

基于高通量测序和组织分离法的虎耳草内生真菌多样性分析及其抗氧化活性研究

陈美琪¹, 王兴¹, 黎俊彦¹, 谭绮雯², 李鉴滨¹, 姚华雄¹, 张玉鑫¹, 谢思韵¹, 邓祖军^{1*}

1. 广东药科大学生命科学与生物制药学院 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广东 广州 510006

2. 广州市微生物研究所, 广东 广州 510663

摘要: 目的 结合高通量测序技术和传统可培养技术对虎耳草 *Saxifraga stolonifera* 内生真菌类群及多样性进行系统分析, 并对其抗氧化活性进行初筛, 为虎耳草内生真菌资源的开发与利用奠定基础, 也为天然抗氧化剂的筛选提供了菌种资源。方法 虎耳草内生真菌多样性的分析采用 Illumina Miseq 高通量测序技术和组织分离法, 利用化学法检测虎耳草内生真菌对 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, DPPH)、羟基自由基 (hydroxyl radical, OH) 和 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABT] 等自由基的清除率, 进而筛选出具有抗氧化活性的菌株。**结果** 高通量测序分析发现虎耳草内生真菌隶属于 347 属, 其中 *Dactyloectria* (15.68%) 为根部优势菌属, 茎部的优势菌属为 *Humicola* (9.57%), 而叶部优势菌属为炭疽菌属 *Colletotrichum* (5.33%)。利用组织分离法从虎耳草分离到 381 株内生真菌, 隶属于 31 个属, 主要类群为炭疽菌属 (19.42%)、篮状菌属 *Talaromyces* (10.76%) 和曲霉菌 *Aspergillus* (8.66%)。基于高通量测序的和组织分离法分析的多样性指数显示虎耳草根部分生真菌的多样性明显高于茎部和叶部, 而且虎耳草内生真菌总体多样性指数均高于多数已报道的其他药用植物。24 株代表性菌株发酵液的抗氧化活性初筛结果显示: 对 DPPH、OH 和 ABTS 自由基清除率高于 50% 的菌株分别占总数的 91.67%、79.17% 和 83.33%, 其中菌株 *Talaromyces* sp. HECS10 对 DPPH、OH 和 ABTS 3 种自由基的清除率均高于 75%。**结论** 虎耳草内生真菌的类群分布具有较高的多样性, 且蕴含着较高比例的抗氧化活性菌种资源, 为筛选微生物来源的天然抗氧化剂提供了重要资源库。

关键词: 虎耳草; 高通量测序; 内生真菌; 多样性; 抗氧化活性

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)06-1924-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.025

Study of endophytic fungi diversity of *Saxifraga stolonifera* based on high-throughput sequencing method and tissue isolation method and their antioxidant activities

CHEN Mei-qi¹, WANG Xing¹, LI Jun-yan¹, TAN Qi-wen², LI Jian-bin¹, YAO Hua-xiong¹, ZHANG Yu-xin¹, XIE Si-yun¹, DENG Zu-jun¹

1. School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University / Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou 510006, China

2. Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou 510663, China

Abstract: Objective To analyze the taxonomic structure and diversity of endophytic fungi of Huercao (*Saxifraga stolonifera*) by high-throughput sequencing technology and traditional culturing techniques, and screen the endophytic fungi strains with antioxidant activity, which laid the foundation for the utilization of the endophytic fungi of *S. stolonifera* and also provided microbial resources for screening of natural antioxidants. **Methods** The diversity of endophytic fungi in *S. stolonifera* was analyzed using Illumina Miseq high-throughput sequencing technology and tissue isolation method. The scavenging rate of endophytic fungi on DPPH, OH and ABTS was detected by chemical method for screening the endophytic strains with antioxidant activity. **Results** The diversity of endophytic fungi in *S. stolonifera* based on high-throughput sequencing showed that the endophytic fungi of *S. stolonifera* belonged

收稿日期: 2022-09-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31971384)

作者简介: 陈美琪, 硕士研究生, 研究方向为药用植物微生物资源开发。E-mail: 846825414@qq.com

*通信作者: 邓祖军, 教授, 研究方向为药用植物内生菌多样性与功能。E-mail: dengzujun66@163.com

to 347 genera. The *Dactylonectria* (15.68%) was the dominant genera in roots, and the dominant taxa in stems was *Humicola* (9.57%), while the dominant genera in leave was *Colletotrichum* (5.33%). A total of 381 endophytic fungi belonging to 31 genera were isolated from *S. stolonifera* using the tissue isolation method and the main taxa were *Colletotrichum* (19.42%), *Talaromyces* (10.76%) and *Aspergillus* (8.66%). Diversity indices analyzed based on high-throughput sequencing and the tissue isolation found that the diversity of endophytic fungi in *S. stolonifera* roots was significantly higher than those in stems and leaves, and that the total diversity index of fungal endophytes in *S. stolonifera* was higher than those in most other medicinal plants that have been reported. The results of the antioxidant activity of 24 representative endophytic strains showed that stains with free radical scavenging rates higher than 50% for DPPH, OH and ABTS accounted for 91.67%, 79.17% and 83.33%, respectively. Strain *Taromyces* sp. HECS10 had scavenging rates of over 75% for all of DPPH, OH and ABTS. **Conclusion** The endophytic fungi of *S. stolonifera* had a high diversity and contained a high proportion of antioxidant active bacterial resources, which provides an important resource library for screening natural antioxidants derived from microorganisms.

Key words: *Saxifraga stolonifera* Curt.; high-throughput sequencing technology; endophytic fungi; diversity; antioxidant activities

虎耳草 *Saxifraga stolonifera* Curt 属虎耳草科虎耳草属多年生草本药用植物, 其作为一种常用中药可全草入药, 性微苦、辛、寒, 具有祛风清热, 凉血解毒等功效, 可用于治疗风疹、湿疹、中耳炎、丹毒、肺痈、痔疾等症^[1-2]。已有研究表明虎耳草含有异香豆精类、酚酸类、萜类和黄酮类等多种化合物, 具有抑菌、抗炎、抗氧化、保肝、抗肿瘤等药理活性。例如卢玉栋等^[3]发现虎耳草提取物在体外具有良好的抑菌和抗氧化作用。Ji 等^[4]从虎耳草药草中分离得到岩白菜素, 具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化应激和神经保护的特性, 可通过激活人磷脂酰肌醇三羟基激酶/苏氨酸蛋白激酶信号通路改善 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱发的帕金森氏病。然而, 一方面由于人们滥挖乱采, 虎耳草野生资源越来越少, 难以满足制药对药源的要求^[5], 另一方面虎耳草在各地栽培所产的活性提取成分含量及作用效果等存在较大差异从而对后续利用造成了不便^[6-7], 因此寻找虎耳草药用资源更稳定有效、可持续的替代利用途径显得十分必要。

植物内生菌是指定殖在植物组织内部的微生物群落, 它们存在于植物发育的不同阶段, 且不会对宿主植物产生损害或者感染, 包括植物内生真菌、细菌和放线菌^[8]。研究表明, 植物内生真菌能产生多种结构类型的代谢产物, 包括生物碱、芳香类、多肽类、萜类、酚类和黄酮类等成分, 具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、免疫抑制剂和抗癌等多种生物学活性^[9-10], 其中很多内生真菌的代谢产物具有植物宿主提取物相同或相似的结构或活性, 如贺鹏飞^[11]从中药乌头中分离得到的内生菌中发现其代谢产物中含有乌头碱, 为乌头碱的获得提供

了微生物来源; 苏秀丽等^[12]从中药植物黄花倒水莲内生真菌中发现一株链格孢属 HNLF-44 菌株具有良好的抑菌和抗氧化活性, 与前人对宿主植物化学成分和药理活性所做的研究结果相符, 因此内生真菌是探寻新型活性物质的重要新资源, 也为药用植物资源的持续利用和保护提供了替代途径。全面了解药用植物内生真菌的类群与多样性信息是充分挖掘和利用植物内生真菌资源的前提。近年来, 高通量测序技术可直接在宿主组织内检测内生真菌, 具有测序基数大、深度高等优点, 能更加全面直观地分析植物组织内生真菌多样性^[13], 有研究者利用高通量测序技术分析朝鲜淫羊藿叶^[14]、百合^[15]的内生真菌群落多样性, 获得了大量的内生真菌类群信息, 为后续药用植物内生真菌的分离和利用奠定了基础。目前大量研究证实虎耳草提取物具有良好的抗氧化活性^[7,16], 但关于虎耳草的内生真菌生物多样性及其抗氧化活性的研究未见报道。因此本研究拟结合高通量测序和传统可培养技术对虎耳草内生真菌的多样性进行系统分析, 并对其代谢产物的抗氧化活性进行筛选, 从而为虎耳草内生真菌资源的后续利用奠定了基础, 也为微生物来源的天然抗氧化剂筛选提供菌种资源, 同时为解决虎耳草资源紧缺提供了替代利用途径。

1 材料与仪器

1.1 材料

供试植株为新鲜、健康 (无明显病症) 的虎耳草, 于 2021 年 7 月 7 日采集自湖南省张家界慈利县 (29°23'90.2N, 111°07'77.6E), 株高约 16 cm, 经华南植物园陈贻竹研究员鉴定为虎耳草 *S. stolonifera* Curt。将植株完整采摘后送至实验室并于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2 主要试剂及仪器设备

高效植物基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; 真菌 DNA 小量提取试剂盒, Magen 公司; 引物 (ITS1 和 ITS4), 生工生物工程 (上海) 有限公司; 马铃薯葡萄糖固体培养基 (PDA) 和液体培养基 (PDB), 广东环凯生物技术有限公司; 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基 (DPPH), 购自 Sigma 公司; 抗坏血酸 (Vc)、水杨酸、硫酸亚铁、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS)、过硫酸钾为分析纯, 上海麦克林有限公司; SW-CJ-1F 型单面双人洁净工作台, 苏州苏洁净化设备有限公司; ETC811 基因扩增仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; JY-C 电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; SpectraMax i3x 酶标仪, MD 美谷分子公司。

2 方法

2.1 虎耳草植株样品的表面消毒

将新鲜健康虎耳草植株在流水下冲洗以去除土壤颗粒等表面杂质, 用无菌剪刀剪切至适量大小, 无菌水清洗 3~5 遍并用无菌滤纸吸干, 依次在 75% 的酒精中浸泡 1 min, 含 3%~5% 有效氯的 NaClO 溶液中浸泡根部 1 min、茎部 2 min、叶部 1.5 min, 再用 75% 酒精浸泡 30 s, 最后用无菌水漂洗 3 遍, 并收集最后一次漂洗样品的无菌蒸馏水, 经平板涂布检查无菌后进行后续实验, 样品则静置于无菌滤纸上吸去多余水分, 晾干。

2.2 虎耳草植株总 DNA 的提取及 PCR 扩增

将按“2.1”项消毒好的虎耳草不同部位通过高效提取试剂盒提取样品基因组总 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳法对提取的 DNA 纯度及浓度进行验证, 确认合格后送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行检测。

2.3 高通量测序及数据处理

根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据, 截去 Barcode 和引物序列后进行拼接、过滤、质量控制、与物种注释数据库进行比对检测并去除嵌合体序列, 最终得到有效数据。以 97% 的一致性^[17]将聚类成为可操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs), 用 Qiime 软件 (V 1.9.1) 对 OTUs 中出现频数最高的序列进行物种注释分析^[18], 并分别在门纲目科属种各个分类水平统计各样本的群落组成。使用 MUSCLE (V 3.8.31) 软件进行快速多序列比对, 得到所有 OTUs 代表序列的系统发生关系, 再对各样本的数据进行均一化处理后进行 Alpha 多样性分析和 Beta 多样性

分析, 最后使用 R 软件 (V 2.15.3) 绘制稀释曲线, Rank abundance 曲线等。

2.4 虎耳草内生真菌可分离培养、纯化及其多样性分析

将虎耳草植株按“2.1”项步骤进行表面消毒验证无菌后, 采用文献^[19]中的组织块分离法进行虎耳草内生真菌的分离, 将晾干后的样品剪切至适当小片, 接种至 PDA 培养板在 28 °C 下培养 1~2 周, 每日观察, 若有菌丝从植物组织切口长出, 及时挑出转移至新的平板上, 纯化培养后接种至斜面培养基, 4 °C 保存备用。参考文献^[20-22]中的方法根据菌落的菌丝和孢子等形态学特征及 ITS 测序进行内生真菌的分类鉴定。然后, 按照真菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明书提取真菌 DNA, 引物为 ITS1 和 ITS4, 再将经琼脂糖凝胶电泳检测合格后的 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序鉴定, 利用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在 GenBank 中获取与鉴定菌株序列相似的相似序列信息。

2.5 虎耳草内生真菌抗氧化活性菌株筛选

选取虎耳草不同部位代表性菌株进行 DPPH、OH 和 ABTS 自由基抗氧化活性筛选。接种适量菌饼至 PDB 培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 5~7 d, 然后将发酵液依次通过纱布、滤纸进行滤过, 再用 0.22 μm 微孔滤膜对发酵液进行过滤除菌, 收集得到内生真菌发酵液, 于 4 °C 冰箱保存备用。

参考 Subbiah 等^[23]的方法并加以改进后进行测定。采用无水乙醇溶液将 DPPH 配制成 0.05~0.1 mmol/L 的溶液。以 Vc 为阳性对照, 在 96 孔板中分别以 A_x 为 100 μL 不同内生真菌发酵液或者阳性对照品与 100 μL 的 DPPH 混合溶液, A_c 为 100 μL 内生真菌发酵液与 100 μL 的无水乙醇溶液混合, A₀ 取 100 μL 无水乙醇溶液与 100 μL 的 DPPH 溶液, 即以无水乙醇作空白对照, 震荡摇匀, 在 25 °C 避光反应 30 min, 最后在 517 nm 下检测 A 值, 每个样品平行测 3 次, DPPH 自由基清除率计算如公式 (1) 所示。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_x - A_c) / A_0 \quad (1)$$

OH 自由基测定采用水杨酸法, 参照文献中 Hu 等^[24]的方法并加以改进后进行测定。称量试剂, 配制 0.1% 的 H₂O₂ 溶液, 浓度为 6 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液和水杨酸乙醇溶液。以 Vc 为阳性对照, 在 96 孔板中依次加入 6 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液、水杨酸

乙醇溶液各 50 μL, 不同内生真菌发酵液或者阳性对照品 50 μL, 然后加入 0.1% 的 H₂O₂ 溶液 50 μL 混合均匀, 设为 B_x, 其中, 对照管 B_c 以 B_x 为基础, 用无水乙醇替代水杨酸乙醇溶液, B₀ 以 B_x 为基础, 用无菌蒸馏水替代内生真菌发酵液, 总体积为 200 μL, 摇匀后在 37 °C 下孵育 30 min, 510 nm 处测定 A 值, 每组实验平行操作测定 3 次, OH 自由基清除率计算见公式 (2)。

$$\text{OH 自由基清除率} = 1 - (B_x - B_c) / B_0 \quad (2)$$

参考文献中 Zou 等^[25]方法并加以改进后进行测定。首先, 配制 ABTS 溶液, 将 7 mmol/L ABTS 和 140 mmol/L 过硫酸钾溶液混合制备 ABTS 储备溶液, 在黑暗环境中孵育 16 h, 再用无水乙醇溶液将其在 734 nm 下的 A 值调整至 0.70±0.02。以 Vc 为阳性对照, 在 96 孔板中加入 50 μL 的不同内生真菌发酵液或者阳性对照品 (Y_x) 和 200 μL ABTS 溶液 (Y_c), 混合摇匀 10 s 以充分混合, 避光静置 6 min, 用无水乙醇作为空白对照 (Y₀), 在 734 nm 波长下检测 A 值, 每个样品平行测 3 次, ABTS 自由基清除率计算见公式 (3)。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = 1 - (Y_x - Y_c) / Y_0 \quad (3)$$

2.6 数据分析

虎耳草内生真菌的定殖率 (colonization rate, CR)、分离率 (isolation frequency, IF)、相对分离频率 (relative frequency, RF)、Shannon-Wiener 多样性指数 (H')

均匀度指数 (E) 以及相似性指数 (C_s) 参考孟祥才等^[26]的方法进行计算, 不同部位间采用 Duncan's 多重比较法进行分析, 统计显著水平为 P<0.05。

3 结果与分析

3.1 高通量测序分析真菌多样性分析

3.1.1 虎耳草高通量测序样本数据统计与 Alpha 多样性分析 利用 Illumina 高通量测序技术, 从虎耳草根、茎、叶 3 个部位的样品中共得到有效序列 660 231 条, 其中根部 244 780 条, 茎部 188 596 条, 叶部 226 855 条 (表 1)。基于 97% 的有效性进行 OTU 聚类分析从根、茎、叶分别获得 507、377、550 个 OTUs (图 1)。样品的稀释曲线显示其随着测序数量的增加趋向平坦 (图 2), 且 3 个部位的 OTU 覆盖指数均为 1 (表 1), 这表明测序结果能够较好地反映虎耳草各部位间微生物的真实情况。叶部的 Chao1 和 ACE 指数最高, 其次为根部, 茎部最低, 这表明虎耳草叶部的内生真菌物种丰富度最高, 而茎部最低。根部的 Shannon 和 Simpson 指数要明显高于茎部和叶部, 这表明虎耳草根部的内生真菌物种多样性最高, 而茎部和叶部之间差异不大 (表 1)。虎耳草的根、茎、叶 3 部位共有的 OTU 为 96 个, 根部和茎部之间共有 194 个 OTU, 茎部与叶部共有 130 个 OTU, 叶部与根部之间共有 158 个 OTU, 其中根部和茎部之间共有 OTU 数量最多, 这表明这 2 个部位含有较多相似或是相同的物种 (图 1)。

表 1 虎耳草根、茎、叶中内生真菌的 Alpha 多样性指数

Table 1 Alpha diversity index of endophytic fungi in roots, stems and leaves of *S. stolonifera*

样品	有效序列数	Chao1 指数	Ace 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	覆盖度
根部	244 780	289.11	287.77	5.16	0.94	1
茎部	188 596	175.41	185.75	2.96	0.69	1
叶部	226 855	330.50	341.07	2.88	0.62	1

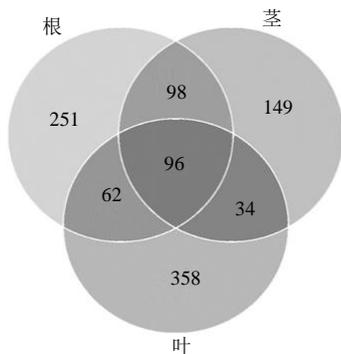


图 1 基于 OTU 的虎耳草根茎叶各部位 Venn 图

Fig. 1 Venn graph in roots, stems and leaves of *S. stolonifera* based on OTU

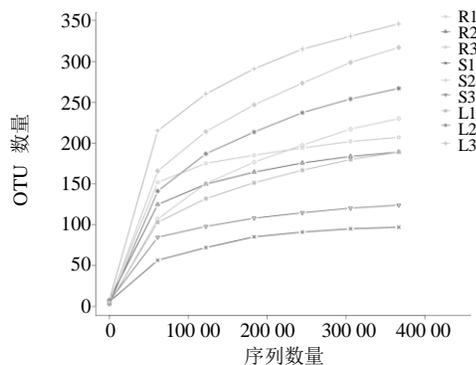


图 2 虎耳草根茎叶各样品的稀释曲线

Fig. 2 Dilution curve of roots, stems, and leaves of *S. stolonifera*

3.1.2 虎耳草高通量测序分析内生真菌的群落组成分析 基于高通量测序分析,虎耳草内生真菌隶属于11门、45纲、100目、205科和347属。在门的分类水平上(图3-a),子囊菌门(Ascomycota)是虎耳草根(84.81%)、茎(39.82%)、叶(27.09%)的共有优势菌门,其次为担子菌门(Basidiomycota),分别占根、茎、叶的8.97%、7.23%和7.43%。在纲分类水平上,虎耳草根部的的主要类群有粪壳菌纲(Sordariomycetes)、锤舌菌纲(Leotiomycetes)、散囊菌纲(Eurotiomycetes)和伞菌纲(Agaricomycetes),分别占比49.14%、19.39%、11.18%和8.74%;茎部中粪壳菌纲(24.41%)、座囊菌纲(Dothideomycetes, 7.66%)和散囊菌纲(5.19%)的相对丰富较高,而在叶部的的主要类群为粪壳菌纲、座囊菌纲和节担菌纲(Wallemiomycetes),分别占15.73%、4.74%和4.46%(图3-b)。在目分类水平上,虎耳草根优势类群为肉座菌目(Hypocreales, 26.84%)和柔膜菌目(Helotiales, 18.69%);茎部为粪壳菌目(Sordariales)、肉座菌目和格孢腔菌目(Pleosporales),分别占比为10.75%、7.16%和6.76%;另外,肉座菌目(6.98%)、Glomerellales(6.69%)和节担菌目(Wallemiales, 4.46%)是叶部的优势类群(图3-c)。在科分类水平上,赤壳科(Nectriaceae)为虎耳草根、茎、叶的共同优势菌科,分别占26.19%、

9.69%、6.88%(图3-d)。在属分类水平上, *Dactylonectria*、*Minimelanolocus* 和 *Mycocleptodiscus* 为根部优势菌属,分别占比15.68%、7.23%和6.03%;茎部的优势菌属为 *Humicola* (9.57%)、链格孢属 *Alternaria* (4.15%) 和 *Minimelanolocus* (2.13%);炭疽菌属 *Colletotrichum*、丽赤壳菌属 *Calonectria* 和 *Wallemia* 属为叶部优势菌属,分别占比5.33%、4.63%和4.46%(图4-b)。

3.2 基于可培养方法的内生真菌多样性分析

3.2.1 虎耳草内生真菌的分离率和定殖率 表面消毒最后一次漂洗用无菌水经平板涂布培养7 d后,检查无菌生长,这表明分离得到的菌株均属虎耳草的内生真菌。从430块虎耳草不同部位组织块中共分离得到381株内生真菌,其中根部103株,茎部136株,叶部142株(表2)。虎耳草叶、根、茎部内生真菌的定殖率分别为89.33%、79.23%和78.63%,其内生真菌分离率分别为94.67%、90.67%和79.23%,3个部位中叶部内生真菌的分离率和定殖率均为最高(表2)。

3.2.2 虎耳草内生真菌的类群组成 利用组织分离法共从虎耳草分离到381株内生真菌,经形态学鉴定和ITS-rDNA序列分析,其属于31个属,其主要类群为炭疽菌属(19.42%)、篮状菌属(*Talaromyces*, 10.76%)、曲霉菌(*Aspergillus*, 8.66%)、青霉菌属

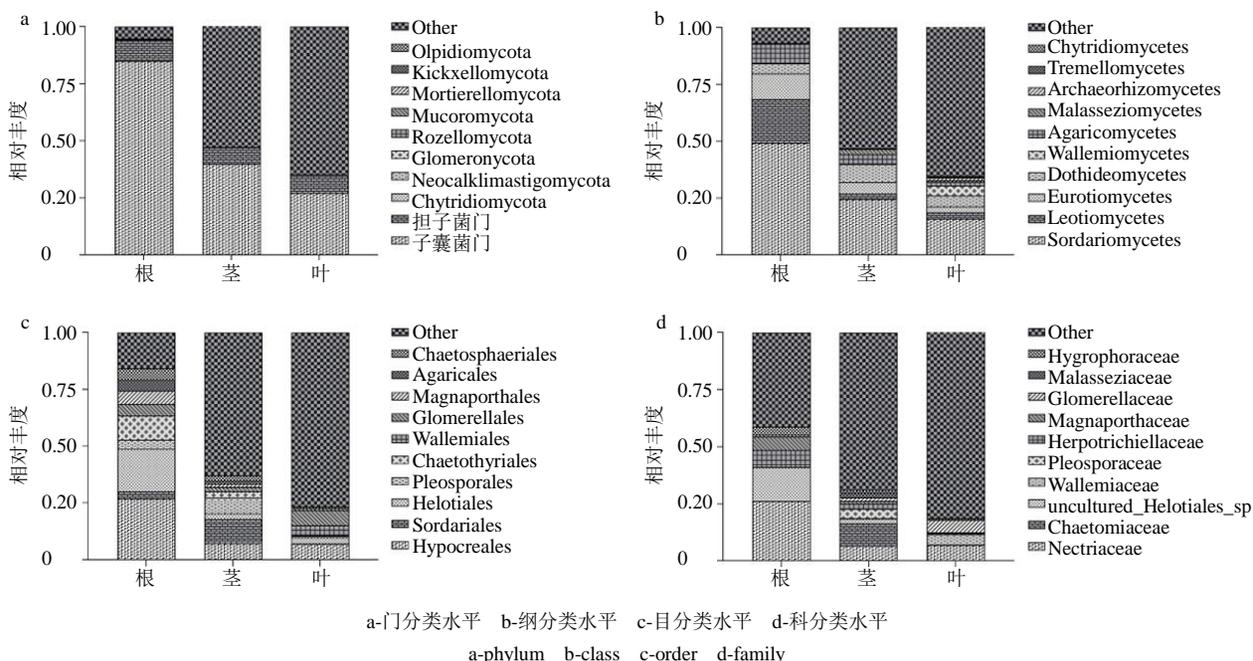


图3 虎耳草根茎叶不同部位内生真菌在不同分类水平上的相对丰度
 Fig. 3 Relative abundance of endophytic fungi in roots, stems and leaves of *S. stolonifera*

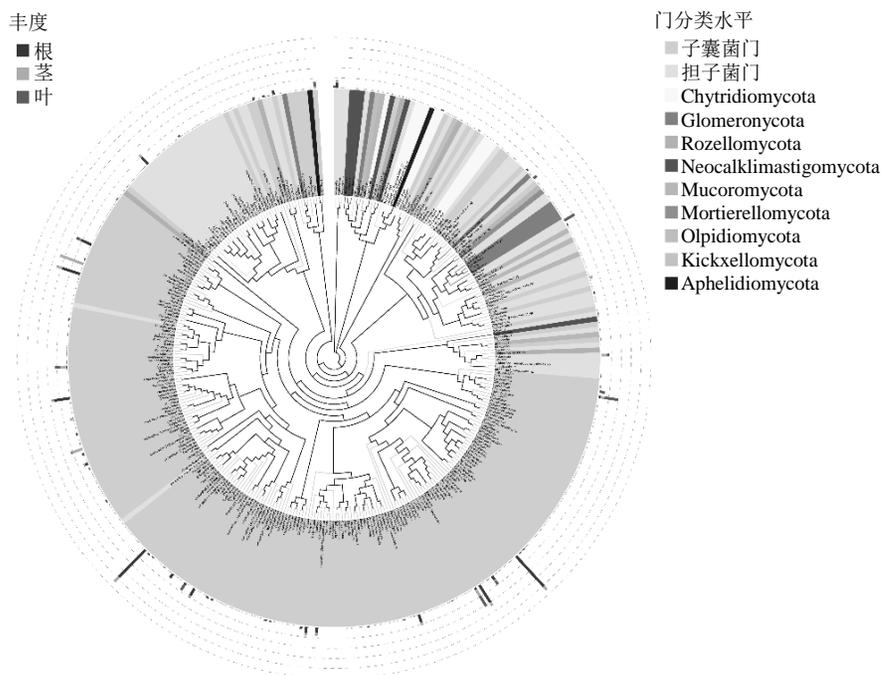


图 4 虎耳草根茎叶中内生真菌在属分类水平上的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of endophytic fungi at genus in roots, stems and leaves of *S. stolonifera*

表 2 虎耳草根、茎、叶内生真菌的分离率和定殖率

Table 2 Isolation rate and colonization rate of fungal endophytes of *S. stolonifera*

部位	组织块数	长菌组织块	内生真菌数	定殖率/%	分离率/%
根	130	103	103	79.23 ^b	79.23 ^c
茎	150	118	136	78.67 ^c	90.67 ^b
叶	150	134	142	89.33 ^a	94.67 ^a
总计	430	355	381	82.56	88.60

同列的不同小写字母表示根、茎叶不同部位之间具有显著差异 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between different parts of roots, stems and leaves ($P < 0.05$)

Penicillium (7.87%)、丽赤壳属 (7.61%) 和间座壳属 *Diaporthe* (7.35%) (表 3)。虎耳草内生真菌不同部位之间内生真菌类群组成存在一定差异: 根部内生真菌有 20 个属, 其优势菌属为炭疽菌属、篮状菌属和 *Dactylonectria*, 相对分离频率分别为 10.68%、10.68% 和 9.71%; 茎部共分离得到 12 个属, 优势属为炭疽菌属 (15.44%)、篮状菌属 (12.50%)、间座壳属 (11.76%) 和曲霉菌 (11.03%); 另外, 叶部分离到 12 个属, 炭疽菌属 (29.58%)、丽赤壳属 (11.97%) 和青霉菌属 (10.56%) 为主要类群。

3.2.3 虎耳草不同部位内生真菌的多样性和相似性比较 虎耳草内生真菌的 H' 为 3.01, 其中根部 H' 值最高 (2.81), 其次是茎部 (2.36), 叶部 (2.18) 最低。虎耳草茎部 (0.95) 和根部 (0.94) 的内生真

菌均匀度指数明显高于叶部 (0.88) ($P < 0.05$)。茎部与叶部、根部与茎部、根部与叶部之间的内生真菌组成的相似性指数介于 0.25~0.50, 均为中等不相似 (表 4)。

3.3 虎耳草内生真菌抗氧化菌株筛选结果

挑选出 24 株代表性内生真菌菌株, 其分子鉴定结果见表 5, 并对它们的抗氧化活性进行了筛选, 结果发现, DPPH 自由基清除率大于 50% 的菌株有 22 株, 占测试菌株的 91.67%, 高于 80% 的菌株有 4 株 (占 16.67%), 分别为 *Cylindrocladiella* sp. HECCR12、*Talaromyces* sp. HECS10、*Phyllosticta* sp. HECL35 和 *Fusarium* sp. HECS27, 其中菌株 *Fusarium* sp. HECS27 (91.67%) 的清除率最高; OH 自由基清除率大于 50% 的菌株有 19 株 (占 79.17%), 高于 80% 的菌株有 *Fusarium* sp. HECS27

表 3 虎耳草内生真菌的种类组成

Table 3 Taxa of endophytic fungi in *S. stolonifera*

序号	菌属	内生真菌的相对分离频率/%			
		根	茎	叶	总计
1	篮状菌属 <i>Talaromyces</i>	10.68	12.50	9.15	10.76
2	青霉菌属 <i>Penicillium</i>	5.83	6.62	10.56	7.87
3	炭团菌属 <i>Hypoxylon</i>	4.85	0.00	0.00	1.31
4	角菌根菌属 <i>Ceratobasidium</i>	2.91	0.00	0.00	0.79
5	无柄盘菌属 <i>Pezicula</i>	2.91	0.00	0.00	0.79
6	炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>	10.68	15.44	29.58	19.42
7	硬孔菌属 <i>Rigidoporus</i>	4.85	0.00	0.00	1.31
8	小帚梗柱孢属 <i>Cylindrocladiella</i>	3.88	0.00	0.00	1.05
9	裂褶菌属 <i>Schizophyllum</i>	0.97	0.00	0.00	0.26
10	中碳垫菌属 <i>Nemania</i>	6.80	0.00	0.00	1.84
11	平革菌属 <i>Phanerochaete</i>	3.88	0.00	0.00	1.05
12	棒孢菌属 <i>Corynespora</i>	8.74	4.41	0.00	3.94
13	蜡质菌属 <i>Ceriporia</i>	0.97	0.00	0.00	0.26
14	<i>Acrocalymma</i>	7.77	4.41	0.00	3.67
15	<i>Dactylonectria</i>	9.71	0.00	0.00	2.62
16	曲霉菌 <i>Aspergillus</i>	3.88	11.03	9.86	8.66
17	<i>Emmia</i>	1.94	0.00	0.00	0.52
18	<i>Muyocopron</i>	2.91	0.00	0.00	0.79
19	拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	3.88	0.00	4.23	2.62
20	木霉属 <i>Trichoderma</i>	1.94	0.00	0.00	0.52
21	丽赤壳属 <i>Calonectria</i>	0.00	8.82	11.97	7.61
22	间座壳属 <i>Diaporthe</i>	0.00	11.76	8.45	7.35
23	香菇属 <i>Lentinus</i>	0.00	3.68	0.00	1.31
24	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	0.00	13.24	0.00	4.72
25	<i>Coniochaeta</i>	0.00	2.94	0.00	1.05
26	毛硬孔革菌 <i>Duportella</i>	0.00	5.15	0.00	1.84
27	<i>Pleurostoma</i>	0.00	0.00	2.82	1.05
28	可可毛色二孢菌 <i>Lasiodiplodia</i>	0.00	0.00	6.34	2.36
29	<i>Hypomontagnella</i>	0.00	0.00	2.11	0.79
30	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	0.00	0.00	2.82	1.05
31	叶点霉属 <i>Phyllosticta</i>	0.00	0.00	2.11	0.79

表 4 虎耳草根、茎、叶中内生真菌的多样性

Table 4 Diversity of endophytic fungi in roots, stems and leaves of *S. stolonifera*

植株部位	株数	物种数	多样性指数	均匀度指数	相似性指数		
					根	茎	叶
根	103	20	2.81 ^a	0.94 ^a	1.00	0.38	
茎	136	12	2.36 ^b	0.95 ^a		1.00	0.50
叶	142	12	2.18 ^c	0.88 ^b	0.31		1.00
总计	381	31	3.01	0.88			

第 4~5 列中不同小写字母表示不同部位的多样性指数和均匀度指数具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters in columns 4—5 indicate significant differences in diversity index and uniformity index of different parts ($P < 0.05$)

和 *Colletotrichum* sp. HECL23，其中菌株 *Colletotrichum* sp. HECL23 的清除率 (98.88%) 高于阳性对照组 (Vc)，具有很强的 OH 清除能力；ABTS 自由基清除率大于 50% 的有 20 株，占测试菌株的 83.33%，其中高于 80% 的有 *Penicillium* sp. HECS30

和 *Aspergillus* sp. HECS31，其清除率为别为 81.27% 和 88.70%。菌株 *Fusarium* sp. HECS27 对 DPPH、OH 自由基清除率均高于 80%，菌株 *Talaromyces* sp. HECS10 对 DPPH、OH、ABTS 3 种自由基的清除率均高于 75% (表 6)。

表 5 虎耳草内生真菌的分子鉴定

Table 5 Molecular identification of endophytic fungi from *S. stolonifera*

序号	菌株编号	植株部位	最相似菌株	一致性/%	属
1	HECR8	根	<i>Ceriporia alachuana</i> strain FP-103881-Sp (KP135341.1)	99.24	蜡质菌属 <i>Ceriporia</i>
2	HECR17	根	<i>Acrocalymma medicaginis</i> strain 5-F33 (MW081367.1)	99.62	<i>Acrocalymma</i>
3	HECR38	根	<i>Trichoderma asperellum</i> strain SCGA5008 (JQ040319.1)	99.83	木霉属 <i>Trichoderma</i>
4	HECR34	根	<i>Emmia lacerata</i> strain WZ-157 (MN872489.1)	100.00	<i>Emmia</i>
5	HECR12	根	<i>Cylindrocladiella ellipsoidea</i> strain CBS 129573 (MH865427.1)	100.00	小帚梗柱孢属 <i>Cylindrocladiella</i>
6	HECR18	根	<i>Phanerochaete</i> sp. strain DL12M (MT102860.1)	98.74	平革菌属 <i>Phanerochaete</i>
7	HECR30	根	<i>Corynespora cassicola</i> strain SAL1 (KY806119.1)	99.64	棒孢菌属 <i>Corynespora</i>
8	HECR35	根	<i>Hypoxyton investiens</i> strain FS57 (MF770837.1)	99.70	炭团菌属 <i>Hypoxyton</i>
9	HECS10	茎	<i>Talaromyces verruculosus</i> strain R 2 (SS) (KC416631.1)	99.29	篮状菌属 <i>Talaromyces</i>
10	HECS20	茎	<i>Colletotrichum boninense</i> strain LCM 869.01 (MF495409.1)	99.83	炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>
11	HECS11	茎	<i>Acrocalymma</i> sp. strain F2152 (KU747920.1)	99.40	<i>Acrocalymma</i>
12	HECS27	茎	<i>Fusarium verticillioides</i> strain UZ487 (KM396284.1)	99.82	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>
13	HECS30	茎	<i>Penicillium citrinum</i> strain QJF-22 (MN319561.1)	99.82	青霉菌属 <i>Penicillium</i>
14	HECS31	茎	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain MF22509 (MH911420.1)	100.00	曲霉菌 <i>Aspergillus</i>
15	HECS28	茎	<i>Coniochaeta fasciculata</i> strain STE-U 9092 (MT298140.1)	99.82	<i>Coniochaeta</i>
16	HECS8	茎	<i>Calonectria eucalypti</i> strain CMW 18443 (GQ280631.1)	99.45	丽赤壳属 <i>Calonectria</i>
17	HECL35	叶	<i>Phyllosticta elongata</i> strain LCM 886.01 (MF495420.1)	99.07	叶点霉属 <i>Phyllosticta</i>
18	HECL27	叶	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> strain FV (KX022498.1)	99.63	可可毛色二孢菌 <i>Lasiodiplodi</i>
19	HECL3	叶	<i>Pleurostoma richardsiae</i> strain D23A (MH010952.1)	99.82	<i>Pleurostoma</i>
20	HECL24	叶	<i>Pestalotiopsis microspora</i> strain AP5 (MH707065.1)	97.99	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>
21	HECL33	叶	<i>Hypomontagnella monticulosa</i> Ta-BL161 (LC505293.1)	100.00	<i>Hypomontagnella</i>
22	HECL23	叶	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> strain W-8 (KT390195.1)	99.83	炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>
23	HECL20	叶	<i>Penicillium aculeatum</i> strain LP65 (HQ392496.1)	99.14	篮状菌属 <i>Talaromyces</i>
24	HECL4	叶	<i>Phomopsis heveicola</i> strain XJJH-3 (KY379053.1)	99.29	拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>

4 讨论

药用植物具有丰富的内生菌资源^[26], 对其群落结构及多样性进行分析, 进而指导筛选功能性菌株可以更好地实现药用植物资源可持续利用, 也为药用微生物资源的开发提供更可靠的菌种信息。本研究采用 Illumina Miseq 高通量测序技术并结合传统培养方法对中药虎耳草植株进行了内生真菌类群结构及多样性分析。基于 Illumina Miseq 高通量测序共从虎耳草检测出 347 属的内生真菌, 明显高于可培养分离得到的 31 个属, 这说明高通量测序技术获得内生真菌类群和多样性信息更为丰富和全面。高通量测序结果显示虎耳草根、茎、叶 3 个部位中的优势菌门为子囊菌门和担子菌门, 这与青海云杉针叶内生真菌类群相似^[27]。另外, 其优势菌属有 *Dactylonectria*、*Minimelanolocus*、*Mycoleptodiscus*、

Humicola、链格孢属、*Wallemia*、炭疽菌属和丽赤壳菌属等, 其中链格孢属、炭疽菌属在其他植物内生真菌中也较为常见^[28-19]。组织分离法得到的相对丰度较高优势菌属如炭疽菌属、*Dactylonectria* 和丽赤壳菌属均在高通量测序中检测到, 但存在一部分类群在高通量测序中并不是优势菌, 这可能与其在分离培养基中更易生长有关^[31]。虎耳草内生真菌基于高通量分析的 α 多样性 Shannon 指数 (根 5.16、茎 2.96、叶 2.88) 与基于可培养方法分析的 Shannon-Wiener 指数 (总体多样性 3.01) 均高于多数已报道的其他药用植物^[27,31-32], 这表明虎耳草蕴含较为丰富的内生真菌资源, 这可能与植物的类型及其特定的生存环境、气候条件等因素有关^[33]。高通量测序分析和组织分离法均发现虎耳草根内生真菌多样性明显高于茎部和叶部, 这可能与根部长

表6 虎耳草内生真菌发酵液对3种自由基的抗氧化活性

Table 6 Antioxidant activity of endophytic fungi fermentation broth from *S. stolonifera* against DPPH, OH, ABTS free radicals

序号	菌株编号	DPPH 清除率/%	OH 清除率/%	ABTS 清除率/%
对照	1 mg·ml ⁻¹ Vc	95.79±0.00	95.59±0.00	98.50±0.00
1	<i>Ceriporia</i> sp. HECR8	66.32±0.05	52.16±0.02	0.71±0.07
2	<i>Acrocalymma</i> sp. HECR17	68.91±0.01	59.50±0.07	73.84±0.06
3	<i>Trichoderma</i> sp. HECR38	77.44±0.01	63.06±0.07	62.53±0.02
4	<i>Emmia</i> sp. HECR34	77.58±0.02	57.92±0.07	37.43±0.06
5	<i>Cylindrocladiella</i> sp. HECR12	84.47±0.05	39.82±0.03	51.22±0.11
6	<i>Phanerochaete</i> sp. HECR18	69.88±0.06	45.60±0.03	52.74±0.69
7	<i>Corynespora</i> sp. HECR30	59.10±0.02	59.82±0.03	70.35±0.04
8	<i>Hypoxylon</i> sp. HECR35	65.28±0.02	55.66±0.08	75.26±0.03
9	<i>Talaromyces</i> sp. HECS10	84.73±0.04	79.62±0.02	75.89±0.02
10	<i>Colletotrichum</i> sp. HECS20	58.62±0.01	55.38±0.04	77.59±0.03
11	<i>Acrocalymma</i> sp. HECS11	67.63±0.03	57.78±0.02	78.83±0.04
12	<i>Fusarium</i> sp. HECS27	91.67±0.01	86.57±0.01	48.47±0.09
13	<i>Penicillium</i> sp. HECS30	62.51±0.04	65.36±0.02	81.27±0.02
14	<i>Aspergillus</i> sp. HECS31	44.27±0.01	76.68±0.02	88.70±0.10
15	<i>Coniochaeta</i> sp. HECS28	55.94±0.02	65.72±0.08	65.84±0.03
16	<i>Calonectria</i> sp. HECS8	59.82±0.03	48.82±0.03	75.36±0.02
17	<i>Phyllosticta</i> sp. HECL35	86.07±0.02	35.71±0.01	48.86±0.04
18	<i>Lasiodiplodia</i> sp. HECL27	76.09±0.04	61.43±0.04	75.07±0.00
19	<i>Pleurostoma</i> sp. HECL3	68.08±0.03	73.00±0.02	75.15±0.01
20	<i>Pestalotiopsis</i> sp. HECL24	42.43±0.03	76.27±0.02	74.93±0.04
21	<i>Hypomontagnella</i> sp. HECL33	57.69±0.02	73.31±0.02	75.31±0.03
22	<i>Colletotrichum</i> sp. HECL23	77.58±0.06	98.99±0.00	47.09±0.06
23	<i>Talaromyces</i> sp. HECL20	60.71±0.02	51.38±0.02	70.87±0.01
24	<i>Phomopsis</i> sp. HECL4	56.58±0.02	45.88±0.02	61.33±0.05

期接触蕴含丰富微生物资源的土壤有关^[34]。结合高通量测序和传统可培养技术可以获得较为全面的虎耳草内生真菌群落信息和菌株资源，这为虎耳草内生真菌药用资源的后续开发与利用奠定了基础^[35]。

当前，氧化应激已被证明在许多情况下会加速疾病的发展，包括糖尿病、心血管疾病、阿尔茨海默症和帕金森症、急性肺损伤、放射性损伤、癌症，甚至衰老等^[36]。几乎所有生物体都存在内源性抗氧化防御和修复系统以防止机体氧化损伤，但这些系统通常不足以完全防止损伤^[37]。因此，寻找天然抗氧化剂以减少机体的氧化损伤在食品工程和医药等领域都具有重要的应用价值。现有研究表明虎耳草具有良好的抗氧化活性，关于虎耳草内生真菌的抗

氧化活性未见报道。本研究对24株虎耳草内生真菌代表性菌株发酵液进行DPPH、OH和ABTS自由基抗氧化活性筛选，结果显示受测试菌株均具有不同程度的抗氧化活性，其中对DPPH、OH和ABTS自由基具有50%以上活性的菌株分别占受测总数的91.67%、79.17%和83.33%。菌株*Fusarium* sp. HECS27对DPPH(91.67%)和OH自由基(86.57%)都具有较高的清除活性，菌株*Colletotrichum* sp. HECL23对OH自由基的清除率达到98.88%；菌株*Penicillium* sp. HECS30(81.27%)和*Aspergillus* sp. HECS31(88.70%)对ABTS自由基具有很好的清除效果，而菌株*Talaromyces* sp. HECS10对DPPH、OH和ABTS3种自由基的清除率均高于75%。以上结果表明虎耳草内生真菌中蕴含中丰富的具抗氧

化活性的菌株, 它们为筛选微生物来源的天然抗氧化剂提供重要资源库, 也为虎耳草药用资源的可持续利用提供了替代途径, 其中活性优良菌株有待于后续进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 何红梅, 戴岳, 夏玉凤. 虎耳草的研究概况 [J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(2): 75-78.
- [2] 张慧, 李秋月, 贺尚文, 等. 虎耳草化学成分及药理活性研究进展 [J]. 动物医学进展, 2021, 42(1): 94-99.
- [3] 卢玉栋, 范敏, 覃贝妮, 等. 虎耳草有效成分的提取及其生物活性的研究 [J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2018, 34(4): 68-74.
- [4] Ji Y F, Wang D, Zhang B A, *et al.* Bergein ameliorates MPTP-induced parkinson's disease by activating PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 72(3): 823-833.
- [5] 蒙先举, 陶文丞, 韦景枫, 等. 虎耳草组培快繁技术试验研究 [J]. 中国园艺文摘, 2010, 26(12): 27-28.
- [6] 马晓彤, 周蓉蓉, 张晶云, 等. 虎耳草科植物指纹图谱及抗氧化活性研究进展 [J]. 广州化工, 2022, 50(1): 27-28.
- [7] 文培华, 颜怡冰, 王文君, 等. 虎耳草总黄酮含量测定及其抗氧化性 [J]. 食品工业, 2022, 43(2): 315-319.
- [8] Gouda S, Das G, Sen S K, *et al.* Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1538.
- [9] Manganyi M C, Ateba C N. Untapped potentials of endophytic fungi: A review of novel bioactive compounds with biological applications [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(12): 1934.
- [10] Wu W, Chen W H, Liu S Y, *et al.* Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 646146.
- [11] 贺鹏飞. 乌头内生菌的分离鉴定及其次生代谢产物研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- [12] 苏秀丽, 李惠敏, 唐辉, 等. 黄花倒水莲内生真菌生物活性评价及 HNLF-44 菌株鉴定 [J]. 广西植物, 16: 1-10.
- [13] Tamošiūnė I, Andriūnaitė E, Stanys V, *et al.* Exploring diversity of bacterial endophyte communities using advanced sequencing technology [A] // *Microbiome in Plant Health and Disease* [M]. Singapore: Springer Singapore, 2019: 447-481.
- [14] 吴媛, 肖井雷, 姜大成, 等. 基于高通量测序技术的朝鲜淫羊藿内生真菌多样性分析 [J]. 分子植物育种, 1-10.
- [15] 王安萍, 冯关萍, 曾建忠, 等. Illumina 高通量测序分析百合内生真菌群落多样性 [J]. 井冈山大学学报: 自然科学版, 2022, 43(4): 30-36.
- [16] 张岩, 陈怀庆, 陶金巧, 等. 虎耳草提取物对酪氨酸酶的激活及抗氧化作用 [J]. 食品工业, 2019, 40(11): 174-177.
- [17] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [18] Kõljalg U, Nilsson R H, Abarenkov K, *et al.* Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi [J]. *Mol Ecol*, 2013, 22(21): 5271-5277.
- [19] Deng Z J, Zhang R D, Shi Y, *et al.* Characterization of Cd-, Pb-, Zn-resistant endophytic *Lasiodiplodia* sp. MXSF31 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2014, 21(3): 2346-2357.
- [20] Dhayanithy G, Subban K, Chelliah J. Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus* [J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19(1): 22.
- [21] Rocha P D S D, Paula V M B, Olinto S C F, *et al.* Diversity, chemical constituents and biological activities of endophytic fungi isolated from *Schinus terebinthifolius raddi* [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(6): 859.
- [22] 吴可欣, 唐诗雨, 朱奕儒, 等. 野生型斜茎黄芪内生真菌分离鉴定及苦马豆素分析 [J]. 草地学报, 2022, 30(7): 1692-1700.
- [23] Subbiah V, Zhong B M, Nawaz M A, *et al.* Screening of phenolic compounds in Australian grown berries by LC-ESI-QTOF-MS/MS and determination of their antioxidant potential [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 10(1): 26.
- [24] Hu T Y, Subbiah V, Wu H J, *et al.* Determination and characterization of phenolic compounds from Australia-grown sweet cherries (*Prunus avium* L.) and their potential antioxidant properties [J]. *ACS Omega*, 2021, 50(6): 34687-34699.
- [25] Zou X D, Bk A, Rauf A, *et al.* Screening of polyphenols in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and determination of their antioxidant activity in different tobacco varieties [J]. *ACS Omega*, 2021, 39(6): 25361-25371.
- [26] 孟祥才, 于鹏程, 何录文, 等. 从社会发展角度探讨中药资源的历史、现在与未来 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5235-5244.
- [27] Strobel G. The emergence of endophytic microbes and

- their biological promise [J]. *J Fungi (Basel)*, 2018, 4(2): 57.
- [28] 方泰军, 白露超. 青海云杉针叶内生真菌群落结构及多样性分析 [J]. *分子植物育种*, 2022, 20(15): 5198-5204.
- [29] 陈少如, 许晓晨, 赵文宝, 等. 闽楠内生真菌高通量分离及种类多样性分析 [J]. *森林与环境学报*, 2022, 42(5): 544-551.
- [30] 顾美英, 张志东, 唐光木, 等. 黑果枸杞不同组织内生真菌群落组成及生态功能分析 [J]. *菌物学报*, 2022, 41(8): 1254-1267.
- [31] 周楠, 姜成英, 刘双江. 从环境中分离培养微生物: 培养基营养水平至关重要 [J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 1075-1081.
- [32] 张林华, 方千, 贾红梅, 等. 川芎非根际、根际及根茎内生真菌群落差异分析 [J]. *生物技术通报*, 2021, 37(4): 56-69.
- [33] 彭黎明, 蒋显锋. 红棕杜鹃根系真菌群落组成与多样性分析 [J]. *西南农业学报*, 2022, 35(4): 957-963.
- [34] 马广强, 徐红波, 朱金华, 等. 植物内生菌对道地药材道地性的影响 [J]. *江西中医药大学学报*, 2014, 26(1): 56-58.
- [35] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题 [J]. *生态学杂志*, 2004, 23(2): 86-91.
- [36] Munteanu I G, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3380.
- [37] SIMIC M G. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis [J]. *Mutat Res*, 1988, 202(2): 377-86.

[责任编辑 时圣明]