

竹肉球内生菌多肽的分离及抑菌活性

韩英乾¹ 邱水² 陶虎¹

1.西北农林科技大学理学院,杨凌 712100; 2.西北农林科技大学生命科学学院,杨凌 712100

摘要 采用浸提、离心、沉淀、冻干的方法得到竹肉球内生菌(*Engleromyces goetzei* P. Hennings)的粗提物,再经分子筛 G-25 凝胶柱纯化后得到粗多肽,采用滤纸片法和平板对峙法,以抑菌圈直径为指标进行抑菌活性检测,结果表明:粗多肽对农业致病真菌的菌丝生长均有不同程度的抑制作用,其中,内生菌多肽 DMSO 提取液对小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、核果炭疽病菌(*Drupe anthrax*)和茄子黄萎病菌(*Verticillium albo-atrum*)的抑菌活性最高,IC₅₀ 分别为 8.70、9.48 和 8.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时,对抗菌肽在酸碱、高温、酶解和有机溶剂环境下的稳定性进行研究,结果显示:除了具有一定的溶剂选择性及 α -淀粉酶、胃蛋白酶对其有一定程度的水解之外,该抗菌肽具有很强的稳定性。用 HPLC 对粗多肽进一步纯化,得到电泳纯的抗菌肽。

关键词 竹肉球内生菌; 抗菌肽; 致病菌; 抑菌活性

中图分类号 S 476 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)05-0045-07

植物内生真菌是寄生在健康植物组织和器官内部且不会引起植物组织明显病害症状的一类真菌,包括一些腐生菌和一些菌根菌等^[1]。内生真菌几乎存在于所有植物体中,一方面,内生菌为植物提供生长所需的营养成分,促进植物的生长发育^[2-5];另一方面,内生菌有助于植物抵御外界微生物和非微生物浸染的能力,提高宿主植物的抗逆性^[6-8];因此,近年来对于植物内生真菌的研究十分活跃。目前,农业致病真菌侵害农作物日益严重,内生真菌作为一种新型的微生物药物资源,在农业抗菌药物开发上有广阔的应用前景^[8-10]。

竹肉球内生菌(*Engleromyces goetzei* P. Hennings)为肉座菌科真菌,仅在亚洲和非洲有分布和发现,在中国分布于云南、四川、西藏等地,为云南省纳西族、傈僳族传统抗菌消炎药^[11]。竹菌的化学成分研究报道很少,仅从其乙酸乙酯提取组分中分离得到十余种小分子化合物。临床用竹肉球内生菌粉治疗皮肤癌、肝癌、肺癌、胃癌、直肠癌等恶性肿瘤有一定疗效^[12]。目前,国内外关于竹肉球内生菌抑制农业致病真菌的研究较少,本研究采用浸提、离心、沉淀、冻干、分子筛以及高效液相色谱等技术对竹肉球内生菌进行了提取、分离,经初步纯化得到了多肽类物质,对其抑菌活性进行初步研究,以期竹肉球

内生菌的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1) 供试内生菌。分离所需的竹肉球内生菌从市场上购得,挑选无病害健康菌体。

2) 培养基。所用培养基为 PDA 和 NA。

3) 供试植物病原菌。供试细菌共有 2 种,分别为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*);供试真菌有 7 种,分别为烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、苹果炭疽病菌(*Clomerella cingulata*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、核果炭疽病菌(*Drupe anthrax*)、茄子黄萎病菌(*Verticillium albo-atrum*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)及小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)。

1.2 竹肉球内生菌多肽的提取、分离与纯化

1) 竹肉球内生菌多肽的提取。从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取材若干,在流水下冲洗,先用 70% 乙醇处理烘干至恒质量。粉碎机破碎,破碎过程中加入 1.1% 的醋酸,破碎完成后,取出放入恒温水浴锅中(27 $^{\circ}\text{C}$)继续搅拌并浸提 24 h。

2) 竹肉球内生菌多肽的分离。浸提 24 h 后,转

收稿日期: 2018-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(21403168); 中央高校基本科研业务费专项(2452015222)

韩英乾, 硕士研究生。研究方向: 蛋白质三维结构。E-mail: hyqawh@163.com

通信作者: 陶虎, 教授。研究方向: 蛋白质三维结构。E-mail: taohu@nwsuaf.edu.cn

入离心管,8 000 r/min 离心 25 min,取上清。在沉淀中继续加入 1.1%醋酸进行再次抽提,如此反复提取 3 次,合并 3 次上清,冻干。

3) 竹肉球内生菌多肽的初步纯化。将冻干粉重新用 1.1%醋酸溶解,离心取上清。将不溶物用 1.1%醋酸继续溶解,反复 3 次,合并所有上清液,浓缩至适当体积。通过 G-25 凝胶柱层析将其初步纯化。样品质量浓度为 1.5 mg/mL,上样量 1.0 mL,流动相为 1.1%醋酸,流速为 1.0 mL/min。自动收集器以每管 1 mL 收集样品峰,冻干后于 -80 °C 冰箱中保存。

4) HPLC 对粗多肽的纯化。首先将上述得到的冻干样品配成质量浓度为 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液,过反相 C_{18} 柱,流动相 Buffer A 为 0.01% TFA,流动相 Buffer B 为 0.08% TFA + 70% 乙腈。首先用流动相 A 冲洗色谱柱,待基线平衡后,上样(0.5、1.0、2.0、5 mL),调节流动相 Buffer B 的梯度:0~5 min buffer B:0%~20%;5~35 min buffer B:20%~35%;35~45 min buffer B:35%~90%;45~50 min buffer B:90%~90%;50~55 min buffer B:90%~0%。在 1 mL/min 的流速下 60 min 梯度洗脱完,检测波长 214 nm,每管 1 mL,收集各组分。

5) 竹肉球内生菌多肽的茚三酮反应和双缩脲反应。参照文献[13]的方法进行。

1.3 抑菌活性测定

采用 K-B 纸片扩散法药敏试验^[14]和平皿法^[15]评价粗多肽对供试细菌和真菌的抑菌活性。采用 5 种溶剂进行多肽提取,称取 30 mg 多肽,分别用 3 mL 丙酮、甲醇、DMSO、吐温 80、无菌水溶解并配制成质量浓度为 1 mg/mL 的 5 种母液,备用。

1) K-B 纸片扩散法药敏试验。参照文献 [14] 进行,将 5 种母液稀释成 500 $\mu\text{g/mL}$ 的多肽液,分别取 200 μL 加入 10 片备用纸片浸泡,浸泡后马上接入提前涂抹好细菌液的 NA 培养基,于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下保湿培养 24 h 后观察抑菌活性,采用十字交叉法测量菌落直径,计算抑制率和抑制中浓度。以无菌蒸馏水处理作为空白对照,每组重复 3 次。

2) 平皿法。参照文献 [15] 进行,将供试药液母液用无菌水进行等比稀释,得到系列浓度药液。取稀释后供试药液 2 mL 分别与 6 mL 灭菌融化的 PDA 培养基混匀后倒入 9 cm 培养皿中,制成带菌培养基。接入供试菌饼,于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下保湿培养

48 h,采用十字交叉法测量菌落直径,计算抑制率及抑制中浓度。以加多菌灵的处理作阳性对照,不加药剂的处理作空白对照,每处理 3 个重复。

3) 多肽提取液对 7 种植物病原真菌的毒力方程。参照文献[16] 进行,分别取 5 个浓度梯度的 5 种多肽提取液,定容至 5 mL,加入已灭菌融化的 PDA 培养基中,通过平皿法测定抑菌活性,建立回归方程。

1.4 抑菌稳定性研究

1) 温度对竹肉球内生菌抗菌肽稳定性的影响。称取抗菌肽纯化样品,用 DMSO 溶解,配制质量浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液,将其分成等体积 20 等份,分别置于 60、80、100 °C 条件下,放置 10、20、30 min 后取出,采用平皿法进行抑菌活性测定。以小麦赤霉病菌和西瓜枯萎病原菌为指示菌,以抑菌效果(抑菌圈直径)为评价指标,研究不同温度条件对竹肉球内生菌抗菌肽抑菌稳定性的影响。

2) pH 对竹肉球内生菌抗菌肽稳定性的影响。称取抗菌肽纯化样品,用 DMSO 溶解,配制不同 pH 系列 (pH 3~11) 的样品液,质量浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 。采用平皿法进行抑菌活性测定。以小麦赤霉病菌和西瓜枯萎病原菌为指示菌,考察 pH 对竹肉球内生菌抗菌肽抑菌(以抑菌圈直径为指标)稳定性的影响。

3) 酶对竹肉球内生菌抗菌肽稳定性的影响。参照文献 [17] 进行,用 DMSO 溶解抗菌肽样品,配制质量浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液。分别用对应的缓冲液(胰蛋白酶用 pH 6.2 的磷酸缓冲液,胃蛋白酶用 pH 4.0 的柠檬酸缓冲液, α -淀粉酶用 pH 5.6 的柠檬酸缓冲液,过氧化氢酶用 pH 7.0 的 PBS 缓冲液)配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,各酶液与竹肉球内生菌抗菌肽样品液等比例混合均匀,在不同温度下保温孵化 2 h(胰蛋白酶和过氧化氢酶 25 °C,胃蛋白酶和 α -淀粉酶 37 °C)后煮沸 3 min,灭酶活。采用平皿法测定抑菌活性。以小麦赤霉病菌和西瓜枯萎病原菌为指示菌,以抑菌效果(抑菌圈直径)为评价指标,考察酶对竹肉球内生菌抗菌肽的抑菌稳定性影响。

2 结果与分析

2.1 竹肉球内生菌多肽的提取、分离与纯化

1) 凝胶层析法对粗多肽的纯化。原料按流程处理、提取得到冻干粉,经过分子筛层析的色谱图如图 1,可以看出提取物经 Sephadex G-25 层析后得到

4 个组分,分别收集、冻干,通过平皿法测定,结果发现色谱峰 2 具有抗菌活性。

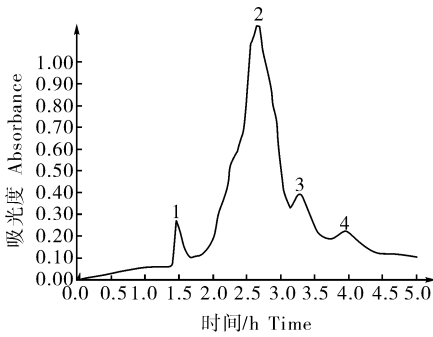


图 1 Sephadex G-25 层析色谱图

Fig.1 Filtration pattern of preparation on Sephadex G-25

2)反相高效液相色谱法(HPLC)对粗多肽的纯化。通过 HPLC 对竹肉球内生菌抗菌活性肽进行柱层析分离纯化,各组分洗脱曲线如图 2 所示,可以看出,经 HPLC 纯化后共出现 9 个峰,经凝胶 Sephadex G-25 层析的峰 2 分离效果较好。

收集各组分冻干后,进行病原真菌抑菌活性初筛,发现峰 1、2、3 对病原菌无抑菌作用;峰 7、8、9 对小麦赤霉病菌和西瓜枯萎病菌有较弱的抑制活性,抑菌效果不是太明显;峰 4、5、6 对 7 种供试病原真菌具有抑制效果,尤其是峰 6 的抑菌效果最好。将峰 6 洗脱收集液合并,冷冻干燥后保存待用。

2.2 竹肉球内生菌多肽的茚三酮反应和双缩脲反应

竹肉球内生菌多肽的茚三酮反应和双缩脲反应

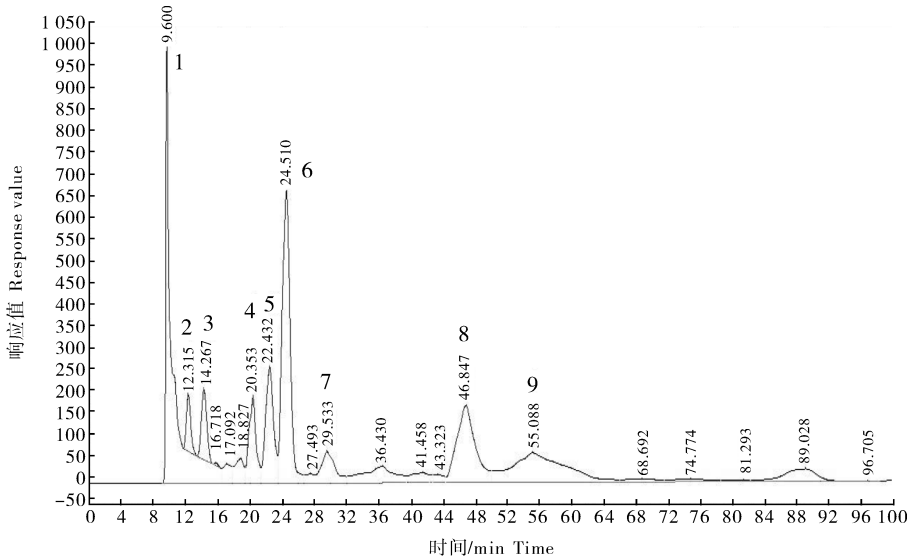


图 2 HPLC 层析色谱图

Fig.2 Filtration pattern of preparation on HPLC

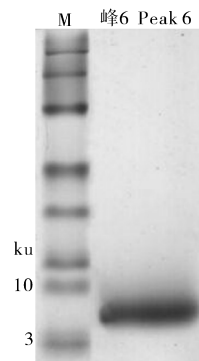
均呈阳性,说明提取物为多肽类物质。

3)竹肉球内生菌抗菌肽的纯度鉴定。对经 HPLC 纯化后具有抑菌活性的峰 6 进行 SDS-PAGE 检测,经 16.5% Tricine-SDS-PAGE 电泳检测,显示为单一的条带(图 3),表明本研究得到的抗菌肽已达到电泳纯。

4)分子质量检测。通过质谱图(图 4)和电泳图初步预测,抗菌肽的分子质量约 5 796.0 u。

2.3 竹肉球内生菌多肽的抑菌活性

1)竹肉球内生菌多肽对细菌的抑菌活性。K-B 纸片扩散法药敏试验结果显示,500 μg/mL 的竹肉球内生菌多肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌无抑制作用。



M: 蛋白质 marker; 峰 6: 经 HPLC 纯化的抗菌肽。M: Protein marker; Peak 6: Antifungal protein 6, freeze-dried sample after HPLC.

图 3 高效液相色谱纯化样品电泳图

Fig.3 The electrophoretogram of the antimicrobial peptides purified by HPLC

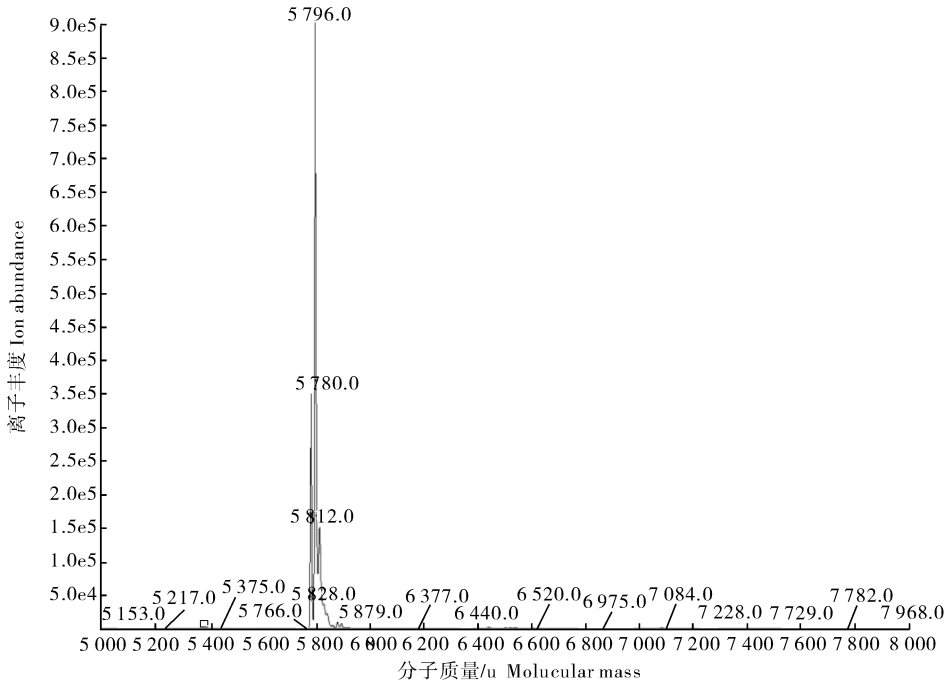


图 4 抗菌肽质谱图

Fig.4 The mass spectrogram of antimicrobial peptides

2) 竹肉球内生菌多肽对植物病原真菌的抑菌活性。平皿法测定结果(表 1) 表明,在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下,竹肉球内生菌多肽在 5 种溶剂中对苹果炭疽病菌、番茄灰霉病菌、核果炭疽病菌、茄子黄萎病菌、西瓜枯萎病菌、小麦赤霉病菌和烟草赤星病菌生长有抑制作用,主要表现为抑制菌丝生长,内生菌多肽对 7 种植物病原真菌的抑菌活性均在 50% 以上。

同时,在丙酮、吐温 80 和 DMSO 中,竹肉球内生菌多肽对 7 种病原菌的抑菌作用较强。其中,内生菌多肽丙酮提取液对于烟草赤星病菌的抑菌率达 90% 以上;吐温 80 提取液对核果炭疽病菌、西瓜枯萎病菌、烟草赤星病菌的抑菌率达 90% 以上;DMSO 提取液对苹果炭疽病菌、番茄灰霉病菌、核果炭疽病菌、西瓜枯萎病菌、小麦赤霉病菌和烟草赤星病菌的抑菌率达 90% 以上。

表 1 竹肉球内生菌多肽在 5 种溶剂中对 7 种植物病原菌的抑菌活性

Table 1 Inhibitory activities of the peptide isolated from *Engleromyces goetzei* P. Hennings against 7 plant pathogens in 5 solvents

溶剂 Solvent	抑菌率/% Inhibitory rate						
	苹果炭疽病菌 <i>C. cingulata</i>	番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	核果炭疽病菌 <i>D. anthrax</i>	茄子黄萎病菌 <i>V. albo-atrum</i>	西瓜枯萎病菌 <i>G. zeae</i>	小麦赤霉病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>
丙酮 Acetone	81.9	84.1	86.3	79.8	79.6	86.7	93.1
甲醇 Methanol	78.3	68.8	65.4	69.2	69.3	67.1	67.0
吐温 80 Tween 80	78.9	81.3	90.7	88.3	91.8	89.4	90.3
DMSO	92.9	94.5	93.7	86.7	93.3	94.1	93.1
无菌水 ddH ₂ O	67.9	76.5	72.9	83.1	80.2	81.3	80.2

3) 竹肉球内生菌多肽对 7 种植物病原真菌的毒力方程。竹肉球内生菌多肽的丙酮、吐温 80、DMSO 提取液对 7 种植物病原真菌菌丝生长抑制毒力方程见表 2~表 4,结果显示:竹肉球内生菌多肽在不同的溶剂和供试真菌之间具有很强的选择性;在

5 种溶剂下对苹果炭疽病菌、番茄灰霉病菌、核果炭疽病菌、茄子黄萎病菌、西瓜枯萎病菌、小麦赤霉病菌和烟草赤星病菌菌丝生长均有不同程度的抑制作用,且总体上抑菌活性较强。尤其是在 DMSO 溶液条件下,竹肉球内生菌多肽对茄子黄萎病菌和小麦

赤霉病菌的抑菌活性最高,抑制率可达 94% 以上, 最低 IC₅₀ 8.7 μg/mL。

表 2 竹肉球内生菌多肽丙酮提取液对 7 种植物病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 2 Inhibitory rate of peptide acetone extracts against 7 plant pathogens

供试真菌 Tested fungi	毒力回归方程 Toxic regression equation	相关系数 Correlation coefficient	IC ₅₀ /(μg/mL)
苹果炭疽病菌 <i>C. cingulata</i>	$y=2.4246+1.5903x$	0.966 6	41.64
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	$y=2.8057+1.2882x$	0.974 8	50.50
核果炭疽病菌 <i>D. anthrax</i>	$y=3.8781+0.9123x$	0.967 2	16.97
茄子黄萎病菌 <i>V. albo-atrum</i>	$y=3.1658+1.0313x$	0.979 8	60.05
西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i>	$y=3.7440+0.8172x$	0.972 4	34.43
小麦赤霉病菌 <i>G. zeae</i>	$y=3.1695+1.3872x$	0.965 8	20.90
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	$y=2.4337+1.6475x$	0.964 3	36.12

表 3 竹肉球内生菌多肽吐温 80 提取液对 7 种植物病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 3 Inhibitory activities of Tween 80 extracts of peptide against 7 plant pathogens

供试真菌 Tested fungi	毒力回归方程 Toxic regression equation	相关系数 Correlation coefficient	IC ₅₀ /(μg/mL)
苹果炭疽病菌 <i>C. cingulata</i>	$y=3.0248+1.0667x$	0.982 3	71.02
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	$y=3.5476+0.8648x$	0.987 4	49.10
核果炭疽病菌 <i>D. anthrax</i>	$y=2.2568+1.5025x$	0.956 0	66.59
茄子黄萎病菌 <i>V. albo-atrum</i>	$y=2.3449+1.6668x$	0.982 8	39.16
西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i>	$y=3.8822+0.9040x$	0.981 9	17.24
小麦赤霉病菌 <i>G. zeae</i>	$y=3.2908+1.0484x$	0.976 4	42.70
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	$y=3.5076+0.9796x$	0.969 1	33.73

表 4 竹肉球内生菌多肽 DMSO 提取液对植物病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 4 Inhibitory rate of peptide DMSO extracts against 7 plant pathogens

供试真菌 Tested fungi	毒力回归方程 Toxic regression equation	相关系数 Correlation coefficient	IC ₅₀ /(μg/mL)
苹果炭疽病菌 <i>C. cingulata</i>	$y=3.5306+1.2052x$	0.978 8	16.56
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	$y=3.5777+1.1600x$	0.984 6	16.82
核果炭疽病菌 <i>D. anthrax</i>	$y=4.1978+0.9876x$	0.976 3	9.48
茄子黄萎病菌 <i>V. albo-atrum</i>	$y=4.5334+0.6707x$	0.977 6	8.96
西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i>	$y=3.7015+1.1846x$	0.977 1	12.48
小麦赤霉病菌 <i>G. zeae</i>	$y=4.1072+1.0828x$	0.973 2	8.70
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	$y=3.6619+1.2162x$	0.958 6	12.60

2.4 抑菌稳定性

1) 温度对竹肉球内生菌抗菌肽稳定性的影响。对不同温度条件下不同时间处理抗菌肽抑菌效果进行研究,结果(表 5)显示:竹肉球内生菌抗菌肽提取物耐热性很好,尤其对短时高温具有很强的耐受性,100 °C 以下热处理对它几乎没有影响,仍然具有很强的抑菌作用;长时间(20 min 以上)高温处理后,抑菌作用会有所减弱,100 °C 处理 30 min 对小麦赤霉病菌和西瓜枯萎病原真菌的抑菌作用减弱甚至消失。

2) pH 对竹肉球内生菌抗菌肽稳定性的影响。研究结果(图 5)显示:在 pH 3~11,竹肉球内生菌

抗菌肽提取物对小麦赤霉病菌和西瓜枯萎病菌有抑菌作用,说明它的抑菌 pH 范围比较广。图 5 中抑菌圈直径变化不大,只是在 pH 7 附近,抑菌圈直径稍小,抑菌作用有所减弱,可能是由于 pH 7 本身就是真菌生长最适 pH 值,故表现出稍弱的抑菌性。

3) 酶对竹肉球内生菌抗菌肽稳定性的影响。酶处理对抗菌肽抑菌效果的影响结果(表 6)显示:经酶解后,竹肉球内生菌抗菌肽抑菌作用仍然很强,抑菌性几乎未受到影响,而且 α-淀粉酶和胃蛋白酶对其有一定的水解作用;胰蛋白酶对其也有轻微的水解作用,处理后抑菌效果稍减弱;抗菌肽对过氧化氢

酶则表现出很好的稳定性。总体来说,抗菌肽依然对供试菌株表现出很强的抑制效果。

表 5 温度对天然抗菌肽的抑菌效果的影响

Table 5 The influence of temperature on the natural antimicrobial peptide

温度和时间处理 Treatment of temperature and time	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	
	小麦赤霉病菌 <i>G. zeae</i>	西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i>
	对照 Control	11.749
80 °C (10 min)	11.688	12.342
100 °C (10 min)	11.657	12.275
120 °C (10 min)	11.629	12.213
100 °C (20 min)	10.025	11.324
100 °C (30 min)	7.911	9.143

注:对照为未经处理的提取物,抑菌圈直径为 3 个重复的平均值。下同。Note: Control is extract without treatment; Diameters of inhibition zone is mean diameter of three replicates. The same as follows.

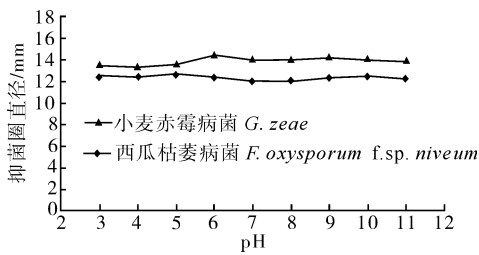


图 5 不同 pH 条件下样品对微生物的抑制作用

Fig.5 The inhibitory effects of the natural antimicrobial peptide at different pH

表 6 酶对竹肉球内生菌抗菌肽抑菌效果的影响

Table 6 The influence of different enzymes on the natural antimicrobial peptide

处理 Treatment	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone	
	小麦赤霉病菌 <i>G. zeae</i>	西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i>
	对照 Control	10.525
胰蛋白酶 Trypsin	9.500	9.833
胃蛋白酶 Pepsin	8.750	8.667
α -淀粉酶 α -Amylase	8.517	8.833
过氧化氢酶 Catalase	10.115	10.167

3 讨论

本研究通过浸提、离心、沉淀、冻干、凝胶过滤层析以及 HPLC 从竹肉球内生菌中提取、分离并纯化抗菌肽,在以往的研究^[11]中,从竹肉球内生菌中提取得到的大多数为多糖类的混合粗提物,迄今为止还未见到关于竹肉球内生菌多肽提取分离与纯化的

相关报道。

笔者对纯化后的竹肉球内生菌抗菌肽进行抑菌谱、溶剂选择优化以及性能稳定性研究,并初步讨论其抑菌机制,发现抗菌肽抑菌效果好,广谱、安全且耐热,pH 稳定性也很好,对酶也有良好的稳定性,因此,对竹肉球内生菌的研究可以为新型微生物抗菌素的开发提供新的途径。虽然其抗菌活性与成品抑菌剂有一定差距,但作为一种天然的植物提取物,具有不易产生耐药性、不良反应轻、成本低、绿色环保以及抗菌谱广等独特优势,使其作为一种新型的微生物药物资源,在农业抗菌药物开发上具有较强的发展前景和较高的开发价值^[18]。同时,也可以与市售的抑菌剂联用,降低农业植物致病菌的耐药性,进而扩大其在农业抗菌上的应用范围。

参 考 文 献

- [1] YU H, LEI Z, LIN L, et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes [J]. Microbiological research, 2010, 165(6): 437-449.
- [2] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展 [J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.
- [3] 刘舒, 陈春黎, 刘敏, 等. 两种内生真菌对大花蕙兰的共生效应比较 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(1): 43-49.
- [4] LEUCHTMANN A. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes [J]. Neurogastroenterology & motility, 1992, 1(3): 150-162.
- [5] 谢玲, 张雯龙, 蓝桃菊, 等. 1 株内生真菌的分离鉴定及其对铁皮石斛的促生作用 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 83-88.
- [6] LARRAN S, PERELLÓ A, SIMÓN M R, et al. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves [J]. World journal of microbiology & biotechnology, 2002, 18(7): 683-686.
- [7] 黄午阳. 植物内生真菌的抗菌活性研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(1): 24-26.
- [8] 印容, 高慧娟, 赵秀云. 球毛壳菌及其产生的鞘氨醇对油菜根肿病的室内生防作用 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(5): 58-62.
- [9] LIU C H, LIU T T, YUAN F F, et al. Isolating endophytic fungi from evergreen plants and determining their antifungal activities [J]. African journal of microbiology research, 2010, 4(21): 2243-2248.
- [10] 秦晶, 张清华, 杨龙, 等. 油菜内生真菌黄柄曲霉 CanS-34A 对核盘菌的拮抗性 [J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 26-32.
- [11] 占扎君, 孙汉董, 吴厚铭, 等. 竹菌化学成分的研究 [J]. 植物学报, 2003, 45(2): 248-252.
- [12] PEDERSEN E J, LARSEN P, BOLL P M. Engleromycin, a new cytochalasan from *Engleromyces goetzei* Hennings [J]. Tetrahedron letters, 1980, 21(52): 5079-5082.
- [13] 萧能庚, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北

京:北京大学出版社,2005.

中国农学通报,2009,25(19):206-208.

[14] 谭瑶,赵清. K-B 纸片扩散法药敏试验[J]. 检验医学与临床, 2010,7(20):2290-2291.

[17] 江惠. 竹叶天然抗菌肽的分离纯化、抑菌活性与抑菌机理研究 [D]. 成都:西华大学,2011.

[15] 中华人民共和国农业部. NY/T1156.2-2006 农药室内生物测定试验准则[S].北京:中国农业出版社,2006.

[18] CHANG H M, PAUL P H. Pharmacology and application of Chinese material medical [M]. Singapore: World Scientific Publishing Company,1998:190-201.

[16] 刘霞,路永贵,闫当萍. EXCEL 在农药毒力测定中的应用[J].

Isolation and antimicrobial activities of peptide from *Engleromyces goetzei* P. Hennings

HAN Yingqian¹ QIU Shui² TAO Hu¹

1.College of Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2.College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract The crude extracts of *Engleromyces goetzei* P. Hennings were obtained by leaching, centrifugation, precipitation and lyophilization. The crude polypeptides were obtained after extracting and isolating the crude extracts with G-25 gel chromatography. The antibacterial activities were measured with paper filtering method and plate confrontation method on the diameter of inhibition zone as an indicator. It inhibited all types of tested agricultural pathogenic fungi on mycelium growth. Among them, the antibacterial activity against *Gibberella zeae*, *Drupe anthrax* and *Verticillium albo-atrum* was highest, with the IC₅₀ of 8.70 μg/mL, 9.48 μg/mL and 8.96 μg/mL, respectively. The crude polypeptides were further purified with HPLC to obtain an electrophoretically pure antimicrobial peptide. It had wide antimicrobial activities and was worth for the further studying.

Keywords *Engleromyces goetzei* P. Hennings; antimicrobial peptide; pathogens; antimicrobial activity

(责任编辑:张志钰)