

网络出版时间:2018-09-27 09:46

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.04.017

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180927.0945.034.html>

1 株亳菊内生菌的分离鉴定及其生物活性分析

王贵生, 陆娟, 唐娟, 余梅霞, 朱玉, 李庆芬, 唐俊

(阜阳师范学院 生物与食品工程学院, 安徽 阜阳 236037)

【摘要】【目的】分离筛选具有抑菌、降解纤维素及抗氧化等功能的亳菊内生菌,为其在农业上的开发应用奠定基础。【方法】以株龄 9 个月的安徽亳菊为材料,分别取根、茎、叶、花 4 部分,采用平板培养法从中分离内生菌菌株,并在平板上筛选和检测分离菌株对玉米弯孢菌、黄瓜枯萎菌、小麦赤霉菌、串珠镰刀菌、瓜炭疽菌、茶叶轮斑菌等 6 种植物病原菌的抑菌活性,测定目标菌株 BJF10 对纤维素的降解活性和 DPPH 的清除能力,根据菌体形态特征和 ITS 序列系统发育树对菌株 BJF10 进行鉴定。【结果】从亳菊的根、茎、叶、花中共获得了 56 株内生菌菌株,其中菌株 BJF10 对 6 种植物供试病原菌均有较强的拮抗作用,抑菌率均在 50% 以上;菌株 BJF10 培养第 4 天的纤维素降解活性达到最强,培养 3 d 时羧甲基纤维素酶(CMCase)和滤纸酶(FPase)的活力达到最高,分别为 180.32 和 81.46 U/mL;BJF10 的 7 d 培养上清液对 DPPH 的清除率可达 67.7%;根据形态特征及 ITS 序列的系统发育分析,将菌株 BJF10 鉴定为柄孢壳菌属(*Zopfiella* sp.)。【结论】柄孢壳菌属亳菊内生真菌 BJF10 菌株具有拮抗植物病原菌、降解纤维素、抗氧化等生物活性。

【关键词】 亳菊;内生菌;抑菌活性;纤维素降解;抗氧化活性

【中图分类号】 S567.9;Q93-331

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)04-0138-08

Isolation, identification and biological activity analysis of an endophytic fungus from *Chrysanthemum morifolium* cv. Boju

WANG Guisheng, LU Juan, TANG Juan, YU Meixia,
ZHU Yu, LI Qingfen, TANG Jun

(School of Biology and Food Engineering, Fuyang Normal University, Fuyang, Anhui 236037, China)

Abstract:【Objective】The paper aimed to isolate and screen endophytic fungi with ability of antifungus, antioxidation and cellulose degradation from *Chrysanthemum morifolium* cv. Boju. It may lay the foundation for further development and application in agriculture.【Method】The 9-month-old *Chrysanthemum morifolium* cv. Boju was divided into roots, stems, leaves, and flower parts. Antagonism of endophytic fungus BJF10 against *Curvularia lunata*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lagenarium* and *Pestalotiopsis theae* were evaluated by plate confrontation assay. The CMC enzyme activity, FPA activity and ability of scavenging DPPH were also studied. The strain BJF10 was identified according to the morphological features and ITS sequence analysis.【Result】The endophytic fungus strain BJF10 has strong antagonistic effects on six plant pathogens and the inhibitory rate was above 50%. The strain reached the highest cellulase activity after incubation for four days. The CMC enzyme activity and FPA activity reached 180.32 and 81.46 U/mL, respectively. The DPPH scavenging

【收稿日期】 2018-02-02

【基金项目】 阜阳市政府与阜阳师范学院横向合作项目(XDXH2016007);安徽高校省级自然科学研究一般项目(2014KJ018);阜阳师范学院研究生创新研究计划项目(2017CXJH05,2017CXJH07)

【作者简介】 王贵生(1991-),男,安徽庐江人,在读硕士,主要从事农业微生物学研究。E-mail:2278917667@qq.com

【通信作者】 唐俊(1975-),男,安徽桐城人,教授,硕士生导师,主要从事农业及环境微生物学研究。E-mail:tj751@163.com

reached 67.7% by fermentation supernatant of BJF10. The strain BJF10 was identified as *Zopfiella* sp. based on morphological characteristics and ITS sequence analysis. 【Conclusion】 The endophytic fungus BJF10 has good ability of resistance to plant pathogens, cellulose degradation, and antioxidation.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* cv. Boju; endophytes; antimicrobial activity; cellulose degradation; antioxidation activity

内生菌(endophytes)是指存活于健康植物组织内,但不引发宿主植物出现明显感染症状的微生物类群,其与宿主存在着和谐的共生关系^[1]。一方面,宿主植物为内生菌提供营养;另一方面,内生菌产生的具有促生、抗菌的活性代谢物促进了植物的生长发育,提高了植物的抗逆境、抗胁迫和抗病害能力,甚至还可以产生与宿主相同或相似的活性物质^[2-3]。植物内生菌具有丰富的多样性,在植物的各种组织和器官内部广泛存在,是植物微生态系统的重要组成部分,包含植物体内所有能培养和不能培养的共生、寄生、腐生微生物,分为内生真菌(*Endophytic fungi*)、内生细菌(*Endophytic bacteria*)和内生放线菌(*Endophytic actinomycetes*)三大类。植物内生菌对植物生长的影响表现为促进、抑制、无作用3种,其中大多数内生菌对植物繁殖生长无明显影响,或其影响在现阶段技术条件下尚不能检测。研究表明,在已分离筛选的内生菌中,对植物生长发育起促进作用的内生菌有5%~10%,在一定条件下危害宿主植物的有10%~20%^[4-5];然而,同一种菌定殖于不同的宿主植物中可能会表现出不同的生物学作用。目前,已经从内生真菌中分离出来生物碱、黄酮、醌类、环肽、萜类、脂肪酸、甾体等多种天然代谢产物,其中部分物质具有抗菌、杀虫、抗肿瘤、抗癌、抗病毒、降血糖等多种生物活性^[6-7]。因此,从药用植物中分离筛选内生菌已成为人们寻找新型活性物质的重要来源。

主产于安徽亳州的药用菊科植物亳菊(*Chrysanthemum morifolium* cv. Boju)与杭菊、贡菊、滁菊并称“四大药菊”,《中药大辞典》和《中药志》等认为,亳菊在药用菊花中品质最佳。亳菊具疏风散热、解暑明目之功效,历来都是中医所用菊花品种的首选^[8]。研究发现,亳菊具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗衰老等多种药理作用^[9]。但是目前对亳菊的研究主要集中于组织培养、化学成分分析、采后加工工艺和脱病毒技术等方面^[10-12],关于亳菊内生真菌的研究尚鲜见报道。因此,分离筛选亳菊内生真菌并对其生物活性开展研究,具有重要的现实意义和开发利用潜力。

本研究从亳菊中分离筛选对常见植物病原菌具有抑制作用的活性内生菌株,对其进行纤维素降解、抗氧化等指标测定,并对活性较强的菌株进行形态学及分子生物学鉴定,以期丰富生物防治菌、纤维素降解菌资源,并为寻找新型抗氧化物质及生物菌肥的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植株 亳菊来源于安徽省亳州市谯城区中药材种植基地,植株高60~80 cm,茎直多分枝,白色绒毛包被;叶淡绿色,呈卵形,长4~7 cm,宽3~6 cm;株龄9个月,植株健壮,无病虫害。

1.1.2 供试病原菌 玉米弯孢菌(*Curvularia lunata*) CY1、黄瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporum*) FH1、小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*) FM1、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*) F1、瓜炭疽菌(*Colletotrichum lagenarium*) CG1、茶叶轮斑菌(*Pestalotiopsis theae*) PC1,保存于安徽阜阳师范学院微生物实验室。

1.1.3 主要试剂 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(DPPH)、PCR反应试剂盒、PCR产物纯化试剂盒等,均购于上海生工生物工程股份有限公司。

1.1.4 培养基 所用培养基有马铃薯蔗糖培养基(PDA)、LB培养基、羧甲基纤维素钠培养基^[13]、羧甲基纤维素酶(CMCase)活性检测培养基^[14]和滤纸酶(FPase)活性检测培养基^[13]。

1.2 方法

1.2.1 亳菊植株的消毒 将亳菊健康植株先用流水冲洗干净,晾干水分后将其剪成根、茎、叶、花等部分,于超净工作台中进行表面消毒:先用体积分数75%酒精浸泡3 min,无菌水冲洗3次;再用体积分数0.1%升汞漂洗30 s(或体积分数10%的次氯酸钠浸泡5 min),无菌水冲洗3~4次。具体消毒方法为酒精、升汞组合消毒和酒精、次氯酸钠组合消毒^[15]。

1.2.2 亳菊内生菌的分离 将消毒处理的亳菊,在超净工作台中晾干后,于无菌条件下按根、茎、叶、花

等部位分别切成 1 cm×1 cm 的小块,切取的组织块最好是植物组织内部已除去暴露在外环境最外层组织的部分,以利于植物内部内生菌的长出。将无菌小块均匀放置于 PDA 和 LB 平板培养基内,每个平皿中等距接种 4 块,同时做 3 个平行,分别置于 28 和 37 °C 条件下培养。

在内生菌分离过程中,设置空白对照试验,以确保分离得到的菌株为毫菊内生菌。将表面消毒过的上述材料不做任何剪切,直接接种到分离培养基平板上,置于相同条件下培养,多次重复,检查是否有菌长出。收集最后一次无菌水的漂洗液,将其涂布至空白平板上与试验组一起培养。若对照平板上无菌落出现,则表明植物组织表面灭菌彻底,说明处理组平板上长出的菌落是内生真菌,否则说明植物表面消毒不彻底,有非内生菌混入。

1.2.3 毫菊内生菌的纯化 待毫菊材料切口处长出菌后,挑取菌丝或菌落,转接至新的 PDA 和 LB 培养基上继续培养,最后对所分离的内生菌进行纯化,将纯化的毫菊内生菌转接到相应培养基斜面上培养,之后于 4 °C 冰箱中保存备用。

1.2.4 内生菌抑菌活性检测 (1)菌株抑菌活性。用无菌打孔器(直径 5 mm)在供试病原菌和毫菊内生菌株边缘等距处取菌饼,再将其对称放置于距 PDA 平板中心 15 mm 处,设置 3 个重复,以仅在中心接种病原菌的平板为对照(CK),28 °C 培养 3 d,分别测量处理组和对照组病原菌的半径,并计算抑菌率:抑菌率=(对照菌落半径-处理菌落半径)/(对照菌落半径-2.5 mm)×100%。

(2)对峙培养菌丝的显微观察。用灭菌毛刷蘸取熔化的无菌 PDA 培养基,刷在已灭菌的载玻片上,制成 1 mm 厚的 PDA 膜,再分别接种 2 mm×2 mm 内生菌和供试病原菌的菌丝块于载玻片两端,二者相距 2 cm,25 °C 培养 24~72 h,用显微镜观察并拍照^[16]。

1.2.5 内生菌纤维素降解能力测定 (1)定性判定。将单菌落分别点种在羧甲基纤维素钠培养基上,28 °C 培养 4 d。用 1 mg/mL 刚果红染色 15 min,倾去染液,再加入 1 mol/L 的氯化钠溶液漂洗,15 min 后倒掉氯化钠溶液,测量透明圈的直径与菌落直径,通过透明圈直径与菌落直径比值判定菌株纤维素降解能力的强弱。

(2)定量测定。DNS 法测定葡萄糖吸光值,以 540 nm 处的吸光度值(OD₅₄₀)为横坐标(x)、葡萄糖质量浓度(mg/mL)为纵坐标(y),绘制葡萄糖标准

曲线,得回归方程 $y = 0.1776x + 0.0056$, $R^2 = 0.9985$ 。将抑菌率较高的菌株接种到 CMCase 检测培养基及 FPase 检测培养基上,于 28 °C、160 r/min 分别振荡培养 1~7 d,每天取上清液 5 000 r/min 离心 10 min,分别检测 CMCase 及 FPase^[13-14]。酶活力单位的定义为:以每毫升发酵上清液酶促反应 30 min 释放 1 μg 葡萄糖为 1 个酶活单位(U)。

CMCase 测定时,将 1 mL 发酵上清液加入到 1 mL 体积分数 1% CMC-Na 溶液(由 0.2 mol/L pH 4.8 的乙酸缓冲液配制)中,以沸水灭活 10 min 的发酵上清液为对照,充分混匀后于 50 °C 酶促反应 30 min,取出后迅速加入 DNS 试剂 3 mL,置于沸水浴中显色 10 min,流水冷却至室温,再用去离子水定容至 25 mL,摇匀,用对照管调零,测定 540 nm 处的吸光度值,根据葡萄糖标准曲线计算还原糖的量。

FPase 测定时,将 1 mL 发酵上清液加入到 1 mL 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液中,并加入滤纸条(6 cm×1 cm),使滤纸条浸泡于液体中混匀,50 °C 酶促反应 30 min,以沸水灭活 10 min 的发酵上清液为对照,DNS 法测定还原糖生成量。

1.2.6 内生菌 DPPH 清除能力的测定 用无菌打孔器(直径 5 mm)取菌碟,将其接种至 100 mL PDA 液体培养基中,于 28 °C、120 r/min 振荡培养 7 d 后,取上清液经 0.22 μm 无菌滤膜过滤得无菌发酵液,4 °C 保存备用。

精确称取 DPPH 粉末 0.001 97 g,无水乙醇溶解并定容至 100 mL,配制成 DPPH 母液(0.05 mol/L),4 °C 避光保存。依次精确量取 0.4,0.8,1.2,1.6,2.0,2.4,3.2,4.0 mL 的 DPPH 母液,分别加无水乙醇至 4.00 mL,测定 517 nm 处吸光度值,以无水乙醇作为空白对照,绘制标准曲线,得回归方程 $y = 9.2956x + 0.0043$, $R^2 = 0.9996$,其中 y 为吸光度值, x 为 DPPH 浓度。

向 2 mL DPPH 母液中加入 1 mL 无菌发酵液和 2 mL 无水乙醇,混匀,25 °C 水浴 30 min,以 0.5 mg/mL Vc 为阳性对照测 517 nm 处吸光度值,计算自由基清除率。

自由基清除率= $[1 - (A_1 - A_2) / A_3] \times 100\%$ 。式中: A_1 为发酵液或 Vc 的吸光度值, A_2 为背景溶液(发酵液或 Vc)不加 DPPH 时的吸光度值, A_3 为空白对照(蒸馏水代替发酵液或 Vc)的吸光度值^[17-18]。

1.2.7 内生菌的鉴定 (1)形态特征。平板培养观察菌落的大小、颜色、表面、边缘及菌落每天生长速

度等宏观特征,显微观察插片培养的内生真菌菌丝和孢子形态等微观性状^[19]。

(2)分子生物学特征。内生菌液体发酵 3 d,抽滤收集菌丝体,用无菌水冲洗 3 遍。用滤纸吸干水分,于-70℃保存备用。采用改进 SDS 法提取内生菌基因组 DNA^[20],以基因组 DNA 为模板,用真菌 ITS 基因通用引物进行 PCR 扩增,扩增反应所用引物为 ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC)和 ITS5(GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)。PCR 反应程序为:95℃ 3 min;95℃ 45 s,55℃ 35 s,72℃ 1.5 min,34 个循环;72℃ 5 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物,用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。将 PCR 反应产物纯化后送上海生工生物工程股份有限公司测序。根据测序结果,在 GenBank 数据库中进行搜索,搜索同源序列。选取代

表性菌株序列进行进一步分析,利用 MEGA 6.0 软件进行系统发育分析,用 Neighbor-joining 法构建系统发育树,并用 Bootstrap(1 000 次重复)进行检验。

2 结果与分析

2.1 亳菊内生菌的分离的纯化

从亳菊的根、茎、叶、花中共分离了 56 株内生菌,其中细菌有 31 种、真菌 25 种。从根中分离的内生菌最多,其次是茎、叶、花。

2.2 抑菌活性菌株的筛选

通过对 56 株亳菊内生菌进行抑菌试验,发现 1 株真菌 BJF10 对玉米弯孢菌等 6 种植物病原菌均具有很强的抑菌活性,6 种植物病原菌在 PDA 平板上的培养特征及菌株 BJF10 对其的抑制作用见图 1 和图 2。

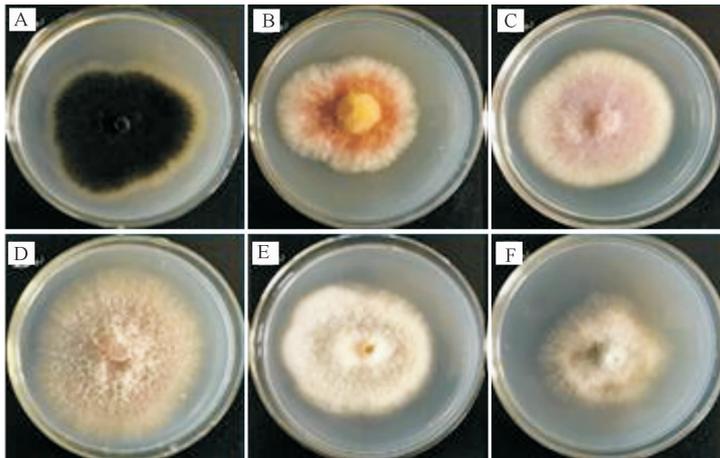


图 1 6 种植物病原菌在 PDA 平板上的培养特征
A. 玉米弯孢菌 CY1;B. 小麦赤霉菌 FM1;C. 串珠镰刀菌 F1;D. 黄瓜枯萎菌 FH1;E. 瓜炭疽菌 CG1;F. 茶叶轮斑菌 PC1;图 2~4 同
A. *C. lunata* CY1;B. *F. graminearum* FM1;C. *F. monili forme* F1;D. *F. oxysporum* FH1;
E. *C. lagenarium* CG1;F. *P. theae* PC1;The same for Fig. 2-4

图 1 6 种植物病原菌在 PDA 平板上的培养特征

Fig. 1 Characteristics of six plant pathogenic fungi in PDA medium

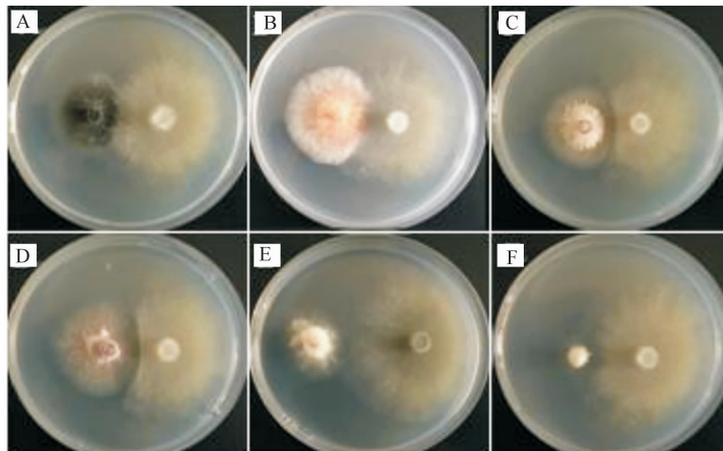
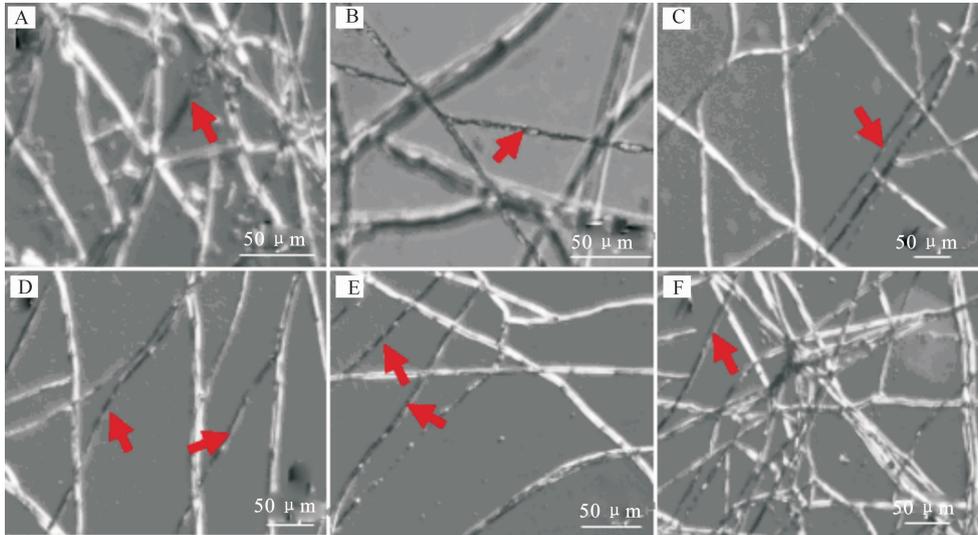


图 2 菌株 BJF10 对 6 种植物病原菌的抑制作用

Fig. 2 Antifungal activities of the strain BJF10 against six plant pathogenic fungi

观察发现, BJF10 繁殖迅速, 培养 24 h 菌落直径约为 20 mm, 培养 48 h 菌落直径为 42 mm, 其生长速度约是其他植物病原菌的 2 倍, 且出现了包围覆盖病原菌的抑菌现象。菌株 BJF10 接种 2 d 后, 与病原菌开始互动, 使对峙的植物病原菌菌丝的正常生长受到明显抑制, 导致其不能正常向外扩展延伸。培养 4 d 后, 内生菌 BJF10 占领大部分营养空间, 且覆盖部分病原菌菌落(图 2)。

显微观察结果(图 3)表明, BJF10 菌丝与病原菌菌丝相互交错生长, 但未对病原菌产生明显缠绕或致畸现象。结合平板对峙(图 2)和显微观察结果推测, BJF10 主要是通过竞争生存空间和营养成分来抑制病原菌的生长。由图 4 可知, BJF10 对 6 种植物病原菌的抑菌率均在 50% 以上, 其中对小麦赤霉菌的抑菌率最低(51%), 对玉米弯孢病菌的抑菌率最高(61%)。



箭头所指的是 BJF10 菌丝

The arrow points to BJF10 mycelium

图 3 BJF10 与 6 种植物病原菌对峙培养的显微观察

Fig. 3 Microscopic observation on the cultivation of BJF10 and six plant pathogenic fungi

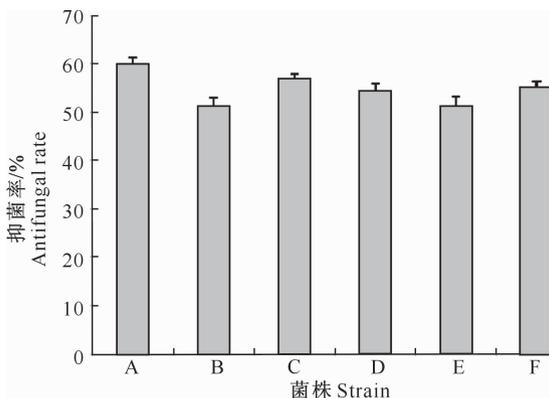


图 4 菌株 BJF10 对 6 种植物病原菌的抑菌活性

Fig. 4 Antifungal activity against six plant pathogenic fungi by strain BJF10

2.3 菌株 BJF10 的纤维素降解能力

菌株 BJF10 在纤维素降解菌筛选培养基上能够生长, 经刚果红染色后产生明显的纤维素降解圈(图 5), 28 °C 培养 4 d 后降解圈直径与菌落直径的比值较大, 为 2.20 ± 0.41 , 初步说明内生菌 BJF10 具有较强的纤维素降解能力。

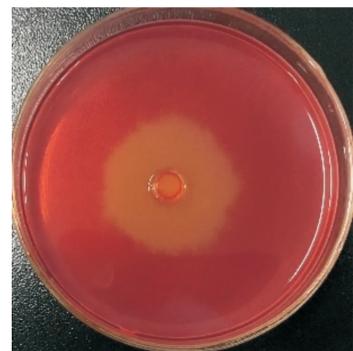


图 5 菌株 BJF10 的纤维素降解能力

Fig. 5 Cellulose degradation capability test for strain BJF10

将菌株 BJF10 连续液体培养 1 周, 根据葡萄糖标准曲线计算发酵上清液的还原糖生成量并计算 CMCase 和 FPase 的活力。由图 6 和图 7 可知, 随着发酵时间延长, 菌株 BJF10 发酵液上清中的 CMCase 和 FPase 的活力均呈先升后降趋势, 且都在培养 3 d 时达到最高, 分别为 180.32 和 81.46 U/mL。

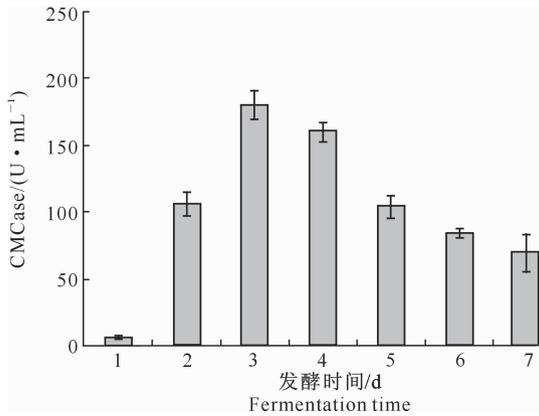


图 6 不同培养时间菌株 BJF10 培养液中 CMCase 的活力

Fig. 6 CMCase activity of culture supernatant from strain BJF10 at different culture time

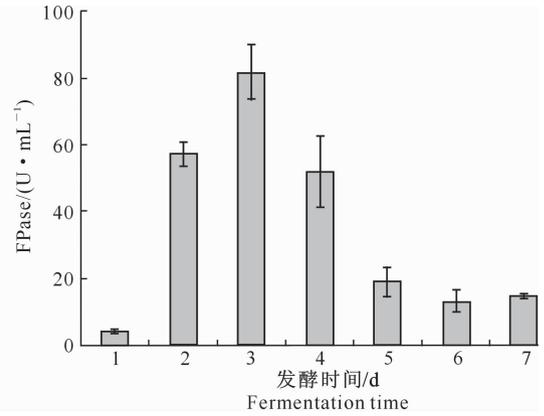


图 7 不同培养时间菌株 BJF10 培养液中 FPase 的活力

Fig. 7 FPase activity of culture supernatant from strain BJF10 at different culture time

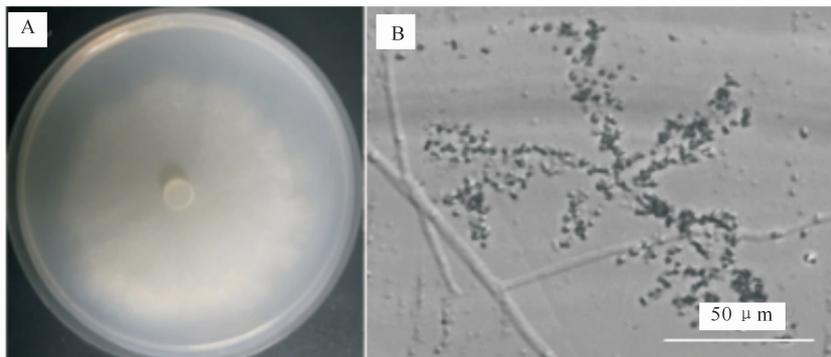
2.4 菌株 BJF10 的 DPPH 清除能力

经测定,菌株 BJF10 发酵液对 DPPH 的清除率为 67.7%,而对照 Vc 的清除率达到 93.5%,说明内生菌 BJF10 具有一定的 DPPH 清除能力。

2.5 BJF10 菌株分类学地位的鉴定

2.5.1 形态学特征 图 8-A 表明,菌株 BJF10 的菌落为圆形,菌丝平铺且致密,短绒状,边缘平滑整

齐,菌落初为白色,后随生长推进由中间开始逐渐变为灰色,培养 20 d 后菌落颜色加深变为灰褐色,且生长速度减慢,在 PDA 培养基上发现有分生孢子产生。显微观察结果(图 8-B)表明,BJF10 菌丝细长、有横隔,孢子较多、呈圆形,初步认为其属于柄孢壳菌。



A. BJF10 的菌落形态;B. BJF10 的菌丝及孢子

A. Colony morphology of BJF10;B. Micromorphology of mycelium and spores of BJF10

图 8 菌株 BJF10 菌落形态及菌丝和孢子的显微观察

Fig. 8 Colony morphology and micromorphology of mycelium and spores of BJF10

2.5.2 分子生物学特征及系统发育分析 通过改进的 SDS 法提取毫菊内生真菌 BJF10 基因组 DNA 片段,利用 ITS 序列通用引物对其进行特异性扩增,获得长约 600 bp 的条带。经上海生工生物工程股份有限公司测序,BJF10 的 ITS 序列长度为 592 bp,根据 GenBank 数据库的基因序列,构建生物进

化树如图 9 所示。由图 9 可见,菌株 BJF10 与柄孢壳菌属(*Zopfiella* sp.)的相似性最高,故将其鉴定为柄孢壳菌属。菌株 BJF10 已保存于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏号为 CGMCC No. 60123。

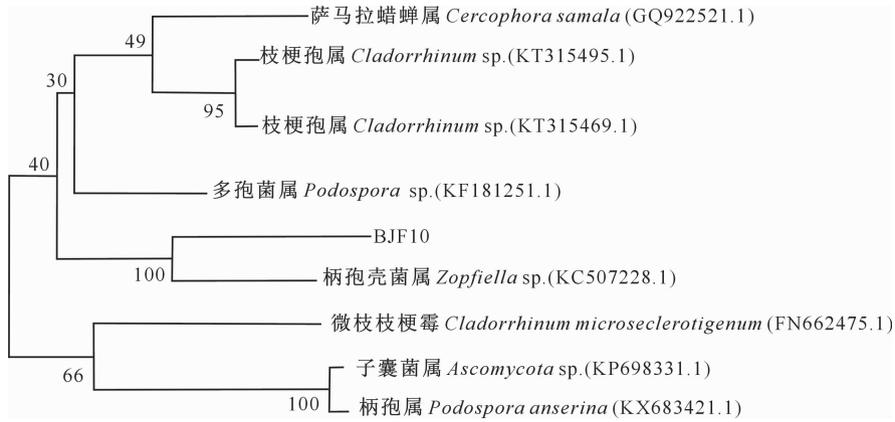


图 9 基于 NJ 法构建的菌株 BJF10 的系统发育树

Fig. 9 Phylogenetic tree based on NJ method based on strain BJF10

3 讨论

从亳菊不同组织中分离的内生菌数量有较大差异,其中根部分布最多,占总数的 40%,其次为叶和茎,分别占总数的 21%和 25%,花中分布的内生菌数量占总数的 13%,内生菌在亳菊不同部位的分布情况表现为根部>叶>茎>花。目前,植物内生菌的分离一般采用表面消毒法,消除植物组织表面附着的微生物是分离植物内生菌的关键。在对亳菊组织进行表面消毒时,要尽可能少地伤害内生菌,以最大程度地分离出所有内生菌。所以,在亳菊组织表面微生物被完全杀死的前提下,应逐步降低表面杀菌强度,确定表面最低灭菌强度即为最佳分离内生真菌的表面杀菌强度^[15]。另外,为了确保所分离菌株为植物内生菌,所采用的表面消毒法需十分严格,与低浓度杀菌剂长时间处理相比,高浓度杀菌剂短时间处理更适合植物内生真菌的分离^[21]。

羧甲基纤维素酶和滤纸酶能够稳定反映纤维素酶活性^[22]。本研究中,分离菌株发酵 3 d 左右时,纤维素酶活性达到最高,随后菌株发酵上清液的纤维素酶活性逐渐降低。由此推测,随着发酵时间延长,蛋白质酶活性逐渐降低,从而使得降解纤维素酶活性呈下降趋势。因此,在进一步研究时将发酵时间控制在 3 d 左右即可。纤维素酶是一个复杂的酶系,包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶及葡萄糖苷酶。以羧甲基纤维素钠为底物分析纤维素酶活性,主要反映了发酵上清液中的内切葡聚糖酶活性,而滤纸酶活性则反映了 3 种诱导复合酶系协同水解纤维素的能力^[23-24]。

菌株 BJF10 具有一定的抗氧化能力,培养 7 d 后上清液对 DPPH 的清除率可达 67.7%。有研究

表明,内生菌的抗氧化活性可提高宿主的抗逆性,有利于宿主更好地生长^[20]。抗氧化是预防衰老的重要途径,如果能够消除过多的自由基,对于预防由自由基引起的老化等相关疾病将非常重要^[25-27]。目前,癌症和心脑血管疾病是世界上死亡率最高的两大疾病,现代医学发现,这些死亡率极高的疾病都与氧化应激有关,而抗氧化剂能够阻碍氧化应激对机体的损伤,但市场上有关的抗氧化类药物并不能满足人们的需求。一是因为天然抗氧化剂大多存在于药用植物体中,一般产量较少;二是因为一些人工合成的抗氧化剂效果不稳定且有很大的副作用,所以导致抗氧化剂开发较为缓慢。随着药用植物内生菌研究的深入,现已发现内生菌能够分泌与宿主植物相同或相似的天然生物活性物质,同时,植物内生菌所产生的活性物质具有安全、高效等优点,因此药用植物内生菌已引起了研究者的极大兴趣^[28-29]。

根据形态特征及 ITS 序列的系统发育分析结果,将 BJF10 菌株鉴定为柄孢壳菌属(*Zopfiella* sp),但具有抑菌、降解纤维素和抗氧化等活性的菌株 BJF10 能否作为一种菌剂添加到生物菌肥中,还有待进一步的盆栽和田间试验验证。利用从植物中分离筛选的内生菌生产生物活性物质在天然药物研究和生产中具有重要的意义^[30-31],寻找药用植物中具有抑菌、促生等多功能的内生菌株,不但可以丰富微生物资源,还可为其在农业及其他领域的开发应用奠定基础。

[参考文献]

- [1] 王志伟,纪燕玲,陈永敢.植物内生菌研究及其科学意义[J].微生物学通报,2015,42(2):349-363.
Wang Z W, Ji Y L, Chen Y G. Studies and biological significances of plant endophytes [J]. Microbiology China, 2015, 42

- (2):349-363.
- [2] 陈向东. 植物内生菌是有待深入开发的资源宝库 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(2):282.
Chen X D. Endophytic microorganisms are valuable resources worthy to be explored deeply [J]. Microbiology China, 2012, 39(2):282.
- [3] 赫荣乔. 植物内生菌成为我国当前微生物研究领域的热点 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(1):1.
He R Q. Plant endophyte becomes one of hot topics in the current microbiological study in China [J]. Microbiology China, 2009, 36(1):1.
- [4] 陈传文, 孙前光, 朱 军, 等. 三种药用植物内生菌的分离及其抗肿瘤活性菌株的筛选 [J]. 微生物学通报, 2010, 37(10):1462-1466.
Chen C W, Sun Q G, Zhu J, et al. Isolation and screening for endophyte with antitumor activities from three medicinal plants [J]. Microbiology, 2010, 37(10):1462-1466.
- [5] 许进娇, 宋 萍, 封 磊, 等. 雷公藤内生细菌的促生作用及其对雷公藤甲素生成的影响 [J]. 应用生态学报, 2014, 25(6):1681-1687.
Xu J J, Song P, Feng L, et al. Growth-promoting effect and triptolide production regulation of endophytic bacteria from *Tripterygium wilfordii* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(6):1681-1687.
- [6] Rudgers J A, Koslow J M, Clay K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties [J]. Ecol Lett, 2004, 7(1):42-51.
- [7] Saikkonen K. Review: forest structure and fungal endophytes [J]. Fungal Biol Rev, 2007, 21(3):67-74.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
National Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Pharmacopoeia: 2010 [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010.
- [9] 颜晓航. 亳菊的遗传学和药理学研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10(13):38-39.
Yan X H. Advances in genetic and pharmacological studies of *Dendranthema morifolium* [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2014, 10(13):38-39.
- [10] 李友连, 王 珊, 朱晶晶, 等. 硫磺熏蒸对亳菊化学成分的影响 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13):2624-2628.
Li Y L, Wang S, Zhu J J, et al. Study on effects of sulfur fumigation on chemical constituents of *Chrysanthemum morifolium* cv. Boju [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(13):2624-2628.
- [11] 纪 薇, 王 瑞, 狄 娟, 等. 亳菊试管嫁接苗胁迫生理机制研究 [J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2016, 36(7):489-494.
Ji W, Wang R, Di J, et al. Study on physiological mechanism of browning *in vitro* grafting of *Chrysanthemum morifolium* cv. Boju [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2016, 36(7):489-494.
- [12] 张 伟, 左亚锋, 金传山, 等. 不同加工方法对亳菊中2种苯丙素类和6种黄酮类成分的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(2):103-107.
Zhang W, Zuo Y F, Jin C S, et al. Effects of different processing methods on contents of 2 phenylpropanoids and 6 flavonoids in Boju [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2017, 37(2):103-107.
- [13] 顾文杰, 徐有权, 徐培智, 等. 酸性土壤中高效半纤维素降解菌的筛选与鉴定 [J]. 微生物学报, 2012, 52(10):1251-1259.
Gu W J, Xu Y Q, Xu P Z, et al. Screening and identification of hemicellulose degrading microorganisms in acid soil [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(10):1251-1259.
- [14] 孙 盈, 田永强, 赵丽坤. 纤维素酶的 CMC 酶活测定条件的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(2):68-71.
Sun Y, Tian Y Q, Zhao L K. Study on the optimum conditions of determination of cellulase activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(2):68-71.
- [15] 王志勇, 刘秀娟. 植物内生菌分离方法的研究现状 [J]. 贵州农业科学, 2014, 42(1):152-155.
Wang Z Y, Liu X J. Research status on separation methods of plant endophytes [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2014, 42(1):152-155.
- [16] 刘 欣. 木霉菌对大豆几种病原真菌的拮抗作用及其耐药性的研究 [D]. 黑龙江大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2007.
Liu X. Study on the antagonistic mechanism to pathogens of soybean root rot and preparation of *Trichoderma* spp [D]. Daqing, Heilongjiang: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2007.
- [17] Brandwilliams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. LWT-Food Sci Technol, 1995, 28(1):25-30.
- [18] Li X, Li X M, Xu G M, et al. Antioxidant metabolites from marine alga-derived fungus *Aspergillus wentii*, EN-48 [J]. Phytochem Lett, 2014, 7(1):120-123.
- [19] 赵 斌. 微生物学实验教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2013.
Zhao B. Microbiology experiment course [M]. Beijing: Higher Education Press, 2013.
- [20] Hamilton C E, Gundel P E, Helander M, et al. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review [J]. Fungal Divers, 2012, 54(1):1-10.
- [21] Reissinger A, Vilich V, Sikora R A. Detection of fungi in planta: effectiveness of surface sterilization methods [J]. Mycological Research, 2001, 105(5):563-566.
- [22] 赵玉萍, 杨 娟. 四种纤维素酶酶活测定方法的比较 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3):116-118.
Zhao Y P, Yang J. Comparison of four cellulase activity measurement methods [J]. Food Research and Development, 2006, 27(3):116-118.

2016(25):104-106.

- [18] 闫亚景,文宝萍,黄志全.可溶盐对兰州非饱和重塑黄土抗剪强度的影响[J].岩土力学,2017,38(10):2881-2887.
Yan Y J, Wen B P, Huang Z Q. Effect of soluble salts on shear strength of unsaturated remoulded loess in Lanzhou city [J]. Rock and Soil Mechanics, 2017, 38(10):2881-2887.
- [19] 南京水利科学研究所. SL 237—1999 土工试验规程 [S]. 北京:中国水利水电出版社,1999.
Nanjing Hydraulic Research Institute. SL 237—1999 specification of soil test [S]. Beijing: China Water & Power Press, 1999.
- [20] Fredlund D G, Rahardjo H. Soil mechanics for unsaturated soils [M]. New York: John Wiley, 1993.
- [21] Alonso E E, Gens A, Josa A. A constitutive model for partially saturated soils [J]. Geotechnique, 1990, 40(3):405-430.
- [22] Alonso E E, Vaunat J, Gens A. Modelling the mechanical behavior of expansive clays [J]. Engineering Geology, 1999, 54(1/2):173-183.
- [23] Yang J K, Zhang J J, Yu H Y, et al. Community composition and cellulase activity of cellulolytic bacteria from forest soils planted with broad-leaved deciduous and evergreen trees [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(3):1449-1458.
- [24] André S, Monika S. Biology and biotechnology of *Trichoderma* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87(3):787-99.
- [25] Miller J D, Adams G W, Sumarah M. Antifungal metabolites from fungal endophytes of *Pinus strobus* [J]. Phytochemistry, 2011, 72(14/15):1833-1837.
- [26] Qiu M, Zhang R, Xue C, et al. Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium*, wilt of cucumber plants by regulating microbial community of rhizosphere soil [J]. Biol Fert Soils, 2012, 48(7):807-816.
- [27] Huang X, Zhang N, Yong X, et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani*, damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43 [J]. Microbiol Res, 2012, 167(3):135-143.
- [28] 刘雅莉,黄一泓,武文斌,等. 茯苓内生真菌抗氧化活性菌株的筛选 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(4):435-439.
Liu Y L, Huang Y H, Wu W B, et al. Screening of antioxidant endophytic fungi isolated from *Tribulus terrestris* L. [J]. Natural Product Research and Development, 2013, 25(4):435-439.
- [29] 陈金阳,陆儒涵,王玲,等. 药用植物内生菌抗氧化活性研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(20):3720-3727.
Chen J Y, Lu R H, Wang L, et al. Recent progress in study on anti-oxidant activity of endophytes in medicinal plants [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(20):3720-3727.
- [30] Harper J K, Arif A M, Ford E J, et al. Pestacin: a 1,3-dihydroisobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antioxidant and antimycotic activities [J]. Tetrahedron, 2003, 59(14):2471-2476.
- [31] Zhao J T, Ma D H, Luo M, et al. *In vitro*, antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Ca-januscajan*(L.) Millsp.] [J]. Food Res Int, 2014, 56(2):243-251.

(上接第 145 页)