

白花曼陀罗内生真菌多样性及抗皮肤真菌活性分析

冯美茹, 施文广, 李佳琪, 陈丹婷, 付英豪, 邓祖军*

(广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广州 510006)

[摘要] 目的:分析白花曼陀罗各部位内生真菌的类群结构与多样性,并筛选出具有抗皮肤真菌的活性菌株,为寻找新的抗皮肤真菌先导化合物提供菌株资源。方法:采用组织块法对白花曼陀罗根、茎、叶3个部位的内生真菌进行分离,结合形态学和rDNA-内转录间隔区(ITS)序列分析法对内生真菌进行鉴定,利用琼脂扩散法分析其抗皮肤真菌活性。结果:该研究从白花曼陀罗中分离到292株内生真菌,隶属于34个属,其中根部内生真菌的优势类群为镰刀菌属(*Fusarium*)占72.97%,茎部以镰刀菌属(37.25%)和*Plectosphaerella*(28.43%)为主要类群,而炭疽属(*Colletotrichum*)在叶部的比例最高,达39.66%;叶部内生真菌的分离率(89.23%),定殖率(84.62%)和多样性指数(1.82)明显高于根(70.48%, 70.48%, 1.23)和茎(69.39%, 68.03%, 1.64)。35代表性内生真菌发酵液的抗皮肤真菌活性结果表明,它们对犬小孢子菌,黏性毛孢子菌,红毛癣菌、白色念珠菌等皮肤致病真菌的具有抑制作用的菌株分别占总数的97.14%, 71.43%, 45.71%, 25.71%,其中有6株(17.14%)对4种皮肤致病真菌均具有抑制活性,它们分别是*Fusarium* sp. R1, *Penicillium* sp. R5, *Aspergillus* sp. R7, *Metarhizium* sp. S18, *Diaporthe* sp. S19和*Glomerella* sp. L57。结论:白花曼陀罗内生真菌具有丰富的物种多样性,其中存在较高比例的具抗皮肤真菌活性菌株,为寻找新的抗皮肤真菌药物提供了菌株资源。

[关键词] 白花曼陀罗; 内生真菌; 多样性; 抗皮肤真菌活性

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0187-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210714

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210326.1048.002.html>

[网络出版日期] 2021-3-28 10:45

Diversity and Anti-Dermatophyte Activities of Endophytic Fungi from *Datura metel*

FENG Mei-ru, SHI Wen-guang, LI Jia-qi, CHEN Dan-ting, FU Ying-hao, DENG Zu-jun*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the taxonomic structure and diversity of endophytic fungi from *Datura metel* and screen the strains with anti-dermatophyte activities, so as to provide resources for the development of new lead compounds against dermatomycosis. **Method:** Endophytic fungi were isolated from the roots, stems and leaves of *D. metel* after tissue block incubation and then identified by morphological analysis and rDNA-internal transcribed spacer(ITS) sequencing. Their anti-dermatophyte activities were detected by agar diffusion assay. **Result:** A total of 292 strains of endophytic fungi were isolated from *D. metel*, belonging to 34 genera, with *Fusarium* (72.97%) in roots, *Fusarium* (37.25%) and *Plectosphaerella* (28.43%) in stems, and *Colletotrichum* (39.66%) in leaves as the dominant species. The isolation rate (89.23%), colonization rate (84.62%), and diversity index (1.82) of endophytic fungi in leaves were significantly higher than those in roots (70.48%, 70.48% and 1.23) and stems (69.39%, 68.03% and 1.64). The determination of anti-dermatophyte activities of 35 endophytic fungal fermented filtrates showed that the strains exhibiting

[收稿日期] 20210223(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31971384)

[第一作者] 冯美茹,在读硕士,从事基础医学研究,E-mail:1097784942@qq.com

[通信作者] * 邓祖军,博士,教授,从事微生物资源学研究,E-mail:dengzujun66@163.com

inhibitory activities against *Microsporum canis*, *Trichosporon mucoides*, *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans* accounted for 97.14%, 71.43%, 45.71%, and 25.71%, respectively. Among them, six strains (17.14%), namely *Fusarium* sp. R1, *Penicillium* sp. R5, *Aspergillus* sp. R7, *Metarhizium* sp. S18, *Diaporthe* sp. S19, and *Glomerella* sp. L57, all inhibited the four types of cutaneous fungal pathogens. **Conclusion:** The endophytic fungi in *D. metel* are diverse, and the proportion of endophytic fungi possessing anti-dermatophyte activities is high, allowing them to serve as potential resources for the development of new anti-dermatophyte agents.

[Key words] *Datura metel*; endophytic fungi; diversity; anti-dermatophyte activities

内生真菌是一类可存在于健康宿主植物体内稳定共生,不引起植物出现明显病症的真菌。自从研究者从短叶红豆杉中分离到能产紫杉醇的内生真菌开始,关于药用植物内生真菌的研究得到了国内外研究者的极大关注^[1]。目前已从药用植物内生菌中分离到多种具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化、抗虫、抗炎症等多种活性的次生代谢产物^[2-4],其中很多成分与其宿主植物的成分在结构或活性上相同或相似,同时也存在大量的具有新结构或新活性的活性成分^[5-6],例如,KORNSAKULKARN等^[7]从药用植物南酸枣的内生真菌 *Nigrospora* sp. BCC 47789 代谢产物中分离到一种新的氢蒽醌(nigrosporone A),它对口腔表皮样癌细胞、人乳腺癌细胞和人肺癌细胞均具细胞毒性,显示出一定的抗癌潜力;UZOR等^[8]从药用植物法氏花椒的内生真菌 *Pestalotiopsis thea* 中分离到一种对呼吸道合胞病毒增殖具有显著抑制作用的氯异硫氰酸;PRIHANTIN等^[9]从杜英的内生真菌 *Pseudocercospora* sp. ESL02 代谢产物中分离到具有很强的抗氧化活性的土曲霉酸和6-甲基水杨酸。因此药用植物内生真菌已被当作一个重要的药用活性物质资源库,在新药筛选中具有重要应用价值^[5]。研究者们已陆续对多种药用植物内生真菌进行了研究,但仍有大量药用植物内生真菌资源有待开发和研究^[10]。

白花曼陀罗属茄科的一年生草本植物,又称“洋金花”,主产于我国南方的江苏、浙江、福建、广东等地。其是一种常见的中药,具有止咳平喘、解痉定痛,用于哮喘咳嗽、面上生疮、腕腹冷痛、跌打损伤、风湿痹痛、小儿慢惊风,以及外科麻醉^[11-12]。大量的研究表明白花曼陀罗根、茎、叶的提取物具有抗细菌、抗真菌、抗肿瘤、抗炎、抗瘙痒、抗氧化、抗癫痫、抗哮喘、抗类风湿、镇痛等广泛的药理活性^[13-14],在临床上常用于治疗银屑病、慢性支气管炎、哮喘、小儿肺炎、帕金森病、风湿、精神分裂等疾病^[15]。同时许多研究者还从白花曼陀罗根、茎、叶、

花、种子等部位的提取物中分离到多种具有新结构的活性物质。LIU等^[16]从白花曼陀罗种子的乙醇提取物中分离到4种新型的吲哚生物碱(daturametelindoles A~D),它们对人胃腺癌细胞(SGC-7901),人肝癌细胞(Hepg2)和人乳腺癌细胞(MCF-7)都表现出较好的细胞毒性;TAN等^[17]从白花曼陀罗叶中分离到具有一种新的醉茄内酯(daturmetelide A),其可以降低肿瘤坏死因子(TNF)- α ,白细胞介素(IL)-1 β ,IL-6等炎性细胞因子的表达,显示出显著的抗炎活性;对宫颈癌细胞增殖具有抑制活性的新型倍半萜物质和新型木脂素类物质也从白花曼陀罗的茎和根部提取物中分离到^[18-19]。白花曼陀罗作为一类重要的药源植物,药理活性非常广泛,然而目前关于其内生真菌生物多样性以及活性物质的研究未见报道。因此,本研究拟系统分析白花曼陀罗根、茎、叶3个部位内生真菌的生物多样性,并对其抗皮肤致病真菌活性进行研究,以期筛选到具有皮肤致病真菌活性的内生真菌菌株,从而为寻找新的抗皮肤真菌药物提供菌株资源。

1 材料

1.1 植物 3株健康的处于成熟期的供试植株,采集自广西省百色市平果县(N23°19'16.0",E107°35'11"),株高80 cm左右,经华南植物园陈贻竹研究员鉴定为白花曼陀罗 *Datura metel*。取其根、茎、叶样品,用无菌袋包好置于4℃冰箱保存,2 h内分离内生真菌。

1.2 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA,批号1096301),马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB,批号1095351)和LB琼脂培养基(批号1092171),均购自广东环凯生物技术有限公司。

1.3 供试菌株 测试皮肤致病用真菌,犬小孢子菌(*Microsporum canis*),黏性毛孢子菌(*Trichosporon mucoides*),红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*),白色念珠菌(*Candida albicans*),以上菌株均由广东省中

医院大学城分院惠赠。

1.4 仪器和试剂 引物内转录间隔区(ITS)1和ITS4[生工生物工程(上海)股份有限公司], 2×Premix Taq聚合酶链式反应(PCR)聚合酶(广州瑞真生物技术有限公司,批号A2A0882),真菌小剂量提取试剂盒[Magen(美基)生物科技有限公司,货号D3171-02],高效植物基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,货号DP350-02),JY-C型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司),ZF-258型凝胶成像分析仪(上海嘉鹏科技有限公司),ETC811型基因扩增仪(北京东胜创新生物科技有限公司),LRH-150型生化培养箱(上海一恒科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 内生真菌的分离纯化^[20] 利用组织块法分离白花曼陀罗植物内生真菌:把用自来水冲洗净后的健康白花曼陀罗的根、茎、叶样品切成2 cm左右的小段,按以下程序进行表面消毒,无菌水清洗3次,70%乙醇1 min,含3%~5%有效氯的NaClO溶液浸泡(根,5 min;茎,3 min;叶,90 s),75%乙醇30 s,最后在无菌水中漂洗3~5遍,无菌滤纸静置,晾干。将其剪成0.5 cm×0.5 cm左右的组织块(叶片切去边缘、叶尖和叶柄,根和茎用剪刀去掉头尾部分)置于PDA培养基上(接种时注意将切口接入培养基内),28℃培养2~3周,每天观察,若在组织块周围有菌丝生长,挑出尖端菌丝纯化保存。同时收集表面消毒最后一次冲洗样品的水样来检查消毒效果。

2.2 内生真菌鉴定 采用载玻片法培养真菌,在显微镜下观察真菌的菌丝、孢子及子实体结构,同时结合其菌落特征,进行形态学鉴定^[21]。刮取1 g左右质量的菌丝置于研钵中。根据真菌DNA小量提取试剂盒的使用说明提取真菌DNA,然后利用引物ITS1上游(5'-CTTGGTCATTTAGAGAAGTAA-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTAGATATGC-3')PCR扩增其ITS,经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,将合格的PCR产物送至上海美吉生物医药科技有限公司测序。BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对后即得分子鉴定结果。将抗菌活性较好的的内生真菌,利用BLAST初步判断待测菌株所在的属水平,同时参考文献[22]方法使用MEGA 7.0软件,采用邻接法构建系统发育树。

2.3 白花曼陀罗内生真菌液体发酵 含有100 mL PDB的锥形瓶(容量300 mL)中放入适量的内生真菌菌饼,28℃,180 r·min⁻¹孵育7 d,先用灭菌纱布进行粗过滤,再用一次性针头过滤器进行过滤,将上

清液置于灭菌试管,4℃冰箱保存备用。

2.4 内生真菌抗皮肤真菌活性筛选^[23] 犬小孢子菌、黏性毛孢子菌、红毛癣菌抑菌活性采用抑制菌丝生长速率法:在无菌条件下,无菌培养皿中倒入内生真菌发酵液1 mL,待PDA培养基冷却至50℃后取9 mL迅速混合均匀制成平板。冷却后,将病原菌菌饼置于培养皿中央,以培养液为对照,28℃培养7 d,采用十字交叉法测量处理组与对照组的菌落直径,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]×100%。白色念珠菌的抑菌活性采用牛津杯法:将测试菌过夜培养后,分别吸取菌悬液0.1 mL均匀涂布于LB平板,用镊子将4个牛津杯均匀地放置于培养皿上,每个牛津杯中均加入内生真菌发酵滤液200 μL。以蒸馏水作对照,4次重复。37℃培养24 h,通过抑菌圈直径大小来判断抑菌活性。

2.5 数据分析 白花曼陀罗根、茎、叶3个部位受到内生真菌侵染的程度采用定殖率分析,在白花曼陀罗组织样品中内生真菌的丰度以及植物组织样品中多重侵染的频率用分离率分析,各部位内生真菌的优势类群用相对分离频率分析及确定,白花曼陀罗各部位内生真菌的多样性用Shannon-Wiener多样性指数(H')分析,内生真菌类群在各部位分布的均匀程度用均匀度指数(E)分析,不同部位内生真菌多样性的差异用相似性指数(C_s)分析。参考文献[24]中公式计算上述数据。

2.6 白花曼陀罗内生真菌的定殖率与分离率 将表面消毒后最后一遍水样涂布于PDA平板,同时将经表面消毒后的内生真菌菌丝(根、茎、叶各5株)接种于PDA平板上,28℃培养7~14 d,所有平板均无真菌生长。以上结果表明,样品表面的附生菌经表面消毒后已被消除,分离到的菌株均为白花曼陀罗内生真菌。

本研究从382个白花曼陀罗组织块中分离到292株内生真菌,根、茎、叶的菌株数分别为74,102,116株。样品的内生真菌总定殖率和总分离率分别为74.35%,76.44%,内生真菌定殖率最高的部位为叶部(84.62%),其次为根部(70.48%),最低为茎部(68.03%)。各部位内生真菌的分离率从高到低依次为叶(89.23%),根(70.48%),茎(69.39%)。见表1。

2.7 白花曼陀罗根、茎、叶内生真菌类群组成 从白花曼陀罗根、茎、叶共分离到292株内生真菌,经鉴定后隶属于34个属,其优势类群为镰刀菌属

表1 白花曼陀罗不同组织内生真菌的定殖率和分离率

Table 1 Colonization rate and isolation rate of endophytic fungi in different parts of *Datura metel*

组织	组织数/块	长菌组织/块	内生真菌数/株	定殖率/%	分离率/%
根	105	74	74	70.48 ^b	70.48 ^b
茎	147	100	102	68.03 ^c	69.39 ^c
叶	130	110	116	84.62 ^a	89.23 ^a

注:不同小写字母表示同一列不同数据之间具有显著性差异 $P < 0.05$ (表3同)。

(*Fusarium*) 31.85% 和炭疽属 (*Colletotrichum*) 16.44%。根部内生真菌分属于14个属,优势菌属为镰刀菌属,占72.97%;茎部内生真菌分属于18个属,*Plectosphaerella* (占28.43%) 和镰刀菌属 (占37.25%) 是其主要类群;叶部共分离到21个属的内生真菌,其中炭疽属和叶点霉属 (*Phyllosticta*) 占的比例最高,分别为39.66%和13.80%。在总共分离的34个不同类群中,根、茎、叶中共同存在的类群有镰刀菌属、弯孢聚壳属 (*Eutypella*), 炭疽属, *Plectosphaerella*, 小球腔菌属 (*Leptosphaeria*) 共5个,丝核菌属 (*Rhizoctonia*), 曲霉属 (*Aspergillus*), 子囊菌 (*Ascomycota*) 等3个类群在根和茎中均有分布;拟茎点霉属 (*Phomopsis*), 间座壳属 (*Diaporthe*), 座囊菌纲 (*Dothideomycetes*), 射脉菌属 (*Phlebia*), 小球腔菌属, 绿僵菌属 (*Metarhizium*) 6个属在茎和叶中均有分布;*Acrocalymma* 分布在根和叶中;壳孢属 (*Macrophomina*), 青霉属 (*Penicillium*), 棘壳孢属 (*Pyrenochaeta*), *Setophoma*, 鬼伞属 (*Coprinellus*) 等6个属只在分布在根中;小孔菌属 (*Microporus*), *Didymella*, 炭垫菌属 (*Nemania*), *Purpureocillium*, 格孢腔菌属 (*Pleosporales*) 5个类群是茎部特有的内生真菌类群;派伦霉属 (*Peyronellaea*), 葡萄座腔菌属 (*Botryosphaeria*), 炭角菌属 (*Xylaria*), 尾孢属 (*Cercospora*), 棒孢菌属 (*Corynespora*), 轮层炭壳菌属 (*Daldinia*), 小丛壳属 (*Glomerella*), 叶点霉属, 莫氏黑粉菌属 (*Moesziomyces*), 链格孢属 (*Alternaria*) 10个属只分布在叶中。见表2。

2.8 白花曼陀罗不同部位内生真菌的多样性和相似性分析 从 H' 来看, 白花曼陀罗总体的 H' 为1.93, 根、茎、叶的 H' 值分别为1.23, 1.64, 1.82, 其中内生真菌多样性最高的部位为叶部;根、茎、叶的 E 分别为0.47, 0.57, 0.60, 3个部位的 E 与多样性指数变化规律均为叶>茎>根, 由此可知叶部内生真菌生

表2 白花曼陀罗根、茎、叶中内生真菌的种类组成

Table 2 Taxa of endophytic fungi in *Datura metel* roots, stems and leaves

真菌种类	内生真菌的相对分离频率/%			
	根	茎	叶	总计
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	72.97	37.25	0.86	31.85
壳孢属 <i>Macrophomina</i>	1.35	0.00	0.00	0.34
<i>Acrocalymma</i>	2.70	0.00	6.03	3.08
拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	0.00	8.82	3.45	4.45
弯孢聚壳属 <i>Eutypella</i>	2.70	2.94	0.86	2.05
间座壳属 <i>Diaporthe</i>	0.00	1.96	1.72	1.37
派伦霉属 <i>Peyronellaea</i>	0.00	0.00	0.86	0.34
葡萄座腔菌属 <i>Botryosphaeria</i>	0.00	0.00	4.31	1.71
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	1.35	0.98	0.00	0.68
炭疽属 <i>Colletotrichum</i>	1.35	0.98	39.66	16.44
炭角菌属 <i>Xylaria</i>	0.00	0.00	2.59	1.03
<i>Plectosphaerella</i>	1.35	28.43	2.59	11.30
座囊菌纲 <i>Dothideomycetes</i>	0.00	1.96	1.72	1.37
小孔菌属 <i>Microporus</i>	0.00	0.98	0.00	0.34
青霉属 <i>Penicillium</i>	4.05	0.00	0.00	1.03
尾孢属 <i>Cercospora</i>	0.00	0.00	1.72	0.68
棒孢菌属 <i>Corynespora</i>	0.00	0.00	6.90	2.74
<i>Didymella</i>	0.00	0.98	0.00	0.34
棘壳孢属 <i>Pyrenochaeta</i>	1.35	0.00	0.00	0.34
轮层炭壳菌属 <i>Daldinia</i>	0.00	0.00	0.86	0.34
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	1.35	0.98	0.00	0.68
<i>Setophoma</i>	1.35	0.00	0.00	0.34
小丛壳属 <i>Glomerella</i>	0.00	0.00	2.59	1.03
叶点霉属 <i>Phyllosticta</i>	0.00	0.00	13.80	5.48
莫氏黑粉菌属 <i>Moesziomyces</i>	0.00	0.00	0.86	0.34
射脉菌属 <i>Phlebia</i>	0.00	0.98	0.86	0.68
鬼伞属 <i>Coprinellus</i>	1.35	0.00	0.00	0.34
子囊菌属 <i>Ascomycota</i>	1.35	0.98	0.00	0.68
炭垫菌属 <i>Nemania</i>	0.00	0.98	0.00	0.34
小球腔菌属 <i>Leptosphaeria</i>	5.41	7.84	3.45	5.48
<i>Purpureocillium</i>	0.00	0.98	0.00	0.34
轮层炭壳菌属 <i>Pleospora</i>	0.00	0.98	0.00	0.34
绿僵菌属 <i>Metarhizium</i>	0.00	0.98	0.86	0.68
链格孢属 <i>Alternaria</i>	0.00	0.00	3.45	1.37

物多样性丰富,且各类群的分布较均匀,见表3。根据 Jaccard 相似性系数原理,当 C_s 介于0.00~0.25时为极不相似, C_s 介于0.25~0.50时为中等不相似, C_s 介于0.50~0.75时为中等相似, C_s 介于0.75~1.00时

为极为相似。从表3中可以看出,根和叶之间的群落组成为中等不相似($C_s=0.34$),而茎和叶($C_s=0.51$),根和茎($C_s=0.50$)之间的群落组成为中等相似。

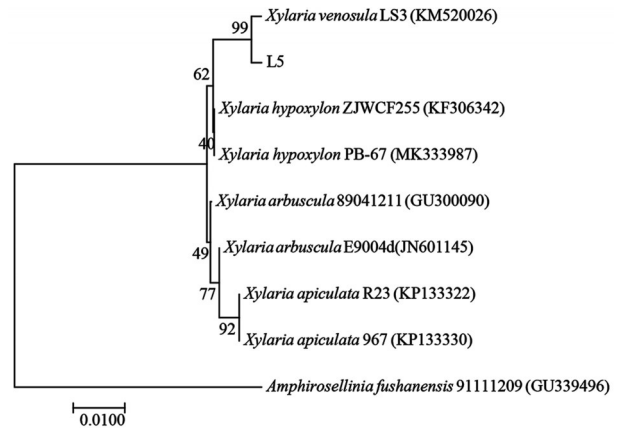
表3 白花曼陀罗根、茎、叶中内生真菌的多样性
Table 3 Diversity of endophytic fungi in roots, stems, and leaves of *Datura metel*

组织	菌株数/株	物种数/个	H'	E	C_s		
					根	茎	叶
根	74	14	1.23 ^c	0.47 ^b	1	0.50	-
茎	102	18	1.64 ^b	0.57 ^a	-	1	0.51
叶	116	21	1.82 ^a	0.60 ^a	0.34	-	1
总计	292	34	1.93	0.55	-	-	-

2.9 白花曼陀罗内生真菌对皮肤致病真菌的抑菌活性 本研究从白花曼陀罗根、茎和叶分离出的植物内生真菌挑选出35株代表性内生真菌菌株,对其抗皮肤致病真菌的活性进行筛选研究。对犬小孢子菌,黏性毛孢子菌,红毛癣菌、白色念珠菌具有抑制活性的菌株分别占总数的97.14%, 71.43%, 45.71%, 25.71%。100%的内生真菌都至少对一种皮肤致病菌具有抑制作用;可抑制犬小孢子菌,黏性毛孢子菌、红毛癣菌这3种皮肤致病真菌数量占总数的37.14%,其中菌株L5对它们具有显著的抑制活性,其抑制率分别为82.99%, 56.33%, 96.76%,均超过50%,在GenBank中Blast比对发现菌株L5的ITS序列与炭角菌属中的*Xylaria venosula* LS3 (KM520026.1)的一致性高达99.64%,系统发育分析发现其可与*X. venosula* LS3菌株序列形成一个支持度为99%的分支,因此将其鉴定为*X. venosula* L5;有6株(17.14%)对4种皮肤致病真菌均具有抑制活性,分别是*Fusarium* sp. R1, *Penicillium* sp. R5, *Aspergillus* sp. R7, *Metarhizium* sp. S18, *Diaporthe* sp. S19和*Glomerella* sp. L57。见图1,菌株来源和分子鉴定见表4,5。

3 讨论

本研究从白花曼陀罗中分离到34个属的内生真菌,内生真菌总的定殖率和分离率分别为74.35%和76.44%,总的多样性指数为1.93。白花曼陀罗内生真菌的定殖率与檀香、广藿香、南方红豆杉等同处于亚热带或热带区域的药用植物较为接近^[24-26],但要高于北方温带地区生长的药用植物,这可能与亚热带或热带地区降水多、湿度大,更有利于内生真菌在宿主植物体内侵染与定殖^[27-28];白花曼陀罗



本系统发育树是基于真菌的ITS rDNA数据,通过Neighbor-Joining方法建立; *Amphirosellinia fushanensis* 91111209 GU339496为外类群;发育树上的数字为1000次重复后的自展值,标尺长度表示遗传距离

图1 基于ITS rDNA序列构建的内生真菌菌株L5系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree based on ITS rDNA gene sequence of endophytic fungus strain L5

内生真菌的多样性指数比目前已报道的温带、亚热带或热带地区药用植物要高,这表明白花曼陀罗的内生真菌多样性更加丰富,这可能与其生长环境(土壤和空气)中真菌多样性比较丰富有关。白花曼陀罗叶部内生真菌定殖率、分离率和生物多样性指数均高于茎部和根部,这可能是由于其叶部的空间和养分更为充足,更加有利于内生真菌的侵染和定殖所致^[24]。本研究还发现白花曼陀罗根、茎和叶内生真菌种类存在差异:镰刀菌属为根部的优势类群, *Plectosphaerella*和镰刀菌属是茎部的优势类群,而叶部的主要类群为炭疽属和叶点霉菌,这表明不同组织部位独特微环境会导致内生真菌在不同部位分布存在一定差异^[29]。

皮肤真菌病是世界性的传染病,平均感染率10%~40%,主要由皮肤癣菌和念珠菌的感染致病。我国南方如广东、海南、福建、香港湿热地区是皮肤真菌病的高发区^[30]。真菌性皮肤病的治疗药物存在抑菌能力较差、起效慢、容易耐药、治疗效果不稳定、易复发等问题,总体治疗效果不理想。因此,寻找和开发新的抗皮肤真菌活性物质或药物显得十分必要。白花曼陀罗作为中药具有治疗皮肤瘙痒的功效,其提取物也被发现具有抗真菌、抗瘙痒等药理活性,在临床上常用于治疗银屑病^[13-15],但关于白花曼陀罗内生真菌的抗皮肤真菌活性的研究未见报道。本研究对35株代表性白花曼陀罗内生真菌的抗真菌活性分析发现,对犬小孢子菌,黏性毛孢子菌,红毛癣菌、白色念珠菌等皮肤致病真菌具

表4 代表性白花曼陀罗内生真菌的分子鉴定

Table 4 Molecular identification of endophytic fungi from *Datura metel*

菌株编号	来源	Genbank中最相似菌株	相似度/%	鉴定种类
R1	根	<i>Fusarium oxysporum</i> GQ121302.1	100.00	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>
R2	根	<i>Rhizoctonia solani</i> KX831968.1	99.51	丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>
R4	根	<i>Ascomycota</i> sp. BYSTW10 MG820068.1	98.44	子囊菌属 <i>Ascomycota</i>
R5	根	<i>Penicillium citrinum</i> MT361775.1	100.00	青霉属 <i>Penicillium</i>
R7	根	<i>Aspergillus sydowii</i> Clin19 MN871723.1	99.62	曲霉属 <i>Aspergillus</i>
R8	根	<i>Coprinellus disseminatus</i> KJ780770.1	99.85	鬼伞属 <i>Coprinus</i>
R11	根	<i>Pyrenochaeta</i> sp. 6316 JN903949.1	100.00	棘壳孢属 <i>Pyrenochaeta</i>
R14	根	<i>Acrocalymma vagum</i> KF494166.1	100.00	<i>Acrocalymma</i>
R21	根	<i>Setophoma terrestris</i> KX823407.1	100.00	<i>Setophoma</i>
R23	根	<i>Nectria haematococca</i> LVPEI.H134 10 JX868612.1	100.00	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>
R33	根	<i>Macrophomina phaseolina</i> MK757624.1	99.64	壳孢属 <i>Macrophomina</i>
R55	根	<i>Eutypella</i> sp. BCRC FU30246 KT868952.1	99.64	弯孢聚壳属 <i>Eutypella</i>
S4	茎	<i>Sordariomycetes</i> sp. 18TP391 MT184057.1	99.61	炭垫菌属 <i>Nemania</i>
S6	茎	<i>Didymella bellidis</i> MK795223.1	100.00	<i>Didymella</i>
S8	茎	<i>Purpureocillium lilacinum</i> ercha17 MK290901.1	99.82	<i>Purpureocillium</i>
S10	茎	<i>Pleosporales</i> sp. 12223 KF019265.1	99.56	格孢腔菌属 <i>Pleospora</i>
S12	茎	<i>Phomopsis asparagi</i> sp. MJ17KM203584.1	79.35	拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>
S14	茎	<i>Phlebia subserialis</i> WZ-90 MN856249.1	99.00	射脉菌属 <i>Phlebia</i>
S15	茎	<i>Microporus xanthopus</i> KM985667.1	99.61	小孔菌属 <i>Microporus</i>
S17	茎	<i>Fusarium incarnatum</i> LS186 MN871572.1	100.00	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>
S18	茎	<i>Metarhizium anisopliae</i> MaH57Z01 MK952374.1	100.00	绿僵菌属 <i>Metarhizium</i>
S19	茎	<i>Diaporthe goulteri</i> GLY18 MF356583.1	98.89	间座壳属 <i>Diaporthe</i>
S20	茎	<i>Plectosphaerella cucumerina</i> WZ-152 MN856294.1	99.61	<i>Plectosphaerella</i>
S22	茎	<i>Dothideomycetes</i> sp. GQ153092.1	100.00	座囊菌纲 <i>Dothideomycetes</i>
S23	茎	<i>Periconia byssoidea</i> MK446311.1	99.80	黑团孢属 <i>Periconia</i>
S26	茎	<i>Aspergillus flavus</i> meijun5 KR076752.1	99.81	曲霉菌 <i>Aspergillus</i>
L1	叶	<i>Moesziomyces aphidis</i> MK994026.1	100.00	莫氏黑粉菌属 <i>Moesziomyces</i>
L5	叶	<i>Xylaria venosula</i> LS3 KM520026.1	99.64	炭角菌属 <i>Xylaria</i>
L40	叶	<i>Peyronellaea glomerata</i> JX573325.1	100.00	派伦霉属 <i>Peyronellaea</i>
L43	叶	<i>Botryosphaeria dothidea</i> KF516940.1	100.00	葡萄座腔菌属 <i>Botryosphaeria</i>
L56	叶	<i>Phyllosticta</i> sp. KY940507.1	100.00	叶点霉属 <i>Phyllosticta</i>
L57	叶	<i>Glomerella acutata</i> CMU11 GQ924900.1	100.00	小丛壳属 <i>Glomerella</i>
L65	叶	<i>Cercospora</i> sp. VC38-3 JQ002573.1	99.80	尾孢属 <i>Cercospora</i>
L67	叶	<i>Daldinia eschscholtzii</i> MF040202.1	99.81	轮层炭壳菌属 <i>Daldinia</i>
L71	叶	<i>Colletotrichum brevisporum</i> LC379210.1	98.91	炭疽属 <i>Colletotrichum</i>

有抑制活性的菌株分别占总数的97.14%, 71.43%, 45.71%, 25.71%;全部菌株对至少对一种皮肤真菌具有抑制活性;有17.14%的菌株对4种皮肤致病真菌均具有抑制活性;对犬小孢子菌,黏性毛孢子菌、红毛癣菌均具抑制活性的菌株占到总数的37.14%,

其中菌株 *Xylaria venosula* L5 对 Q 都具有很强的抑制活性,其抑制率分别 82.99%, 56.33%, 96.76%。表明白花曼陀罗内生真菌蕴含丰富的抗皮肤致病真菌的次生代谢产物。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

表 5 白花曼陀罗内生真菌发酵液的抗皮肤真菌活性

Table 5 Antibacterial activities of endophytic fungi from *D. metel*

菌株	抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)/%			抑菌活性
	犬小孢子菌 <i>Microsporum canis</i>	黏性毛孢子菌 <i>Trichosporon mucoides</i>	红毛癣菌 <i>Trichophyton rubrum</i>	白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>
<i>Fusarium</i> sp. R1	6.80±0.02	0.44±0.01	19.77±0.02	+
<i>Rhizoctonia</i> sp. R2	12.93±0.01	55.90±0.14	84.30±0.01	-
<i>Ascomycota</i> sp. R4	8.84±0.01	26.20±0.01	62.79±0.06	-
<i>Penicillium</i> sp. R5	6.12±0.01	8.73±0.01	1.16±0.01	++
<i>Aspergillus</i> sp. R7	3.06±0.02	10.04±0.02	1.74±0.03	+++
<i>Coprinellus</i> sp. R8	27.21±0.03	6.99±0.03	-15.12±0.06	-
<i>Pyrenochaeta</i> sp. R11	5.44±0.00	8.73±0.03	12.56±0.06	-
<i>Acrocalymma</i> sp. R14	4.42±0.00	-0.44±0.03	-4.65±0.02	++
<i>Setophoma</i> sp. R21	10.88±0.02	4.37±0.03	-15.12±0.00	-
<i>Nectria</i> sp. R23	68.37±0.10	-	78.49±0.03	-
<i>Macrophomina</i> sp. R33	86.39±0.00	-	-	-
<i>Eutypella</i> sp. R55	1.70±0.02	10.92±0.03	-14.53±0.02	-
<i>Nemania</i> sp. S4	6.12±0.01	17.90±0.02	17.44±0.00	-
<i>Didymella</i> sp. S6	47.62±0.03	15.28±0.01	-0.58±0.00	-
<i>Purpureocillium</i> sp. S8	4.08±0.01	-3.49±0.02	1.16±0.01	++
<i>Pleospora</i> sp. S10	3.06±0.02	13.97±0.01	-19.77±0.00	-
<i>Phomopsis</i> sp. S12	18.37±0.03	4.80±0.10	43.60±0.01	-
<i>Phlebia</i> sp. S14	82.31±0.00	-	-	-
<i>Microporus</i> sp. S15	2.04±0.00	4.37±0.00	-23.26±0.19	-
<i>Fusarium</i> sp. S17	7.82±0.02	12.23±0.01	-25.00±0.08	-
<i>Metarhizium</i> sp. S18	7.14±0.01	30.13±0.00	18.02±0.17	+
<i>Diaporthe</i> sp. S19	2.38±0.01	11.35±0.01	16.28±0.07	+++
<i>Plectosphaerella</i> sp. S20	47.62±0.00	-4.80±0.01	-20.35±0.01	+
<i>Dothideomycetes</i> sp. S22	19.05±0.01	-4.37±0.03	9.30±0.02	-
<i>Periconia</i> sp. S23	6.12±0.01	10.92±0.02	-20.93±0.00	-
<i>Aspergillus</i> sp. S26	6.12±0.05	11.35±0.05	-13.37±0.03	-
<i>Moesziomyces</i> sp. L1	7.14±0.03	89.08±0.11	6.98±0.47	-
<i>Xylaria</i> sp. L5	82.99±0.01	56.33±0.00	96.76±0.09	-
<i>Peyronellaea</i> sp. L40	81.29±0.00	-	-	-
<i>Botryosphaeria</i> sp. L43	86.05±0.06	-	-	-
<i>Phyllosticta</i> sp. L56	-2.38±0.01	10.92±0.01	-20.93±0.01	-
<i>Glomerella</i> sp. L57	3.06±0.00	31.44±0.04	19.77±0.00	+
<i>Cercospora</i> sp. L65	85.37±0.09	76.42±0.00	-	-
<i>Daldinia</i> sp. L67	37.76±0.28	21.45±0.06	-15.12±0.00	-
<i>Colletotrichum</i> sp. L71	18.37±0.01	-	-	-

注: - 无抑菌活性; + 表示抑菌圈直径(d)<1 cm; ++ 表示 1 cm≤d<1.5 cm; +++ 表示 d≥1.5 cm。

[参考文献]

[1] 郭顺星, 药用植物内生真菌研究现状和发展趋势[J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 1-13.

[2] LI S, ZHANG X, WANG X H, et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity[J]. Eur J Med Chem, 2018, 156: 316-343.

- [3] YU J, WU Y, HE Z, et al. Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Camellia oleifera*[J]. Mycobiology, 2018, 46(2): 85-91.
- [4] SHAN T, TIAN J, WANG X, et al. Bioactive spirobisnaphthalenes from the endophytic fungus *Berkleasium* sp. [J]. J Nat Prod, 2014, 77(10): 2151-2160.
- [5] VENIERAKI A, DIMOU M, KATINAKIS P. Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts[J]. HPPJ, 2017, 10(2): 51-66.
- [6] MANGANYI M C, ATEBA C N. Untapped potentials of endophytic fungi: A review of novel bioactive compounds with biological applications [J]. Microorganisms, 2020, 8(12): 1934.
- [7] KORNSAKULKARN J, CHOOWONG W, RACHTAWEE P, et al. Bioactive hydroanthraquinones from endophytic fungus *Nigrospora* sp. BCC47789 [J]. Phytochem Lett, 2018, 24: 46-50.
- [8] UZOR P F, ODIMEGWU D C, EBRAHIM W, et al. Anti-respiratory syncytial virus compounds from two endophytic fungi isolated from nigerian medicinal plants[J]. Drug Res, 2016, 66(10): 527-531.
- [9] PRIHANTINI A I, TACHIBANA S. Antioxidant compounds produced by *Pseudocercospora* sp. ESL 02, an endophytic fungus isolated from *Elaeocarpus sylvestris*[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2017, 7(2): 110-115.
- [10] 武艳霜, 陆悦, 朱作斌, 等. 药用植物中具有抗真菌活性的内生真菌及其次级代谢产物的研究[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2019, 40(4): 309-315.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [12] 井佳楠, 吕邵娃, 王秋红, 等. 洋金花化学成分和药理作用及临床应用研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(19): 3513-3521.
- [13] AL-SNAFI A E. Medical importance of *Datura fastuosa* (syn: *Datura metel*) and *Datura stramonium*- A review[J]. IOSRPHR, 2017, 7(2): 43-58.
- [14] MONIRA K M, MUNAN S M. Review on *Datura metel*: A potential medicinal plant[J]. GJRMI, 2012, 1(4): 123 - 132.
- [15] 张宏利, 杨学军, 刘文国, 等. 曼陀罗化学成分与生物活性研究现状及展望[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(2): 98-102.
- [16] LIU Y, JING H B, LIU Y, et al. New indole alkaloids from the seeds of *Datura metel* L [J]. Fitoterapia, 2020, 146: 104726.
- [17] TAN J, LIU Y, CHENG Y, et al. New withanolides with anti-inflammatory activity from the leaves of *Datura metel* L. [J]. Bioorg Chem, 2020, 95: 103541
- [18] LIU Y, GUAN W, LU Z, et al. New sesquiterpenoids from the stems of *Datura metel* L [J]. Fitoterapia, 2019, 134: 417-421.
- [19] YANG B Y, LUO Y M, LIU Y, et al. New lignans from the roots of *Datura metel* L [J]. Phytochem Lett, 2018, 28: 8-12.
- [20] 邓祖军, 曹理想, 周世宁. 红树林内生真菌的分离及代谢产物生物活性的初步研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2010, 49(2): 100-104.
- [21] DENG Z, ZHANG R, SHI Y, et al. Characterization of Cd⁺, Pb⁺, Zn⁺ resistant endophytic *Lasiodiplodia* sp. MXSF31 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils [J]. Environ Sci Pollut Res, 2014, 21(3): 2346-2357.
- [22] LIU J K, HYDE K D, JONES E B G, et al. Fungal diversity notes 1-110: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species [J]. Fungal Diversity, 2015, 72(1): 1-197.
- [23] 赵瑞芳, 张程成, 王增辉, 等. 忍冬内生真菌的分离鉴定及其抑菌活性初探[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(11): 2064-2067.
- [24] 谢华蓉, 徐在超, 刘军, 等. 广藿香内生真菌多样性及其对青枯菌的拮抗活性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1171-1181.
- [25] 刘军, 刘艳明, 徐在超, 等. 檀香内生真菌多样性及其抗菌与促生特性的研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17): 3477-3483.
- [26] 臧威, 孙翔, 孙剑秋, 等. 南方红豆杉内生真菌的多样性与群落结构[J]. 应用生态学报, 2014, 25(7): 2071-2078.
- [27] 潘田扬, 殷照青, 李仙杰, 等. 入侵植物紫茎泽兰叶内生真菌多样性研究[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(5): 73-78.
- [28] PORRAS-ALFARO A, BAYMAN P. Hidden fungi emergent properties: endophytes and microbiomes [J]. Annu Rev Phytopathol, 2011, 49(1): 291-315.
- [29] THONGSANDEE W, MATSYDA Y, ITO S. Temporal variations in endophytic fungal assemblages of *Ginkgo biloba* L. [J]. J For Res, 2012, 17(2): 213-218.
- [30] 杨得坡, CHAUMONT JEAN-PIERRE, MILLET JOLLE. 藿香和广藿香挥发油对皮肤癣菌和条件致病真菌的抑制作用[J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(1): 9-11.

[责任编辑 顾雪竹]