

萝芙木内生真菌的分离及发酵产物抑菌活性的研究

刘海燕, 杜丰玉, 肖琳, 金玉兰

(青岛农业大学 化学与药学院, 山东 青岛 266109)

摘要:从萝芙木的果实中分离得到 5 株内生真菌:LG-A、LG-B、LG-C、LG-D 与 LG-E, 以 5 株内生真菌为试验材料, 采用微量滤纸片法, 研究了 5 株内生真菌发酵乙醇粗提物对苹果腐烂病菌、苹果轮纹病菌与苹果果实链格孢菌的抑菌活性, 以期筛选出具有农用抗植物病原真菌的活性菌株。并采用菌丝生长速率法, 进一步测定了菌株 LG-B 与 LG-D 乙醇粗提物的不同溶剂萃取物的抑菌活性。结果表明:菌株 LG-B 与 LG-D 对 3 种苹果病原真菌均有明显的抑制作用。LG-B 与 LG-D 发酵产物的乙酸乙酯萃取物抑菌活性较好, 菌株 LG-B 对苹果腐烂病菌的 EC_{50} 仅为 $16.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, LG-D 对苹果腐烂病菌与苹果轮纹病菌的 EC_{50} 分别为 $21.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $52.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词:萝芙木; 内生真菌; 发酵产物; 抑菌活性

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)15-0105-03

植物内生真菌由于个体小、生长周期短、生长易控制等优点, 其次代谢产物可以作为对环境无公害农药的新来源, 为新农药的资源开发提供了很大的发展空间^[1]。药用植物内生真菌代谢产物是一类尚未完全开发的天然化合物资源, 从药用植物内生真菌中寻找新的生物活性成分已成为研究热点。ALY 等^[2]研究发现, 补血草内生真菌 *Penicillium* sp. 的代谢产物具有显著抗布氏锥虫的活性; 特别是产紫杉醇的内生真菌被发现后^[3], 药用植物内生真菌作为新的药物资源受到人们的广泛关注, 内生真菌产生生物活性物质的报道也越来越多。

萝芙木为夹竹桃科植物萝芙木(*Rauwolfia verticillata* (Lour.) Baill.) 的根, 又名山辣椒、山马蹄、萝芙藤等。SHARIFF 等^[4]研究发现, 四叶萝芙木叶的醇提物对细菌和真菌具有抑制作用; 萝芙木叶中分离得到的吲哚生物碱类具有较好的肿瘤细胞毒性^[5-6]。近年来, 由于中草药的大规模开发应用, 野生萝芙木已经属于珍稀濒危药用植物资源, 为了有效保护萝芙木野生药用资源, 因此, 有必要开发萝芙木内生真菌, 通过内生真菌发酵实现生物活性物质的工业化生产。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试萝芙木果实采摘自广西药用植物园。

供试菌种:苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、苹果轮纹病菌(*Phylospora piricola*)与苹果果实链格孢病菌(*Alternaria mali*)均由青岛农业大学农学与植保学院植物病害流行病学研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 内生菌的分离纯化 首先用自来水流水冲洗萝芙木果实 10~20 min, 75% 的乙醇清洗 1 min, 次氯酸钠消毒 3 min, 无菌水冲洗 3~4 次^[7]。然后将萝芙木果实置于无菌滤纸上, 吸干表面上的水分, 用剪刀或解剖刀将处理的样品剪碎, 各取 3 块组织放在 PDA 培养基上, 做 3 次重复; 将植物组织轻触培养皿, 作为空白试验。将分离出来的真菌纯化后用斜面进行保藏。

1.2.2 样品的制备 将 5 种萝芙木内生真菌活化, 然后采用摇瓶发酵法^[8], 在 1 000 mL 三角瓶中装量 400 mL PDA 液体培养基, 28 °C, 120 r · min⁻¹ 发酵 18 d 后, 用乙醇提取 3 次, 合并滤液, 减压浓缩; 应用系统溶剂法对乙醇粗提物进行萃取, 分别用乙酸乙酯与水饱和和正丁醇萃取, 所得液和剩余水相减压浓缩。

1.2.3 抑菌活性的测定方法 微量滤纸片法:准备直径为 7 mm 的圆形滤纸片若干, 灭菌。在平板的中心接上病原真菌, 在无菌条件下, 取已配好的样品液滴在滤纸片上, 每个滤纸片加 10 μL , 不加样品的滤纸片为空白对照, 27 °C 培养, 待空白对照一侧的菌丝即将长满时, 测量

第一作者简介:刘海燕(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物源农药。E-mail:liu2011haiyan@163.com.

责任作者:金玉兰(1965-), 女, 副教授, 研究方向为植物内生菌抑菌活性物质。E-mail:yulanj@hotmail.com.

基金项目:青岛农业大学博士基金资助项目(631431)。

收稿日期:2016-04-20

菌落半径, R_1 为空白对照一侧的菌落半径, R_2 为样品一侧的菌落半径, 抑菌率(%) = $(R_1 - R_2) / R_1 \times 100$ 。菌丝生长速率法: 将配制好的样品液加到 PDA 培养基里, 摇匀, 倒平板, 凝固后在平板的中心接上病原菌, 28 ℃ 静置培养, 不加样品的平板为空白对照, 待对照组菌丝即将长满整个平板时, 采用十字交叉法测量菌落直径^[9], 按下列公式求出抑菌率: 抑菌率(%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 $\times 100$ 。

1.2.4 EC_{50} 的测定 在 200、100、50、25、12.5 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度下测定苹果轮纹菌、苹果腐烂菌、苹果果实链格孢菌 EC_{50} 值。

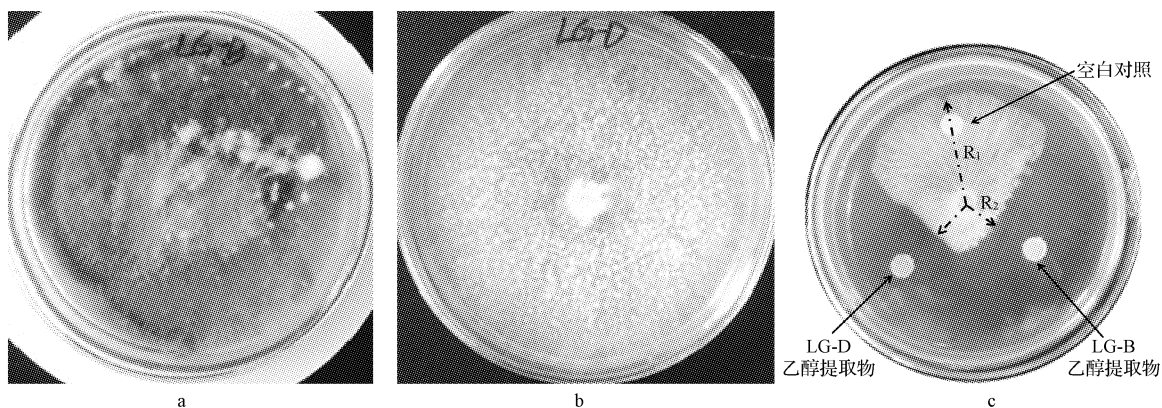
2 结果与分析

2.1 罗芙木内生菌的分离纯化

该试验从罗芙木果实中分离得到 5 株内生真菌, 编

表 1 罗芙木内生菌发酵产物乙醇粗提物对苹果病原菌的抑菌活性

苹果病原菌	抑菌率/%				
	LG-A	LG-B	LG-C	LG-D	LG-E
苹果轮纹菌	8.62±0.34	18.52±0.40	6.03±0.73	38.42±0.43	6.27±0.35
苹果腐烂菌	5.59±0.35	67.53±0.81	15.54±0.58	60.41±0.32	6.35±0.34
苹果果实链格孢菌	2.28±0.33	25.51±0.39	17.36±0.43	45.55±0.38	7.79±0.29



注: a 为 LG-B 的菌落形态, b 为 LG-D 菌落形态, c 为 LG-B 和 LG-D 乙醇提取物对苹果腐烂菌的抑菌活性结果。

图 1 LG-B 和 LG-D 的菌落形态以及微量滤纸片法抑菌活性结果

表 2 LG-B 发酵产物乙醇粗提物各萃取部分对苹果病原菌的抑菌活性

病原菌	抑菌率/%		
	乙酸乙酯层	水饱和正丁醇层	水层
苹果轮纹菌	60.48±0.84	12.34±1.19	5.43±0.39
苹果腐烂菌	93.29±1.23	23.72±0.78	32.73±0.67
苹果果实链格孢菌	48.19±1.53	8.35±0.86	9.86±0.54

2.3.2 LG-D 发酵产物乙醇粗提物各萃取部分对苹果病原菌的抑菌活性 从表 3 可以看出, LG-D 内生菌发酵产物乙醇粗提物的活性部位主要集中在乙酸乙酯层, 对苹果轮纹菌、苹果腐烂菌和苹果果实链格孢菌这 3 种苹果病原菌的抑制效果比较好, 分别为 71.87%、87.60%、62.82%, 水饱和正丁醇层和水层的抑制效果比较差。

号为 LG-A、LG-B、LG-C、LG-D 与 LG-E。

2.2 乙醇粗提物对植物病原菌的抑菌活性

从表 1 可以看出, 5 种罗芙木内生真菌发酵产物的乙醇粗提物对 3 种苹果病原真菌均存在不同程度的抑制作用, 其中 LG-B 和 LG-D 内生菌发酵产物乙醇粗提物对苹果轮纹菌、苹果腐烂菌和苹果果实链格孢菌这 3 种病原菌的抑菌活性比较高, 其中 LG-B 和 LG-D 内生菌发酵产物乙醇粗提物对苹果腐烂菌的抑菌率较高, 分别为 67.53% 和 60.41%。

2.3 不同极性溶剂萃取物对苹果病原真菌的抑菌活性

2.3.1 LG-B 发酵产物乙醇粗提物各萃取部分对苹果病原菌的抑菌活性 由表 2 可知, LG-B 内生菌发酵产物乙醇粗提物的活性部位主要集中在乙酸乙酯层, 特别是对苹果腐烂菌的抑菌活性较高, 抑菌率为 93.29%。

表 3 LG-D 发酵产物乙醇粗提物各萃取部分对苹果病原菌的抑菌活性

病原菌	抑菌率/%		
	乙酸乙酯层	水饱和正丁醇层	水层
苹果轮纹菌	71.87±1.82	3.45±0.63	25.73±1.69
苹果腐烂菌	87.60±1.26	12.42±0.82	37.22±1.17
苹果果实链格孢菌	62.82±1.09	20.35±0.78	17.87±0.65

2.4 乙酸乙酯萃取物对苹果病原菌的毒力测定

2.4.1 LG-B 发酵液乙醇提物乙酸乙酯萃取物对苹果病原菌的毒力测定 由表 4 可知, LG-B 发酵液乙醇粗提物的乙酸乙酯萃取部分对苹果腐烂菌的抑制效果最好, EC_{50} 为 16.2 $mg \cdot L^{-1}$; 对苹果轮纹菌的抑制效果次之, EC_{50} 为 109.7 $mg \cdot L^{-1}$; 对苹果果实链格孢菌的抑制效果相对最弱, EC_{50} 为 293.6 $mg \cdot L^{-1}$ 。

表4 LG-B 发酵液乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对苹果病原菌的毒力

供试病原菌	毒力回归方程	相关系数	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)
苹果轮纹菌	y=0.841 0x+3.284 2	0.991 3	109.7
苹果腐烂菌	y=1.122 8x+3.642 0	0.988 6	16.2
苹果果实链格孢菌	y=0.931 3x+2.701 8	0.989 7	293.6

2.4.2 LG-D 发酵液乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对苹果病原菌的毒力测定 从表5可以看出, LG-D 发酵液乙醇粗提物的乙酸乙酯萃取物对苹果腐烂菌抑制效果最好, EC₅₀为21.0 mg·L⁻¹; 对苹果轮纹菌次之, EC₅₀为52.8 mg·L⁻¹; 苹果果实链格孢菌的抑制效果相对最弱, EC₅₀为98.8 mg·L⁻¹。

表5 LG-D 发酵液乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对苹果病原菌的毒力

供试病原菌	毒力回归方程	相关系数	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)
苹果轮纹菌	y=0.917 2x+3.419 9	0.987 6	52.8
苹果腐烂菌	y=0.965 3x+3.724 5	0.992 2	21.0
苹果果实链格孢菌	y=0.786 5x+3.514 8	0.990 7	98.8

3 讨论

该研究发现, 微量滤纸片法测定抑菌率可以节省样品, 特别是抑菌活性的粗筛时, 发酵产物量一般不大, 粗提物样品量少, 利用微量滤纸片法, 可以节省样品。并且, 每个平板可以同时测量2个样品的抑菌率, 可以节省PDA培养基。普通滤纸片法一般是用来定性的测定样品是否具有抑菌活性, 而该研究所用微量滤纸片法可以定量的测定样品的抑菌率。传统的生药对植物病原真菌的抑菌率测定常采用菌丝生长速率法, 但该方法需要的样品量比较大, 而且真菌在不同平板上的生长速率有差异, 相同批次, 相同培养条件, 空白对照组的菌丝生长情况也会不一样, 这会影响试验结果的准确性和可重

复性。而该研究所用微量滤纸片法可以克服这一缺点。

现通过对萝芙木内生菌代谢产物抑菌活性的研究, 为进一步从萝芙木内生菌代谢产物中分离得到抗菌活性成分奠定了基础, 今后研究的重点将放在对乙酸乙酯萃取物中的活性组分加以分离纯化, 进而对活性单体化合物的化学结构进行解析, 优化化学结构, 为新型微生物源农药的研制提供新颖的先导化合物。

参考文献

- [1] 丁常宏, 都晓伟, 徐莹. 药用植物内生真菌的功能研究进展[J]. 中药学报, 2013, 41(3): 168-171.
- [2] ALY A H, DEBBAB A, CLEMENTS C, et al. NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum* [J]. Bioorg Med Chem, 2011(19): 414-421.
- [3] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxant production by *Taxomyces* and reanaean endophytic fungus of pacific yew [J]. Science, 1993, 260(9): 214-216.
- [4] SHARIFF N, SUDARSHANA M S, UMESHA S, et al. Antimicrobial activity of *Rauwolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts [J]. Afr J Biotechnol, 2006, 5(10): 946-950.
- [5] ZHANG B J, PENG L, WU Z K, et al. Indole alkaloids from leaves and twigs of *Rauwolfia verticillata* [J]. Asian Nat Prod Res, 2013, 15(12): 1221-1229.
- [6] 彭浩, 陈文强, 邓百万, 等. 药用植物虎杖内生菌的研究现状与应用展望[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 1-4.
- [7] 申屠旭萍, 陈宵峰, 俞晓平. 雷公藤内生真菌的分离及活性菌株的筛选[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(5): 308-312.
- [8] 张飞官, 高雅慧, 任慧爽, 等. 桑疫病病原拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1285-1294.
- [9] 程永芳, 宗磊, 赵莉, 等. 广玉兰叶乙醇提取物对植物病原真菌抑菌活性研究[J]. 中国农学通报, 2010, 16(4): 267-270.

Isolation and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Derived From *Rauwolfia verticillata*

LIU Haiyan, DU Fengyu, XIAO Lin, JIN Yulan

(College of Chemistry and Pharmaceutial Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: Five strains of endophytic fungi, LG-A, LG-B, LG-C, LG-D and LG-E, were isolated from the fruit of *Rauwolfia verticillata*. Using the disk diffusion method, the antifungal activities of the fermentation extracts of five fungi were evaluated with three plant pathogenic fungi, including *Valsa mali*, *Physalospora piricola*, and *Alternaria mali*. The growth rate method was further used to evaluate the antifungal activities of the extracts of LG-B and LG-D. The results showed that the ethyl acetate extracts of LG-B and LG-D possessed the best antifungal activities. The EC₅₀ value of LG-B to *Valsa mali* was only 16.2 mg·L⁻¹, and the LG-D to *Valsa mali* and *Physalospora piricola* were only 21.0 mg·L⁻¹ and 52.8 mg·L⁻¹, respectively.

Keywords: *Rauwolfia verticillata*; endophytic fungi; fermentation extracts; antifungal activity