

远志内生真菌抑菌活性筛选

王玉君 崔晋龙 苏红 范黎*

(首都师范大学生命科学学院 北京 100048)

摘要: 从10月份采集的栽培和野生远志(*Polygala tenuifolia* Willd)的根、茎、叶中分离内生真菌85株,其中自栽培远志分离33株,野生远志分离52株,共鉴定76株,隶属于23个属。通过对14种指示菌进行生长抑制试验,发现远志内生真菌对枯草芽孢杆菌、宋内氏痢疾杆菌、大肠杆菌、白色念珠菌和九州镰孢霉等5种指示菌抑制效果较好。经鉴定,它们属于镰孢霉属,交链孢霉属, *Aphanocladium* 等属,对单核细胞增生李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、普通变形杆菌、致病性大肠埃希氏菌、小孢拟盘多毛孢和深红酵母等6种指示菌抑制效果较差,对金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌和副溶血型弧菌没有抑制作用。

关键词: 远志, 内生真菌, 抑菌活性

Inhibitory Activity Screening of Endophytic Fungi from *Polygala tenuifolia* Willd

WANG Yu-Jun CUI Jin-Long SU Hong FAN Li*

(College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: Eighty-five endophytic fungal strains were isolated from the roots, stems and leaves of *Polygala tenuifolia* Willd, among which, fifty-two from natural plants and thirty-three from cultivated ones. Seventy-six strains were classified as twenty-three fungal genera. The inhibitory activity screening to fourteen microbe were conducted research. The results showed that some endophytic fungi had remarkable inhibitory activities to *Bacillus subtilis*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Fusarium kyushuense* and they were all belonged to *Fusarium*, *Alternaria*, *Aphanocladium* respectively. All of the endophytic fungi isolated from *Polygala tenuifolia* showed no inhibitory activities to *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritis*, *Bibrio parahemolyticus*.

Keywords: *Polygala tenuifolia* Willd, Endophytic fungi, Inhibitory activity

远志(*Polygala tenuifolia* Willd)为中国传统中药,具有安神,益智,祛痰,消肿等功效,用于惊悸健忘、多梦失眠、咳痰不爽、痰湿痹肿,其主要有效成分是远志皂苷类化合物。国内外越来越多的研究表明,远志在抗衰老、益智、抗氧化及降压等方面

有着广泛的生物活性^[1]。

植物内生真菌(Endophytic fungi)可产生与宿主相同或不同的具有生物活性的次生代谢产物,在医药卫生、农业生产、以及病虫害的防治等方面有很好的应用前景,如欧洲短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)

* 通讯作者: Tel: 86-10-68902964; E-mail: clifan@public3.bta.net.cn
收稿日期: 2008-09-19; 接受日期: 2008-11-28

内生真菌 *Taxomyces andreanae* 因产生新型抗癌物质紫杉醇而受到学术界和企业界的广泛关注^[2,3]。迄今为止, 有关植物内生真菌抑制病原菌的研究已积累了大量资料, 薄荷 (*Mentha haplocalyx*) 内生真菌 *Phomopsis longicolla* 产生的抗生素 dicerandrols 具有很强的杀菌作用^[4], *Selaginella pallescens* 的一株隶属于镰刀菌属的菌株 CR377 (*Fusarium* sp.) 产生的一种新型酮内酯 Pentaketide 对白色念珠菌 (*Candida albicans*) 有较强的抑制作用^[5]。显然, 随着对内生真菌研究的深入和数据的积累, 内生真菌在作为野生药用植物的替代资源以及发现新型药物方面将发挥更大的作用。

有关远志内生真菌的研究除我们实验室外, 未见其他报道。此前, 我们报道了 88 株野生远志内生真菌对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和深红酵母的抑菌活性研究结果^[6], 本试验进一步对十月份采集的健康野生和栽培远志中的内生真菌进行分离鉴定, 以 14 种不同微生物为指示菌对其进行抑菌活性研究, 旨在进一步挖掘远志内生真菌资源, 寻找具有应用价值的活性菌株, 为有效地利用远志内生真菌资源积累数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物样本: 野生远志采集于山西省长治县雄山林场, 栽培远志采集于山西省绛县“山西省中药种子繁殖基地”, 由山西省中药药材监督所、山西生物应用职业技术学院郭吉刚鉴定。采样时间 2006 年 10 月。

1.1.2 供试指示菌: 供试指示菌的种类见表 1。枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、深红酵母购自中国普通微生物菌种保藏管理中心; 九州镰孢霉和小孢拟盘多毛孢由首都师范大学微生物系提供; 蜡样芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、致病性大肠埃希氏菌、肠炎沙门氏菌、副溶血型弧菌、宋内氏痢疾杆菌和白色念珠菌自北京市疾病预防控制中心提供。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离与纯化: 将采集的新鲜远志经自来水洗净泥土等脏物, 去腐叶, 根、茎、叶分别切为约 0.5 cm 的小段(片)。

无菌条件下, 按下列程序进行表面消毒: 75% 乙醇(3 s~5 s) → 无菌水(3~4 次) → 0.1% 的升汞

表 1 供试指示菌
Table 1 Indicators of inhibitory test

指示菌类别 Sort of indicators	种名 Species	菌株编号 No. of strains
革兰氏阳性细菌 Gram-positive bacilli	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	CGMCC1.769
	蜡样芽孢杆菌(<i>B. cereus</i>)	ATCC1361
	单核细胞增生李斯特菌(单增李斯特菌)(<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC27708
	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC12600
	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	CGMCC1.1103
革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacilli	普通变形杆菌(<i>Proteus vulgaris</i>)	ATCC33420
	致病性大肠埃希氏菌(<i>Enteropathogenic E. coli</i> , EPEC)	ATCC49105
	肠炎沙门氏菌(<i>Salmonellae enteritis</i>)	ATCC14208
	副溶血型弧菌(<i>Bibrio parahemolyticus</i>)	ATCC27519
	宋内氏痢疾杆菌(<i>Shigella sonnei</i>)	ATCC51060
真菌 Fungi	深红酵母(<i>Rhodotorula rubra</i>)	CGMCC2.282
	白色念珠菌(<i>Candida albicans</i>)	
	九州镰孢霉(<i>Fusarium kyrushuense</i>)	
	小孢拟盘多毛孢(<i>Pestalotiopsis microspora</i>)	

注: 枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、深红酵母来源于中国普通微生物菌种保藏管理中心; 九州镰孢霉和小孢拟盘多毛孢由首都师范大学微生物系分离得到; 其余菌株来源于北京市疾病预防控制中心。

Note: *Bacillus subtilis*, *B. cereus* and *Rhodotorula rubra* came from CGMCC; *Fusarium kyrushuense* and *Pestalotiopsis microspora* were isolated by department of microbiology of capital normal university; Others came from Beijing centers for diseases control and prevention centers for preventive medical research.

(3 min~5 min) → 无菌水(4~5次), 叶片等幼嫩组织处理时间稍短。同样无菌条件下将上述表面消毒的样品切成 0.2 cm×0.2 cm 长段(片)接种于含 0.04% 氯霉素的马铃薯固体培养基(PDA)中, 置 25℃ 恒温培养箱中培养, 5 d 左右长出适当大小的菌落后, 自各菌落边缘切取 0.2 cm² 的小块分别转接于新的上述培养基上, 反复转接至纯培养, 保藏待用。消毒后不做切割的样品作为对照。

1.2.2 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。在 100 mL 的三角瓶中分装 20 mL 培养基, 放入 10 粒玻璃珠, 切取 0.2 cm² 的菌种块接入瓶中, 25℃、200 r/min 条件下摇瓶发酵培养 9 d。无菌条件下取发酵液 1 mL 于 eppendorf (EP) 管中, 离心去菌丝和孢子, 上清作抑菌试验。不接种的液体培养基作同样处理, 作为阴性对照。

1.2.3 指示菌培养: 细菌指示菌采用牛肉膏蛋白胨液体培养基在 37℃ 条件下恒温培养 18 h, 真菌指示菌采用马铃薯液体培养基(PDA) 30℃ 条件下恒温培养 48 h。

1.2.4 抑菌实验: 采用双层平板法, 稀释倒平板法倒平板制备指示菌平板, 在平板上放置无菌牛津杯, 按菌种编号分别将发酵液上清 120 μL 加入牛津杯。每个菌株 3 个重复。细菌指示菌平板置 37℃ 恒温培养, 真菌指示菌平板置 30℃ 恒温培养。以阴性发酵液作对照。48 h 后观察结果, 测量并记录抑菌圈直径。

1.2.5 菌种鉴定: 分类鉴定参照文献[7-9]。其中一些不易产生孢子的菌株, 采用数十天冷(4℃)、热(37℃)、弱光、水培养等多种培养条件刺激诱导其产孢。

2 结果与分析

2.1 远志内生真菌的抑菌活性

从 10 月份采集的野生和栽培远志中共分离获得内生真菌菌株 85 株, 其中 52 株来自野生远志植株, 33 株来自栽培远志植株, 对 14 种病原菌进行抑菌活性筛选, 结果表明, 有 73 株内生真菌对一种或多种指示菌具有抑菌活性(表 2, 表 3), 占分离菌株总数的 85.9%。

2.1.1 野生远志内生真菌的抑菌活性: 成熟期野生远志中分离鉴定内生真菌 52 株^[6], 对 14 种指示菌进行的抑菌活性筛选结果表明, 野生远志内生真菌

除对金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌和副溶血型弧菌没有拮抗作用外, 对其他病原菌均有抗性。在活性菌株中, 对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌有抑菌作用的菌株最多, 分别为 48 株、42 株, 占菌株总数的 92.3%、80.8%, 其中高抗菌株(抑菌圈直径大于 15 mm)较多, 分别有 22 株和 19 株, 菌株 N.PTO26 最大抑菌圈直径更分别达 19.46 mm 和 20.26 mm; 对宋内氏痢疾杆菌、致病性大肠埃希氏菌和白色念珠菌有抗性的活性菌株数也较多, 分别有 13 株、8 株、9 株。N.PTO24、N.PTO25、N.PTO26、N.PTO30 等 4 个菌株的抑菌谱较广, 除均能抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和宋内氏痢疾杆菌 3 种病原菌外, N.PTO24、N.PTO25 和 N.PTO30 能拮抗白色念珠菌, N.PTO24、N.PTO25 拮抗致病性大肠埃希氏菌, N.PTO26、N.PTO30 拮抗蜡样芽孢杆菌, N.PTO26 拮抗小孢拟盘多毛孢, 将这些分离菌株的生物学特征和文献[7-9]的记载进行比较, 发现这四株菌株均隶属于交链孢霉属(表 2)。

2.1.2 栽培远志内生真菌的抑菌活性: 从栽培远志中分离获得内生真菌 33 株, 其中根、茎、叶分别分离到 11 株、15 株、8 株。经过对白色念珠菌等 14 种指示菌进行抑菌试验, 发现有 24 株菌对其中的至少一种病原菌有抑制作用。对大肠杆菌有抑菌活性的菌株最多, 达 16 株, 占 48.5%, 对白色念珠菌、九州镰孢霉和小孢拟盘多毛孢这 3 种病原真菌有抗性的活性菌株数也较多, 分别为 5、10、5 株, 其中 C.PTO26 和 C.PTO31 对小孢拟盘多毛孢的抑制作用非常强, 直径分别达 19.12 mm 和 27.08 mm, 且均隶属于镰孢霉属。栽培远志的内生真菌对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、致病性大肠埃希氏菌、肠炎沙门氏菌、副溶血型弧菌、宋内氏痢疾杆菌和深红酵母等 8 种病原菌均没有抗菌活性, 对单核细胞增生李斯特菌和蜡样芽孢杆菌有拮抗活性的菌株也仅有 1~2 株(表 3)。

2.2 远志内生真菌的鉴定

从 10 月份采集的野生和栽培远志根、茎、叶中分离获得内生真菌 85 株, 共鉴定 69 株, 将这些分离菌株的生物学特征和文献[7-9]的记载进行比较, 发现它们隶属于 23 个真菌属(表 4)。其中以交链孢霉属为主, 占总数的 35.6%。野生远志的内生真菌菌株较多, 隶属于 *Arbuscula*、*Nalanthamala* 等 21 个属; 栽培远志的内生真菌菌株相对较少, 隶属于

表 2 野生远志内生真菌菌株分离鉴定及抑菌活性

Table 2 Inhibitory activity screening of endophytic fungi and identification isolated from natural *Polygala tenuifolia* willd

菌株编号	真菌属名	指示菌 Tested microbes													
		大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	深红酵母	单核细胞增生李斯特菌	蜡样芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	普通变形杆菌	致病性大肠埃希氏菌	肠炎沙门氏菌	副溶血型弧菌	宋内氏痢疾杆菌	白色念珠菌	九州镰孢霉	小孢拟盘多毛孢
Fungal code	Genus name	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>R. rubra</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i> EPEC	<i>S. enteritis</i>	<i>B. parahe-molyticus</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. kyu-shuense</i>	<i>P. micro-spora</i>
N.PTO1	<i>Alternaria</i>	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO2	<i>Sirodothis</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO3	<i>Alternaria</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO4	<i>Arbuscula</i>	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO5	<i>Alternaria</i>	—	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—
N.PTO6	<i>Alternaria</i>	++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO7	<i>Alternaria</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO8	<i>Alternaria</i>	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO9	<i>Sclerotium</i>	++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO10	<i>Sclerotium</i>	—	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO11	<i>Trichothecium</i>	+++	—	—	++	—	—	++	+	—	—	+	—	—	—
N.PTO12	<i>Gliocephalis</i>	+++	+++	—	++	—	—	—	++	—	—	—	—	—	—
N.PTO13	<i>Amerosporium</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—	—
N.PTO14	<i>Alternaria</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—
N.PTO15	<i>Alternaria</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—
N.PTO16	<i>Acremonium</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++
N.PTO17	<i>Sclerotium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO18	<i>Minimedusa</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO19	<i>Papulaspora</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO20	<i>Alternaria</i>	++	++	—	—	—	—	—	+	—	—	++	++	—	—
N.PTO21	<i>Alternaria</i>	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—	—
N.PTO22	<i>Alternaria</i>	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
N.PTO23	<i>Amerosporium</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO24	<i>Alternaria</i>	+++	+++	—	—	—	—	—	++	—	—	++	++	—	—
N.PTO25	<i>Alternaria</i>	++	+++	—	—	—	—	—	+	—	—	++	++	—	—
N.PTO26	<i>Alternaria</i>	+++	+++	—	—	+	—	—	—	—	—	++	—	—	++
N.PTO27	<i>Minimedusa</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—	—

续表

菌株编号	真菌属名	指示菌 Tested microbes													
		大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	深红酵母	单核细胞增生李斯特菌	蜡样芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	普通变形杆菌	致病性大肠埃希氏菌	肠炎沙门氏菌	副溶血性弧菌	宋内氏痢疾杆菌	白色念珠菌	九州镰孢霉	小孢拟盘多毛孢
Fungal code	Genus name	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>R. rubra</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i> EPEC	<i>S. enteritis</i>	<i>B. parahe-molyticus</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. kyus-huense</i>	<i>P. microspora</i>
N.PTO28	<i>Rhizoctonia</i>	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—	—
N.PTO29	<i>Alternaria</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	++	++	—	—
N.PTO30	<i>Alternaria</i>	+++	++	—	—	++	—	—	—	—	—	++	++	—	—
N.PTO31	<i>Alternaria</i>	—	+++	—	—	++	—	—	—	—	—	++	++	—	—
N.PTO32	<i>Trichosporiella</i>	++	—	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO33	<i>Paecilomyces</i>	++	++	—	—	—	—	—	++	—	—	—	—	—	—
N.PTO34	<i>Arbuscula</i>	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO35	<i>Aphanocladium</i>	++	+++	—	—	—	—	—	++	—	—	—	—	++	—
N.PTO36	<i>Malbranchea</i>	—	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
N.PTO37	<i>Fusarium</i>	—	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO38	<i>Endothiella</i>	+++	++	—	—	—	—	+++	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO39	<i>Paecilomyces</i>	—	++	—	—	—	—	++	—	—	—	—	—	++	—
N.PTO40	<i>Nalanthamala</i>	+++	++	—	—	—	—	++	++	—	—	—	—	++	—
N.PTO41	<i>Alternaria</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO42	<i>Minimedusa</i>	—	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO43	<i>Minimedusa</i>	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO44	<i>Arbuscula</i>	+++	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO45	<i>Aspergillus</i>	++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO46	<i>Trichosporiella</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO47	<i>Penicillium</i>	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
N.PTO48	<i>Malbranchea</i>	++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO49	<i>Nalanthamala</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO50	<i>Nalanthamala</i>	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO51	<i>Nalanthamala</i>	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.PTO52	<i>Mariannaea</i>	—	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：抑菌圈(Φ)；+：直径 ≤ 10 mm；++：直径10 mm~15 mm；+++：直径 > 15 mm；—：无抗性；N.PTO51-N.PTO10 分离自叶；N.PTO11-N.PTO31 分离自茎；N.PTO32-N.PTO52 分离自根。

Note: Antibiotic circle diameter(Φ)；+： $\Phi \leq 10$ mm；++：10 mm $< \Phi \leq 15$ mm；+++： $\Phi > 15$ mm；—：None inhibitory activity；N.PTO51-N.PTO10 isolated from leaves；N.PTO11-N.PTO31 isolated from stems；N.PTO32-N.PTO52 isolated from roots.

表3 栽培远志内生真菌菌株分离鉴定及抑菌活性

Table 3 Inhibitory activity screening of endophytic fungi and identification isolated from cultivated *Polygala tenuifolia* willd

菌株编号	真菌属名	指示菌 Tested microbes													
		大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	深红酵母	单核细胞增生李斯特菌	蜡样芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	普通变形杆菌	致病性大肠埃希氏菌	肠炎沙门氏菌	副溶血性弧菌	宋内氏痢疾杆菌	白色念珠菌	九州镰孢霉	小孢拟盘多毛孢
Fungal code	Genus name	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>R. rubra</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i> EPEC	<i>S. enteritis</i>	<i>B. parahe-molyticus</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. kyus-huense</i>	<i>P. micro-spora</i>
C.PTO1	<i>Latendraea</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.PTO2	<i>Aphanocladium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	++
C.PTO4	<i>Nalanthamala</i>	—	—	—	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.PTO6	<i>Alternaria</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.PTO8	<i>Alternaria</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.PTO10	<i>Alternaria</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—
C.PTO13	<i>Alternaria</i>	—	—	—	++	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
C.PTO14	<i>Arbuscula</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
C.PTO15	<i>Alternaria</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	++	—
C.PTO16	<i>Minimedusa</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
C.PTO19	<i>Alternaria</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.PTO20	<i>Alternaria</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.PTO22	<i>Alternaria</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.PTO23	<i>Alternaria</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.PTO24	<i>Alternaria</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—
C.PTO25	<i>Alternaria</i>	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—	++
C.PTO26	<i>Fusarium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.PTO27	<i>Fusarium</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
C.PTO28	<i>Phoma</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
C.PTO29	<i>Aphanocladium</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
C.PTO30	<i>Aphanocladium</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
C.PTO31	<i>Fusarium</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
C.PTO32	<i>Fusarium</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.PTO33	<i>Fusarium</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：抑菌圈(Φ)；+：直径≤10 mm；++：直径10 mm~15 mm；+++：直径>15 mm；—：无抗性；C.PTO1-C.PTO10 分离自叶；C.PTO11-C.PTO25 分离自茎；C.PTO26-C.PTO33 分离自根。

Note: Antibiotic circle diameter(Φ)；+：Φ≤10 mm；++：10 mm<Φ≤15 mm；+++：Φ>15 mm；—：None inhibitory activity；C.PTO1-C.PTO10 isolated from leaves；C.PTO11-C.PTO25 isolated from stems；C.PTO26-C.PTO33 isolated from roots.

表 4 野生和栽培远志内生真菌的鉴定及分布(单位: 株)

Table 4 Identification and distribution of endophytic fungi isolated from natural and cultivated *Polygala tenuifolia* willd

属名 Genus name	野生 Wild type			栽培 Cultivated type			属名 Genus name	野生 Wild type			栽培 Cultivated type		
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf		根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
<i>Acremonium</i>	0	1	0	0	0	0	<i>Minimedusa</i>	2	2	0	0	1	0
<i>Amerosporium</i>	0	2	0	0	0	0	<i>Nalanthamala</i>	4	0	0	0	0	1
<i>Alternaria</i>	1	11	6	0	8	3	<i>Paecilomyces</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Arbuscula</i>	2	0	1	0	1	0	<i>Papulaspora</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i>	1	0	0	0	0	0	<i>Penicillium</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Aphanocladium</i>	1	0	0	2	0	1	<i>Phoma</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Endothiella</i>	1	0	0	0	0	0	<i>Rhizoctonia</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	1	0	0	5	0	0	<i>Sirodothis</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Gliocephalis</i>	0	1	0	0	0	0	<i>Sclerotium</i>	0	1	2	0	0	0
<i>Latendraea</i>	0	0	0	0	0	1	<i>Trichosporiella</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Malbranchea</i>	2	0	0	0	0	0	<i>Trichothecium</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Mariannaea</i>	1	0	0	0	0	0							

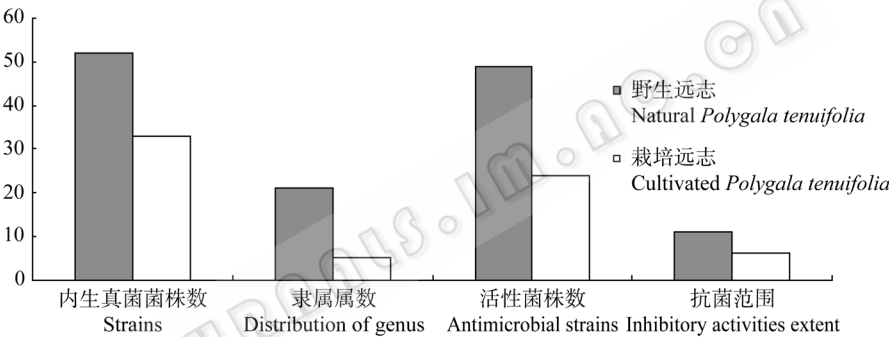


图 1 野生与栽培远志内生真菌菌株数、真菌属数、活性菌株数及抗菌范围比较

Fig. 1 Comparision of strains、distribution of genus、antimicrobial strains and inhibitory activities extent between endo-
phytic fungi isolated from natural and cultivated *Polygala tenuifolia* willd

Aphanocladium、镰孢霉属等 5 个属。

上述实验结果表明, 野生远志分离到的内生真菌的菌株数、属种分布、活性菌株的数量以及抗菌范围都要大于栽培远志(图 1), 表明野生远志中的内生真菌的物种多样性远比栽培远志丰富。

野生远志内生真菌对枯草芽孢杆菌、宋内氏痢疾杆菌、致病性大肠埃希氏菌、普通变形杆菌和深红酵母 5 种指示菌均有拮抗作用, 栽培远志内生真菌则无。野生和栽培远志内生真菌对单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌、白色念珠菌、九州镰孢霉和小孢拟盘多毛孢 6 种指示菌均有拮抗作用, 但是活性菌株隶属于不同的真菌属; 拮抗单增李斯特菌的野生远志活性菌株有 2 株, 分别隶属于 *Gliocephalis*、*Trichothecium* 两属, 而 2 株栽培远志中的活性菌株却分别隶属于交链孢霉属、*Nalanthamala*;

拮抗蜡样芽孢杆菌的野生远志活性菌株有 3 株, 均隶属于交链孢霉属, 而 1 株栽培远志活性菌株却隶属于 *Nalanthamala*; 拮抗白色念珠菌的 9 株野生远志活性菌株均隶属于交链孢霉属, 而栽培远志活性菌株有 1 株隶属于 *Aphanocladium*, 其余 4 株隶属于交链孢霉属; 拮抗九州镰孢霉的野生远志活性菌株有 5 株, 分别隶属于 *Aphanocladium*、*Malbranchea*、*Paecilomyces*、*Nalanthamala*、*Penicillium* 等五属, 而栽培远志活性菌株有 9 株, 其中 2 株隶属于交链孢霉属, 2 株隶属于 *Aphanocladium*、2 株隶属于镰孢霉属、1 株隶属于 *Arbuscula*、1 株隶属于 *Minimedusa*、1 株隶属于 *Phoma*; 拮抗小孢拟盘多毛孢的野生远志活性菌株有 2 株, 分别隶属于 *Acremonium*、交链孢霉属, 而栽培远志活性菌株有 4 株, 其中 1 株隶属于 *Aphanocladium*, 1 株隶属于交链

孢霉属, 其余 2 株隶属于镰孢霉属。

同一真菌属的内生真菌菌株拮抗病原菌的种类可能相同但也可能不同。菌株 N.PTO20、N.PTO24 和 N.PTO25 同隶属于交链孢霉属, 且对致病性大肠埃希氏菌和白色念珠菌均有拮抗活性; 菌株 N.PTO33 和 N.PTO39 同隶属于 *Paecilomyces*, 但是 N.PTO33 拮抗致病性大肠埃希氏菌, 不拮抗九州镰孢霉, 而 N.PTO39 拮抗九州镰孢霉, 不拮抗致病性大肠埃希氏菌。菌株 C.PTO2 和 C.PTO30 同隶属于 *Aphanocladium*, 但是 C.PTO2 拮抗白色念珠菌和小孢拟盘多毛孢, 不拮抗九州镰孢霉, 而 C.PTO30 拮抗九州镰孢霉, 不拮抗白色念珠菌和小孢拟盘多毛孢。菌株 N.PTO40 和 C.PTO4 同隶属于 *Nalanthamala*, 但是 N.PTO40 拮抗普通变形杆菌、致病性大肠埃希氏菌和九州镰孢霉, 而 C.PTO4 拮抗单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌。

3 讨论

实验结果表明, 远志内生真菌中广泛分布着抑菌活性菌株(占分离菌株总数的 85%以上), 其抗菌活性、属种分布具有丰富的多样性。生长于野生环境条件下的远志, 在菌株的种类和抗菌活性菌株的数量上远远大于栽培远志, 除隶属于 *Latendrea* 和 *Phoma* 两个属的菌株在野生远志中未分离到外, 其余自栽培远志中分离到的 8 个真菌属在野生远志中均有分布, 这一现象可能与野生环境的复杂性有关, 同时也说明, 无论是在野生环境还是在人工栽培环境, 远志内生真菌的种群可能存在一定的稳定性。

隶属于不同真菌属的菌株对同一指示菌显示出不同程度的拮抗活性, 同一真菌属的菌株其抗菌范围以及抗菌活性也存在既相似又有差异的现象, 这可能与它们对环境的适应性有关, 也或者与它们在远志生长发育过程中所起的作用不同有关。内生真菌表现出的抗菌范围和抗菌活性多样性为新型药物的筛选提供了新的资源。

远志内生真菌中有选择性的高活性菌株占分离菌株的 34%, 且多隶属于交链孢霉属和镰孢霉属, 如菌株 N.PTO24、N.PTO25、N.PTO26、N.PTO30、C.PTO31、C.PTO26 等, 其中 C.PTO31 对小孢拟盘多毛孢的抑菌圈直径高达 27 mm。此外, 野生远志中隶属于 *Arbuscula*、*Sclerotium*、*Trichothecium*、*Gliocephalis* 和 *Endothiella* 的内生真菌菌株也具有显著的抑菌活性。这些菌株可能产生了抗生素类物

质, 对其活性成分有待进一步研究。

从植物中寻找天然活性物质一直是新药研究的重要内容, 但过度采挖终究会造成物种的枯竭。大量有关内生真菌次生代谢产物体外抗菌试验的研究表明: 约有 30% 的内生真菌能够产生具有抗菌活性的物质, 因此从内生真菌中寻找新药或新型化合物应是有效的途径之一^[10-12]。在目前作为中药的 11116 种植物药中, 已发表的关于药用植物内生真菌涉及到的药用植物有 47 科 81 属 114 种 3 变种, 我国研究过的仅有 21 科 44 属 62 种 2 变种^[13]。显然, 相关的研究亟待开展。本文报道的抗菌活性菌株或具有广谱抗菌活性或具有选择抗性, 可以针对性地进行跟踪研究, 分离筛选有效的活性物质。

参考文献

- [1] 姜 勇, 屠鹏飞. 远志研究进展. 中草药, 2001, 32(8): 759-761.
- [2] Strobel G, Stierle A, Stierle D. *Taxomyces andreanae*, A proposed new Taxon for a *Bubilliferous hyphomycetes* associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*). *Mycotaxon*, 1993, 47: 71-80.
- [3] 陈利军, 陈月华, 史洪中, 等. 药用植物内生真菌研究进展. 安徽农业科学, 2006, 34(11): 2438-2440.
- [4] Wagenaar MM, Clardy J. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimmers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from endangered mint. *Nat Prod Res*, 2001, 64(8): 1006-1009.
- [5] Brady SF, Clardy J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Nat Prod*, 2000, 63: 1447-1448.
- [6] 崔晋龙, 郭吉刚, 范 黎. 远志内生真菌分离鉴定及活性筛选. 微生物学通报, 2007, 34(5): 839-840.
- [7] 巴尼特, 亨特著. 沈崇尧译. 半知菌属图解. 北京: 科学出版社, 1977, pp.64-210.
- [8] Josef Adolf Von Arx. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. Germany: J Cramer, Vaduz, 1981, pp.234-358.
- [9] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979, pp.406-649.
- [10] 秦 盛, 邢 珂, 吴少华, 等. 3 种仙人掌植物内生真菌抑菌活性的研究. 中草药, 2006, 37(6): 919-920.
- [11] 郑 毅, 陈有为, 张传会, 等. 木本曼陀罗内生真菌抗菌活性的筛选研究. 菌物研究, 2007, 5(2): 104-105.
- [12] 邓祖军, 曹理想, 谭红铭, 等. 红树林内生真菌抗细菌和抗真菌活性的初步研究. 广东药学院学报, 2007, 23(5): 564-566.
- [13] 孙剑秋, 郭良栋, 臧 威, 等. 药用植物内生真菌及活性物质多样性研究进展. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1505-1506.