

铁皮石斛内生真菌的分离及其体外抑菌和抗肿瘤活性初步研究

周琢艳², 刘玉寒³, 刘文洪^{1*}, 李俊峰¹, 杨明², 郭莹², 夏瑾¹

1. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053

3. 南昌大学第一临床医学院, 江西 南昌 330000

摘要: 目的 分离铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 内生真菌, 研究内生真菌的分布并初步探讨和筛选具有抑菌和抗肿瘤活性的特异菌株。方法 利用组织分离法和分子生物学方法分离、鉴定内生真菌; 以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌作为受试对象, 采用对峙法和管碟法分别对内生真菌及其发酵代谢产物的醋酸乙酯萃取相进行抑菌实验; 采用 MTT 法对内生真菌代谢产物醋酸乙酯萃取相进行体外抗肿瘤活性检测。结果 从铁皮石斛中分离得到 28 株内生真菌, 分子鉴定结果显示, 分离的内生真菌归属于 10 个属, 其中镰刀菌属为优势属。抑菌实验结果显示 28 株内生真菌中, 有 7 株至少能对 1 种指示菌有抑菌作用, 其代谢产物的醋酸乙酯萃取相对 3 种指示菌和 HepG2 细胞具有不同程度的抑制作用。结论 铁皮石斛内生真菌种群丰富, 从中分离得到的内生真菌具有潜在的抑菌和抗肿瘤活性, 为进一步开发抑菌、抗肿瘤候选药物奠定基础。

关键词: 铁皮石斛; 内生真菌; 抗菌活性; 抗肿瘤活性; 镰刀菌属

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)03-0533-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.018

Isolation of endophytic fungi from *Dendrobium officinale* and preliminary evaluation of *in vitro* biological activity

ZHOU Zhuo-yan², LIU Yu-han³, LIU Wen-hong¹, LI Jun-feng¹, YANG Ming², GUO Ying², XIA Jin¹

1. College of Basic Medicine Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

3. College of Clinical Medicine, Nanchang University, Nanchang 330000, China

Abstract: Objective To study the distribution of endophytic fungi from *Dendrobium officinale* and screen the distinctive fungi with antimicrobial and antitumor activities. **Methods** Endophytic fungi were isolated by the conventional method and cylinder-plate method with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis* as subjects. The metabolites of ethyl acetate extracts with antitumor activity were identified based on MTT assay. **Results** A total of 28 strains of the endophytic fungi were isolated from *D. officinale*. By analyzing the data of molecular identity, there were 10 species in *D. officinale*, in which *Fusarium* Link is a dominant. The ethyl acetate extracts of the fermentation broth had different antibiotic activities on the indicator microorganisms, and had antitumor effect on HepG2 cells. **Conclusion** Endophytic fungi isolated from *D. officinale* have rich diversity and have antimicrobial and antitumor activities, which could be potential for developing antimicrobial and antitumor reagents.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; endophytic fungi; antibacterial activity; antitumor activity; *Fusarium* Link

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年生附生草本植物, 是《中国药典》2015 年版记载的 5 种药用石斛之一。《神农本草经》中将其列为上品, 味甘、质重、柔韧、黏性大, 具有大补五脏虚劳,

久服厚肠胃, 益寿延年、增强精气、益胃生津、滋阴清热的功效^[1]。铁皮石斛中含有的活性成分为石斛多糖、石斛碱、氨基酸及其衍生物以及多种挥发性成分^[2-3]。大量现代药理学研究结果表明, 铁皮石斛的有效成分具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、增强免疫

收稿日期: 2016-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270051); 浙江省自然科学基金项目 (LY16H28007)

作者简介: 周琢艳 (1992—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药抗肿瘤研究。E-mail: 884621970@qq.com

*通信作者 刘文洪 Tel: (0571)86613613 E-mail: lwh687@163.com

功能、降糖等作用^[4]，被国际药用植物界称为“药界大熊猫”。此外，铁皮石斛相关的产品不仅用于治疗疾病，还可加工成食品、保健品等，如石斛茶、果冻。因此，铁皮石斛的开发和应用具有很好的前景^[5]。

植物内生真菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部，而不使宿主植物表现出明显感染症状的真菌，是植物微生态系统中的重要组成成分^[6]。研究发现，内生真菌广泛存在于几乎所有植物中，且种类繁多。其与药用植物在长期的生活过程中，形成了互惠互利的共生关系，在宿主的生长发育和系统演化过程中起重要作用。此外，内生真菌的代谢产物十分丰富，具有多种生物活性，是新化合物、新药源的潜在资源。本实验对广西产的铁皮石斛不同部位内生真菌进行了分离鉴定，并进行抑菌及其代谢产物的活性研究，旨在筛选出能产生新型抗菌、抗肿瘤物质的真菌以及具有生物活性的代谢产物，为铁皮石斛的综合利用、新药开发提供前期实验研究基础。

1 材料

1.1 药材

铁皮石斛，采自广西容县，经浙江中医药大学李荣群副教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo。对采集的铁皮石斛根部、茎部和叶部样本进行编号，即广西根部（GXR）、广西茎部（GXS）和广西叶部（GXL）。

1.2 菌株与细胞株

大肠杆菌（*Escherichia coli*，ATCC 25922）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*，ATCC 25923）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*，ATCC6633）、人肝癌 HepG2 细胞，均由浙江中医药大学基础医学院微生物与免疫学教研室提供。

1.3 试剂与仪器

MS 培养基、分离培养基（PDA 培养基）、LB 培养基均由实验室配制；0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA（吉诺生物医药技术有限公司）；胎牛血清、高糖 DMEM 培养基（杭州普域公司）；其他试剂均为国产分析纯；354 型酶标仪（美国 Thermo 公司）；IX70 倒置相差显微镜（日本 Olympus 公司）。

2 方法

2.1 内生真菌的分离与纯化

从新鲜健康的广西铁皮石斛完整植株取下根、茎、叶 3 个部位，用自来水冲洗干净，剔除腐叶，用滤纸吸干表面水分。按下列程序进行表面消毒：

75%乙醇浸泡 30 s，无菌水冲洗 4~6 次；0.1%升汞浸泡 2 min，无菌水冲洗 4~6 次；置于培养皿中，用滤纸吸干多余水分；无菌条件下，将根、茎切割成 0.5 cm³ 的小块，叶切割成 0.5 cm² 的小块，置于 MS 培养基上，28 ℃ 恒温培养，同时取最后 1 次冲洗样本的无菌水 200 μL 涂布于 PDA 培养基上，28 ℃ 恒温培养，检验表面消毒是否彻底。逐日观察，待组织块切面长出菌后及时挑取菌丝转移到 PDA 培养基上，采用平板划线法进行纯化，直至平板中菌落形态、菌丝、孢子形态和菌落颜色稳定，得到菌落纯菌株，编号并保存菌种备用。

2.2 内生真菌的形态鉴定

根据菌落的形状、大小、颜色、纹饰等特征，在 PDA 培养基中于 28 ℃ 培养 3~8 d，观察菌落和菌丝等形态及颜色，结合革兰氏染色进行形态初步鉴定。

2.3 内生真菌的分子鉴定

取各内生真菌菌丝 0.8~1.0 g，于液氮中（加 0.01 g 聚乙烯吡咯烷酮）研磨成细粉状后，放入 1.5 mL 离心管中，采用 CTAB 法提取内生真菌 DNA，以真菌通用引物 ITS1：5'-TCCGTAGGTGAAC-CTGCGG-3' 和 ITS4：5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 扩增 ITS rDNA 基因序列。扩增产物纯化后送上海生工生物工程有限公司测序。

根据测序结果，登录 GenBank 进行 BLAST 比对，搜索同源序列，选出与该序列相关性较高的核酸序列进行分析。采用 Clustal W^[7] 软件进行多序列比对分析，利用 Mega5.0 构建系统发育进化树。

2.4 菌株抑菌活性筛选

采用平板对峙法^[8]，将指示菌菌液（约 1×10⁶ cfu/mL）涂布于 LB 平板，制成含菌平板，将直径 7 mm 的圆形内生真菌菌片置于 LB 培养基上，每个样品重复 3 次。于 37 ℃ 生化培养箱中培养 24 h，观察抑菌圈大小，并做记录。

2.5 内生真菌的发酵培养及发酵产物的提取

取抑菌活性较强的内生真菌接种于 PDA 液体培养基中，28 ℃、150 r/min 恒温振荡培养 7 d。发酵液用等体积的醋酸乙酯提取 3 次，提取液减压浓缩得浸膏，4 ℃ 保存进行抑菌和抗肿瘤活性实验。

2.6 代谢产物抑菌活性筛选

以醋酸乙酯溶解浸膏（质量浓度为 20 mg/mL），进行抑菌活性实验。采用管碟法^[9]测定代谢产物抑菌活性，将指示菌菌液（约 1×10⁶ cfu/mL）均匀涂

布于 LB 培养基上, 放入牛津杯, 并向杯中加入配好的醋酸乙酯代谢产物溶液 100 μ L, 以等体积醋酸乙酯溶剂做阴性对照, 每个样品重复 2 次。于 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱中培养 24 h, 测量抑菌圈大小并记录。

2.7 代谢产物体外抗肿瘤活性检测

采用 MTT 法^[10]进行抗肿瘤活性检测, 以人肝癌 HepG2 细胞为受试对象, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下的 DMEM 培养液中培养, 取对数生长期细胞, 用 0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化并制成细胞悬液, 调整细胞浓度至 $5 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 个/mL, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔加 100.0 μ L 细胞悬液, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中过夜。24 h 后换液, 每孔加入测试样品溶液 (终质量浓度为 10 mg/mL)。以 DMEM 培养液为阴性对照, 每组设 3 个复孔。培养 48 h 后, 加入 MTT 作用 4 h, 吸弃培养基, 加入 150.0

μ L DMSO 震荡 10 min, 在 570 nm 波长处检测吸光度 (*A*) 值, 并计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率 = $1 - \text{处理组 } A \text{ 值} / \text{阴性对照组 } A \text{ 值}$

3 结果

3.1 铁皮石斛内生真菌的分离鉴定

采用组织分离法从广西铁皮石斛的根、茎和叶中共分离得到 28 株内生真菌, 其中从根中分离出 12 株 (42.86%)、茎中 10 株 (35.71%)、叶中 6 株 (21.43%)。从分离部位看, 根部分离的菌株最多, 其次为茎, 叶中最少。

通过菌落形态和革兰氏染色对分离纯化的 28 株内生真菌进行初步鉴定, 结果见表 1。染色结果表明, 28 株菌中, 7 株菌的菌丝染色呈红色 (25%), 21 株菌的菌丝染色呈紫色 (75%)。各菌株的菌落形态特征、菌丝的染色结果及孢子的形态等均有差

表 1 内生真菌革兰氏染色结果及菌落形态特征

Table 1 Colony appearance of entophytic fungi from *D. officinale*

菌株编号	革兰氏染色	菌落形态
GXRz1	红	菌落粉白色放射状生长
GXRz2	红	菌落白色, 绒毛状
GXRz3	紫	菌落灰白色, 绒毛状, 白色边缘, 背面黑色基底
GXRz4	紫	菌落呈干燥的白色, 有枯黄色分泌物
GXRz5	紫	菌落呈棉絮状, 白色, 背面观察划线部分有红色, 生长较快
GXRz6	紫	菌落呈白色, 背面紫红色
GXRz7	紫	菌落呈蛋黄色毯状, 白色边缘, 背面灰黑色
GXRz8	红	菌落呈白色毡状, 基内菌丝白色
GXRz9	紫	菌落墨绿色毛毯状, 基质黑色
GXRz10	紫	菌落呈毡状, 刚开始暗白色, 最后灰绿色
GXRz11	紫	菌落白色, 雪花状中间凹陷
GXRz12	红	菌落灰白色, 细毛毯状, 基底沙黄色
GXSz1	紫	菌落毛毯状, 灰黄色, 基质黑色
GXSz2	紫	气生菌丝白色, 致密, 基内菌丝粉紫色
GXSz3	紫	菌落为白色, 絮状, 基底水红色
GXSz4	紫	气生菌丝白色, 放射状生长, 基内菌丝为牙色
GXSz5	红	菌落灰白色, 毯状, 基底为白色
GXSz6	紫	气生菌丝白色, 蓬松, 基内菌丝为姜黄色
GXSz7	紫	菌落白色, 絮状, 基质呈浅红色
GXSz8	红	气生菌丝白色, 蓬松, 基内菌丝白色
GXSz9	紫	菌丝绿色, 稀疏, 分泌物使培养基由绿变黑
GXSz10	红	菌落白色, 细毛毯状, 菌丝细长发达
GXLz1	紫	菌落呈棉絮状, 白色, 背面呈暗红色
GXLz2	紫	菌落呈灰绿偏灰, 背面黑色
GXLz3	紫	菌落呈棉絮状, 白色, 培养时间变长有淡黄色出现
GXLz4	紫	菌落呈棉絮, 白色, 背面观察划线部分有红色, 生长较快
GXLz5	紫	菌落呈灰偏黑, 背面呈黑黄色
GXLz6	紫	菌落呈白色, 毛毯状, 背面紫色

GX-广西 R-根 S-茎 L-叶 z-真菌

GX-Guangxi R-root S-stem L-leaf z-fungus

异。菌落形态丰富,有毛毯状、絮状、棉絮状、绒毛状等,各菌落颜色也不尽相同,有白色、蛋黄色、灰白色、灰绿色等。

利用分子生物学方法得到测序结果,登录 NCBI 网站,进行 BLAST 比对,比对结果见表 2。镰刀菌属 *Fusarium* 为 12 株、链格孢属 *Alternaria*、刺盘孢属 *Colletotrichum*、小球壳孢属 *Microspheeropsis*、黑孢霉属 *Nigrospora*、炭角菌属 *Xylaria* 和未知真菌各为 2 株,生赤壳属 *Bionectria*、

枝孢属 *Cladosporium*、*Meyerozyma* 属、鼓孢瘤座霉属 *Pithomyces* 各为 1 株。其中,镰刀菌属 *Fusarium* 为铁皮石斛内生真菌的优势种群,占分离得到的内生真菌的 42.86%。

3.2 铁皮石斛内生真菌的抑菌活性

平板对峙实验结果显示,7 株内生真菌至少对 1 种指示菌有抑菌作用(抑菌圈直径大于 7 mm),抗大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的活性菌株分别有 3、5、3 株(表 3)。部分菌株对峙结果见图 1。

表 2 铁皮石斛内生真菌菌属鉴定结果

Table 2 Identification of entophytic fungi from *D. officinale*

菌株编号	相近的属	相似度/%	菌株编号	相近的属	相似度/%
GXRz1	<i>Fusarium equiseti</i> (HG798754)	98	GXSz3	<i>Pleosporales</i> sp. LH241 (HQ832825)	100
GXRz2	<i>Fusarium oxysporum</i> Z9 (EF611088)	99	GXSz4	<i>Glomerella cingulate</i> (HQ607386)	100
GXRz3	Fungal endophyte sp. P54-001 (EU818918)	99	GXSz5	<i>Xylariales</i> sp. JS18 (KM513623)	100
GXRz4	<i>Bionectria</i> sp. EXMQ-9 (FJ233188)	100	GXSz6	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KM357453)	99
GXRz5	<i>Fusarium solani</i> (KF494120)	100	GXSz7	<i>Fusarium solani</i> strain LW-1 (EU719658)	99
GXRz6	<i>Gibberella fujikuroi</i> (AB237662)	100	GXSz8	<i>Fusarium oxysporum</i> 2906 (KM817209)	99
GXRz7	<i>Pithomyces sacchari</i> MITS2136 (KP132540)	99	GXSz9	<i>Alternaria tenuissima</i> (JQ417902)	99
GXRz8	<i>Fusarium fujikuroi</i> 2F5 (KF572451)	100	GXSz10	<i>Cladosporium</i> sp. HDN13-394 (KF986437)	100
GXRz9	<i>Microspheeropsis arundinis</i> (KF624797)	99	GXLz1	<i>Fusarium proliferatum</i> A2S1-D96 (KJ767073)	99
GXRz10	<i>Alternaria alternata</i> isolate C8 (JF802121)	100	GXLz2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (HQ693799)	100
GXRz11	<i>Xylaria</i> sp. XF2 (HQ435659)	99	GXLz3	<i>Fusarium oxysporum</i> CID 199 (HQ829108)	100
GXRz12	<i>Microspheeropsis arundinis</i> AC380 (KJ413387)	100	GXLz4	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. (AY684920)	98
GXSz1	<i>Nigrospora oryzae</i> HGUP 0837 (KC806231)	100	GXLz5	<i>Nigrospora</i> sp. JS3 (KM513608)	99
GXSz2	<i>Fusarium oxysporum</i> UOA (KC254033)	100	GXLz6	<i>Fusarium solani</i> DE17 (KF897898)	99

表 3 铁皮石斛内生真菌抑菌活性筛选

Table 3 Antimicrobial activity of entophytic fungi in *D. officinale*

菌株编号	抑菌圈直径/mm		
	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌
GXRz4	11.0	7.0	7.0
GXRz6	7.0	13.4	7.0
GXRz12	20.5	17.6	21.2
GXSz7	15.0	17.0	7.0
GXSz9	7.0	7.0	18.2
GXSz10	7.0	12.8	19.0
GXLz5	7.0	19.6	7.0

3.3 铁皮石斛内生真菌发酵液的抑菌活性

对分离纯化得到的内生真菌进行发酵培养,采用管碟法,对 28 株铁皮石斛内生真菌发酵液醋酸乙酯部分样品进行抑菌实验,结果见表 4。

在 10 mg/mL 质量浓度下有 7 个测试样品至少对 1 种指示细菌具有抑制作用,对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌有抑菌活性菌株分别为 3、5、3 株。部分菌株代谢产物醋酸乙酯萃取相抑菌活性结果见图 2。



GXRz12 对大肠杆菌抑菌圈



GXLz5 对枯草芽孢杆菌抑菌圈



GXRz12 对金黄色葡萄球菌抑菌圈

菌饼直径 7.0 mm, 图 2 同

Diameter of bacterium tablets: 7.0 mm, Fig.2 is same

图 1 铁皮石斛部分内生真菌抑菌活性结果

Fig. 1 Antimicrobial activity of entophytic fungi from *D. officinale*

表 4 内生真菌发酵产物醋酸乙酯萃取相抑菌活性

Table 4 Antimicrobial activity of ethyl acetate extracts from fermentation broth of entophytic fungi from *D. officinale*

菌株编号	抑菌圈直径/mm		
	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌
GXRz4	11.4	8.0	8.0
GXRz6	8.0	14.0	8.0
GXRz12	22.6	18.4	21.8
GXSz7	15.8	18.0	8.0
GXSz9	8.0	8.0	18.8
GXSz10	8.0	13.2	20.5
GXLz5	8.0	20.0	8.0

牛津杯内径为 6.0 mm，外径为 8.0 mm，高为 10.0 mm

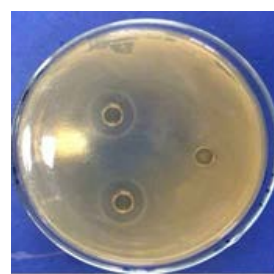
Internal diameter of Oxford cup: 6.0 mm, external diameter of Oxford cup: 8.0 mm, height: 10.0 mm



GXRz12 发酵液对大肠杆菌抑菌圈



GXRz12 发酵液对金黄色葡萄球菌抑菌圈



GXLz5 发酵液对枯草芽孢杆菌抑菌圈

图 2 铁皮石斛部分内生真菌发酵液的抑菌活性

Fig. 2 Antimicrobial activity of fermentation broth of endophytic fungi from *D. officinale*

表 5 内生真菌代谢产物醋酸乙酯萃取相对 HepG2 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Antitumor activity of ethyl acetate extracts from fermentation broth of entophytic fungi isolated from *D. officinale* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌株编号	A 值	增殖抑制率/%
GXRz4	0.686 ± 0.011	7.25
GXRz6	0.391 ± 0.009	47.12
GXRz12	0.292 ± 0.008	60.58
GXSz7	0.640 ± 0.008	13.56
GXSz9	0.344 ± 0.007	53.51
GXSz10	0.325 ± 0.008	56.08
GXLz5	0.725 ± 0.010	1.98



对照



GXLz5 10 mg·mL⁻¹



GXRz6 10 mg·mL⁻¹



GXRz12 10 mg·mL⁻¹

图 3 内生真菌代谢产物醋酸乙酯相对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

Fig. 3 Antitumor activity of ethyl acetate extracts from fermentation broth of entophytic fungi isolated from *D. officinale*

3.4 代谢产物醋酸乙酯部分体外抗肿瘤活性

采用 MTT 法检测 28 株铁皮石斛内生真菌代谢产物醋酸乙酯萃取部分对人肝癌细胞 HepG2 的细胞毒性，结果见表 5。7 株菌株代谢产物醋酸乙酯萃取部分在 10 mg/mL 质量浓度下对 HepG2 的增殖具有不同程度的抑制作用，抑制率在 30% 以上的有 4 株，50% 以上的有 3 株。菌株代谢产物有良好的体外抗肿瘤活性，可在后续实验中进一步研究。部分菌株抗肿瘤活性结果如图 3 所示。

4 讨论

近年来，随着人们对人工合成化学品安全性问题的关注，对天然产物的应用开发在学术界日益得

到重视。以铁皮石斛为原料的保健品、食品、化妆品越来越多，但从资源利用角度来说，野生铁皮石斛生长环境特殊，自身繁殖困难^[11-12]，自然界中的资源少。本实验对铁皮石斛内生真菌进行深入研究，以期寻找到产生与宿主植物相同或相似化学物质的内生真菌来缓解甚至解决这一问题。

植物内生真菌具有普遍性和多样性，其代谢产物中的生物活性成分具有很好的开发利用价值^[13-15]。杨明俊等^[16]以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯菌和人肝癌细胞 HepG2 作为受试对象，对从水仙中分离出的 18 株内生真菌发酵液的醋

酸乙酯提取物进行抑菌和抗肿瘤活性筛选, 结果表明, 各菌株发酵液的醋酸乙酯提取物对 4 种供试细菌和 HepG2 细胞都有抑制作用。王卓等^[17]对人参内生真菌进行了抗肿瘤活性研究, 其中有 2 株内生真菌的次级代谢产物具有良好的体外抗肿瘤活性。钱一鑫等^[18]采用 MTT 法对 54 株白苞蒿内生真菌发酵产物粗提物的体外抗肿瘤活性进行筛选, 发现对 3 种肿瘤细胞增殖有抑制作用。这些研究结果提示可进一步对内生真菌代谢产物进行分离提纯, 寻找具有抑菌、抗肿瘤活性的成分。

本实验以铁皮石斛作为研究对象, 从中分离得到 28 株内生真菌, 发现内生真菌的种群及分布具有差异, 根中内生真菌的数量和种类较多, 叶中最少; 其中, 12 株内生真菌鉴定为镰刀菌属, 是铁皮石斛内生真菌的优势种群。同时采用管碟法和 MTT 法对内生真菌代谢产物的抑菌活性及体外抗肿瘤活性进行检测, 发现具有抑菌活性的内生真菌, 其发酵液醋酸乙酯萃取同样具有不同程度的抑菌和抗肿瘤活性。其中, GXRz12 菌株具有较强的抗菌作用及良好的体外抗肿瘤活性, 提示可对其代谢产物进行进一步的分离纯化, 为抗肿瘤药物及抗菌药物的研究提供新的对象。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李 燕. 铁皮石斛化学成分的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [3] 周 佳, 周先丽, 梁成钦, 等. 铁皮石斛化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1292-1295.
- [4] 郑会丹. 石斛及其复方制剂降血糖作用及其疗效机制综述 [J]. 海峡药学, 2011, 23(10): 24-26.
- [5] 肖正杭. 铁皮石斛种质资源遗传多样性及 HPLC 指纹图谱分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [6] 周永强, 程玉鹏, 刘丹丹, 等. 药用植物内生真菌代谢产物的活性研究进展 [J]. 中医药信息, 2014, 31(3): 158-161.
- [7] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [8] 李 娟. 单蕊黄芪内生真菌的分离鉴定及其次级代谢产物生物活性的研究 [D]. 兰州: 兰州理工大学, 2014.
- [9] 陈国妮, 孙飞龙, 闫亚茹, 等. 抗菌剂抗菌性能测定与抗菌效果评价技术研究 [J]. 化工技术与开发, 2015, 44(2): 19-22.
- [10] Chanvorachote P, Pongrakhananon V. Ouabain downregulates Mcl-1 and sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 304(3): 263-272.
- [11] 张翼轸, 张文驹, 穆 青, 等. 人参化学成分的药理活性及其含量积累的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(20): 121581-12163.
- [12] 聂少平, 蔡海兰. 铁皮石斛活性成分及其功能研究进展 [J]. 食品科学, 2012, 33(23): 356-361.
- [13] Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites [J]. *Chem Biol*, 2012, 19(7): 792-798.
- [14] Pimentel M R, Molina G, Dionísio A P, *et al.* The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in bio-transformation process [J]. *Biotechnol Res Int*, 2011, doi: 10.4061/2011/576286.
- [15] 邓墨渊, 王伯初, 杨再昌, 等. 分子生物学技术在植物内生菌分类鉴定中的应用 [J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(3): 9-14.
- [16] 杨明俊, 李 娟, 薛鸿燕, 等. 水仙内生真菌的分离及抑菌和抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 819-824.
- [17] 王 卓, 于慧美, 刘 鼎, 等. 人参内生真菌的分离及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中国现代中药, 2016, 15(9): 748-751.
- [18] 钱一鑫, 康冀川, 雷帮星, 等. 白苞蒿内生真菌的分离及其抗肿瘤抗菌活性筛选 [J]. 菌物研究, 2013, 11(2): 149.