

单体江, 秦楷, 谢银燕, 等. 木麻黄内生真菌次生代谢产物及生物活性 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(3): 67-74.
SHAN Tijiang, QIN Kai, XIE Yinyan, et al. Secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *Casuarina equisetifolia* and their bioactivities[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(3): 67-74.

木麻黄内生真菌次生代谢产物及生物活性

单体江[†], 秦楷[†], 谢银燕, 张伟豪, 毛子翎, 王军

(华南农业大学 林学与风景园林学院/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广东 广州, 510642)

摘要:【目的】分离和鉴定木麻黄 *Casuarina equisetifolia* 枝条和果实中的内生真菌, 筛选具有抗菌和抗氧化活性的内生真菌。【方法】采用组织块分离法分离木麻黄枝条和果实中的内生真菌, 通过菌落观察和分子生物学相结合的方法对分离到的内生真菌进行鉴定; 采用薄层层析-生物自显影法测定木麻黄内生真菌次生代谢产物对细菌的抑制活性, 采用多孔板-DPPH 显色法测定抗氧化活性。【结果】从木麻黄枝条和果实中共分离鉴定得到 12 株内生真菌, 枝条和果实内生真菌存在明显的差异, 相同的菌株只有 2 株, 分别为 Cef-1(*Pseudofusicoccum* sp.) 和 Cef-7(*Pestalotiopsis* sp.); 12 株内生真菌分属于 9 个不同的属中, 分别为 *Pseudofusicoccum*、葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*、拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、木霉属 *Trichoderma*、曲霉属 *Aspergillus*、裂菌属 *Rhytidhysterium*、拟茎点霉属 *Phomopsis*、镰刀菌属 *Fusarium* 和炭疽菌属 *Colletotrichum*。其中, 葡萄座腔菌属种类最多, 为木麻黄内生真菌的优势种群, 其次是拟盘多毛孢属真菌。抗细菌活性的结果表明, Cef-2(*Botryosphaeria* sp.) 表现出最强的抑制活性, 对所有供试细菌的抑菌斑直径均大于 10 mm, 强于阳性对照硫酸链霉素, Cef-1 和 Cef-9(*Fusarium* sp.) 对青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 也表现出较好的抑制活性。内生真菌 Cef-2 表现出最好的抗氧化活性, IC₅₀ 为 0.80 mg/mL。【结论】木麻黄枝条和果实中均存在内生真菌且均以葡萄座腔菌属为优势种群, 2 个部位真菌的种类存在明显差异。内生真菌 Cef-2 表现出最强的抗细菌和抗氧化活性, 可作为候选菌株进一步分离和鉴定其活性成分。

关键词: 木麻黄; 内生真菌; 次生代谢产物; 抗细菌活性; 抗氧化活性
中图分类号: S763.1; S939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2019)03-0067-08

Secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *Casuarina equisetifolia* and their bioactivities

SHAN Tijiang[†], QIN Kai[†], XIE Yinyan, ZHANG Weihao, MAO Ziling, WANG Jun
(College of Forestry and Landscape Architecture/Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To isolate and identify endophytic fungi from branches and fruits of *Casuarina equisetifolia* Forst., and screen active endophytic fungi with antibacterial and antioxidant activities. 【Method】Endophytic fungi from branches and fruits of *C. equisetifolia* were isolated by the tissue block separation method, and identified by combining colony observation with molecular biology. The antibacterial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi against different bacteria were determined using TLC-bioautography and their antioxidant activities were determined using the multi-orifice plate-DPPH coloration method. 【Result】Twelve strains were isolated and identified from branches and fruits of *C. equisetifolia*. There were significant difference between endophytic fungi isolated from branches and fruits.

收稿日期: 2018-07-24 网络首发时间: 2019-04-16 09:11:00
网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20190412.1740.004.html>
作者简介: 单体江 (1983—), 男, 讲师, 博士, E-mail: tjshan@scau.edu.cn; 秦楷 (1995—), 男, 硕士研究生, E-mail: 466542074@qq.com; [†]对本文贡献相同; 通信作者: 王军 (1962—), 男, 教授, 博士, E-mail: wangjun@scau.edu.cn
基金项目: 广东省自然科学基金 (2017A030313200); 国家自然科学基金青年科学基金 (31400544)

There were only two same endophytic fungus strains in branches and fruits, namely Cef-1 (*Pseudofusicoccum* sp.) and Cef-7 (*Pestalotiopsis* sp.). All endophytic fungi were mainly distributed in nine different genera, including *Pseudofusicoccum*, *Botryosphaeria*, *Pestalotiopsis*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Rhytidhysterium*, *Phomopsis*, *Fusarium* and *Colletotrichum*. Among them, *Botryosphaeria* had the most species and was the dominant species, followed by *Pestalotiopsis*. Cef-2 (*Botryosphaeria* sp.) showed the strongest inhibitory activity and the diameters of antibacterial spots were more than 10 mm, which were stronger than that of the positive control streptomycin sulfate. Cef-1 and Cef-9 (*Fusarium* sp.) showed well inhibition on *Ralstonia solanacearum*. Cef-2 displayed the best antioxidant activity and the IC₅₀ value was 0.80 mg/mL. 【Conclusion】 There are endophytic fungi in branches and fruits of *Casuarina equisetifolia*, and *Botryosphaeria* is the dominant species. There are significant differences of fungi species between branches and fruits. Endophytic fungus Cef-2 exhibits the strongest antibacterial and antioxidant activities, which can be used as a candidate strain for further isolation and identification of active component.

Key words: *Casuarina equisetifolia*; endophytic fungus; secondary metabolite; antibacterial activity; antioxidant activity

木麻黄 *Casuarina equisetifolia* 属木麻黄科 Casuarinaceae 木麻黄属常绿乔木或灌木, 原产于澳大利亚、太平洋诸岛以及亚洲东南部^[1-2]。木麻黄由于生长迅速、耐干旱、防风固沙、耐盐碱和生物固氮等特殊功能, 广泛用于热带亚热带地区沿海防护林的建设, 是我国东南沿海和华南地区不可替代的防护林树种, 同时也是重要的经济林和园林绿化树种^[3-6]。近年来, 由于沿海木麻黄树种单一, 缺少抗病品种以及自然灾害等因素的影响, 木麻黄青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 的发生日趋严重, 制约了沿海木麻黄防护林的发展, 对我国东南沿海的生态环境和生态安全构成严重的威胁^[7]。木麻黄青枯病是危害木麻黄最严重的一种细菌性土传病害^[8], 作为木麻黄的“癌症”, 目前尚无有效的防治方法。内生真菌作为一种新型的天然活性物质资源宝库, 能够产生多种结构新颖的次生代谢产物, 具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤以及促进植物生长和提高植物抗病性等多种生物活性, 近年来, 从植物内生真菌中寻找具有开发潜能的生物活性物质引起了人们极大的兴趣^[9-11]。木麻黄是一种特殊类型的共生营养型植物, 它不仅具有由放线菌中的弗兰克氏菌共生形成的固氮根瘤, 还有内生菌根 (VA 或 AM 菌) 和外生菌根, 共生固氮菌和菌根菌一直是木麻黄研究的热点^[12]。王璇^[13]利用传统经典法对不同林龄木麻黄根内生真菌进行分离, 基于 Biolog 微生物自动分析系统鉴定出 4 株木麻黄根内生真菌, 分别为棘孢曲霉、梅林青霉、新萨托菌属和离生青霉。林燕青等^[14]从木麻黄根和枝条中分离得到 65 株内生真菌, 并从中初步筛选出 28 株有促生作用的菌株。目前对

木麻黄内生真菌次生代谢产物抗细菌和抗氧化活性的研究鲜见报道。本研究通过采集木麻黄的枝条和果实, 采用组织块分离法分离枝条和果实中的内生真菌, 并测定内生真菌次生代谢产物的抗细菌和抗氧化活性, 从中筛选具有抗氧化和抗木麻黄青枯病菌的活性菌株, 以期对木麻黄青枯病的防治以及内生真菌资源的综合开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康的木麻黄枝条 (2 年生) 和果实, 2015 年 10 月 14 日采自华南农业大学校园, 标本由华南农业大学林学与风景园林学院李镇魁教授鉴定。

SHZ-D3 循环水式多用真空泵 (广州市臻胜仪器设备有限公司); 旋转蒸发器 OSB-2100 (东京理化器械株式会社); SW-CJ-2G 型超净工作台 (苏州净化设备有限公司); LRH 系列生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); HQ45 恒温摇床 (中国科学院武汉科学仪器厂); JJ300 型电子天平 (苏制); DSX-280KB30 手提式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); ZF-2 型三用紫外仪 (上海安亭电子仪器厂)。

硫酸链霉素 (美国 Sigma 公司, w=99%); GF254 薄层层析硅胶 (青岛海洋化工厂); 羧甲基纤维素钠 (国药集团化学试剂有限公司); 噻唑蓝 (MTT) 生物显色剂 (Amresco 公司); 甲醇、丙酮、乙酸乙酯、石油醚等均为分析纯 (天津富宇精细化工厂); DNA 抽提试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离和纯化 内生真菌的分离

采用 Shan 等^[15] 的方法。将木麻黄枝条和果实用清水洗净, 用 ϕ 为 70% 的乙醇溶液处理 30 s 后, 再用 w 为 0.2% 的氯化汞溶液处理 20 min, 最后用无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min, 置于无菌滤纸上晾干。去除表皮后, 将枝条分成约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小的块段, 放在 PDA 培养基平板上 (含 500 μ g/mL 的硫酸链霉素), 3 块/皿, 在 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内暗培养, 待内生真菌长出后, 从每个菌落的边缘挑取一小段菌丝接种到 PDA 培养基上, 连续纯化多次, 至菌落形态一致为止。4 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

1.2.2 内生真菌的鉴定 将内生真菌菌株接种于 PDA 平板上, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 5~10 d, 观察、记录菌落形态并拍照, 在光学显微镜下观察菌丝和产孢情况。内生真菌的分子生物学鉴定参照冯皓等^[16] 的方法, 将纯化后的菌株 (在 PDA 平板生长 5 d) 接种到马铃薯葡萄糖液体 (PDB) 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 5 d, 4 层纱布过滤并用无菌水冲洗掉残留 PDB, 然后用滤纸吸干获得菌丝。用液氮将菌丝充分研磨至粉末状, 采用试剂盒法提取 DNA。采用真菌的通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 扩增 ITS 序列。反应体系为: 2×*Taq* PCR MasterMix (含染料) 25 μ L, ITS4 (10 μ mol/L) 1 μ L, ITS5 (10 μ mol/L) 1 μ L, 模板 DNA (10 ng/ μ L) 3 μ L, 双蒸水补足到 50 μ L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。将测序成功的序列使用 DNAMAN 软件进行互补拼接, 将正向与反向引物互补序列两端加上引物序列拼接成完整序列, 将扩增所得的 rDNA-ITS 序列在 NCBI 网站上进行 Blast, 在 GenBank 数据库中进行相似性检索, 下载与其相似性较高的序列及其近似属的序列, 使用 MAFFT version 7 进行序列处理后, 用 MEGA 7.0.26 软件采用最大似然法 (Maximum likelihood) 构建系统发育树, 其中 Bootstrap method 中重复抽样次数设置 500, 模式为 General time reversible model。将最终的鉴定结果和所得的 rDNA-ITS 序列提交到 GenBank 数据库, 获得其登录号。

1.2.3 内生真菌次生代谢产物的制备 内生真菌的发酵培养采用大米固体培养基, 先将内生真菌菌株活化 3~5 d, 采用 PDB 培养基培养种子, 将培养好的种子接入已灭菌的大米培养基中, 培养温度为 28 $^{\circ}$ C, 培养时间为 60 d。发酵产物用乙酸乙酯和丙酮的混合液冷浸提取 3 次, 每次 7 d。将提取液减压

浓缩得到其次生代谢产物, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.4 抗菌活性的测定 供试细菌分别为根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*(G⁻)、大肠埃希菌 *Escherichia coli*(G⁻)、青枯病菌 (G⁻)、黄瓜角斑病菌 *Pseudomonas lachrymans*(G⁻)、番茄疮痂病菌 *Xanthomonas vesicatoria*(G⁻)、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*(G⁺) 和溶血葡萄球菌 *Staphylococcus haemolyticus*(G⁺)。采用 TLC-MTT-生物自显影法测定内生真菌次生代谢产物对不同供试细菌的抑制活性^[17]。将次生代谢产物溶解, 用直径为 0.5 mm 的毛细管在薄层层析板上点样, 点样量为 5 μ L。采用二氯甲烷和甲醇作为展开剂进行薄层层析, 薄层层析后在薄层板的一侧原点处点 5 μ L 的 0.2 mg/mL 硫酸链霉素作为阳性对照。向灭菌的 LB 半固体培养基 (琼脂质量浓度为 5 g/L) 中加入一定量准备好的菌液 (45 mL LB+5 mL 菌液), 调至约 10⁸ CFU/mL, 振荡摇匀。用喷样器将制备好的菌悬液均匀喷洒到层析后的硅胶板上; 待培养基在硅胶板上冷却后, 将硅胶板置于培养皿中于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 4 h, 以利于抗菌成分的扩散; 然后将培养皿置于 28 $^{\circ}$ C 下保湿培养, 12 h 后取出硅胶板, 在其上均匀喷洒噻唑蓝 (MTT), 约 10 min 后观察试验结果。有抗菌活性成分处, 供试细菌由于受到活性成分的抑制而出现抑菌斑; 无抗菌活性成分处, 供试细菌正常生长, MTT 显色后显蓝色。通过抑菌斑的迁移率 (R_f) 评价样品中抗菌化合物的极性, 根据抑菌斑的大小和多少评价活性化合物的抑菌活性和数量。

$$R_f = \frac{\text{斑点与点样处之间的距离}}{\text{展开剂前沿与点样处之间的距离}}。$$

1.2.5 抗氧化活性的测定 采用多孔板-DPPH 显色法^[18] 测定内生真菌次生代谢产物对 DPPH 的清除率, 以 IC₅₀ 来表示内生真菌次生代谢产物的抗氧化能力。用 DMSO 配制质量浓度为 100 mg/mL 的母液, 然后采用倍半稀释法依次稀释成质量浓度为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25 mg/mL 的样品溶液。阳性对照为 BHT, 初始质量浓度为 2.0 mg/mL, 采用倍半稀释法依次稀释成 1~0.031 25 mg/mL 的阳性对照溶液。向 96 微孔板中加入 80 μ L 质量浓度为 0.2 mg/mL 的 DPPH 无水乙醇溶液, 再加入 20 μ L 系列质量浓度的待测样品溶液或阳性对照溶液, 振荡摇匀, 在 37 $^{\circ}$ C 下水浴 30 min, 517 nm 下测定光密度 ($D_{517\text{ nm}}$)。以 20 μ L DMSO 溶液代替样品溶液作为空白对照, 每个处理 3 个重复, 供试样品对 DPPH 清除率的有效中浓度 (IC₅₀) 计算公式如下:

$$IC_{50} = \frac{\text{空白对照}D_{517\text{ nm}} - \text{样品溶液}D_{517\text{ nm}}}{\text{空白对照}D_{517\text{ nm}}} \times 100\%。$$

所得数据采用 Excel 软件进行作图分析, 供试样品浓度取对数 (X), 抑制率换算成几率值 (Y), 求得抗氧化活性的回归方程 (Y=aX+b)。

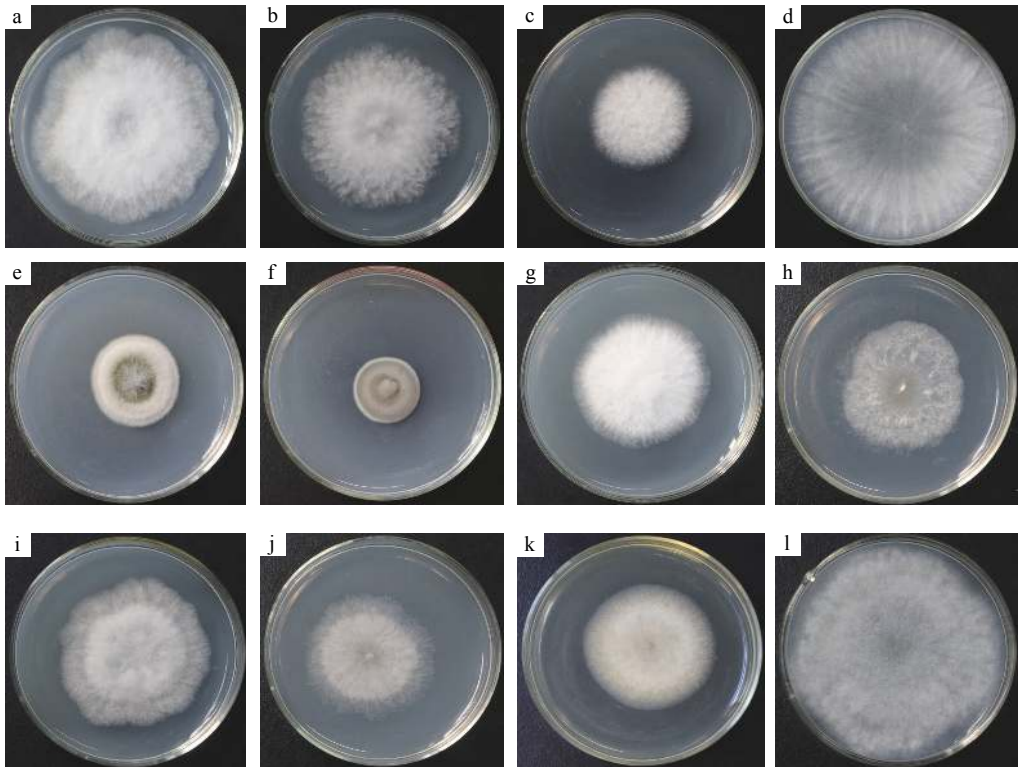
2 结果与分析

2.1 木麻黄内生真菌的分离和鉴定结果

采用组织块分离法从木麻黄枝条和果实中分离内生真菌, 从枝条中分离到 33 株, 从果实中分离到 20 株, 通过菌落形态观察, 初步合并相同的菌株, 从木麻黄枝条和果实中共分离得到 12 株形态各异的内生真菌, 分别命名为 Cef-1~Cef-12, 其菌落形态如图 1 所示。由图 1 可见, 木麻黄内生真菌菌落规则圆形, 气生菌丝发达, 多为白色, Cef-6 为灰色, Cef-5 边缘白色, 中间灰色; 除 Cef-3、Cef-5 和 Cef-6 外, 其他内生真菌生长迅速, 尤其是 Cef-4, 3 d 即可长满培养皿 (直径为 7.5 cm), 后期在菌落表面产生淡绿色的霉层, 为分生孢子。光学显微镜下发现所有内生真菌菌丝均有隔膜, 为有隔菌丝, 但多数内生真菌未见产孢。

通过形态学很难进行准确的鉴定, 因此采用分子生物学方法进一步对筛选出的形态各异的内生

真菌进行鉴定。通过 PCR 扩增、测序后, 将拼接完整的 ITS 序列提交至 GenBank, 获得其登录号, 并构建系统发育树 (图 2), 综合菌落形态和显微观察以及构建的系统发育树, 木麻黄内生真菌的最终鉴定结果如表 1 所示。从木麻黄枝条和果实中共鉴定出 12 株不同的内生真菌, 其中从枝条和果实中各鉴定出 7 株, Cef-1(*Pseudofusicoccum* sp.) 和 Cef-7 (*Pestalotiopsis* sp.) 为枝条和果实共有菌株。从分离到的内生真菌可以看出, 木麻黄内生真菌存在明显的生物多样性, 且不同部位的内生真菌存在明显差异。12 株内生真菌主要分布于 *Pseudofusicoccum*、葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*、拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、木霉属 *Trichoderma*、曲霉属 *Aspergillus*、裂菌属 *Rhytidhysteron*、拟茎点霉属 *Phomopsis*、镰刀菌属 *Fusarium* 和炭疽菌属 *Colletotrichum* 等 9 个不同的属中。葡萄座腔菌属种类最多, 有 3 株菌株, 分别为 Cef-2(KX960803)、Cef-10(KX960811) 和 Cef-12 (KX960815), 说明葡萄座腔菌属菌株为木麻黄内生真菌的优势种群; 其次是拟盘多毛孢属真菌, 有 Cef-3(*Pestalotiopsis* sp.) 和 Cef-7 共 2 株菌株; 其他属的内生真菌均为 1 株。BLAST 的结果显示, 所有菌株相似性均在 99% 以上, 5 株 (Cef-2、Cef-6、Cef-10、Cef-11 和 Cef-12) 内生真菌的相似性为 100%(图 2)。



a:Cef-1, b:Cef-2, c:Cef-3, d:Cef-4, e:Cef-5, f:Cef-6, g:Cef-7, h:Cef-8, i:Cef-9, j:Cef-10, k:Cef-11, l:Cef-12

图 1 从木麻黄枝条和果实中分离到的 12 株内生真菌

Fig. 1 Twelve strains of endophytic fungi isolated from branches and fruits of *Casuarina equisetifolia*

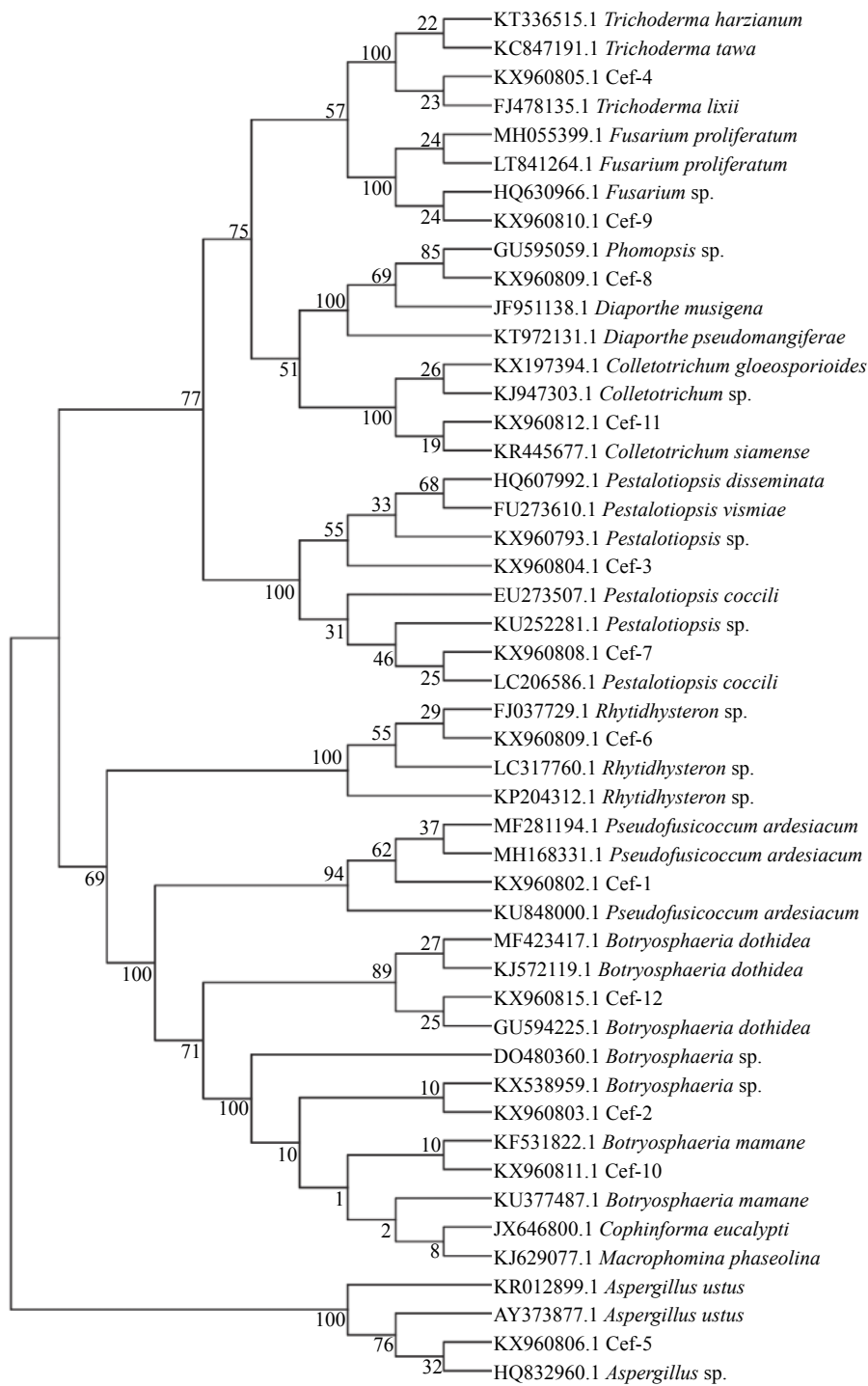


图 2 依据木麻黄内生真菌 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of endophytic fungi in *Casuarina equisetifolia* based on rDNA-ITS sequence

2.2 内生真菌次生代谢产物的抗细菌活性

采用 TLC-MTT-生物自显影法测定了木麻黄内生真菌次生代谢产物对 7 种供试细菌的抑制活性(表 2)。由表 2 可见,除内生真菌 Cef-3 和 Cef-6(*Rhytidhysteron* sp.) 未表现出任何抗菌活性外,其他内生真菌提取物均表现出一定的抑菌活性,且对不同的供试细菌抑菌活性差异较大。Cef-2 (*Botryosphaeria* sp.) 表现出最强的抑制活性,对所有供试细菌的抑

菌斑直径均大于 10 mm, 且强于阳性对照硫酸链霉素, R_f 的范围也最大,在 0.00~0.58 的范围内均有抑菌活性。多数内生真菌抑菌斑的 R_f 在 0~0.20 之间, R_f 越小,化合物的极性越大,说明具有活性的化合物多为极性较大的化合物。内生真菌 Cef-2 在 R_f 为 0.38~0.58 的范围内也表现出较好的抗菌活性,属于中等极性的化合物。Cef-1、Cef-4、Cef-5、Cef-8、Cef-9、Cef-10 和 Cef-11 等 7 种内生真菌对所

表 1 木麻黄内生真菌及分布
Table 1 Endophytic fungi of *Casuarina equisetifolia* and distribution

菌株	登录号	鉴定结果	最大相似菌株	相似性/%	分离部位
Strain	Accession number	Identification result	Closest related species	Similarity	Separated part
Cef-1	KX960802	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	MF281194.1 <i>Pseudofusicoccum ardesiacum</i>	99	枝条, 果实 Branch, fruit
Cef-2	KX960803	<i>Botryosphaeria</i> sp.	KX538959.1 <i>Botryosphaeria</i> sp.	100	枝条 Branch
Cef-3	KX960804	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	HQ607992.1 <i>Pestalotiopsis disseminata</i>	99	枝条 Branch
Cef-4	KX960805	<i>Trichoderma</i> sp.	FJ478135.1 <i>Trichoderma lixii</i>	99	枝条 Branch
Cef-5	KX960806	<i>Aspergillus</i> sp.	HQ832960.1 <i>Aspergillus</i> sp.	99	枝条 Branch
Cef-6	KX960807	<i>Rhytidhysteron</i> sp.	FJ037729.1 <i>Rhytidhysteron</i> sp.	100	枝条 Branch
Cef-7	KX960808	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	LC206586.1 <i>Pestalotiopsis cocculi</i>	99	枝条, 果实 Branch, fruit
Cef-8	KX960809	<i>Phomopsis</i> sp.	GU595059.1 <i>Phomopsis</i> sp.	99	果实 Fruit
Cef-9	KX960810	<i>Fusarium</i> sp.	HQ630966.1 <i>Fusarium</i> sp.	99	果实 Fruit
Cef-10	KX960811	<i>Botryosphaeria</i> sp.	KF531822.1 <i>Botryosphaeria mamane</i>	100	果实 Fruit
Cef-11	KX960812	<i>Colletotrichum</i> sp.	KR445677.1 <i>Colletotrichum siamense</i>	100	果实 Fruit
Cef-12	KX960815	<i>Botryosphaeria</i> sp.	GU594225.1 <i>Botryosphaeria dothidea</i>	100	果实 Fruit

表 2 木麻黄内生真菌提取物对不同供试细菌的抑制活性 (R_p)¹⁾

Table 2 Antibacterial activities of endophytic fungus crude extracts of *Casuarina equisetifolia* against different tested bacteria

供试菌株	青枯病菌	根癌土壤杆菌	枯草芽孢杆菌	大肠埃希菌	黄瓜角斑病菌	番茄疮痂病菌	溶血葡萄球菌
Tested strain	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas lachrymans</i>	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Cef-1	0.00~0.18 ⁺⁺	0.00~0.17 ⁺⁺	0.00~0.18 ⁺⁺⁺	0.00~0.17 ⁺⁺⁺	0.00~0.18 ⁺⁺⁺	0.00~0.18 ⁺⁺	0.00~0.20 ⁺⁺
Cef-2	0.00~0.22 ⁺⁺⁺ , 0.43~0.58 ⁺⁺⁺	0.00~0.17 ⁺⁺⁺ , 0.40~0.55 ⁺⁺⁺	0.00~0.18 ⁺⁺⁺ , 0.34~0.37 ⁺⁺ , 0.40~0.55 ⁺⁺⁺	0.00~0.18 ⁺⁺⁺ , 0.38~0.52 ⁺⁺⁺	0.00~0.22 ⁺⁺⁺ , 0.32~0.58 ⁺⁺⁺	0.00~0.17 ⁺⁺⁺ , 0.38~0.52 ⁺⁺⁺	0.00~0.17 ⁺⁺ , 0.42~0.55 ⁺⁺⁺
Cef-3	—	—	—	—	—	—	—
Cef-4	0.00~0.13 ⁺⁺	0.00~0.03 ⁺	0.00~0.13 ⁺⁺	0.00~0.05 ⁺⁺	0.00~0.12 ⁺⁺	0.00~0.15 ⁺⁺	0.00~0.15 ⁺⁺
Cef-5	0.00~0.12 ⁺⁺	0.00~0.1 ⁺⁺	0.00~0.13 ⁺⁺	0.00~0.12 ⁺⁺	0.00~0.12 ⁺⁺	0.00~0.12 ⁺⁺	0.00~0.12 ⁺⁺
Cef-6	—	—	—	—	—	—	—
Cef-7	—	0.00~0.03 ⁺	0.00~0.08 ⁺	0.00~0.03 ⁺	0.00~0.07 ⁺⁺	0.00~0.08 ⁺	—
Cef-8	0.00~0.15 ⁺⁺	0.00~0.08 ⁺⁺ , 0.48~0.58 ⁺	0.00~0.08 ⁺⁺	0.00~0.27 ⁺⁺	0.00~0.12 ⁺⁺⁺	0.00~0.08 ⁺⁺	0.00~0.10 ⁺⁺
Cef-9	0.00~0.18 ⁺⁺	0.00~0.15 ⁺⁺	0.00~0.13 ⁺⁺	0.00~0.18 ⁺⁺⁺	0.00~0.18 ⁺⁺	0.00~0.17 ⁺⁺	0.00~0.17 ⁺⁺
Cef-10	0.00~0.10 ⁺⁺	0.00~0.17 ⁺⁺	0.00~0.17 ⁺⁺⁺	0.00~0.12 ⁺⁺	0.00~0.17 ⁺⁺	0.00~0.15 ⁺	0.00~0.17 ⁺⁺
Cef-11	0.0~0.12 ⁺	0.00~0.13 ⁺⁺	0.00~0.10 ⁺	0.00~0.10 ⁺⁺	0.00~0.12 ⁺⁺	0.00~0.12 ⁺	0.00~0.17 ⁺⁺
Cef-12	—	—	—	0.00~0.07 ⁺⁺	0.12~0.15 ⁺⁺	0.00~0.22 ⁺⁺	—
CK	++	++	++	++	+++	++	++

1) “—”表示无抗菌活性; “+”表示抗菌斑最大直径(d)<5 mm, “++”表示 5 mm≤ d <10 mm, “+++”表示 d ≥10 mm; CK: 阳性对照硫酸链霉素, 仅在原位点样

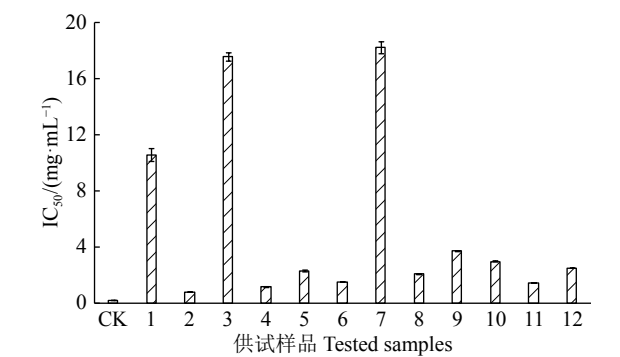
1) “—”: Inhibition spot was not observed; “+”: The maximum diameter of inhibition spot (d)<5 mm; “++”: 5 mm≤ d <10 mm; “+++”: d ≥10 mm; CK: the positive control streptomycin sulfate which was only sampled on TLC plate

有供试细菌均表现出抑制活性; Cef-12仅对大肠埃希菌、黄瓜角斑病菌和番茄疮痂病菌表现出抑制活性; Cef-7 对青枯病菌和溶血葡萄球菌未表现出抑制活性。从对青枯病菌的抑制活性来看, 内生真菌

Cef-2 的抑制活性最强, 抑菌斑直径大于 10 mm, R_f 为 0.00~0.22 和 0.43~0.58; Cef-1、Cef-4、Cef-5、Cef-8、Cef-9 和 Cef-10 对青枯病菌也表现出较好的抑制活性, 抑菌斑的最大直径在 5~10 mm 之间。不同内生真菌提取物对革兰阳性菌和革兰阴性菌的抑制活性无明显差异。

2.3 内生真菌次生代谢产物的抗氧化活性

采用多孔板-DPPH 显色法测定了内生真菌次生代谢产物的抗氧化活性, 结果如图 3 所示。由图 3 可见, 内生真菌 Cef-2 的抗氧化活性最好, IC_{50} 为 0.80 mg/mL, 但弱于阳性对照 BHT (IC_{50} 为 0.18 mg/mL); 内生真菌 Cef-4、Cef-11 和 Cef-6 也表现出较好的抗氧化活性, IC_{50} 均小于 2.00 mg/mL; Cef-1、Cef-3 和 Cef-7 的抗氧化活性相对较弱, IC_{50} 均大于 10.00 mg/mL。其他内生真菌的 IC_{50} 在 2.00~4.00 mg/mL 之间。



CK: 阳性对照 BHT; 1~12 分别表示菌株 Cef-1、Cef-2、Cef-3、Cef-4、Cef-5、Cef-6、Cef-7、Cef-8、Cef-9、Cef-10、Cef-11 和 Cef-12
CK: The positive control BHT; 1-12 were Cef-1, Cef-2, Cef-3, Cef-4, Cef-5, Cef-6, Cef-7, Cef-8, Cef-9, Cef-10, Cef-11 and Cef-12, respectively

图 3 木麻黄内生真菌次生代谢产物对 DPPH 自由基的清除活性
Fig. 3 DPPH free radical scavenging activities of secondary metabolites from endophytic fungi of *Casuarina equisetifolia*

3 讨论与结论

内生真菌在植物中广泛存在, 但不同植物以及同一植物不同部位内生真菌的种类和数量均存在较大差异。本研究从木麻黄枝条和果实中分离、纯化和鉴定得到 12 株内生真菌, 鉴定结果表明枝条和果实中内生真菌的种类存在较大差异, 相同的菌株只有 2 株, 可能与不同部位的生存环境有关。葡萄座腔菌属为木麻黄内生真菌的优势种群, 葡萄座腔菌属是多种植物的内生真菌。Ibrahim 等^[19] 从阿尔卑斯山脉的花白蜡树 *Fraxinus ornus* 中分离到 *Botryosphaeria dothidea*, 且为该树的优势内生真菌

菌株; Aghdam 等^[20] 从酸樱桃树 *Prunus cerasus* 中分离到内生真菌 *B. dothidea*; Zhong 等^[21] 从药食两用植物苦荞麦 *Fagopyrum tataricum* 中分离到 *Botryosphaeria* sp. KC218456, 同时也分离到镰刀菌属等多种内生真菌。内生真菌和病原菌之间往往存在竞争关系, 对病原菌表现出一定的抗性, 植物病原真菌也许可以看成是一类特殊的“内生真菌”^[22]。本研究分离到拟茎点霉属、葡萄座腔菌属、镰刀菌属和炭疽菌属等多种内生真菌, 其中拟茎点霉属可引起核桃枝枯病^[23], 此外还会侵染果实等, 引起果腐、溃疡等症状^[23-24]; 葡萄座腔菌属是多种树木溃疡病和枝枯病的病原菌, 在世界范围内分布广泛^[25-26]; 镰刀菌属和炭疽菌属更是人们熟知的植物病原菌, 可引起多种植物的枯萎和叶片坏死^[27-28]。内生真菌在某种寄主中共生、在另外的一些寄主中又成为病原菌的这种转变机制现在仍不明确, 未来也是研究的热点。

内生真菌与宿主植物在长期的协同进化过程中, 形成了相互稳定的生态关系, 内生真菌不仅可以给植物提供所需的营养物质, 还参与植物的防卫功能, 增强植物抗逆境、抗病害的能力^[29]。地中海松 *Pinus halepensis* 内生真菌木霉属 *Trichoderma* spp.、出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* 等均可有效抑制枯梢病病斑的扩展^[30]。小麦 *Triticum aestivum* 内生菌钩状木霉 *Trichoderma hamatum*、青霉属 *Penicillium* sp. 和淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus* 能够显著抑制小麦黄斑叶枯病病原菌菌落的生长^[31]。内生真菌具有丰富的多样性, 部分内生真菌在代谢过程中产生的活性物质在药物研发、植物病害生物防治等方面表现出了巨大的经济价值及应用前景^[32]。目前从柴胡、红景天、北五味子、枸杞、刺五加、郁金、藏红花等药用植物中均分离到具有抗氧化活性物质的内生菌^[33]。本研究从木麻黄枝条中分离到的内生真菌 Cef-2 (*Botryosphaeria* sp.) 对青枯病菌表现出最强的抑制活性, 其次是 Cef-1 (*Pseudofusicoccum* sp.) 和 Cef-9(*Fusarium* sp.), 能否作为抗木麻黄青枯病的生防菌还有待于进一步研究。Cef-2 表现出较好的抗氧化活性, 在以后的研究中可作为候选菌株, 进一步分离、纯化和鉴定其中的活性成分, 为将来生物农药的大规模开发应用和病害的生物防治奠定基础。此外, 并不是所有内生真菌都能在 PDA 或人工培养基上培养, 因此分离到的这 12 株内生真菌只是木麻黄内生真菌的一部分。在后续的研究中可以尝试采用不同的培养基, 分离得到尽可能多的内生真菌, 并比较不同培养基内生真菌的分布和生长情况。

参考文献:

- [1] WANG F, XU X, ZOU B, et al. Biomass accumulation and carbon sequestration in four different aged *Casuarina equisetifolia* coastal shelterbelt plantations in South China[J]. Plos One, 2013, 8(10): 1-7.
- [2] ZHONG C, MANSOUR S, NAMBIAR-VEETIL M, et al. *Casuarina glauca*: A model tree for basic research in actinorhizal symbiosis[J]. J Biosci, 2013, 38(4): 815-823.
- [3] 刘洪波, 史冬辉, 陈旭华, 等. 木麻黄青枯病研究进展 [J]. 浙江林业科技, 2013, 33(1): 68-73.
- [4] DIAGNE N, DIOUF D, SVISTOONOFF S, et al. *Casuarina* in Africa: Distribution, role and importance of arbuscular mycorrhizal, ectomycorrhizal fungi and *Frankia* on plant development[J]. J Environ Manage, 2013, 128: 204-209.
- [5] 张巧, 韩永刚, 黄义雄, 等. 沿海木麻黄生态效益研究综述 [J]. 防护林科技, 2014(1): 45-49.
- [6] MODHUMITA G D, RADHA V, KARPAGA R S B. Characterization of genes expressed in *Casuarina equisetifolia* in response to elicitation by cell wall components of *Trichosporium vesiculosum*[J]. Silvae Genet, 2017, 62(4): 161-173.
- [7] 冯莹. 木麻黄青枯病风险分析 [J]. 广东林业科技, 2014, 30(1): 52-55.
- [8] 孙思, 伍慧雄, 王军. 木麻黄青枯病研究概述 [J]. 中国森林病虫, 2013, 32(5): 29-34.
- [9] LI S, ZHANG X, WANG X H, et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity[J]. Eur J Med Chem, 2018, 156: 316-343.
- [10] YU J, WU Y, HE Z, et al. Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Camellia oleifera*[J]. Mycobiology, 2018, 46(2): 85-91.
- [11] SHAN T, TIAN J, WANG X, et al. Bioactive spirobisnaphthalenes from the endophytic fungus *Berkleasium* sp.[J]. J Nat Prod, 2017, 77(10): 2151-2160.
- [12] 张昕, 沈爱华, 林永敬, 等. *Frankia* 菌侵染木麻黄与其共生结瘤程序 [J]. 浙江农林大学学报, 2013, 30(5): 669-673.
- [13] 王璇. 不同林龄木麻黄根内生真菌群落结构多样性与化感潜力研究 [D]. 海口: 海南师范大学, 2017.
- [14] 林燕青, 吴承祯, 谢安强, 等. 木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 内生真菌的分离与促生菌株的筛选 [J]. 北华大学学报(自然科学版), 2015, 16(4): 522-528.
- [15] SHAN T, LOU J, GAO S, et al. Antibacterial activity of the endophytic fungi from a traditional Chinese herb *Paris polyphylla* var. *chinensis*[J]. Afr J Microbiol Res, 2012, 6(14): 3440-3446.
- [16] 冯皓, 宋慧云, 祝一鸣, 等. 羊蹄甲白粉病的首次报道 [J]. 热带农业学报, 2018, 38(1): 95-97, 104.
- [17] 张伟豪, 翁道玥, 宋慧云, 等. 9 种夹竹桃科和大戟科植物抗菌和抗氧化活性测定 [J]. 南方农业学报, 2018, 49(1): 85-90.
- [18] OUYANG J, MAO Z, GUO H, et al. Mollicellins O-R, four new depsidones isolated from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. Eef-10[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3218-3229.
- [19] IBRAHIM M, SIEBER T N, SCHLEGEL M. Communities of fungal endophytes in leaves of *Fraxinus ornus* are highly diverse[J]. Fungal Ecol, 2017, 29: 10-19.
- [20] AGHDAM S A, FOTOUHIFAR K B. Introduction of some endophytic fungi of sour cherry trees (*Prunus cerasus*) in Iran[J]. Rostaniha, 2017, 18(1): 77-94.
- [21] ZHONG L Y, ZOU L, TANG X H, et al. Community of endophytic fungi from the medicinal and edible plant *Fagopyrum tataricum* and their antimicrobial activity[J]. Trop J Pharm Res, 2017, 16(2): 387-396.
- [22] 姜道宏. 植物内生真菌及其展望 [J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 742-749.
- [23] 李星月, 何朋俊, 朱天辉, 等. 核桃枯枝病新病原及生物学特性 [J]. 微生物学通报, 2017, 44(6): 1339-1348.
- [24] 劳佳萍. 植物内生真菌拟茎点霉生物多样性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [25] MARSBERG A, KEMLER M, JAMI F, et al. *Botryosphaeria dothidea*: A latent pathogen of global importance to woody plant health[J]. Mol Plant Pathol, 2017, 18(4): 477-488.
- [26] 王璠, 黄俊斌, 李国怀. 葡萄座腔菌属 (*Botryosphaeria*) 引起的果树病害及研究进展 [J]. 植物保护, 2013, 39(6): 7-13.
- [27] PAPARU P, DUBOIS T, COYNE D, et al. Differential gene expression in east African highland bananas (*Musa* spp.): Interactions between non-pathogenic *Fusarium oxysporum* V5w2 and *Radopholus similis*[J]. Physiol Mol Plant P, 2013, 82: 56-63.
- [28] GONZAGA L L, COSTA L E O, SANTOS T T, et al. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity[J]. J Appl Microbiol, 2014, 118(2): 485-496.
- [29] 宋薇薇, 朱辉, 余凤玉, 等. 植物内生菌及其对植物病害的防治作用综述 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(6): 12-16.
- [30] ROMERALO C, SANTAMARÍA O, PANDO V, et al. Fungal endophytes reduce necrosis length produced by *Gremmeniella abietina* in *Pinus halepensis* seedlings[J]. Biol Control, 2015, 80: 30-39.
- [31] LARRAN S, SIMÓN M R, MORENO M V, et al. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease[J]. Biol Control, 2016, 92: 17-23.
- [32] 郭顺星. 药用植物内生真菌研究现状和发展趋势 [J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 1-13.
- [33] 杨志军, 邓毅, 曼琼, 等. 内生菌在天然药物研究中的研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(5): 593-596.

【责任编辑 周志红】