

植物内生真菌的多样性及应用

徐萌, 郭晴雪, 杨 茉, 吕 鑫, 杨斯锦, 马莲菊* (沈阳师范大学生命科学学院, 辽宁沈阳 110034)

摘要 综述了植物内生真菌的多样性以及次生代谢产物的应用, 植物内生真菌资源丰富, 其次生代谢产物种类繁多, 具有促进植物生长、提高植物抗逆性、抑制病原菌、抗癌、降解环境污染物质等功效, 被广泛应用于医学、农业和环保方面, 前景广阔。

关键词 植物内生真菌; 多样性; 次生代谢产物

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)15-0015-03

Diversity and Application of Endophytic Fungi in Plants

XU Meng, GUO Qing-xue, YANG Mo et al (College of Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang, Liaoning 110034)

Abstract We focused on discussing the diversity of endophytic fungi and the application of secondary metabolites. Endophytic fungi are rich in resources, and their secondary metabolites are widely used in medicine, agriculture and environmental protection. They have the advantages on promoting plant growth, improving plant resistance, inhibiting pathogens, anti-cancer and degrading environmental pollutants.

Key words Plant endophytic fungi; Diversity; Secondary metabolites

植物内生真菌(Endophytic fungi)是指在其生活史的部分阶段或全部阶段寄生于健康的植物组织或器官内, 且对植物不表现出明显病害症状的一类真菌^[1]。大多数内生真菌寄生在宿主体内中不会使宿主呈现病态, 而是与宿主在一定程度上达到微调的动态平衡^[2], 从而形成内生真菌与宿主互利共生的关系。一方面在其生长过程中产生的次生代谢产物能够有效提高宿主的抗逆性, 另一方面可以从宿主的体内汲取用于自身生长所需的营养物质^[3]。1898年Guerin^[4]从黑麦草中分离出第1株植物内生真菌, 但在当时并未受到关注, 直至1993年Stroble等^[1]从太平洋红豆杉的韧皮组织中分离出一株能够产紫杉醇的内生真菌, 人们才逐渐把视线转移到植物内生真菌的次生代谢产物。随后的几十年中, 研究人员逐渐发现内生真菌本身以及其次生代谢产物具有促进植物生长、抑制病原菌、降低病虫害威胁、降解污染物等作用, 能够广泛应用于农业生产、医学研究、环境保护等方面。笔者综述了近些年国内外对植物内生真菌的多样性研究及其次生代谢产物的应用方面研究进展, 旨在为植物内生真菌的进一步研究与应用提供参考。

1 植物内生真菌的多样性

植物内生真菌资源广阔, 种类繁多, 有研究表明大部分植物体内都含有1种或者多种内生真菌^[5]。研究人员从众多重要的经济林木, 如杉科和松科植物的树皮和枝叶中分离鉴定出多种植物内生真菌^[6]。Xiong等^[7]在红豆杉中分离鉴定出81株内生真菌, 分属于8个属, 且在其中提取出紫杉醇高产菌属赤霉属(*Fusarium*)和小丛壳属(*Glomerella*)。内生真菌也存在于多种草本植物、经济作物和绝大部分低等植物中^[8]。Dalal等^[9]在研究不同时期大豆植株内生真菌种群的变化关系时, 共分离了630株内生真菌, 分别属于枝顶孢属(*Eucalyptus*)、青霉属(*Penicillium*)和丝核菌属(*Rhizoctonia*)

等7个菌属。国内对于植物内生真菌的研究普遍倾向于药用植物, 谭小明等^[10]从212种药用植物中分离得到376属以上的内生真菌, 其中镰刀菌属(*Fusarium*)、链格孢属(*Alternaria*)、青霉菌属(*Penicillium*)、曲霉菌属(*Aspergillus*)、刺盘孢属(*Cercospora*)、毛壳菌属(*Mushroom genus*)普遍存在, 属于优势菌属。目前已研究的植物内生真菌大多数为子囊菌类(Ascomycetes)的核菌纲(Pyrenomyetes)、盘菌纲(Discomycetes)和腔菌纲(Loculoascomycetes), 无孢菌群的多种真菌及少量担子菌、结核菌和半知菌中常见的镰刀菌属(*Fusarium*)、青霉属(*Penicillium*)、链格孢属(*Alternaria*)等, 主要分布于植物的叶鞘、种子、花、茎、叶片和根等细胞间隙, 多数以叶鞘和种子中分布最广泛, 叶片和根的内生真菌数量极少^[11]。根据内生真菌和宿主之间的专一性分析, 目前自然界至少有100万种内生真菌^[12]。植物内生真菌和其宿主的生物多样性和存在的普遍性也为其研究提供了基本的保障。

2 植物内生真菌应用研究

目前, 对于内生真菌的研究主要包括植物内生真菌次生代谢产物的作用研究和植物内生真菌在与宿主共生时本身对宿主产生的影响, 这2个方面的研究逐渐体现了植物内生真菌的价值多样性。

2.1 医药方面 植物内生真菌的最为人们所熟知的医用价值就是因本身的次生代谢产物中含有抗肿瘤物质, 从而显现出抗肿瘤机制。现有的已知具有抗肿瘤活性较明显的化合物主要有萜类化合物、生物碱类化合物、黄酮类化合物等。

2.1.1 产萜类活性物质。早在20世纪70年代, 美国化学家Wani从美国西部森林中的太平洋紫杉树皮中提取出一种对小鼠肿瘤细胞具有高效活性的二萜类生物碱——紫杉醇^[13], 其对抑制微管的解聚和稳定微管有很好的作用, 是近几十年来治愈肿瘤的重要药物之一。但是紫杉属植物生长周期普遍长, 且紫杉醇的含量极低, 如何在短时间内获得大量紫杉醇成为当时的一大难题。1993年Stroble等^[1]从短叶红豆杉中分离出一株名为安德氏紫杉霉(*Taxomyces andreae*)的内生真菌, 并从其发酵产物中提取出紫杉醇, 这一发现为提取和生产紫杉醇提供了新的方法。此后研究人员分别

基金项目 国家自然科学基金项目(31270369, 31600314); 沈阳市科学技术计划项目(F16-205-1-50)。

作者简介 徐萌(1994—), 女, 辽宁普兰店人, 硕士研究生, 研究方向: 资源与应用微生物学。*通讯作者, 副教授, 博士, 从事资源与应用微生物学研究。

收稿日期 2018-01-28

从不同地区红豆杉、紫杉以及松科植物中相继发现能够产生紫杉醇的内生真菌,分别属于茎点霉属(*Phoma*)、拟盘孢属(*Pseudomonas* sp.)等^[14-18]。项勇等^[19]从东北红豆杉中分离出的链格孢属(*Alternaria* sp. 1011)菌种的发酵代谢产物中提取出紫杉烷类二萜Ⅲ型化合物,其可有效抑制肺癌细胞生长^[20]。

2.1.2 产生物碱类活性物质。长春新碱(vincristine)是一种二聚吲哚类化合物,早在1962年被发现存在于长春花叶中。长春新碱可以通过抑制癌细胞中纺锤体的形成干扰细胞的有丝分裂,有效防止癌细胞的扩散。长春新碱的临床应用比较广泛,对白血病的治疗有显著功效^[21]。杨显志等^[22]从长春花叶内生真菌中筛选出产生长春新碱的菌株97CY3,经高效液相色谱法(HPLC)测定长春新碱含量为0.205 $\mu\text{g/L}$ 。

球毛壳甲素A^[23]是20世纪80年代发现的一种能够抗癌的生物碱类活性物质,其作用机理是通过干扰癌细胞内的收缩蛋白从而达到抑制细胞分裂的目的。邱大任^[24]从61株银杏内生真菌中筛选出一株高效菌,能够在次生代谢产物中提取到球毛壳甲素。但目前国内对于其的研究仍然较少。

2.1.3 产其他抗肿瘤活性物质。随着研究的深入,人们发现更多的内生真菌代谢产物具有抗肿瘤效果。阮丽军等^[25]从植物内生真菌HCCB00189的次生代谢产物中提取到大豆异黄酮的主要成分4',7-二羟基异黄酮和4,5,7-三羟基异黄酮,对肿瘤细胞A549和LoVo有明显的抑制作用。云南八角莲、川八角莲、桃儿七的内生真菌刺状毛霉具有较高的抗癌活性,且这些植物的地下茎内生真菌的抗癌活性成分是独立的^[26]。陈旭等^[27]在马比木植物中分离提取出一株木霉属(*Trichoderma* sp.)的内生真菌GX-8,在其发酵产物中得到一种甾类化合物,对人非小细胞肺癌细胞株A549和人前列腺癌细胞株PC3的增殖有一定的抑制作用。植物内生真菌作为一种微生物来源的抗癌活性产物的新途径,为医学等方面提供了新的药源。

2.2 农业方面

2.2.1 产促生长类活性物质。大多数植物内生真菌及其代谢产物都具有促进植物生长的功效,若能将这些促生长作用明显的菌株应用在农业方面,将对作物产量的提高有较大作用。王维^[28]利用从半夏中分离出的5株内生真菌的发酵液对4种常见蔬菜进行了种子萌发试验,发现PI-Z01对4种蔬菜的种子萌发普遍具有促进作用,产生代谢产物IAA的最高浓度可达9.86 $\mu\text{g/mL}$,且被处理过的植株长势普遍较好。从铁皮石斛中分离出的内生真菌Tj2,对铁皮石斛的地上根系生长、株高增加、新芽和新叶的萌发等具有明显的促进作用,有效缓解了铁皮石斛生长缓慢、自身繁殖率低等问题^[29]。内生真菌促生长的作用机制除了产生IAA外,还可以作用于植物的叶绿体或其他代谢途径,起到间接促进生长的作用。从碱蓬中分离提取的内生真菌JP3,菌株自身及其发酵液可显著提高水稻幼苗叶片中的叶绿素含量,促进植物体内有机物的积累,对水稻幼苗株高和干重有显著影响^[30]。

2.2.2 产抑菌类活性物质。抑制病原菌的生长是防治作物病害的最好途径,目前国内采用预防病原菌的方法主要是施用化学药剂,不仅提高了病原菌的抗性,而且会对人体造成危害。研究发现内生真菌的代谢产物,如几丁质酶、脂肽等,能够抑制病原菌的入侵^[31]。王瑞珍^[32]在银杏的枝叶中分离出一株真菌M50,其对稻瘟病菌、白菜炭疽、莴苣菌核等病原真菌具有强烈的抑制作用。有研究者在对厚朴内生真菌黑孢霉HPFJ3的研究中发现其次生代谢产物麦角甾醇和对羟基苯甲酸对小麦全蚀病菌都有抑制作用,且麦角甾醇的抑菌效果更好,抑菌率达66.7%^[33]。罗寒等^[34]在海南的红树林植物揽李中分离出一株杂色曲霉(*Aspergillus racemose*)MA-299,其次生代谢产物中提取到了新化合物22-*epi*-aflaquinolone B和喹诺啉酮类化合物,分别对农业病害菌小麦全蚀病菌和小麦赤霉病有较好的抑制活性。自然界中存在的许多植物的内生真菌都可以通过与病原菌拮抗或产生有抑制病原菌能力的代谢物质等方式提高植物抗病能力,但是目前对抑菌机制的研究仍然较少,随着蛋白质组学或代谢组学的发展,有望对抑菌机制进行深入研究。

2.2.3 产抗虫活性物质。虫害也是影响农作物产量的重要因素之一,内生真菌的感染能够提高农作物的抗虫性,部分植物内生真菌还能够产生具有杀虫活性的代谢产物,尤其针对鳞翅目、膜翅目、半翅目和鞘翅目的农业害虫^[35]。大多数内生真菌对于昆虫的抑制作用主要体现在能产生毒素,使昆虫的进食受影响从而抑制昆虫的生长或直接杀死幼虫^[36-37]。早在20世纪80年代,Funk等^[38]就已经提出了内生真菌可能具有抑制虫害的说法,发现长圆形拟茎点霉(*Phomopsis oblonga*)能够保护榆属植物免受美洲榆皮天牛的危害。朱虹等^[39]从具有较强抗虫能力的落叶乔木苦楝中分离出球孢白僵菌KL042和拟青霉KL017,其中球孢白僵菌KL042对马尾松毛虫进行触杀处理2.5 d校正死亡率达83.33%,5 d校正死亡率达100%。拟青霉KL017菌株发酵液中含有胃毒活性物质,其10倍浓缩液对柳蓝叶甲的胃毒活性最强,48 h校正死亡率高达90.09%。内生真菌的抗虫作用机理还表现在与昆虫竞争能源物质方面^[40]。固醇类物质是昆虫合成体内脱皮激素的必需物质,但通过自身代谢无法合成,真菌的生长也需要固醇类物质,两者同时竞争固醇类物质势必会在一定程度上影响昆虫的生长^[41]。Raps等^[42]将子囊菌接入甘蓝叶片,然后喂食小菜蛾幼虫,发现前10 d的幼虫死亡率显著增加,同时降低幼虫早期发育过程中的相对生长速率,但不会导致蛹或成虫体重减轻。在内生真菌侵染植物的叶上喂养的雌性幼虫,通过增加摄入食物的相对消耗率来降低转化效率,其基本机制是由于植物甾醇代谢发生变化,从而导致接种的甘蓝上幼虫生长减少。

2.3 环境修复方面 植物内生真菌降解土壤中的有机污染物是以有机污染物为唯一碳源或与其他代谢机制共同作用^[43]。田林双^[44]发现水稻内生真菌拟茎点霉属真菌能够降解土壤有机污染物菲。Corrêa等^[45]研究发现多数属于子囊菌的内生真菌具有降解木质素并能够打开苯环的特有的氧

化木质素的分解体系,主要包括漆酶、木质素酶和过氧化物酶,通过漆酶等的作用降解土壤中的有机污染物。Ambrose 等^[46]从冷季型草中提取出的香柱菌属(*Epichlo*)菌株,能够产生水杨酸羟化酶,能够降解植物体内水杨酸,保护寄生于宿主中的内生菌不被宿主攻击,继而产生其他酶发挥降解有机污染物的作用。

重金属污染也是目前较难解决的难题之一,可通过直接或间接吸收重金属的方式。徐在超等^[47]从大宝山矿区重金属富集植物油菜中分离出的 3 株内生真菌 *Fusarium* sp. CBRF14、*Penicillium* sp. CBRF65 和 *Alternaria* sp. CBSF68 对 Cd、Pb、Zn 具有良好的抗性,这 3 株真菌的生物量随着 Cd、Pb、Zn 浓度的增加而减少,但是对其富集量则呈现不断上升的趋势,并通过研究发现以上 3 株真菌可在含有重金属液体的环境中生存并具有对重金属的富集能力。此外,内生真菌也可减少宿主对重金属的吸收或提高宿主对重金属的抗性,Mirzahossini 等^[48]从高羊茅中分离出的内生真菌能够协助宿主植物抵抗高浓度的 Ni,同时降低宿主对 Ni 的吸收,降低 Ni 对植物的毒害作用。上述研究为植物内生真菌修复环境污染的实际应用方面提供了新的思路和资源。

3 展望

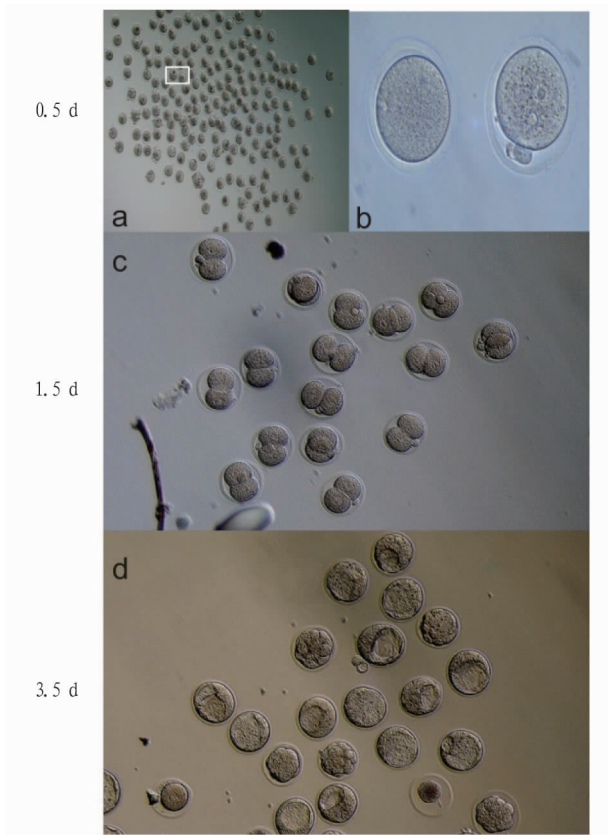
目前对植物内生真菌的研究仍集中在内生真菌的种类、形态特征、分布等方面,对植物内生真菌的自身特性以及次生代谢产物的成分和作用研究相对较少,尤其在涉及次生代谢产物合成相关基因表达研究方面。在实际应用方面也有一些问题值得关注:一是菌种协调问题,例如某种生防高效菌接种于其他作物中与作物本身的内生菌发生拮抗作用而导致该高效菌无法发挥应有的作用;二是菌种生存环境问题,在投放菌种的同时应考虑环境温度、pH 等因素对菌种的影响;三是菌种的实际应用问题,科研人员往往将供试菌种与 1 种重金属进行抗性试验,但是在实际环境中污水或重金属污染土壤中往往含有不止 1 种重金属,其他种类的重金属是否会影响供试菌种的效应仍然不明确。

总之,植物内生真菌是大自然赐予人类的宝贵资源,其代谢产物在医学、农业、环境治理等方面应用广泛,为新资源以及稀有资源的生产及再生开辟了新的途径。

参考文献

- [1] STROBEL G, STIERLE A, STIERLE D, et al. Taxomyces andreanae, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. Mycotaxon, 1993, 47: 71–80.
- [2] KOGEL K H, FRANKEN P, HÜCKELHOVEN R. Endophyte or parasite: What decides? [J]. Current opinion in plant biology, 2006, 9(4): 358–363.
- [3] 官珊, 钟国华, 孙之潭, 等. 植物内生真菌的研究进展 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(1): 61–66.
- [4] GUERIN D. Sur la presence d'un Champignon dan Ilvraie [J]. J Bot, 1898, 12: 230–238.
- [5] TAN R X, ZOU W X. Endophytes: A rich source of functional metabolites [J]. Nat Prod Rep, 2011, 18(4): 448–459.
- [6] SIEGEL M R, JOHNSON M C, VARNEY D R. A fungal endophytic in tall fescue: Incidence and dissemination [J]. Phytopathology, 1984, 74(8): 932–937.
- [7] XIONG Z Q, YANG Y Y, ZHAO N, et al. Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, *Taxus x media* [J]. BMC Microbiology, 2013, 13(1): 1–10.

- [8] ANANDA K, SRIDHAR K R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India [J]. Canadian J Microbiol, 2002, 48(10): 871–878.
- [9] DALAL J M, KULKARNI N S. Population variance and diversity of endophytic fungi in soybean (*Glycine max* (L) Merrill) [J]. Research and reviews: Journal of botanical sciences, 2014, 3(4): 33–39.
- [10] 谭小明, 周雅琴, 陈娟, 等. 药用植物内生真菌多样性研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(18): 1563–1580.
- [11] CARROL G. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont [J]. Ecology, 1998, 69(1): 2–9.
- [12] PETRINI O. Microbial ecology of leaves [M]. New York: Springer-Verlag, 1991: 179–197.
- [13] WANI M C, TAYLOR H L, WALL M E, et al. Plant antitumor agents. VI: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. J Am Chem Soc, 1971, 93(9): 2325–2327.
- [14] YANG X S, STROBEL G, STIERLE A, et al. A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana* [J]. Plant science, 1994, 102(1): 1–9.
- [15] STROBEL G, YANG X S, SEARS J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. Microbiology, 1996, 142(Pt 2): 435–440.
- [16] STROBEL G A, HESS W M. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity [J]. Chemistry & biology, 1997, 4(7): 529–536.
- [17] SHRESTHA K, STROBEL G A, SHRIVASTAVA S P, et al. Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan yew of Nepal [J]. Planta medica, 2001, 67(4): 374–376.
- [18] WANG J F, LI G L, LU H Y, et al. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 193(2): 249–253.
- [19] 项勇, 崔京霞, 吕安国. 东北红豆杉内生真菌的分离和筛选 [J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(2): 30–34.
- [20] 卫强, 孙涛. 红豆杉的抗肿瘤活性成分及其衍生物研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(10): 1664–1675, 1685.
- [21] 卢懿, 侯世祥, 陈彤. 长春花抗癌成分长春新碱研究的进展 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1006–1009.
- [22] 杨显志, 张玲琪, 郭波, 等. 一株产长春新碱内生真菌的初步研究 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 79–81.
- [23] SEKITA S, YOSHIHARA K, NATORI S. Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indol-3-yl)-[13]cytochalasans from *Chaetomium* spp. IV: ¹³C-nuclear magnetic resonance spectra and their application to a biosynthetic study [J]. Chemical & pharmaceutical bulletin, 1983, 31(2): 490–498.
- [24] 邱大任. 一株球毛壳内生真菌化学成分及生物活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [25] 阮丽军, 尚新艳, 戈梅, 等. 植物内生真菌 HCCB00189 代谢产物研究 [J]. 中国新药杂志, 2007(1): 52–55.
- [26] 王兴红. 鬼臼类植物内生真菌的分离及其抗癌活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(5): 723–727.
- [27] 陈旭, 雷帮里, 文庭池, 等. 一株马比木植物内生真菌 *Trichoderma* sp. 抗癌活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(3): 522–525.
- [28] 王维. 半夏内生菌的分离及其内生真菌对宿主生长影响的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010: 30–33.
- [29] 黎勇, 王小丹, 罗培凤, 等. 铁皮石斛菌根真菌对铁皮石斛组培苗的接种效应 [J]. 农业科学与技术: 英文版, 2011, 12(11): 1580–1584.
- [30] 赵颖, 于飞, 卜宁, 等. 碱蓬内生真菌 JP3 的分离、鉴定及促生作用研究 [J]. 沈阳师范大学学报 (自然科学版), 2015, 33(1): 116–120.
- [31] 徐亚军. 植物内生菌资源多样性研究进展 [J]. 广东农业科学, 2011(24): 149–152.
- [32] 王瑞珍. 2 株银杏内生真菌的抑菌活性研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [33] 姜华年. 厚朴内生真菌 HPFJ3 菌株中抑菌活性物质的分离纯化及结构鉴定 [J]. 河南农业科学, 2016, 45(12): 82–88.
- [34] 罗寒, 李晓栋, 李晓明, 等. 红树林来源内生真菌杂色曲霉 *Aspergillus versicolor* MA-229 次级代谢产物研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(4): 14–20.
- [35] 杨玉锋, 李保利. 植物内生真菌在植物病害生物防治中的作用 [J]. 河南农业科学, 2011, 40(3): 25–28.
- [36] 李秀璋, 姚祥, 李春杰, 等. 禾草内生真菌作为生防因子的潜力分析 [J]. 植物生态学报, 2015, 39(6): 621–634.



注: a. 100 × 受精卵; b. 400 × 受精卵, 左侧为未受精卵, 右侧为原核受精卵; c. 200 × 2-细胞; d. 200 × 囊胚

Note: a. 100 × Fertilized ovum; b. 400 × Fertilized ovum, left side was unfertilized ovum, right side was prokaryotic fertilized ovum; c. 200 × 2-Cell; d. 200 × Blastocyst

图3 不同时段受精卵体外发育的状态

Fig. 3 The state of development of fertilized ovum *in vitro* at different times

唐一岷等^[6]认为 C57BL/6J 小鼠超排后 14 ~ 15 h 取的卵最多;陈晓娟等^[4]发现,4 周龄的 C57BL/6J 小鼠对 PMSG 应答产生的内源黄体素 (LH) 释放量不足以引起排卵, HCG 注射时间为注射 PMSG 后 48 ~ 49 h, 此时获得卵母细胞数较多。该实验中 4 周龄的 C57BL/6J 小鼠内源性 LH 释放不足, 排卵的高峰时间就和上述的“HCG10 ~ 13 h”不一致。实验结果显示, 注射 PMSG (10IU) 时间为第 1 天 12:00—13:00, 间隔

48 h 同样的时间再注射 HCG (10 IU), 注射 HCG 后 18 ~ 21 h 取胚, 也能获得比较好的超排效果。

3.3 C57BL/6J 小鼠早期胚胎体外发育 小鼠的早期胚胎即从受精卵开始经过卵裂、2-细胞、8-细胞、桑椹胚、囊胚等阶段, 尚未与子宫建立组织联系的游离阶段的胚胎。体外培养效率首先依赖于超排获得优质的卵母细胞和受精卵。该实验中小鼠受精卵收集时间固定为第 4 天 09:00。光照周期为 05:00—19:00, PMSG 时间也相应提前到中午, 才能保证受精卵的存活率^[7]。而 Takeo 等^[8-10]采用其他激素 (IAS 和 eCG, 辅以体外授精 (IVF), 2-细胞百分比、原代出生率都非常可观。该实验采用自然交配获得受精卵, 发育到 2-细胞的百分比可达 27.91%。后续实验若采用 IVF, 受精率可大幅提升, 能进一步提高小鼠早期胚胎体外发育质量。实验小鼠的发情周期、营养状况对超排效果的影响还有待进一步研究。

参考文献

- [1] ARMSTRONG D T (赵晓霞, 高昌恒, 译). 家畜超排的生理基础 (下) [J]. 国外畜牧科技, 1991, 18 (2): 18-20.
- [2] 宋绍征, 王怡, 王宝珠, 等. 激素剂量、小鼠品系及周龄对超数排卵的影响 [J]. 实验动物科学, 2011, 28 (4): 5-8.
- [3] ESMAIL M Y, QI P, CONNOR A B, et al. Generating chimeric mice by using embryos from nonsuperovulated BALB/c mice compared with superovulated BALB/c and albino C57BL/6 mice [J]. Journal of the American association for laboratory animal science, 2016, 55 (4): 400-405.
- [4] 陈晓娟, 王芊芊. C57BL/6J 小鼠促性腺激素注射时间对诱导超排卵的影响 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2015 (3): 38-39.
- [5] KOLBE T, LANDSBERGER A, MANZ S, et al. Productivity of superovulated C57BL/6J oocyte donors at different ages [J]. Lab animal, 2015, 44 (9): 346-349.
- [6] 唐一岷, 刘丽均, 徐平. 小鼠超排后的取卵时间对体外受精率的影响 [J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2003, 21 (3): 185-188.
- [7] 安德拉斯·纳吉, 玛丽娜·格特森斯坦, 克里斯蒂娜·文特斯藤, 等. 小鼠胚胎操作实验手册 [M]. 孙青原, 陈大元, 译. 北京: 化学工业出版社, 2006: 1.
- [8] TAKEO T, NAKAGATA N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice [J]. PLoS One, 2015, 10 (5): 1-11.
- [9] TAKEO T, NAKAGATA N. Efficient production of mouse oocytes using superovulation by immunization against inhibin [J]. Transgenic research, 2016, 25 (2): 211-212.
- [10] TAKEO T, NAKAGATA N. Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains [J]. Theriogenology, 2016, 86 (5): 1341-1346.

(上接第 17 页)

- [37] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 禾本科植物内生真菌及其在农业上的应用潜力 [J]. 南京农业大学学报, 2011, 34 (5): 144-154.
- [38] FUNK C R, HALISKY P M, JOHNSON M C, et al. An endophytic fungus and resistance to soil webworms: Association in *Lolium perenne* L. [J]. Nature biotechnology, 1983, 1 (2): 189-191.
- [39] 朱虹, 单淑芳, 李增智, 等. 苦楝内生真菌及其代谢产物的杀虫活性 [J]. 中国生物防治, 2010, 26 (1): 47-52.
- [40] 王婷, 叶耀辉, 郑红梅, 等. 植物内生真菌抗虫活性研究进展 [J]. 江西中医药, 2016, 47 (5): 67-70.
- [41] 左玮. 植物内生真菌在植保上的应用 [J]. 安徽农学通报, 2014, 20 (1): 90-91.
- [42] RAPS A, VIDAL S. Indirect effects of an unspecialized endophytic fungus on specialized plant-herbivorous insect interactions [J]. Oecologia, 1998, 114 (4): 541-547.
- [43] 傅婉秋, 谢星光, 戴传超, 等. 植物-微生物联合对环境有机污染物降

解的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2017, 44 (4): 929-939.

- [44] 田林双. 内生真菌降解多环芳烃非研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2007.
- [45] CORRÊA R C, RHODEN S A, MOTA T R, et al. Endophytic fungi: Expanding the arsenal of industrial enzyme producers [J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2014, 41 (10): 1467-1478.
- [46] AMBROSE K V, TIAN Z P, WANG Y F, et al. Functional characterization of salicylate hydroxylase from the fungal endophyte *Epichloe festucae* [J]. Scientific reports, 2015, 5 (1): 1-12.
- [47] 徐在超, 史亚楠, 张仁铎, 等. 三株具重金属抗性油菜内生真菌对镉铅锌富集特性研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2016, 55 (6): 153-160.
- [48] MIRZAHOSSEINI Z, SHABANI L, SABZALIAN M R, et al. ABC transporter and metallothionein expression affected by Ni and *Epichloe* endophyte infection in tall fescue [J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2015, 120: 13-19.