

研究报告

‘海螺’望春花内生真菌 EF-WCH-51 鉴定及其抑制葫芦科刺盘孢活性成分分析

张义军, 王捷, 裴宁宁, 秦丽, 王士娟, 彭凡*

安徽农业大学林学与园林学院 安徽省微生物防治重点实验室, 安徽 合肥 230036

张义军, 王捷, 裴宁宁, 秦丽, 王士娟, 彭凡. ‘海螺’望春花内生真菌 EF-WCH-51 鉴定及其抑制葫芦科刺盘孢活性成分分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3997-4009.

ZHANG Yijun, WANG Jie, PEI Ningning, QIN Li, WANG Shijuan, PENG Fan. Endophytic fungus EF-WCH-51 from *Yulania denudata* ‘Hailuo’: strain identification and determination of active component against *Colletotrichum orbiculare*[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3997-4009.

摘要:【背景】药用植物内生真菌产生的次生代谢产物具有多种抗菌活性, 因而具有生防菌开发潜力。【目的】鉴定一株对葫芦科刺盘孢(*Colletotrichum orbiculare*)有抑菌活性的‘海螺’望春花内生真菌 EF-WCH-51, 并确定其主要抑菌活性成分。【方法】根据形态特征并结合分子序列鉴定 EF-WCH-51 菌株, 利用生长速率法确定 EF-WCH-51 抑菌活性, 并采用半制备型 HPLC、HPLC-MS/MS 对其活性成分进行分离鉴定。【结果】供试菌株 EF-WCH-51 为丝枝蜡蚧菌(*Lecanicillium aphanocladii*), 其发酵液粗提物对葫芦科刺盘孢菌丝生长具有较强抑制作用, EC_{50} 为 0.086 2 mg/mL; 抑菌活性组分 A (0.085 0 mg/mL) 对葫芦科刺盘孢抑制率达到 76.08%, 通过查询 MS、MS/MS 数据库以及 with 相关文献对比, 确定该化合物为卵孢菌素(oosporein)。【结论】本研究发现丝枝蜡蚧菌对葫芦科刺盘孢具有较好的抑菌活性, 其主要抑菌活性成分为卵孢菌素, 具有作为瓜类炭疽病生防菌株的潜力。**关键词:** ‘海螺’望春花; 内生真菌; 葫芦科刺盘孢; 丝枝蜡蚧菌; 卵孢菌素

资助项目: 安徽省林业科技攻关团队项目(2019 [15]); 安徽省大学生创新训练计划(S202010364090)

This work was supported by the Forestry Science and Technology Team Project of Anhui Province (2019 [15]) and the Anhui College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202010364090).

*Corresponding author. E-mail: fpeng@ahau.edu.cn

Received: 2023-02-01; Accepted: 2023-04-05; Published online: 2023-05-06

Endophytic fungus EF-WCH-51 from *Yulania denudata* ‘Hailuo’: strain identification and determination of active component against *Colletotrichum orbiculare*

ZHANG Yijun, WANG Jie, PEI Ningning, QIN Li, WANG Shijuan, PENG Fan*

Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, School of Forestry & Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

Abstract: [Background] The endophytic fungi of medicinal plants have good biocontrol potential because the secondary metabolites they produced have a variety of antimicrobial activities. [Objective] To identify an endophytic fungus EF-WCH-51 with inhibitory activity against *Colletotrichum orbiculare* (a pathogen causing anthracnose of melons) from *Yulania denudata* ‘Hailuo’ and determine its main antifungal component. [Methods] Strain EF-WCH-51 was identified based on morphological characteristics and molecular sequences. The growth rate method was employed to determine the antifungal activity of EF-WCH-51, and semi-preparative HPLC and HPLC-MS/MS to identify the active component. [Results] Strain EF-WCH-51 was identified as *Lecanicillium aphanocladii*. The crude extract of its fermentation broth had a strong inhibitory effect on the mycelial growth of *C. orbiculare*, with EC_{50} of 0.086 2 mg/mL. The inhibitory rate of the bioactive compound A (0.085 0 mg/mL) against *C. orbiculare* was 76.08%. The compound was identified as oosporein by data comparison with MS, MS/MS databases and related literature. [Conclusion] *L. aphanocladii*, with oosporein as the main antifungal active component, had good inhibitory activity against *C. orbiculare*, demonstrating the potential as a biocontrol strain against *C. orbiculare*.

Keywords: *Yulania denudata* ‘Hailuo’; endophytic fungi; *Colletotrichum orbiculare*; *Lecanicillium aphanocladii*; oosporein

葫芦科(*Cucurbitaceae*)瓜类作物在我国水果蔬菜生产中占据重要地位, 无论是西瓜(*Citrullus lanatus*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)还是甜瓜(*C. melo*), 其产量都对我国果蔬产业具有重要影响^[1]。炭疽病是瓜类作物的常见病害, 主要是由葫芦科刺盘孢(*Colletotrichum orbiculare*)在植株不同生长阶段侵染引发, 大棚和田间均有发生^[2]。目前, 瓜类炭疽病害防治主要依靠化学防治。由于化学药剂的大量使用, 不仅造成环境污染、农药残留问题, 还导致病原菌产生抗药性, 而生物防治以高效性、环保性及不产

生抗药性等特点得到关注。用于植物病害生物防治的生防因子很多, 包括拮抗微生物、抗生素及植物诱导子等^[3], 其中内生真菌在生物防治方面具有巨大潜力, 因而获得了更多的关注。

药用植物的内生真菌可产生与其宿主植物相同或相似的生物活性成分^[4-5], 从中探寻生防菌株更具靶向性和高效性, 杨明琰等^[6]从药用植物杜仲分离出内生真菌淡紫色拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*), 其发酵液乙酸乙酯提取物对番茄灰霉病菌、番茄叶霉病菌和苹果炭疽病菌均有较好的抑制效果; 武文斌等^[7]发现

从药用植物蒺藜中分离的内生真菌发酵产物对稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)有一定的抗性。

‘海螺’望春花(*Yulania denudate* ‘Hailuo’)作为传统的中药材,含有 D-柠檬烯、大香叶烯 D、蒎烯等活性成分,具有消炎、抗过敏、抗菌、抗癌及抗氧化等活性^[8-13]。截至目前,针对‘海螺’望春花的研究仅限于观赏及药用价值,与之相关的内生真菌鲜有报道。因此,本课题组以‘海螺’望春花中分离出的内生真菌 EF-WCH-51 为研究材料,探究其对葫芦科刺盘孢的抑菌活性,并对相关活性成分进行分离鉴定,旨在为瓜类炭疽病的生物防治提供新的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 EF-WCH-51、葫芦科刺盘孢 S9 均由安徽省微生物防治重点实验室提供。

PDA 培养基^[14] (g/L): 土豆 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0。PDB 培养基为 PDA 不加琼脂粉。

2×*Taq* Plus Master Mix, 北京康为世纪生物科技有限公司; 引物, 上海生工生物工程有限

公司; 乙腈(色谱级), 安徽天地高纯溶剂有限公司; 甲醇(色谱级), 安徽天地高纯溶剂有限公司。PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司; 旋转蒸发浓缩仪, 巩义市予华仪器有限责任公司; 液质联用分析仪, Agilent 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株 EF-WCH-51 鉴定

形态学观察: 配制浓度为 1×10^6 孢悬液, 使用移液器吸取 1.5 μ L 孢悬液点接于 PDA 培养基中央, 25 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 7 d, 并观察菌落形态特征(菌落颜色、剖面、菌丝质地、是否有气味以及表面是否有水滴), 之后进行显微观察(菌丝特征、孢子形态及其产孢结构)。

分子序列测定: 采用 CTAB 法提取菌株 DNA, 采用引物对 ITS4/ITS5、NS1/NS4、LR5/LR0R、9865F/2218R、CRPB1/RPB1Cr 及 fRPB2-5F/fRPB2-7cR (表 1) 分别扩增 ITS、SSU、LSU、TEF、RPB1 和 RPB2 序列。PCR 反应体系(25 μ L): 2×*Taq* Plus Master Mix 12.5 μ L, 正、反向引物(表 1) (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 DNA (220 ng/mL) 1.5 μ L, 超纯水 9 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 43 $^{\circ}$ C (SSU)/48 $^{\circ}$ C

表 1 PCR 反应引物信息

Table 1 PCR reaction primers information

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)	参考文献 References
ITS4	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	550	[15]
ITS5	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	1 010	[15]
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG		
LR5	ATCCTGAGGGAACTTC	850	[16]
LROR	GTACCCGCTGAACTTAAGC		
985F	GCTCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	1 000	[17]
2218R	ATGACACCACCRACRGCRACRGTYTG		
CRPB1	CCWGGYTTYATCAAGAARGT	720	[18]
RPB1Cr	CCNGCDATNTCRTTRTCCATRTA		
fRPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	1 020	[19]
fRPB2-7cR	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT		

(ITS/LSU/RPB1/RPB2)/58 °C (TEF) 15 s, 72 °C 1 min, 34 次循环; 72 °C 5 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。扩增产物送通用生物有限公司进行测序, 使用 Chromas 查看峰图, 选择无重峰、无杂合的序列片段, 再使用 DNAMAN 对正反序列进行拼接。将拼接好的序列导入 BioEdit v7.0.9.0 检查是否存在歧义碱基, 若存在碱基错位及时校正, 再利用 ClustalW 进行多序列对比。使用 PhyloSuite® v1.2.1 将多基因序列组合成序列数据集, 利用 iqtree-1.6.12 构建最大似然法(maximum likelihood, ML)的系统发育树。

1.2.2 菌株发酵液粗提物制备

将菌株 EF-WCH-51 接种于 PDA 培养基上 25 °C 培养 5 d, 用 6 mm 打孔器打取菌饼若干于装有 100 mL PDB 的 250 mL 锥形瓶中, 25 °C、220 r/min 摇床培养 3 d 得到种子液, 然后利用分散器将菌丝打碎, 将种子液以 5% 的接种量接种于 PDB 培养基中, 置于相同条件的摇床上继续培养 7 d, 随后用布氏漏斗过滤菌丝得到发酵液, 利用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液, 利用旋转蒸发浓缩仪浓缩干燥, 然后利用甲醇进行复溶(600 mL 乙酸乙酯利用 2 mL 甲醇复溶)得到粗提物原液, 置于 4 °C 冰箱进行保存。

1.2.3 菌株发酵液粗提物抑菌活性测定

以甲醇作为溶剂, 配制质量浓度为 48、24、12、6 和 3 mg/mL 的发酵液粗提物, 按 2% (体积分数) 接种量接种于冷却至 45 °C 左右的 PDA 培养基, 制成浓度为 0.192、0.096、0.048、0.024 和 0.012 mg/mL 含粗提物的 PDA 平板, 加入等量的甲醇溶液作为阴性对照, 加入等量无菌水作为空白对照。用 6 mm 打孔器打取病原菌菌饼置于培养皿中间, 每个处理重复 3 次, 置于 25 °C 培养箱恒温培养 3 d, 采用十字交叉法测量各菌

落直径, 计算各质量浓度发酵液粗提物对病原菌菌丝生长的抑制率, 用最小二乘法求出毒力回归方程、相关系数(r)、有效中浓度 EC_{50} 。

菌丝生长抑制率(%)=

$$\frac{\text{空白对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{空白对照组菌落直径} - 6 \text{ mm}} \times 100。$$

1.2.4 菌株发酵液粗提物分离及活性组分 A 鉴定

通过液质联用分析仪对发酵液粗提物进行分析。液质分析条件: A 为超纯水(含 0.1% 甲酸), B 为乙腈, 洗脱条件: 0–3 min, 5% B; 3–10 min, 5%–50% B; 10–39 min, 50%–100% B; 39–49 min, 100% B。进样量 0.3 μ L, 柱温 30 °C, 流速 0.3 mL/min, 检测波长为 200–600 nm 的全波长检查。质谱阳离子模式下的条件: 干燥气体为氮气, 其温度为 325 °C, 流速为 0.3 mL/min, 雾化气压 35 psi; 毛细管电压: 阴离子 3 500 V, 阳离子 4 000 V; 破裂电压: 阴离子 175 V, 阳离子 215 V, 分离器电压 60 V; 质量采集范围: 阴阳离子模式均为 0.05–1.50 kDa。色谱柱: Agilent Porshell, 100 mm \times 2.1 mm, 3 μ m。

采用半制备型高效液相色谱仪 HPLC (Shimadzu LC-20A) 对粗提物进行分离纯化, 高效液相色谱分离条件: 流动相: A 为超纯水, B 为色谱乙腈, 洗脱条件: 0–10 min, 5%–35% B; 10–15 min, 35%–100% B; 15–20 min, 100%–5% B。进样量为 100 μ L, 流速 2 mL/min, 检测波长为 190 nm。色谱柱: Agilent, 250 mm \times 9.4 mm, 5 μ m。

利用 HPLC-MS/MS 对组分 A 进行鉴定, 流动相: A 为蒸馏水(含 0.1% 甲酸), B 为乙腈; 洗脱条件: 0–3 min, 5%–10% B; 3–25 min, 10%–50% B; 25–30 min, 50%–100% B; 30–50 min, 100% B。质谱条件: 电喷雾离子源, 质量扫描范围(m/z): 50–1 100; 雾化气温度: 350 °C; 碰撞电压: 175 V; 锥孔电压: 65 V; 质荷比(m/z): 50–500; 碰撞能量: 50–180 eV。

1.2.5 EF-WCH-51 活性组分 A 的抑菌作用

组分 A 使用 100% 甲醇复溶, 再用无菌水稀释到一定浓度后加入 PDA 培养基混匀, 制成浓度为 0.085 0 mg/mL 的含药平板, 以加入等量同等浓度甲醇作为阴性对照, 不加等量无菌水作为空白对照, 采用生长速率法测定活性组分 A 对病原菌的抑制率。

菌丝生长抑制率(%)=

$$\frac{\text{空白对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{空白对照组菌落直径} - 6 \text{ mm}} \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 菌株 EF-WCH-51 的鉴定结果

EF-WCH-51 菌株培养 7 d, 菌落平均生长直径为(36.44±0.93) mm, 菌落表面致密, 菌丝白色, 质地绒毛状, 边缘整齐, 生长后期菌

落表面有无色透明液滴产生, 菌落有同心环; 培养基呈现紫红色(图 1A、1B)。菌丝直径 1.194–1.746 μm, 有隔; 分生孢子椭圆形, (3.084–5.877) μm×(1.569–2.769) μm; 分生孢子梗单生、对生或轮生于菌丝上, 瓶梗椭圆形至柱状, (4.738–13.119) μm×(1.330–3.230) μm (图 1C–1E); 以 *Simplicillium lanosoniveum* 为外群, 利用最大似然法构建 ITS/LSU/SSU/TEF/RPB1/RPB2 六基因系统发育树, 发现 EF-WCH-51 与蜡蚧菌属 *Lecanicillium* 丝枝蜡蚧菌 *L. aphanocladii* 聚为一支, 且支持率为 100%, 表现出非常近的亲缘关系(图 2, 表 2); 结合该菌株的形态特征, 确定该菌株为丝枝蜡蚧菌 *L. aphanocladii*。

2.2 菌株发酵液粗提物的抑菌活性

EF-WCH-51 发酵液粗提物对葫芦科刺盘孢菌丝生长影响明显, 随着发酵液粗提物浓度

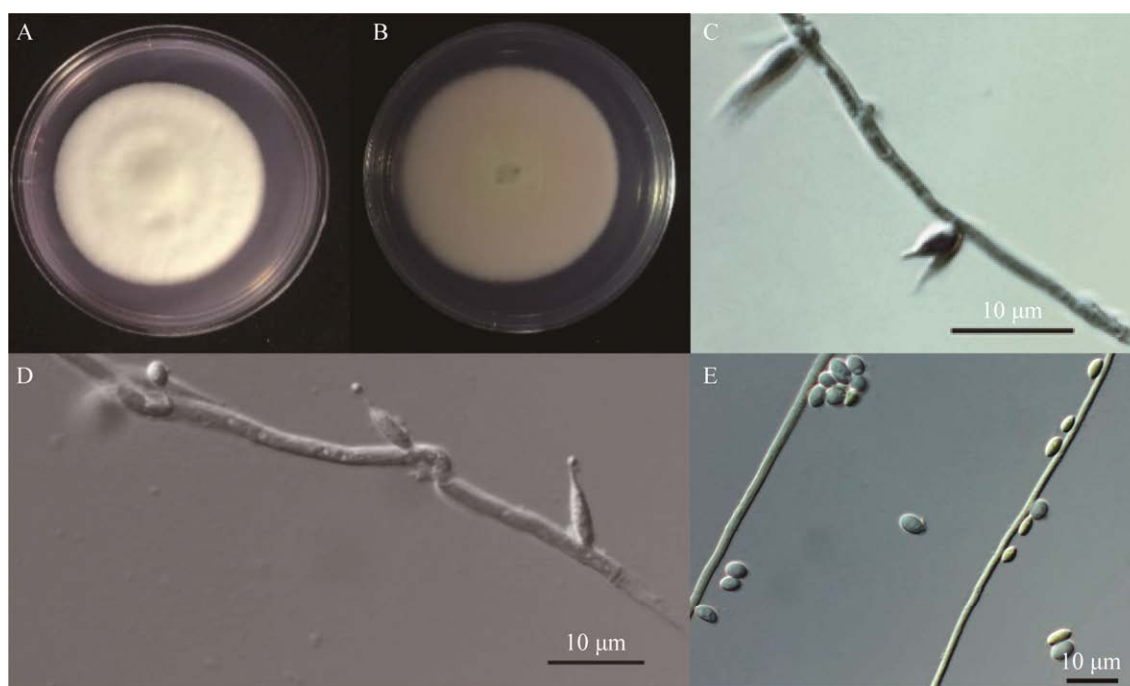


图 1 丝枝蜡蚧菌在 PDA 培养基上的形态学特征 A: 菌落正面. B: 菌落背面. C–E: 产孢结构及孢子

Figure 1 Morphological characteristics of *Lecanicillium aphanocladii* on PDA. A: The front side of colony. B: The reverse side of colony. C–E: Sporulation structure and conidia.

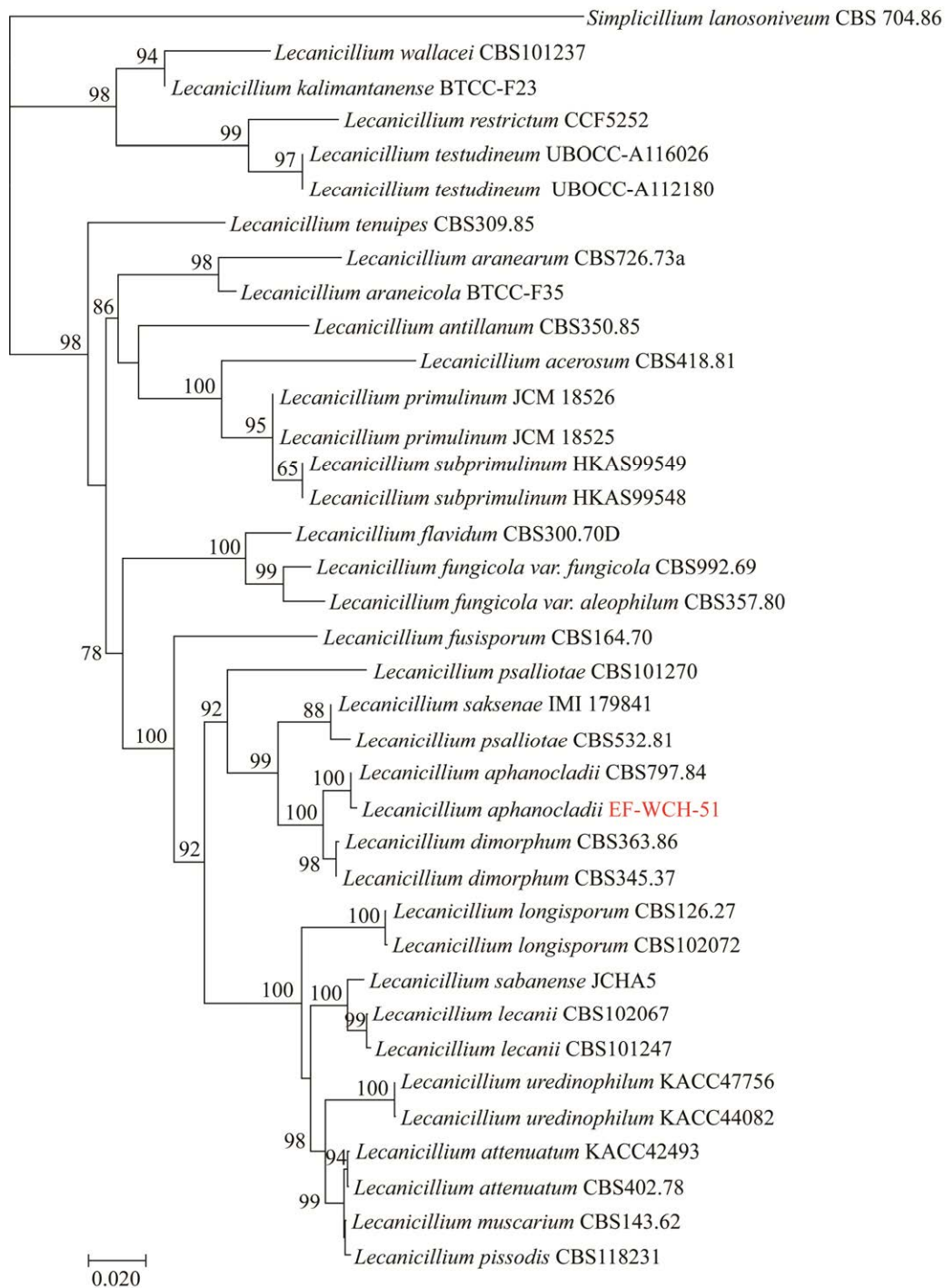


图 2 基于最大似然法构建蜡蚧菌属 ITS/SSU/LSU/TEF/RPB1/RPB2 多基因系统发育树 EF-WCH-51 为目的菌株；树的分支上显示的是最大似然法支持率；标尺表示基因组的遗传变异

Figure 2 Phylogenetic tree of genus *Lecanicillium* obtained from the concatenated dataset for the genes ITS, SSU, LSU, TEF, RPB1 and RPB2, for maximum likelihood method. EF-WCH-51 as the target strain; The maximum likelihood method support rate is displayed on the branches of the tree; Scales represent genetic variations in the genome.

表 2 构建蜡蚧菌属系统发育树的菌株及其 GenBank 登录号

Table 2 Strains used in construction of the phylogenetic tree and their GenBank accession numbers about *Lecanicillium*

种名 Strain	菌株编号 Strain code	GenBank 登录号 GenBank accession No.					
		ITS	TEF	LSU	SSU	RPB1	RPB2
<i>Lecanicillium acerosum</i>	CBS 418.81	EF641893	KM283810	KM283786	KM283762	KM283832	KM283852
<i>L. antillanum</i>	CBS 350.85	AJ292392	DQ522350	AF339536	AF339585	DQ522396	DQ522450
<i>L. aphanocladii</i>	CBS797.84	—	KM283811	KM283787	KM283763	KM283833	KM283853
<i>L. aphanocladii</i>	EF-WCH-51	OQ806916	OQ857508	OQ807036	OQ807035	OQ857510	OQ857509
<i>L. araneorum</i>	CBS726.73a	AJ292464	EF468781	AF339537	AF339586	EF468887	EF468934
<i>L. araneicola</i>	BTCC-F35	AB378506	—	—	—	—	—
<i>L. attenuatum</i>	CBS402.78	AJ292434	EF468782	AF339565	AF339614	EF468888	EF468935
<i>L. attenuatum</i>	KACC42493	—	KM283804	KM283780	KM283756	KM283826	KM283846
<i>L. dimorphum</i>	CBS345.37	—	KM283812	KM283788	KM283764	KM283834	KM283854
<i>L. dimorphum</i>	CBS363.86	—	EF468784	AF339559	AF339608	EF468890	—
<i>L. flavidum</i>	CBS300.70D	EF641877	KM283813	KM283789	KM283765	—	KM283855
<i>L. fungicola</i> var. <i>aleophilum</i>	CBS357.80	NR_111064	KM283815	KM283791	KM283767	KM283835	KM283856
<i>L. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>	CBS992.69	NR_119653	KM283816	KM283792	KM283768	—	KM283857
<i>L. fusisporum</i>	CBS164.70	AJ292428	KM283817	KM283793	KM283769	KM283836	KM283858
<i>L. kalimantanense</i>	BTCC-F23	AB360356	—	—	—	—	—
<i>L. lecanii</i>	CBS101247	JN049836	DQ522359	KM283794	KM283770	KM283837	KM283859
<i>L. lecanii</i>	CBS102067	—	KM283818	KM283795	KM283771	KM283838	KM283860
<i>L. longisporum</i>	CBS102072	—	KM283819	KM283796	KM283772	KM283839	KM283861
<i>L. longisporum</i>	CBS126.27	—	KM283820	KM283797	KM283773	KM283840	KM283862
<i>L. muscarium</i>	CBS143.62	—	KM283821	KM283798	KM283774	KM283841	KM283863
<i>L. pissodis</i>	CBS118231	—	KM283822	KM283799	KM283775	KM283842	KM283864
<i>L. primulinum</i>	JCM18525	AB712266	—	AB712263	—	—	—
<i>L. primulinum</i>	JCM18526	AB712267	—	AB712264	—	—	—
<i>L. psalliotae</i>	CBS532.81	JN049846	EF469067	AF339560	AF339609	EF469096	EF469112
<i>L. psalliotae</i>	CBS101270	—	EF469066	EF469081	EF469128	EF469095	EF469113
<i>L. restrictum</i>	CCF5252	LT548279	LT626943	—	—	—	—
<i>L. sabanense</i>	JCHA5	KC633232	KC633266	KC875225	KC633251	—	KC633249
<i>L. saksenae</i>	IMI179841	AJ292432	—	—	—	—	—
<i>L. subprimulinum</i>	HKAS99548	MG585314	MG585317	MG585315	MG585316	—	—
<i>L. subprimulinum</i>	HKAS99549	MG585318	MG585321	MG585319	MG585320	—	—
<i>L. testudineum</i>	UBOCC-A112180	LT992874	LT992868	—	—	—	—
<i>L. testudineum</i>	UBOCC-A116026	LT992871	LT992867	—	—	—	—
<i>L. tenuipes</i>	CBS309.85	JN036556	DQ522341	KM283802	KM283778	KM283844	KM283866
<i>L. uredinophilum</i>	KACC44082	—	KM283806	KM283782	KM283758	KM283828	KM283848
<i>L. uredinophilum</i>	KACC47756	—	KM283807	KM283783	KM283759	KM283829	KM283849
<i>L. wallacei</i>	CBS 101237	EF641891	EF469073	AY184967	AY184978	EF469102	EF469119
<i>Simplicillium lanosoneum</i>	CBS 704.86	AJ292396	DQ522358	AF339553	AF339602	DQ522406	DQ522464

—: 未找到相关基因库登录号

—: The relevant gene bank login number was not found.

的升高,对菌丝生长抑制效果增加(图 3),毒力方程为 $Y=6.980\ 3+1.860\ 4X$, 相关系数 $r=0.924\ 7$, EC_{50} 为 $0.086\ 2\ \text{mg/mL}$ 。

2.3 菌株发酵液粗提物的初步分离

EF-WCH-51 发酵液粗提物中,组分 A 为粗提物中主要成分(图 4)。为探究发酵液粗提物中的抑菌活性成分,后续试验对组分 A 进行初步

分离并确定其活性。采用半制备柱高效液相色谱仪对 EF-WCH-51 发酵液粗提物进行初步分离纯化,收集 5 min 时 A 组分峰(图 5),分离液浓缩至干,得到干品 $3.7\ \text{mg}$ 。根据高效液相色谱中组分 A 的峰面积占总峰面积的百分比进行纯度分析,结果表明获得的干品其纯度达到 75.6%。

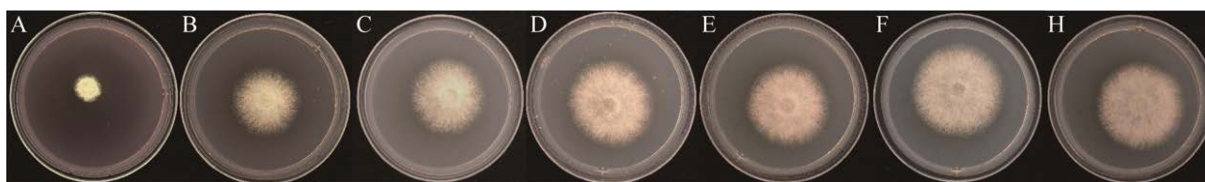


图 3 EF-WCH-51 发酵液粗提物对葫芦科刺盘孢的抑制作用 A-E: 发酵液浓度从高到低分别为 0.192、0.096、0.048、0.024 和 0.012 mg/mL. F: 阴性对照. H: 空白对照

Figure 3 Inhibitory effect of crude extract from EF-WCH-51 fermentation broth on *Colletotrichum orbiculare*. A-E: 0.192, 0.096, 0.048, 0.024 and 0.012 mg/mL. F: Negative control. H: Blank control.

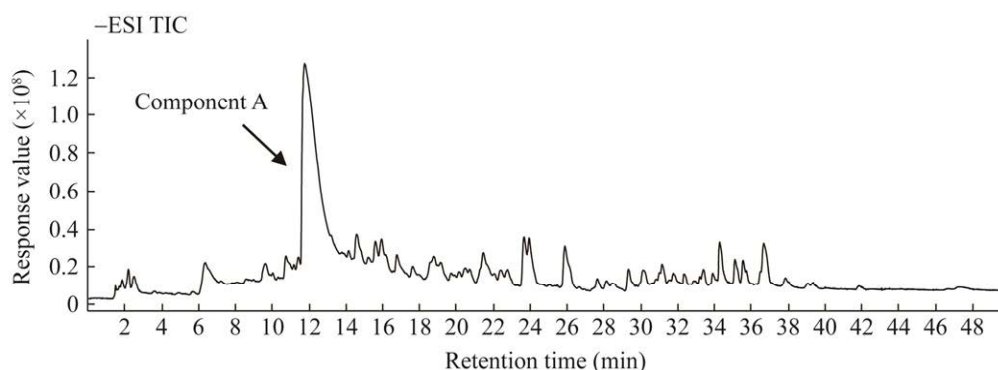


图 4 EF-WCH-51 发酵液粗提物阴离子模式下 HPLC-DAD-MS 分析

Figure 4 HPLC-DAD-MS analysis of crude extract from EF-WCH-51 fermentation broth in negative mode.

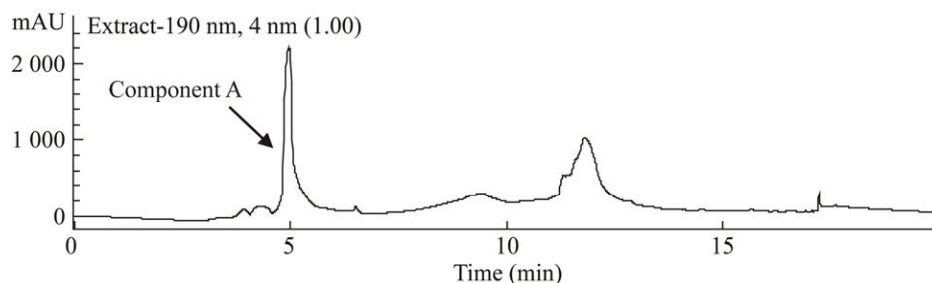


图 5 EF-WCH-51 发酵液粗提物高效液相色谱图

Figure 5 HPLC chromatogram of crude extract from EF-WCH-51 fermentation broth.

2.4 EF-WCH-51 菌株组分 A 的抑菌活性

组分 A 对葫芦科刺盘孢菌丝生长影响的结果表明: 添加 0.085 0 mg/mL 组分 A 的药板上病原菌平均生长直径为 (12.20 ± 0.13) mm, 阴性对照组病原菌平均生长直径为 (31.94 ± 0.80) mm, 空白对照组病原菌平均生长直径为 (31.17 ± 1.80) mm, 组分 A 对葫芦科刺盘孢的生长具有明显的抑制效果, 其抑制率为 76.08%。

2.5 组分 A 的物质鉴定结果

一级质谱(图 6)结果显示: 阴离子模式下出

现碎片离子峰 305.0 [M-H]、277.0 [M-H-CO], 该化合物可能的分子式为 $C_{14}H_{10}O_8$; 二级质谱(图 7)结果显示: 阳离子模式下出现准分子离子峰为 307.0 [M+H], 其碎片离子为 279、222 和 131; 阴离子模式下出现准分子离子峰为 305.0 [M-H], 其碎片离子为 277、249、205、192、165 和 151。通过查阅 DNP 数据库并与参考文献[20-21]对比, 其 MS/MS 及 MS 分析结果一致, 且分离得到的化合物为红色粉末状, 与文献报道颜色一致, 因此确定该组分为卵孢菌素(oosporein)。

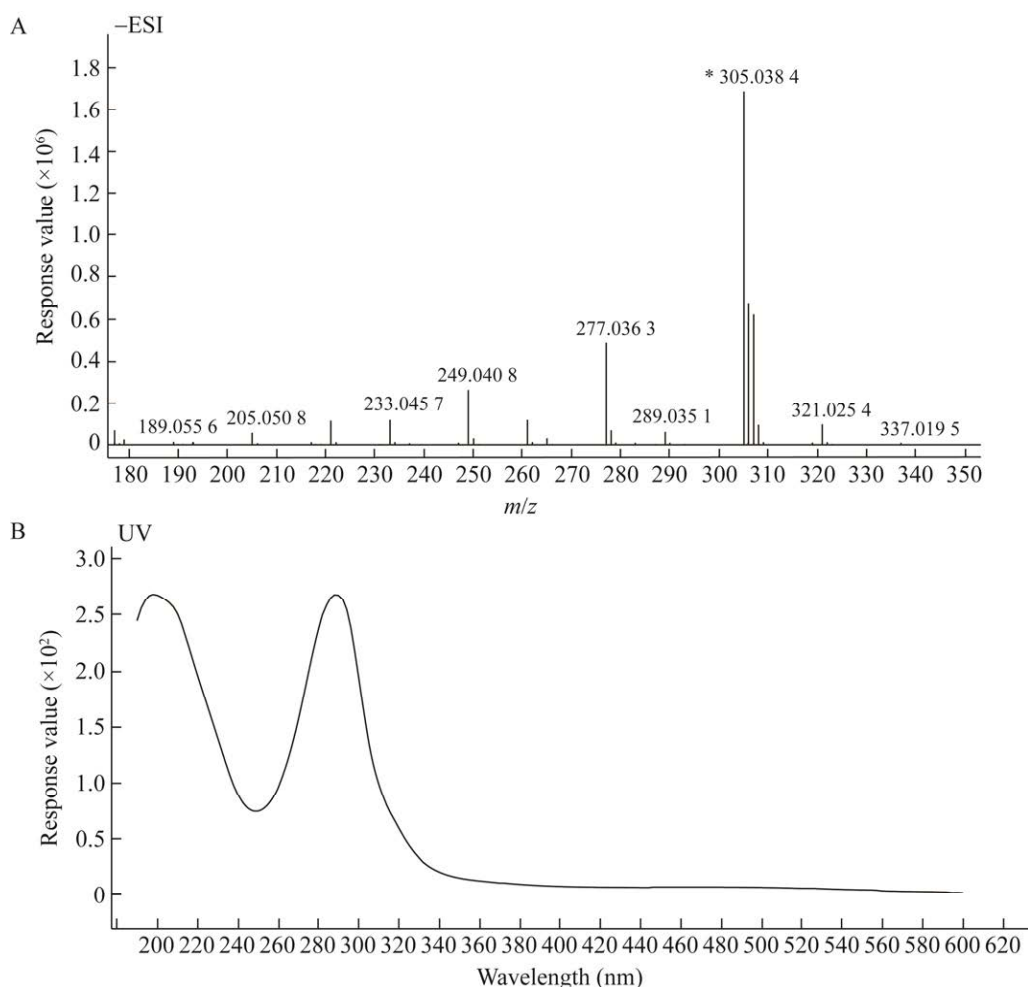


图 6 组分 A 阴离子模式一级质谱图及紫外光谱图 A: 质谱图. *: 分子离子峰, 下同. B: 紫外光谱图

Figure 6 Primary mass spectrum and ultraviolet spectrum of anion mode of component A. A: Mass spectrum. *: Molecular ion peak, the same below. B: Ultraviolet spectrum.

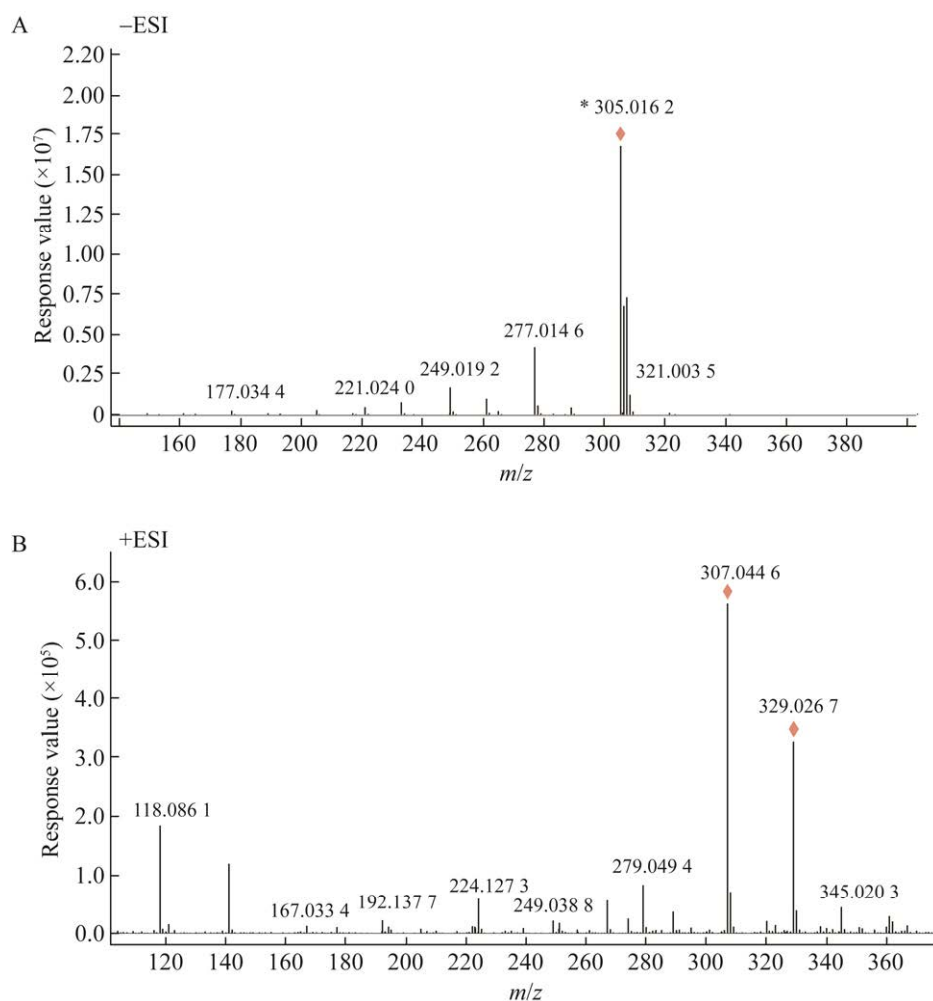


图7 组分A二级质谱图 A: 阴离子模式. B: 阳离子模式

Figure 7 Secondary mass spectrum of component A. A: Negative mode. B: Positive mode.

3 讨论与结论

研究表明,从‘海螺’望春花中分离出的内生真菌 EF-WCH-51 是来自蜡蚧菌属的丝枝蜡蚧菌 *L. aphanocladii*,其发酵产物中含有抑制瓜炭疽病原菌生长的活性成分,该成分经鉴定确定为卵孢菌素(oosporein)。虽然卵孢菌素是已知化合物,但对瓜类作物致病菌葫芦科刺盘孢的抑制活性未见报道。

蜡蚧菌属真菌是一类重要的昆虫病原真菌^[22],多寄生于蚜虫、叶蝉等半翅目昆虫^[23],除此之

外,该属真菌也作为植物内生真菌从杜鹃科植物(*Arctostaphylos uva-ursi*)、美洲鹅耳枥(*Carpinus caroliniana*)、海枣(*Phoenix dactylifera*)等植物体中分离到^[24-26]。丝枝蜡蚧菌从七叶树潜叶蛾(*Cameraria ohridella*)的幼虫及成虫^[27]、蜘蛛上分离得到^[28],也有从淡水鱼^[29]、土壤^[30]中分离得到,而丝枝蜡蚧菌作为内生真菌,仅见报道从禾本科植物玉米和草本植物霍山石斛中分离到^[31-32]。

卵孢菌素最初作为色素被发现^[33],存在于毛壳菌属^[34-35]、白僵菌属^[36]、虫草属^[37]及轮枝菌属^[38]等真菌中。Amin等^[39]研究发现卵孢菌素

对烟粉虱具有杀虫活性, 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)以及绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)具有抑菌活性^[40], 对疫霉(*Phytophthora infestans*)^[38]、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、灰霉菌(*Botrytis cinerea*)以及终极腐霉(*Pythium ultimum*)表现出抑制活性^[35], 也具有抗病毒^[41]活性。本试验通过探究丝枝蜡蚧菌发酵产物活性成分发现卵孢菌素对葫芦科刺盘孢菌丝生长具有显著抑菌活性, 这为针对瓜炭疽病的生物防治提供了一种新的可能。

一直以来, 丝枝蜡蚧菌都是以虫害防治为研究目标, 而以植物病害为防治对象的研究鲜有报道。本研究发现的这株望春花内生真菌丝枝蜡蚧菌对瓜炭疽病原菌有很好的生长抑制效果, 其活性成分卵孢菌素起主要抑菌作用。后续还可进一步探究该菌株在防治瓜类主要虫害时是否具有防控效果, 如果该菌株能兼具防治植物病害和虫害, 那将为瓜类植物病虫害的生物防治提供优良的菌株。

REFERENCES

- [1] 邹明学, 许勇, 张海英, 郭绍贵, 宫国义. 葫芦科瓜类作物分子标记辅助育种研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(4): 72-78.
ZOU MX, XU Y, ZHANG HY, GUO SG, GONG GY. Progress in molecular marker-assisted breeding of Cucurbitaceae[J]. Biotechnology Bulletin, 2007(4): 72-78 (in Chinese).
- [2] 谢学文, 揣红运, 董瑞利, 杨杰, 石延霞, 柴阿丽, 李宝聚. 甲基营养型芽孢杆菌 WF-3 微粉剂的研制及对黄瓜炭疽病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(5): 722-728.
XIE XW, CHUAI HY, DONG RL, YANG J, SHI YX, CHAI AL, LI BJ. Preparation of micropowder of *Bacillus methylotrophicus* WF-3 and its control effect on cucumber anthracnose[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(5): 722-728 (in Chinese).
- [3] 邱德文. 我国植物病害生物防治的现状与发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 15-18, 35.
QIU DW. Current status and development strategy for biological control of plant diseases in China[J]. Plant Protection, 2010, 36(4): 15-18, 35 (in Chinese).
- [4] 王贵生, 陆娟, 唐娟, 余梅霞, 朱玉, 李庆芬, 唐俊. 1 株毫菊内生菌的分离鉴定及其生物活性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(4): 138-145, 154.
WANG GS, LU J, TANG J, YU MX, ZHU Y, LI QF, TANG J. Isolation, identification and biological activity analysis of an endophytic fungus from *Chrysanthemum morifolium* cv.Boju[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2019, 47(4): 138-145, 154 (in Chinese).
- [5] 黄燕, 曾东强, 唐文伟, 杜良伟. 植物内生真菌生物活性成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(8): 1419-1437.
HUANG Y, ZENG DQ, TANG WW, DU LW. Research advances of endophytic fungi bioactive components[J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(8): 1419-1437 (in Chinese).
- [6] 杨明琰, 梁语燕, 田稼, 杨建军, 孙超, 董岁明. 杜仲内生真菌 DZ05 的鉴定及抗菌生物活性研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(12): 2550-2554.
YANG MY, LIANG YY, TIAN J, YANG JJ, SUN C, DONG SM. Study on identification and bioactivity of endophytic fungus DZ05 isolated from the *Eucommia ulmoides*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(12): 2550-2554 (in Chinese).
- [7] 武文斌, 刘雅莉, 岳高超, 张雯. 蕈藟内生真菌发酵液抗菌及抗肿瘤活性初步研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(12): 2280-2287.
WU WB, LIU YL, YUE GC, ZHANG W. Antagonism on microorganisms and cancer cells by the fermentation broth of endophytic fungi from *Tribulus terrestris* L.[J]. Microbiology China, 2013, 40(12): 2280-2287 (in Chinese).
- [8] 王文魁, 王一鸣, 张映, 沈映君, 齐云. 辛夷油抗炎机理探讨[J]. 山西农业大学学报, 2000, 20(4): 324-326.
WANG WK, WANG YM, ZHANG Y, SHEN YJ, QI Y. Anti-inflammatory mechanism of the volatile oil of *Magnoliae Flos*[J]. Journal of Shanxi Agricultural University, 2000, 20(4): 324-326 (in Chinese).
- [9] 张婷婷, 郭夏丽, 黄学勇, 罗丽萍. 辛夷挥发油 GC-MS 分析及其抗氧化、抗菌活性[J]. 食品科学, 2016, 37(10): 144-150.
ZHANG TT, GUO XL, HUANG XY, LUO LP. GC-MS

- analysis and antioxidant and antimicrobial properties of volatile oil from *Magnoliae Flos*[J]. Food Science, 2016, 37(10): 144-150 (in Chinese).
- [10] 朱雄伟, 杨晋凯, 胡道伟. 辛夷成分及其药理应用研究综述[J]. 海峡药学, 2002, 14(5): 5-7.
ZHU XW, YANG JK, HU DW. Summarize of study on the application in medicine function and the ingredient of *Magnolia liliflora*[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2002, 14(5): 5-7 (in Chinese).
- [11] 张劲松, 李博, 陈家宽, 周铜水. 加拿大一枝黄花挥发油成分及其抗菌活性[J]. 复旦学报(自然科学版), 2006, 45(3): 412-416.
ZHANG JS, LI B, CHEN JK, ZHOU TS. Chemical constituents and antimicrobial activity of volatile oil from *Solidago canadensis* L.[J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 2006, 45(3): 412-416 (in Chinese).
- [12] 彭凡, 易善萍, 赵铨, 于文雅, 尹婉莹, 谢慧颖. ‘海螺’望春花幼树和古树花苞挥发性成分比较[J]. 植物资源与环境学报, 2021, 30(4): 69-71.
PENG F, YI SP, ZHAO C, YU WY, YIN WY, XIE HY. Comparison on volatile components in flower buds of saplings and ancient trees of *Yulania denudata* ‘Hailuo’[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2021, 30(4): 69-71 (in Chinese).
- [13] 单体江, 贺佳, 苏艳, 钟慧霞, 叶孟辉, 余炳伟, 温秀军, 王军. 鲜切花黄芩挥发油 GC-MS 分析及其抗菌活性[J]. 华北农学报, 2016, 31(S1): 335-339.
SHAN TJ, HE J, SU Y, ZHONG HX, YE MH, YU BW, WEN XJ, WANG J. GC-MS analysis and antibacterial activity of volatile oil from cut flowers *Solidago* spp.[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2016, 31(S1): 335-339 (in Chinese).
- [14] 丁浩, 张帆, 曹研, 吕龙, 杜木英. 马铃薯葡萄糖培养基制作方法的改进[J]. 中国酿造, 2012, 31(4): 141-144.
DING H, ZHANG F, CAO Y, LÜ L, DU MY. Improvement of potato dextrose agar medium preparation[J]. China Brewing, 2012, 31(4): 141-144 (in Chinese).
- [15] INNIS MA. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990.
- [16] REHNER SA, BUCKLEY E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs[J]. Mycologia, 2005, 97(1): 84-98.
- [17] VILGALYS R, HESTER M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(8): 4238-4246.
- [18] CASTLEBURY L A, ROSSMAN AY, SUNG GH, HYTEN AS, SPATAFORA JW. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus[J]. Mycological Research, 2004, 108(8): 864-872.
- [19] LIU YJ, WHELEN S, HALL BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit[J]. Molecular Biology and Evolution, 1999, 16(12): 1799-1808.
- [20] 胡丰林, 丁晓娟, 杨成, 李增智, 樊美珍. 一种白僵菌中 MAO 抑制剂的分离纯化和结构鉴定[J]. 菌物学报, 2006, 25(2): 273-277.
HU FL, DING XJ, YANG C, LI ZZ, FAN MZ. Isolation and identification of monoamine oxidase inhibitor from fermentation broth of a strain of *Beauveria*[J]. Mycosystema, 2006, 25(2): 273-277 (in Chinese).
- [21] ROSS PF, OSHEIM DL, ROTTINGHAUS GE. Mass spectral confirmation of oosporein in poultry rations[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 1989, 1(3): 271-272.
- [22] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996.
PU ZL, LI ZZ. Insect Mycology[M]. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House, 1996 (in Chinese).
- [23] 刘明科, 闫芳芳, 齐禹哲, 黄岩, 闫雪梨, 钱逸彬, 李茂业. 对桃蚜高毒力的蜡蚧菌菌株筛选[J]. 昆虫学报, 2020, 63(6): 751-758.
LIU MK, YAN FF, QI YZ, HUANG Y, YAN XL, QIAN YB, LI MY. Screening of *Lecanicillium* strains with high virulence to *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2020, 63(6): 751-758 (in Chinese).
- [24] WIDLER BE. Untersuchungen über endophytische pilze von *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel (Ericaceae)[J]. Botanica Helvetica, 1982, 94: 307-337.
- [25] BILLS GF, POLISHOOK JD. Microfungi from *Carpinus caroliniana*[J]. Canadian Journal of Botany, 1991, 69(7): 1477-1482.
- [26] GÓMEZ-VIDAL S, LOPEZ-LLORCA LV, JANSSON HB, SALINAS J. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi[J]. Micron (Oxford, England: 1993), 2006, 37(7):

- 624-632.
- [27] PEČIULYTĖ D, KAČERGIUS A. *Lecanicillium aphanocladii*: a new species to the mycoflora of Lithuania and a new pathogen of tree leaves mining insects[J]. Botanica Lithuanica, 2012, 18(2): 133-146.
- [28] MANFRINO RG, GONZÁLEZ A, BARNECHE J, TORNESELLO GALVÁN J, HYWELL-JONES N, LÓPEZ LASTRA CC. Contribution to the knowledge of pathogenic fungi of spiders in Argentina. Southernmost record in the world[J]. Revista Argentina De Microbiologia, 2017, 49(2): 197-200.
- [29] GOH J, OH Y, PARK YH. Isolation and characterization of previously undescribed seventeen fungal species belonging to the order *Hypocreales* in Korea[J]. The Korean Journal of Mycology, 2022, 50(1): 517-520.
- [30] 董旋, 曾桂萍, 陈万浩, 韩燕峰, 梁宗琦. 一株产红色色素的丝枝蜡蚧霉新菌株[J]. 山地农业生物学报, 2016, 35(3): 91-94.
- DONG X, ZENG GP, CHEN WH, HAN YF, LIANG ZQ. A new fungus strain (producing red pigment) of *Lecanicillium aphanocladii*[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2016, 35(3): 91-94 (in Chinese).
- [31] RIJAVEC T, LAPANJE A, DERMASTIA M, RUPNIK M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2007, 53(6): 802-808.
- [32] 闵长莉, 闵运江, 徐慧欣, 汪学军. 霍山石斛内生真菌的分离及其活性菌株的鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 968-973.
- MIN CL, MIN YJ, XU HX, WANG XJ. Isolation and identification of an endophytic fungus from *Dendrobium huoshanense*[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(6): 968-973 (in Chinese).
- [33] KOGL F, VAN WESSEM G. Analysis concerning pigments of fungi XIV: concerning oosporein, the pigment of oospora colorans van Beyma[J]. Recl Trav Chim Pays Bas Bel, 1944, 63: 5-24.
- [34] COLE RJ, KIRKSEY JW, CUTLER HG, DAVIS EE. Toxic effects of oosporein from *Chaetomium trilaterale*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1974, 22(3): 517-520.
- [35] MAO BZ, HUANG C, YANG GM, CHEN YZ, CHEN SY. Separation and determination of the bioactivity of oosporein from *Chaetomium cupreum*[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(36): 5955-5961.
- [36] LUO ZB, LI YJ, MOUSA J, BRUNER S, ZHANG YJ, PEI Y, KEYHANI NO. *Bbmsn2* acts as a pH-dependent negative regulator of secondary metabolite production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(4): 1189-1202.
- [37] 卢梦梦, 李义勇, 刘洪新, 郝再彬, 章卫民. 深红虫草次级代谢产物的分离与鉴定[J]. 中国药房, 2018, 29(3): 353-356.
- LU MM, LI YY, LIU HX, HAO ZB, ZHANG WM. Isolation and identification of secondary metabolites from *Cordyceps cardinalis*[J]. China Pharmacy, 2018, 29(3): 353-356 (in Chinese).
- [38] NAGAOKA T, NAKATA K, KOUNO K, ANDO T. Antifungal activity of oosporein from an antagonistic fungus against *Phytophthora infestans*[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C, Journal of Biosciences, 2004, 59(3/4): 302-304.
- [39] AMIN GA, YOUSSEF NA, BAZAID S, SALEH WD. Assessment of insecticidal activity of red pigment produced by the fungus *Beauveria bassiana*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(12): 2263-2268.
- [40] ALURAPPA R, BOJEGOWDA MRM, KUMAR V, MALLESH NK, CHOWDAPPA S. Characterisation and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander* L.[J]. Natural Product Research, 2014, 28(23): 2217-2220.
- [41] TERRY BJ, LIU WC, CIANCI CW, PROSZYNSKI E, FERNANDES P, BUSH K, MEYERS E. Inhibition of *Herpes simplex* virus type 1 DNA polymerase by the natural product oosporein[J]. The Journal of Antibiotics, 1992, 45(2): 286-288.