

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202112017

苏秀丽, 李惠敏, 唐辉, 等. 2023. 黄花倒水莲内生真菌生物活性评价及 HNLF-44 菌株鉴定 [J]. 广西植物, 43(1): 88–95.
SU XL, LI HM, TANG H, et al., 2023. Bioactivity evaluation of endophytic fungi of *Polygala fallax* and identification of HNLF-44 strain [J]. *Guihaia*, 43(1): 88–95.



黄花倒水莲内生真菌生物活性评价及 HNLF-44 菌株鉴定

苏秀丽^{1,3}, 李惠敏³, 唐辉^{1,2*}, 李良波⁴, 刘宝玉^{1,2}

(1. 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 2. 广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室, 中国科学院 广西 桂林 541006; 3. 广西师范大学珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室, 广西 桂林 541006; 4. 广西中医药大学 药学院, 南宁 530200)

摘要: 为充分开发黄花倒水莲 (*Polygala fallax*) 的内生真菌资源, 获得具有抗植物病原真菌、抗氧化活性的内生真菌, 该文以黄花倒水莲内生真菌为研究对象, 使用平板对峙法检测内生真菌对 6 种植物病原真菌的抑菌活性, 测定内生真菌发酵液的 DPPH 清除自由基能力和总还原能力, 评价内生真菌的抗氧化活性, 并对具有强抑菌活性和抗氧化活性的菌株进行形态和 ITS 鉴定。结果表明: (1) 黄花倒水莲内生真菌中有 2 株内生真菌对香蕉专化尖孢镰刀菌、柑橘树脂病菌、叶点霉菌、香蕉具条叶斑病菌、茄病镰刀菌、三七根腐病菌具有明显的抑菌活性, 抑菌率在 50.3%~91.4% 之间, 其中 HNLF-5 对柑橘树脂病菌的抑菌率为 73.2%, HNLF-44 对香蕉专化尖孢镰刀菌抑菌率为 91.4%。(2) 内生真菌发酵液具有良好的抗氧化活性, DPPH 清除率均在 80% 以上, 总还原能力吸光值范围为 0.279 2~0.748 8。(3) HNLF-44 菌株为链格孢属真菌。该研究表明, 药用植物黄花倒水莲内生真菌具有较好的生物活性, 为后续从黄花倒水莲内生真菌中挖掘潜在新型抑菌活性和抗氧化活性物质奠定了基础。

关键词: 黄花倒水莲, 内生真菌, 抗氧化, 抑菌, 菌株鉴定

中图分类号: Q946.885 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)01-0088-08

Bioactivity evaluation of endophytic fungi of *Polygala fallax* and identification of HNLF-44 strain

SU Xiuli^{1,3}, LI Huimin³, TANG Hui^{1,2*}, LI Liangbo⁴, LIU Baoyu^{1,2}

(1. *Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China*; 2. *Key Laboratory of Plant Functional Phytochemicals and Sustainable Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006, Guangxi, China*; 3. *Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, Guangxi Normal University, Guilin 541006, Guangxi, China*; 4. *College of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China*)

收稿日期: 2022-03-16

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA18118015); 桂林市重大专项(20190101); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室项目(ZRJJ2018-7)。

第一作者: 苏秀丽(1996-), 硕士研究生, 主要从事微生物研究, (E-mail) 1808891670@qq.com。

*通信作者: 唐辉, 研究员, 主要从事特色经济植物资源保护及可持续利用研究, (E-mail) 913529761@qq.com。

Abstract: The medicinal plant *Polygala fallax* has a variety of biological activities. In order to fully develop the endophytic fungi resources of the wild *P. fallax* and to obtain the culture-endophytic fungi strains with an anti-phytopathogenic fungi and antioxidant activities, the endophytic fungi of *P. fallax* were taken as the research object, the antifungal activity of the endophytic fungi against six kinds of phytopathogenic fungi was detected by the plate confrontation method; and the antioxidant activity of endophytic fungi was evaluated by measuring the DPPH free radical scavenging ability and total reducing ability of endophytic fungi fermentation broth. Finally, the endophytic fungi strains with strong antifungal and antioxidant activities were then analyzed by the morphological traits and the flanking ITS sequencing. The results were as follows: (1) In the antifungal experiment, there were two endophytic fungi of *P. fallax* had obvious antifungal activities on six kinds phytopathogenic fungi of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Phyllosticta zingiberi*, *Diaporthe citri*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, and the inhibition rates ranged from 50.3% to 91.4%. Among them, HNFL-5 strain had a good effect antifungal activity against *Diaporthe citri*, with a inhibition rate of 73.2%, and HNFL-44 strain had a good effect antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, with a inhibition rate of 91.4%. (2) In the experiment of antioxidant activity, the endophytic fungal fermentation broth had good antioxidant activity, the DPPH clearance rate was above 80%, and the total reducing ability absorbance value ranged from 0.279 2 to 0.748 8. (3) It could be seen from the strain identification results that the HNFL-44 strain with antifungal activity was *Alternaria* sp. fungus. This study indicates that the endophytic fungi of *Polygala fallax* have a good ability of inhibiting plant phytopathogenic fungi and antioxidant activity, which lays the foundation for the subsequent exploration of potential new antifungal and antioxidant substances from *P. fallax* endophytic fungi.

Key words: *Polygala fallax*, endophytic fungi, antioxidant, antifungi, identification

植物内生真菌是指长期生活在健康植物体内,但在体内生活的这段时间不会引起宿主产生病害的一类真菌(隋丽等,2021)。药用植物内生真菌具有良好的抗氧化活性、抑菌活性等,在农医药行业的活性产物开发中发挥重要作用。研究表明,链格孢属、间座壳属等内生真菌具有良好的抗氧化活性,殷娜等(2022)从药用植物马利筋中发现具有抗氧化活性的链格孢属和间座壳属内生真菌;程庭峰等(2021)从野生麻花苻的一株 *Cadophora* sp. 内生真菌 Gs-6 发酵液中发现槲皮素等黄酮类物质, DPPH 清除自由基的 IC_{50} 为 $0.039\ 9\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 具有较强的清除活性;寇晓琳等(2020)从青钱柳中发现 3 株能产生黄酮的链格孢属真菌。此外,镰刀菌属、木霉属等对病原菌具有良好的抑制作用,Zhao 等(2020)研究发现 1 株内生真菌 *Seimatosporium* sp. M7SB 41 能够增强宿主植物抵抗蔷薇白粉病的能力,降低感染蔷薇白粉病的风险。Bucarei 等(2019)将一种白僵菌(*Beauveria bassiana*)定殖在西红柿和辣椒植株根部一段时间后发现,其能够减轻由灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)引起的灰霉病病害发生程度。此外,内生真菌燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum*)和木霉属(*Trichoderma*)的康宁木霉(*T. koningii*)和深绿木霉(*T. atroviride*)对柑橘青霉

病,烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)和黑曲霉(*A. niger*)具有良好的防治作用(郭东升等,2020; Erfandoust et al., 2020)。因此,从药用植物内生真菌中获得具有生物活性的次级代谢产物是可行的,药用植物内生真菌次级代谢产物为天然产物的开发提供了强大动力。

黄花倒水莲(*Polygala fallax*),别称黄花远志,远志科(Polygalaceae)远志属(*Polygala*)植物,是一种深受少数民族喜爱的药用植物(翁颖妮等,2020)。其根部富含皂苷、黄酮、多糖类等物质,具有抗衰老、降血糖等多种生物活性(姚志仁等,2020;李根等,2022)。目前,虽然国内外已有许多有关黄花倒水莲化学成分和药理活性的研究,但未曾见到有关黄花倒水莲内生真菌及其次级代谢产物生物活性的研究。有研究表明,从药用植物远志中分离得到的链格孢属内生真菌不仅具有抑菌活性,而且能够产生皂苷类物质、香豆素等抗氧化物质,具有重要的研究价值(王玉君等,2009;付建红和熊东兰,2013)。据此,我们提出黄花倒水莲内生真菌也具有抗氧化活性、抑菌活性的推测。在内生真菌与宿主有着相似活性的基础上,以黄花倒水莲内生真菌为研究对象,以香蕉专化尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)、香蕉具

条叶斑病菌 (*Mycosphaerella fijiensis*)、柑橘树脂病菌 (*Diaporthe citri*)、三七根腐病菌 (*Fusarium oxysporum*)、茄病镰刀菌 (*F. solani*)、叶点霉菌为指示菌 (*Phyllosticta zingiberi*), 评价内生真菌的抑菌效果, 并通过测定内生真菌发酵液 DPPH 清除自由基能力和总还原能力等指标, 评价其抗氧化活性, 为下一步从高活性菌株中筛选活性化合物奠定基础, 也为民族用药黄花倒水莲资源的综合利用提供了另一条途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试 21 株黄花倒水莲内生真菌: 实验室前期于 2020 年 8—11 月从广西灵川、湖南永州、云南文山等地采集的野生黄花倒水莲植株中分离得到。

供试植物病原真菌: 香蕉专化尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)、茄病镰刀菌 (*F. solani*)、三七根腐病菌 (*F. oxysporum*)、香蕉具条叶斑病菌 (*Mycosphaerella fijiensis*)、叶点霉菌 (*Phyllosticta zingiberi*)、柑橘树脂病菌 (*Diaporthe citri*), 由广西大学农学院提供。

1.1.2 培养基 PDA 培养基和 PDB 培养基: 购于北京暖溪汇智科技有限公司, 前者 100 mL 的培养基中含有 2 g 马铃薯淀粉、0.6 g 葡萄糖、2 g 琼脂; 后者 100 mL 的培养基中含有 2 g 马铃薯淀粉、0.6 g 葡萄糖。

1.2 方法

1.2.1 供试菌株抑菌活性测定 初筛和复筛过程均采用平板对峙法 (杨帆等, 2021), 区别在于初筛过程采用五点对峙法, 复筛过程采用两点对峙法。将对峙的 PDA 平板在光照培养箱中静置培养 5~7 d 后, 测量对照组菌落的半径 (R) 和实验组病原真菌菌落朝内生真菌方向生长的半径 (r), 抑菌率取 3 次重复的平均值。抑菌率 (%) = $(R-r)/R \times 100$

1.2.2 供试菌株液体发酵培养 将抑菌活性复筛的 13 株内生真菌在 PDA 培养基上培养 3~7 d 后, 用 0.5 cm 的无菌打孔器在菌落边缘打取大小一致的菌块, 在含有 100 mL PDB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中加入菌块 3 个, 于 25 °C, 140 r·min⁻¹ 的恒温摇床中进行培养 15 d。培养结束后, 利用抽滤的方法将菌丝体和发酵液分开, 然后将

获得的发酵滤液依次用 0.45、0.22 μm 滤膜过滤, 获得无菌发酵滤液, 保存于 4 °C 冰箱备用。

1.2.3 供试菌株抗氧化活性测定 DPPH 清除能力和总还原力是评价抗氧化活性的重要指标, 参照前人的研究方法 (宋新月等, 2018; 金宏杰等, 2019) 对 1.2.2 中的无菌发酵滤液进行 DPPH 清除能力和总还原力测定。

1.2.4 HNFLF-44 菌株的鉴定 采用透明胶带法在莱卡显微镜下观察 HNFLF-44 菌株的菌丝体和孢子形态, 根据真菌形态对照相关资料对菌株进行初步鉴定。分子鉴定则根据真菌 ITS 序列的保守性来进行, 根据真菌 DNA 提取试剂盒说明书提取内生真菌 HNFLF-44 的总 DNA, 以引物 ITS1 (序列为 TCCGTAGGTGAACCTGCGG) 和引物 ITS4 (序列为 TCCTCCGCTTATTGATATGC) 进行 PCR 扩增, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的纯度, 将 PCR 产物送到上海生物工程有限公司进行测序。对测序结果进行处理, 然后将处理好的序列上传到 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 寻找与其相似性最高的菌株序列, 下载与其相似性最高的几组序列作为参考序列, 利用 MEGA7.0 软件进行序列对齐、邻接法 (neighbor-joining) 构建 HNFLF-44 菌株的系统发育树, 在分支上显示 Bootstrap 重复 1 000 次的数值。

2 结果与分析

2.1 供试菌株抑菌活性初筛测定

黄花倒水莲供试菌株抑菌初筛结果如表 1 所示, 供试菌株对 6 种植物病原真菌具有不同程度的拮抗作用 (图 1)。从抑制的病原菌来看, HNFLF-7、HNFLF-26、HNFLF-44、YNLF-32 对香蕉专化尖孢镰刀菌的抑制效果较强, 其中 HNFLF-44 对香蕉专化尖孢镰刀菌的抑制效果最好, 抑菌率为 69.3%。除 HNFLF-9 和 LCRXY-26 对柑橘树脂病菌的抑菌率分别为 49.1% 和 45.9% 外, 其余菌株的抑菌率均超过 50.8%。HNBA-9 对香蕉具条叶斑病菌抑制效果最强, 抑菌率为 69.1%。HNFLF-44 对三七根腐病菌具有 58.9% 的抑菌率。LCPH-5 对茄病镰刀菌抑制效果最好, 抑菌率为 59.0%。所有供试菌株均对叶点霉菌具有较强的抑菌效果, 抑菌率均超过 53.6%。综上所述, HNFLF-44 对 6 种植物病原真菌都具有较强的抑菌活性, 抑菌率均超过 51.3%。

表 1 黄花倒水莲内生真菌初筛抑菌率的测定

Table 1 Determination of inhibition rate primary screening of endophytic fungi of *Polygala fallax*

名称 Name	香蕉专化 尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	香蕉具条 叶斑病菌 <i>Mycosphaerella</i> <i>fijiensis</i>	柑橘树脂病菌 <i>Diaporthe citri</i>	三七根腐病菌 <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	叶点霉菌 <i>Phyllosticta</i> <i>zingiberi</i>	茄病镰刀菌 <i>Fusarium</i> <i>solani</i>
HNFL-5	37.7±0.011 2	66.0±0.014 0	59.45±0.006 1	50.5±0.011 4	58.7±0.008 3	48.2±0.018 1
HNFL-7	67.4±0.007 9	47.0±0.008 3	52.74±0.038 1	35.0±0.020 7	72.7±0.015 4	37.9±0.024 2
HNFL-8	42.0±0.046 5	60.0±0.003 0	60.07±0.035 5	44.3±0.020 7	62.8±0.012 1	45.5±0.008 3
HNFL-9	26.0±0.019 6	49.4±0.028 6	49.10±0.048 6	25.1±0.027 3	65.5±0.044 4	24.8±0.004 9
HNFL-12	38.6±0.023 1	55.0±0.010 0	56.81±0.051 2	50.8±0.020 5	58.5±0.017 8	51.7±0.027 2
HNFL-26	57.1±0.028 2	58.2±0.035 1	57.16±0.038 8	53.6±0.021 0	68.2±0.015 1	47.1±0.013 7
HNFL-44	69.3±0.018 7	59.8±0.022 0	61.3±0.025 2	58.9±0.034 4	70.7±0.018 2	51.3±0.036 0
HNFL-45	34.5±0.011 6	49.1±0.025 6	51.8±0.018 5	43.6±0.019 3	55.2±0.014 3	37.9±0.016 3
HNRXY-1	40.0±0.021 6	50.6±0.006 5	56.8±0.016 5	39.4±0.004 8	66.6±0.009 2	38.8±0.013 1
HNBA-9	27.6±0.004 3	69.1±0.019 9	57.2±0.065 1	44.6±0.031 9	64.2±0.010 4	52.5±0.072 5
LCPH-1	25.6±0.015 2	62.3±0.054 6	54.2±0.027 5	42.9±0.012 0	54.1±0.029 3	50.8±0.078 9
LCPH-5	38.5±0.010 0	67.7±0.035 7	62.2±0.049 1	53.3±0.015 5	60.1±0.022 8	59.0±0.031 6
LCRPH-9	37.7±0.025 1	42.3±0.034 5	56.0±0.018 6	41.3±0.007 9	56.1±0.017 2	41.2±0.011 6
LCLF-16	40.9±0.016 9	63.7±0.074 7	61.3±0.016 1	49.6±0.013 8	61.6±0.015 7	56.4±0.047 8
LCLF-44	41.1±0.040 6	40.9±0.024 4	50.8±0.006 9	35.9±0.016 1	60.0±0.010 9	35.8±0.011 9
LCSXY-9	32.9±0.011 6	55.3±0.008 7	54.5±0.041 4	48.6±0.020 6	53.6±0.017 4	47.0±0.018 2
LCSXY-43	34.1±0.005 6	55.4±0.028 1	58.5±0.015 4	49.2±0.055 3	56.9±0.007 9	48.6±0.013 0
LCRXY-26	39.6±0.010 1	36.9±0.038 8	45.9±0.073 2	31.6±0.033 2	64.6±0.031 9	30.6±0.025 6
LCBA-85	43.4±0.019 5	57.4±0.009 9	54.9±0.044 9	39.8±0.012 0	53.7±0.017 9	42.5±0.007 2
LCBA-133	40.1±0.015 3	59.4±0.009 9	51.7±0.038 1	51.7±0.022 1	53.8±0.007 9	55.6±0.014 5
YNLF-32	64.1±0.019 8	46.8±0.018 4	51.2±0.034 6	41.2±0.016 4	77.5±0.012 0	41.5±0.022 8

注: 数据为平均值±标准误差,以百分数表示。下同。

Note: The data are $\bar{x} \pm s_x$, expressed as percentages. The same below.

其中,对叶点霉菌的抑制效果最强,为 70.7%;其次是对香蕉转化尖孢镰刀菌,抑制率为 69.3%;对茄病镰刀菌的抑制效果较弱,抑菌率仅为 51.3%。

2.2 内生真菌抑菌活性复筛测定结果

黄花倒水莲供试菌株抑菌活性复筛结果如表 2 所示,HNFL-5、HNLF-44 对 6 种植物病原真菌的抑制效果比较好,抑菌率在 50.3%以上,其余菌株的抑菌效果较差。从抑制的病原菌来看,对香蕉专化尖孢镰刀菌抑制效果最强的是 HNFL-44 (91.4%) (图 2),其次是 HNFL-5 (54.0%)。HNLF-44 对香蕉具条叶斑病菌的抑制效果最强 (67.0%),其次是 HNFL-5 (59.4%)。对柑橘树脂病菌、叶点霉菌抑制效果最好的均为 HNFL-5,抑菌率分别为 73.2%和 70.3%;其次是 HNFL-44,抑菌率分别为 67.7%和 67.0%。HNLF-44 对三七根腐病菌、茄病镰刀菌的抑制效果最好,抑制能力均达到 60.7%以上。

2.3 抗氧化活性分析

内生真菌发酵液的总还原能力测定结果如图 3 所示,菌株 HNFL-26、HNLF-44、HNLF-45、LCPH-

9、LCSXY-43、LCRXY-26、LCBA-85、YNLF-32 的发酵液还原力的吸光值均大于 0.5,其余菌株发酵液的吸光值小于 0.4。总还原能力强弱与吸光值大小成正比,由此可知,还原能力最强的菌株是 LCBA-85,其次是 YNLF-32。

内生真菌发酵液清除 DPPH 自由基的结果如图 4 所示,DPPH 清除率都很高,除 HNFL-7 的清除率为 86.90%外,其余菌株的清除率均达 90%以上。DPPH 清除率越大,抗氧化能力越强,表明供试内生真菌发酵液中含有清除 DPPH 自由基的物质,具有较强的抗氧化活性。

2.4 HNFL-44 的鉴定

对香蕉专化尖孢镰刀菌具有强抑菌活性的 HNFL-44 菌株进行鉴定。HNLF-44 菌株在 PDA 平板上生长缓慢,菌落边缘不规则,表面有白色绒毛,菌丝上还附有少量的黄色水珠、菌丝易挑取 (图 5:A)。菌落背面为黄色,产色素,在培养过程中可看到基质由透明色变为黄色 (图 5:B)。培养 10 d 后在显微镜下观察可看到菌丝分支有隔,分生孢子呈淡黄色、倒棒状,表面有横隔和纵隔 (图 5:

表 2 黄花倒水莲内生真菌复筛抑菌率的测定

Table 2 Determination of inhibition rate re-screening of endophytic fungi of *Polygala fallax*

名称 Name	香蕉专化 尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	香蕉具条 叶斑病菌 <i>Mycosphaerella</i> <i>fijiensis</i>	柑橘树脂病菌 <i>Diaporthe</i> <i>citri</i>	三七根腐病菌 <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	叶点霉菌 <i>Phyllosticta</i> <i>zingiberi</i>	茄病镰刀菌 <i>Fusarium</i> <i>solani</i>
HNLF-5	54.0±0.021 1	59.4±0.029 3	73.2±0.015 7	50.3±0.017 6	70.3±0.033 4	51.0±0.030 4
HNLF-7	12.7±0.040 0	7.7±0.008 9	14.2±0.049 5	30.3±0.046 8	49.9±0.018 2	20.8±0.010 2
HNLF-9	17.4±0.020 0	10.0±0.009 4	36.3±0.003 9	32.0±0.022 2	52.6±0.025 8	25.1±0.003 1
HNLF-26	39.7±0.036 1	31.2±0.055 2	44.8±0.041 4	48.0±0.014 5	46.0±0.011 5	46.8±0.016 2
HNLF-44	91.4±0.042 1	67.0±0.024 1	67.7±0.021 7	60.7±0.004 1	67.0±0.011 8	65.7±0.029 0
HNLF-45	37.3±0.038 9	21.2±0.037 4	23.6±0.031 4	41.5±0.018 3	41.0±0.013 2	39.7±0.004 8
LCRPH-9	47.5±0.020 1	27.5±0.018 5	36.2±0.018 9	47.3±0.023 7	53.0±0.027 8	49.5±0.031 2
LCSXY-9	30.7±0.019 2	32.0±0.029 3	21.4±0.045 6	43.0±0.013 9	43.3±0.010 3	40.2±0.040 8
LCSXY-43	46.5±0.010 0	39.1±0.006 6	25.0±0.054 3	41.8±0.015 9	44.7±0.002 1	40.1±0.040 6
LCRXY-26	19.3±0.012	15.2±0.028 0	27.6±0.026 7	38.6±0.017 8	52.8±0.021 6	26.3±0.015 8
LCBA-85	48.0±0.007 6	42.1±0.012 9	33.3±0.028 3	45.7±0.007 9	46.5±0.022 2	48.7±0.022 2
LCBA-133	38.3±0.034 7	47.4±0.043 1	28.6±0.009 8	44.8±0.011 6	47.2±0.016 2	52.9±0.008 3
YNLF-32	8.7±0.022 2	15.7±0.015 9	18.4±0.030 9	25.2±0.012 8	61.3±0.024 4	18.1±0.053 7

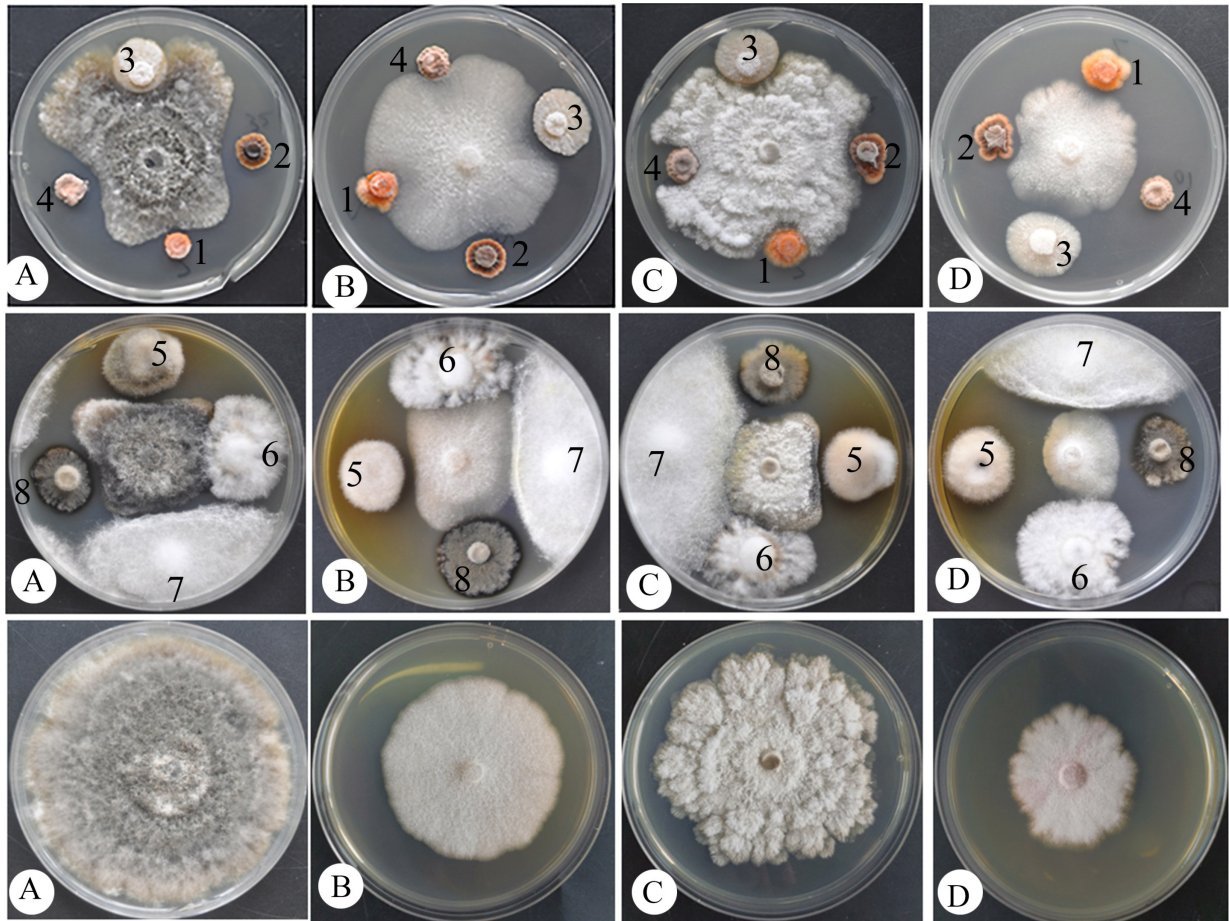
C, D), 根据形态特点将其鉴定为链格孢属真菌。HNLF-44 菌株 ITS 序列经比对后发现, 其 ITS 序列与 *Alternaria burnsii* (NR136119.1) 的相似性为 100%, 由系统发育树图 6 可知, HNLF-44 菌株与 NR136119.1 聚在同一个分支上, 且可信度为 97, 结合形态特点, 将 HNLF-44 鉴定为链格孢属真菌。

3 讨论与结论

植物体内具有生物活性的内生真菌是天然产物开发的重要来源, 长期生活在药用植物体内的内生真菌会趋于与宿主有一致的生物活性, 因此药用植物内生真菌是研究中的重点对象 (侯晓强等, 2015)。为此我们对黄花倒水莲内生真菌的抗氧化活性和抑菌活性进行了研究, 结果发现黄花倒水莲内生真菌不仅具有抑菌活性还具有抗氧化活性, 与丹参种子内生真菌具有抑菌活性、抗氧化活性的结果相似 (刘玉娇等, 2020), 表明黄花倒水莲内生真菌具有可开发利用的基础。

链格孢属内生真菌在拮抗病原菌方面具有良好的作用, 能够通过产生一些交链格孢酚、交替那吡酮等物质对生物产生毒害作用, 是一种很好的生物资源 (Puntschner et al., 2019)。本研究发现, 黄花倒水莲的 1 株链格孢属内生真菌 HNLF-44 对香蕉专化尖孢镰刀菌、柑橘树脂病菌、叶点霉菌等具有良好的拮抗活性, 特别是对香蕉专化尖孢镰刀菌具有 91.4% 的拮抗活性。这表明 HNLF-44

菌株在对峙培养的过程中可能产生了一些对植物病原真菌有害的如交链格孢酚等物质, 进而抑制了病原真菌菌丝的生长。本研究结果与现有的链格孢属内生真菌对植物病原真菌具有拮抗活性的研究结果基本一致, 周兵等 (2011) 研究发现链格孢菌的发酵液产物对小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、烟草灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 等植物病原真菌具有一定的抑制活性; 翟凤艳等 (2011) 认为茄链格孢菌毒素对小麦赤霉病菌和番茄煤污病菌 (*Cladosporium fulvum*) 的菌丝生长和孢子萌发均具有抑制作用; 陈思杰等 (2022) 发现 *Alternaria alternata* 的 50% 浓度发酵滤液对枸杞根腐病菌 (*Fusarium oxysporum*) 的分生孢子抑制率为 91.48%, 挥发性物质对菌丝生长的抑制率为 94.10%; 苗智等 (2016) 从夹竹桃中筛选到 1 株对白菜黑斑病菌 (*Cabbage shading germs*)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 等 8 种病原菌具有抑制作用的链格孢属真菌 SPS-04, 从其发酵产物中发现了交链孢酚的存在。此外, 链格孢属内生真菌还可以产生与宿主相同或相似的抗氧化活性物质, 如黄酮类物质等。李姝诺等 (2009) 从越橘中发现了一株可以产黄酮化合物的细链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*); 寇晓琳等 (2020) 从药用植物青柳的内生真菌中发现了 3 株能够产生的黄酮类物质的链格孢属内生真菌。因此, 我们认为链格孢属真菌 HNLF-44 菌株具有抗氧化活性的原因可能是其在进行发酵培养的过程中产生了诸如黄酮类的抗氧

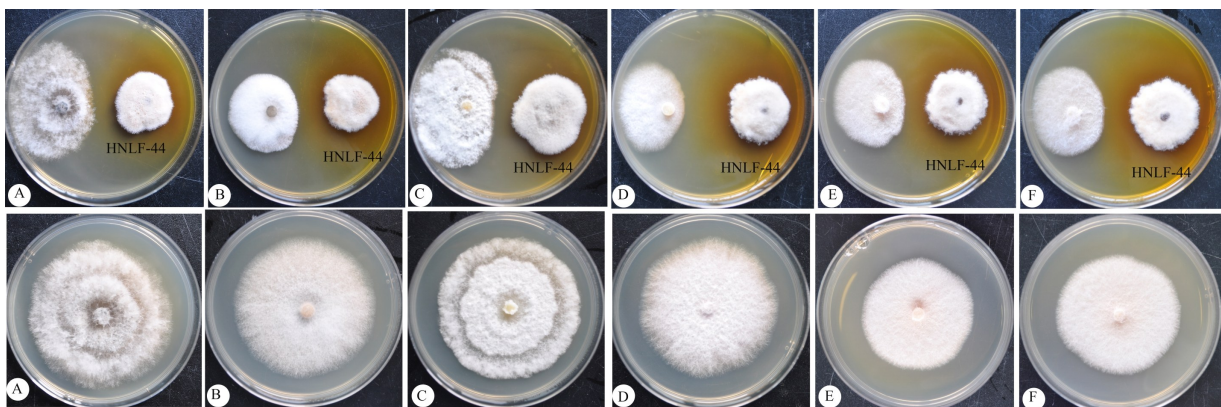


A. 叶点霉菌; B. 茄病镰刀菌; C. 柑橘树脂病菌; D. 香蕉专化尖孢镰刀菌。

A. *Phyllosticta zingiberi*; B. *Fusarium solani*; C. *Diaporthe citri*; D. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. 1. LCLF-7; 2. YNLF-32; 3. LCRXY-26; 4. HNFLF-10; 5. HNFLF-44; 6. LCSY-43; 7. LCPH-1; 8. LCSXY-9.

图 1 供试菌株对病原真菌的抑菌作用

Fig. 1 Antifungal activity of endophytic fungi isolated from *Polygala fallax*



A. 叶点霉菌; B. 香蕉具条叶斑病菌; C. 柑橘树脂病菌; D. 香蕉专化尖孢镰刀菌; E. 茄病镰刀菌; F. 三七根腐病菌。

A. *Phyllosticta zingiberi*; B. *Mycosphaerella fijiensis*; C. *Diaporthe citri*; D. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; E. *F. solani*; F. *F. oxysporum*.

图 2 HNFLF-44 对 6 种植物病原真菌的影响

Fig. 2 Effects of HNFLF-44 on six phytopathogenic fungi

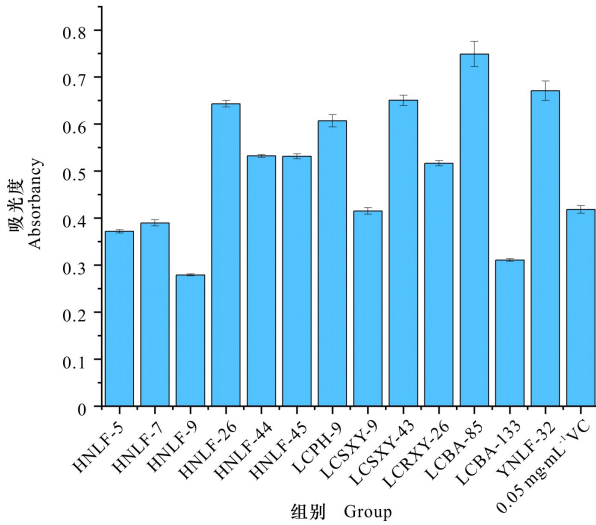


图 3 发酵液总还原力测定

Fig. 3 Determination of total reducing power of fermentation broth

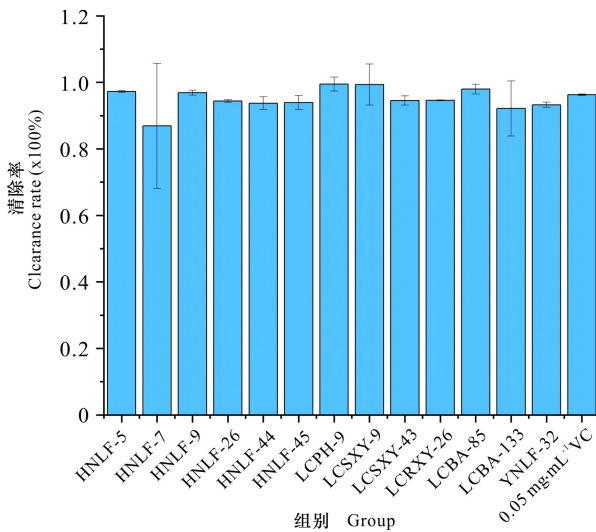
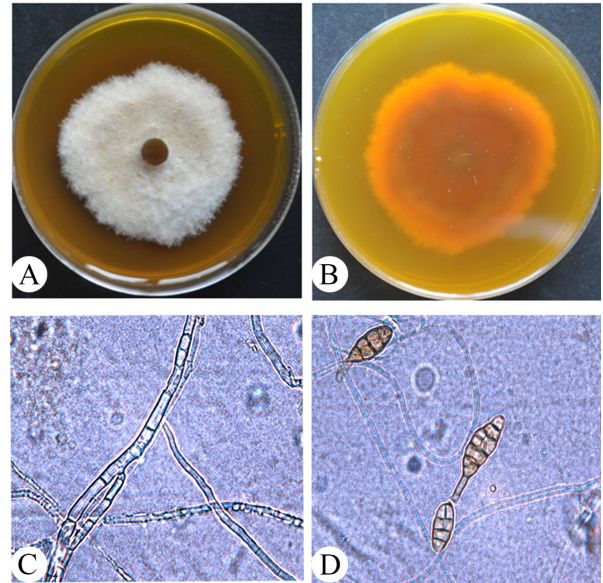


图 4 发酵液 DPPH 清除能力测定

Fig. 4 Determination of DPPH scavenging ability of fermentation broth

化活性物质,这表明 HNLF-44 在与黄花倒水莲长期共存的过程中可能获得了产抗氧化活性物质的能力。因此,后续我们需要对 HNLF-44 的菌株的次级代谢产物进一步研究,找出其中的抗氧化和抑菌活性物质。

综上所述,本研究从黄花倒水莲内生真菌中发现的一株链格孢属 HNLF-44 菌株具有良好的抑菌、抗氧化活性,为后续从 HNLF-44 菌株中深入挖掘抑菌、抗氧化活性物质奠定了优良基础。



A. 菌落正面; B. 菌落背面; C. 菌丝体; D. 分生孢子。
A. Colony front; B. Colony back; C. Mycelium; D. Conidium.

图 5 菌株 HNLF-44 的菌落及孢子形态

Fig. 5 Morphological characteristics of HNLF-44 strain

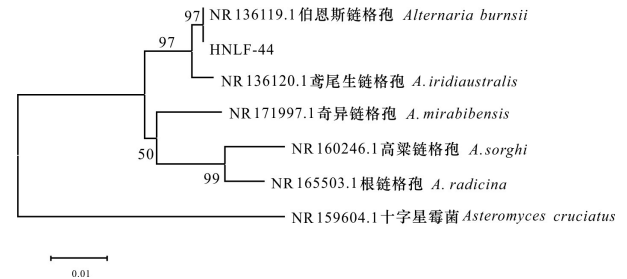


图 6 基于 ITS 序列构建的 HNLF-44 菌株的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of HNLF-44 strain constructed based on ITS sequence

参考文献:

BUCAREI BL, IGLESIAS AF, GONZÁLEZ MG, et al., 2019. Antifungal activity of *Beauveria bassiana* endophyte against *Botrytis cinerea* in two *Solanaceae* crops [J]. *Microorganisms*, 8(1): 65.
CHEN SJ, ZHANG T, JIA BS, et al., 2022. Study on antibacterial activity of dark septate endophytes against *Fusarium oxysporum* in Chinese wolfberry [J]. *Acta Horti Sin.*, 49(7): 1519-1531. [陈思杰, 张涛, 贾宝森, 等, 2022. 深色有隔内生真菌对枸杞根腐病菌抑菌活性 [J]. *园艺学报*, 49(7): 1519-1531.]
CHENG TF, LÜ DJ, WANG H, et al., 2022. Isolation, identification and antioxidant activity of endophytic fungi producing flavonoids from *Gentiana straminea* Maxim

- [J]. Mol Plant Breed, 20(19): 6541-6549. [程庭峰, 吕东晋, 王环, 等, 2022. 麻花苳产黄酮类物质内生真菌的分离与鉴定及抗氧化活性分析 [J]. 分子植物育种, 20(19): 6541-6549.]
- ERFANDOUST R, HABIBPOUR R, SOLTANI J, 2020. Antifungal activity of endophytic fungi from Cupressaceae against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* [J]. J Mycol Med, 30(3): 100987.
- FU JH, XIONG DL, 2012. Isolation of endophytic fungus from *Polygala hybrida* DC cultivated and the study on its bioactive metabolites [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci Ed), 51(5): 929-934. [付建红, 熊东兰, 2012. 新疆远志内生真菌的分离及其代谢产物分析 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 51(5): 929-934.]
- GUO DS, YUAN CH, ZHAI YY, et al., 2020. Citrus endophytic *Fusarium avenaceum* Gds-1 for the control of citrus blue mold [J]. Chin J Pestic Sci, 22(5): 782-790. [郭东升, 原晨虹, 翟颖妍, 等, 2020. 柑橘内生燕麦镰刀菌 Gds-1 对柑橘青霉病的防治研究 [J]. 农药学报, 22(5): 782-790.]
- HOU XQ, REN XY, FU YJ, et al., 2015. Study on antimicrobial activity and classification of endophytic fungi from *Glehnia littoralis* [J]. Chin J Integr Med, 46(19): 2932-2936. [侯晓强, 任秀艳, 付亚娟, 等, 2015. 北沙参内生真菌的抑菌活性与分类研究 [J]. 中草药, 46(19): 2932-2936.]
- JIN HJ, CAO H, LIU H, et al., 2019. Isolation of endophytic fungi from *Cinnamomum camphora* leaves, screening an identification of biologically active strains [J]. Biotechnol Bull, 35(3): 53-58. [金宏杰, 曹红, 刘红, 等, 2019. 龙脑樟树叶内生真菌的分离及生物活性菌株的筛选鉴定 [J]. 生物技术通报, 35(3): 53-58.]
- KOU XL, XIE N, WU CE, et al., 2020. Isolation and identification of endophytic fungi from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja [J]. J Nanjing For Univ(Nat Sci Ed), 44(2): 26-34. [寇晓琳, 谢楠, 吴彩娥, 等, 2020. 青钱柳产黄酮类物质真菌的分离与鉴定 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 44(2): 26-34.]
- LI G, PAN ZH, NING DS, et al., 2022. Isolation, identification and antioxidant activity of the flavonoid glycosides from *Polygala fallax* flower [J]. Guihaia, 42(5): 790-795. [李根, 潘争红, 宁德生, 等, 2022. 黄花倒水莲花中黄酮苷类成分的分离、鉴定及抗氧化活性研究 [J]. 广西植物, 42(5): 790-795.]
- LIU YJ, SONG LT, GUO SX, et al., 2020. Isolation, identification and biological activity of an endophytic fungus strain ZJZD-3 from *Salvia miltiorrhiza* seed [J]. Sci Technol Food Ind, 41(4): 67-73. [刘玉娇, 宋乐天, 郭书欣, 等, 2020. 一株丹参种子内生真菌 ZJZD3 的分离鉴定及其生物活性 [J]. 食品工业科技, 41(4): 67-73.]
- LI SN, LI YD, WANG Q, 2009. Bolting flavonoid-producing endophytic fungi from *Vaccinium* [J]. J Jilin Agric For Univ, 31(5): 587-591. [李姝诺, 李亚东, 王琦, 2009. 越橘产黄酮类化合物内生真菌的筛选 [J]. 吉林农业大学学报, 31(5): 587-591.]
- MIAO Z, MA YM, KONG Y, et al., 2016. Isolation and secondary metabolites antibacterial activity of J14, an endophytic fungus in *Nerium indicum* [J]. Guizhou Agric Sci, 44(1): 88-92. [苗智, 马养民, 孔阳, 等, 2016. 夹竹桃内生真菌 J14 次生代谢产物的分离和抑菌活性 [J]. 贵州农业科学, 44(1): 88-92.]
- PUNTSCHER H, HANKELE S, TILLMANN K, et al., 2019. First insights into *Alternaria* multi-toxin *in vivo* metabolism [J]. Toxicol Lett, 301: 168-178.
- SONG XY, TANG BX, QIU JZ, et al., 2018. Isolation and identification of endophytes from *Arundina graminifolia* and its antioxidant activity [J]. Mod Food Sci Technol, 34(2): 82-88. [宋新月, 汤冰雪, 邱君志, 等, 2018. 竹叶兰内生真菌的分离鉴定及其抗氧化活性研究 [J]. 现代食品科技, 34(2): 82-88.]
- SUI L, WAN TY, LU Y, et al., 2021. Review of fungal endophytes on plant growth promotion and stress resistance [J]. Chin J Biol Con, 37(6): 1325-1331. [隋丽, 万婷玉, 路杨, 等, 2021. 内生真菌对植物促生、抗逆作用研究进展 [J]. 中国生物防治学报, 37(6): 1325-1331.]
- WANG YJ, CUI JL, SU H, et al., 2009. Inhibitory activity screening of endophytic fungi from *Polygala tenuifolia* willd [J]. Microbiol Chin, 36(3): 404-411. [王玉君, 崔晋龙, 苏红, 等, 2009. 远志内生真菌抑菌活性筛选 [J]. 微生物学通报, 36(3): 404-411.]
- WENG YN, ZHU J, WANG QB, 2020. Induction of hairy roots of *Polygala fallax* Hemsl and determination of total saponins in callus [J]. J Chin Med Mat, 43(9): 2099-2102. [翁颖妮, 朱婧, 王琴波, 等, 2020. 黄花倒水莲毛状根诱导及其愈伤组织总皂苷的测定 [J]. 中药材, 43(9): 2099-2102.]
- YAO ZR, LI Y, ZHU KM, et al., 2020. Antioxidant and hypoglycemic activities of different parts partitioned from the ethanol extract of *Polygala fallax* Hemsl [J]. Sci Technol Food Ind, 41(7): 55-59. [姚志仁, 李豫, 朱开梅, 等, 2020. 黄花倒水莲不同极性部位抗氧化和降血糖活性研究 [J]. 食品工业科技, 41(7): 55-59.]
- YANG F, LIU CL, LIU L, et al., 2021. Isolation of endophytic fungi from medicinal plants and screening for antagonistic strains [J]. Plant Prot, 47(5): 78-85. [杨帆, 刘春来, 刘亮, 等, 2021. 野生药用植物内生真菌的分离及拮抗菌株筛选 [J]. 植物保护, 47(5): 78-85.]
- YIN N, SONGNL, PU XJ, et al., 2022. Biological activities of endophytic fungi from *Asclepias curassavica* [J]. Guihaia, 42(5): 781-789. [殷娜, 宋娜丽, 普晓佳, 等, 2022. 民族药马利筋内生真菌生物活性研究 [J]. 广西植物, 42(5): 781-789.]
- ZHOU B, YAN XH, PENG F, et al., 2011. Antifungal activities of *Alternaria alternata* metabolites [J]. J Fujian Agric For Univ (Nat Sci Ed), 40(4): 416-420. [周兵, 闫小红, 彭峰, 等, 2011. 链格孢菌代谢产物的抑菌活性 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 40(4): 416-420.]
- ZHAI FY, ZHAO RY, YANG R, et al., 2011. Bacteriostatic activity of TIC and TOC extracted from *Alternaria solani* [J]. Guizhou Agric Sci, 39(2): 97-98. [翟凤艳, 赵荣艳, 杨蕊, 等, 2011. 茄链格孢毒素抑菌活性的研究 [J]. 贵州农业科学, 39(2): 97-98.]
- ZHAO Y, JI XL, SHEN T, et al. 2020. Fungal endophytic communities of two wild *Rosa* varieties and the role of an endophytic *Seimatosporium* sp. in enhancing host plant powdery mildew resistance [J]. Plant Soil, 447(1-2): 553-564.