

肇庆鱼藤内生真菌的分离及生物活性研究

黄献培, 罗建军, 胡美英, 梁颖仪, 叶欣欣, 钟国华

(华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:从肇庆鱼藤 *Derris hancei* 分离获得内生真菌 10 属 16 株, 体外拮抗作用测定表明, 鱼藤茎内生菌株 *Penicillium* sp. Q1、*Rhizoctonia* sp. S1、*Phomopsis* sp. N2、*Corticium* sp. F1 和叶内生菌株 *Penicillium* sp. Q2 对芒果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. *niveum* *Rhizoctonia* sp. S1 对黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* 以及 *Phomopsis* sp. N2 对香蕉炭疽病菌 *Colletotrichum musae* 的对峙培养拮抗系数均达到 II 级, 且证实鱼藤内生真菌可产生抑菌活性物质。浸叶法测定表明, 叶内生菌 *Penicillium* sp. Q2 菌株发酵液活性最强, 处理后 48 h, 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 2 龄幼虫和萝卜蚜 *Lipaphis erysimi* 无翅成蚜校正死亡率分别为 100.00% 和 75.10%, 活性高于其他分离筛选所获菌株。

关键词:肇庆鱼藤; 内生真菌; 分离; 生物活性

中图分类号: Q93; S482.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)02-0044-04

Isolation and Bioactivity of Endophytic Fungi in *Derris hancei*

HUANG Xian-pei, LUO Jian-jun, HU Mei-ying, LIANG Ying-yi, YE Xin-xin, ZHONG Guo-hua

(Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Sixteen endophytic fungi belonging 10 genus were isolated from *Derris hancei* Hemsl. The antagonism of endophytic fungi against fungal pathogens was tested *in vitro*. *Penicillium* sp. Q1, *Rhizoctonia* sp. S1, *Phomopsis* sp. N2, and *Corticium* sp. F1 isolated from the caudex of *D. hancei*, and *Penicillium* sp. Q2 isolated from the leaf, inhibited the hyphal growth of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, *Fusarium oxysporum* f. *niveum* (E. F. Smith) Snyder et Hansen, *Rhizoctonia* sp. S1 against *Colletotrichum orbiculare* Arx, and *Phomopsis* sp. N2 against *Colletotrichum musae* (Berk1 & Curt1) Arx1 on dual culture with inhibition index II. It was reported that endophytic fungus in *D. hancei* could produced antibacterial substances in this paper. The culture filtrates of *Penicillium* sp. Q2 treated in 48 h after treatment possessed 100.00% of adjusted mortality against the 2nd larvae of *Spodoptera litura* by leaves disc feeding bioassays, and 75.10% against *Lipaphis erysimi* Kalténbach (apterous adult) by insect-soaking method, respectively, which showed that the activity of *Penicillium* sp. Q2 was higher than that of other endophytic fungi.

Key words: *Derris hancei*; endophytic fungus; isolated; bioactivity

内生真菌 (Endophytic fungus) 是一大类未被充分认识的真菌, 泛指生活在健康植物体内不引起任何可见病害症状的所有真菌^[1]。现代共生理论认为, 植物与内生真菌在长期的协同进化过程中, 生物化学途径的连续演化会导致信息物质在内生真菌产生与宿主植物相同或相似的活性物质^[2]。内生真菌

普遍存在于植物之中, 几乎每种植物都有内生菌的存在, 种类繁多, 其代谢产物生物活性类型多, 是丰富的化合物宝库, 开发这种宝贵资源, 潜力巨大。鱼藤是传统的高效杀虫植物, 主要活性成分鱼藤酮对多种昆虫具有较高的活性, 非常适合于现代农产品安全生产的要求。但是, 鱼藤酮的提取主要是从鱼

收稿日期: 2008-09-02

作者简介: 黄献培 (1983—), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 钟国华 (1973—), 男, 副教授, 博士, E-mail: guohuazhong@scau.edu.cn

基金项目: 教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金 (2004061)

藤植物根中提取,尤其是现在土地资源紧张,鱼藤资源极其缺乏,已经远不能满足鱼藤农药的商品生产,资源问题已成为稳定发展鱼藤生物农药的“瓶颈”问题。基于植物内生真菌能产生与其宿主相同或相似的活性成分这一观点,鱼藤内生真菌亦可能产生具抑菌、杀虫活性的活性次生代谢产物。对鱼藤内生真菌及其代谢产物杀虫活性已有研究报道^[34],但其代谢产物的抑菌活性鲜见报道。本文分离筛选了鱼藤内生真菌活性菌株,初步测定了其抑菌和杀虫活性,以期寻找鱼藤酮或其类似物的新型可靠来源提供探索和理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和昆虫

供试鱼藤内生真菌分别从肇庆鱼藤 *Derris hancei* Hemsl 茎和叶中分离得到,植物样品于2007年9月采自华南农业大学杀虫植物标本园。

供试植物病原真菌包括芒果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., 西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. *niveum* (E. F. Smith) Snyder et Hansen, 香蕉炭疽菌病 *Colletotrichum musae* (Berk1 & Curt1) Arx1 和黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* Arx., 菌种均由华南农业大学植物病理系提供。

供试昆虫斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Fab., 从中山大学昆虫研究所购回虫蛹,化蛹后产卵孵化,幼虫用饲料喂养,取2龄幼虫供试;萝卜蚜 *Lipaphis erysimi* Kaltenbach, 从华南农业大学试验农场采回蚜虫后,挑选生长良好、大小一致的无翅成虫直接供试。

1.2 内生真菌的分离、纯化和培养

内生真菌的分离参考文献[5]方法进行。所用培养基为马铃薯葡萄糖培养基(PDA)或PDA+链霉素。采集新鲜肇庆鱼藤,分开根、茎和叶不同器官进行表面消毒。首先用自来水冲洗干净植物表面灰尘,然后在无菌条件下用 ϕ 为75%乙醇漂洗3 min,用无菌水冲洗4次,再置于次氯酸钠溶液(有效氯体积分数为10%)漂洗1 min,最后用无菌水冲洗4次,将最后一次洗涤用的无菌水涂抹于平板上作为对照,用于检验表面消毒是否彻底。如对照平板2~5 d后有菌落生成,表明表面消毒不彻底,弃之。在无菌条件下,将上述处理过的材料剪切成0.3~0.5 cm 长的短条或0.5 cm × 0.5 cm 的小片(剪去0.5 cm 的边缘),并移植于含链霉素的PDA培养基平板上,3块/皿,每种器官3次重复,于(26±1)℃黑暗条件下培养2~10 d,待植物样品边缘长出菌丝体后,根据菌丝体的形态特点(包括菌丝体的颜色、形状和质

地等),采用尖端菌丝体挑取法对不同菌株进行分离纯化,保存备用。

1.3 抑菌活性测定

内生真菌对病原真菌的体外拮抗作用采用两点对峙培养法测定,拮抗系数分级标准参照文献[6]方法分5级:I级为内生真菌占据平皿100%,II级为内生真菌占据平皿>2/3,III级为内生真菌占据平皿1/3~2/3;IV级为内生真菌占据平皿<1/3;V级为病原菌(指示菌)占据平皿100%。测定时,将分离得到的内生真菌活化后,以灭菌打孔器($d=6$ mm)切取培养5 d,同质等量的内生真菌和植物病原真菌的菌丝块接种于PDA平板上距中心2 cm处同一直线的两点,同时设接种病原菌为对照(CK)。每处理3个重复,于26℃恒温连续培养6~8 d,连续观察菌落生长和相互影响情况,分别测量内生真菌和病原真菌的菌落直径^[7-8]。

1.4 杀虫活性测定

培养液滤液制备。将1.2所获得的内生真菌菌株分别接种于100 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基中,25℃、150 r/min 摇床下恒温培养6~8 d,得到培养液。将上述培养液在3 000 r/min 条件下离心去菌体,上清液经孔径0.2 μ m 的滤膜过滤得培养液滤液。

对斜纹夜蛾幼虫的毒杀活性测定采用叶片浸渍法。选取洁净的菜心叶片,在供试内生真菌菌株的培养液滤液(每10 mL 滤液加入5滴乳化剂吐温1601)中浸泡30 s后取出,自然晾干,将足量该菜心叶片置于垫有保湿滤纸的9 cm 培养皿中,每皿放入斜纹夜蛾2龄幼虫10头,让试虫自由取食处理叶片。对照(CK)叶片以添加等量吐温1601的清水浸渍。每种菌液3个重复。处理24和48 h后检查试虫死亡率。

对萝卜蚜的毒杀活性测定采用浸虫法。挑取约30~50头无翅成蚜放在新鲜的白菜叶中,放置1~2 h稳定后,放入供试内生真菌菌株培养液滤液(每10 mL 滤液加入5滴乳化剂吐温1601)中浸3 s后取出,用滤纸吸除多余菌液,待干后置于垫有保湿滤纸的9 cm 培养皿,对照以添加了等量吐温1601的清水浸渍。每种菌液设3个重复。处理24和48 h后检查试虫死亡率。试虫死亡率=死亡虫数/供试虫数×100%,校正死亡率=(处理组死亡率-对照组死亡率)/(100-对照组死亡率)×100%。

2 结果与分析

2.1 肇庆鱼藤内生真菌的初步分离和归类

对肇庆鱼藤茎和叶的内生真菌进行了分离,合

并外观形态、显微镜检查完全相同的菌株,得到16株不同内生真菌,其中来自茎部和叶部的内生真菌分别有10和6株.采用经典形态学方法对其进行初步分类,确定分属于10属,其中:分离自茎部的内生真菌包括拟茎点霉属菌株 *Phomopsis* sp. N1、N2和N3,粘帚霉属菌株 *Gliocladium* sp. Nz1,青霉属菌株 *Penicillium* sp. Q1,丝核菌属菌株 *Rhizoctonia* sp. S1,根霉属菌株 *Rhizopus* sp. G1和G2,梨孢属菌株 *Pyricularia* sp. L1,伏革菌属菌株 *Corticium* sp. F1;分离自叶部的内生真菌包括拟茎点霉属菌株 *Phomopsis* sp. N4,青霉属菌株 *Penicillium* sp. Q2,炭疽菌属菌株 *Colletotrichum* sp. T1和T2,镰孢菌属菌株 *Fusarium* sp. Lb1和球座菌属菌株 *Guignardia* sp. Qz1.可见,叶部和茎部均分离的内生真菌包括拟茎点霉属菌株和青霉属菌株.

2.2 肇庆鱼藤内生真菌的抑菌活性

肇庆鱼藤内生真菌各菌株对4种供试植物病原真菌的拮抗作用结果见表1.两点对峙培养法测定结果表明,供试内生真菌均不能完全抑制病原菌的生长,分离自叶和茎的内生真菌的拮抗作用差别较大,不同采集部位的同属菌株的拮抗作用也有一定的差别,其中青霉属菌株 *Penicillium* sp. Q1和Q2、茎部的丝核菌属菌株 *Rhizoctonia* sp. S1、拟茎点霉属菌株 *Phomopsis* sp. N2、伏革菌属菌株 *Corticium* sp. F1对芒果炭疽病菌和西瓜枯萎病菌, *Rhizoctonia* sp. S1

表1 肇庆鱼藤内生真菌对4种病原真菌的拮抗作用

Tab. 1 Antagonistic effects of endophytic fungi in *Derris hancei* against 4 species of fungus

真菌菌株	分离部位	芒果炭疽病菌	西瓜枯萎病菌	香蕉炭疽病菌	黄瓜炭疽病菌
<i>Phomopsis</i> sp. N1	茎	II	II	III	III
<i>Phomopsis</i> sp. N2	茎	II	II	II	II
<i>Phomopsis</i> sp. N3	茎	II	II	III	IV
<i>Phomopsis</i> sp. N4	叶	II	III	II	III
<i>Gliocladium</i> sp. Nz1	茎	III	IV	IV	IV
<i>Rhizoctonia</i> sp. S1	茎	II	II	II	II
<i>Rhizopus</i> sp. G1	茎	III	III	III	III
<i>Rhizopus</i> sp. G2	茎	III	III	III	III
<i>Pyricularia</i> sp. L1	茎	II	III	III	II
<i>Corticium</i> sp. F1	茎	II	II	II	II
<i>Penicillium</i> sp. Q1	茎	II	II	II	III
<i>Penicillium</i> sp. Q2	叶	II	II	III	III
<i>Colletotrichum</i> sp. T1	叶	III	III	III	III
<i>Colletotrichum</i> sp. T2	叶	III	III	III	III
<i>Fusarium</i> sp. Lb1	叶	III	III	III	III
<i>Guignardia</i> sp. Qz1	叶	IV	IV	IV	IV

及 *Phomopsis* sp. N2对黄瓜炭疽病菌和香蕉炭疽病菌对峙培养时,内生真菌占据平皿的比例均达到或超过2/3,拮抗系数均为II级,初步判断这些内生真菌对上述病菌有较好的抑制作用,而采集于茎部的粘帚霉属菌株 *Gliocladium* sp. Nz1、根霉属菌株 *Rhizopus* sp. G1和G2,分离自叶部的炭疽菌属菌株 *Colletotrichum* sp. T1和T2、镰孢属菌株 *Fusarium* sp. Lb1、球座菌属真菌 *Guignardia* sp. Qz1对上述4种供试植物病原菌的拮抗系数均为III或IV级,拮抗作用不明显.

2.3 鱼藤内生真菌的杀虫活性

各供试内生菌株发酵液原液对斜纹夜蛾2龄幼虫和萝卜蚜无翅成蚜毒杀活性测定结果见表2.浸渍叶片饲喂法测定结果表明,从叶部分离的内生真菌菌株 *Penicillium* sp. Q2发酵液原液浸渍叶片饲喂斜纹夜蛾2龄幼虫24和48h后的校正死亡率分别为92.30%和100.00%,显著高于其他处理;茎部内生菌株 *Penicillium* sp. Q1发酵液原液浸渍叶片饲喂斜纹夜蛾2龄幼虫24和48h后的校正死亡率分别为73.08%和96.00%,仅次于同期处理的Q2菌株;此外,茎部内生菌株 *Phomopsis* sp. N1和N2、*Rhizopus*

表2 肇庆鱼藤内生真菌代谢产物杀虫活性¹⁾

Tab. 2 Insecticidal activities of secondary metabolites of endophytic fungi in *Derris hancei* n = 3

真菌菌株	分离部位	斜纹夜蛾2龄幼虫		萝卜蚜无翅成蚜	
		校正死亡率/%		校正死亡率/%	
		24 h	48 h	24 h	48 h
<i>Phomopsis</i> sp. N1	茎	57.69c	80.00c	26.49b	57.46b
<i>Phomopsis</i> sp. N2	茎	34.61ab	67.99bc	33.35c	75.10c
<i>Phomopsis</i> sp. N3	茎	34.61ab	48.00b	23.10b	43.54ab
<i>Phomopsis</i> sp. N4	叶	19.23a	55.99b	11.84a	37.46a
<i>Gliocladium</i> sp. Nz1	茎	26.93ab	72.00c	23.03a	58.26a
<i>Rhizoctonia</i> sp. S1	茎	42.31b	67.99bc	6.24a	35.86a
<i>Rhizopus</i> sp. G1	茎	19.23a	36.00a	29.95bc	35.86a
<i>Rhizopus</i> sp. G2	茎	42.31b	72.00c	21.53b	37.46a
<i>Pyricularia</i> sp. L1	茎	7.70a	72.00c	23.10b	52.96b
<i>Corticium</i> sp. F1	茎	23.08ab	36.00a	21.53b	58.86b
<i>Penicillium</i> sp. Q1	茎	73.08d	96.00d	29.95bc	75.10c
<i>Penicillium</i> sp. Q2	叶	92.30e	100.00d	33.35c	75.81c
<i>Colletotrichum</i> sp. T1	叶	19.23ab	48.00ab	11.84a	37.46a
<i>Colletotrichum</i> sp. T2	叶	23.08ab	48.00ab	26.49b	37.46a
<i>Fusarium</i> sp. Lb1	叶	15.39a	48.00ab	21.53b	56.28b
<i>Guignardia</i> sp. Qz1	叶	34.61ab	55.99b	24.37b	43.54ab
CK ²⁾		13.33	16.67	11.34	15.46

1) 同列数据后标有相同字母者表示在5%水平差异不显著(DMRT法); 2) CK数据为处理后24或48h的试虫死亡率/%

sp. G2 和叶部内生菌株 *Rhizoctonia* sp. S1、*Guignardia* sp. Qz1 发酵液对斜纹夜蛾 2 龄幼虫的毒杀活性亦较高,处理后 24 h 的校正死亡率均可达到 35% ~ 58%,处理后 48 h 的校正死亡率为 56% ~ 80% (对照 24 和 48 h 的死亡率分别为 13.33% 和 16.67%),其余处理效果较差.浸虫法测定结果表明,各菌株发酵液处理后 24 h,萝卜蚜无翅成虫的校正死亡率均不超过 35%,处理后 48 h 校正死亡率达到 55% ~ 75% 的菌株包括茎部内生菌株 *Phomopsis* sp. N1 和 N2、*Gliocladium* sp. Nz1、*Corticium* sp. F1、*Penicillium* sp. Q1 和 *Fusarium* sp. Lb1,以及叶部内生菌株 *Penicillium* sp. Q2 (对照 24 和 48 h 后的试虫死亡率分别为 11.34% 和 15.46%). 这些结果表明内生菌株 *Penicillium* sp. Q1 和 Q2、*Phomopsis* sp. N1 和 N2 杀虫活性较高.

3 讨论

自 Strobel 等^[9]首次从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 韧皮部中分离出能产生紫杉醇(Taxol)的内生真菌安德氏紫杉霉 *Taxomyces andreanae* 后,从植物内生真菌中寻找和发现新的活性化合物成为研究新热点,目前已发现多种植物内生真菌及其代谢产物具有抑菌及杀虫等生物活性,如:从锡兰肉桂 *Cinnamomum zeylanicum* 内生真菌 *Muscodor albus* 中得到 5 种挥发性化合物,均具有不同程度的对细菌和真菌抑制作用,如将此 5 种化合物混合使用,可增强其抑菌效果^[10];药用植物络石 *Trachelospermum jasminoides* 内生真菌代谢物抗菌活性较强^[11];从雪上一枝蒿 *Aconitum brachypodum*、刺五加 *Acanthopanax senticosys* 和大血藤 *Sargentodoxa cuneata* 中分离到 162 株内生真菌,其中具有抗菌活性的菌株有 74 株^[12];从冷杉 *Abies fabri* 内生真菌叶点霉 *Phyllosticta* sp. 发酵产物中分离获得萜烯七酯酸(Heptelidic acid)和细皱青霉素(Rugulosine)2 种化合物,前者每头用量 0.2 μ mol 对云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* 的致死率可达 92%^[13];从植物 *Bontial daphnoides* 内生真菌中发现一种吡啶二萜类化合物具有杀灭大苍蝇幼虫的活性^[14]. 所以,植物内生真菌是一类潜力巨大、值得开发的微生物新资源,随着研究的不断深入,用植物内生真菌生产新型农用活性物质,寻找新型活性物质的骨架,将成为新型农药研发的重要途径.

本文采用两点对峙培养法测定出从肇庆鱼藤中分离获得的内生真菌对西瓜枯萎病菌、芒果炭疽病菌、黄瓜炭疽病菌和香蕉炭疽病菌具有较好的拮抗抑制作用,试验结果证实鱼藤内生真菌可产生抑菌活性物质,同时进一步实验证实这些内生真菌培养滤液对斜

纹夜蛾和萝卜蚜等均具有一定的毒杀效果.这说明本文分离所得的肇庆鱼藤内生真菌(或其菌株)不同于以前报道的菌株,能够产生抑菌和杀虫活性物质,推测这种或这些活性物质不同于鱼藤酮类化合物,具体活性物质及活性机制有待深入研究.

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] 邵爱娟,林淑芳,张思巨,等.一种能产生紫杉醇类化合物内生真菌的分离[J]. *中国医学科学院学报*, 2001, 23(6): 642-644.
- [3] HU Mei-ying, ZHONG Guo-hua, SUN Zhi-tan, et al. Insecticidal activities of secondary metabolites of endophytic *Penicillium* sp. in *Derris elliptica* Benth [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2005, 129(8): 413-417.
- [4] HU Mei-ying, ZHONG Guo-hua, SUN Zhi-tan, et al. Insecticidal metabolites produced by *Penicillium* spp., an endophytic fungus in *Derris elliptica* Benth [J]. *Allelopathy Journal*, 2008, 21 (2): 349-360.
- [5] 王利娟,贺新生.植物内生真菌分离培养的研究方法[J]. *微生物学杂志*, 2006, 26(4): 55-60.
- [6] BELL D K, WELLS H D, MARKHAM C R. *In vitro* antagonism of trichoderma species against six fungal plant pathogens [J]. *Phytopathology*, 1982, 72(4): 379-382.
- [7] 袁秀英,白红霞,白玉明,等.杨树内生真菌的分离和拮抗生防菌的筛选[J]. *林业科学研究*, 2006, 19(6): 713-717.
- [8] 凌霞.海洋植物内生菌 A44 发酵培养及抗菌活性的研究[D].南京:南京工业大学制药与生命科学学院, 2004.
- [9] STROBEL G, STIERLE A, STIERLE D. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbiliferous hyphomycete associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. *Mycotaxon*, 1993, 47: 71-80.
- [10] STROBEL G A, DIRKSE E, SEARS J, et al.. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus [J]. *Microbiology*, 2001, 147(11): 294-300.
- [11] 黄午阳.植物内生真菌的抗菌活性研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2005, 21(1): 24-26.
- [12] 李治滢,李绍兰,周斌,等.三种药用植物内生真菌抗真菌活性的研究[J]. *微生物学杂志*, 2004, 24(6): 35-37.
- [13] LARRY A C, JOHN A F, NOAMN J W, et al. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes [J]. *Mycol Res*, 1992, 96(4): 281-286.
- [14] STROBEL G, DAISY B, CASTILLO U, et al.. Natural products from endophytic microorganisms [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(2): 257-268.

【责任编辑 李晓卉】