

竹叶兰内生真菌的分离鉴定及其抗氧化活性研究

宋新月¹, 汤冰雪², 邱君志¹, 刘美凤²

(1. 福建农林大学生命科学学院, 福建福州 350002) (2. 华南理工大学化学与化工学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文采用经典的植物内生菌分离方法, 从两种不同产地的竹叶兰植株的根、茎及叶片部位中共分离出 16 株可培养的内生真菌, 其中 4 种真菌分离自云南省西双版纳地区的竹叶兰, 12 种真菌分离自广西省百色市的竹叶兰。根据形态学观察和 ITS 基因序列同源性分析, 大致分为 7 类, 其中 *Phanerochaete* sp.、*Phyllosticta capitalensis*、*Diaporthe* sp.、*Hypoxylon* sp.、*Nodullsporium* sp.、*Chaetomium nigricolor* 各一株, 其余 10 个菌株均属于 *Colletotrichum* sp., 说明 *Colletotrichum* sp. 为竹叶兰内生真菌的一大优势种。通过对其中 5 种内生真菌的抗氧化活性进行测定 (DPPH 自由基清除法、Fe³⁺ 还原能力及 H₂O₂ 自由基清除法), 得到具有较强抗氧化活性的 2 种菌株 BSSF-2 及 YNLF-1 (对 DPPH 自由基的清除率 ≥ 80%), 经鉴定菌株 BSSF-2 为 *Colletotrichum karstii*, 菌株 YNLF-1 为 *Phanerochaete* sp.。本研究结果表明, 药用植物内生真菌在寻找新型抗氧化药物的方面具有广阔前景。

关键词: 竹叶兰; 内生真菌; 形态学鉴定; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2018)02-82-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.014

Isolation and Identification of Endophytes from *Arundina graminifolia* and Its Antioxidant Activity

SONG Xin-yue¹, TANG Bing-xue², QIU Jun-zhi¹, LIU Mei-feng²

(1. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

(2. College of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: 16 endophytic strains of fungi were isolated from roots, stems and leaves of two different origins of *Arundina graminifolia* using classical endophyte isolation method during an interesting investigation on the culturable endophyte communities and diversities of *Arundina graminifolia* grown in Xishuangbanna, Yunnan province and Baise, Guangxi province. Among them, Four endophytic fungi were isolated from *Arundina graminifolia* grown in Xishuangbanna, Yunnan province, and 12 endophytic fungi were isolated from *Arundina graminifolia* grown in Baise, Guangxi province. According to the morphological observation and ITS gene sequence homology analysis, they were divided into 7 categories, including *Phanerochaete* sp., *Phyllosticta capitalensis*, *Diaporthe* sp., *Hypoxylon* sp., *Nodullsporium* sp., *Chaetomium nigricolor*, and the other 10 strains belonging to *Colletotrichum* sp., indicating that *Colletotrichum* sp. was a dominant species of endophytic fungi. Two kinds of strains BSSF-2 and YNLF-1 (DPPH free radicals scavenging rate ≥ 80%) with strong antioxidant activity were obtained by measuring the antioxidant activity (DPPH radical scavenging assay, the reducing ability of Fe³⁺ and H₂O₂ radical scavenging assay) of 5 endophytic fungi (i.e., YNLF-1, BSSF-2, BSRF-1, BSRF-2 and BSRF-3). The strain BSSF-2 was identified as *Colletotrichum karstii*, the strain YNLF-1 was *Phanerochaete* sp. The results of this study showed that the endophytic fungi of medicinal plants had broad prospects for the development of antioxidant drugs.

Key words: *Arundina graminifolia*; endophytic fungi; morphological identification; antioxidant

植物内生菌(endophytes)一词最早是由 De Bary 在 1886 年首次提出, 是指在其部分或全部生活史中存活

收稿日期: 2017-09-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81473422); 中央高校基础研究基金项目 (SCUT-2015zz051)

作者简介: 宋新月 (1992-), 女, 硕士生, 研究方向: 微生物学

通讯作者: 邱君志 (1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物组学、微生物新药创制与分子系统学; 刘美凤 (1975-), 女, 博士, 教授, 研究方向:

天然活性成分及作用机理研究与小分子药物设计

于健康植物组织内部、但不会引发宿主植物表现出明显的感染症状, 并与宿主植物协同进化的一类具有丰富多样性的微生物类群, 包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌。自 1993 年 Stierle 等^[1]首次报道了从太平洋紫杉树中分离出一种可产生紫杉醇的内生真菌后, 关于植物内生菌的分离与鉴定立即成为国内外微生物研究领域的一大热点。药用植物内生真菌是植物生态系统中的重要组成部分, 其活性次级代谢产物具有良好的开发利用价值^[2]。已有学者从无花果叶中分离

获得 1 株具有抗菌活性的炭角菌属 *Xylaria* sp. 内生真菌, 发现其次级代谢产物对 3 种肿瘤细胞具有较强的体外抑制活性^[3]; 从内生真菌 *Preussia* sp. 的发酵液中获得了具有抗肿瘤活性的次级代谢物产物 *Spiropreussione A*^[4]。某些药用植物内生真菌不仅具备合成宿主植物次级代谢产物的能力, 还能够独立产生丰富的、结构新颖的次级代谢产物, 例如抗生素等^[5], 因此利用药用植物内生真菌替代稀有药用植物来开发新药具有重要的科学意义和应用价值^[6]。

自由基作为机体的正常代谢产物, 在平衡状态下, 其在抗菌、消炎和抗肿瘤等方面具有重要作用; 一旦平衡被打破, 如机体被某些外源药物侵害, 自由基便会产生强大的反作用, 迫使组织细胞受损, 进而引起机体病变, 甚至死亡^[7]。目前, 国内外研究发现自由基与肿瘤、衰老、心脑血管疾病等多种人体疾病的发生密切相关^[8]。已有研究证明, 一些植物内生菌具有良好的抗氧化活性^[9,10]。因此, 植物内生菌的天然活性物质将为寻找高效、廉价及低毒的新型抗氧化剂提供一种新思路。

竹叶兰(*Arundina graminifolia*)为兰科竹叶兰属植物, 别名长杆兰、草姜、文哈海(傣名), 分布于热带和亚热带地区, 用于治疗尿路感染及毒蛇咬伤等, 收载于《中药大辞典》中。但由于其地域分布性强, 并且产量有限, 所以从其内生菌中获得具有良好生物活性的次级代谢产物来代替稀有药用植物竹叶兰是一条便捷而有效的途径。当前国内外学者对竹叶兰的研究主要集中在其化学成分^[11,12]、药理研究^[13,14]以及人工栽培等方面^[15,16], 有关竹叶兰内生菌的研究尚未见报道。因此, 本实验对采自云南西双版纳地区及广西百色地区的竹叶兰植物体的根、茎和叶片中的内生菌进行了分离和鉴定, 同时探讨了部分竹叶兰内生真菌的抗氧化活性, 为后续进一步研究竹叶兰内生菌及其生物活性成分提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

新鲜的竹叶兰植株采集于中国云南省西双版纳地区以及广西省百色市, 均由云南药物研究所邱斌教授对其种属鉴定, 凭证标本(YN20170313 及 GX2170323)存入华南理工大学化学与化工学院制药工程系。

1.2 培养基的配制

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 取新鲜马铃

薯 200 g, 洗净, 去皮, 切成小块, 放入适量的水中煮沸 30 min, 用 8 层纱布过滤后置于 1000 mL 烧杯中, 向其中依次加入葡萄糖和琼脂各 20 g, 加热搅拌至琼脂完全融化, 补加蒸馏水至 1000 mL。趁热将其分装于 5 个 250 mL 三角瓶中, 每瓶装 200 mL 培养基, 用 8 层纱布包住瓶口, 2 层报纸封口并写好标签, 于 121 °C 下高压灭菌 20 min 后备用。

1.3 实验材料竹叶兰内生菌分离纯化及保存

将采集的竹叶兰植株储存于 4 °C 环境中, 且储存时间最好不超过 2 周。选取新鲜且植株样品完好的竹叶兰, 用无菌水洗涤除去其表面泥土。采用组织切块培养法^[17], 在无菌条件下, 用无菌解剖刀将竹叶兰的根和茎分别切成厚度为 0.5 cm 的切块, 将叶片切成面积为 0.5 cm×0.5 cm 大小的切片。把切好的材料先置于 75%乙醇溶液中浸泡 3 min, 用无菌水冲洗 3 次后, 置于 0.1%升汞溶液中, 将根和茎漂洗 2 min, 叶片漂洗 1 min, 然后用无菌水冲洗 5 次。用灭菌的滤纸片吸干竹叶兰组织切块表面的水分, 将其消毒后的新鲜剖面与含氯霉素(100 μg/mL)的 PDA 培养基平板相贴合, 每个 PDA 培养基平板上放置 3~4 个竹叶兰组织切块, 最后将其置于 28 °C 恒温培养箱中倒置培养 4~7 d。取最后一次清洗竹叶兰组织切块后的无菌水, 用涂布棒涂布于含抗生素的 PDA 培养基平板上, 28 °C 恒温培养 4~7 d, 观察是否有其他杂菌长出, 以此作为无菌操作参照组。

待竹叶兰组织切块或切片的切口处有菌落长出, 根据菌落颜色、形态差异和长出菌落时间长短的不同, 分别挑取各菌落边缘形态各异的菌丝, 接种于 PDA 培养基平板上进行纯化再培养。培养数日后, 观察并记录菌落的生长形态。对得到的菌株进行多次纯化后编号, 并转接至 PDA 斜面培养基上, 在 28 °C 恒温培养箱中培养 4~7 d 后, 放入 4 °C 冰箱中长期保存。

1.4 竹叶兰内生菌的形态学观察

将已分离纯化的内生菌接种于 PDA 培养基平板上, 28 °C 恒温培养 7~10 d。采用插片法, 在各菌株的培养平板上以斜 45 °角插入无菌盖玻片 2~3 枚, 在 28 °C 下继续培养 3~5 d, 取出盖玻片, 制成载片标本, 在倒置荧光显微镜下依次从低倍镜向高倍镜观察, 获取各菌株在油镜下(100×10 倍)的显微图片。

1.5 竹叶兰内生菌 DNA 分子鉴定

从 PDA 培养基平板上刮取已得到分离纯化的内生菌菌株的菌丝体, 加入 DNA 提取裂解液 300 μL,

涡旋振荡后,在 65 °C 下水浴 30 min,再加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),涡旋混匀,13000 r/min 离心 5 min。取上清液,加入等体积的异丙醇,混匀后,13000 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入 70%乙醇混匀,13000 r/min 离心 1 min。弃乙醇,倒置离心管,晾干。之后加入 30 μ L ddH₂O,溶解 DNA,即可进行下游 PCR 扩增或者在-20 °C 下保存。

提取内生菌基因组 DNA 后,用通用引物 ITS4/ITS5 来扩增 18S rRNA 基因片段,PCR 反应体系(50 μ L): 10 倍缓冲液 5 μ L, dNTPs 5 μ L, 正反引物各 1 μ L, Taq 酶 1 μ L, 模板 DNA 稀释 50 倍后取 1 μ L (对照组加 ddH₂O), ddH₂O 36 μ L。PCR 扩增条件为: 94 °C 变性 3 min; 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 90 s, 如此处理 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经切胶纯化回收,加入去离子水溶解后送到广州基迪奥生物科技有限公司进行测序。

1.6 部分竹叶兰内生菌抗氧化活性测试

1.6.1 竹叶兰内生菌发酵液提取物对 DPPH 自由基的清除活性

对竹叶兰内生菌 YNLF-1、BSSF-2、BSRF-1、BSRF-2 及 BSRF-3 的发酵液提取物进行抗氧化活性的测定。以上内生菌的发酵液均用乙酸乙酯萃取 3 次后蒸发旋干得发酵浸膏^[18],再将各样品用无水乙醇溶解,分别配制成 0.0125 mg/mL、0.025 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL 和 0.2 mg/mL 的待测样品液。

DPPH 自由基清除能力测定参照 Atoui^[19]方法,并略作改动。(1)精确移取 2 mL 0.2 mmol/mL DPPH (DPPH 溶液要现用现配,注意避光保存)与 2 mL 供试液混合,室温下放置 30 min,于 517 nm 处测吸光度,记为 A₃;(2)精确移取 2 mL 0.2 mmol/mL DPPH 与 2 mL 无水乙醇混合,室温下放置 30 min,于 517 nm 处测吸光度,记为 A₀;(3)精确移取 2 mL 无水乙醇与 2 mL 供试液混合,室温下放置 30 min,于 517 nm 处测吸光度,记为 A_c;以 Vc 溶液作为阳性对照。每个样品做 2 个平行样,清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 清除率 } S\% = 1 - (A_3 - A_c) / A_0 \times 100\%$$

1.6.2 竹叶兰内生菌发酵液提取物对 Fe³⁺还原能力的测定

Fe³⁺还原能力的测定是根据 Wang^[20]的方法,并略有改动。取 2.5 mL 各菌株不同浓度的样品液,与 2.5 mL 0.2 mol/L pH 6.6 的 PBS 缓冲液和 2.5 mL 1%的铁氰化钾溶液混合,50 °C 水浴 20 min 后迅速冷却至室温,再向其中加入 2.5 mL 10%的三氯化钾溶液,用微孔滤膜器过滤后,取上清液 5 mL,向其中加入 4 mL

蒸馏水和 1 mL 0.1%的三氯化铁溶液,混匀后,静置 10 min 并于 700 nm 处测定吸光度,记为 A。以 Vc 溶液作为阳性对照。每个样品做 2 个平行样。

1.6.3 竹叶兰内生菌发酵液提取物清除 H₂O₂ 的能力

清除过氧化氢能力(PSC)分析参照 Du^[21]等人报道的方法,并稍有调整。取 4.0 mL 各菌株不同浓度的样品,向其中加入 1.0 mL 由 pH 7.4 的 PBS 缓冲液调配的 1%的过氧化氢溶液,静置反应 10 min 后,于 230 nm 处测吸光度值,记为 A_x;以蒸馏水调零,记为 A₀;以 Vc 溶液作为阳性对照。每个样品做 2 个平行样,清除率计算公式如下:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 清除率 } Q\% = (A_0 - A_x) / A_0 \times 100\%$$

1.7 数据分析

采用 SPSS 11.0 统计分析软件,实验结果用平均值±标准差来表示,数据统计分析以单向方差分析法进行差异显著性检验分析,以 p<0.05 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 竹叶兰内生菌的分离和纯化结果

竹叶兰植物组织块在 28 °C 下培养 4~7 d 后,作为无菌参照组的平板上均未有菌落生长,说明本实验对竹叶兰植物组织块的表面消毒较为彻底,实验中所分离得到的所有菌株均来自竹叶兰植物组织内部。从表 1 可知,本次实验从两种不同产地的竹叶兰中共分离得到 16 株内生真菌,其中,在产自云南的竹叶兰中分离得到 4 株内生真菌,编号依次为:YNLF-1、YNLF-2、YNLF-3、YNLF-4;在产自广西的竹叶兰中分离得到 12 株内生真菌,编号依次为:BSLF-1、BSLF-2、BSLF-3、BSLF-4、BSLF-5、BSLF-6、BSSF-1、BSSF-2、BSSF-3、BSRF-1、BSRF-2、BSRF-3。实验结果显示,不同地区的竹叶兰均在其叶片中更容易分离得到内生真菌,表明竹叶兰叶片中内生真菌资源较为丰富。

从提取的竹叶兰内生真菌基因组 DNA 中,利用 ITS rRNA 通用引物 ITS4/ITS5 成功地扩增出了单一清晰的条带,且所有序列长度均在 500~750 bp 之间,没有拖带现象。

研究认为,菌种基因序列的 BLAST 比对结果的同源性若大于 97%,则可判定为同一物种;若小于 97%,则不能判定其一致性。在 GenBank 数据库中的 BLAST 分析比对结果显示(见表 1),本实验所分离得到的 16 株竹叶兰内生真菌,经鉴定 YNLF-1 为

Phanerochaete sp., YNLF-3 为 *Phyllosticta capitalensis*, BSSF-3 为 *Diaporthe* sp., BSRF-1 为 *Hypoxylon* sp., BSRF-2 为 *Nodullsporium* sp., BSRF-3 为 *Chaetomium nigricolor*, 其余 10 种菌株均为 *Colletotrichum* sp.。结果显示竹叶兰内生真菌的优势种为刺盘孢属。由于 YNLF-1 的比对结果较低, 为 93%, 表明该菌株很大可能是 *Phanerochaete* sp. 的新种, 后续我们还将会对

其作进一步的分析鉴定。

2.2 竹叶兰内生菌的形态学观察结果

实验中得到的 16 种内生菌菌株菌落表面均呈丝状或绒毛状, 因此可初步判断其全部为真菌。我们采用 FIM 倒置荧光显微镜 (100×10 倍) 对该 16 种内生菌株分别进行形态学观察 (图 1), 特征描述详见表 2。

表 1 两种产地竹叶兰植株的不同部位内生菌分离及鉴定结果

Table 1 Isolation and identification of endophytes in different parts of *Arundina graminifolia* in two producing regions

序号	菌株编号	产地	部位	比对结果	相似度
1	YNLF-1	云南西双版纳	叶	<i>Phanerochaete</i> sp.	93%
2	YNLF-2	云南西双版纳	叶	<i>Colletotrichum boninense</i>	99%
3	YNLF-3	云南西双版纳	叶	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	100%
4	YNLF-4	云南西双版纳	叶	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%
5	BSLF-1	广西百色	叶	<i>Colletotrichum capsici</i>	99%
6	BSLF-2	广西百色	叶	<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%
7	BSLF-3	广西百色	叶	<i>Colletotrichum acutatum</i>	98%
8	BSLF-4	广西百色	叶	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%
9	BSLF-5	广西百色	叶	<i>Colletotrichum tropicicola</i>	100%
10	BSLF-6	广西百色	叶	<i>Colletotrichum taiwanense</i>	100%
11	BSSF-1	广西百色	茎	<i>Colletotrichum cordylinicola</i>	98%
12	BSSF-2	广西百色	茎	<i>Colletotrichum karstii</i>	100%
13	BSSF-3	广西百色	茎	<i>Diaporthe</i> sp.	99%
14	BSRF-1	广西百色	根	<i>Hypoxylon</i> sp.	97%
15	BSRF-2	广西百色	根	<i>Nodullsporium</i> sp.	99%
16	BSRF-3	广西百色	根	<i>Chaetomium nigricolor</i>	100%

表 2 竹叶兰内生真菌的形态学特征

Table 2 Morphological characteristics of endophytes in *Arundina graminifolia*

序号	菌株编号	主要表观特征	主要微观特征
1	YNLF-1	菌落表面干燥蓬松, 菌落呈乳白色	菌丝有分支结构, 产生椭圆形分生孢子
2	YNLF-2	菌落蓬松, 菌丝较长且浓密, 菌丝呈乳白色, 菌落呈浅黄色	菌丝有隔膜且有分支结构, 产生圆形分生孢子
3	YNLF-3	菌落小而紧致, 中间突起, 呈黑色, 边缘有少许白色菌丝, 菌落中有大量无色透明的孢子液产生	菌丝有隔膜且有分支结构, 产生圆形分生孢子
4	YNLF-4	菌落呈同心环状, 菌落中心处菌丝较长, 呈灰白色, 外圈菌丝呈黑色, 菌落表面干燥蓬松, 呈绒毛状	菌丝有隔膜且有分支结构, 结构致密, 产生圆形孢子
5	BSLF-1	菌落中心处凸起, 菌丝呈灰色, 菌落边缘菌丝呈乳白色, 菌落背面中心菌呈黑色, 四周呈灰色, 边缘呈乳白色	菌丝有隔膜且有分支结构, 结构致密, 菌丝直径较大, 产生卵圆形孢子
6	BSLF-2	菌落中心处呈黑色, 有少量透明孢子液产生, 菌丝呈灰色, 菌落边缘菌丝呈乳白色	菌丝有隔膜且有分支结构, 结构致密, 菌丝直径较大, 产生圆形孢子
7	BSLF-3	菌落呈同心环状, 菌落中心呈乳白色, 中央有无色透明孢子液产生, 菌丝呈灰色, 菌落外部菌丝呈墨绿色, 边缘处菌丝呈乳白色	菌丝有隔膜且有分支结构, 结构致密, 菌丝直径较大, 产生圆形孢子

转下页

接上页

8	BSLF-4	菌落较厚且蓬松, 菌落中心处菌丝呈墨绿色, 边缘有少许乳白色菌丝	菌丝有隔膜且有分支结构, 结构致密, 菌丝直径较大产生圆形分生孢子
9	BSLF-5	菌落蓬松且中心凸起, 菌丝呈墨绿色, 菌落边缘菌丝呈乳白色	菌丝有隔膜且有分支结构, 结构致密, 产生圆形孢子
10	BSLF-6	菌落表面干燥且蓬松, 呈绒毛状, 中心处菌丝较长, 略突起, 呈深灰色, 菌落边缘菌丝呈浅灰色	菌丝有隔膜且有分支结构, 结构致密, 产生圆形孢子
11	BSSF-1	菌落表面干燥且蓬松, 呈绒毛状, 菌丝呈灰色	菌丝有隔膜且有分支结构, 结构致密, 产生圆形孢子
12	BSSF-2	菌落中心处粉红色, 四周呈乳白色, 菌落表面干燥, 菌落背面中心处呈粉红色, 边缘呈乳白色	菌丝有分支, 有隔膜, 菌丝纤细透明且结构致密, 长短不一, 尚未观察到孢子的产生
13	BSSF-3	菌落表面干燥且蓬松, 中心处菌丝较长, 四周菌丝较短, 菌丝呈乳白色, 菌落呈乳白色	菌丝有分支, 有隔膜, 菌丝纤细透明且结构致密, 菌丝表面不光滑, 有锯齿状凸起, 产生圆形孢子
14	BSRF-1	菌落表面干燥且蓬松, 呈绒毛状, 菌丝呈乳白色, 菌落呈棕黄色	菌丝有隔膜且有分支结构, 结构致密, 尚未观察到孢子的产生
15	BSRF-2	菌丝较短呈乳白色, 菌落背面颜色呈棕褐色	菌丝有隔膜且有分支结构, 结构致密, 产生圆形孢子
16	BSRF-3	菌落较小且紧致, 菌落中心略凸起, 表面干燥, 菌丝呈白色, 菌落背面颜色呈墨绿色	菌丝无隔膜, 有分支结构, 结构致密, 产生圆形孢子

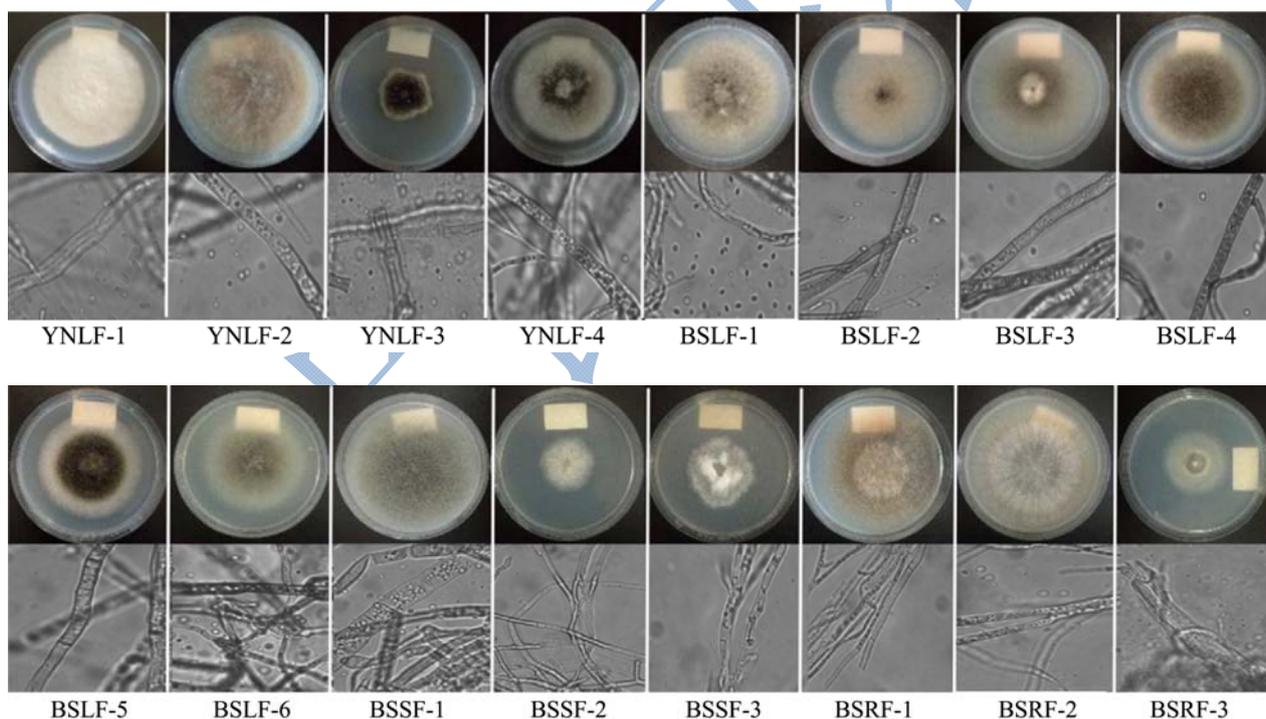


图1 竹叶兰内生真菌的形态学特征(菌落平板正面观察图及对应菌株在100×10倍下倒置荧光显微镜图)

Fig.1 Morphological characteristics of endophytes in *Arundina graminifolia* (the positive view of the colony plate and the corresponding strain were observed using an inverted fluorescence microscopy at 100 x 10 times)

2.3 部分竹叶兰内生菌的抗氧化活性的评价

本次实验中我们选择了5种具有代表性的竹叶兰内生真菌,分别为YNLF-1、BSSF-2、BSRF-1、BSRF-2及BSRF-3。对以上菌株进行摇瓶发酵培养后,得其

发酵液萃取物,各个样品依次进行对DPPH自由基的清除能力的测定、对Fe³⁺还原能力的测定及清除H₂O₂能力的测定。结果表明(图2),该5种竹叶兰内生真菌均有不同程度的抗氧化活性,其中菌株BSSF-2的抗氧化活性最强,其在0.2 mg/mL的浓度下对DPPH

自由基的清除率高达 90.25%左右,对 Fe³⁺的还原能力最强,对 H₂O₂ 自由基的清除率可达 81.08%;菌株 YNLF-1 也具有较弱的抗氧化活性,其在 0.2 mg/mL 的浓度下对 DPPH 自由基的清除率可超过 80%,对 Fe³⁺的还原能力稍弱于 BSSF-2,对 H₂O₂ 自由基的清除率也接近 70%。

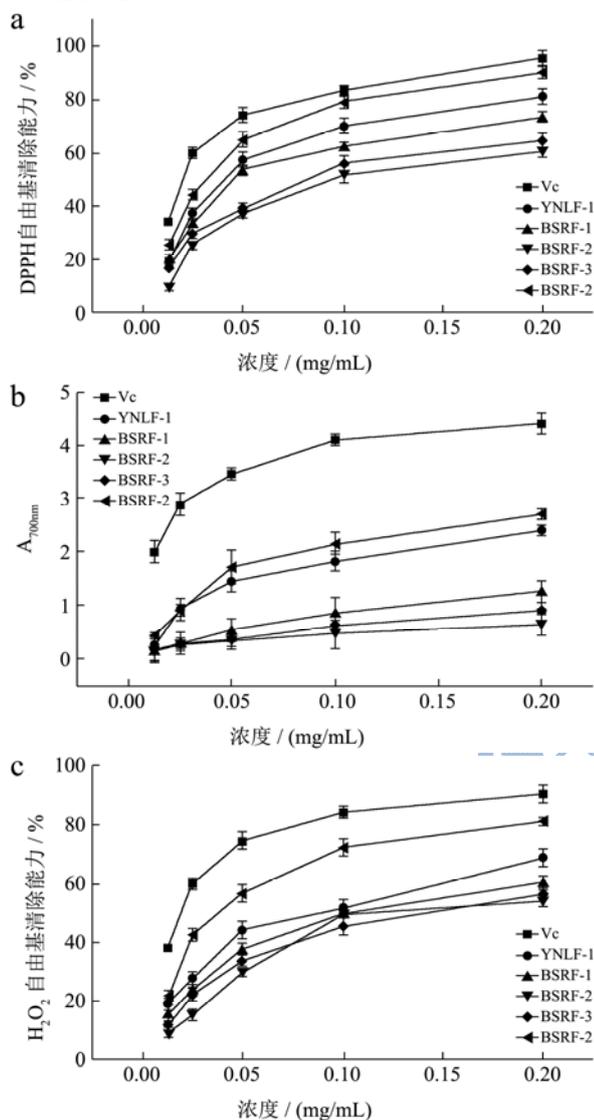


图2 5种竹叶兰内生真菌发酵液的抗氧化活性

Fig.2 Antioxidant activity of five kinds of endophytic fungi in the fermentation broth of *Arundina graminifolia*

注: (a)竹叶兰内生真菌发酵液提取物对 DPPH 自由基的清除作用; (b)竹叶兰内生真菌发酵液提取物对 Fe³⁺的还原能力的测定; (c)竹叶兰内生真菌发酵液提取物对过氧化氢自由基清除能力的测定。

2.4 抗氧化优势菌种 BSSF-2 的系统发育分析

将竹叶兰内生菌 BSSF-2 的 ITS 序列结果与 GenBank 数据库进行比对分析,采用 MEGA 6.0 软件对抗氧化优势菌种 BSSF-2 构建系统发育树 (图 3)。

结合该菌株形态学特征,鉴定菌株 BSSF-2 为刺盘孢属的喀斯特炭疽菌(*Colletotrichum karstii*)。

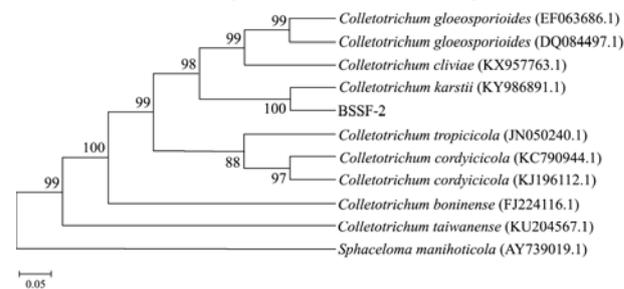


图3 抗氧化优势菌 BSSF-2 与 GenBank 中参考菌株 ITS rDNA 构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the ITS rDNA sequences of antioxidant dominant bacteria BSSF-2 and its GenBank allies

注: 进化树树枝的长度代表遗传距离,自检重复为 1000 次。

3 结论

3.1 本研究通过对两种产地的竹叶兰植株的内生菌进行初步的分离及纯化,发现在不同地区的竹叶兰中分离得到的内生菌其数量、种类均有显著差异,其中产于广西的竹叶兰中分离出的内生菌数量及种类明显多于产于云南的竹叶兰内生菌,反映出植物内生菌的种类和数量可能与宿主植物的生长环境有关,例如当地的温度、空气湿度和土壤成分等。本实验首次从药用植物竹叶兰中分离得到 16 株内生菌,经形态学观察和 ITS 基因序列同源性分析,发现这些菌株全部归属于真菌,表明内生真菌是竹叶兰内生菌的重要组成部分,其中刺盘孢属真菌为竹叶兰内生真菌的一大优势种。

3.2 近年来国内外已经有学者从数十种药用植物中分离出了内生菌,并从这些药用植物内生菌中获得了和宿主植物相同或相似天然活性成分。植物内生真菌中存在大量具有良好抗氧化活性的天然产物,包括酚酸类、异苯并呋喃、生物碱、聚酮、黄酮、芳香醚和萜类等,这些结构多样生物活性物质将成为开发新型天然抗氧化剂的重要来源。本实验通过对 5 种竹叶兰内生真菌 YNLF-1、BSSF-2、BSRF-1、BSRF-2 及 BSRF-3 抗氧化活性进行测定,发现菌株 BSSF-2 及 YNLF-1 具有较强的抗氧化作用(其中对 DPPH 自由基的清除率 ≥80%),经鉴定菌株 BSSF-2 为 *Colletotrichum karstii*, YNLF-1 为 *Phanerochaete* sp.。本研究结果表明,分离药用植物内生菌不仅是寻找未知新菌种的一个重要途径,同时也将为新型抗氧化药物的开发提供新思路。至于内生菌与其宿主植物之间具体存在怎样的互作关系,内生菌与宿主植物生长及

其代谢产物的产生存在何种联系,尚需我们深入研究。

参考文献

- [1] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-6
- [2] Chowdhary K, Kaushik N, Coloma A G, et al. Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plant [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2012, 11(4): 467-485
- [3] 王丽薇,王国平,唐婷,等.一株无花果内生真菌及其次生代谢产物[J].菌物学报,2014,33(5):1084-1093
WANG Li-wei, WANG Guo-ping, TANG Ting, et al. An endophytic fungus in *Ficus carica* and its secondary metabolites [J]. *Mycosystema*, 2014, 33(5): 1084-1093
- [4] 陈晓梅,施琦渊,王春兰,等.内生真菌 *Preussia* sp.液体发酵生产抗肿瘤活性产物 Spiroreussione A 的研究[J].菌物学报,2013,32(4):729-740
CHEN Xiao-mei, SHI Qi-yuan, WANG Chun-lan, et al. The production of Spiroreussione A, an antitumor metabolite produced by endophytic fungus *Preussia* sp., with liquid fermentation [J]. *Mycosystema*, 2013, 32(4): 729-740
- [5] Gray A S. Endophytes as sources of bioactive products [J]. *Microbes and Infection*, 2003, 5(6): 535-544
- [6] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms [J]. *The Journal of Nature Product*, 2004, 67: 257-268
- [7] Stratta P, Canavese C, Dogliani M, et al. The role of free radicals in the progression of renal disease [J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 1991, 17: 33-37
- [8] Chen A F, Chen D D, Daiber A, et al. Free radical biology of the cardiovascular system [J]. *Clinical Science*, 2012, 123(1-2): 73-91
- [9] Huang W Y, Cai Y, Xing J, et al. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants [J]. *Econ. Botany*, 2007, 61(1): 14-30
- [10] Lu R, Liu X, Fan M, et al. Isolation of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* and screening test for strains of antitumor activity [J]. *J Anhui Agric. Univ.*, 2008, 35: 262-265
- [11] Liu M, Han Y, Xing D, et al. A new stilbenoid from *Arundina graminifolia* [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2004, 6(3): 229-232
- [12] Liu M, Han Y, Xing D, et al. One new benzylidihydrophenanthrene from *Arundina graminifolia* [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2005, 7(5): 767-770
- [13] Du G, Shen Y Q, Yang L Y, et al. Bibenzyl derivatives of *arundina graminifolia* and their cytotoxicity [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2014, 49(6): 1019-1022
- [14] 翁瑞旋,文小玲,罗敏,等.傣药竹叶兰化学成分及药理作用研究进展[J].昆明医科大学学报,2014,35(8):146-149
WENG Rui-xuan, WEN Xiao-ling, LUO Min, et al. Advance in the chemical and pharmacological studies on *Arundina graminifolia* [J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2014, 35(8): 146-149
- [15] 唐德英,王云娇,李荣英,等.野生竹叶兰引种栽培初报[J].中药材,2005,28(4):263-264
TANG De-ying, WANG Yun-jiao, LI Rong-ying, et al. Preliminary report on introduction and cultivation of wild *Arundina graminifolia* [J]. *Jornal of Chinese Medicinal Materials*, 2005, 28(4): 263-264
- [16] 张文珠,林炳英,林德钦.竹叶兰的无菌播种快繁技术研究[J].热带农业科学,2011,31(12):16-19
ZHANG Wen-zhu, LIN Bing-ying, LIN De-qin. Aseptic sowing and rapid propagation technology for *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr [J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2011, 31(12): 16-19
- [17] Schulz B, Wanke U, Draeger S. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods [J]. *Mycological Research*, 1993, 97(12): 1447-1450
- [18] 张新国,唐鹏,刘英娟,等.6种药用植物内生菌提取物的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2016,32(4):66-74
ZHANG Xin-guo, TANG Peng, LIU Ying-juan, et al. Antioxidant activity of endophyte extracts isolated from six medicinal plants [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(4): 66-74
- [19] Atoui A K, Mansouri A, Boskou G, et al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile [J]. *Food Chemistry*, 2005, 89(1): 27-36
- [20] Wang Y, Yang Z, Wei X. Antioxidant activities potential of tea polysaccharide fractions obtained by ultra filtration [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 50(3): 558-564
- [21] Du X, Mu H, Zhou S, et al. Chemical analysis and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Inonotus obliquus sclerotia* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 62: 691-696