

袁名远,李宇,谭旭辉,等.湖北贝母活性成分与内生菌次级代谢产物研究[J].华中农业大学学报,2021,40(6):27-34.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.06.004

# 湖北贝母活性成分与内生菌次级代谢产物研究

袁名远<sup>1,2</sup>,李宇<sup>1</sup>,谭旭辉<sup>1</sup>,刘玉<sup>1,2</sup>,方昕悦<sup>1</sup>,冉亚兰<sup>3</sup>,何美军<sup>1</sup>

1.湖北省农业科学院中药材研究所/国家中药材产业技术体系恩施综合试验站,恩施 445000;

2.湖北民族大学生物科学与技术学院,恩施 445000; 3.恩施土家族苗族自治州农业农村局,恩施 445000

**摘要** 为探究湖北贝母不同组织贝母素乙含量、内生菌组成及其次级代谢产物的抑菌活性,采用气相色谱法测定湖北贝母鳞茎、花、叶的贝母素乙含量,分别利用16S rDNA和ITS测序技术鉴定内生细菌和真菌,并通过琼脂扩散法、微量二倍稀释法研究内生菌次级代谢产物对10株供试菌的抑菌活性。结果表明:湖北贝母叶中贝母素乙含量最高,达(3.99±0.10) mg/g,其含量是鳞茎的1.78倍、花的4.24倍;从湖北贝母中分离鉴定了4株内生菌,分别为 *Pseudomonas* sp. BM-X-6、*Arthrinium* sp. BM-Z-5、*Aspergillus* sp. BM-Z-1、*Aspergillus* sp. BM-Z-3;3株内生真菌次级代谢产物抑菌活性均优于细菌 *Pseudomonas* sp. BM-X-6,其中 *Arthrinium* sp. BM-Z-5的次级代谢产物抑菌谱最广,对肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、鲍曼不动杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌有中度抑制活性。

**关键词** 湖北贝母; 贝母素乙; 内生菌; 次级代谢产物; 抑菌活性; 药用植物; 新型抗菌药物

**中图分类号** R 285.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)06-0027-08

湖北贝母(*Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia)属百合科(Liliaceae)贝母属(*Fritillaria*),野产于湖北恩施地区,民间称之为“板贝”“窑贝”,常作为川贝使用,药用历史悠久<sup>[1]</sup>。湖北贝母具有清热润肺、化痰止咳的功效,常用于治疗热痰咳嗽、痰核瘰疬、痈肿疮毒等症状<sup>[2]</sup>。现代药理学实验表明,湖北贝母具有抑菌<sup>[3]</sup>、降压<sup>[4]</sup>、镇咳平喘<sup>[5]</sup>等功效。贝母素乙是贝母中的重要生物碱成分之一,是《中国药典》中规定的贝母品质定量检测指标,在抑制结肠癌<sup>[6]</sup>、缓解心肌炎<sup>[7]</sup>、减轻肺损伤<sup>[8]</sup>等方面有显著作用。植物内生菌主要包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌三类微生物,在长期的进化中与宿主植物“协同进化”,形成互利共生关系<sup>[9]</sup>。已有研究发现药用植物中多种重要药用成分紫杉醇、长春花碱、龙血碱、异大戟素和巨大戟醇等均受到植物内生菌诱导合成或积累调控<sup>[10]</sup>。此外,内生菌能产生具有生物活性的代谢产物,如抗氧化类<sup>[11]</sup>、抗菌类<sup>[12]</sup>、抗肿瘤类<sup>[13]</sup>、生长调节类<sup>[14]</sup>等物质,在医药和农业方面具有重要意义。

贝母常以鳞茎入药,在其枯萎期采摘,此时贝母地上部分包括花、叶均已枯萎凋落<sup>[15]</sup>,利用率不高,造成了贝母资源的浪费。截至目前,关于湖北贝母内生菌、次级代谢产物及其抑菌活性的相关研究尚无文献报道。本文通过研究湖北贝母不同组织中活性成分含量、内生菌组成及其次级代谢产物活性,以为湖北贝母资源的合理开发利用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

选择30株1年生、长势一致的湖北贝母健康植株,株高30~40 cm,鳞茎直径2.0~3.0 cm,通过五点采样法于2021年4月15日上午10:00在湖北省恩施市三岔镇采集,由湖北省农业科学院中药材研究所鉴定。标准品贝母素乙和抗生素氨苄青霉素,从阿拉丁试剂有限公司购买;二甲基亚砜、EDTA、苯酚、三氯甲烷、无水乙醇等,从天津科密欧化学试剂有限公司购买。

收稿日期:2021-07-28

基金项目:湖北省重点研发计划项目(2020BCA059);湖北省现代农业产业技术体系(HBHZD-ZB-2020-005);湖北省农业科学院中药材研究所2019年青年基金项目(2019ZYCJJ05)

袁名远,E-mail:1748898770@qq.com

通信作者:李宇,E-mail:977956996@qq.com

10 株供试细菌(表 1)由中国科学院热带海洋生  
物资源与生态重点实验室鉴定和提供。

DFY-1000 中草药磨粉机(温岭市林大机械有

限公司),TS-200B 恒温摇床(上海精其仪器有限公  
司),BSD-400 震荡培养箱(上海博迅实业有限公司

医疗设备厂),RE-200A 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪

表 1 供试革兰阳性菌和革兰阴性菌类型

Table 1 Tested gram-positive and gram-negative bacteria

中文名 Chinese name	拉丁文名 Latin name	细菌类型 Bacteria types
耐甲氧西林表皮葡萄球菌	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	G <sup>+</sup>
肺炎克雷伯菌	<i>Klebsiella pneumonia</i> (ATCC 13883)	G <sup>-</sup>
粪链球菌	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	G <sup>+</sup>
多耐铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	G <sup>+</sup>
鲍曼不动杆菌	<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 19606)	G <sup>-</sup>
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 19659)	G <sup>+</sup>
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	G <sup>+</sup>
藤黄微球菌	<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 4698)	G <sup>+</sup>
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 43300)	G <sup>+</sup>
苏云金芽孢杆菌	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ATCC 10792)	G <sup>+</sup>

注:“G<sup>+</sup>”:革兰阳性菌,“G<sup>-</sup>”:革兰阴性菌。Note:“G<sup>+</sup>”:Gram-positive bacteria,“G<sup>-</sup>”:Gram-negative bacteria.

器有限公司),DZF-6020 真空干燥箱(上海一恒科学  
仪器有限公司),HP4500 酶标仪(北京华安麦科生  
物技术有限公司)等。

## 1.2 不同组织中贝母素乙含量检测方法

供试样品制备:湖北贝母洗净除杂,鳞茎、花、叶  
分别装盘置于 40 ℃ 恒温干燥箱干燥,粉碎后过筛  
(筛孔直径 0.27 mm),按料液质量体积比 1:50  
(g/mL)加入乙酸乙酯,超声功率 500 W 下超声 30  
min,经减压浓缩、真空干燥得不同组织提取物浸  
膏。分别取适量浸膏用乙酸乙酯充分溶解,12 000  
r/min 离心 10 min,吸取上清液进样分析,以分析纯  
乙酸乙酯进样作为对照组。

色谱条件:Agilent 19091S-433 毛细管柱(HP-  
5MS 5% Phenyl Methyl Silox, 30 m × 250 μm)。  
升温程序:初始温度 100 ℃,保持 3 min;3~15 min,  
从 100 ℃ 升至 280 ℃;15~20 min,温度保持 280 ℃ 不  
变;20~35 min,从 280 ℃ 升至 310 ℃;35~40 min,温  
度保持 310 ℃ 不变。进样口温度为 310 ℃,载气为高  
纯度氦气(99.999%),流速为 1.8 mL/min,进样量为  
5 μL,不分流。

采用气相色谱(GC)外标法<sup>[16]</sup>检测湖北贝母鳞  
茎、花、叶中贝母素乙的含量,设定贝母素乙标准品  
质量浓度分别为 1.13、2.25、4.50、6.75、9.00、11.25  
mg/mL。分别进行精密度和重复性实验,每个样品  
重复 6 次,计算回收率和相对标准偏差,公式如下:

$$C = \frac{nV}{m}$$

式中,C 为不同组织中贝母素乙的含量,mg/g;  
n 为气相色谱检测的质量浓度,mg/mL;V 为不同

组织供试液体积,mL;m 为不同组织供试样品质  
量,g。

## 1.3 内生菌的分离鉴定

湖北贝母全株表面洗净,4%次氯酸钠溶液消  
毒,75%乙醇浸泡 5 min;无菌水冲洗 5~7 次,培养  
观察,确认彻底消毒。无菌条件下将贝母全株于  
2 mL 无菌水中轻柔研磨成悬浮液,稀释涂布培养,  
(28 ± 2) ℃ 培养 7 d,采用划线法纯化获得单克  
隆<sup>[17]</sup>。将纯化的内生菌单克隆接入 LB 培养基,  
28 ℃、180 r/min 培养 24~48 h,提取内生菌基因组  
DNA 为模板,27F、1492R 引物扩增细菌 16S rDNA  
序列,ITS1、ITS4 引物扩增真菌 ITS 序列,扩增产  
物送武汉奥科鼎盛公司测序,将测序结果在 Gen-  
Bank 中进行 BLSAT 分析,获得与菌株同源的 16S  
rDNA、ITS 序列,采用 MEGA-X 7.0<sup>[18]</sup> 软件中的邻  
接法构建内生真菌和细菌的系统发育树。

## 1.4 内生菌代谢产物抑菌活性测定

运用琼脂扩散法<sup>[19]</sup>测试 4 种内生菌次级代谢  
产物的抑菌活性,配制 4 种次级代谢产物测试液  
(100 mg/mL);设置阳性对照组(氨苄青霉素)和阴  
性对照组(DMSO 溶液),测量抑菌圈直径,直径 ≥  
20 mm 的判断为高敏,10~20 mm 为中敏,≤10  
mm 为轻敏或耐药。运用微量二倍稀释法<sup>[20]</sup>测定 4  
种内生菌次级代谢产物对供试菌的最小抑菌质量浓  
度(minimal inhibitory concentration, MIC)和最小  
杀菌质量浓度(minimal bactericidal concentration,  
MBC),设阳性对照组(加入 100 μg/mL 氨苄青霉  
素),每组重复 3 次,计算 MIC 和 MBC 值<sup>[21]</sup>。

### 1.5 数据分析

试验数据运用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,以“平均值±标准差”表示, $P<0.05$  表示差异显著, $P<0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同组织中的贝母素乙含量

通过外标法检测到贝母素乙检出限、定量限分别为 15.77、57.27  $\mu\text{g/mL}$ 。得到线性回归方程  $Y=900.30X-49.25$  ( $R^2=0.9996$ ),表明贝母素乙在 1.13~11.25  $\text{mg/mL}$  线性关系良好,适用于分析测定。分别向一定量鳞茎、花、叶供试液中准确添

加适量贝母素乙标准品使其质量浓度分别达到 1.79、0.78、3.20  $\text{mg/mL}$ ,采用相同色谱条件进行定量检测,计算得出其加样回收率分别为 97.6%、97.4%、98.1%,相对标准偏差 RSD 分别为 1.18%、1.78%、2.70%,表明气相色谱法回收率较好,准确度较高。

如表 2 所示,气相色谱法检测到湖北贝母鳞茎、花、叶中贝母素乙含量分别为  $2.24\pm 0.17$ 、 $0.94\pm 0.13$ 、 $3.99\pm 0.10$   $\text{mg/g}$ ,说明不同组织中贝母素乙含量具有显著性差异,叶中含量最高,鳞茎次之,花中含量最低,其中贝母叶的含量为鳞茎的 1.78 倍,为花的 4.24 倍。

表 2 湖北贝母不同组织中贝母素乙含量

Table 2 Content of peiminine B of different tissue of *F. hupehensis*

组织 Tissues	检测质量浓度/( $\text{mg/mL}$ ) Detection concentration	回收率/% Recovery rate	相对标准偏差/% RSD	平均含量/( $\text{mg/g}$ ) Average content
鳞茎 Bulbs	$0.89\pm 0.07$	97.6	1.18	$2.24\pm 0.17\text{b}$
花 Flowers	$0.38\pm 0.05$	97.4	1.78	$0.94\pm 0.13\text{c}$
叶 Leaves	$1.60\pm 0.04$	98.1	2.70	$3.99\pm 0.10\text{a}$

注:不同小写字母表示差异显著。Note: The different lowercase represents the significant differences.

### 2.2 内生菌鉴定及系统发育树构建

对从湖北贝母全株中分离的 1 株内生细菌 (BM-X-6) 和 3 株内生真菌 (BM-Z-1、BM-Z-3、BM-Z-5) 样品的 16S rDNA 和 ITS 序列进行扩增、测序,获得其序列信息,其碱基对全长分别为 1 447、596、590、618 bp。利用 Blast 软件与 NCBI 数据库

中序列进行同源比对,选取相似性 $\geq 98\%$ 的菌种,应用 MEGA-X 7.0 软件,选择邻接法,利用极大似然估计法构建内生菌系统发育树(进行 1 000 次自展检测,Bootstrap 值 $\geq 80\%$ )基因组的遗传变异度为 0.5(图 1、图 2)。

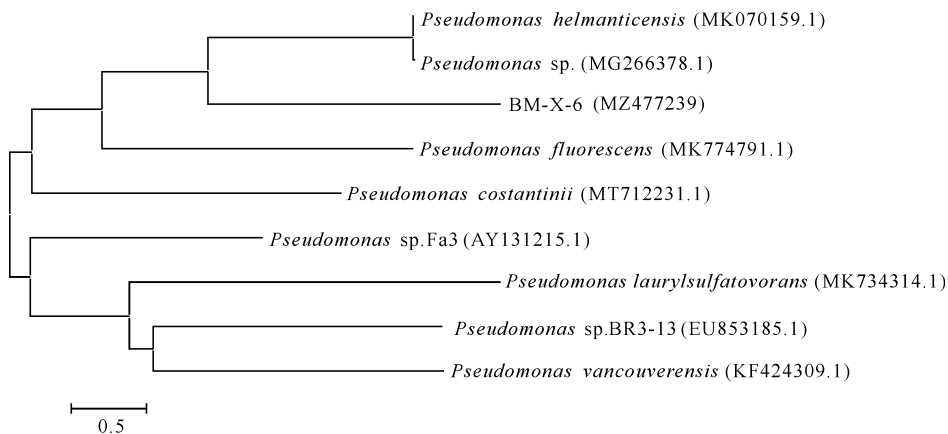


图 1 基于 16S rDNA 序列构建的湖北贝母内生细菌系统发育树

Fig.1 16S rDNA phylogenetic tree of endophytic bacteria of *F. hupehensis*

将 BM-X-6 内生细菌扩增序列提交到 GenBank,获得登录号为 MZ477239。由图 1 湖北贝母内生细菌系统发育树可见, BM-X-6 与假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的亲缘关系最近,其中 BM-X-6 与 *Pseudomonas* sp. (MG266378.1) 序列相似性最高,为 99.03%,与

*Pseudomonas helmanticensis* (MK070159.1) 和 *Pseudomonas fluorescens* (MK774791.1) 等序列相似性也分别达到 98.38% 和 98.95%; 据此可以初步将 BM-X-6 鉴定为假单胞菌属菌株,并命名为 *Pseudomonas* sp. BM-X-6。

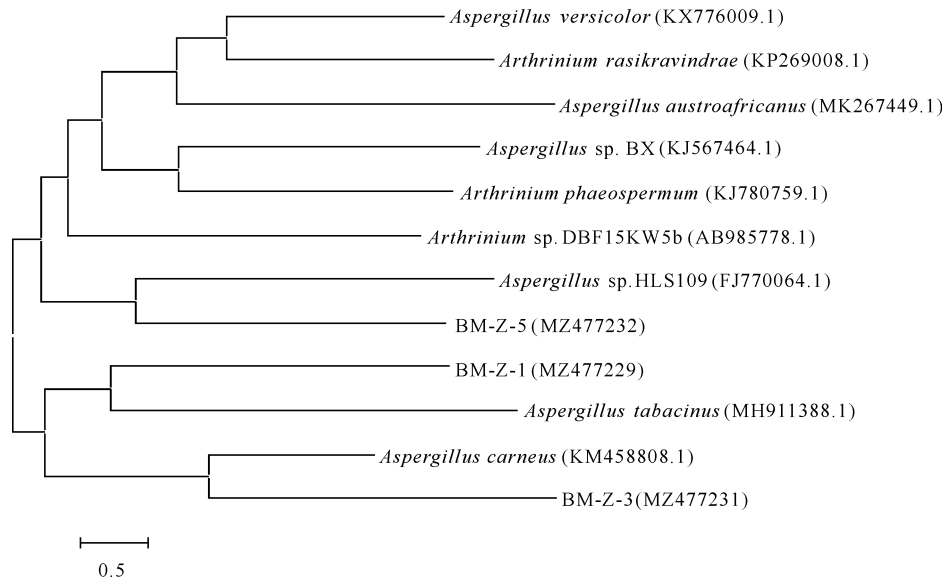


图 2 基于 ITS 序列构建的湖北贝母内生真菌系统发育树

Fig.2 ITS phylogenetic tree of endophytic fungi of *F. hupehensis*.

将 BM-Z-1、BM-Z-3、BM-Z-5 这 3 种内生真菌扩增序列提交到 GenBank, 获得登录号分别为: MZ477229、MZ477231、MZ477232。由图 2 系统发育树可见, 3 株内生菌与曲霉属 (*Aspergillus*) 或节菱孢霉属 (*Arthrinium*) 存在进化关系。通过对比, BM-Z-5 与 *Arthrinium rasikravindrae* (KP269008.1) 序列相似性最高, 为 98.05%; BM-Z-1 与 *Aspergillus versicolor* (KX776009.1) 等多个序列相似性较高, 且与 *Aspergillus tabacinus* (MH911388.1) 聚为一簇; BM-Z-3 与 *Aspergillus* sp. BX (KJ567464.1) 等多个序列相似性较高, 且与 *Aspergillus carneus* (KM458808.1) 聚为一簇, 此外 BM-Z-1、BM-Z-3 还属于同一个分支。综上, 可以将 BM-Z-5 初步鉴定为节菱孢霉属菌株, 将其命名为 *Arthrinium* sp. BM-Z-5; 将 BM-Z-1、BM-Z-3 初步鉴定为曲霉属菌株, 并分别命名为 *Aspergillus* sp. BM-Z-1、*Aspergillus* sp. BM-Z-3。

### 2.3 内生菌次级代谢产物抑菌活性分析

如表 3 所示, 琼脂扩散法结果表明, 4 种内生菌次级代谢产物对 10 株供试菌有不同的抑菌活性, 抑菌圈直径越大说明抑菌效果越强。 *Aspergillus* sp. BM-Z-1、*Aspergillus* sp. BM-Z-3、*Arthrinium* sp. BM-Z-5 及 *Pseudomonas* sp. BM-X-6 这 4 种次级代谢产物分别对 2、3、9、1 株供试菌具有中度抑制作用 (抑菌圈直径  $\geq 10$  mm)。其中 *Arthrinium* sp. BM-Z-5 次级代谢产物对除枯草芽孢杆菌外的其余 9

株供试菌均有中度抑制作用, 且相较其余 3 种次级代谢产物, 只有 *Arthrinium* sp. BM-Z-5 次级代谢产物能对肺炎克雷伯菌 ( $10.90 \pm 0.56$  mm)、金黄色葡萄球菌 ( $11.56 \pm 0.36$  mm)、藤黄微球菌 ( $10.07 \pm 0.49$  mm)、鲍曼不动杆菌 ( $11.94 \pm 0.21$  mm) 以及具有耐抗生素的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ( $10.67 \pm 0.24$  mm) 等 5 种供试菌起中度抑制作用, 呈广谱抑菌特性, 而 *Aspergillus* sp. BM-Z-1 与 *Pseudomonas* sp. BM-X-6 次级代谢产物只对 2 种供试菌有抑制作用, 抑菌谱最窄; 此外, 所有的内生菌次级代谢产物都对苏云金芽孢杆菌有良好的抑制作用。

采用微量二倍稀释法进一步测定有明显中度抑菌作用的处理组的最小抑菌质量浓度 (MIC) 和最小杀菌质量浓度 (MBC) 值, 结果如表 4 所示。由表 4 可知, 相较其余 3 种次级代谢产物, *Aspergillus* sp. BM-Z-1 次级代谢产物对苏云金芽孢杆菌有最强的抑制效果, 其 MIC 值为 0.36 mg/mL, MBC 值为 5.83 mg/mL。 *Aspergillus* sp. BM-Z-3 次级代谢产物对枯草芽孢杆菌、表皮葡萄球菌的抑制效果较好, 其 MIC 值为 0.50~1.00 mg/mL, MBC 值为 8.04~16.08 mg/mL。 *Arthrinium* sp. BM-Z-5 次级代谢产物对肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、鲍曼不动杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌有中度抑制活性, 其 MIC 值均为 1.59 mg/mL, MBC 值为 12.76~25.52 mg/mL。



表 3 湖北贝母内生菌次级代谢产物的抑菌圈直径

**Table 3 Inhibition zone diameter of secondary metabolites of endophytic of *F. hupehensis*** mm

供试菌株 Strains	阳性对照 Positive control	内生真菌 Endophytic fungi			内生细菌 Endophytic bacteria
		BM-Z-1	BM-Z-3	BM-Z-5	BM-X-6
肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumonia</i>	18.65±0.69b	—	—	10.90±0.56a	—
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	12.32±0.34a	—	—	11.56±0.36a	—
粪链球菌 <i>E. faecalis</i>	—	—	9.47±0.37a	10.96±0.11a	—
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	14.94±0.35b	—	16.18±1.15c	—	9.46±0.07a
藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	12.55±0.52a	—	—	10.07±0.49b	—
苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	10.14±0.11a	14.77±0.58b	16.92±0.54c	11.73±0.56a	14.96±0.44b
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	—	—	—	10.67±0.24a	—
多耐铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	10.78±0.32a	—	9.56±0.35a	10.63±0.43a	—
耐甲氧西林表皮葡萄球菌 Methicillin-resistant <i>S. epidermidis</i>	13.67±0.01b	11.40±1.29a	14.38±0.88b	10.94±0.43a	—
鲍曼不动杆菌 <i>A. baumannii</i>	11.90±4.81a	—	—	11.94±0.21a	—

注：“—”表示在试验浓度范围内抑菌圈不明显；同一行中不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note: “—” represents that no obvious inhibition zone in the test concentration range; the different lowercase represents significant differences in a raw.

表 4 湖北贝母内生菌次级代谢产物的最小抑菌质量浓度和最小杀菌质量浓度

**Table 4 MIC and MBC of secondary metabolites of endophytic of *F. hupehensis*** mg/mL

供试菌株 Strains	最小抑菌质量浓度 MIC				最小杀菌质量浓度 MBC			
	内生细菌 Endophytic bacteria		内生细菌 Endophytic bacteria		内生真菌 Endophytic fungi		内生细菌 Endophytic bacteria	
	BM-Z-1	BM-Z-3	BM-Z-5	BM-X-6	BM-Z-1	BM-Z-3	BM-Z-5	BM-X-6
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	—	—	1.59	—	—	—	12.76	—
粪链球菌 <i>E. faecalis</i>	—	—	1.59	—	—	—	25.52	—
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	—	0.50	—	—	—	8.04	—	—
苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	0.36	0.50	1.59	1.95	5.83	8.04	12.76	15.60
耐甲氧西林表皮葡萄球菌 Methicillin-resistant <i>S. epidermidis</i>	—	1.00	1.59	—	—	16.08	25.52	—
鲍曼不动杆菌 <i>A. baumannii</i>	—	—	1.59	—	—	—	12.76	—

注：“—”表示在试验浓度范围内无 MIC 或 MBC。Note: “—” represents that no MIC or MBC in the test concentration range.

### 3 讨论

湖北贝母作为恩施地区地道药材,使用历史悠久,但其药用部位仅采用鳞茎,而花、叶等非药用部位在采收时被丢弃<sup>[22-24]</sup>。笔者研究发现,湖北贝母不同组织中贝母素乙的含量差异巨大,叶中贝母素乙的含量远高于鳞茎和花。这说明叶、花等地上部分均具有高含量的生物碱活性成分,具有药用前景和潜在的经济价值,可为湖北贝母资源的综合开发利用提供新的思路。

内生菌长期生活在宿主植物体内,是植物微生态系统不可缺少的部分之一。植物内生菌在与植物长期协同进化过程中形成了丰富的微生物资源,不同植物体、甚至同一植物体不同器官中内生菌的多样性和组成都不尽相同<sup>[25]</sup>。

笔者从湖北贝母中分离出 1 株假单胞菌

*Pseudomonas* sp. BM-X-6, 1 株节菱孢霉菌 *Arthrrium* sp. BM-Z-5, 2 株曲霉菌 *Aspergillus* sp. BM-Z-1、*Aspergillus* sp. BM-Z-3。同时,这 3 个内生菌属也在浙贝母<sup>[26]</sup>、甘蔗<sup>[27]</sup>、夹竹桃<sup>[28]</sup>等植物体中被发现。

药用植物与其体内的内生菌之间存在复杂的微生态关系,诱导、胁迫药用植物或者自身能产生抑菌、抗病毒、杀虫、抗氧化、生长调节等物质,提高宿主植物抗逆、抗胁迫和抗病害的能力<sup>[29-30]</sup>。本研究抑菌结果表明,湖北贝母中分离出的不同内生真菌和内生细菌次级代谢产物均有抑菌活性,但是有较大差异。其中 *Arthrrium* sp. BM-Z-5 次级代谢产物抑菌谱最广,且对革兰阳性细菌如金黄色葡萄球菌、粪链球菌、苏云金芽孢杆菌、耐甲氧西林表皮葡萄球菌和鲍曼不动杆菌共 5 株供试菌有良好的抑制效果。有学者研究发现:从白芨中分离鉴定的 1

株假单胞菌对藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌以及大肠杆菌等有抑菌活性<sup>[31]</sup>；从紫玉盘中分离鉴定的1株节菱孢霉菌对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有一定的抑制效果<sup>[32]</sup>；从竹荪中分离鉴定的1株曲霉菌对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等具有较强的抑制能力<sup>[33]</sup>。笔者所在课题组前期研究中分离的4株内生菌与这些文献所报道的内生菌虽在同一属，但是抑菌活性的差异较大，推测是其次级代谢产物成分不同所致<sup>[34]</sup>。

后续将进一步构建湖北贝母无菌愈伤组织、无菌组培苗，再通过共培养4株内生菌的方式研究内生菌对湖北贝母中贝母素乙等生物碱类化合物生物合成与积累的影响规律，并对这些内生菌次级代谢产物的抑菌活性成分进行分离鉴定，以期开发新型抗菌药物、缓解菌株耐药性提供参考依据。

## 参考文献 References

- [1] 魏梦佳,赵佳琛,赵鑫磊,等.经典名方中贝母类药材的本草考证[J].中国现代中药,2020,22(8):1201-1213.WEI M J,ZHAO J C,ZHAO X L,et al.Textual research on *Fritillariae Bulbus* in Chinese classical prescription[J].Modern Chinese medicine,2020,22(8):1201-1213(in Chinese with English abstract).
- [2] 中国药典委员会.中国药典[S].北京:化学工业出版社,2020:271.Chinese Pharmacopoeia Commission.Chinese Pharmacopoeia [S].Beijing:Chemical industry press,2020:271(in Chinese).
- [3] 方诗琪,李宇,黄东海,等.湖北贝母石油醚段的抗菌活性和化学成分研究[J].湖北农业科学,2020,59(22):160-165.FANG S Q,LI Y,HUANG D H,et al.Study on compositions and antibacterial activities of petroleum ether extracts from *Fritillaria hupehensis* Hsiao et K.C.Hsia[J].Hubei agricultural sciences,2020,59(22):160-165(in Chinese with English abstract).
- [4] 徐定平,吴晶晶,周鑫堂,等.湖北贝母化学成分和药理作用研究进展[J].中国药业,2015,24(6):92-94.XU D P,WU J J,ZHOU X T,et al.Research advance in chemical constituents and pharmacological effects of *Fritillaria hupehensis* Hsiao [J].China pharmaceuticals,2015,24(6):92-94(in Chinese with English abstract).
- [5] 张勇慧,阮汉利,皮慧芳,等.湖北贝母生物碱单体的镇咳、祛痰和平喘作用[J].中草药,2005,36(8):1205-1207.ZHANG Y H,RUAN H L,PI H F,et al.Antitussive,expectorant and asthmatic effects of alkaloid monomer in *Fritillaria hupehensis* Hsiao et K.C.Hsia[J].Chinese herbal medicine,2005,36(8):1205-1207(in Chinese).
- [6] 张喆,何勤思,吴晨雯,等.中药提取物贝母素乙对人结肠癌 HCT-116 细胞基因表达的影响[J].中医杂志,2016,57(17):1504-1509.ZHANG Z,HE Q S,WU C W,et al.Effects of Chinese herb extracts peiminine on gene expression of HCT-116 cells in patients with colon cancer[J].Journal of traditional Chinese medicine,2016,57(17):1504-1509(in Chinese with English abstract).
- [7] 黄亚萍,肖惠玲,李艳红,等.贝母素乙抑制 MEK/ERK 的磷酸化对新生小鼠柯萨奇 B 病毒性心肌炎心肌细胞凋亡和炎症水平的影响[J].中药药理与临床,2020,36(1):94-99.HUANG Y P,XIAO H L,LI Y H,et al.Effects of peiminine inhibiting MEK/ERK phosphorylation on cardiomyocyte apoptosis and inflammation level in neonatal mice with *Coxsackie virus* B myocarditis[J].Pharmacology and clinics of Chinese materia medica,2020,36(1):94-99(in Chinese with English abstract).
- [8] 王晶晶,李玉兰,童茜,等.贝母素乙预处理对小鼠机械通气相关性肺损伤的影响[J].中华麻醉学杂志,2018(4):505-508.WANG J J,LI Y L,TONG Q,et al.Effects of peiminine preconditioning on ventilator-induced lung injury in mice[J].Chinese journal of anesthesiology,2018(4):505-508(in Chinese).
- [9] 孔德崑,牛若超,毛彦芝,等.植物内生菌活性代谢物研究进展[J].黑龙江农业科学,2019(12):151-154.KONG D W,NIU R C,MAO Y Z,et al.Research progress on active metabolites of endophytes[J].Heilongjiang agricultural sciences,2019(12):151-154(in Chinese with English abstract).
- [10] 李林,上官艳妮,黄惻隐,等.白及愈伤组织与内生真菌共培养及次生代谢产物含量变化[J].北方园艺,2021(14):128-134.LI L,SHANGGUAN Y N,HUANG C Y,et al.Co-culture system of *Bletilla striata* callus with endophytic fungi and changing contents of secondary metabolites[J].Northern horticulture,2021(14):128-134(in Chinese with English abstract).
- [11] 冯书珍,谢广燕,刘南英,等.两种海藻内生菌的分离及其抗氧化活性研究[J].食品与生物技术学报,2020,39(6):99-105.FENG S Z,XIE G Y,LIU N Y,et al.Isolation and antioxidative activities of algal endophytes[J].Journal of food science and biotechnology,2020,39(6):99-105(in Chinese with English abstract).
- [12] 刘萍,王祖华,张七,等.金黄色葡萄球菌拮抗菌株的筛选鉴定及其抗菌物质分析[J].微生物学通报,2020,47(5):1544-1551.LIU P,WANG Z H,ZHANG Q,et al.Screening and identification of antagonistic strains against *Staphylococcus aureus* [J].Microbiology China,2020,47(5):1544-1551(in Chinese with English abstract).
- [13] 李俊峰,刘文洪,张贝贝,等.铁皮石斛内生菌的分离及代谢产物活性的初步研究[J].中华中医药杂志,2016,31(3):970-974.LI J F,LIU W H,ZHANG B B,et al.Preliminary study on separation of endophytes from *Dendrobium officinale* and activity of metabolites[J].China journal of traditional Chinese medicine and pharmacy,2016,31(3):970-974(in Chinese with English abstract).
- [14] 丁绍武,张鹏,刘梦铭.植物内生菌对植物生长的影响研究进展[J].现代农业科技,2020(11):132-134.DING S W,ZHANG P,LIU M M.Research progress on the effects of endophytes on plant growth [J].Modern agricultural science and technology,2020(11):132-134(in Chinese).

- [15] 彭芳,贺正,祁妹俄波,等.暗紫贝母栽培关键技术研究[J].安徽农业科学,2021,49(4):166-168,179.PENG F, HE Z, QI M E B, et al.Study on the key techniques in cultivation of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K.C.Hsia[J].Journal of Anhui agricultural sciences,2021,49(4):166-168,179(in Chinese with English abstract).
- [16] LI S L, LI P, LIN G, et al.Simultaneous determination of seven major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by gas chromatography[J].Journal of chromatography A,2000,873(2):221-228.
- [17] 宋发军,甘喆,裴婷,等.重楼根内生细菌的多样性分析及促生菌的筛选[J].中南民族大学学报(自然科学版),2020,39(3):250-254.SONG F J, GAN Z, PEI T, et al.Diversity analysis of endophytic bacteria in roots of *Paris Polyphylla* and screening of growth-promoting bacteria[J].Journal of South-Central University for Nationalities (natural science edition),2020,39(3):250-254(in Chinese with English abstract).
- [18] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al.MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J].Molecular biology and evolution,2018,35(6):1547-1549.
- [19] 包怡红,张俊顺,符群,等.细叶小檗果小檗碱抑菌性能及机理[J].食品科学,2020,41(17):29-34.BAO Y H, ZHANG J S, FU Q, et al.Antibacterial activity and mechanism of berberine from the fruit of *Berberis poiratii* [J].Food science,2020,41(17):29-34(in Chinese with English abstract).
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically[S].Wayne,PA:CLSI,2015.
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S].Wayne,PA:CLSI,2016.
- [22] 陈文君,郑卫红,项颖华.浙贝母花、地上茎与鳞茎总生物碱、总皂苷含量测定的比较[J].浙江中医药大学学报,2008,32(4):530-531.CHEN W J, ZHENG W H, XIANG Y H. Content measurement of bulb total alkaloid and saponin in Zhejiang fritillariae and thunbergii[J].Journal of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine,2008,32(4):530-531(in Chinese with English abstract).
- [23] 张鹏葛,盛萍,任慧梅.不同产地和生长年限伊贝母地上部位与鳞茎生物碱含量研究[J].安徽农业科学,2015,43(19):82-83,140.ZHANG P G, SHENG P, REN H M. Studies on determination of total alkaloids in aerial parts and bulb of *Fritillaria pallidiflora* in different origins and years[J].Journal of Anhui agricultural sciences,2015,43(19):82-83,140(in Chinese with English abstract).
- [24] 张鹏葛,盛萍,任慧梅.新疆贝母属8种药用贝母地上部位与鳞茎生物碱含量差异研究[J].中国野生植物资源,2016,35(1):12-15.ZHANG P G, SHENG P, REN H M. Studies on determination of total alkaloids in aerial parts and bulb of eight medicinal plants of *Fritillaria* from Xinjiang[J].Chinese wild plant resources,2016,35(1):12-15(in Chinese with English abstract).
- [25] 游静,赵梅华,周勇,等.药食同源植物及其内生菌关系的研究进展[J].粮食科技与经济,2019,44(12):132-133.YOU J, ZHAO M H, ZHOU Y, et al.Research progress on the relationship between medicinal and edible homologous plants and endophytes[J].Grain science and technology and economy,2019,44(12):132-133(in Chinese).
- [26] 彭三妹,王博林,路京,等.浙贝母中内生菌的多样性及组成分析[J].浙江中医药大学学报,2014,38(9):1091-1097,1102.PENG S M, WANG B L, LU J, et al.Diversity and structure of endophyte in vegetative organs of *Fritillia thunbergii* [J].Journal of Zhejiang Chinese Medical University,2014,38(9):1091-1097,1102(in Chinese with English abstract).
- [27] 林羽浩.四株植物内生菌的代谢物及生物活性研究[D].昆明:云南中医学院,2018.LIN Y T. Chemical investigation of metabolites from four strains of plant endophytes and their biological activities[D].Kunming:Yunnan University of Traditional Chinese Medicine,2018(in Chinese with English abstract).
- [28] 朱美林,王皓天,黄雪南,等.夹竹桃活性内生真菌的分离筛选及菌株 *Aspergillus* sp.次级代谢产物的研究[J].山西医科大学学报,2020,51(9):982-985.ZHU M L, WANG H T, HUANG X N, et al.Isolation and screening of bioactive endophytic fungi from *Nerium oleander* and study on the secondary metabolites of *Aspergillus* sp.[J].Journal of Shanxi Medical University,2020,51(9):982-985(in Chinese with English abstract).
- [29] 张国荣,翟丽霞,王燕萍,等.药用植物内生菌次级代谢产物药理作用研究进展[J].中国药房,2021,32(7):880-884.ZHANG G R, ZHAI L X, WANG Y P, et al.Research progress on pharmacological action of secondary metabolites of endophytes in medicinal plants [J].China pharmacy,2021,32(7):880-884(in Chinese).
- [30] 范丽霞,郑继平,白新鹏.药用植物内生菌及其对道地药材影响的研究进展[J].安徽农业科学,2012,40(22):11221-11223,11467.FAN L X, ZHENG J P, BAI X P. Research advances in medicinal plant endophyte and its effects on geoherts[J].Journal of Anhui agricultural sciences,2012,40(22):11221-11223,11467(in Chinese with English abstract).
- [31] 王红莹,李春燕,宋发军,等.一株白及内生细菌的分离鉴定及抑菌机理初步研究[J].中南民族大学学报(自然科学版),2021,40(3):246-251.WANG H Y, LI C Y, SONG F J, et al.Isolation and identification of an endophytic bacterium from *Bletilla striata* and preliminary study of antibacterial mechanism[J].Journal of South-Central University for Nationalities (natural science edition),2021,40(3):246-251(in Chinese with English abstract).
- [32] 周燕燕,李浩华,谭国慧,等.紫玉盘内生真菌 *Arthrinium* sp.的次级代谢产物研究[J].中药材,2014,37(11):2008-2011.ZHOU Y Y, LI H H, TAN G H, et al.Study on secondary metabolites of endophytic fungus *Arthrinium* sp. A092 from *Uvaria microcarpa* [J].Journal of Chinese medicinal materials,2014,37(11):2008-2011(in Chinese with English abstract).

- [33] 王智颖,孙坤来.浒苔来源真菌 *Aspergillus versicolor* ZJOU-SKL-02 次级代谢产物及其活性研究[J].中国海洋药物,2020,39(4):16-22.WANG Z Y,SUN K L.Studies on the secondary metabolites of *Aspergillus versicolor* ZJOU-SKL-02 and their activities[J].Chinese journal of marine drugs,2020,39(4):16-22(in Chinese with English abstract).
- [34] 黄磊,高燕燕,许才万,等.药用植物内生菌的多样性及其活性代谢产物功能研究进展[J].贵州林业科技,2019,47(3):59-64.HUANG L,GAO Y Y,XU C W,et al.The research progress of diversity and functions of their active metabolites of endophytes of medicinal plants[J].Guizhou forestry science and technology,2019,47(3):59-64(in Chinese with English abstract).

## Active components of *Fritillaria hupehensis* and secondary metabolites of its endophytes

YUAN Mingyuan<sup>1,2</sup>, LI Yu<sup>1</sup>, TAN Xuhui<sup>1</sup>, LIU Yu<sup>1,2</sup>, FANG Xinyue<sup>1</sup>, RAN Yalan<sup>3</sup>, HE Meijun<sup>1</sup>

1. Institute of Chinese Herbal Medicines, Hubei Academy of Agricultural Sciences/  
Enshi Comprehensive Test Station of National Traditional Chinese Medicine Industry  
Technology System, Enshi 445000, China;

2. College of Biological Science and Technology, Hubei Minzu University,  
Enshi 445000, China;

3. Agricultural and Rural Bureau of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture,  
Enshi 445000, China

**Abstract** Endophytes induced the biosynthesis or accumulation of the active components of the host medicinal plants, making the production and distribution of these active components different in species, organs, tissues and growth stages. *F. hupehensis* was a geo-authentic crude drug in Enshi area with a long medicinal history. Peiminine B was the main active component in *F. hupehensis*, with its functions of anti-colonic cancer, relieving myocarditis, alleviating lung injury and etc. We use gas chromatography (GC) to determine the content of peiminine B in bulbs, flowers and leaves of *F. hupehensis* to explore the content of peiminine B, the composition of endophytes and the antibacterial activity of its secondary metabolites in different tissues of *F. hupehensis*. The 16S rDNA and ITS sequencing were used to identify the species of endophytic bacteria or fungi, respectively. The agar diffusion method and double dilution method were used to study the antibacterial activity of secondary metabolites of endophytes against 10 strains of bacteria tested. The results showed that the content of peiminine B in leaves of *F. hupehensis* was the highest with  $(3.99 \pm 0.10)$  mg/g, which was 1.78 and 4.24 times as much as that in bulb and flower, respectively. Four strains of endophytes were isolated from *F. hupehensis*, identified as *Pseudomonas* sp. BM-X-6, *Arthrimum* sp. BM-Z-5, *Aspergillus* sp. BM-Z-1 and *Aspergillus* sp. BM-Z-3. The secondary metabolites of three endophytic fungi had stronger antibacterial activity than *Pseudomonas* sp. BM-X-6. Meanwhile *Arthrimum* sp. BM-Z-5 had the broadest antibacterial spectrum, which showed moderate antibacterial activities against *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter baumannii* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). It will provide a reference for expanding the medicinal parts and effectively saving resources of *F. hupehensis* and will provide a novel way to alleviate bacterial resistance and develop new antibacterial drugs.

**Keywords** *Fritillaria hupehensis*; peiminine B; endophyte; secondary metabolite; antibacterial activity; medicinal plant; new antibacterial drug