 分子鉴定

用 16S rRNA 通用引物对所获得的内生菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳结果(见图 3), 可见获得与预期相符的约 1 500 bp 目的片段, 将 PCR 扩增产物经纯化后送至生物公司测序后, 所获得序列进入 NCBI 数据库进行 BLAST 同源性比对, 利用 ClustalX 和 MEGA 软件分析并绘制进化树(见图 4), 结果表明: 该内生菌菌株与贝莱斯芽孢杆菌 16S rDNA 序列相似度最高, 在发育进化树上与贝莱斯芽孢杆菌聚为一簇。因此将该内生菌菌株鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), 该菌株命名为 HJ-3。

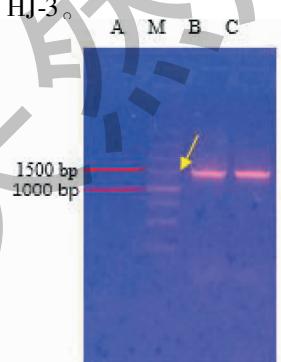


图3 16S rRNA 通用引物 PCR 扩增产物电泳结果图

Fig. 3 Electrophoresis results of PCR amplification products with 16S rRNA universal primers

注: M: DNA Mark; A: 阴性对照; B: 菌株 HJ-3; C: 阳性对照。Note: M: DNA Mark; A: Negative control; B: Strain of HJ-3; C: Positive control.

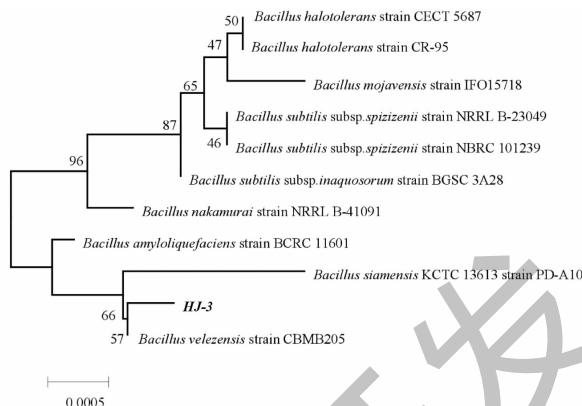


图4 菌株 HJ-3 的 16S rRNA 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of 16S rRNA of strain HJ-3

### 2.2 内生菌株 HJ-3 对病原真菌的拮抗活性

采用五点对峙培养法, 测定内生菌株 HJ-3 对 8 种常见的植物病原真菌的对峙作用(见图 5), 结果表明, 菌株 HJ-3 对盘长孢状刺盘孢、番茄尖镰孢菌、尖孢镰刀菌、核盘菌、禾生腐霉、新月弯孢、禾谷镰刀菌及立枯丝核菌 8 种病原真菌均表现出较为明显的抑制作用, 通过计算抑制率分析绘图(见图 6), 可见在这 8 种病原真菌中, 菌株 HJ-3 对立枯丝核菌的对峙作用非常明显, 抑制率高达 81.90%; 新月弯孢、禾生腐霉、尖孢镰刀菌、禾谷镰刀菌、核盘菌和番茄尖镰孢菌这六种病原真菌抑制率分别为 78.74%、73.87%、73.87%、72.16%、71.37% 和 70.37%, 抑制率均超过 70%, 对峙作用明显; 而盘长孢状刺盘孢抑制率为 64.02%, 在这 8 种病原真菌中抑制率最低。

### 2.3 内生菌发酵产物对供试细菌的抑菌活性

采用滤纸片扩散法检测内生菌 HJ-3 不同浓度的发酵产物对 4 种供试细菌的抑菌活性。从图 7 可见, 内生菌发酵产物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、苏云金芽孢杆菌以及枯草芽孢杆菌 4 种供试菌均有抑菌作用。从图 8 结果可知, 不同浓度发酵产物作用于金黄色葡萄球时, 发酵产物浓度为 40 mg/mL 时抑菌效果最明显, 抑菌圈直径达 16 mm 左右; 当浓度为 10 mg/mL, 抑菌圈直径 11 mm 左右, 差异最显著。不同浓度发酵产物作用于苏云金芽孢杆菌时, 发酵产物浓度为 60 mg/mL 时抑菌效果最明显, 抑菌圈直径达 13 mm 左右。而不同浓度发酵产物作用于大肠杆菌和枯草芽孢杆菌时, 抑菌效果基本相似, 随着浓度升高, 抑菌作用增强。从图 8 明显可以看出, 发酵产物浓度不同, 对各种供试菌的抑菌效

果不同。四种供试菌中,内生菌 HJ-3 的发酵产物对金

黄色葡萄球菌的抑菌效果要高于其他的三种供试菌。

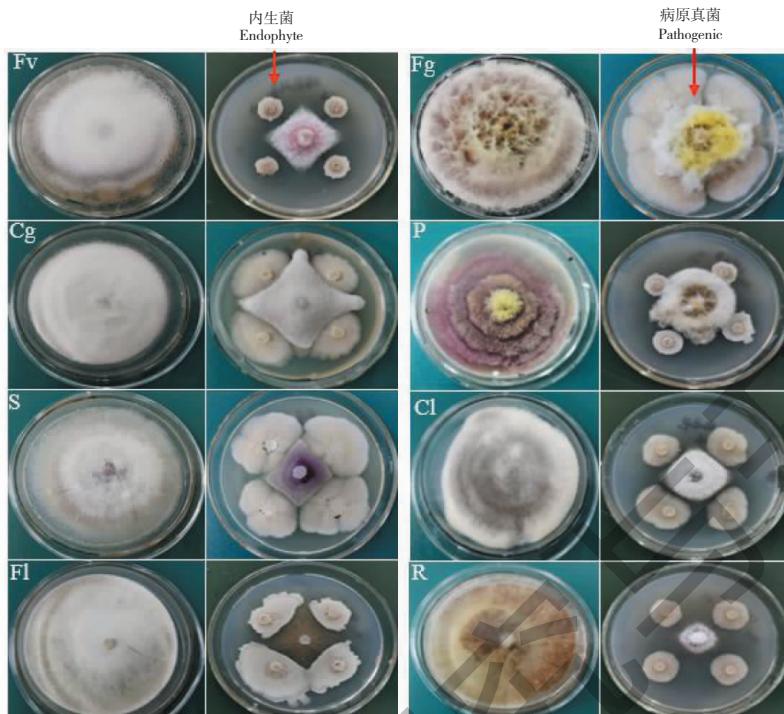


图 5 内生菌株 HJ-3 对 8 种病原真菌的拮抗效果

Fig. 5 Antagonistic effect of endophytic strain HJ-3 on eight pathogenic fungi

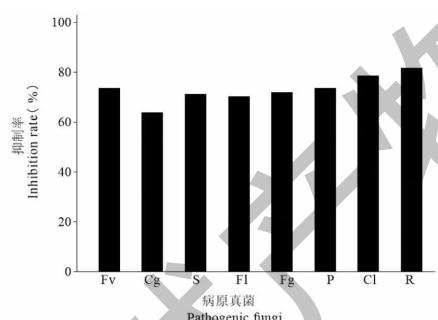


图 6 内生菌株 HJ-3 对 8 种病原真菌的抑制率

Fig. 6 Inhibition rate of endophytic strain HJ-3 against eight pathogenic fungi

#### 2.4 内生菌发酵产物 LC-MS 检测分析

取发酵液进 LC-MS 分析,正负模式总离子流见图 9,同培养液对比,发酵液中检出了多种组分,其中 1 号信号峰  $m/z$  为 339. 232 6 [M-H]<sup>-</sup>,经仪器软件自带插件 Element composition 计算其元素组成为  $C_{23}H_{32}O_2$ ,对该物质做二级质谱,采集信号如图 10 所示,该化合物产生特征碎片  $m/z$  163. 112 1 为 [M-H-C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O]<sup>-</sup>,从 Chemspider 及文献<sup>[17]</sup>中查阅到该组分的分子式结构。由 Chemdraw 画出该物质结构式经质谱仪器软件自带插件 Massfragment 识别出该物质碎裂过程,该物质可能从中间断裂,脱落形成

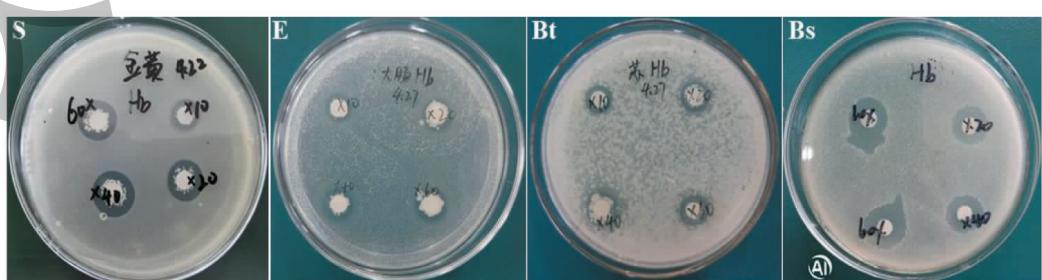


图 7 内生菌株 HJ-3 发酵产物对不同供试菌的抑菌效果

Fig. 7 Antibacterial effects of fermentation products of endophytic strain HJ-3 on different tested bacteria

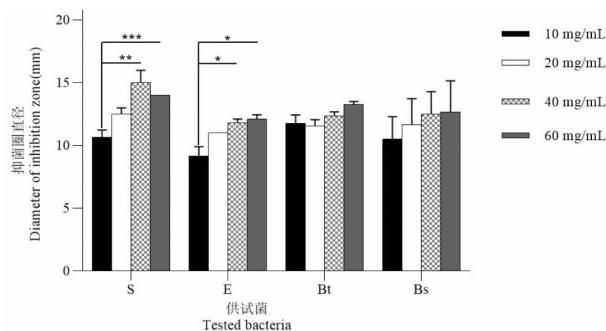


图8 内生菌株 HJ-3 发酵产物对不同供试菌的抑菌圈直径

Fig. 8 Diameters of inhibitory zone of fermentation products of endophytic strain HJ-3 against different tested bacteria

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

$m/z$  163.112 1 碎片。与吴盼关于桦褐孔菌发酵液研究的文献<sup>[14]</sup>报道的化合物相吻合,确定化合物为 5,5'-methylenebis(2-tert-butyl-4-methylphenol),是一种酚类物质,裂解示意图见图 10。经文献<sup>[18]</sup>可知,桦褐孔菌发酵液在抗菌、抗肿瘤、抗氧化等方面具有生物活性功效。同时经正负模式及其加氢/脱氢和加钠比较分析,发现 2 号峰  $m/z$  1 006.633 7 [M-H]<sup>-</sup>、3 号峰  $m/z$  1 020.652 3 [M-H]<sup>-</sup>、4 号峰  $m/z$  1 034.674 1 [M-H]<sup>-</sup> 分别相差-CH<sub>2</sub>,应为同系物,经仪器原件自带插件推算分子式分别为 C<sub>55</sub>H<sub>93</sub>NO<sub>15</sub>、C<sub>56</sub>H<sub>95</sub>NO<sub>15</sub>、C<sub>57</sub>H<sub>97</sub>NO<sub>15</sub>。分析这些化合物,发现都具有特征性的离子碎片  $m/z$  678.475 3 [M-H]<sup>-</sup>、 $m/z$  452.285 2 [M-H]<sup>-</sup>、 $m/z$  339.202 3 [M-H]<sup>-</sup>,进一步说明 2,3,4 号化合物含有共同的基团,可能是同系列化合物,至于何种化合物有待下一步解析。

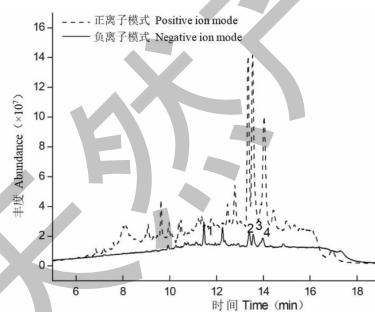


图9 正负离子模式下发酵液总离子流图

Fig. 9 Total ion flow diagram of zymotic fluid in positive and negative ion mode

### 3 讨论与结论

内生菌在与宿主共生的过程中会产生许多具有药用价值的生物活性物质,在抗癌、抗菌、抗氧化等人类疾病防治以及农业病虫害防治领域具有潜在的价值。国内外针对内生菌相关的研究报道很多,比

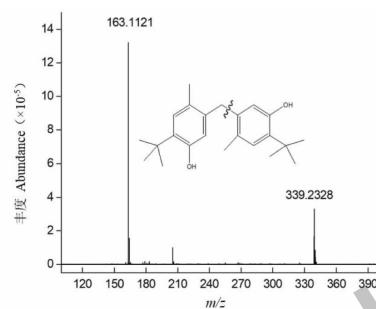


图10 化合物 C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> 化学结构图和 MS 图谱

Fig. 10 Chemical structure and MS spectra of compound C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>

如 Halim 等<sup>[19]</sup>从水稻田的根叶中分离出 BCA 3 和 BCA 12 两种内生菌,研究发现其对细菌性叶枯病 (BLB) 具有积极的拮抗活性;灰葡萄孢是最重要的收获后真菌病原体之一,Chao 等<sup>[20]</sup>从不同植物中筛选出内生细菌,发现对番茄中的灰葡萄孢具有生防作用;本课题获得的内生菌 HJ-3 研究发现对植物病原真菌具有拮抗作用,而且表现出广谱的拮抗活性。Zhang 等<sup>[21]</sup>从小麦小穗中分离出一株具有广谱拮抗细菌 XS-2,发现对小麦赤霉病 (FHB) 的病原体禾谷镰刀菌、棉花病原立枯丝核菌等 6 种植物病原体具有抑制作用,抑菌圈在 10 ~ 29.58 mm 之间,使其成为宝贵的生物资源,用于开发生物防治剂。本课题所获得的内生菌 HJ-3 对立枯丝核菌、禾谷镰刀菌等植物病原真菌具有同样抑制效果,所不同的是该内生菌不是从农作物分离,而是从药用植物黄精分离。科学家研究表明,从植物尤其是一些药用植物分离内生菌,可以抑制病原细菌、病原真菌生长,原因可能是内生菌与药用植物共生过程中会产生代谢产物,这些代谢产物对病虫害或病原菌产生抑制作用<sup>[22]</sup>。Bai 等<sup>[12,13]</sup>从药用植物黄精中分离出内生菌株 HJ-1 和 HJ-2,发现其发酵产物对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌等病原细菌具有很好的抑制作用,本研究从药用植物黄精分离内生菌 HJ-3,也表现出对常见病原菌广泛的抑菌作用,但本研究重点探讨了内生菌对植物病原真菌的拮抗作用,进而丰富了黄精内生菌潜在应用价值。已有资料表明,从药用植物筛选内生菌用于生产具有药用价值的生物活性化合物,特别是从濒临灭绝的宿主植物内生菌中生产有用的生物活性化合物,成为新药开发生物活性化合物的重要来源之一。

该课题是从安徽道地药材黄精内筛选到一株内生菌株 HJ-3,经形态初步鉴定以及 16S rRNA 分子

生物学方法测序,将该菌株鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。贝莱斯芽孢杆菌因其具有广谱的抗菌活性、促进植物生长的作用以及具有作为生物表面活性剂的潜力被广泛应用到工农业和环境保护领域,还可以作为饲用微生物菌剂,同时有望在医疗保健方面发挥更重要的作用。但同种不同株 *B. velezensis* 在功能上存在着差异,因此还需要进一步发掘自然界中 *B. velezensis* 的新菌株资源,以开发利用新功能菌株。Chi 等<sup>[23]</sup>也从多花黄精内分离到贝莱斯芽孢杆菌株 ZJU-3,研究了内生菌及其代谢产物对尖孢镰刀菌拮抗活性。本研究所分离的 *B. velezensis* 菌株 HJ-3 对植物病原真菌除了尖孢镰刀菌外,还有盘长孢状刺盘孢、番茄尖镰孢菌、核盘菌、禾生腐霉、新月弯孢、禾谷镰刀菌及立枯丝核菌均有抑制作用,尤其是对立枯丝核菌具有非常明显抑制作用,其次是新月弯孢、禾生腐霉、尖孢镰刀菌、禾谷镰刀菌、核盘菌和番茄尖镰孢菌。由此可见,本研究所获得的黄精内生菌 HJ-3 对常见植物病原真菌具有广谱的拮抗活性,其研究结果对农业病虫害生物防治具有一定指导意义。此外研究发现,内生菌株 HJ-3 的发酵产物对常见细菌表现出广泛抑菌效果,尤其是对金黄色葡萄球菌,抑菌作用最为明显,其中金黄色葡萄球菌是临床常见的病原菌,其抗生素耐药现象非常常见。因此,寻找有效的抗菌药物,尤其是从天然产物中寻找新型的抗菌药物对于细菌性疫病的防治具有非常重要的意义,也是解决细菌耐药性问题的方法之一。

经以上研究表明,从中药黄精中筛选到的 HJ-3 内生菌株对多种植物病原真菌具有明显的拮抗效果,其发酵产物能抑制大肠杆菌等常见细菌的生长。通过 UPLC-MS/MS,从内生菌发酵产物中检测到 5,5'-methylenebis(2-tert-butyl-4-methylphenol) 酚类化合物,同时获得三个同系列化合物。本研究获得数据将为进一步挖掘黄精内生菌发酵产物中的活性成分奠定基础,也为植物内生菌药物广泛应用提供依据。

## 参考文献

- Gotor VA, Teixido N, Casals C, et al. Biological control of brown rot in stone fruit using *Bacillus amyloliquefaciens* CPA8 under field conditions [J]. Crop Prot, 2017, 102: 72-80.
- Vega FE. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review [J]. Mycologia, 2018, 110(1): 4-30.
- Guo WX, Ju F, Shen YR. Study on metabolites of *Pseudeurotium ovale* isolated from *Ligusticum chuanxiong* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34: 239-244.
- Xie J, Wu YY, Zhang TY, et al. New and bioactive natural products from an endophyte of *Panax notoginseng* [J]. RSC Adv, 2017, 7: 38100-38109.
- Keshri PK, Rai N, Verma A, et al. Biological potential of bioactive metabolites derived from fungal endophytes associated with medicinal plants [J]. Mycol Progress, 2021, 20: 577-594.
- Gupta S, et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi [J]. Biotechnol Adv, 2020, 39: 107462.
- Bos A, Li H, Jean S, et al. Anticancer natural products from traditionally used Canadian medicinal plants [J]. Planta Med, 2016, 81(S01): S1-S381.
- Seo WT, Lim WJ, Kim EJ, et al. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens [J]. J Korean Soc Appl Biol Chem, 2010, 53: 493-503.
- Li L, Thakur K, Liao BY, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtonema* Hua [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 114: 317-323.
- Li YL, Wang DC, Shi RJ, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from *Polygonatum sibiricum* in Mountain Tai and study on their antimicrobial activity [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2013, 44: 1490-1494.
- Wang Y, Wang GP, Wang LW, et al. Isolation and identification of an endophytic fungus of *Polygonatum cyrtonema* and its antifungal metabolites [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2010, 50: 1036-1043.
- Bai XH, Liu XL, Liu D, et al. Isolation and identification of an endophytic bacterium from *Polygonatum cyrtonema* and its antibacterial activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 777-782.
- Zhai DC, Fang Z, Lv CY, et al. Study on the antibacterial activity of *Bacillus subtilis* HJ-2, an endophytic bacterium from semen flavescentis [J]. J Agr Biotechnol (农业生物技术学报), 2019, 27(9): 148-156.
- Schulz B, Wanke U, Draeger S, et al. Endophytes from herbaceous plants and shrubs; effectiveness of surface sterilization methods [J]. Mycol Res, 1993, 97: 1447-1450.
- He FL, Chen XM, Zhang R, et al. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo bi-*

- loba* Linn[J]. *Nat Prod Res Dev( 天然产物研究与开发 )*, 2017, 29:1141-1147.
- 16 Wang XH, Hui-Ping LI, Huang DZ, et al. Isolation of endophytic fungi from *Populus tomentosa* and screening of antagonistic bacteria[J]. *Hebei J Forestry Orchard Res( 河北林果研究 )*, 2007, 22:343-347.
- 17 Wu P. Isolation of substances with anti-enzyme activity produced by *Inonotus obliquus* in liquid fermentation and study on its antioxidant activity[D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University( 浙江理工大学 ), 2019.
- 18 Zou L, Tan Y, Yang MB, et al. C-inhibitory activity of the fermentation products of *Inonotus obliquus*[J]. *J Northeast Forestry Univ( 东北林业大学学报 )*, 2012, 40(11):123-126.
- 19 Halim RA, Hasan A, Ramachandran K. Screening of endophytic bacteria as biocontrol agents against bact-eria leaf blight (*Xanthomonas oryzae*) [J]. *HAYATI J Biosci*, 2021, 27:215-220.
- 20 Chao MA, Zhu H, Huang T, et al. Screening and identification of endophytic antagonistic bacteria to *Botrytis cinerea* in tomato[J]. *J Shanxi Agr Sci( 山西农业科学学报 )*, 2018, 46: 427-440.
- 21 Zhang P, Zhu Y, Ma D, et al. Screening, identification, and optimization of fermentation conditions of an antagonistic endophyte to wheat head blight[J]. *Agronomy*, 2019, 9(9): 476.
- 22 Faheem M, Raza W, Zhong W, et al. Evaluation of the bio-control potential of *Streptomyces goshikensis* YCXU against *Fusarium arys porn f. sp. niveum*[J]. *Biol Control*, 2015, 81(10):101-110.
- 23 Chi HR, Zhang YH, Zeng X. Isolation and identification of endophytic *Bacillus velez* from *Polygonatum cyrtonema* and analysis of its antibacterial and growth-promoting effects[J]. *Plant Prot( 植物保护 )*, 2019, 45(4):122-131.

## 《天然产物研究与开发》青年编委会

### 青年编委(以姓氏笔划为序)

#### Members

王红兵 WANG Hongbing	戈惠明 GE Huiming	尹文兵 YIN Wenbing	尹胜 YIN Sheng	吕兆林 LYU Zhaolin	刘相国 LIU Xiangguo
孙昊鹏 SUN Haopeng	孙桂波 SUN Guibao	李良成 LI Liangcheng	李国友 LI Guoyou	邱莉 QIU Li	汪海波 WANG Haibo
沐万孟 MU Wanmeng	张炳火 ZHANG Binghuo	张德武 ZHANG Dewu	陈益华 CHEN Yihua	林昌俊 LIN Changjun	欧阳杰 OUYANG Jie
易华西 YI Huaxi	罗应刚 LUO Yinggang	周文 ZHOU Wen	胡友财 HU Youcai	袁涛 YUAN Tao	夏永刚 XIA Yonggang
高慧敏 GAO Huimin	唐金山 TANG Jinshan	黄胜雄 HUANG Shengxiong	韩秀珍 HAN Xiuzhen	韩淑燕 HAN Shuyan	曾克武 ZENG Kewu
蓝蔚青 LAN Weiqing	廖晨钟 LIAO Chenzhong	薛永波 XUE Yongbo			