

文章编号 1672-6634(2024)03-0080-10

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2024020005

大叶梅属地衣内生真菌的多样性及抗菌活性研究

郭堂丽, 武玉岩, 崔 璨, 赵 欣

(聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252059)

摘 要 运用组织分离法对采自江西井冈山及福建武夷山自然保护区的大叶梅属(*Parmotrema*)地衣进行内生真菌的分离、培养及纯化。利用形态学及分子生物学特征对其进行分类鉴定;用乙酸乙酯萃取菌株液体发酵物,旋蒸获得粗提物,并通过打孔法检测地衣内生真菌提取物对以下菌株——变形杆菌*Proteus* sp. MC110、表皮葡萄球菌*Staphylococcus epidermidis* TC149、大肠杆菌*Escherichia coli* ATCC25922、枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* CS136 和白色念珠菌*Candida albicans* TC152 的抑菌活性。结果显示,从4种大叶梅属地衣中分离获得75株内生真菌,ITS测序确定了29个种级分类单元,隶属于2门,4纲,7目,10科,14属。其中,橘色黑孢霉*Nigrospora aurantiaca* 抑菌效果良好,可作为药物研发的良好生物资源,具有潜在的开发价值。

关键词 地衣内生真菌;物种多样性;抗菌活性;大叶梅属

中图分类号 Q93

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



The Diversity and Antimicrobial Activity of Endolichenic Fungi from *Parmotrema*

GUO Tangli, WU Yuyan, CUI Can, ZHAO Xin

(School of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract Endolichenic fungi were isolated, cultured and purified from *Parmotrema* spp. collected from Jinggangshan of Jiangxi Province and Wuyi Mountain National Nature Reserve of Fujian Province by tissue isolation method. These fungi were identified based on morphological and molecular data; the liquid-fermented products of strains were extracted with ethyl acetate and then the crude extracts were obtained through rotary evaporation, antimicrobial activity of the extracts against the following strains:—*Proteus* sp. MC110, *Staphylococcus epidermidis* TC149, *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus subtilis* CS136 and *Candida albicans* TC152 were tested by punch method. The results showed that 75 strains of endolichenic fungi were isolated from four species of *Parmotrema*, and ITS sequences were used in the identification of 29 species-level taxa, belonging to 2 phyla, 4 classes, 7 orders, 10 families and 14 genera. Among them,

收稿日期: 2024-02-23

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2023MC105);山东省自然科学基金青年项目(ZR2023QC245);国家自然科学基金应急管理项目(31750001)资助

通信作者: 赵欣,女,汉族,博士,副教授,研究方向:真菌资源分类与系统演化,E-mail:zhaoxin1@lzu.edu.cn.

Nigrospora aurantiaca shows good antibacterial effect, which can be used as a good bioresource for pharmaceutical purpose and has potential research value.

Key words endolichenic fungi; species diversity; antimicrobial activity; *Parmotrema*

0 引言

国内外对内生真菌的研究主要集中在高等植物中,对地衣内生真菌的研究较少。事实上,内生真菌作为一个丰富的生物类群,也广泛存在于地衣组织中。地衣是共生真菌和光合共生物构成的共生体,其中的共生真菌以子囊菌为主,少数为担子菌,光合共生物为蓝藻或绿藻。构成地衣的共生真菌又称为地衣型真菌,而存在于地衣体内的非地衣型真菌,被称为地衣内生真菌^[1]。地衣内生真菌依赖地衣体中的光合共生物为其提供碳源,与植物内生真菌相似,不会引起宿主明显的病害特征^[2-4]。地衣内生真菌的种类和数量非常丰富,在与宿主长期的协同进化过程中除了产生与宿主相同或相似的活性物质外,还衍生出独特的代谢途径,产生大量结构复杂、骨架新颖、具有丰富生物活性的化合物^[5,6],如生物碱类、聚酮类、萜类、醌类等化合物,成为重要的天然药物化学来源^[7-12]。

大叶梅属 *Parmotrema* A. Massal. 地衣属于子囊菌门 Ascomycota, 茶渍纲 Lecanoromycetes, 茶渍目 Lecanorales, 梅衣科 Parmeliaceae。该属地衣的主要特征是地衣体多为大型叶状地衣,直径可达 30 cm,无假杯点,通常具缘毛,其下表面周缘裸露区通常宽大于 5 mm,假根不分枝且稀疏;子囊盘为表面生,茶渍型,通常有柄,盘面穿孔或不穿孔,果托表面光滑至皱褶;子囊 8 孢;子囊孢子无色,椭圆形,偶呈肾形或亚球形,较大,10~37 μm $\times$ 6~18 μm ;分生孢子器常见^[13,14]。大叶梅属是梅衣科中次于黄梅属(*Xanthoparmelia* (Vain.) Hale)的第二大属,包括约 350 种,主要分布在热带、亚热带区域。中国大陆已知 43 种,主要分布在长江以南和西藏南部喜马拉雅地区^[13]。鉴于该属地衣广泛的地理分布、便于采集的生长特性、充足的生物量等优势,选取该属为研究对象。

本研究以江西井冈山及福建武夷山地区的大叶梅属地衣为材料,进行地衣内生真菌的分离鉴定、纯化保存和拮抗真菌及细菌的活性菌株筛选,旨在挖掘大叶梅属内生真菌的多样性,有助于深入了解地衣微生物群落的功能,为挖掘抗菌药物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本。实验材料是 2023 年采自江西井冈山和福建武夷山自然保护区的 12 份大叶梅属地衣标本,从中分离出 75 株地衣内生真菌。大叶梅属地衣标本和分离的菌株均保存于聊城大学生命科学学院菌物标本馆(LCUF)。

1.1.2 培养基。PDA 培养基(用于地衣内生真菌的分离纯化培养),PDB 培养基(用于菌株发酵扩大培养),LB 固体、LB 液体培养基及 MH 培养基(用于抗菌活性实验)。

1.1.3 供试菌株。变形杆菌 *Proteus* sp. MC110、表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* TC149、大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* CS136 和白色念珠菌 *Candida albicans* TC152。

1.1.4 仪器和试剂。洁净工作台(苏净安泰 SW-CJ-2FD)、体视显微镜(OLYMPUS SZX16)、光学显微镜(OLYMPUS BX53)、生化培养箱(宁波北角 NP-SPX-80)、PCR 仪(Bio-Rad C1000Touch)、凝胶图像分析系统(上海培清 JS-780)、智能恒温培养振荡器(天津欧诺 HNYC-203T)、立式自动压力蒸汽灭菌器(厦门致微 AX124ZH)、旋转蒸发仪(广州艾卡 IKA/RV3);Sigma-Aldrich REDEExtract-N-AmpTM 植物 PCR 试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 地衣内生真菌的分离纯化。取地衣体自来水冲洗 30 min 后用无菌手术刀切成 5 mm $\times$ 5 mm 左右

的小块,用75%乙醇表面消毒1 min,再用4%次氯酸钠溶液浸泡10 min,最后用无菌水冲洗3~4次。在无菌条件下,用镊子夹取上述处理过的样品,放在PDA固体平板中,每皿5块,使其表面充分接触培养基^[15]。为了确保灭菌方法的有效性,将用蒸馏水的最终洗涤液倾倒在3个无菌培养皿中的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)上作为对照。PDA平板上任何微生物菌落的生长表明地衣表面上存在污染物,即灭菌不成功。在25℃恒温培养箱中培养5~7 d,每日观察,在菌丝从地衣体组织块周围长出菌丝后,从边缘挑取菌丝移至另一PDA平板上进行纯化。进行多次纯化,直至得到单一菌落;将纯化好的菌株接种于PDA斜面培养基,保存于4℃冰箱^[18]。

1.2.2 菌株的形态特征观察及分子鉴定。(1)地衣内生真菌的形态观察:将纯化的菌株接种到PDA固体培养基,25℃培养5~7 d,观察菌落正反面特征并拍照记录。挑取菌丝,制备水装片于显微镜下观察菌丝形态。菌株菌丝的粗细、颜色、菌落形状及孢子的形态特征。(2)DNA提取,ITS序列的扩增与测序:采用Sigma-Aldrich REDExtract-N-Amp™试剂盒按照使用说明进行地衣内生真菌基因组的提取^[19]。以内生真菌的总DNA为模板,使用真菌通用引物ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增^[20,21]。PCR反应体系为ddH₂O 19 μL、2×Taq PCR MasterMix 25 μL、上游引物2 μL、下游引物2 μL、DNA模板2 μL,共50 μL体系。PCR反应过程:预变性95℃5 min;94℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸1 min,34个循环;最后72℃延伸10 min。目的产物经1%琼脂糖凝胶电泳确认后由北京擎科生物科技股份有限公司测序。(3)系统发育树的构建:测序结果在NCBI数据库中进行Blast同源比对,下载相似序列。选取毛霉菌门伞枝霉属*Umbelopsis* Amos & H. L. Barnett物种作为外类群^[15,22]。利用Geneious v9.0.2软件对所测得的两条互补序列进行拼接组装,使用MAFFT v.7并选择“L-INS-i”运算法则进行多序列比对^[23]。比对后的序列矩阵在首尾处进行手动删减。使用CIPRES科学门户网站(<http://www.phylo.org/portal2/>)采用最大似然法(Maximum likelihood, ML)进行系统发育树构建。采用RAxML-HPC v.8进行最大似然自举分析^[24],使用默认参数,NSF XSEDE资源,对每个节点以假设1 000个复制值来评价自展值。生成的系统发育树在Figtree v1.4.2下可视化。ML自举值(BS)大于等于70%的被认为显著支持。

1.2.3 菌株发酵液粗提物的制备。将4℃冰箱保存的菌株培养7 d后从PDA固体培养基接种到PDB液体培养基,两天后按10%接菌量转接到新的PDB培养基中,在25℃、150 r/min条件下振荡培养5~7 d。真菌培养物用乙酸乙酯浸泡提取24 h,然后过滤除去菌丝球。收集有机层,合并萃取液利用旋转蒸发仪减压浓缩得粗提物^[25]。粗提物用甲醇溶解,制成100 μg/mL。

1.2.4 抗菌活性实验。(1)供试菌株的活化:将供试菌株在LB平板上三区划线37℃培养出单克隆菌落,挑取单克隆菌落接种至LB液体培养基,37℃、150 r/min振荡培养4 h,至OD₆₀₀值为0.6~0.8^[26]。(2)抗菌活性筛选:在超净工作台,将活化好的菌株用涂布棒将其均匀涂布在MH平板上。在平板中央打8 mm的孔,移液枪吸取100 μL待测粗提物溶液于孔内,甲醇作为空白对照,平行3次实验。将平板置于37℃恒温培养箱培养24 h观察结果。孵育后,使用直尺测量抑制区的直径。按照Quinto和Santos方案,将抑制区(ZOI)分类为无活性(小于10 mm ZOI)、部分活性(10~12 mm ZOI)、活性(13~19 mm ZOI)和非常活性(大于19 mm ZOI)^[27]。

2 结果与分析

2.1 地衣内生真菌的分离与纯化

利用组织分离法将无菌处理后的12份大叶梅属地衣体组织块接种到PDA固体培养基上,分离纯化共得到75株内生真菌。综合形态学及化学将地衣标本鉴定为4个物种,相关采集信息以及分离得到的内生真菌数量如表1所示。

表1 地衣标本采集信息及所分离的菌株数量

Table 1 The information of voucher specimens and numbers of the isolated endolichenic fungal strains

地衣物种名称 Species	标本采集信息 Information of specimens	标本采集号 Voucher No.	菌株数量 No. of stains	菌株编号 Strain No.
<i>Parmotrema cetratum</i>	江西 井冈山市,茨坪镇,黄龙瀑,850 m, 树皮,2023. 07. 14	JX231314	3	4064-2/3/4
<i>Parmotrema clavuliferum</i>	福建 南平市,武夷山市,大安村垅空,720 m, 树皮,2023. 06. 03	FJ230020	11	4062-1/2/3/4/6/7/8/ 9/10/11/13
<i>Parmotrema clavuliferum</i>	福建 南平市,武夷山市,星村镇,桐木村, 关坪,1 040 m,树皮,2023. 06. 08	FJ230410	12	4071-2/5/6/8/9/11/12/ 14/16/17/18/20
<i>Parmotrema tinctorum</i>	江西 井冈山市,茅坪镇,龙江书院,460 m, 树皮,2023. 07. 16	JX231500	6	4061-1/2/4/5/6/7
<i>Parmotrema tinctorum</i>	江西 吉安市,井冈山市,茅坪镇,八角楼,345 m, 树皮,2023. 07. 16	JX231519	2	4065-1/2
<i>Parmotrema tinctorum</i>	江西 吉安市,井冈山市,茅坪镇,八角楼,345 m, 树皮,2023. 07. 16	JX231522	9	4067-1/10/11/12/13/ 14/15/16/17
<i>Parmotrema tinctorum</i>	江西 井冈山市,茅坪镇,象山庵,460 m, 树皮,2023. 07. 16	JX231492	10	4069-1/2/5/6/7/8/ 9/10/11/12
<i>Parmotrema tinctorum</i>	江西 井冈山市,茨坪镇,大井,870 m, 树皮,2023. 07. 15	JX231489	6	4072-3/4/5/6/7/8
<i>Parmotrema tinctorum</i>	江西 吉安市,井冈山市,茅坪镇,八角楼,345 m, 树皮,2023. 07. 16	JX231520	7	4073-1/2/3/4/5/6/8
<i>Parmotrema</i> sp.	江西 吉安市,井冈山市,茅坪镇,八角楼,345 m, 树皮,2023. 07. 16	JX231521	2	4063-2/3
<i>Parmotrema</i> sp.	福建 南平市,武夷山市,大溪源, 程墩村,485 m,石生,2023. 06. 04	FJ230064	6	4070-1/2/3/4/5/7
<i>Parmotrema</i> sp.	福建 南平市,武夷山市,星村镇,桐木村, 燕子窠生态茶园示范基地,225 m,茶树,2023. 06. 10	FJ230920	1	4079-1

2.2 大叶梅属地衣内生真菌的物种多样性及组成分析

将分离获得的 75 株内生真菌进行 DNA 提取、PCR 扩增和序列测定,获得其 nrDNA-ITS 序列,并全部上传至 GenBank(表 2)。

表2 大叶梅属地衣内生真菌的物种组成

Table 2 The compositions of endolichenic fungi associated with 4 species of *Parmotrema*

序号 Serial No.	菌株编号 Strain No.	种名或分类单元 Species or taxon	序列登录号 GenBank Acc. No.	宿主 Host species	地点 Locality
1	4061-1	<i>Annulohypoxylon stygium</i>	PP109160	<i>P. tinctorum</i>	江西
2	4069-9	<i>Annulohypoxylon stygium</i>	PP109161	<i>P. tinctorum</i>	江西
3	4069-11	<i>Annulohypoxylon stygium</i>	PP109162	<i>P. tinctorum</i>	江西
4	4069-8	<i>Annulohypoxylon stygium</i>	PP109163	<i>P. tinctorum</i>	江西
5	4069-12	<i>Annulohypoxylon stygium</i>	PP109164	<i>P. tinctorum</i>	江西
6	4061-2	<i>Hypoxylon vinosopulvinatum</i>	PP109165	<i>P. tinctorum</i>	江西
7	4070-7	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	PP109166	<i>P.</i> sp.	福建
8	4071-12	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	PP109167	<i>P. clavuliferum</i>	福建

续表 2 大叶梅属地衣内生真菌的物种组成

Table 2 The compositions of endolichenic fungi associated with 4 species of *Parmotrema*

序号 Serial No.	菌株编号 Strain No.	种名或分类单元 Species or taxon	序列登录号 GenBank Acc. No.	宿主 Host species	地点 Locality
9	4072-8	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	PP109168	<i>P. tinctorum</i>	江西
10	4067-12	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	PP109169	<i>P. tinctorum</i>	江西
11	4069-10	<i>Daldinia albofibrosa</i>	PP109170	<i>P. tinctorum</i>	江西
12	4071-14	<i>Daldinia childiae</i>	PP109171	<i>P. clavuliferum</i>	福建
13	4071-17	<i>Daldinia childiae</i>	PP109172	<i>P. clavuliferum</i>	福建
14	4061-4	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109173	<i>P. tinctorum</i>	江西
15	4064-4	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109174	<i>P. cetratum</i>	江西
16	4061-7	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109175	<i>P. tinctorum</i>	江西
17	4064-2	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109176	<i>P. cetratum</i>	江西
18	4062-11	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109177	<i>P. cetratum</i>	江西
19	4073-5	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109178	<i>P. tinctorum</i>	江西
20	4071-8	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109179	<i>P. clavuliferum</i>	福建
21	4062-6	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109180	<i>P. clavuliferum</i>	福建
22	4067-13	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109181	<i>P. tinctorum</i>	江西
23	4072-4	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109182	<i>P. tinctorum</i>	江西
24	4063-2	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109183	<i>P. sp.</i>	江西
25	4067-15	<i>Hypoxylon investiens</i>	PP109184	<i>P. tinctorum</i>	江西
26	4072-6	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	PP109185	<i>P. tinctorum</i>	江西
27	4072-7	<i>Hypoxylon investiens</i>	PP109186	<i>P. tinctorum</i>	江西
28	4067-14	<i>Hypoxylon pulvicidum</i>	PP109187	<i>P. tinctorum</i>	江西
29	4069-6	<i>Hypoxylon pulvicidum</i>	PP109188	<i>P. tinctorum</i>	江西
30	4061-5	<i>Nemania diffusa</i>	PP109189	<i>P. tinctorum</i>	江西
31	4061-6	<i>Nemania diffusa</i>	PP109190	<i>P. tinctorum</i>	江西
32	4073-2	<i>Nemania diffusa</i>	PP109191	<i>P. tinctorum</i>	江西
33	4062-9	<i>Nemania diffusa</i>	PP109192	<i>P. clavuliferum</i>	福建
34	4062-10	<i>Nemania diffusa</i>	PP109193	<i>P. clavuliferum</i>	福建
35	4062-7	<i>Nemania diffusa</i>	PP109194	<i>P. clavuliferum</i>	福建
36	4072-5	<i>Nemania</i> sp. 1	PP109195	<i>P. tinctorum</i>	江西
37	4062-13	<i>Nemania</i> sp. 1	PP109196	<i>P. clavuliferum</i>	福建
38	4070-2	<i>Nemania</i> sp. 1	PP109197	<i>P. sp.</i>	福建
39	4071-6	<i>Nemania</i> sp. 1	PP109198	<i>P. clavuliferum</i>	福建
40	4062-3	<i>Xylaria flabelliformis</i>	PP109199	<i>P. clavuliferum</i>	福建
41	4071-16	<i>Xylaria flabelliformis</i>	PP109200	<i>P. clavuliferum</i>	福建
42	4069-5	<i>Xylaria flabelliformis</i>	PP109201	<i>P. tinctorum</i>	江西
43	4070-3	<i>Xylaria flabelliformis</i>	PP109202	<i>P. sp.</i>	福建
44	4071-11	<i>Xylaria flabelliformis</i>	PP109203	<i>P. clavuliferum</i>	福建
45	4071-2	<i>Xylaria flabelliformis</i>	PP109204	<i>P. clavuliferum</i>	福建

续表 2 大叶梅属地衣内生真菌的物种组成

Table 2 The compositions of endolichenic fungi associated with 4 species of *Parmotrema*

序号 Serial No.	菌株编号 Strain No.	种名或分类单元 Species or taxon	序列登录号 GenBank Acc. No.	宿主 Host species	地点 Locality
46	4072-3	<i>Xylaria flabelliformis</i>	PP109205	<i>P. tinctorum</i>	江西
47	4067-16	<i>Xylaria flabelliformis</i>	PP109206	<i>P. tinctorum</i>	江西
48	4071-9	<i>Xylaria cubensis</i>	PP109207	<i>P. clavuliferum</i>	福建
49	4073-8	<i>Xylaria cubensis</i>	PP109208	<i>P. tinctorum</i>	江西
50	4073-1	<i>Nemania primolutea</i>	PP109209	<i>P. tinctorum</i>	江西
51	4073-4	<i>Nemania primolutea</i>	PP109210	<i>P. tinctorum</i>	江西
52	4067-17	<i>Xylaria arbuscula</i>	PP109211	<i>P. tinctorum</i>	江西
53	4069-7	<i>Xylaria arbuscula</i>	PP109212	<i>P. tinctorum</i>	江西
54	4067-11	<i>Xylaria arbuscula</i>	PP109213	<i>P. tinctorum</i>	江西
55	4062-2	<i>Nodulisporium</i> sp.	PP109214	<i>P. clavuliferum</i>	福建
56	4064-3	<i>Nodulisporium</i> sp.	PP109215	<i>P. cetratum</i>	江西
57	4070-4	<i>Nodulisporium</i> sp.	PP109216	<i>P. sp.</i>	福建
58	4070-5	<i>Nodulisporium</i> sp.	PP109217	<i>P. sp.</i>	福建
59	4065-1	<i>Nodulisporium</i> sp.	PP109218	<i>P. tinctorum</i>	江西
60	4062-4	<i>Nemania</i> sp. 2	PP109219	<i>P. clavuliferum</i>	福建
61	4062-1	<i>Nemania</i> sp. 3	PP109220	<i>P. clavuliferum</i>	福建
62	4073-6	<i>Nemania</i> sp. 4	PP109221	<i>P. tinctorum</i>	江西
63	4065-2	<i>Nigrospora</i> sp. 1	PP109222	<i>P. tinctorum</i>	江西
64	4067-10	<i>Nigrospora</i> sp. 2	PP109223	<i>P. tinctorum</i>	江西
65	4063-3	<i>Nigrospora</i> sp. 3	PP109224	<i>P. sp.</i>	江西
66	4067-1	<i>Nigrospora aurantiaca</i>	PP109225	<i>P. tinctorum</i>	江西
67	4069-1	<i>Neopestalotiopsis foedans</i>	PP109226	<i>P. tinctorum</i>	江西
68	4073-3	<i>Neopestalotiopsis foedans</i>	PP109227	<i>P. tinctorum</i>	江西
69	4079-1	<i>Biscogniauxia</i> sp.	PP109228	<i>P. sp.</i>	福建
70	4071-18	<i>Biscogniauxia</i> sp.	PP109229	<i>P. clavuliferum</i>	福建
71	4062-8	<i>Coniochaeta</i> sp.	PP109230	<i>P. clavuliferum</i>	福建
72	4071-5	<i>Sordariomycetes</i> sp.	PP109231	<i>P. clavuliferum</i>	福建
73	4069-2	<i>Hannaella sinensis</i>	PP109232	<i>P. tinctorum</i>	江西
74	4071-20	<i>Aspergillus</i> sp.	PP109233	<i>P. clavuliferum</i>	福建
75	4070-1	<i>Agaricales</i> sp.	PP109234	<i>P. sp.</i>	福建

通过 NCBI 数据库网站 Blast 在线比对搜索同源序列,并进行分子系统学分析,确定了 29 个种级分类单元,分属于 2 个门,4 个纲,7 个目,10 个科,14 个属(表 2,图 1)。

27 个种级分类单元(73 个菌株,97. 33%)隶属于子囊菌门 Ascomycota,其中,26 个种级分类单元为粪壳菌纲 Sordariomycetes(72 个菌株,96%),另外 1 个为散囊菌纲 Eurotiomycetes 中的曲霉属 *Aspergillus*; 有 2 种(2 个菌株)隶属于担子菌门,分属于伞菌纲和银耳纲。在目级水平上,炭角菌目 Xylariales 占明显优势(68 个菌株,90. 67%),该目中菌株数量较多的为炭团菌属 *Hypoxyton* (17 株,22. 67%)、碳垫菌属 *Nemania* (15 株,20%)和炭角菌属 *Xylaria* (13 株,17. 33%)。分离得到的内生真菌各属的数量如图 2 所示。

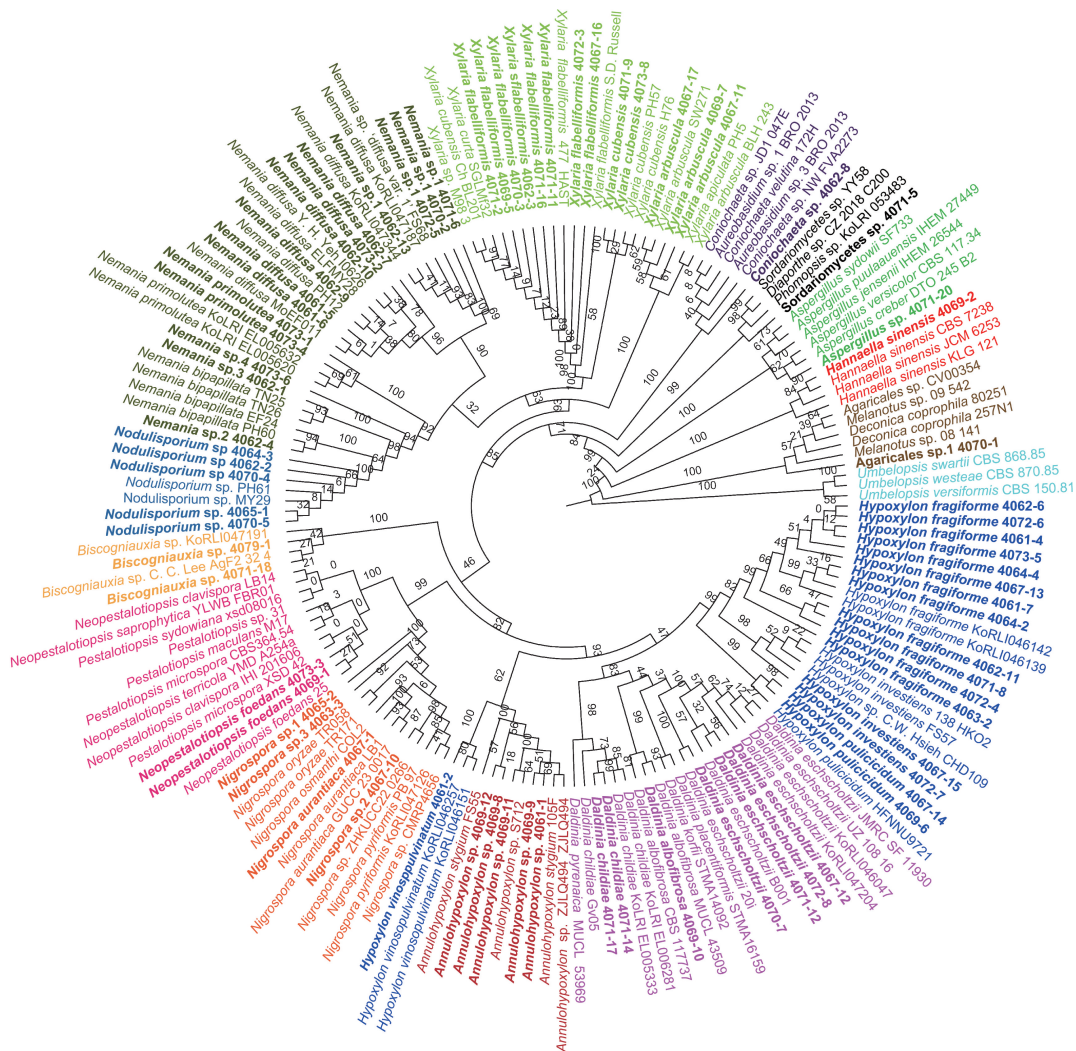


图 1 基于 ITS 序列构建的大叶梅属地衣内生真菌的 ML 系统发育树(本研究获得的样本加粗表示)

Fig. 1 The ML tree of the endolichenic fungal strains isolated from *Parmotrema* spp. inferred from ITS sequences(The strains obtained in this study were shown in bold)

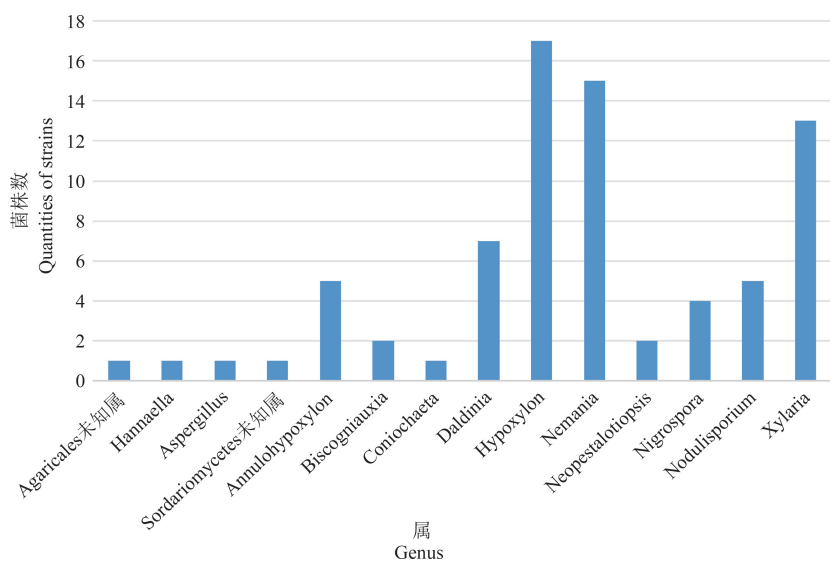
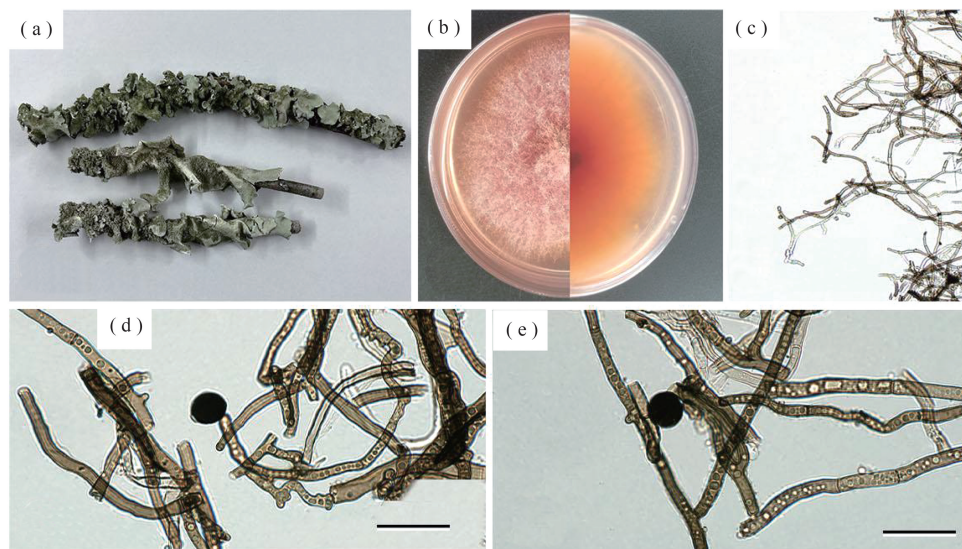


图 2 从 12 份大叶梅属地衣分离得到的地衣内生真菌的分属类群

Fig 2 The genera of endolichenic fungi isolated from 12 samples of *Parmotrema* spp.

2.3 菌株的鉴定

通过 ITS 序列比对和分子系统学分析确定的 29 个种级分类单元,依据菌株的形态特征能够进一步鉴定到种的有 54 个菌株,16 个物种(表 2)。以菌株 4067-1 为代表(图 1),其 ITS 序列经 NCBI 网站 Blast 在线比对,与 *Nigrospora aurantiaca* 的相似度为 99%,系统发育树上该菌株与下载自 NCBI 的 *N. aurantiaca* LB1 和 *N. aurantiaca* GUCC 23-0017 聚为一枝,支持率为 100%(图 1)。在 PDA 培养基上,菌落平坦,边缘全缘,中心被丛卷毛,最初为橙色,产生橙色色素,中心随着时间的增长而变黑。在 25 °C 下 5 d 后菌落直径达到 5.5 cm。在光学显微镜下,菌丝褐色,平滑,分枝,具隔,宽度 2.3~7.5 μm ;分生孢子梗退化为产孢细胞。分生孢子单一,多数为近圆形,黑色,发亮,光滑,直径 12~13 μm (图 3)。该菌株的形态解剖学特征与 *N. aurantiaca* Mei Wang & L. Cai 的模式标本高度吻合^[28]。综合分子生物学与形态解剖学特征,该菌株鉴定为橘色黑孢霉 *N. aurantiaca*。其属于子囊菌门 Ascomycota,盘菌亚门 Pezizomycotina,粪壳菌纲 Sordariomycetes,炭角菌目 Xylariales,梨孢假壳科 Apiosporaceae,黑孢霉属 *Nigrospora*。

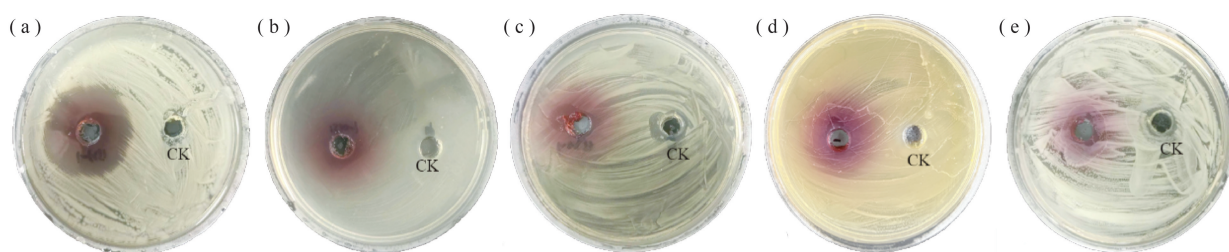


注:(a) 宿主:大叶梅 JX231522 (LCUF);(b) 菌落形态;(c) 菌丝形态;(d,e) 产生分生孢子的产孢细胞;比例尺为 25 μm 。

Notes:(a) Host species: *Parmotrema tinctorum* JX231522 (LCUF); (b) colony morphology; (c) mycelial morphology; (d,e) conidiogenous cells giving rise to conidia; Scale bars is 25 μm .

图 3 橘色黑孢霉的形态特征

Fig. 3 The morphological characters of *Nigrospora aurantiaca*



注:(a) 枯草芽孢杆菌 CS136;(b) 白色念珠菌 TC152;(c) 大肠杆菌 ATCC25922;(d) 变形杆菌 MC110;(e) 表皮葡萄球菌 TC149。CK: 空白对照。

Notes:(a) *Bacillus subtilis* CS136; (b) *Candida albicans* TC152; (c) *Escherichia coli* ATCC25922; (d) *Proteus* sp. MC110; (e) *Staphylococcus epidermidis* TC149. CK: Blank control.

图 4 地衣内生真菌橘色黑孢霉乙酸乙酯粗提物的抗菌活性

Fig. 4 Antimicrobial activity of ethyl acetate extract of endolichenic fungi *Nigrospora aurantiaca*

2.4 菌株发酵液粗提物的抑菌活性

结果显示,地衣内生真菌橘色黑孢霉 *Nigrospora aurantiaca* (菌株编号 4067-1)发酵粗提液表现出对枯

草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* CS136 的抑制作用较强,如图 4(a),平均抑菌圈直径为 35 mm($n=3$)。对白色念珠菌 *Candida albicans* TC152、大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922、变形杆菌 *Proteus* sp. MC 110 和表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* TC149 均无明显抑制活性,如图 4(b~e)。

3 小结与讨论

地衣内生真菌作为一类新兴的生物资源,具有潜在的生态及药用价值,而分离培养大量的地衣内生真菌菌株是获得新菌株及新型抗菌药物的前提。

本研究对 75 株大叶梅属地衣内生真菌的组成分析表明,大多数为广谱内生菌,如: *Annulohypoxylon stygium*, *Daldinia childiae*, *D. eschscholtzii*, *Hannaella sinensis*, *Hypoxylon investiens*, *H. pulicicidum*, *H. vinosopulvinatum*, *Nemania diffusa*, *N. primolutea*, *Neopestalotiopsis foedans*, *Nigrospora aurantiaca*, *Xylaria arbuscula*, *X. cubensis*, *X. flabelliformis* 也曾作为植物内生菌被报道过,且其代谢产物在抑制植物病原菌、临床治疗等方面表现出良好的开发前景^[29-35]。同时,本研究也发现了一些先前未作为内生菌报道的真菌,如 *Hypoxylon fragiforme* 和 *Daldinia albofibrosa*, 并且在 4 种大叶梅属地衣中都分离到了 *H. fragiforme*, 该种地衣内生真菌表现出与大叶梅属地衣共生的偏好性及对宿主的非专一性。

韩国和印度的学者也曾针对大叶梅属地衣进行过内生真菌的分离培养:2021 年 Yang 等人通过对韩国 5 个采集点的大叶梅 *Parmotrema tinctorum* 进行地衣内生真菌的深度分离培养,得到 104 种地衣内生真菌,隶属于 2 门,7 纲,23 目,38 科,60 属^[36]。本研究的培养深度较之虽有不及,但优势类群的结果较为一致,子囊菌门占绝对优势,在不同分类等级中,占最大比例的均为粪壳菌纲、炭角菌目和炭角菌科,在属级水平稍有不同,前者的优势属为 *Daldinia*^[36]。2023 年,Chakarwari 等人对印度的 15 种大叶梅属地衣进行了内生真菌的分离培养,确定了 47 种内生菌,优势纲同样为粪壳菌纲,优势属则为炭角菌属^[37]。

由此可见,大叶梅属地衣内生真菌具有丰富的多样性,虽然其内生真菌未表现出明显的宿主专一性,但其发生和多样性可能会因海拔高度、分离方法及培养基等多种因素而出现差异^[37],关于地衣内生真菌的起源与传播方式有待深入研究探讨。另外大叶梅属地衣内生真菌含有大量具有生物活性的次生代谢产物^[16,17,36,37],其药用价值及生态价值有待深入研究并开发利用。下一步将对筛选得到的一株具有抗菌活性的地衣内生真菌 *N. aurantiaca* 进行大量发酵,并对其次级代谢产物做进一步的分离纯化,以期发现新的抗菌活性物质。

4 致谢

感谢聊城大学生命科学学院巨延虎老师和李洁老师提供本研究所所需的供试菌株。

参 考 文 献

- [1] 程璐,翟亚楠,孙立彦,等. 地衣及其内生真菌活性次级代谢产物研究进展[J]. 菌物学报, 2021, 40(1): 14-30.
- [2] PETRINI O. Fungal Endophytes of Tree Leaves[M]. New York: Springer, 1991.
- [3] ARNOLD A E, MIADLIKOWSKA J, HIGGINS K L, et al. A phylogenetic estimation of trophic transition networks for ascomycetous fungi: are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification? [J]. Systematic Biology, 2009, 58(3): 283-297.
- [4] SURYANARAYANAN TS, THIRUNAVUKKARASU N. Endolichenic fungi: the lesser known fungal associates of lichens[J]. Mycology, 2017, 8(3): 189-196.
- [5] 解斐,姜红祥. 地衣内生真菌及其活性次生代谢产物研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(4): 682-686.
- [6] KELLOGG J J, RAJA H A. Endolichenic fungi: a new source of rich bioactive secondary metabolites on the horizon[J]. Phytochemistry Reviews, 2017, 16(2): 271-293.
- [7] SINGH B N, UPRETI D K, GUPTA V K, et al. Endolichenic fungi: a hidden reservoir of next generation biopharmaceuticals[J]. Trends in Biotechnology, 2017, 35(9): 808-813.
- [8] ZHANG K, REN J, GE M, et al. Mono- and bis-furanone derivatives from the endolichenic fungus *Peziza* sp[J]. Fitoterapia, 2014, 92: 79-84.
- [9] LI X B, LI L, ZHU R X, et al. Tetramic acids and pyridone alkaloids from the endolichenic fungus *tolypocladium cylindrosporum*[J].

Journal of Natural Products, 2015, 78(9): 2155-2160.

- [10] DOU Y, WANG X, JIANG D, et al. Metabolites from *Aspergillus versicolor*, an endolichenic fungus from the lichen *Lobaria retigera* [J]. Drug Discoveries and Therapeutics, 2014, 8(2): 84-88.
- [11] DING G, LI Y, FU S, et al. Ambuic acid and torreyanic acid derivatives from the endolichenic fungus *Pestalotiopsis* sp [J]. Journal of Natural Products, 2009, 72(1): 182-186.
- [12] LI X B, ZHOU Y H, ZHU R X, et al. Identification and biological evaluation of secondary metabolites from the endolichenic fungus *Aspergillus versicolor* [J]. Chemistry & Biodiversity, 2015, 12(4): 575-592.
- [13] 陈建斌. 中国地衣志. (第4卷), 梅衣科 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [14] 任强. 中国地衣分属检索表 [J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2023, 36(1): 107-110.
- [15] 娄亚坤, 郭守玉, 韩留福. 中国一些地卷属地衣内生真菌的多样性 [J]. 菌物研究, 2023, 21(Z1): 121-130.
- [16] TAN M A, CASTRO S G, OLIVA P M P, et al. Biodiscovery of antibacterial constituents from the endolichenic fungi isolated from *Parmotrema rampoddense* [J]. 3 Biotech, 2020, 10(5): 212-218.
- [17] PADHI S, MASI M, PANDA S K, et al. Antimicrobial secondary metabolites of an endolichenic *Aspergillus niger* isolated from lichen thallus of *Parmotrema ravum* [J]. Natural Product Research, 2020, 34(18): 2573-2580.
- [18] 范海云, 滕梦婷, 周生亮, 等. 八种肺衣属地衣内生真菌的鉴定及抗菌活性研究 [J]. 湖北农业科学, 2019, 58(12): 92-96.
- [19] 何宣宣, 贾泽峰. 槟榔点衣, 中国点衣属地衣一新记录种 [J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2023, 36(5): 86-90.
- [20] WHITE T J, BRUNS T D, LEE S B, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, 38: 315-322.
- [21] GARDES M, BRUNS T D. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts [J]. Molecular Ecology, 1993, 2(2): 113-118.
- [22] SPATAFORA J W, AIME M C, GRIGORIEV I V, et al. The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies [J]. Microbiol Spectrum, 2017, 5(5): 1-32.
- [23] KATO H K, STANDLEY D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(4): 772-780.
- [24] STAMATAKIS A. RAXML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies [J]. Bioinformatics, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [25] 李世玉, 吕建华, 姚澜, 等. 1株地衣内生真菌 *Preussia africana* 的化学成分 [J]. 菌物研究, 2023, 21(Z1): 184-192.
- [26] 穆守臣, 许俊杰, 张海娟, 等. 一株抗金黄色葡萄球菌肺衣内生真菌的分离与鉴定 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(15): 145+148.
- [27] QUINTO E A, Santos M A G. A Guidebook to Plant Screening: Phytochemical and Biological [M]. UST Pub. House: Microbiology, 2005.
- [28] WANG M, LIU F, CROUS P W, CAI L. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: ubiquitous endophytes, plant and human pathogens [J]. Persoonia, 2017, 39(2): 118-142.
- [29] RONDILLA R R L, CRUZ T E E D, CHANG F R, et al. *Annulohypoxylon stygium*, a Pandanus simplex-associated fungal endophyte with α -glucosidase inhibitory activity [J]. Studies in Fungi, 2022, 7(1): 38-43.
- [30] 吕佳, 罗碧, 钱家萍, 等. 广东肉桂内生真菌多样性及其抗肉桂枝枯病菌初步研究 [J]. 菌物学报, 2022, 41(3): 435-449.
- [31] 张会, 石绵绵, 李伟, 等. 闽浙马尾杉内生真菌 *Hypoxylon investiens* NX9 的次级代谢产物与乙酰胆碱酯酶抑制活性 [J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2019, 35(5): 55-60.
- [32] BILLS G F, GONZÁLEZ-MENÉNDEZ V, MARTÍN J, et al. *Hypoxylon pulicicidum* sp. nov. (Ascomycota, Xylariales), a Pantropical Insecticide-Producing Endophyte [J]. Plos One, 2012, 7(10): e46687.
- [33] NURUL F A, MASRATUL H M, NIK FNR, et al. Molecular phylogeny of endophytic fungi from rattan (*Calamus castaneus* Griff.) spines and their antagonistic activities against plant. Pathogenic Fungi [J]. Journal of Fungi, 2021, 7(4): 301.
- [34] SAFWAN S, HSIAO G, LEE T H, et al. Bioactive compounds from an endophytic fungi *Nigrospora aurantiaca* [J]. Botanical Studies, 2021, 62: 18.
- [35] SHETTY K G, RIVADENEIRA D V, JAYACHANDRAN K, et al. Isolation and molecular characterization of the fungal endophytic microbiome from conventionally and organically grown avocado trees in South Florida [J]. Mycological Progress, 2016, 15(9): 977-986.
- [36] YANG J H, OH S Y, KIM W, et al. Effect of isolation conditions on diversity of endolichenic fungal communities from a foliose lichen, *Parmotrema tinctorum* [J]. Journal of Fungi, 2021, 7(5): 335.
- [37] CHAKARWARTI J N, NAYAKA S, SRIVASTAVA S. Diversity of endolichenic fungi within lichen genus *Parmotrema* from India [J]. Turkish Journal of Botany, 2023, 47(4): 291-306.

(责任编辑:刘庆松)