

伊犁野生郁金香内生烟曲霉的分离鉴定及活性

王世苗, 陈天意, 冯亚萍, 张晓妍, 范馨予, 欧阳艳*

伊犁师范大学 新疆维吾尔自治区普通高校天然产物化学与应用重点实验室, 新疆 伊宁 835000

王世苗, 陈天意, 冯亚萍, 张晓妍, 范馨予, 欧阳艳. 伊犁野生郁金香内生烟曲霉的分离鉴定及活性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 289-300.

WANG Shimiao, CHEN Tianyi, FENG Yaping, ZHANG Xiaoyan, FAN Xinyu, OUYANG Yan. Isolation, identification, and activity of endophytic *Aspergillus fumigatus* from wild tulip in Ili[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 289-300.

摘要:【背景】对郁金香的研究主要集中在种质资源、引种栽培、扩繁育种及化学成分分析方面, 而关于伊犁野生郁金香内生菌的研究尚未见报道。【目的】从伊犁野生郁金香中筛选出内生真菌并对其进行抑菌及抗氧化活性研究。【方法】采用组织块培养法和平板划线法对伊犁野生郁金香内生菌进行分离纯化; 用斜面低温保存法对内生菌进行保存; 以形态学方法和分子生物学方法对分离出的内生真菌进行鉴定; 通过液体发酵得到次级代谢产物, 对乙酸乙酯萃取发酵产物进行滤纸片抑菌分析。使用 Fe^{3+} 总还原能力法、2,2'-二苯基-1-三硝基苯肼(2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基法、2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, ABTS) 自由基法及羟基自由基法比较菌株乙酸乙酯层和水层的抗氧化活性。【结果】从伊犁野生郁金香中分离获得一株内生真菌, 经鉴定为曲霉属(*Aspergillus*)烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*), 简称为 YGL-1。YGL-1 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)均具有显著的抑菌活性。经抗氧化活性实验发现有机溶剂层和水层都具有还原 Fe^{3+} 和清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟基自由基的能力, 尤其是清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基, 抗氧化活性的能力均随着浓度的增高而增强, 属于剂量依赖型。当两相溶剂萃取粗提物浓度为 2.0 mg/mL 时, 有机溶剂层清除 DPPH 自由基效率为 91.45%, 清除 ABTS 自由基效率为 99.84%。YGL-1 的发酵产物具有较强的抗氧化活性, 主要分布在有机溶剂层, 其次分布于水层。【结论】从伊犁野生郁金香中分离纯化出一株内生真菌, 为曲霉属(*Aspergillus*)烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)。研究结果预示郁金香内生烟曲霉是产生抑菌、抗氧化活性物质的重要资源, YGL-1 菌株可作为进一步的实验研究对象。

关键词: 伊犁野生郁金香; 内生真菌; 烟曲霉; 抑菌; 抗氧化

资助项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划(XJEDU2018I018)

This work was supported by the Key Program of Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region Colleges (XJEDU2018I018).

*Corresponding author. E-mail: ouyy656@sina.com

Received: 2022-04-26; Accepted: 2022-05-20; Published online: 2022-05-30

Isolation, identification, and activity of endophytic *Aspergillus fumigatus* from wild tulip in Ili

WANG Shimiao, CHEN Tianyi, FENG Yaping, ZHANG Xiaoyan, FAN Xinyu, OUYANG Yan*

Key Laboratory of Natural Products Chemistry and Applications in General Universities of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Yili Normal University, Yining 835000, Xinjiang, China

Abstract: [Background] There has been an explosion of research on the germplasm resources, introduction, expansion and breeding, and chemical components of tulip, but no report on the endophytes of wild tulip in Ili is available. **[Objective]** To screen endophytic fungi from wild tulip in Ili and study their antibacterial and antioxidant activities. **[Methods]** The endophytic fungi of Ili wild tulip were isolated and purified by tissue culture and streak plate method. The endophytes were preserved with the slant cryopreservation method. The isolated endophytic fungi were identified based on morphological observation and molecular biology methods. The secondary metabolites were obtained by liquid fermentation, and the antibacterial activity of the fermentation product extracted with ethyl acetate was analyzed with the filter paper method. The total Fe^{3+} -reducing power, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)-scavenging ability, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonicacid) (ABTS)-scavenging ability, and hydroxyl radical-scavenging ability of the aqueous fraction and ethyl acetate fraction were determined to compare the antioxidant activity. **[Results]** An endophytic strain was isolated and identified as *Aspergillus fumigatus* YGL-1. YGL-1 showed significant inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Candida albicans*. Both the aqueous fraction and the ethyl acetate fraction can reduce Fe^{3+} , and scavenge DPPH, ABTS, and hydroxyl radicals, especially DPPH and ABTS. The antioxidant activity was enhanced with increase in concentration. When the concentration of the crude extract was 2.0 mg/mL, the ethyl acetate fraction can scavenge 91.45% of DPPH and 99.84% of ABTS. In summary, the fermentation products of YGL-1 had strong antioxidant activity, particularly the organic solvent fraction, followed by the aqueous fraction. **[Conclusion]** *A. fumigatus* was isolated from wild tulip in Ili. This study is expected to serve as a reference for the comprehensive utilization of endophytic fungi in plant resources and the development of antibacterial and antioxidant drugs.

Keywords: Ili wild tulip; endophytic fungi; *Aspergillus fumigatus*; antibacteria; antioxidation

目前, 从药用植物资源中筛选具有生物活性或通过各种途径和手段得到既具有某种生物活性又已知化学结构的化合物已成为新药开发研制的有效途径之一, 但随着人们对药用植物资源需求量的日益增大, 直接导致了許多野生

药用植物遭受过度开垦, 植物濒临灭绝^[1], 因此, 保护野生药用植物迫在眉睫。随着微生物研究的不断发展, 人们在健康植物组织内部也发现了微生物的存在, 这类微生物后来被称为“植物内生菌”^[2]。植物内生菌是指其生活史的一

定阶段或全部阶段定殖于植物器官、组织内部和细胞间隙的微生物, 被感染的植物(至少是暂时)不表现出明显的症状^[3]。植物内生真菌是近年来出现的一种很有前景的植物次生代谢产物替代品^[4]。经过数年来的研究, 人们发现植物内生菌与宿主植物之间存在着互利共生的关系, 这一发现不仅拓宽了植物药用资源的来源, 同样也实现了对濒危植物的保护和可持续发展^[5]。因此, 利用内生菌与宿主植物的共生关系以及对宿主代谢的影响, 从植物资源中分离筛选出产高活性物质的内生菌, 进而研制出低毒、环保、高效用的新药, 可为解决由于野生植物资源匮乏所导致的药物资源短缺等问题提供理论依据。

郁金香(*Tulipa gesneriana* L.)是百合科(Liliaceae)郁金香属(*Tulipa*)的草本植物, 又名洋荷花、草麝香, 是土耳其、哈萨克斯坦、荷兰的国花^[6]。据文献^[7]记载, 全球大约有 150 种郁金香属植物, 主要分布在我国郁金香属植物约有 14 种, 除郁金香、老鸦瓣及二叶这 3 种之外, 其余准噶尔郁金香、伊犁郁金香、天山郁金香等 11 种郁金香均分布在新疆。夏提古丽·阿不利孜等^[8]采用系统预试法对地上地下部分的郁金香进行了化学成分分析, 发现郁金香中可能含有黄酮类、有机酸类、酚类、皂苷类等化学成分, 为郁金香的进一步开发利用提供了实验基础。Krzymińska 等^[9]通过对 5 种不同品种的郁金香花中黄酮类、有机酸类及酚类物质进行含量测定分析, 进而证实了郁金香中含有黄酮类、有机酸类及酚类化学成分。Yu 等^[10]采用探针电喷雾电离质谱法对郁金香鳞茎的碳水化合物、氨基酸等物质进行了含量测定。研究表明, 郁金香具有抗氧化^[11]、抑菌^[12]、引发接触性皮炎^[13]等生物活性。近年来, 人们对郁金香的研究主要集中在种质资源^[14]、引种栽

培^[15]、扩繁育种^[16]及化学成分分析^[6]上, 而关于野生郁金香内生菌的研究尚未见报道。本实验以伊犁野生郁金香为研究对象, 对其具有显著抑菌、抗氧化活性的菌株进行菌种鉴定, 以期为伊犁野生郁金香的药用资源提供利用依据。

烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)是一种重要的致病真菌, 属于半知菌类门丝孢纲(*Hyphomycetes*)丛梗孢科烟曲霉属。烟曲霉作为常见的条件致病菌, 通常由吸入分生孢子引起, 从而导致免疫功能正常的人群发生致命性侵袭性感染等一系列疾病^[17], 其侵袭性肺曲霉病为严重的感染类型, 死亡率高达 50%–100%^[18]。研究表明, 胶霉毒素(gliotoxin)由非核糖体多肽合成酶(non ribosomal peptide synthase)催化的丝氨酸和苯丙氨酸氨基酸的缩合反应产生, 烟曲霉 96%的毒力作用由其引起^[19]。目前, 关于烟曲霉的研究主要集中在基因与蛋白质水平, 而对其抑菌、抗氧化活性研究较少。刘增然等^[20]利用 Double-joint PCR 方法和进一步基因敲除技术对烟曲霉 *Afu4g13170* 基因功能进行了初步研究, 结果显示烟曲霉 *Afu4g13170* 基因可以作为控制曲霉制毒的一个靶位点。陈晨等^[21]对烟曲霉的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)蛋白质及 RNA 进行了分析, 结果证实烟曲霉也能分泌 EVs, 并含有较多种蛋白, 其中以烟曲霉胞浆蛋白为主。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验植物样品

健康完整的伊犁野生郁金香植株于 2021 年 5 月 1 日采摘自伊犁巩留县, 采集时使用小铲子将外观呈现无病虫害且带根际及附着根际土壤的郁金香植物全株铲起, 测定其株高约为 13 cm。将采集的新鲜样品置于自封袋中, 于 -20 °C 冰箱中保存备用, 并在 24 h 内完成样品处理。

1.1.2 指示菌

抑菌试验所用菌株为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)和白色念珠菌(*Candida albicans*),上述3种细菌和1种真菌均购自广东环凯生物科技有限公司,保藏于天然产物化学与应用重点实验室。

1.1.3 培养基

内生真菌分离 PDA 培养基(g/L):新鲜无芽马铃薯(去皮)200.0,葡萄糖20.0,琼脂20.0,pH自然;PDB液体培养基同上,无琼脂。细菌NB培养基(g/L):牛肉膏3.0,蛋白胨10.0,NaCl5.0,琼脂20.0,pH7.2–7.5。以上培养基均经 1×10^5 Pa灭菌后备用。

1.1.4 主要试剂和仪器

真菌基因组DNA快速抽提试剂盒、柱式DNA胶回收试剂盒、DNA分子量标准Marker(100–2000 bp)、4S Green Plus 无毒核酸染料、琼脂糖、DNA分子量标准Marker(250–10000 bp),生工生物工程(上海)股份有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、乙酸乙酯、丙酮、异丙醇、无水乙醇、次氯酸钠,天津福晨化学试剂有限公司。立式高压灭菌器,致微仪器有限公司;霉菌培养箱,上海齐欣科学仪器有限公司;立式双层小容量全温振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;PCR仪、凝胶成像系统,Bio-Rad公司;旋转蒸发器,Buchi公司;紫外可见分光光度计,岛津公司。

1.2 内生真菌的分离及纯化

将新鲜完整的伊犁野生郁金香根部、鳞茎、叶片用流动的自来水冲洗干净后,用无菌滤纸吸干其表面水分,置于超净工作台,依次用无菌水漂洗30 s,75%乙醇浸泡30 s,2.5% NaClO浸泡1 min,无菌水漂洗3次,重复3次,取最后一次漂洗液作为空白对照。用灭菌的剪刀将

植物组织材料剪切成大小约0.3 cm \times 0.2 cm的小段,切口处紧贴于PDA琼脂平板上,置于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱中倒置培养3–7 d,待组织切口处长出菌落后,用接种环挑取形态不一的菌体转接至新的PDA平板上进行分离,采用菌丝顶端纯化法得到单一菌落,斜面低温法进行菌种保存。

1.3 内生真菌发酵产物的提取

挑取少量保藏于斜面上的菌种于新鲜PDA培养基上划线培养,28 $^{\circ}$ C活化3–7 d。将活化后的菌落转接至新鲜配制的PDB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、180 r/min培养7 d,观察PDB液体培养基中孢子的生长情况。

取发酵7 d后的液体培养基,用快速双层无菌滤纸抽滤除去菌体,发酵液与乙酸乙酯等体积萃取3次,合并3次有机层,减压浓缩,得到发酵产物粗浸膏。用少量超纯水洗脱粗浸膏并转至干净的玻璃培养皿中用保鲜膜封住,扎上密集透气孔,置于–20 $^{\circ}$ C冰箱中冻存12 h后,于冷冻干燥机中除去水分达到恒重,得到固态发酵产物。用70%乙醇将上述粗发酵产物分别配制成4 mg/mL,4 $^{\circ}$ C保存备用。

1.4 内生真菌发酵产物的抑菌活性

收集无菌发酵液,将发酵液与乙酸乙酯等体积萃取3次,合并乙酸乙酯层,45 $^{\circ}$ C减压旋蒸至金黄色浸膏,加入40 mL甲醇,40 $^{\circ}$ C减压旋蒸浓缩至2 mL,过0.22 μ m滤膜后,置于4 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

用新配制的NB液体培养基将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌37 $^{\circ}$ C培养12 h。PDB液体培养基将白色念珠菌28 $^{\circ}$ C培养48 h。分别移取相对应的100 μ L菌液至新配制的NB、PDA固体培养基上并涂布均匀;将此平板均匀分为3个部分,贴于于发酵液中浸泡的6 mm滤纸片,置于涂有不同受试菌体的平板上,每

个平板 3 个重复, 同时以甲醇作空白对照, 分别置于 37 °C 和 28 °C 恒温培养箱中培养 24–48 h, 观察无菌滤纸片周围是否有透明抑菌圈出现, 并用带有毫米刻度的铁尺测量抑菌圈直径, 记录抑菌结果。

1.5 发酵产物抗氧化能力测定

取 1.3 中制备好的粗发酵产物母液, 配制成一定浓度梯度的抗氧化溶液。使用 Fe^{3+} 总还原能力法^[22]、DPPH 法^[23]、ABTS 法及羟基自由基清除法^[24]比较菌株乙酸乙酯层和水层的抗氧化活性。

1.6 内生真菌的分类及鉴定

依据常规方法将菌株 YGL-1 接种至 PDA 平板上, 置于 28 °C 恒温恒湿霉菌培养箱中培养 7–10 d, 每天观察并记录 YGL-1 菌株的生长特征, 如菌落颜色、菌落质地、菌落边缘及其分生孢子形状和分生孢子梗等^[25]。

采用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取内生真菌 YGL-1 的基因组 DNA, 真菌鉴定选用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μL): 2 \times Direct PCR Mix 10 μL , Hot Start DNA Polymerase 0.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , DNA Sample 2 μL , 无菌双蒸水补足 20 μL 。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 5 s, 55 °C 5 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 1 min; 4 °C 保存。测定扩增无杂带 DNA 大小后, 采用柱式胶回收试剂盒对 DNA 进行切胶回收并验证, 回收产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

打开 NCBI 网站, 将菌株 YGL-1 的 ITS 序列信息输入 GenBank 中进行 BLAST 分析, 在 BLASTn 数据库中选取并比对相似度和匹配度高的菌株, 使用 MEGA-X-10.1.7 软件 neighbor-joining 方法构建系统发育树, 确定菌株 YGL-1 的种属关系^[26]。

2 结果与分析

2.1 郁金香内生真菌的分离纯化及鉴定

利用组织块表面消毒法对伊犁野生郁金香根部、鳞茎及叶片的内生真菌进行分离纯化, 在 3 个不同组织块中得到同一株内生真菌, 该菌落呈绒状, 颜色为暗烟绿色。利用电子显微镜进一步观察, 该菌的分生孢子梗光滑, 顶囊呈烧瓶状; 分生孢子球形, 绿色(图 1)。

2.2 发酵产物的抑菌活性

将 6 mm 无菌滤纸片置于无菌发酵液 2 h, 取出后放置于涂有不同受试菌体的平板上, 检测其对 4 种受试菌体的抑菌活性, 结果如图 2 所示。从图 2 的检测结果可知, 该内生菌在 PDB 液体培养基中产生的发酵产物对金黄色葡萄球菌(图 2A)、枯草芽孢杆菌(图 2B)、大肠埃希氏菌(图 2C)和白色念珠菌(图 2D)的抑菌效果显著, 抑菌圈直径可达 18–22 mm。

2.3 发酵产物抗氧化活性测定结果

2.3.1 Fe^{3+} 总还原能力的测定

取 1.3 中制备好的粗发酵产物母液, 配制成一定浓度梯度的抗氧化溶液, 采用 Fe^{3+} 总还原能力法测定乙酸乙酯层和水层的抗氧化活性。图 3 结果表明, 粗发酵产物随着质量浓度的增加, 对 Fe^{3+} 的总还原能力也逐渐增强。当粗发酵产物浓度为 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 所对应的

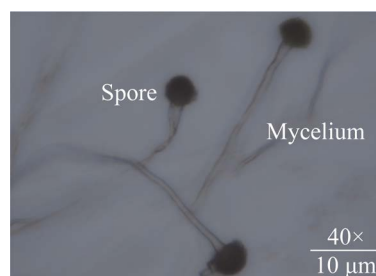


图 1 电子显微镜下菌株 YGL-1 菌体形态
Figure 1 Morphology of strain YGL-1 bacteriophage under electron microscope.

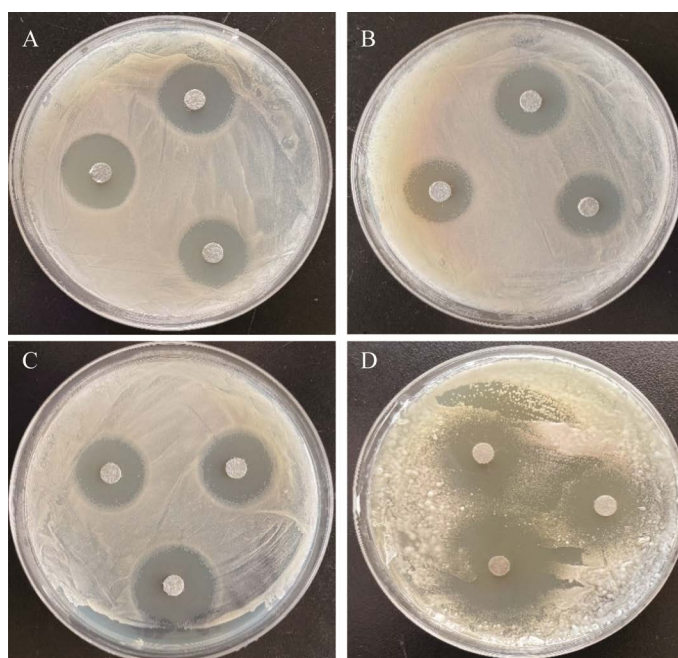


图2 不同培养基发酵产物对受试菌的抑菌活性 A: 金黄色葡萄球菌. B: 枯草芽孢杆菌. C: 大肠杆菌. D: 白色念珠菌

Figure 2 Inhibitory activity of fermentation products of different media against the tested microorganisms. A: *Staphylococcus aureus*. B: *Bacillus subtilis*. C: *Escherichia coli*. D: *Candida albicans*.

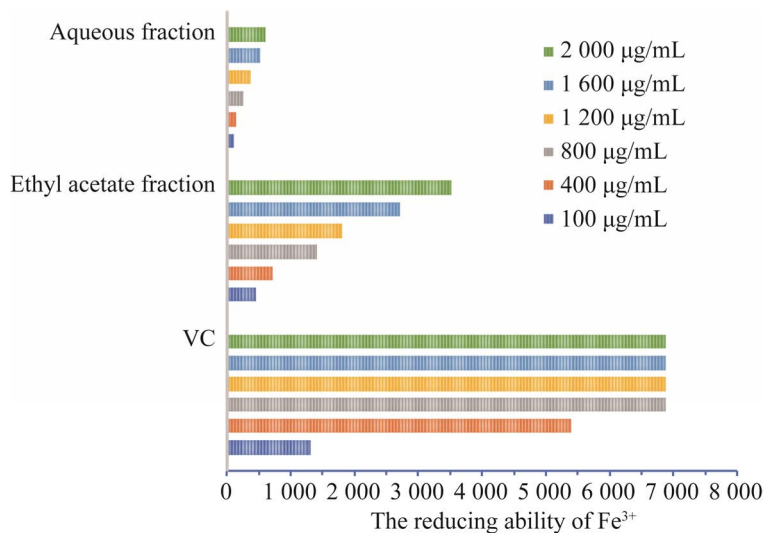


图3 菌株 YGL-1 不同萃取层对 Fe^{3+} 的还原能力

Figure 3 Reduction ability of Fe^{3+} by different extraction layers of strain YGL-1.

FeSO_4 浓度分别为 3 513.71 μmol 、601.69 μmol ，还原能力大小为：维生素 C (VC) (6 880.14 μmol) > 乙酸乙酯层(ethyl acetate, EA) (3 513.71 μmol) > 水层(H_2O) (601.69 μmol)，这表明次级代谢产物中具有生物活性的物质主要分布在乙酸乙酯层，少许在

水层，因而导致其抗氧化活性能力差异较大。

2.3.2 DPPH 自由基测定

DPPH 自由基测定法是一种常见的抗氧化活性测定方法，被人们广泛使用。在菌株的提取物中，有机层和水层都具有较好的清除 DPPH

自由基的能力, 并属于剂量依赖型, 浓度越大其对 DPPH 自由基的清除活性越强。图 4 结果表明, 当质量浓度为 2.0 mg/mL 时, 清除 DPPH 自由基的能力大小为: VC (96.76%)>EA (91.45%)>H₂O (83.09%), 说明有机层与水层对 DPPH 自由基均具有较好的清除能力, 并随其粗发酵产物浓度发生改变。

2.3.3 ABTS 自由基测定

ABTS 自由基反应是一种常见的清除自由基的反应, 其是 2,2'-联氨双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐与过硫酸钾反应生成的。把不同浓度的 VC、EA 及 H₂O 层物质加入到 ABTS+ 溶液中, 通过检测其在 734 nm 处的吸光度, 从而判定对自由基的清除能力。图 5 结果表明,

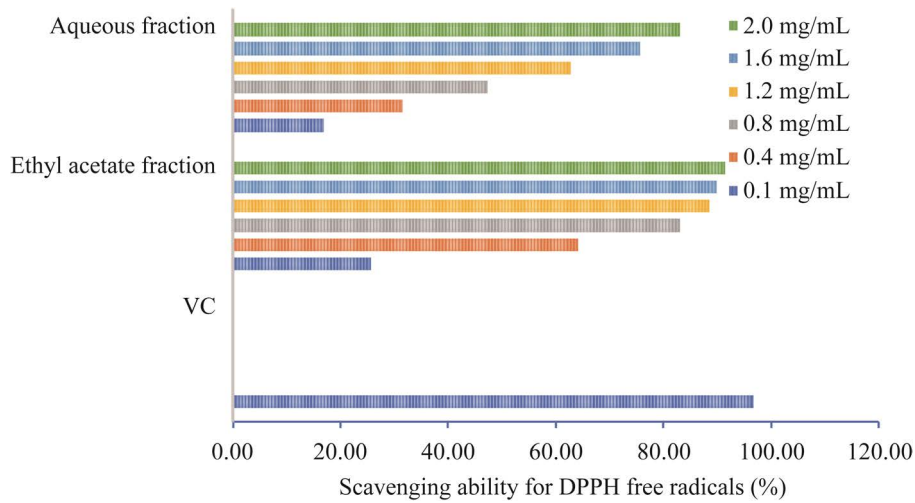


图 4 菌株 YGL-1 不同萃取层对 DPPH 自由基的清除率

Figure 4 Scavenging rate of DPPH radicals by different extraction layers of strain YGL-1.

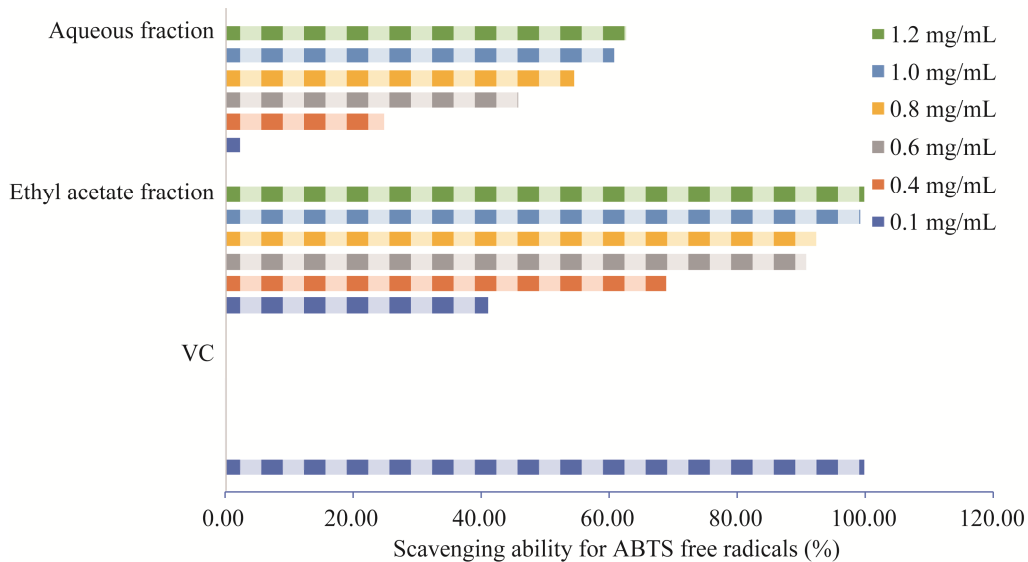


图 5 菌株 YGL-1 不同萃取层对 ABTS 自由基的清除率

Figure 5 Scavenging rate of ABTS radicals by different extraction layers of strain YGL-1.

当粗发酵产物质量浓度为 1.2 mg/mL 时,清除 ABTS 自由基能力依次为 VC (99.90%)>EA (99.84%)>H₂O (62.68%),说明具有较强清除能力的活性物质主要分布在乙酸乙酯层,并且清除能力略小于阳性对照。

2.3.4 羟基自由基测定

羟基自由基是一种重要的活性氧,具有极强的获得电子能力,即氧化能力,是自然界中仅次于氟的氧化剂。人体多种疾病的触发与体内存在的过多活性羟基自由基具有千丝万缕的联系。图 6 结果表明,菌株发酵提取物对羟基自由基有较强的清除能力,当粗发酵产物质量浓度为 1.2 mg/mL 时,清除能力大小为:VC (99.96%)>EA (64.00%)>H₂O (34.83%)。

2.4 分离菌株的系统发育分析

将内生真菌 YGL-1 的总 DNA 提取后作为

模板,使用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增,回收产物后测序,获得的 ITS 序列在 NCBI 数据库上做 BLAST 序列比对分析,发现菌株 YGL-1 与菌株 *Aspergillus fumigatus* strain TY197-10 (序列号 MT093256.1)及菌株 *Aspergillus fumigatus* strain ND87 (序列号 MG659681.1)的相似度均为 100%。利用软件 MEGA-X-10.1.7,采用 neighbor-joining 方法构建系统发育树,随机抽样 1 000 次,自展法 (bootstrap)计算自引导值,从而评估系统发育树的置信度,得到其系统发育树(图 7),发育树分析显示菌株 YGL-1 与 *Aspergillus fumigatus* strain 10 在系统发育树上处于同一个分支。综合菌落、菌体形态和 ITS 序列分析等结果,将该菌株鉴定为曲霉属 (*Aspergillus*) 烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)。

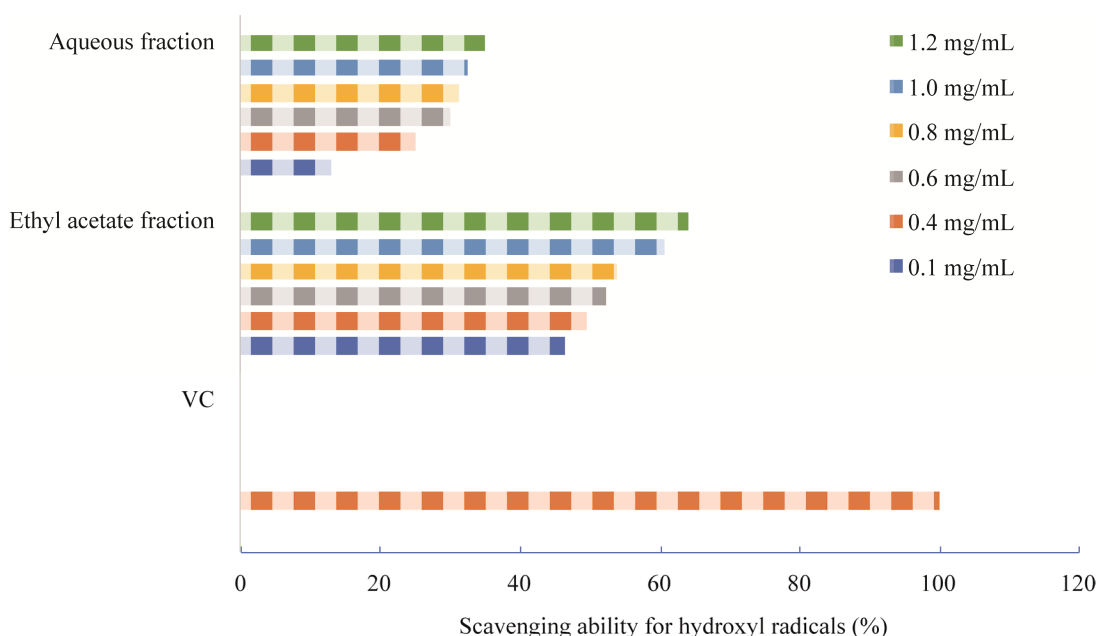


图 6 菌株 YGL-1 不同萃取层对羟基自由基的清除率

Figure 6 Scavenging rate of hydroxyl radicals by different extraction layers of strain YGL-1.

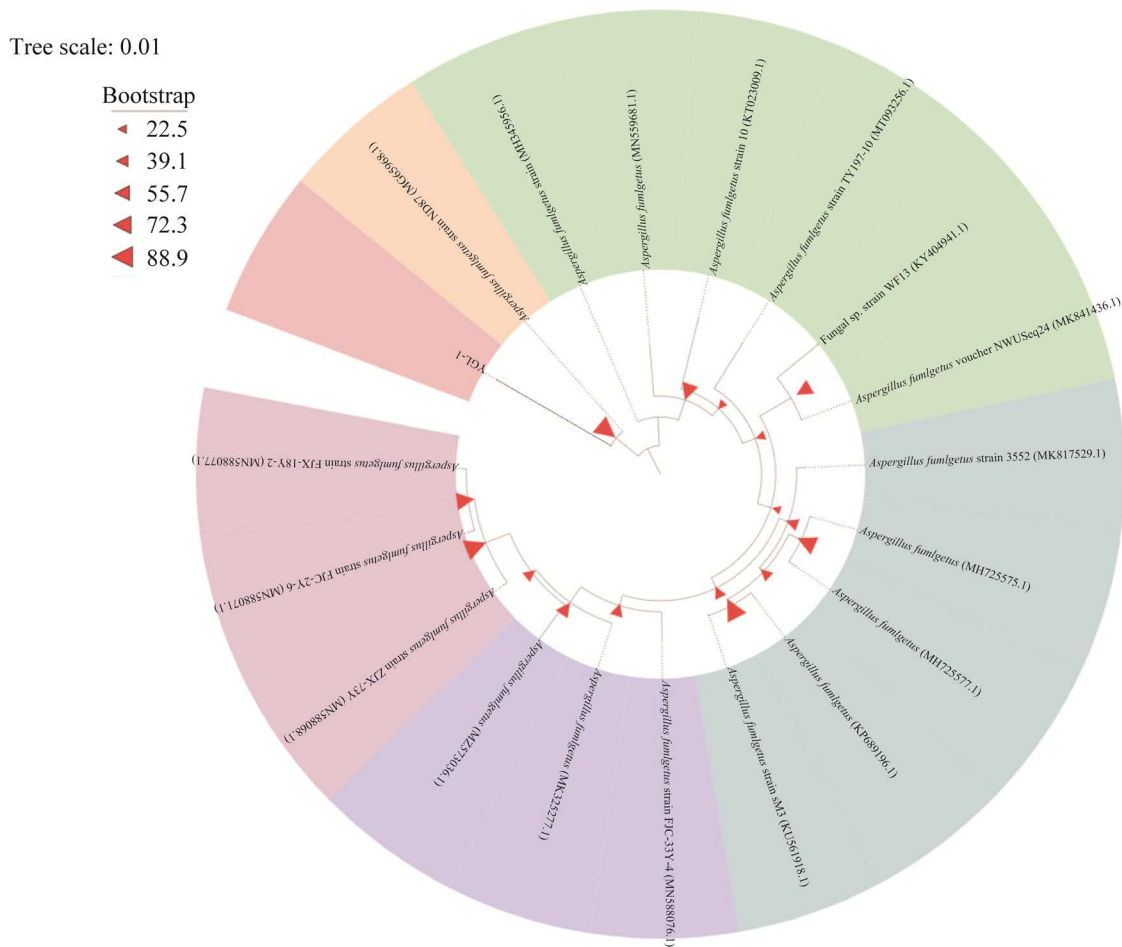


图 7 菌株 YGL-1 与曲霉属烟曲霉相关菌株的系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree of strain YGL-1 and related strains of *Aspergillus fumigatus*.

3 讨论

植物内生菌是指其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物体内但不引起植物体明显病害症状的微生物群,包括内生细菌、内生真菌、内生放线菌等^[27-28]。植物内生菌与宿主植物之间具有互利共生的关系,早在 20 世纪 90 年代就有学者发现内生菌与植物(宿主)长期共存的部分内生真菌能够产生与宿主相同或相似的活性成分^[29]。1993 年美国科学家 Stierle 等^[30]从短叶红豆杉的韧皮部分离得到一株产紫杉醇的内生真菌——安德氏紫衫霉,从此开启了人们对植

物内生真菌的研究热潮。本实验以伊犁野生郁金香的根部、鳞茎及叶片部位为研究对象,采用组织块培养法和平板划线法对相应研究部位的内生真菌进行分离纯化,在 3 个不同组织块中得到同一株曲霉属(*Aspergillus*)烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)内生真菌,该菌落呈绒状,颜色为暗烟绿色。本实验从宿主中只分离出一株单一内生真菌,造成内生真菌种类多样性少的原因可能为:(1)伊犁野生郁金香生长环境常年气温低于零下,不利于内生真菌的生长,导致其物种丰富度降低;(2)宿主体内的内生真菌不适宜在实验室培养。

周婧等^[31]从红树林植物红茄苳中分离获得一株内生真菌烟曲霉,采用抗氧化多活性模型对烟曲霉内生真菌进行了自由基清除能力的测定,研究结果预示红树林内生烟曲霉是产生抗氧化活性物质的重要资源,可作为进一步实验的研究对象。孔阳等^[32]以一株烟曲霉属白花夹竹桃内生真菌为研究对象,对其抗植物病原菌活性的次生代谢产物进行了研究,共分离鉴定了6个化合物,研究结果显示,化合物1(alternariol)对白菜黑斑病菌、苹果腐烂病菌等3种病菌的抑制率分别为91.8%、89.1%和90.6%,大于阳性对照,为研制新型微生物来源的杀菌剂和植物病害的防治提供了理论依据。本实验以从伊犁野生郁金香中分离获得的一株烟曲霉内生真菌为实验对象,对其进行抑菌及抗氧化活性测定,研究结果显示,内生真菌烟曲霉对金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌这3种细菌及白色念珠菌这1种真菌均具有显著的抑菌效果,其抑菌圈直径可达18–22 mm;采用 Fe^{3+} 总还原能力法、DPPH法、羟基自由基法以及ABTS自由基法比较菌株乙酸乙酯层和水层的抗氧化活性,研究结果显示,当菌株YGL-1的质量浓度为1.2 mg/mL时,乙酸乙酯部位ABTS自由基清除率为99.84%,水层的清除率为62.68%。这说明烟曲霉发酵提取产物中,具有抗氧化活性的物质主要分布于乙酸乙酯部位,其次是水层。从本研究结果来看,伊犁野生郁金香内生烟曲霉是具有抑菌、抗氧化活性的生物资源,其抑菌及抗氧化活性物质方面值得进一步深入研究。

4 结论

本研究从伊犁野生郁金香中分离得到一株内生真菌。通过形态学鉴定和分子生物学鉴定发现该真菌为曲霉属(*Aspergillus*)烟曲霉

(*Aspergillus fumigatus*)。本研究是首次发现伊犁野生郁金香中存在抑菌及抗氧化活性效果较好的内生真菌,这激发了人们对伊犁野生郁金香次级代谢产物具体活性成分的深入研究。本课题组正在尝试采用多种色谱手段对该发酵产物进行化学成分分析,以期筛选出活性效果显著的单体化合物,为植物资源的综合利用和新药研发提供理论基础。

REFERENCES

- [1] 让凤菊,任艳利,张维,欧阳艳.伊犁野核桃内抑菌抗氧化内生真菌的分离、筛选和鉴定[J].生物技术通报,2019,35(9):218-223.
RANG FJ, REN YL, ZHANG W, OUYANG Y. Isolation, screening and identification of active endophytic fungi from Yili wild walnut[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(9): 218-223 (in Chinese).
- [2] 常恺莉,张琳,周红英,张晨雪,叶鸿翔,梅显贵.药用植物内生菌资源在农业中的应用与研究进展[J].山东农业科学,2021,53(7):135-141.
CHANG KL, ZHANG L, ZHOU HY, ZHANG CX, YE HX, MEI XG. Application and research progress of endophyte resources of medicinal plants in agriculture[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2021, 53(7): 135-141 (in Chinese).
- [3] 方珍娟,张晓霞,马立安.植物内生菌研究进展[J].长江大学学报(自然科学版),2018,15(10):41-45.
FANG ZJ, ZHANG XX, MA L. Research progress of plant endophytic bacteria[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2018, 15(10): 41-45 (in Chinese).
- [4] GUPTA S, CHATURVEDI P, KULKARNI MG, van STADEN J. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi[J]. Biotechnology Advances, 2020, 39: 107462.
- [5] 陈龙,梁子宁,朱华.植物内生菌研究进展[J].生物技术通报,2015,31(8):30-34.
CHEN L, LIANG ZN, ZHU H. Research advances in the studies of plant endophytic[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(8): 30-34 (in Chinese).
- [6] 葛翎,黄晓德,张峰伦,周谦,钱骅,陈斌,苏华,李海涛,赵伯涛,钱雪.郁金香的化学成分及药理活性研究进展[J].中国野生植物资源,2019,38(5):79-83.
GE L, HUANG XD, ZHANG FL, ZHOU Q, QIAN H, CHEN B, SU H, LI HT, ZHAO BT, QIAN X. Research

- progress on chemical constituents and pharmacological activities of tulips[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2019, 38(5): 79-83 (in Chinese).
- [7] 中国科学院中国植物志编辑委员会 中国植物志: 第14卷[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
Editorial Committee of the Flora of China, Chinese Academy of Sciences Flora of China: Vol. 14[M]. Beijing: Science Press, 1980 (in Chinese).
- [8] 夏提古丽·阿不利孜, 马晓玲, 刘雪松, 魏鸿雁, 陈刚. 郁金香化学成分预实验[J]. 新疆中医药, 2017, 35(5): 62-63.
XIATIGULI-ABULIZI, MA XL, LIU XS, WEI HY, CHEN G. Pre-experimentation of chemical composition of tulip[J]. Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 35(5): 62-63 (in Chinese).
- [9] KRZYMIŃSKA A, GAŚECKA M, MAGDZIAK Z. Content of phenolic compounds and organic acids in the flowers of selected *Tulipa gesneriana* cultivars[J]. Molecules, 2020, 25(23): 5627.
- [10] YU Z, CHEN LC, SUZUKI H, ARIYADA O, ERRA-BALSELLS R, NONAMI H, HIRAOKA K. Direct profiling of phytochemicals in tulip tissues and *in vivo* monitoring of the change of carbohydrate content in tulip bulbs by probe electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009, 20(12): 2304-2311.
- [11] 李凤英, 李润丰, 赵希艳, 刘素稳. 60种花卉多酚、黄酮含量及其抗氧化活性[J]. 经济林研究, 2011, 29(3): 59-63.
LI FY, LI RF, ZHAO XY, LIU SW. Polyphenols and flavones contents and antioxidant activity in 60 kinds of flowers[J]. Nonwood Forest Research, 2011, 29(3): 59-63 (in Chinese).
- [12] 夏提古丽·阿不利孜, 徐建国, 马晓玲, 石明辉, 潘兰, 魏鸿雁. 郁金香提取物及其提取方法和应用: 中国, CN107802725A[P]. 2018-03-16.
XIATIGULI-ABULIZI, XU JG, MA XL, SHI MH, PAN L, WEI HY. Tulip extract as well as extraction method and application thereof: China, CN107802725A[P]. 2018-03-16 (in Chinese).
- [13] HASSAN I, RASOOL F, AKHTAR S, KAMILI A, RATHER P, KANTH R, BHAT Y, RATHER S, MUBASHIR S, YASEEN A, BASHIR S. Contact dermatitis caused by tulips: identification of contact sensitizers in tulip workers of Kashmir Valley in north India[J]. Contact Dermatitis, 2018, 78(1): 64-69.
- [14] 巨秀婷, 潘阿青, 蒋福娟, 唐楠, 侯志强. 郁金香种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(8): 3667-3674.
JU XT, PAN AQ, JIANG FJ, TANG N, HOU ZQ. Genetic diversity of tulip germplasm resource revealed by ISSR markers[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(8): 3667-3674 (in Chinese).
- [15] 巨秀婷, 才卓吉, 蒋福娟, 侯志强. 伊犁野生郁金香和栽培郁金香的 ISSR 分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(10): 4060-4065.
JU XT, CAI ZJ, JIANG FJ, HOU ZQ. Tulip ISSR analysis of Yili wild species and cultivars[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(10): 4060-4065 (in Chinese).
- [16] 陈娟娟. 两种野生郁金香种子萌发特性及多倍体诱导研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2018.
CHEN JJ. Studies on seed germination and polyploid induction of two *Tulipa* species[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [17] 易浔飞, 连兰兰, 兰小鹏. 烟曲霉致病性与免疫系统相互作用的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(2): 132-136.
YI XF, LIAN LL, LAN XP. Advances in the study of the interaction between *Aspergillus fumigatus* pathogenicity and the immune system[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2016, 34(2): 132-136 (in Chinese).
- [18] BROWN GD, DENNING DW, GOW NAR, LEVITZ SM, NETEA MG, WHITE TC. Hidden killers: human fungal infections[J]. Science Translational Medicine, 2012, 4(165): 165rv13.
- [19] GARDINER DM, WARING P, HOWLETT BJ. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis[J]. Microbiology: Reading, England, 2005, 151(Pt 4): 1021-1032.
- [20] 刘增然, 张光一, YU Jae-Hyuk. 致病烟曲霉新基因 *Afu4g13170* 生孢致毒相关性初步研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(1): 68-74.
LIU ZR, ZHANG GY, JAE HYUK Y. The function of the *Afu4g13170* gene in conidiation and gliotoxin production of pathogenic *Aspergillus fumigatus*[J]. Microbiology China, 2012, 39(1): 68-74 (in Chinese).
- [21] 陈晨, 贺彬婵, 朱益敏, 赵蓓蕾, 陈菲, 徐小勇. 烟曲霉的细胞外囊泡蛋白质及 RNA 分析[J]. 中国真菌学杂志, 2022, 17(1): 8-11, 26.
CHEN C, HE BC, ZHU YM, ZHAO BL, CHEN F, XU XY. Protein and RNA analysis of extracellular vesicles of *Aspergillus fumigatus*[J]. Chinese Journal of Mycology, 2022, 17(1): 8-11, 26 (in Chinese).
- [22] YAO XH, SHEN YS, HU RZ, XU M, HUANG JX, HE CX, CAO FL, FU YJ, ZHANG DY, ZHAO WG, LIU L,

- CHEN T. The antioxidant activity and composition of the seed oil of mulberry cultivars[J]. Food Bioscience, 2020, 37: 100709.
- [23] WU YT, HUO YF, XU L, XU YY, WANG XL, ZHOU T. Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Porphyra haitanensis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 2116-2125.
- [24] 高海立. 铁皮石斛叶黄酮提取纯化工艺优化及抗氧化性研究[D]. 杭州: 浙江理工大学硕士学位论文, 2019. GAO HL. Optimization of extraction and purification condition and evaluation of antioxidant activities of the total flavonoids in *Dendrobium officinale* leaves[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Sci-Tech University, 2019 (in Chinese).
- [25] 田小娟. 太行菊(*Opisthopappus taihangensis*)产黄酮内生真菌的筛选和鉴定[D]. 郑州: 郑州大学硕士学位论文, 2016. TIAN XJ. Isolation of endophytic fungi from *Opisthopappus taihangensis* and selection of fungi producing flavonoids[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University, 2016 (in Chinese).
- [26] 柏晓辉, 刘孝莲, 刘娣, 汤敏, 孙春巧, 胡长玉. 一株黄精内生菌的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 777-782. BAI XH, LIU XL, LIU D, TANG M, SUN CQ, HU CY. Isolation and identification of an endophytic bacterium from *Polygonatum cyrtoneura* and its antibacterial activity[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(5): 777-782 (in Chinese).
- [27] SUHANDONO S, KUSUMAWARDHANI MK, ADITIAWATI P. Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from rambutan fruits (*Nephelium lappaceum* L.) cultivar binjai[J]. HAYATI Journal of Biosciences, 2016, 23(1): 39-44.
- [28] TADYCH M, WHITE JF. Endophytic microbes[A]// Encyclopedia of Microbiology[M]. Amsterdam: Elsevier, 2009: 431-442.
- [29] 姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 周吉燕, 黎万奎. 植物内生菌与宿主关系研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(7): 1750-1754. YAO LA, HU ZB, WANG LL, ZHOU JY, LI WK. Research development of the relationship between plant endophyte and host[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(7): 1750-1754 (in Chinese).
- [30] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.
- [31] 周婧, 黄丽云, 李钢, 徐静. 一株红茄苳内生烟曲霉菌的分离鉴定及其发酵产物抗氧化活性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(8): 1958-1966. ZHOU J, HUANG LY, LI G, XU J. Isolation, identification and antioxidant activity *Aspergillus fumigatus* HQD24 endophytic in *Rhizophora mucronata*[J]. Microbiology China, 2017, 44(8): 1958-1966 (in Chinese).
- [32] 孔阳, 马养民, 王佳运, 易军军, 王丽红. 一株烟曲霉抗植物病原菌活性次生代谢产物的研究[J]. 东北农业科学, 2019, 44(2): 34-38. KONG Y, MA YM, WANG JY, YI JJ, WANG LH. Studies on anti-plant pathogen secondary metabolites from an *Aspergillus fumigatus*[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2019, 44(2): 34-38 (in Chinese).