

参考文献

[1] Masatoshi GOTO, Eiji KUWANO, Werasit KANLAYAKRIT, Shinsaku HAYASHIDA, Biosci Biotech Biochem, 1995, **59**: 16~ 20.

[2] MASTOSH GOTO, TSUYOSHI SEMIMARU, KENSUKE FURUKAWA, SHINSAKU HAYASHIDA, APPL ENVIRON MICROBIOL, 1994, **60**: 3926~ 3930.

[3] Keiji KAINUMA, Hiroshi ISHIGAMI, Shoichi KOBAYASHI, J Jpn Soc. Starch sci, 1985, **31**: 136~ 141.

[4] Shinsaku HAYASHIDA, and Perfecto Q. FLOR, Agric Biol Chem, 1981, **45**: 2675~ 2681.

[5] Cheorl-Ho Kim, Suk-Tae Kwon, Hajime Taniguchi, Dae-Sil Lee, Biochimica et Biophysica Acta, 1992, **1122**: 243~ 250.

[6] Hiroshi Morita, Kouhei Mizuno, Mayumi Matsunage, Yusaki Fujio, J Appl Glycoci, 1999, **46**: 15~ 21.

[7] Jun-ichi ABE, Susumu HIZUKURI, J Jpn Soc Starch Sci, 1988, **35**: p. 43~ 47.

[8] Tomoko TAKAHASHI, Keiko KATO, Yoshio Ikegami, Masachika IRIE, J Biochem, 1985, **98**: 663-671.

[9] Kohsai Fukuda, Yuji Teramoto, M. Goto, J. Sakamoto, S. Mitsuiki, Hayashida, Biosci Biotech Biochem, 1992, **56**: 556~ 559.

[10] Mitsuru MONMA, et al, Agric Biol Chem, 1989, **53**: 1503~ 1508.

几种药用植物内生真菌抗真菌活性的初步研究*

李桂玲 王建锋 黄耀坚 郑忠辉 苏文金**

(厦门大学生命科学院 厦门 361005)

摘要: 从三尖杉, 南方红豆杉及香榧中分离出 172 株内生真菌, 对其进行抗菌活性检测, 结果表明共 90 株内生真菌对一种或多种植物病原真菌, 如红色面包霉 (*Neurospora* sp.), 木霉 (*Trichoderma* sp.), 镰刀菌 (*Fusarium* sp.) 等有抑制作用, 来自三尖杉、南方红豆杉和香榧的抗菌活性菌株比例分别为 40%, 54.2% 及 57.1%。其中平板抑菌圈直径大于 15mm 的高抗菌株有 35 株。按 Ainsworth 等鉴定系统和方法进行鉴定, 具有抗菌活性的内生真菌主要分布于拟青霉属、镰孢菌属等 18 个属中。

关键词: 内生真菌, 抗真菌作用

中图分类号: Q939.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 06-0064-05

STUDY ON THE ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM SEVERAL PHARMACEUTICAL PLANTS

LI Gui-Ling WANG Jian-Feng HUANG Yao-Jian ZHENG Zhong-Hui SU Wen-Jin

(Life Sciences Institute of Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract: One hundred and seventy-two strains of endophytic fungi were isolated from *Taxus mairei*, *Cephalotaxus fortunei* and *Torreya grandis* cv. *merillia*. The result of the antifungal assay shows that ninety strains of the fungi have antagonism against one or more botanical pathogenic fungi, such as *Neurospora* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. etc. The percentage of antifungal strains to tested strains are as follows: 40% *Cephalotaxus fortunei*,

* 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (No. 96038402)

** 通讯联系人

收稿日期: 2000-11-13, 修回日期: 2001-01-31

54.2% *Taxus mairei*, 57.1% *Torreya grandis* cv. *merrillia*. Thirty-five strains have high antifungal activities, and their inhibition zone diameter is at least 15mm. The active endophytic fungi were identified as 18 genera, most of which belong to *Paecilomyces* and *Fusarium* etc.

Key words: endophytic fungi, antifungal action

真菌是由不同进化途径的类群组成的, 现已发现 69, 000 种, 而且每年尚以 1000 余种的新种递增。保守的估计, 全世界真菌的总数可达 150 万余种^[1], 故真菌有“生物资源的宝库”之称。真菌和植物的相互关系极其有趣和复杂, 它们可以是寄生、共生或互生。其共生关系主要表现在: 一方面, 植物为内生真菌提供光合产物和矿物质; 另一方面内生真菌的代谢物能刺激植物的生长发育。业已证明, 内生真菌能够参与植物活性成分的合成, 或者对植物次生代谢产物进行转化。

目前人们所利用的微生物资源仅是自然界存在微生物的一小部分, 现存的微生物资源急需环境的有效保护、大量的分离和培养菌种才能有效地保存和利用。但是环境资源保护并不能使资源优势转化为具有经济效益的天然产品, 真菌资源的真正价值在于受到切实重视和有效的利用。从这个意义上说, 内生真菌的研究对于植物-真菌共生生态、天然产物的开发等有着重要的意义。

本文旨在通过对分布于福建省的几种珍稀药用植物的内生真菌抗真菌活性的初步研究, 确定抗真菌活性菌株的生态分布及其抗菌特性, 从而为植物-真菌生态关系的研究以及植物内生真菌资源的利用提供依据。

1 材料

1.1 材料及来源

南方红豆杉 (*Taxus mairei*) 树皮样品: 采自福建省尤溪县汤川和黄林两地及福建省武夷山自然保护区, 树径为 20~ 80cm, 海拔 800~ 900m。

三尖杉 (*Cephalotaxus fortunei*) 树皮样品: 采自福建省武夷山自然保护区, 树径为 10~ 50cm, 海拔 800~ 900m。

香榧 (*Torreya grandis* cv. *merrillia*) 树皮样品: 采自福建省武夷山自然保护区, 树径为 30~ 120cm, 海拔 900m 左右。

1.2 拮抗测定指示菌

红色面包霉 (*Neurospora* sp.), 葡萄状穗霉 (*Stachybotrys* sp.), 弯孢霉 (*Curvularia* sp.), 轮枝孢霉 (*Verticillium* sp.), 镰刀菌 (*Fusarium* sp.), 木霉 (*Trichoderma* sp.)。

2 方法

2.1 内生真菌分离

采用平板倾注法^[2, 3]。上述南方红豆杉、三尖杉、香榧植物样品 (带有少量木质部的树皮) 采集后即予处理分离。即用无菌小刀去除外皮层和木质部, 取内皮层及韧皮部用 70% 乙醇消毒 3min, 无菌水冲洗 3min。将大约 0.5g 的树皮加 2mL 的无菌水于研钵中充分研磨后, 取 0.1mL 的匀浆液于培养皿中, 加入 10~ 15mL 的含终浓度 50mg/L 庆

大霉素的 PDA 培养基, 25℃ 培养, 待菌丝长出后, 经过纯化, 挑出单菌落于斜面上。

2.2 内生真菌液体培养及发酵液处理

液体培养采用 PDA 液体培养基, 取菌丝块接种, 25℃, 120r/min 培养 7d。发酵液经冻融, 匀浆后, 4000r/min 离心 5min, 取上清液, 过滤除菌。

2.3 抑菌实验

采用滤纸片法^[4-7]。将斜面培养的指示菌用无菌水洗下其孢子, 与适量培养基混匀 (孢子终浓度约为 10^6 个/mL), 倒平板。待培养基凝固后, 将无菌滤纸片 (= 5mm) 用样品浸湿, 贴放于培养基上, 25℃ 培养 48h, 测量抑菌圈直径。

2.4 菌株鉴定

按 Airsworth 等真菌鉴定系统和方法进行鉴定^[8,9]。

3 结果及分析

3.1 植物内生真菌的抗真菌活性

从上述 3 种植物中共分离得内生真菌 172 株, 其中红豆杉 107 株, 三尖杉 30 株, 香榧 35 株。内生真菌拮抗实验结果见表 1。从表 1 可以看出, 172 株供测菌株中, 共有 90 株内生真菌对一种或多种指示菌有抑制作用 (占总分离菌株数的 52.3%)。3 种植物内生真菌的抗菌活性菌株所占比例都超过 40%, 香榧抗菌活性菌株所占比例最高, 达 57.1%。这表明, 植物内生真菌中存在着广泛的抗真菌资源。

表 1 内生真菌的抗真菌活性及宿主分布

宿主植物	供测菌株 (株)	抗菌活性菌株数 (百分比)	抗菌活性菌株的分布 (株)			
			A	B	C	D
红豆杉	107	58 (54.2%)	49	9	20	29
三尖杉	30	12 (40%)	18	2	9	1
香榧	35	20 (57.1%)	15	4	11	5
总计	172	90 (52.3%)	82	15	40	35

A: 无抗菌活性, B: 抑菌圈直径 < 10mm, C: 抑菌圈直径 10~15mm, D: 抑菌圈直径 > 15mm。

从表 1 还可以看出, 3 种植物内生真菌活性菌株的分布有较大差别。红豆杉内生真菌抗真菌高活性菌株 (抑菌圈直径 > 15mm) 所占比例最高, 三尖杉的最低。而香榧内生真菌中, 一般活性菌株 (抑菌圈直径 10~15mm) 所占比例最高, 低活性菌株 (抑菌圈直径 < 10mm) 与高活性菌株数相当。

3.2 香榧内生真菌抑菌活性

香榧内生真菌的抗菌活性主要表现在对葡萄状穗霉的抗性上, 35 株供测菌株中, 共有 14 株 (占 40%) 对葡萄状穗霉有抗菌活性, 对镰刀菌有抗性的菌株也较多, 占供测菌株的 28.6%, 但未发现对弯孢霉有抗性的菌株。香榧内生真菌高抗菌株较少, 5 株抗真菌高活性的菌株主要对轮枝孢霉起抑制作用。高活性菌株多数分布在隔指孢属 (*Dactylium*) 中。

3.3 红豆杉内生真菌抑菌活性

红豆杉内生真菌中, 对红色面孢霉有抗菌活性的菌株最多, 共有 28 个菌株 (占供测菌株的 26.4%), 而对轮枝孢霉有抗菌活性的菌株最少, 仅有 4 株 (约占总供测菌株

的3.8%)。其活性菌株主要分布在拟青霉属(Paecilomyces)及头孢霉属(Cephalosporium),高抗菌株也主要为拟青霉属的菌株,且多数可以抑制红色面孢霉的生长。

3.4 三尖杉内生真菌抑菌活性

三尖杉内生真菌中,对红色面孢霉及弯孢霉有抗性的菌株所占比例最高,各占总供测菌株的23.3%,未发现对木霉有抗菌作用的菌株。其高活性菌株较少,仅有1株,为一种被孢霉(Mortierella sp.),该菌株对红色面孢霉及弯孢霉均有较强的抗菌作用。三尖杉内生真菌抗菌活性菌株主要分布在拟青霉属中。

3.5 植物内生真菌抗菌活性菌株鉴定结果统计

3种植物内生真菌抗菌活性菌株分布在18个属中(见表2),其中以拟青霉属为主,占活性菌株的6.7%。此外,3种植物内生真菌活性菌株的种属分布具有多样性。红豆杉内生真菌活性菌株分布在16个属中,以拟青霉属、镰孢菌属、头孢霉属及枝孢霉属为主,各占活性菌株的10.7%、8.6%、8.6%和8.6%;三尖杉内生真菌活性菌株较少,分布在拟青霉属及被孢霉属等属中;而香榧内生真菌活性菌株分布在5个属中,以枝孢霉属为主。

表2 3种植物内生真菌抗菌活性菌株属的分布(单位:株)

属	红豆杉	三尖杉	香榧	属	红豆杉	三尖杉	香榧
拟青霉属(Paecilomyces)	6	4	0	木霉属(Trichoderma)	3	0	0
被孢霉属(Mortierella)	3	1	0	头珠霉属(Oedocephalum)	2	0	0
头孢霉属(Cephalosporium)	5	0	0	腐霉属(Pythium)	1	0	0
枝孢属(Cladosporium)	5	0	4	明枝霉属(Hyalodendron)	1	0	0
镰孢菌属(Fusarium)	5	0	0	掷孢酵母属(Sporobolomyces)	1	0	0
阜孢霉属(Papularia)	2	0	3	丛梗孢属(Monilia)	1	0	0
葡萄孢属(Botrytis)	1	0	1	隔指孢属(Dactylium)	0	0	1
拟小卵孢属(Ovulariopsis)	2	0	1	链二孢属(Biospora)	0	0	1
地霉属(Geotrichum)	4	0	0	未知属	13	7	9
毛霉属(Mucor)	3	0	0				

4 讨论

植物内生真菌指的是生长在植物体的根、茎及叶等组织中的细胞间隙或细胞内,与植物建立无害的共生关系的一类真菌,是植物微生态系统中的天然组成成分^[7,10,11]。也有人认为内生真菌是指整个生活史或生活史的某个阶段,侵入活体植物组织内,而引起不可见、非炎症感染的真菌^[12]。植物内生真菌在进化过程中与宿主建立了和谐的联合关系,其次代谢产物是十分丰富的,是天然产物的重要来源^[7,10,11]。我们的工作结果表明,植物内生真菌中广泛分布着抗菌活性菌株(占供测菌株的40%以上)。内生真菌的拮抗作用、生态分布及属种分布具有多样性。3种植物中内生真菌抗菌活性菌株的种属类型及数目具有较大差异,红豆杉内生真菌的抗菌活性菌株类型较多,三尖杉的较少。同属的内生真菌对不同的植物病原菌拮抗作用及抗菌效果各不相同。不同属种的菌株对同一指示菌的抗菌作用也有较大差别,对红色面孢霉有拮抗作用的菌株种类较多。

植物病原真菌的感染是引起植物病害,造成作物减产的重要原因。目前,对植物病害的防治均采用化学农药杀灭病原菌,而化学农药对人畜的毒副作用和残留问题至

今仍难以解决。随着越来越多抗药性植物病原菌的出现,寻找其它可替代的、毒副作用小,安全有效的农药来防治植物病害成了农业可持续发展的焦点问题^[13]。以上结果表明,高活性菌株在内生真菌中占有一定比例,占总供测菌株的20%以上。而抑菌作用最强的菌株,对木霉的平板抑菌圈直径达46mm。在3种植物的内生真菌中,存在着比较罕见的抗菌活性菌株,如子囊菌及瘤座孢科和暗色孢科的某些种,值得进一步研究。因此,植物内生真菌是重要的抗菌药用资源。开发植物内生真菌,寻找新的抗菌活性物质具有广阔的前景。

致谢 本课题承蒙胡志钰老师,程阳健同学的大力支持和帮助,在此表示衷心感谢。

参考文献

- [1] 梁宗琦. 生物多样性, 1999, 7 (2): 145~ 150.
- [2] 李海燕, 王志军, 张琪玲, 等. 云南大学学报(自然科学版), 1999, 21 (3): 243.
- [3] 庄铁诚, 张瑜斌, 林 鹏. 厦门大学学报(自然科学版), 2000, 39 (2): 227~ 234.
- [4] 邓维秀, 杨 靖, 张克兰, 等. 邵阳医学院学报, 1999, 18 (2): 74~ 75.
- [5] 刘 宁, 陈蓉蓉, 谷晓明. 贵州师范大学学报(自然科学版), 1998, 16 (1): 1~ 3.
- [6] 杨文博, 冯 波, 佟树敏. 微生物学通报, 1997, 24 (4): 224~ 226.
- [7] Hong Lu, Wen Xin Zou, Jun Cai Meng, et al. Plant Science, 2000, 151: 67~ 73.
- [8] Ainsworth G C, Sparrow F K Sussman A S. The fungi, an advanced treatise (IVA), 1973.
- [9] Barnett H L Hunter B B. China scientific press, 1977, 144~ 145.
- [10] Service, Robert F. Science, 2000, 288 (5463): 27~ 28.
- [11] 梁 宇, 高玉葆. 植物学通报, 2000, 17 (1): 52~ 59.
- [12] Stutz A V, Nowak J. Applied Soil Ecology, 2000, 15: 183~ 190.
- [13] Nicole Benhamou, Michel Nicole. Plant Physiol Biochem, 1999, 37 (10): 703~ 719.

底物的分散和溶解对甾体微生物酶反应的影响*

阳 葵 李晓静 冯 霞 尹 强 赵海燕

(天津大学理学院化学系 天津 300072)

摘要: 甾体的溶解是微生物转化反应的控制步骤。表面活性剂对憎水性物质的增溶作用是具有憎水内核胶团形成的直接结果。随表面活性剂溶液浓度的增加,胶团数目增加,甾体水溶性增强。复配型分散剂 PSE-MGE 应用于甾体转化体系,相对于单组分分散剂 PSE 而言,实现同一程度甾体水溶性增强所需的表面活性剂用量减少,对菌体生长的负面影响较小,有利于转化。超声与分散剂配合使用的效果优于分散剂单独使用的效果,且使用较强的超声声强 (12.4 W/cm^2) 和较短的超声时间 (5min) 时效果最佳。

关键词: 甾体化合物, 微生物转化, 分散剂, 超声, 溶解

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 06-0068-04

* 国家自然科学基金青年基金资助项目 (No. 29606008)

天津市自然科学基金资助项目 (No. 993607111)

收稿日期: 2000-11-20, 修回日期: 2001-03-25