

# 野生黄芩内生真菌的分离鉴定及抗菌活性筛选

李青连 苏红 池维丹 崔晋龙 范黎\*

(首都师范大学生命科学学院 北京 100048)

**摘要:** 从野生黄芩的根、茎、叶中分离出 97 株内生真菌, 其中 33 株来自生长期植株, 64 株来自成熟期植株。经分类鉴定, 隶属于 38 个属, 优势属为 *Alternaria*, 成熟期的属种多样性高于生长期。将其中的 95 株内生真菌对 14 种指示菌进行抑菌试验, 发现其中 91 株内生真菌对一种或多种指示菌具有抑菌活性, 占分离菌株总数的 95.8%。野生黄芩内生真菌对大肠杆菌 CGMCC1.1103、枯草芽孢杆菌 CGMCC1.769、蜡样芽孢杆菌 ATCC1361、致病性大肠埃希氏菌 ATCC49105、白色假丝酵母 ATCC10231、小孢拟盘多毛孢 CNUMB2PM01 等 6 个指示菌菌株抑菌效果较好; 对单核细胞增生李斯特菌 ATCC27708、普通变形杆菌 ATCC33420、肠炎沙门氏菌 ATCC14208、副溶血型弧菌 ATCC27519、宋内氏痢疾杆菌 ATCC51060、九州镰孢霉 CNUMB2FK01 等 6 个指示菌菌株抑菌效果较差; 对深红酵母 CGMCC2.282 和金黄色葡萄球菌 ATCC12600 没有抑制作用。

**关键词:** 真菌, 分离, 中药, 抑菌活性

## Isolation, Identification and Inhibitory Activity Screening of Endophytic Fungi from Wild Plants of *Scutellaria baicalensis* Georgi

LI Qing-Lian SU Hong CHI Wei-Dan CUI Jin-Long FAN Li\*

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

**Abstract:** Ninety-seven strains of endophytic fungi were isolated from the roots, stems and leaves of natural *Scutellaria baicalensis* Georgi, in which, thirty-three from the living stage and sixty-four from the riping stage. They were classified as thirty-eight fungal genera in which *Alternaria* is the dominant genus. The distribution of genera in riping stage was more diversified than that in living stage. The inhibitory activity screening was conducted with fourteen species of microbes. The results showed that ninety-one strains, accounting for 95.8% of all the isolates, showed inhibitory activity to one indicator or more. Some endophytic fungi showed remarkable inhibitory activity to *Escherichia coli* CGMCC1.1103, *Bacillus subtilis* CGMCC1.769, *Bacillus cereus* ATCC1361, Enteropathogenic *E. coli* ATCC49105, *Candida albicans* ATCC10231, *Pestalotiopsis microspora* CNUMB2PM01. All fungal strains of endophytes obtained in this study showed no inhibitory activity to *Staphylococcus aureus* CGMCC2.282 and *Rhodotorula rubra* ATCC12600.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30870008)

\*通讯作者: Tel: 86-10-68902964; ✉: clifan@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2009-10-10; 接受日期: 2010-01-05

**Keywords:** Fungi, Isolation, Traditional medicine, Inhibitory activity

中药黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi, Labiatae)的干燥根,是著名的传统中药,最早收载于《神农本草经》,列为草根药的上品。它的主要有效成分是黄酮类化合物,迄今已分离出 40 多种黄酮<sup>[1]</sup>。国内外越来越多的研究表明,它的活性成分黄芩苷及黄芩素等具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗感染、抗 HIV、抗氧化及清除自由基和治疗心血管疾病等作用<sup>[2]</sup>。

内生真菌(Endophytic fungus)是指生活在健康植物组织内部,但不引起植物病害的真菌,在植物组织中普遍存在,具有丰富的物种多样性<sup>[3-4]</sup>。内生真菌与宿主在长期的生态系统演化中形成了互惠共生关系,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<sup>[5-8]</sup>,因此具有重要经济价值的药用植物的内生真菌已成为筛选新的活性物质的重要资源。迄今为止,已从夹竹桃科、小檗科、杜仲科、禾本科、红豆杉科、菊科、唇形科等多年生药用植物内生真菌中分离到多种活性物质。如,分离自长春花(*Catharanthus roseus*)的一种链格孢(*Alternaria* sp.)真菌能够合成长春碱(Vinblastine)<sup>[9]</sup>;桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)的内生黑曲霉(*Aspergillus* sp.)可产生鬼臼毒素(Podophyllotoxin)<sup>[7]</sup>;杜仲(*Eucommia ulmoides*)的内生刺孢壳(*Chaetomella* sp.)能产生具有抗氧化活性的黄酮类化合物<sup>[10]</sup>;狗牙根(*Cynodon dactylon*)的内生曲霉(*Aspergillus* sp.)产生的一种麦角甾醇(Ergosterol),对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)具有很好的抑制活性<sup>[11]</sup>等。

鉴于药用植物内生真菌具有的潜在重要应用价值,本课题组以山西省野生和栽培中药黄芩为材料研究其内生真菌的属种多样性和生物活性,旨在为探索黄芩与其内生真菌的关系,以及进一步寻找新的活性化合物积累数据和资料。有关黄芩内生真菌的研究此前未见记载。对栽培黄芩内生真菌的研究共分离内生真菌54株,其中生长期24株,成熟期30株,大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、深红酵母等3种指示菌的抑菌活性筛选研究表明,其中的17株内生真菌为高活性菌株<sup>[12]</sup>。本文报道有关野生黄芩内生真菌的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试药材:**野生黄芩于 2006 年 8 月份(生长期,以营养生长为主)和 10 月份(成熟期,以积累代谢产物为主)采自山西省长治县(36°18'N, 113°08'E)雄山林场。选取地上部分大小接近的黄芩植株,全株取样后立即放入塑料袋中,贴标签后 4°C 冷藏保存带回实验室,2 d 内样品处理完毕。野生黄芩由山西省中药药材监督所郭吉刚鉴定。

**1.1.2 供试指示菌菌株:**供试指示菌菌株见表1。枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、深红酵母来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分离得到;其余菌株来自北京市疾病预防控制中心。菌种接种于琼脂斜面(培养基见1.1.3)置于4°C,在本实验室保藏。

**1.1.3 培养基:**含氯霉素的PDA培养基(0.4-5 g/L):分离纯化内生真菌。牛肉膏蛋白胨培养基:培养细菌指示菌。MYPG培养基:培养深红酵母和白色假丝酵母,配方为(g/L):麦芽浸膏 3 g,酵母浸膏 3 g,蛋白胨 5 g,葡萄糖 10 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1 L, pH 5.5。马铃薯培养基(PDA):培养九州镰孢霉和小孢拟盘多毛孢。

### 1.2 方法

**1.2.1 内生真菌的分离和纯化:**参见文献[13]。此外,表面消毒后的样品切成 0.2 cm × 0.2 cm 的小段(片),然后从生长期和成熟期的根、茎、叶中分别随机选取 32 个组织块(共 192 个组织块)用于内生真菌的分离。每个 PDA(含氯霉素)平板上各放置 2 个组织块。

**1.2.2 内生真菌发酵培养及发酵液处理:**参见文献[13]。

**1.2.3 指示菌液体培养:**参见文献[13]。

**1.2.4 抑菌试验:**参见文献[13]。

**1.2.5 菌种鉴定:**分类鉴定参照文献[14-18]。其中一些不易产生孢子的菌株,采用数十天冷(4°C)、热(37°C)、弱光、水培养等多种刺激诱导其产孢。内生真菌的分离率<sup>[19]</sup>(Isolation Rate, IR)按以下方法计算:分离率 = 样本组织块中得到的菌株数 / 全部样本组织块数。

表1 供试指示菌  
Table 1 Microbes as indicators of inhibitory test

指示菌类别 Sort of indicator	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 Enteropathogenic <i>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
	深红酵母 <i>Rhodotorula rubra</i>	CGMCC2.282
	白色假丝酵母 <i>Candida albicans</i>	ATCC10231
真菌 Fungi	九州镰孢霉 <i>Fusarium kyrushuense</i>	CNUMB2FK01
	小孢拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis microspora</i>	CNUMB2PM01

## 2 结果与分析

### 2.1 野生黄芩内生真菌的鉴定

从山西雄山林场的野生黄芩的根、茎、叶的192个表面消毒组织块中共分离到97株内生真菌(表2), 33株来自生长期野生黄芩植株, 根、茎、叶分别为12、10、11株; 64株来自成熟期野生黄芩植株, 根、茎、叶分别为21、22、21株。生长期和成熟期野生黄芩内生真菌的分离率分别为0.67和0.34。显然, 成熟期黄芩中的内生真菌菌株数量远大于生长期的。分类鉴定结果表明, 这些菌株隶属于38个真菌属, 其中生长期17属, 成熟期28属, 有7属同时见于这两个时期, 9属仅见于生长期, 22属仅见于成熟期(表2)。可见, 成熟期的属种多样性大于生长期, 处于不同生长发育期的植物, 其内生真菌的属种存在差异。*Alternaria*为优势属, 占总数的23.2%。

### 2.2 内生真菌的抑菌活性

将其中95株野生黄芩内生真菌对14种指示菌进行抗菌活性试验, 结果(表3、4)发现, 有91株内生真菌对一种或多种指示菌具有抑菌活性, 占分离菌株总数的95.8%, 这说明野生黄芩内生真菌中存在着丰富的抗菌资源。

**2.2.1 生长期野生黄芩内生真菌的抑菌活性:** 抑菌活性试验结果表明, 生长期黄芩中分离的33株内生真菌分别至少能抑制一种指示菌的生长繁殖, 均有抑菌活性(表3); 除对深红酵母、金黄色葡萄球菌没有抑制作用外, 对其他的10种指示菌均有抗性。在活性菌株中, 对大肠杆菌有抑制作用的菌株最多, 为30株, 占菌株总数的90.9%, 且抑菌圈直径大于20 mm的高抗菌株有9株, 其中一株分离自根的菌株N.SBA27(*Paecilomyces* sp.)的抑菌圈直径更达到26.30 mm; 其次是对枯草芽孢杆菌、致病性大肠埃希氏和宋内氏痢疾杆菌有抑制作用的, 分别为15、14、11株。N.SBA9、N.SBA18、N.SBA29等3个菌株具有较广的抗菌谱和较高的抗性, 分别隶属于*Alternaria*和*Sclerotium*, 能够分别抑制6、6、7种指示菌的生长繁殖, 抑菌圈直径多能达到15 mm以上(表3)。值得注意的是, 有16株(占菌株总数的48.48%)真菌的抗菌谱在1-3种之间, 涉及的指示菌有8种(占指示菌总数57.1%), 表明黄芩内生真菌可能具有较好的选择抗性。

**2.2.2 成熟期野生黄芩内生真菌的抑菌活性:** 对成熟期黄芩中分离到的62株内生真菌菌株的抑菌试验结果表明, 有59株至少能拮抗一种指示菌, 活性菌株占到总数的95.2%(表4)。对大肠杆菌有抑制作用的活性菌株最多, 为54株, 占菌株总数的87.1%; 对深红酵母、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、副溶血型弧菌、宋内氏痢疾杆菌等5种细菌指示菌没有拮抗作用。成熟期野生黄芩内生真菌对白色念珠菌、小孢拟盘多毛孢、九州镰孢霉等3种真菌指示菌表现出较高的拮抗活性(表4), 拮抗活性的菌株数分别为14、21、6株; 其中, 对小孢拟盘多毛孢具有高拮抗活性(抑菌圈直径大于20 mm)的菌株有6株, 隶属于*Naemospora*的N.SBO40和隶属于*Sclerotium*的N.SBO45的抑菌圈直径更分别达22.7 mm和19.40 mm。62株内生真菌中仅有12株(占总菌株数的19.4%)对供试指示菌中的5种细菌(普通变形杆菌、致病性大肠埃希氏菌、单核细胞增生李斯特菌、

蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌)显示出抗菌活性,其中拮抗2种细菌的7株、3种的2株、4种的2株、5种的1株,表明黄芩内生真菌对细菌的拮抗活性相对较差,但选择抗性可能较好。

上述实验结果表明,野生黄芩成熟期比生长期分离到的内生真菌数量多、菌属覆盖面广,但活性

菌株的比例偏低,抗菌范围则较窄,但成熟期黄芩内生真菌显示出较好的抗真菌活性,值得进一步研究。黄芩内生真菌菌株对细菌指示菌普遍表现出较窄的抗菌谱,说明它们的代谢产物具有较好的选择抗性,可能成为筛选具有选择抗性的活性化合物的潜在资源。

表2 野生黄芩内生真菌的鉴定分布(单位:株)  
Table 2 Identification and distribution of endophytic fungi isolated from wild plants of *Scutellaria baicalensis* Georgi

编号 No.	属名 Genus name	成熟期(28个属) Growth				生长期(17个属) Ripeness				总数 Total
		根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	总数 Total	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	总数 Total	
		1	<i>Alternaria</i>	0	3	6	9	0	4	
2	<i>Arbuscula</i>	0	5	6	11	0	1	0	1	12
3	<i>Sclerotium</i>	2	3	1	6	2	0	0	2	8
4	<i>Fusarium</i>	4	0	0	4	0	0	0	0	4
5	<i>Minimedusa</i>	3	0	1	4	0	0	0	0	4
6	<i>Asteromella</i>	1	2	0	3	0	0	0	0	3
7	<i>Acremonium</i>	2	0	0	2	1	0	0	1	3
8	<i>Colletotrichum</i>	0	0	1	1	0	2	0	2	3
9	<i>Paecilomyces</i>	2	0	0	2	1	0	0	1	3
10	<i>Amerosporium</i>	0	0	1	1	1	0	0	1	2
11	<i>Cladorrhinum</i>	0	2	0	2	0	0	0	0	2
12	<i>Dendrodochium</i>	0	0	0	0	2	0	0	2	2
13	<i>Isaria</i>	0	0	0	0	2	0	0	2	2
14	<i>Myriococcum</i>	1	1	0	2	0	0	0	0	2
15	<i>Rhizoctonia</i>	0	0	0	0	0	0	2	2	2
16	<i>Aspergillus</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1
17	<i>Beverwykella</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1
18	<i>Bullera</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1
19	<i>Cryptostroma</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1
20	<i>Echinochondrium</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1
21	<i>Gonatobotrys</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1
22	<i>Libertella</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	1
23	<i>Metarhizium</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	1
24	<i>Mucor</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1
25	<i>Naemospora</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	1
26	<i>Nigrospora</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	1
27	<i>Phialocephala</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1
28	<i>Botrytis</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1
29	<i>Rhinochadiella</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	1
30	<i>Thichothecium</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	1
31	<i>Trichocladium</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1
32	<i>Trichosporiella</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1
33	<i>Chloridium</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	1
34	<i>Diplodia</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	1
35	<i>Aplosporella</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1
36	<i>Penicillium</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	1
37	<i>Sirodothis</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1
38	<i>Ulocladium</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1
菌株总数 Total strains isolated		21	22	21	64	12	10	11	33	97
总植物组织块 Total fragments plated		32	32	32	96	32	32	32	96	192
分离率 Isolation rate		0.67	0.69	0.66	0.67	0.38	0.31	0.34	0.34	0.51

表3 生长期野生黄芩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 wild plants of *Scutellaria baicalensis* Georgi in growth

A	B	C	指示菌 Tested microbes													
			Ec	Bs	Rr	Lm	Bc	Sa	Pv	EcE	Se	Bp	Ss	Ca	Fk	Pm
叶 Leaf	N.SBA1	<i>Beverwykella</i>	+++	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBA2	<i>Alternaria</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBA3	<i>Rhizoctonia</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBA4	<i>Rhizoctonia</i>	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBA5	<i>Alternaria</i>	++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	-
	N.SBA6	<i>Alternaria</i>	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	-	-	-
	N.SBA7	<i>Alternaria</i>	++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBA8	<i>Alternaria</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBA9	<i>Alternaria</i>	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	++
	N.SBA10	<i>Alternaria</i>	++	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	++
	N.SBA11	<i>Alternaria</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
N.SBA31	<i>Alternaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	
茎 Stem	N.SBA12	<i>Aplosporella</i>	-	++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
	N.SBA13	<i>Coleletotrichum</i>	++	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
	N.SBA14	<i>Coleletotrichum</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBA15	<i>Alternaria</i>	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
	N.SBA16	<i>Sirodothis</i>	++	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	-	++	-
	N.SBA17	<i>Alternaria</i>	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	N.SBA18	<i>Alternaria</i>	++	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	++	-	-
	N.SBA19	<i>Alternaria</i>	++	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	-	-
	N.SBA20	<i>Arbuscula</i>	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N.SBA32	<i>Ulocladium</i>	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
根 Root	N.SBA21	<i>Dendrodochium</i>	++	+++	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	++	-
	N.SBA22	<i>Isaria</i>	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+++
	N.SBA23	<i>Dendrodochium</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
	N.SBA24	<i>Chloridium</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	N.SBA25	<i>Diplodia</i>	-	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBA26	<i>Sclerotium</i>	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	-
	N.SBA27	<i>Paecilomyces</i>	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	++	-
	N.SBA28	<i>Amerosporium</i>	+++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	-	-	-
	N.SBA29	<i>Sclerotium</i>	+++	-	-	+++	++	-	+++	-	-	++	+++	-	+++	-
	N.SBA30	<i>Acremonium</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBA33	<i>Isaria</i>	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++

注: A: 分离部位; B: 菌株编号; C: 真菌属名; Ec: 大肠杆菌 CGMCC1.1103; Bs: 枯草芽孢杆菌 CGMCC1.769; Rr: 深红酵母 CGMCC2.282; Lm: 单核增生李斯特菌 ATCC27708; Bc: 蜡样芽孢杆菌 ATCC1361; Sa: 金黄色葡萄球菌 ATCC12600; Pv: 普通变形杆菌 ATCC33420; EcE: 致病性大肠埃希氏菌 ATCC49105; Se: 肠炎沙门氏菌 ATCC14208; Bp: 副溶血型弧菌 ATCC27519; Ss: 宋内氏痢疾杆菌 ATCC51060; Ca: 白色假丝酵母 ATCC10231; Fk: 九州镰孢霉 CNUMB2FK01; Pm: 小孢拟盘多毛孢 CNUMB2PM01; +: 抑菌圈直径  $d \leq 10$  mm; ++:  $10 \text{ mm} < d < 15$  mm; +++:  $d > 15$  mm; -: 无抗性。

Note: A: Plant position; B: Fungal code; C: Genus name; Ec: *E. coli* CGMCC1.1103; Bs: *B. subtilis* CGMCC1.769; Rr: *R. rubra* CGMCC2.282; Lm: *L. monocytogenes* ATCC27708; Bc: *B. cereu* ATCC1361; Sa: *S. aureus* ATCC12600; Pv: *P. vulgaris* ATCC33420; EcE: *E. coli* EPECATCC49105; Se: *S. enteritis* ATCC14208; Bp: *B. parahemolyticus* ATCC27519; Ss: *S. sonnei* ATCC51060; Ca: *C. albicans* ATCC10231; Fk: *F. kyushuense* CNUMB2FK01; Pm: *P. microspora* CNUMB2PM01; +: Antibiotic circle diameter ( $d$ )  $\leq 10$  mm; ++:  $10 \text{ mm} < d < 15$  mm; +++:  $d > 15$  mm; -: None inhibitory activity.

表 4 成熟期野生黄芩内生真菌菌株分离鉴定及抑菌活性  
Table 4 Inhibitory activity screening of endophytic fungi and identification isolated from wild plants of *Scutellaria baicalensis* Georgi in ripeness

A	B	C	指示菌 Tested microbes																
			Ec	Bs	Rr	Lm	Bc	Sa	Pv	EcE	Se	Bp	Ss	Ca	Fk	Pm			
叶 Leaf	N.SBO1	<i>Coleletotrichum</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++		
	N.SBO2	<i>Alternaria</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-		
	N.SBO3	<i>Alternaria</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	N.SBO4	<i>Alternaria</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++		
	N.SBO5	<i>Alternaria</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++		
	N.SBO6	<i>Phymatotrichum</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++		
	N.SBO7	<i>Latendraea</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+++		
	N.SBO8	<i>Minimedusa</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-		
	N.SBO9	<i>Amerosporium</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	N.SBO10	<i>Arbuscula</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	N.SBO29	<i>Cryptostroma</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	
	N.SBO30	<i>Trichocladium</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N.SBO31	<i>Arbuscula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	
	N.SBO32	<i>Arbuscula</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N.SBO33	<i>Arbuscula</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
	N.SBO34	<i>Arbuscula</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
	N.SBO35	<i>Alternaria</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	N.SBO36	<i>Arbuscula</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N.SBO37	<i>Echinochondrium</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	茎 Stem	N.SBO11	<i>Cladorrhinum</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	
		N.SBO12	<i>Arbuscula</i>	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	
		N.SBO13	<i>Minimedusa</i>	+++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	++	
		N.SBO14	<i>Sclerotium</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		N.SBO15	<i>Rhinochadiella</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		N.SBO16	<i>Cladorrhinum</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		N.SBO17	<i>Thichothecium</i>	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		N.SBO18	<i>Arbuscula</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
		N.SBO19	<i>Arbuscula</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		N.SBO20	<i>Libertella</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		N.SBO38	<i>Arbuscula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		N.SBO39	<i>Arbuscula</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	
		N.SBO40	<i>Naemospora</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
		N.SBO41	<i>Metarrhizium</i>	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
		N.SBO42	<i>Asteromella</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
		N.SBO43	<i>Alternaria</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		N.SBO44	<i>Nigrospora</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		N.SBO45	<i>Sclerotium</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N.SBO46		<i>Sclerotium</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N.SBO47		<i>Myriococcum</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N.SBO53		<i>Paecilomyces</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N.SBO54		<i>Fusarium</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	
根 Root		N.SBO21	<i>Mucor</i>	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	
		N.SBO22	<i>Paecilomyces</i>	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
		N.SBO23	<i>Aspergillus</i>	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		N.SBO24	<i>Sclerotium</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
		N.SBO25	<i>Asteromella</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
		N.SBO26	<i>Acremonium</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		N.SBO27	<i>Fusarium</i>	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		N.SBO28	<i>Acremonium</i>	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBO48	<i>Alternaria</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	
	N.SBO49	<i>Fusarium</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
	N.SBO50	<i>Fusarium</i>	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N.SBO51	<i>Myriococcum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	N.SBO52	<i>Trichosporiella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	
	N.SBO53	<i>Paecilomyces</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N.SBO54	<i>Fusarium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

续表 4 成熟期野生黄芩内生真菌菌株分离鉴定及抑菌活性  
Table 4 Inhibitory activity screening of endophytic fungi and identification isolated from wild plants of *Scutellaria baicalensis* Georgi in ripeness

根	N.SBO55	<i>Gonatobotrys</i>	+	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
Root	N.SBO56	<i>Asteromella</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBO57	<i>Minimedusa</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBO58	<i>Minimedusa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	N.SBO59	<i>Phialocephala</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N.SBO60	<i>Sclerotium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++

注: A: 分离部位; B: 菌株编号; C: 真菌属名; Ec: 大肠杆菌 CGMCC1.1103; Bs: 枯草芽孢杆菌 CGMCC1.769; Rr: 深红酵母 CGMCC2.282; Lm: 单核增生李斯特菌 ATCC27708; Bc: 蜡样芽孢杆菌 ATCC1361; Sa: 金黄色葡萄球菌 ATCC12600; Pv: 普通变形杆菌 ATCC33420; EcE: 致病性大肠埃希氏菌 ATCC49105; Se: 肠炎沙门氏菌 ATCC14208; Bp: 副溶血型弧菌 ATCC27519; Ss: 宋内氏痢疾杆菌 ATCC51060; Ca: 白色假丝酵母 ATCC10231; Fk: 九州镰孢霉 CNUMB2FK01; Pm: 小孢拟盘多毛孢 CNUMB2PM01; +: 抑菌圈直径  $d \leq 10$  mm; ++:  $10 \text{ mm} < d < 15$  mm; +++:  $d > 15$  mm; -: 无抗性。

Note: A: Plant position; B: Fungal code; C: Genus name; Ec: *E. coli* CGMCC1.1103; Bs: *B. subtilis* CGMCC1.769; Rr: *R. rubra* CGMCC2.282; Lm: *L. monocytogenes* ATCC27708; Bc: *B. cereus* ATCC1361; Sa: *S. aureus* ATCC12600; Pv: *P. vulgaris* ATCC33420; EcE: *E. coli* EPECATCC49105; Se: *S. enteritidis* ATCC14208; Bp: *B. parahemolyticus* ATCC27519; Ss: *S. sonnei* ATCC51060; Ca: *C. albicans* ATCC10231; Fk: *F. kyushuense* CNUMB2FK01; Pm: *P. microspora* CNUMB2PM01; +: Antibiotic circle diameter ( $d$ )  $\leq 10$  mm; ++:  $10 \text{ mm} < d < 15$  mm; +++:  $d > 15$  mm; -: None inhibitory activity.

### 3 讨论

试验结果表明, 野生黄芩成熟期和生长期的内生真菌株数和种属分布存在差异, 成熟期的植物内生真菌株数较多(64株), 种属分布范围较广(28属)。此前本课题组在对栽培黄芩和野生远志的研究中也观察到类似现象, 自栽培黄芩成熟期和生长期中各分离到 10 属 1 无孢菌群 30 株和 5 属 1 无孢菌群 24 株内生真菌<sup>[12]</sup>; 野生远志成熟期和生长期中各分离到 21 属 52 株和 13 属 36 株内生真菌<sup>[20]</sup>。内生真菌的分布规律可能与宿主所处的不同生长季节有关, 处于成熟期的植物组织内积累的营养物质和次生代谢物质丰富, 而不同的真菌对营养物质的需求不尽相同, 所以侵袭从而生长在成熟期植物中的内生真菌数量多, 种属分布广。此外, 值得注意的是, 野生黄芩中的内生真菌菌株数量(97株)远远大于栽培黄芩(54株)<sup>[12]</sup>, 这与本课题组有关远志内生真菌的研究结果类似<sup>[13]</sup>, 野生远志的内生真菌菌株 65 株, 栽培远志的 24 株。这一现象可能与其生长的环境相关, 与栽培环境相比, 野生环境中生态系统复杂, 物种较多, 竞争压力较大, 野生植物可能需要更多的不同种类的内生真菌与其共生, 以增强抗病能力和提高抗逆性。同时也说明, 无论是在野生环境还是在人工栽培环境, 植物内生真菌的种群可能存在一定的稳定性。

在野生黄芩中分离到的 38 个内生真菌属中, 有

13 个属也发现于本课题组此前对野生远志内生真菌的研究<sup>[14]</sup>, 分别为 *Alternaria*、*Aspergillus*、*Amerosporium*、*Fusarium*、*Minimedusa*、*Paecilomyces*、*Penicillium*、*Rhizoctonia*、*Sclerotium*、*Trichosporiella* 和 *Thichothecium*, 其中 *Alternaria*、*Arbuscula* 和 *Fusarium* 的菌株也分布于栽培黄芩和栽培远志的植物体中<sup>[12-13]</sup>。据孙剑秋等<sup>[4]</sup>的统计, 近十多年来, 人们已从 47 科 81 属 114 种 3 变种药用植物中分离到内生真菌 171 属, 其中隶属于 *Alternaria*、*Arbuscula*、*Acremonium*、*Aspergillus*、*Penicillium*、*Rhizoctonia*、*Fusarium* 等的菌株较为常见。显然, 尽管不同种类的植物中, 内生真菌的种类和数量不同, 但同时, 也有一些属种可能是植物内生真菌的常见类群。此外, 野生黄芩和野生远志具有较多相同属(13 个属)的成员可能与它们生长于近似的地理环境有关, 两者均采自山西省长治县雄山林场的同一林区。这一现象也见于赵春安<sup>[21]</sup>等对华凤仙、问荆、轮叶尾孢藻等 3 种水生植物的内生真菌的研究, 在所分离的 26 个菌属中, 有 7 个菌属同时出现在 3 种植物中, 9 个菌属出现在其中的任意两种植物中, 3 种植物均采自云南省昆明市嵩明县黑龙宫公园的溪水中。王涛<sup>[3]</sup>等对采自四川宜宾县兴隆乡油樟母树基地的油樟、香樟、白栎 3 种乔木内生真菌的研究也发现, 虽然 3 种植物共有的内生真菌属和各自特有的属数量大致一致, 但属于共有属的菌株数量远高于特有属的菌株数量, 三者共有

的内生真菌有 8 属, 菌株数分别为 78、42、51 株, 各自特有的分别为 6 属 7 株、8 属 12 株、7 属 18 株。以上结果表明, 相同环境中微生物的数量和种类的相对稳定可能导致不同的植物具有较多的相同属的内生真菌。

抑菌活性试验表明, 野生黄芩内生真菌具有广泛的抗菌活性(活性菌株占总数的 93.8%以上), 且具有广谱抗性或选择抗性, 成熟期的部分内生真菌菌株更显示出有较好的抗真菌活性, 这为寻找新的、有效的、具有选择抗性的抗菌药物提供了新的材料, 今后应对其代谢产物进行深入的研究。此外, 虽然从成熟期黄芩分离到的内生真菌数量比生长期黄芩要多, 但是, 生长期黄芩内生真菌的抗菌范围比率以及活性菌株比率均比成熟期的要高。此结果说明, 对生长期的野生黄芩内生真菌进行研究, 可能更有利于新化合物和新药物发现, 也提示我们, 在对植物内生真菌的种群进行研究时, 应考虑到植物在不同的生长发育阶段可能与不同的内生真菌合作, 这些真菌所发挥的作用也可能不同。

值得关注的是分离自生长期黄芩根部的两个菌株 N.SBA22 和 N.SBA33, 经形态学和培养特征鉴定均隶属于 *Isaria* (棒束孢属), 该属成员均为虫生真菌, 之前未见有关此类真菌在植物体内部定殖的记载。为何此类虫生真菌会出现在植物体内, 其原因尚需进一步研究, 其属种的鉴定也需要更多的数据来支持, 如分子数据、有性世代诱导等。

## 参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. I 部. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 陈秀清, 齐香君, 何恩铭, 等. 中药黄芩研究新进展. 食品与药品, 2006, **8**(5): 23.
- [3] 王涛, 游玲, 崔晓龙, 等. 四川宜宾三种乔木内生真菌的多样性. 微生物学通报, 2009, **36**(3): 339–344.
- [4] 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): 1505–1519.
- [5] Stierle EA, Strobel G, Stierl ED, *et al.* Taxol and taxane

- production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993(260): 214–216.
- [6] 陈贤兴, 陈析丰, 南旭阳, 等. 喜树果内生真菌的分离与鉴定. 河南科学, 2003, **21**(4): 431–433.
- [7] 李海燕, 曾松荣, 张玲琪, 等. 云南桃儿七植株地下茎内生真菌多样性及有价值菌株的筛选. 西南农业学报, 1999, **12**(4): 123–125.
- [8] 施琦渊, 陈晓梅, 郭顺星, 等. 植物内生真菌来源的抗菌活性物质研究进展. 中国药学杂志, 2007, **42**(11): 804–807.
- [9] 郭波, 李海燕, 张玲琪, 等. 一种产长春碱真菌的分离. 云南大学学报, 1998, **20**(3): 214–215.
- [10] 王梅霞 陈双林, 闫淑珍, 等. 一株产黄酮银杏内生真菌的分离鉴定与培养介质的初步研究. 南京师范大学学报, 2003, **26**(1): 106–110.
- [11] Li Y, Song YC, Liu JY, *et al.* Anti-helicobacter pylori substances from endophytic fungal cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005(21): 553–558.
- [12] 崔晋龙, 范黎, 丁翠, 等. 栽培黄芩高活性内生真菌菌株的筛选与鉴定. 西北植物学报, 2007, **27**(7): 1384–1388.
- [13] 王玉君, 崔晋龙, 苏红, 等. 远志内生真菌抑菌活性筛选. 微生物学通报, 2009, **6**(3): 404–411.
- [14] Sutton BC. The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1980: 1–696.
- [15] Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1998: 1–218.
- [16] Carmichael JW, BryceKendrick W, Connors IL, *et al.* Genera of Hyphomycetes. Edmonton, Alberta: The University of Alberta Press, 1980: 1–386.
- [17] Ellis MB. Dematiaceous hyphomycetes. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1971: 1–608.
- [18] Arx V. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. A. R. Gantner Verlag Kommandi tgesellschaft, 1981.
- [19] 孙剑秋, 郭良栋, 臧威, 等. 药用植物内生真菌多样性及生态分布. 生命科学, 2008, **38**(5): 475–484.
- [20] 崔晋龙, 郭吉刚, 范黎, 等. 远志内生真菌分离鉴定及活性筛选. 微生物学通报, 2007, **34**(5): 839–842.
- [21] 赵春安, 罗珊珊, 李海燕, 等. 三种水生植物内生真菌多样性及其抗真菌活性. 微生物学通报, 2009, **36**(9): 1305–1310.