



陈晓芳,李明健,宁悦彤.杜仲内生真菌研究进展[J].黑龙江农业科学,2020(12):138-141.

杜仲内生真菌研究进展

陈晓芳¹,李明健²,宁悦彤¹

(1. 毕节医学高等专科学校 医学技术系,贵州 毕节 551700;2. 毕节医学高等专科学校 基础医学系,贵州 毕节 551700)

摘要:为探索和研究杜仲内生真菌的利用情况,本文较系统地归纳了近年来杜仲内生真菌的多样性、抑菌活性、活性成分等方面的研究,并对目前研究存在的问题进行了分析,提出亟需解决的问题。

关键词:杜仲;内生真菌;多样性;抑菌活性;活性物质

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 是杜仲科 (Eucommiaceae) 杜仲属 (*Eucommia*) 植物,为我国特有的药用树种,国家二级保护植物^[1]。杜仲有重要的药用价值,其性味甘、微辛、温、无毒,有补中益气,坚筋健骨的功效^[2]。近年来研究表明,杜仲植株中含有绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷、杜仲糖 A、B、槲皮素等丰富的化学物质,在抗菌、抗肿瘤、治疗心脑血管疾病、抗衰老、增强免疫力、安胎等方面有药理活性^[3-4]。由于杜仲的这些药理作用,除了作为临床用药以外,其作为保健食品也在不断的研制和开发,这使得杜仲的用量迅速

增大。植物内生真菌是指其能够生存于健康植物组织或细胞间隙中但不会引起宿主植株明显病害症状的真菌^[5]。宿主植物和真菌在长期的共同生长进化过程中,逐渐形成了互利互惠的生存关系和相互依存的共生体结构。目前在国内外的研究中已经陆续发现很多植物的内生真菌可以产生和宿主植物相同或相似的代谢产物,从这些代谢产物中可以筛选活性物质来代替珍贵且生长条件苛刻的植物资源或者开发农药成分^[6]。因此,从杜仲植物体中分离出有价值的内生真菌,开发利用其代谢产物是满足医药生产、生物防治等各方面的有效方法。本文主要从杜仲内生真菌多样性、抑菌活性和活性成分 3 个方面的研究情况进行归纳总结,指出当前研究中存在的问题并进行分析,为杜仲内生真菌的后续研究提供参考。

收稿日期:2020-07-30

基金项目:毕节科技局联合基金(毕科联合字 YZ[2017]02号);毕节科技局联合基金(毕科联合字 YZ[2019]4号)。

第一作者:陈晓芳(1986-),女,硕士,讲师,从事特色资源分子生物学研究。E-mail:672409415@qq.com。

[35] 朱林. 植物生长调节剂对大豆产量及其构成因素的影响[J]. 作物研究, 2019, 33(6): 547-548, 533.

[36] 李冰, 蔡光容, 张洪鹏, 等. 新型植物生长调节剂 AP₂ 和 CGR₃ 对大豆光合特性及产量的影响[J]. 大豆科学, 2018(4): 77-83.

[37] 郑殿峰, 宋春艳. 植物生长调节剂对大豆氮代谢相关生理指标以及产量和品质的影响[J]. 大豆科学, 2011, 30(1): 109-112.

Research and Application of Chemical Control Technology in Soybean Planting

HAN Dong, ZHANG Dai-ping, WANG Ping, SONG Xiao-hui

(Heilongjiang Academy of Land Reclamation Sciences, Jiamusi 154007, China)

Abstract: In order to promote the rational application of chemical control technology in soybean production, the effects of growth regulators on soybean root development, plant shape shaping, photosynthetic characteristics, flower pod formation, stress resistance enhancement, yield and quality improvement were summarized in this paper. The problems that should be paid attention to in the use of plant growth regulators were put forward.

Keywords: soybean; chemical control technology; growth regulator; yield

1 杜仲内生真菌多样性

2003 年李雅等^[7]进行了杜仲内生真菌的研究,从采自陕西杨凌的杜仲根茎叶中一共分离出 49 株内生真菌。王丽丽等^[8]分离得到 41 株杜仲内生真菌,分为曲霉属(*Aspergillus*)、粗糙脉孢霉属(*Neurospora*)、盾壳霉属(*Conithyrium*)、白僵菌属(*Beauveria*)、离蠕孢属(*Bipolaris*)、小菌核属(*Sclerotium*)共 6 个属。杨明琰等^[9]从秦岭的杜仲茎部分离得到内生真菌 38 株,形态学鉴定为青霉属(*Penicillium*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、交链孢属(*Alternaria*)等 8 个属,其中青霉属为优势菌群。马养民等^[10]从杜仲的根、茎、叶组织块中分离出 62 株内生真菌,鉴定为 15 个属,链格孢属为优势种群,其次是青霉属。陈峻青等^[11]从南京老山的杜仲根、茎、叶中分离得到 52 株内生真菌,鉴定为 10 个属,镰孢霉属最多,其次是交链孢霉属。梁雪娟^[12]从采自慈利、略阳和遵义的杜仲皮中分离得到 152 株内生真菌,经形态学和分子结合方法鉴定为拟茎点霉属(*Phomopsis*)、间座壳属(*Diaporthe*)、链格孢属、葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)、扁孔腔菌属(*Lophiostoma*)等 8 个属,其中间座壳属、拟茎点霉属和链格孢属为 3 个地域杜仲的内生真菌共有属,且为优势菌群。张亮等^[13]从河南郑州和江苏徐州的杜仲中分离得到 90 株真菌,经形态学鉴定出 13 个属,其中茎点霉属和链格孢属为优势菌群,其次为黑孢属(*Nigrospora*)和枝孢属(*Cladosporium*)等。

从上述研究中可知,杜仲内生真菌有着丰富的资源。目前,杜仲内生真菌的分离培养,都是采用传统的组织块培养法。这种方法分离得到的内生真菌多样性会受到很多因素的影响。首先是杜仲样本采集的不同部位、不同的生长时间和季节都会对菌群多样性产生差异。孙奎等^[14]研究表明,杜仲根部组织分离出来的内生真菌在数量和种属上都占优势。但是马养民等^[10]研究却有不一致的结果,研究表明从杜仲根、茎、叶中分离内生真菌的种类和数量并无明显差异。陈峻青等^[11]研究表明杜仲不同部位的内生真菌有差异,叶中分离的内生真菌数量多于根部。梁雪娟^[12]

研究认为不同季节分离得到的杜仲内生真菌种群差异大,在秋季杜仲内生真菌分离得到的种类和数量较多。

其次,杜仲的外部生长环境对种群的影响。有研究表明不同地域的分离得到的杜仲内生真菌在种属和数量上有差异,优势菌株组成不一样^[15]。有学者初步分析为,可能是地域气候特征、土壤和周围植被的不同,造成大气和土壤中的微生物种类等不同,而导致真菌侵入植物组织机会不等所致^[16-17]。具体产生菌群差异的原因还需要进一步研究。

另外,不同的研究采取的杜仲表面的消毒方法不一致,在样本分离培养过程中对分离的菌株影响很大,不同年龄段的样本对消毒剂的耐受度可能也存在差异,生长年龄较长的杜仲茎可能比新鲜的年龄较小的杜仲叶更耐受,叶子如果采用和茎相同的消毒方式,可能存在过度灭菌的可能性。而这些基础的细节性问题,可能会对研究结果产生比较大的影响。药用植物内生真菌的分离,有很大的随机性和不确定性;研究学者的结果在一定的条件下也有差异;对杜仲内生真菌种群差异并没有系统的研究,各个内容需经过论证才能科学地解释内生真菌存在的意义。不同产地杜仲品质的差异,与内生真菌的存在可能有着不可分割的联系。

2 杜仲内生真菌抑菌活性

苏印泉等^[18]对 20 株杜仲内生真菌进行抑菌活性筛选,发现有 3 株内生真菌对测试菌有较强的抑制作用。李雅等^[7]用 6 株植物病原菌为测试菌,发现 49 株杜仲内生真菌中 22 个菌株对至少其中的 3 种测试菌有明显的抑制作用。王丽丽等^[8]以 6 株人类致病细菌和 5 株植物病原真菌为供试菌株,除了白僵菌属外所有杜仲内生菌株对供试细菌均有抑制作用,48.8%的内生菌株对供试植物病原菌有抑制作用。Chen 等^[19]研究发现绝大多数杜仲内生真菌对测试病原细菌有抑制作用。杨明琰等^[20]研究发现鉴定为淡紫色拟青霉的 DZ05 菌株,具有广谱的抗菌活性,对 3 种病原真菌的抑菌圈达 40 mm 以上,说明该菌在生物防治方面具有开发利用价值。孙微微等^[21]发现鉴

一株炭疽菌属(*Colltotrichum*) DZGS07 对苹果炭疽菌有较强拮抗作用,能造成病原菌菌丝畸形等现象,对苹果炭疽病具有较好的生防潜力。丁婷等^[22]对杜仲内生真菌梭孢壳属(*Thielawia*) DZGS08 研究发现,该菌对玉米纹枯病菌有较好的拮抗作用,能造成病原菌菌丝畸形等现象。

以上研究结果表明,杜仲内生真菌具有普遍的抗菌活性资源,有广阔的应用前景。但是目前缺乏对杜仲内生真菌抑菌机制的深入研究,在真菌代谢产物中,可能是多种活性物质相互作用共同发挥抑菌效果的结果,所以杜仲内生真菌抗菌活性研究仍然不足。内生真菌易于发酵培养和工业化生产,但是内生菌株发酵产物中活性成分含量低,尚未有将杜仲内生真菌代谢产物应用于药物生产的实例,如何提高发酵过程中内生真菌活性物质的产量是需要解决的重要问题,或者从分子水平上利用现代技术来提高菌株活性物质产量。要想杜仲内生真菌真正走向生物防治等应用方面的道路,还需要很多探索和研究。

3 杜仲内生真菌活性成分

植物内生真菌不仅能促进宿主的生长发育,增强宿主植株的抗逆性,还能产生与宿主相同或相似的生物活性物质,所以内生真菌活性成分的研究成为一个热点。霍娟等^[23]从杜仲叶片中分离到 1 株刺孢壳属菌株,测定此菌能和其宿主一样产生黄酮类抗氧化活性物质。李爱华等^[24]首先发现有杜仲内生真菌拟茎点菌属等 5 个属可产生松脂醇二葡萄糖苷(PDG)。沈书庆^[25]从杜仲分离到编号为的 DZ11 内生真菌能产与宿主相同或相似的黄酮类物质槲皮素,并且产量相对稳定。谢辉等^[26]发现一株球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)具有较高的抗氧化活性,能够起到保护红细胞的作用。Chen 等^[19]发现一株鉴定为粪壳菌纲的杜仲内生真菌的次生代谢产物中含有绿原酸。刘超等^[27]从陕西杨凌分离得到 29 株杜仲内生真菌,其中 3 株分子鉴定为拟茎点霉属的内生真菌具有产生 PDG 的能力,并对该菌株产生 PDG 的影响因素、生长所需的培养条件进行摸索研究,以期提高 PDG 的产量。Shi 等^[28]从杜仲内生真菌的发酵液通过高效液相色谱法(HPLC)检

测出能产生 PDG 的真菌。陈峻青等^[11]研究发现部分杜仲内生真菌对异甜菊醇具有生物转化活性,具有很好的研究价值。张亮等^[13]通过比色法进行杜仲内生真菌产吲哚乙酸(IAA)的定性实验,发现有 37 株真菌具有产 IAA 的能力;通过定量实验发现有 8 株真菌有较好的产 IAA 活性。

从以上研究来看,杜仲内生真菌发酵产物中检测到与杜仲相同的药效物质,如 PDG、绿原酸、黄酮类等,这些成分是评价药用杜仲药材质量的重要指标^[29]。对于杜仲产生的这些活性物质,需要加强育种和提高菌株的产量的研究,以期能够得到工业化生产。另外杜仲内生真菌产生活性代谢产物的机制没有相关的研究,真菌产生这些物质与宿主杜仲的关联性也有待探索。除了上述活性物质以外,杜仲内生真菌其他生理活性相关研究较少。

4 结语

杜仲作为我国独有的药用植物,近现代研究表明,其除了传统的医效以外,还具有降血压、抗癌、抗病毒、增强机体免疫功能等作用。杜仲内生真菌能够产生与宿主相同或相似的重要药用活性物质,这使其替代资源缺乏、生长周期长的杜仲和开发生物防控等方面成为可能。目前亟需解决的问题主要在几个方面:一是在长期共同进化的过程内生真菌与宿主建立相互关系的机制;二是杜仲内生真菌的群落组成和生态功能;三是内生真菌功能群与杜仲道地性的关联;四是杜仲内生真菌活性物质之间的关系和抑菌机理;五是杜仲内生真菌药用活性产物的开发和产量的提高等。全方位的探索和研究才能真正让杜仲内生真菌的利用成为现实。

参考文献:

- [1] 何强,陈文强,彭浩,等. 濒危植物杜仲内生真菌及次生代谢产物活性研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017(2): 20-23.
- [2] 李芳东,杜红岩. 杜仲[M]. 北京:中国中医药出版社, 2001.
- [3] Guo H, Shi F, Li M, et al. Neuroprotective effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. and its bioactive constituent work via ameliorating the ubiquitin-proteasome system [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015, 15(1): 675-682.
- [4] Xian J, Wei-Hua H, Yong-Jun T, et al. *Eucommia ulmoides* Oliv. (Du-Zhong) lignans inhibit angiotensin ii-stimulated proliferation by affecting P21, P27, and bax expression in

- rat mesangial cells[J]. Evidence Based Complementary & Alternative Medicine, 2015; 1-8.
- [5] James F W. An overview of endophytic microbes: endophytism defined [M]//Marcel Dekker; Microbial Endophytes, 2000; 29-33.
- [6] Card S D, Faville M J, Simpson W R, et al. Mutualistic fungal endophytes in the triticeae - survey and description[J]. FEMS Microbiology Ecology(1); 1.
- [7] 李雅, 宋晓斌, 马养民, 等. 杜仲内生真菌对植物病原真菌的抑菌活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007(2); 77-81.
- [8] 王丽丽, 白方文, 张西玉, 等. 杜仲内生真菌的分离鉴定及其抑菌活性研究[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2009(4); 102-106.
- [9] 杨明琰, 田稼, 马瑜, 等. 杜仲内生真菌的分离鉴定及抗菌活性研究[J]. 西北植物学报, 2012, 32(1): 193-198.
- [10] 马养民, 田从丽, 张弘弛. 杜仲内生真菌的分离鉴定及抗菌活性筛选[J]. 时珍国医国药, 2011(3); 34-36.
- [11] 陈峻青, 王伊文, 冯成亮, 等. 杜仲内生真菌的分离鉴定及其对异甜菊醇的生物转化研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2011, 30(6); 861-865.
- [12] 梁雪娟. 杜仲皮有效成分与其内生真菌的相关性研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [13] 张亮, 桑曼曼, 郭小伟, 等. 杜仲内生真菌的多样性分析及其抗植物病原真菌的活性[J]. 生物资源, 2017, 39(1): 48-52.
- [14] 孙奎, 苏印泉. 杜仲内生真菌的分离及其鉴定[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(4): 731-733.
- [15] 王梅霞, 张丽, 霍娟, 等. 杜仲内生真菌类群与分布的初步研究[J]. 菌物研究, 2006, 4(3): 55-58.
- [16] Southcott K A, Johnson J A. Isolation of endophytes from two species of palm, from Bermuda[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(8): 789-792.
- [17] Guo L D, Liew K D H C Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rdna sequences [J]. New Phytologist, 2000, 147(3): 617-630.
- [18] 苏印泉, 朱红薇, 马希汉, 等. 杜仲内生真菌的抑菌活性筛选[J]. 西北植物学报, 2005, 25(6): 1153-1157.
- [19] Chen X, Sang X, Li S, et al. Studies on a chlorogenic acid-producing endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(5): 447-454.
- [20] 杨明琰, 梁海燕, 田稼, 等. 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.
- [21] 孙微微, 丁婷. 杜仲内生真菌中抗苹果炭疽病活性菌株的筛选[J]. 安徽农业大学学报, 2013, 40(6): 981-987.
- [22] 丁婷, 孙微微, 王帅, 等. 杜仲内生真菌中抗玉米纹枯病活性菌株的筛选[J]. 植物保护, 2014, 40(6): 29-35.
- [23] 霍娟, 陈双林. 杜仲内生真菌抗氧化活性[J]. 南昌大学学报(理科版), 2004, 28(3): 270-275.
- [24] 李爱华, 樊明涛, 师俊玲. 杜仲内生菌的分离及产 PDG 菌株的筛选[J]. 西北植物学报, 2007, 27(3): 616-619.
- [25] 沈书庆. 濒危药用植物杜仲产活性成分内生真菌的研究[D]. 西安: 西北大学, 2008.
- [26] 谢辉, 陈双林, 姚慧琴, 等. 杜仲内生球毛壳菌发酵产物体外抗脂质过氧化和保护红细胞的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 355.
- [27] 刘超, 师俊玲, 周小娟, 等. 产 PDG 杜仲内生菌的分离筛选和分类鉴定及生长条件研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(1): 203.
- [28] Shi J, Liu C, Liu L, et al. Structure identification and fermentation characteristics of pinoresinol diglucoside produced by *Phomopsis* sp. isolated from *Eucommia ulmoides* Oliv[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2012, 93(4): 1475-1483.
- [29] 尉芹, 王冬梅, 马希汉, 等. 杜仲叶总黄酮含量测定方法研究[J]. 西北农业科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(5): 119-123.

Research Progress of Endophytic Fungi in *Eucommia ulmoides* Oliv

CHEN Xiao-fang¹, LI Ming-jian², NING Yue-tong¹

(1. Department of Medical Technology, Bijie Medical College, Bijie 551700, China; 2. Department of Basic Medicine, Bijie Medical College, Bijie 551700, China)

Abstract: In order to explore and study the utilization of endophytic fungi in *Eucommia ulmoides* Oliv., this paper systematically summarized the research on the diversity, antibacterial activity and active components of endophytic fungi in *Eucommia ulmoides* in recent years, and analyzed the problems existing in the current research, and put forward the problems to be solved urgently.

Keywords: *Eucommia ulmoides*; endophytic fungus; biodiversity; antimicrobial activity; active substance