

# *Endomelanconiopsis microspora* 发酵产物乙酸乙酯提取物对人参核盘菌的抑制机理

董婧<sup>1,2</sup>, 吕建华<sup>1</sup>, 李可心<sup>1,2</sup>, 叶明玉<sup>1,2</sup>, 张晨<sup>1</sup>, 李长田<sup>\*1</sup>

1 吉林农业大学食药用菌教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

2 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

董婧, 吕建华, 李可心, 叶明玉, 张晨, 李长田. *Endomelanconiopsis microspora* 发酵产物乙酸乙酯提取物对人参核盘菌的抑制机理[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3682-3692

Dong Jing, L ü Jianhua, Li Kexin, Ye Mingyu, Zhang Chen, Li Changtian. Ethyl acetate extract of *Endomelanconiopsis microspora* inhibits *Sclerotinia ginseng*[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3682-3692

**摘要:** 【背景】人参菌核病是人参的主要病害之一, 严重影响人参的产量。【目的】探索白花蒲公英内生菌(*Endomelanconiopsis microspora*)发酵产物乙酸乙酯提取物对人参核盘菌的抑制机理。【方法】采用人参核盘菌菌丝生长和孢子萌发试验测定抑制效果; 采用显微镜观察菌丝形态变化, 通过电导率和核酸含量的变化测定细胞膜通透性, 通过丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活力的变化测定膜脂过氧化程度。【结果】内生菌 *E. microspora* 发酵产物乙酸乙酯提取物能显著抑制人参核盘菌菌丝生长, 最小抑菌浓度为 3.75 mg/mL, 培养 6 d 后抑制率为 76.22%。该提取物能显著抑制人参核盘菌孢子萌发, 15.00 mg/mL 时抑制效果最好, 抑制率达 90.69%。提取物影响菌丝形态, 增加人参核盘菌细胞膜通透性, 造成菌丝内含物外渗, 7.50 mg/mL 处理 10 h 后电导率和核酸含量分别比对照组增加 30.11%和 62.85%。同时提取物显著增加人参核盘菌 MDA 含量和 SOD、POD、CAT 活力, 7.50 mg/mL 处理组呈现先上升后下降的变化趋势, 并在 12 h 时达到最高值。【结论】内生菌 *E. microspora* 发酵产物乙酸乙酯提取物通过改变人参核盘菌细胞膜通透性, 加剧膜脂过氧化, 破坏细胞膜完整性, 导致细胞内含物流失, 显著抑制孢子萌发和菌丝生长。

**关键词:** 白花蒲公英内生菌; 人参核盘菌; 抑菌作用

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-20)

Supported by: Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-20)

\*Corresponding author: E-mail: lct@jlau.edu.cn

Received: 2022-01-25; Accepted: 2022-03-28; Published online: 2022-04-19

## Ethyl acetate extract of *Endomelanconiopsis microspora* inhibits *Sclerotinia ginseng*

DONG Jing<sup>1,2</sup>, LÜ Jianhua<sup>1</sup>, LI Kexin<sup>1,2</sup>, YE Mingyu<sup>1,2</sup>, ZHANG Chen<sup>1</sup>, LI Changtian<sup>\*1</sup>

1 Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

2 College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

**Abstract:** [Background] *Sclerotinia ginseng*, one of the major pathogen attacking ginseng, seriously affects the yield of ginseng. [Objective] To explore the mechanism of ethyl acetate extract of the endophytic bacteria *Endomelanconiopsis microspora* from *Taraxacum albiflos* Kirschner & Štepanek in inhibiting *S. ginseng*. [Methods] The inhibitory effect was verified by the test of mycelial growth and spore germination of *S. ginseng*. The morphological changes of mycelia were observed under a microscope. The cell membrane permeability was detected by changes in conductivity and nucleic acid content, and the membrane lipid peroxidation was measured by changes in malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT) activities. [Results] The ethyl acetate extract from *E. microspora* significantly inhibited the mycelial growth of *S. ginseng* with the minimum inhibitory concentration (MIC) of 3.75 mg/mL and the inhibition rate of 76.22% after 6 days of culture. The ethyl acetate extract significantly inhibited the spore germination of *S. ginseng*. The 15.00 mg/mL ethyl acetate extract demonstrated the optimal inhibitory effect with the inhibition rate of 90.69%. The ethyl acetate extract influenced mycelial morphology, increased cell membrane permeability of *S. ginseng*, and resulted in extravasation of mycelial inclusions. Compared with the control group, the treatment with 7.50 mg/mL ethyl acetate extract for 10 h increased the conductivity and nucleic acid content by 30.11% and 62.85%, respectively. At the same time, the ethyl acetate extract significantly increased MDA content and SOD, POD and CAT activities of *S. ginseng*. The MDA content and SOD, POD and CAT activities in the 7.50mg/mL treatment group first increased, peaked at the time point of 12 h, and then decreased. [Conclusion] The ethyl acetate extract from the endophytic bacteria *E. microspora* changed the cell membrane permeability of *S. ginseng*, aggravated the membrane lipid peroxidation, and destroyed the cell membrane integrity, thus leading to the loss of cell inclusions and inhibiting the spore germination and mycelial growth.

**Keywords:** *Endomelanconiopsis microspora*; *Sclerotinia ginseng*; antifungal effect

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)为多年生草本,是我国传统名贵中药材,种植广泛<sup>[1]</sup>。人参菌核病是人参种植过程中危害最严重的土传病害之一<sup>[2]</sup>,严重时会引起参根腐烂、植株死亡,造成重大经济损失<sup>[3]</sup>。化学杀菌剂因操作简单、适应性广等特点被广泛应用于人参病害防治中,然而长期使用化学杀菌剂会造成农药残留超标、

环境污染等问题<sup>[4-5]</sup>,因此,如何安全有效地防治人参菌核病的危害已经成为人参栽培中亟待解决的问题。

内生菌是指生存在植物组织内部而不使宿主植物表现明显病症的一类微生物<sup>[6]</sup>,其生命周期近乎全部都生活在植物组织内,能与宿主协同进化,并不使植株本身表现任何病症,在植物微

生态系统中扮演着重要角色<sup>[7]</sup>。植物内生真菌在发酵与培养过程中产生大量具有生理和药理活性的代谢产物<sup>[8]</sup>，其中很多具有显著的抗真菌活性。Zhang 等<sup>[9]</sup>研究发现从柑橘植株中分离得到的内生真菌针曲霉 GC-09 其发酵产物对意大利青霉具有显著的抑菌活性。因此，内生真菌生物活性代谢产物的开发在农业、制药和工业中具有重大的应用价值<sup>[10]</sup>。

*Endomelanconiopsis* 是由 RoJas 等<sup>[11]</sup>于 2008 年发现并建立的新属，该属仅有 *E. endophytica*、*E. microspora* 和 *E. freycinetiae* 3 个种的记录，关于 *Endomelanconiopsis* 活性的研究报道较少<sup>[12-13]</sup>，具有一定的开发潜力。本研究通过测定菌丝生长和孢子萌发等，初步探索 *E. microspora* 发酵产物乙酸乙酯提取物对人参核盘菌的抑制机理，以期防治人参菌核病生物农药的开发提供新思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

人参核盘菌(*Sclerotinia ginseng*)由吉林农业大学中药材学院化学生态学实验室提供，现保存于吉林农业大学中药材学院菌物生态学实验室。*Endomelanconiopsis microspora* EI002388 是由吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心李长田教授在 2006 年从吉林省大安市白花蒲公英(*Taraxacum albiflos* Kirschner & Štepanek)中分离得到的内生菌，后对该菌进行了生物学鉴定并存放于吉林农业大学中药材学院菌物生态学实验室。

### 1.2 主要试剂和仪器

丙二醛试剂盒、超氧化物歧化酶试剂盒、过氧化氢酶试剂盒，南京建成生物工程研究所；过氧化物酶试剂盒，苏州科铭生物技术有限公司；甲醇、乙酸乙酯、无水乙醇，国营北京永定化工厂。生化培养箱，上海新苗医疗器械有限公司；

立式压力蒸汽灭菌器，上海博迅实业有限公司医疗设备厂；超净工作台，上海苏净实业有限公司；恒温摇床，上海智城分析仪器制造有限公司；光学显微镜，ZEISS 公司；电导率仪，梅特勒-托利多上海仪器公司。

### 1.3 内生菌提取物制备

内生菌提取物制备：将保存在冰箱的内生菌菌株接种至 PDA 平板上进行活化，25 °C 恒温培养 7 d；用接种铲取适量的菌丝接种到 500 mL 的 PDB 培养基中，在摇床上 25 °C 恒温振荡培养 7 d，转速 150 r/min，获得种子液。大米培养基中(80 g/袋)接种 2 mL 种子液，共培养 200 袋，25 °C 恒温培养 60 d。将培养好的大米发酵物粉碎，分别使用石油醚、乙酸乙酯和甲醇超声提取 2 h (55 w)，重复 3 次，得到石油醚、乙酸乙酯和甲醇提取物，根据前期活性测定选择乙酸乙酯提取物进行抑菌试验。

### 1.4 内生菌提取物对人参核盘菌的抑制作用

#### 1.4.1 菌丝生长测定

采用菌丝生长速率法<sup>[14]</sup>测定提取物对人参核盘菌的抑制作用。将提取物用 10% 甲醇溶解，得到初始浓度分别为 150.0、75.0、37.5、18.8、9.4、4.7 和 2.3 mg/mL 的母液，用 0.22 μm 针头过滤器过滤，用 PDA 培养基稀释 10 倍，得到最终浓度分别为 15.00、7.50、3.75、1.88、0.94、0.47 和 0.23 mg/mL 的含药培养基，对照为加入等量甲醇的 PDA 培养基，用打孔器打取直径为 6 mm 的病原菌菌饼，倒置接种于含药培养基上，在 25 °C 下恒温培养 7 d，每日观察菌丝生长情况，每组 3 个重复。

菌丝生长抑制率=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)]×100%。

最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)的测定<sup>[15]</sup>：在病原菌培养 2 d

后,以培养基上未长菌丝的提取物浓度为最小抑菌浓度。最小杀真菌浓度(minimum fungicidal concentration, MFC)的测定<sup>[15]</sup>:在病原菌培养 5 d 后,以培养基上未长菌丝的提取物浓度为最小杀菌浓度。

#### 1.4.2 孢子萌发率测定

参照 Wei 等的方法<sup>[16]</sup>测定孢子萌发率。在培养好的病原菌种平板加入 5 mL 无菌水,刮取平板中真菌表面的孢子,倒入 50 mL PDB 培养基中,25 °C、180 r/min 恒温振荡培养 6 d,用灭菌的双层细纱布进行过滤,再用无菌水冲洗 3 次,最终制成浓度为  $1 \times 10^6$  孢子/mL 的孢子悬浮液。将 5 mL 病原菌孢子悬浮液分别添加到 5 mL 含有不同浓度提取物(0×MIC、1×MIC、2×MIC、4×MIC、8×MIC)的 PDB 培养基中,使提取物的最终浓度分别为 0×MIC、1/2×MIC、1×MIC、2×MIC、4×MIC,在 25 °C 孵育 12 h。取 50  $\mu$ L 滴定到血球计数板上,用光学显微镜观察,在视野范围大约 100 个孢子的区域进行计数,孢子芽管长度大于孢子半径的视为萌发,计算孢子萌发率。

孢子萌发率=已萌发孢子数/镜检孢子总数×100%。

#### 1.4.3 人参核盘菌菌丝形态观察

采用插片法<sup>[17]</sup>观察菌丝形态。无菌条件下制备 PDA 培养基平板,在培养基中倾斜插入无菌盖玻片,待培养基冷却至室温,于平板中央接种直径为 6 mm 的病原菌菌饼,25 °C 恒温培养至菌丝长至盖玻片的三分之二,取出盖玻片,放置在含有提取物浓度为 MIC 的 PDB 培养基中,25 °C 恒温培养 24 h,无菌水冲洗 3 次后置于光学显微镜下进行菌丝形态观察。

#### 1.4.4 相对电导率和核酸含量测定

参照 Xue 等的方法<sup>[18]</sup>测定电导率和核酸含量。将 10 mL 不同浓度提取物(0×MIC、2×MIC、

4×MIC)分别加入 10 mL 孢子悬浮液中,制成提取物最终浓度分别为 0×MIC、1×MIC、2×MIC 的孢子悬浮液,25 °C 恒温培养 0、2、4、6、8、10 h 后,用电导率仪测定电导率;在 10 mL 孢子悬浮液中分别加入 10 mL 不同浓度提取物(0×MIC、2×MIC、4×MIC),25 °C 恒温培养 0、2、4、6、8、10 h 后,12 000 r/min 离心 2 min 收集上清液。用紫外分光光度计测定 260 nm 处上清液的吸光度。每个处理 3 次重复。

#### 1.4.5 MDA 含量和酶活测定

在刘耀华等的方法<sup>[19]</sup>上进行改进测定酶活。在 500 mL PDB 培养基中接种 8 块直径为 6 mm 的病原菌菌饼,25 °C、180 r/min 恒温振荡培养 3 d,待菌丝长出后吸取 1 mL 转接到 100 mL 的 PDB 培养基中,25 °C、180 r/min 恒温振荡培养 3 d,添加提取物使其终浓度分别为 0、3.75、7.50 mg/mL,25 °C 继续振荡培养 0、12、24、48 h 后取出,过滤,PBS 冲洗 3 次并吸干水分,称取 0.1 g 菌丝备用。MDA 含量和 SOD、POD、CAT 活力测定均按照试剂盒说明书进行操作。每个处理 3 次重复。

### 1.5 数据分析

采用 Excel 2019 进行数据录入和计算,采用 SPSS 23 软件进行 ANOVA 单因素方差分析,结果以平均值±标准差表示。采用 Prism 软件进行图表制作。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取物对人参核盘菌菌丝生长的影响

提取物对人参核盘菌菌丝生长的抑制作用如图 1 所示,对人参核盘菌菌丝生长的抑制率如表 1 所示,培养到第 2 天时,提取物浓度为 15.00、7.50 和 3.75 mg/mL 的培养基对人参核盘菌的抑制率均达到 100%,即提取物对人参核盘菌的最小抑菌浓度为 3.75 mg/mL。培养 5 d 后提取物浓

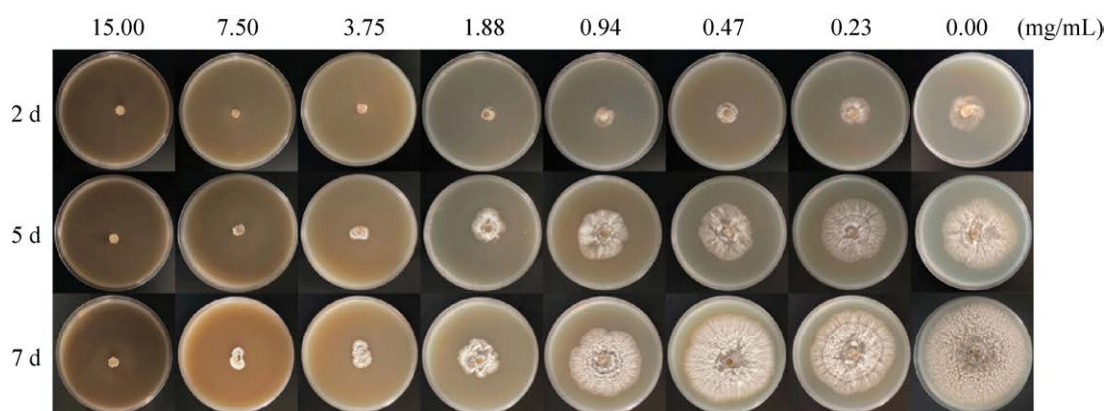


图 1 提取物对人参核盘菌菌丝生长的影响

Figure 1 Effects of extracts on mycelia growth of *Sclerotinia ginseng*.

表 1 提取物对人参核盘菌菌丝生长的抑制率

Table 1 Inhibition rate of the extract on mycelia growth of *Sclerotinia ginseng*

浓度 Concentration (mg/mL)	菌落直径 Colony diameter (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)
15.00	0.00	100.00a
7.50	8.67±1.76g	89.06±2.22b
3.75	18.83±4.19f	76.22±5.30c
1.88	26.33±0.58e	66.75±0.73d
0.94	50.83±2.02d	35.82±2.55e
0.47	61.00±0.87c	22.98±1.09f
0.23	66.83±2.75b	15.62±3.48g
0.00	79.67±1.04a	—

注：菌落直径为第 7 天的测试结果，数据为 3 次测量的平均结果±标准误差，表中同一列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )；—：无抑制效果

Note: Colony diameter was measured on the seventh day, all data are means of 3 replications±SE. Different lowercase letters at the end of figure on the same line indicate significant differences ( $P<0.05$ ); —: Indicates no inhibitory effect.

度为 15.00 mg/mL 的培养基对人参核盘菌的抑制率为 100%，即提取物对人参核盘菌的最小杀菌浓度为 15 mg/mL。

## 2.2 提取物对人参核盘菌孢子萌发的影响

由表 2 可知，培养时间为 12 h 时，未添加提取物的人参核盘菌孢子萌发率为 84.85%；提取物浓度为 MFC 时，人参核盘菌的孢子萌发率为

9.31%，孢子萌发抑制率为 90.69%；提取物浓度为 1×MIC 时人参核盘菌孢子萌发率为 39.38%，孢子萌发抑制率为 60.62%。

## 2.3 提取物对人参核盘菌菌丝形态的影响

提取物对人参核盘菌菌丝形态的影响如图 2 所示，通过显微观察，未添加提取物(图 2A)的人参核盘菌健康饱满、表面光滑，而经提取物(图 2B)处理的菌丝形态异常，菌丝干瘪，局部膨大，内含物外渗使菌丝内部空洞。

表 2 提取物对人参核盘菌孢子萌发率的影响

Table 2 Effect of extracts on spore germination rate of *Sclerotinia ginseng*

浓度 Concentration (mg/mL)	萌发率 Germination rate (%)	抑制率 Inhibition rate (%)
15.00 (MFC)	9.31±2.41e	90.69±2.41a
7.50 (2×MIC)	27.03±1.58d	72.92±1.58b
3.75 (1×MIC)	39.38±2.09c	60.62±2.09c
1.88 (1/2×MIC)	78.95±1.50b	21.05±1.50d
0.00 (0×MIC)	84.85±2.12a	—

注：数据为 3 次测量的平均结果±标准误差，表中同一列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )；—：无抑制效果

Note: all data are means of 3 replications±SE. Different lowercase letters at the end of figure on the same line indicate significant differences ( $P<0.05$ ); —: Indicates no inhibitory effect.

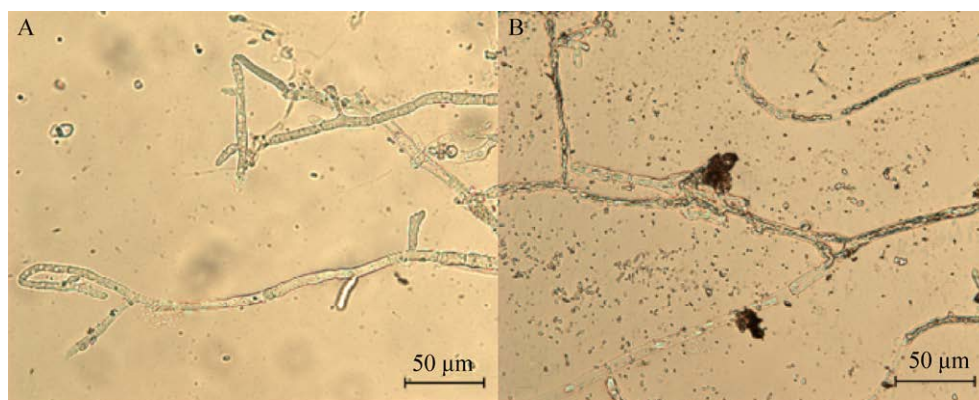


图2 提取物对人参核盘菌菌丝形态的影响

Figure 2 Effects of extracts on mycelium morphology of *Sclerotinia ginseng*. A: 0×MIC; B: 1×MIC.

#### 2.4 提取物对人参核盘菌细胞膜通透性的影响

细胞膜通透性的变化能反映细胞膜结构的损伤程度,当细胞受到损害时膜通透性增加,细胞内、外电解质失衡,导致电导率发生变化<sup>[20]</sup>。提取物对人参核盘菌电导率的影响如图 3A 所示,对照组的电导率无明显变化,而处理组的电导率在 6 h 后明显增长;在培养 10 h 时,提取物浓度为 1×MIC 的电导率比对照组增加 24.74%,提取物浓度为 2×MIC 电导率比对照组的电导率增加 30.11%。核酸是所有生物体中的一种基本遗传物质。在正常情况下,核酸被保留在细胞中。然而细胞损伤可导致核酸泄漏到细胞外<sup>[21]</sup>。如图 3B 所示,核酸含量的变化趋势与电导率的变化趋势相似。培养时间为 10 h 时,提取物浓度为 1×MIC 的核酸含量比对照组增加 56.89%,提取物浓度为 2×MIC 的核酸含量比对照组增加 62.85%。电导率和核酸含量的增加说明提取物可以提高人参核盘菌的细胞膜通透性,从而反映细胞膜的损伤程度。

#### 2.5 提取物对人参核盘菌 MDA 含量的影响

提取物对人参核盘菌 MDA 含量的影响如图 4 所示,低处理组(1×MIC)人参核盘菌菌丝内 MDA 含量随着培养时间的增加显著增长,在处

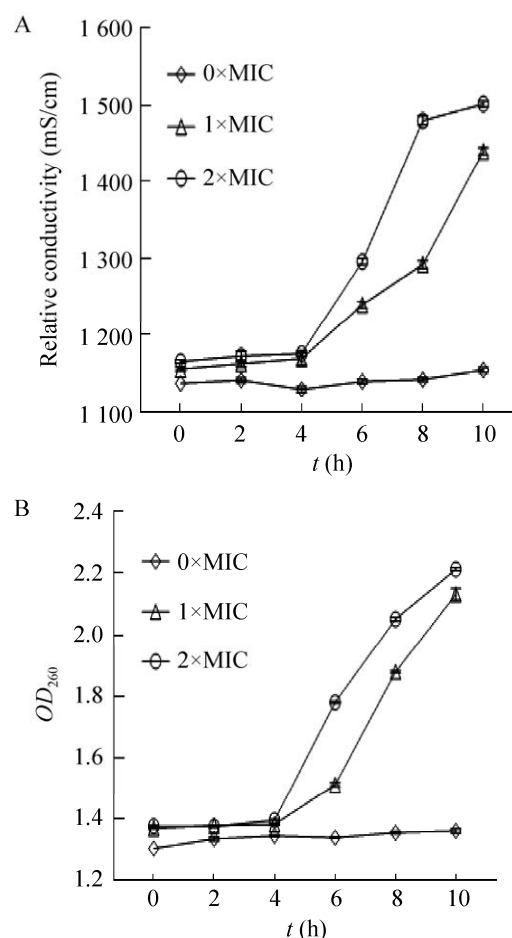


图3 提取物对人参核盘菌细胞膜通透性的影响  
A: 电导率; B: 核酸含量

Figure 3 Effect of extracts on cell membrane permeability of *Sclerotinia ginseng*. A: Conductivity; B: Nucleic acid content.



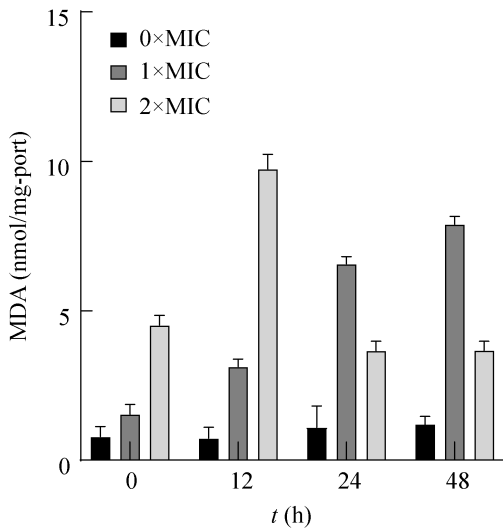


图4 提取物对人参核盘菌 MDA 含量的影响  
Figure 4 Effects of extracts on MDA content of *Sclerotinia ginseng*.

理 48 h 后, MDA 含量是对照组的 5.60 倍; 高处理组(2xMIC)人参核盘菌菌丝的 MDA 含量呈先升高后降低的趋势, 并在 12 h 时含量最高, 是对照组的 12.40 倍。MDA 浓度经常被用作脂质过氧化指标, MDA 含量的增加说明提取物能够破坏菌丝体细胞膜, 引起脂质过氧化反应, 进而造成膜的损伤。

## 2.6 提取物对人参核盘菌 SOD、POD 和 CAT 活力的影响

提取物对人参核盘菌 SOD、POD 和 CAT 活力的影响如图 5 所示。提取物浓度为 1xMIC 时, 人参核盘菌菌丝的 SOD 活力随着处理时间的增加而增加, 在处理 48 h 时比对照组增加 29.89%; 提取物浓度为 2xMIC 时, 人参核盘菌菌丝的 SOD 活力呈先升高后降低的趋势, 并在 12 h 时活力最高, 相比对照组增加 41.54%。POD 和 CAT 活力变化趋势与 SOD 相似, 2xMIC 处理组在处理 12 h 时达到峰值, POD 活力是对照组的 16.42 倍, CAT 活力比对照组增加 57.93%; 1xMIC 处理组在处理 24 h 后, POD 活力是对照组的 2.76 倍, CAT 活力比对照组增加 72.14%。

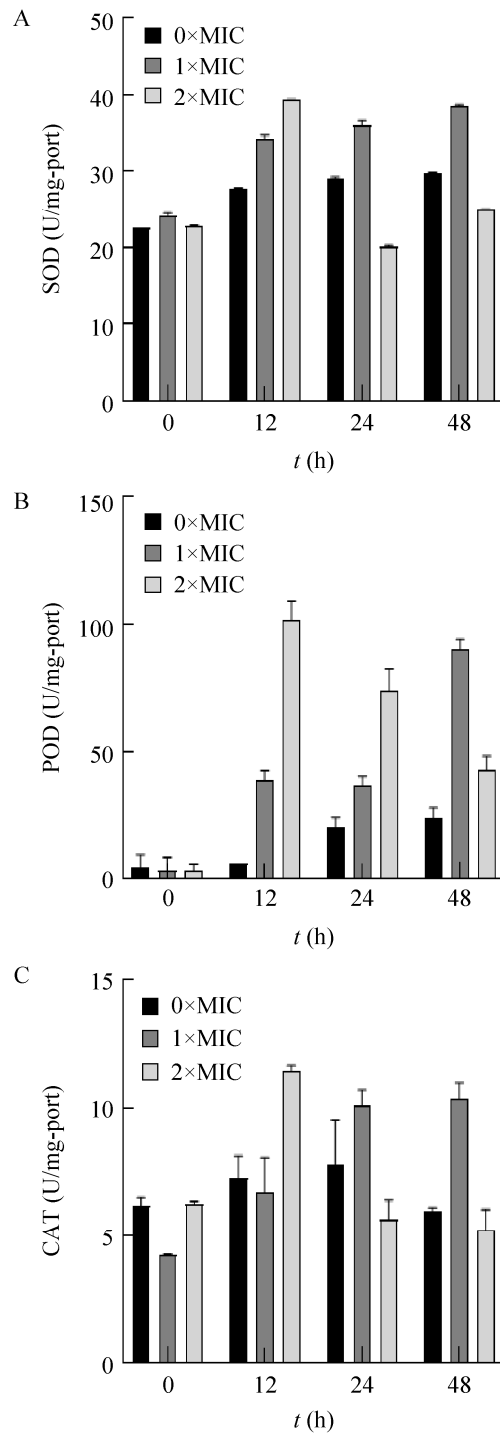


图5 提取物对人参核盘菌 SOD、POD、CAT 活力的影响 A: SOD 活力; B: POD 活力; C: CAT 活力

Figure 5 Effects of extracts on SOD, POD and CAT activities of *Sclerotinia ginseng*. A: SOD activity; B: POD activity; C: CAT activity.

### 3 讨论与结论

植物内生真菌抗菌活性的研究是生物农药开发的重要方向之一<sup>[22]</sup>。*Endomelanconiopsis* 作为一个建立时间较短的属,其次生代谢产物的研究较少,仅有 9 个酮类化合物的报道<sup>[12-13]</sup>,关于其次生代谢产物活性的研究尚处于空白阶段。为了探究 *E. microspora* 的次生代谢产物对人参核盘菌的抑制作用,本研究选取了 *E. microspora* 发酵物的乙酸乙酯提取物,分别从菌丝生长速率、孢子萌发抑制率、菌丝显微形态观察和细胞膜通透性几个方面进行研究。研究结果表明, *E. microspora* 乙酸乙酯提取物具有抑制人参核盘菌菌丝生长的活性,最小抑菌浓度为 3.75 mg/mL,最小杀菌浓度为 15.00 mg/mL。此外,本研究发现 *E. microspora* 乙酸乙酯提取物对人参核盘菌孢子萌发也具有较强的抑制效果,而且抑制效果与提取物浓度呈正相关,这与李可心等在研究槐耳发酵液乙酸乙酯提取物对人参核盘菌抑制作用中的结果<sup>[23]</sup>一致。

观察抑菌物质处理前后菌丝形态的变化对发现药物的作用靶点具有重要意义<sup>[24]</sup>。为了进一步研究 *E. microspora* 提取物对人参核盘菌的抑菌机制,本研究通过显微镜观察提取物处理前后人参核盘菌菌丝形态变化,结果表明,提取物处理后菌丝形态异常,内含物外渗,菌丝内部空洞。由此推断 *E. microspora* 提取物可能破坏了人参核盘菌菌丝的细胞膜,改变了其通透性,导致细胞内物质的渗漏。有大量研究表明抗真菌药物可以通过改变病原菌的菌丝形态,从而影响菌丝的正常生长发育。Tao 等<sup>[25]</sup>对意大利青霉的研究结果表明,柠檬醛明显引起胞质丢失和菌丝扭曲,从而影响意大利青霉菌丝的形态。Shen 等<sup>[26]</sup>通过观察石蒜碱处理前后小麦镰刀菌菌丝形态的变化,发现石蒜碱处理后小麦镰刀菌菌丝干

瘪、表面粗糙、分枝不明显,均与本研究有类似的结果。基于以上结果,之后研究了 *E. microspora* 提取物对人参核盘菌细胞膜通透性的影响,进一步分析 *E. microspora* 提取物的抗真菌机制。

细胞膜是细胞的重要组成部分,在物质交换和能量转移中起着重要的作用,当真菌受到抗菌药物的刺激时细胞膜通透性增大,导致菌丝体内容物外渗<sup>[27-28]</sup>。通过研究电导率和核酸含量的变化可反映杀菌剂对病原菌细胞膜通透性的影响<sup>[29]</sup>,本研究发现经提取物处理后人参核盘菌电导率和核酸的含量显著上升,以上结果进一步证明 *E. microspora* 提取物破坏了人参核盘菌细胞膜通透性。Zhang 等<sup>[30]</sup>研究发现 2-异硫氰酸酯破坏梨果黑斑病菌细胞膜的完整性,致使其电导率和核酸含量显著上升,与本研究结果相似。

膜脂过氧化是细胞膜通透性增加的主要原因之一,MDA 是膜脂过氧化的产物,MDA 含量的变化可以反映细胞膜的损伤程度<sup>[31-32]</sup>。本研究中,低处理组(1×MIC)的 MDA 含量随着培养时间的增加显著增长,高处理组(2×MIC)的 MDA 含量在 12 h 时最高,随后下降。MDA 含量增加说明经提取物作用后人参核盘菌菌丝体内发生了脂质过氧化,随着膜脂过氧化的加剧,细胞膜丧失完整性,从而导致 MDA 含量下降,这与李琴琴等对小麦赤霉病菌的研究结果<sup>[33]</sup>相似。

SOD、CAT 和 POD 是菌丝体内重要的抗氧化酶,可以清除体内的活性氧(reactive oxygen species, ROS),在正常情况下,活性氧的产生和消除处于动态平衡状态,通过抗氧化酶活性的变化反映脂质过氧化的进程<sup>[34]</sup>。本研究中,提取物处理人参核盘菌 0-48 h,低处理组(1×MIC)菌体内 SOD、POD 和 CAT 的活性均随着处理时间的延长而上升;高处理组(2×MIC)的 SOD、



POD 和 CAT 活力随着处理时间的延长均呈现先上升后降低的趋势, 在 12 h 时达到峰值。在提取物的作用下, 菌丝体内通过产生保护酶消除 ROS 从而保护菌体, 而高处理组(2×MIC)随着处理时间延长, 菌丝体内 ROS 的产生超过了保护酶的清除能力, 从而破坏了 ROS 产生与清除的动态平衡, 随后保护酶被过量的 ROS 破坏, 从而导致酶活降低。Gao 等<sup>[35]</sup>发现在愈创木酚处理下, 小麦镰刀菌 SOD、POD 和 CAT 的活性随着愈创木酚浓度的增加而降低。Halifu 等<sup>[36]</sup>报道的病毒 ZT05 乙酸乙酯提取物对茄属菌丝 CAT、SOD 和 POD 活力的影响结果与本研究结果类似。

综上所述, 白花蒲公英内生菌(*E. microspora*)乙酸乙酯提取物对人参核盘菌的抑制作用主要表现为加剧膜脂过氧化, 改变细胞膜通透性, 进而导致细胞内含物流失。本研究通过体外试验评估了白花蒲公英内生菌(*E. microspora*)乙酸乙酯提取物对人参核盘菌的初步抑制机理, 表明 *E. microspora* 乙酸乙酯提取物具有开发成生物农药的潜力, 这为人参核盘菌的防治提供了新思路。本研究虽然确定了 *E. microspora* 乙酸乙酯提取物对人参核盘菌的抑制活性, 但其活性成分尚未明确, 因此后续还需进一步对其活性成分进行研究。

## REFERENCES

- [1] 王英权, 郁万芹. 人参栽培管理要点[J]. 特种经济动植物, 2022, 25(1): 61-62  
Wang YQ, Yu WQ. Key points of *Panax ginseng* cultivation and management[J]. Special Economic Animals and Plants, 2022, 25(1): 61-62 (in Chinese)
- [2] 王丹, 傅俊范, 尹海波, 周如军, 李自博. 人参核盘菌菌核分泌液致病性及生物学特性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2020, 51(4): 439-445  
Wang D, Fu JF, Yin HB, Zhou RJ, Li ZB. Pathogenicity and biological characteristics of the exudate of *Sclerotinia ginseng*[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2020, 51(4): 439-445 (in Chinese)
- [3] 韩月玲. 人参核盘菌侵染特性及致病机制研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2019  
Han YL. Infection characteristics and pathogenic mechanism of *Sclerotinia ginseng*[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [4] 杨骁, 李长田. 人参内生防真菌的筛选与鉴定[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2013, 45(4): 107-113  
Yang X, Li CT. Screening and identification of endophytic biocontrol fungi of *Panax ginseng*[J]. Journal of Northeast Normal University: Natural Science Edition, 2013, 45(4): 107-113 (in Chinese)
- [5] 姜云, 尹望, 陈长卿, 陈光, 高洁. 人参内生菌的分离及拮抗菌株的筛选[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(5): 517-521  
Jiang Y, Yin W, Chen CQ, Chen G, Gao J. Isolation and screening of antagonistic endophyte from *Panax ginseng*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2012, 34(5): 517-521 (in Chinese)
- [6] 卜宣尹, 杨卫丽. 植物内生菌抑菌机制和抑菌次生代谢产物的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(10): 2200-2206  
Bu XY, Yang WL. Research progress on antibacterial mechanism of plant endophytes and antibacterial secondary metabolites[J]. Drugs & Clinic, 2021, 36(10): 2200-2206 (in Chinese)
- [7] 曾茜, 陈旭, 杨雨, 王晓敏, 李玉平. 一株内生菌对香菇和灵芝菌棒病原菌的生防潜力研究[J]. 种子, 2021, 40(5): 52-56, 62  
Zeng Q, Chen X, Yang Y, Wang XM, Li YP. Studies on biocontrol potential of an endophytes against pathogenic bacteria from fungus rods of *Lentinula edodes* *Ganoderma lucidum*[J]. Seed, 2021, 40(5): 52-56, 62 (in Chinese)
- [8] 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)
- [9] Zhang J, He L, Guo C, Liu ZY, Kaliaperumal K, Zhong BL, Jiang YM. Evaluation of *Aspergillus aculeatus* GC-09 for the biological control of citrus blue mold caused by *Penicillium italicum*[J]. Fungal Biology, 2022, 126(3): 201-212
- [10] Adeleke BS, Babalola OO. The plant endosphere-hidden treasures: a review of fungal endophytes[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2021,

- 37(2): 154-177
- [11] Rojas EI, Herre EA, Mejía LC, Arnold AE, Chaverri P, Samuels GJ. *Endomelanconiopsis*, a new anamorph genus in the *Botryosphaeriaceae*[J]. Mycologia, 2008, 100(5): 760-775
- [12] Sun ZH, Li HH, Liang FL, Chen YC, Liu HX, Li SN, Tan GH, Zhang WM. Two new secondary metabolites from the endophytic fungus *Endomelanconiopsis endophytica*[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2016, 21(7): 943
- [13] Sun ZH, Liang FL, Chen YC, Liu HX, Li HH, Zhang WM. Two new xyloketal from the endophytic fungus *Endomelanconiopsis endophytica* derived from medicinal plant *Ficus hirta*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2016, 18(11): 1036-1041
- [14] He C, Zhang ZQ, Li BQ, Xu Y, Tian SP. Effect of natamycin on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*—postharvest pathogens of grape berries and jujube fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 151: 134-141
- [15] Chen CY, Qi WW, Peng X, Chen JY, Wan CP. Inhibitory effect of 7-demethoxytylophorine on *Penicillium italicum* and its possible mechanism[J]. Microorganisms, 2019, 7(2): 36
- [16] Wei QH, Cui DZ, Liu XF, Chai YY, Zhao N, Wang JY, Zhao M. *In vitro* antifungal activity and possible mechanisms of action of chelerythrine[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020, 164: 140-148
- [17] 张晨, 吕建华, 董婧, 李长田. 蜜环菌发酵液提取物对人参链格孢霉菌的抑制作用[J]. 菌物研究, 2021, 19(3): 177-183
- Zhang C, Lü JH, Dong J, Li CT. The effect of *Armillaria mellea* fermentation broth extract in inhibiting *Alternaria panax* in ginseng[J]. Journal of Fungal Research, 2021, 19(3): 177-183 (in Chinese)
- [18] Xue YB, Yang MG, Li SH, Li ZJ, Liu HH, Guo QB, Wang CL. The antibiotic activity and mechanisms of active metabolites (*Streptomyces alboflavus* TD-1) against *Ralstonia solanacearum*[J]. Biotechnology Letters, 2019, 41(10): 1213-1222
- [19] 刘耀华, 马新耀, 程作慧, 赵瑞, 李锐, 李生才. 香茅精油对番茄早疫病菌的抑菌作用及抑菌机制[J]. 应用生态学报, 2017, 28(9): 3016-3022
- Liu YH, Ma XY, Cheng ZH, Zhao R, Li R, Li SC. The antimicrobial activity and mechanism of *Cymbopogon citratus* essential oil against *Alternaria solani*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2017, 28(9): 3016-3022 (in Chinese)
- [20] Chen TW, Lu J, Kang BB, Lin MS, Ding LJ, Zhang LY, Chen GY, Chen SJ, Lin HT. Antifungal activity and action mechanism of ginger oleoresin against *Pestalotiopsis microspora* isolated from Chinese olive fruits[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2583
- [21] Wang RC, Zhai SY, Liang YT, Teng LR, Wang D, Zhang GR. Antibacterial effects of a polypeptide-enriched extract of *Rana chensinensis* via the regulation of energy metabolism[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(6): 4477-4483
- [22] 赵瑞芳, 张程成, 王增辉, 李尧, 田小卫. 具有农用活性植物内生真菌的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(33): 4-7
- Zhao RF, Zhang CC, Wang ZH, Li Y, Tian XW. Advances in plant endophyte with agricultural activity[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(33): 4-7 (in Chinese)
- [23] 李可心, 吕建华, 董婧, 张晨, 范冬雨, 李长田. 槐耳发酵液乙酸乙酯提取物对人参菌核病的抑制作用[J/OL]. 吉林农业大学学报, 2021. DOI: 10.13327/j.jjlau.2021.1041
- Li KX, Lü JH, Dong J, Zhang C, Fan DY, Li CT. Inhibitory effect of ethyl acetate extract from *Vanderbylia robiniohila* fermentation broth on *Sclerotinia schinseng*[J/OL]. Journal of Jilin Agricultural University, 2021. DOI: 10.13327/j.jjlau. 2021.1041 (in Chinese)
- [24] Huang F, Kong J, Ju J, Zhang Y, Guo Y, Cheng Y, Qian H, Xie Y, Yao W. Membrane damage mechanism contributes to inhibition of trans-cinnamaldehyde on *Penicillium italicum* using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 490
- [25] Tao NG, OuYang QL, Jia L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism[J]. Food Control, 2014, 41: 116-121
- [26] Shen JW, Ruan Y, Ren W, Ma BJ, Wang XL, Zheng CF. Lycorine: a potential broad-spectrum agent against crop pathogenic fungi[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(3): 354-358
- [27] Xing FG, Hua HJ, Selvaraj JN, Zhao YJ, Zhou L, Liu X, Liu Y. Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde[J]. Food Control, 2014, 46: 343-350
- [28] Chen C, Wang YM, Su C, Zhao XQ, Li M, Meng XW, Jin YY, Yang SH, Ma YS, Wei DZ, et al. Antifungal activity of *Streptomyces albidoflavus* L131 against the leaf mold pathogen *Passalora fulva* involves membrane leakage and oxidative damage[J]. Journal of the Korean

- Society for Applied Biological Chemistry, 2015, 58(1): 111-119
- [29] 王蕾, 毛玉玲, 许汉亮, 李继虎, 林明江, 胡玉伟, 毛永凯, 管楚雄. 生物表面活性剂鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌的体外抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(6): 1356-1363
- Wang L, Mao YL, Xu HL, Li JH, Lin MJ, Hu YW, Mao YK, Guan CX. *In vitro* antifungal activity of biosurfactant rhamnolipids against sugarcane smut caused by *Sporisorium scitamineum*[J]. Microbiology China, 2019, 46(6): 1356-1363 (in Chinese)
- [30] Zhang M, Li YC, Bi Y, Wang TL, Dong YP, Yang Q, Zhang TT. 2-phenylethyl isothiocyanate exerts antifungal activity against *Alternaria alternata* by affecting membrane integrity and mycotoxin production[J]. Toxins, 2020, 12(2): 124
- [31] Ma DY, Ji DC, Liu JL, Xu Y, Chen T, Tian SP. Efficacy of methyl thujate in inhibiting *Penicillium expansum* growth and possible mechanism involved[J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 161: 111070
- [32] Hussein KA, Lee YD, Joo JH. Effect of rosemary essential oil and *Trichoderma koningiopsis* VOCs on pathogenic fungi responsible for ginseng root-rot disease[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(7): 1018-1026
- [33] 李琴琴, 赵英虎, 高莉, 侯倩倩, 王芳, 贾万利, 王英勇. 纳米银对小麦赤霉病菌的抑制[J]. 生物工程学报, 2017, 33(4): 620-629
- Li QQ, Zhao YH, Gao L, Hou QQ, Wang F, Jia WL, Wang YY. Inhibition of *Fusarium graminearum* by silver nanoparticles[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(4): 620-629 (in Chinese)
- [34] Yin FM, Liu QF, Zhang BJ, Zhang X, He JG, Xie J, Hu Z, Sun RF. Microemulsion preparation of *Waltheria indica* extracts and preliminary antifungal mechanism exploration[J]. Industrial Crops and Products, 2021, 172: 114000
- [35] Gao T, Zhang Y, Shi JR, Mohamed SR, Xu JH, Liu X. The antioxidant guaiacol exerts fungicidal activity against fungal growth and deoxynivalenol production in *Fusarium graminearum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 762844
- [36] Halifu S, Deng X, Song XS, Song RQ, Liang X. Inhibitory mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*[J]. Plants: Basel, Switzerland, 2020, 9(7): 912