

文章编号: 1674-7054(2017)04-0424-07

诺丽内生真菌的分离鉴定及其次生代谢产物的抗氧化活性

马文婷 吴友根 胡征波 张军锋 于 靖

(海南大学 热带农林学院, 海口 570228)

摘 要: 对采自海南省海口市、万宁市、儋州市、琼海市、三亚市和临高县的诺丽果和叶, 消毒后, 25℃下分离培养得到32株内生真菌, 采用26S rDNA D1/D2区域和ITS rDNA测序鉴定菌种。结果表明: 32株内生真菌属于担子菌门(Basidiomycota)、子囊菌门(Ascomycota) 2个类群。其中, 13株酵母菌分别属于金担子菌属(*Aureobasidium*)、蔷薇色酵母属(*Rhodotorula*)、隐球菌属(*Cryptococcus*) 3个属5个种; 19株霉菌分别属于刺盘孢属(*Colletotrichum*)、间座壳属(*Diaporthe*)、炭团菌属(*Hypoxylon*)、枝孢属(*Cladosporium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、叶点霉属(*Phyllosticta*)和赤霉属(*Gibberella*) 7个属10种。同时, 采用乙酸乙酯溶剂对15种诺丽内生真菌发酵液进行提取, 获得次生代谢产物。用ABTS⁺·自由基清除法进行了抗氧化活性评价, 用福林-肖卡法和AlCl₃显色法测定各提取次生代谢产物中总多酚含量(TPC)、总黄酮含量(TFC)。结果显示, 乙酸乙酯提取的15种诺丽内生真菌都具有抗氧化活性, 且m48、j22抗氧化活性显著, 诺丽内生真菌具有较丰富的多样性和具有产生抗氧化活性物质的潜力, 在医药健康领域具有重要应用价值。

关键词: 诺丽; 内生真菌; 分离鉴定; 抗氧化活性

中图分类号: R 285.5

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.04.09

诺丽(*Morinda citrifolia* Linn.) , 又名海巴戟, 是茜草科巴戟天属的传统药用植物^[5]。诺丽的根、皮、果实和叶都被用于药用, 诺丽的果富含多种糖苷类物质、醌类化合物、环烯醚萜类、维生素等化学成分或有效营养成分, 对癌症、高血压、肺结核、肝中毒、及抗氧化等疾病作用显著^[6]。海南拥有适宜诺丽生长的热带沿海气候和土壤条件, 对诺丽的开发研究具有地理优势且内生真菌的药用价值已成为国际热点。植物内生真菌是指那些生活在地上部分且活的植物组织体内, 但不引起宿主植物患病的一类真菌^[1-2]。药用植物内生真菌的次生代谢产物十分丰富, 具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、杀虫、调节免疫及促进植物生长等生物活性, 是筛选生物活性成分或先导化合物的有效途径之一, 在工业发酵、生物制药、农业生产等领域具有潜在的应用价值^[3-4]。本实验采用分离纯化和26S rDNA D1/D2区域、核糖体 rDNA ITS 序列法鉴定内生真菌种类和属性, 用ABTS⁺·自由基清除法进行了抗氧化活性评价, 用福林-肖卡法和AlCl₃显色法测定各提取此生代谢产物中总多酚含量(TPC)、总黄酮含量(TFC), 旨在为诺丽的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料的采集 于2016-03—12月, 从海南省海口市(北纬20°03'35", 东经110°19'44", 海拔9 m)、万宁市(北纬18°45'24", 东经110°72'06", 海拔33 m)、琼海市(北纬19°16'56", 东经110°37'46", 海拔10 m)、三亚市(北纬18°20'38", 东经109°34'41", 海拔35 m)、临高市(北纬19°54'58", 东经109°38'46", 海

收稿日期: 2017-07-27

修回日期: 2017-10-06

基金项目: 海南省中药现代化专项: 海巴戟内生真菌抗肿瘤活性的次生代谢产物研究(2015ZY15)

作者简介: 马文婷(1990-), 女, 海南大学热带农林学院2015级硕士研究生, E-mail: 136985179@qq.com

通信作者: 吴友根(1975-), 男, 博士, 教授, 博导, 研究方向: 南药植物资源开发与利用, E-mail: wygeng2003@

163.com

拔 76 m)、儋州市(北纬 19°30'38", 东经 109°34'21", 海拔 158 m) 6 个市(县) 采集健康、八成熟的果和叶, 无菌水冲洗后, 即得待分离内生真菌的植物样品, 将其存放无菌袋中于 4 °C 保存。

1.2 培养基及试剂 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA) 固体培养基: 马铃薯浸粉 3 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g、氯霉素 0.1 g, 每 1 L 蒸馏水中加 PDA 38 g; 麦芽汁琼脂(MEA) 固体培养基: 麦芽浸粉 130 g、氯霉素 0.1 g、琼脂 15.0 g, 25 °C 时 pH 6.0 ± 0.2, 每 1 L 蒸馏水中加 MEA 145.1 g; 马铃薯葡萄糖肉汤(PDB) 液体培养基: 马铃薯浸粉 5 g、葡萄糖 15 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g, 每 1 L 蒸馏水中加 PDB 35 g。使用前, 以上 3 种培养基均在 121 °C 0.1 MPa 下灭菌 20 min。

没食子酸、芦丁、水溶性维生素 E 均产自中国药品生物制品鉴定所; 2, 2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐(ABTS)、福林酚、碳酸钠、氯化银、过硫酸钾、甲醇、醋酸钠缓冲液、乙酸乙酯和无水乙醇均为国产分析纯。

真菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 相关试剂(北京索莱宝 Solarbio 科技有限公司); PCR 引物序列由海南光威科技有限公司合成。

1.3 诺丽果和叶表面消毒 诺丽果和叶样品用纯净水洗净, 依次以 2.6% 次氯酸钠 + 75% 酒精做 6 个梯度 32 组进行表面消毒: 次氯酸钠溶液消毒的时间为 60 ~ 300 s, 乙醇溶液消毒的时间为 30 ~ 180 s。然后用无菌水洗涤 3 次, 用无菌滤纸吸干水分后, 用灭菌过的手术刀将果和叶边缘部分去除, 果内部或中心部分切分成 1 cm × 1 cm 大小的组织块, 叶内部或中心部分切分成 0.5 cm × 0.5 cm 大小的组织块^[7]。先把果块和叶块进行无菌检测: 采用组织印迹法, 将果块和叶块置于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA) 固体培养基平板上轻轻滚动或紧贴培养基放置 2 min, 接着移去果块和叶块, 于 25 °C、黑暗条件下, 恒温培养 8 ~ 10 d, 无杂菌长出即说明消毒后的果块表面和叶块表面无菌; 然后把果块和叶块放在灭菌的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA) 固体培养基平板上, 于 25 °C、黑暗条件下, 恒温培养 8 ~ 10 d; 每组重复 3 次。

1.4 内生真菌的分离纯化 当 PDA 和 MEA 固体培养基平板上的诺丽的果块和叶块周围长出菌丝时, 采用尖端菌丝挑取法, 把培养得到的菌丝的尖端部分移至新的 PDA 和 MEA 平板培养基上, 于 25 °C 黑暗条件下, 培养 8 ~ 10 d, 长出完整菌落; 重复上述步骤 4 ~ 5 次, 直至得到纯菌落, 即得诺丽内生真菌。挑取纯菌落内生真菌的尖端部分移至 PDA 斜面培养基上, 于 25 °C 黑暗条件下, 培养 8 ~ 10 d, 于 4 °C 保存^[8]。由于其生长速度存在明显差异, 所以同时进行了对其生长速度的测定试验, 为接下来的内生真菌鉴定提供更多的鉴别信息。

1.5 鉴定菌种 把获得的纯菌种接种到装有 PDB 液体培养基的 5 mL 离心管中, 每组挑 3 环菌丝体, 每组 3 个重复, 放入恒温摇床(25 °C, 100 r · min⁻¹) 在黑暗条件下, 进行液体培养 5 d。根据 Solarbio 真菌基因组 DNA 提取试剂盒的使用方法提取内生真菌的 DNA, 菌株基因组 DNA 作为反应的模板, 霉菌以基于核糖体 ITS 区域的序列 ITS1f 和 ITS4(ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; ITS1f: 5'-CTTGCTCATT-TAGAGGA AGTAA-3') 作为引物; 酵母菌以基于 26S rDNA D1/D2 区域的 NL-1 和 NL-4(NL-1: 5'-GCATAT-CAATAAGCGGAGGAAAAG-3'; NL-4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG G-3') 作为引物, 进行 PCR 扩增。

PCR 扩增体系(255 μL): 无菌水 9.5 μL, Premix Taq 12.5 μL, 引物各 1.0 μL, DNA 模板 1.0 μL。PCR 反应程序: 94 °C 预变形 5 min, 94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 55 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 并拍照保存。将 PCR 扩增产物送至北京六合华大基因科技有限公司广州分公司进行测序, 并将得到的序列在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中进行 Blast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, 确定种属关系。

1.6 菌株发酵及次生代谢产物的制备 在超净工作台上, 将保存菌种接种到新的 PDA 培养基上进行活化后, 用打孔器在活化菌落边缘处打孔得到直径为 6 mm 的菌饼, 转接到装有 300 mL PDB 液体培养基的 500 mL 锥形瓶内, 于 25 °C, 130 r · min⁻¹ 摇床内发酵培养 8 ~ 10 d。用减压抽滤法分离发酵液的菌丝菌液, 收集菌液, 然后用乙酸乙酯溶剂在 12 h 之内等体积萃取 3 次, 静置待分层后收集萃取液, 40 °C 旋转蒸发浓缩, 在烘箱内加热烘干得粗提物。称重, 配制成 1.0 g · L⁻¹ 的供试液。

1.7 抗氧化活性的测定

1.7.1 总多酚含量(TPC)的测定 总酚含量测定使用福林-肖卡法^[9]测定。待测提取液 0.1 mL 加入 5 mL 的 Eppendorf 试管中,分别加入 3.85 mL 蒸馏水,摇匀,再加 0.25 mL FC 试剂(用前 1 : 1 稀释),充分摇匀,1 min 之后,加入 20% 的饱和 Na_2CO_3 溶液 0.75 mL 混匀,避光反应 2 h,以提取溶剂为对照,用紫外分光光度计在 765 nm 波长下比色,测定吸光度,每个处理重复 3 次。结果以没食子酸等价值($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, FW)表示。没食子酸标准溶液浓度为:0, 50, 100, 150, 250, 500 和 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.7.2 总黄酮含量(TFC)测定 总黄酮含量测定采用 AlCl_3 显色法^[10],稍作修改。待测提取液 0.3 mL 加入 5 mL Eppendorf 试管中,然后分别加入 2 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AlCl}_3$,1 mL 的 NaAC-HAC 缓冲溶液(pH5.2),用甲醇定容至 4 mL,摇匀,40 °C 水浴显色 10 min,以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AlCl}_3$ 溶液为空白,采用紫外-可见分光光度法,在 510 nm 波长处测定吸光度,每个处理重复 3 次。结果以芦丁等价值($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, FW)表示。芦丁标准溶液浓度为:0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 和 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.7.3 ABTS⁺·自由基清除法(ABTS) Trolox 标准溶液的配制 母液:0.062 6 g 的 Trolox 标准品用无水乙醇定容到 25 mL,浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。ABTS 法中的 Trolox 标准溶液:200, 400, 600, 800, 1 000, 1 200 和 1 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

自由基的产生使用 ABTS 与 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 反应体系^[11]。ABTS⁺·由 5 mL 的 $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABTS 溶液和 88 μL $140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 水溶液避光反应 12 h 后生成,该溶液提前 1 d 配制,并且必须当天使用。使用前用无水乙醇稀释到吸光值在 732 nm 处为 0.70 ± 0.02 。25 μL 样品提取液加到 2 mL ABTS 溶液中避光反应 6 min 进行吸光值测定,最终结果以 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Trolox 等量抗氧化能力(Trolox equal antioxidant capacity TEAC)表示。

1.8 统计分析 ABTS⁺·自由基清除法抗氧化能力数据在 Microsoft Excel 版软件上进行,抗氧化成分含量与其抗氧化活性之间的相关性分析在 SAS V8 上进行。

2 结果与分析

2.1 表面消毒对内生真菌的影响 在消毒剂的选择上有 3 种组合(75% 酒精,75% 酒精 + 升汞,75% 酒精 + 次氯酸钠)^[12-16]。单独选择酒精消毒不彻底,因此,本实验采用 75% 酒精 + 2.6% 次氯酸钠这一消毒剂组合进行表面消毒。其中,180 s + 30 s,180 s + 60 s 处理,约 8 d 出菌,效果最好,菌落个数为 7 ~ 10 个,菌种 4 ~ 5 种;120 s + 30 s,120 s + 60 s,240 s + 30 s,240 s + 60 s,300 s + 30 s,300 s + 60 s 处理,约 8 d 出菌,效果良好,菌落个数为 4 ~ 5 个,菌种 2 ~ 3 种;80 s + 180 s,240 s + 150 s,240 s + 180 s,300 s + 90 s,300 s + 120 s,300 s + 150 s,300 s + 180 s 的处理没有菌落长出。

2.2 诺丽内生真菌的分离纯化及形态描述 通过微生物分离培养共获得诺丽内生真菌 32 株,酵母 13 株和霉菌 19 株。代表性菌落形态特征如表 1 所示。

2.3 内生真菌的 PCR 扩增和序列测定 成功提取到 13 株内生霉菌和 19 株内生酵母菌的基因组 DNA,PCR 扩增得到霉菌和酵母菌 ITS rDNA 和 26s rDNA D1/D2 区域的序列片段条带大小分别为 700 bp 和 500 ~ 700 bp,条带均单一明亮(图 1)。

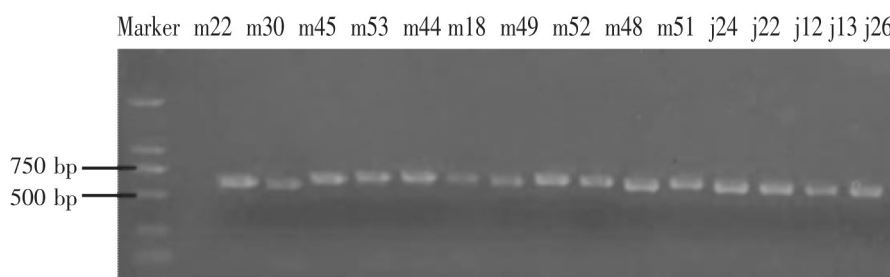


图 1 ITS rDNA 和 26s rDNA D1/D2 PCR 扩增片段

Fig.1 PCR amplified fragments of ITS rDNA and 26s rDNA D1/D2 regions

表 1 诺丽内生真菌及其形态特征

Tab. 1 Endophytic fungi and the morphological characteristics of noni

菌株代码 Strain code	主要特征 Main features		参考特征 Reference features					
	含水状态 Water bearing state	外观形态 Appearance shape	颜色 Color	边缘 Edge	透明度 Transparency	结合程度 Binding degree	细胞生长速度 Cell growth rate	气味 Smell
m22	质地湿润	表面凸起	黑色	不整齐	不透明	容易挑起	+ + + +	无
m30	质地湿润	表面平整	黑色	整齐	不透明	容易挑起	+ + + + +	无
m45	质地湿润	表面平整	淡褐色	整齐	不透明	容易挑起	+ + + +	无
m53	有液体产生	表面凸起	白色	呈羽毛状	不透明	容易挑起	+ + + + +	无
m44	质地干燥	表面平整	白色	不整齐	不透明	不容易挑起	+ + +	无
m18	质地干燥	表面平整	淡棕色	整齐	不透明	容易挑起	+ + + + +	无
m49	质地湿润	表面平整	褐色	不整齐	不透明	容易挑起	+ + + +	无
m52	有液体产生	表面平整	白色	不整齐	不透明	容易挑起	+ + + + +	无
m48	质地湿润	表面凸起	黑色	不整齐	不透明	不容易挑起	+ + +	无
m51	质地湿润	表面平整	白色	呈放射状	半透明	容易挑起	+ + +	无
j24	质地湿润	表面平整	透明色	整齐	透明	容易挑起	+ + +	无
j22	质地粘稠	表面凸起	乳白色	不整齐	不透明	容易挑起	+ +	有
j12	质地粘稠	表面凸起	红色	整齐	不透明	容易挑起	+ +	有
j13	质地粘稠	表面平整	粉红色	整齐	不透明	容易挑起	+ + +	有
j26	质地粘稠	表面平整	淡黄色	整齐	不透明	容易挑起	+ +	有

注: + (生长极慢)、++ (生长较慢)、+++ (生长中速)、++++ (生长较快)、+++++ (生长很快)
Note: + (very slow growth) ,+ + (slow growth) ,+ + + (medium growth) ,+ + + + (rapid growth) + + + + + (grow quickly)

表 2 诺丽果、叶中分离得到的内生真菌

Tab. 2 Fungal endophytes from noni

属 Genus	菌株 Code	NCBI 数据库中相似性最高的菌种 Closest (published) Genbank match	登录号 Accession number	相似度 Max identity	菌源 Source
Colletotrichum	m22	<i>Colletotrichum</i> LL-2015 isolate LJ TJ30	KP748221.1	99%	Fruit
	m30	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> strain CMT51	JQ754033.1	97%	Fruit
Diaporthe	m45	<i>Diaporthe longicolla</i> strain A0663	KF577911.1	97%	Fruit
	m53	<i>Diaporthe phaseolorum</i> isolate 8.1.1	KP133195.1	99%	Fruit
Hypoxylon	m44	<i>Hypoxylon monticulosum</i> culture-collection MUCL: 54626	KC968939.1	99%	Leaf
Cladosporium	m18	<i>Cladosporium cladosporioides</i> isolate SZ8M-5	JN226994.1	99%	Fruit
	m49	<i>Cladosporium colocasiae</i>	FJ216453.1	99%	Fruit
Fusarium	m52	<i>Fusarium proliferatum</i> isolate A710	KU529832.1	98%	Fruit
Phyllosticta	m48	<i>Phyllosticta capitalensis</i> strain HHL96	KX631700.1	99%	Leaf
Gibberella	m51	<i>Gibberella</i> sp. 1893	FJ008984.1	100%	Fruit
Aureobasidium	j24	<i>Aff. Aureobasidium</i> sp. isolate mk169	KT150681.1	99%	Fruit
Cryptococcus	j22	<i>Cryptococcus</i> sp. 3 TMS-2011	HQ631014.1	99%	Leaf
	j12	<i>Rhodotorul amucilaginoso</i> culture-collection CBS: 2405	KY104846.1	92%	Fruit
Rhodotorula	j13	<i>Rhodotorula dairenensis</i> culture-collection CBS: 7294	KY104734.1	96%	Leaf
	j26	<i>Rhodotorula</i> sp. LH23	HQ832796.1	91%	Fruit

将上述所得 32 株诺丽果、叶内生真菌菌株的 rDNA ITS 和 26s rDNA D1/D2 区域序列登录 NCBI 数据库用 Blast 进行序列比对, 所得比对结果见表 2。将序列比对的结果和上述菌落形态特征描述相结合对本课题分离出的诺丽果内生真菌进行鉴定处理, 本研究从诺丽果、叶中提取到的内生真菌 32 株, 属于担子菌门(Basidiomycota)、子囊菌门(Ascomycota) 两个类群, 13 株酵母菌分别属于金担子菌属(*Aureobasidium*)、蔷薇色酵母属(*Rhodotorula*) 和隐球菌属(*Cryptococcus*) 3 个属 5 个种; 19 株霉菌分别属于刺盘孢属(*Colletotrichum*)、间座壳属(*Diaporthe*)、炭团菌属(*Hypoxylon*)、枝孢属(*Cladosporium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、叶点霉属(*Phyllosticta*) 和赤霉属(*Gibberella*) 7 个属 10 种, 种类丰富具有多样性。

2.4 TPC 和 TFC 测定结果 于 765 nm 处测定吸光度, 标准品没食子酸浓度为横坐标(X), 吸收值为纵坐标(Y) 绘制标准曲线。所得线性回归方程为: $y = 0.0013x - 0.0027$, $R^2 = 0.9991$ (图 2), 表现出显著的量效相关性。总多酚含量(TPC) 的测得结果如(图 3) 所示。就乙酸乙酯萃取的次生代谢产物而言, m30 号含量最高, 达 $79.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 是 m45 j12 的 3 倍多。其余 m22, m51, m53, m44, m48 和 j22 都有较高的含量。

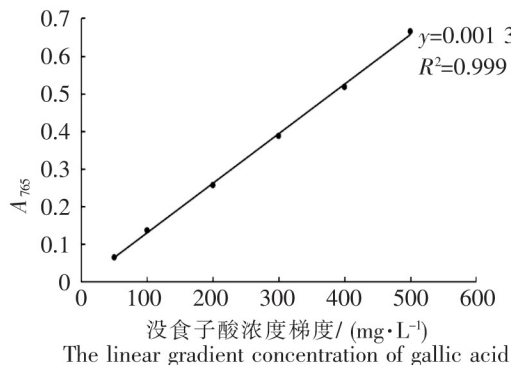


图 2 没食子酸标准曲线(765 nm)
不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 下同
Fig.2 Gallic acid standard curve (765nm)
Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$, similarly hereinafter

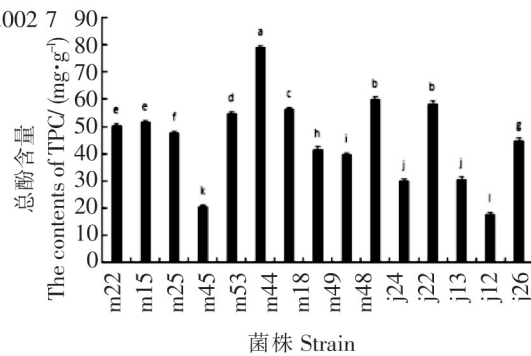


图 3. 次生代谢产物总酚含量
Fig.3 Total TPC content of the secondary metabolite

于 510 nm 处测定吸光度, 芦丁对照品浓度为横坐标(X), 吸光值为纵坐标(Y) 绘制标准曲线。所得线性回归方程: $y = 1.4703x + 0.0152$, $R^2 = 0.9966$ (图 4), 表现出显著的量效相关性。

总黄酮含量(TFC) 测得结果如(图 5) 所示。就乙酸乙酯萃取的次生代谢产物而言, m48 和 j22 具有较高的含量, 分别为 144.49 , $158.97 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 都高于 $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 显著高于其他种类, 且差异显著。

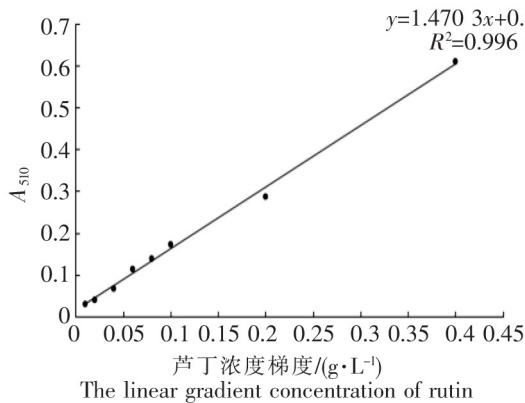


图 4 芦丁标准曲线(510 nm)
Fig.4 Rutin standard curve (510 nm)

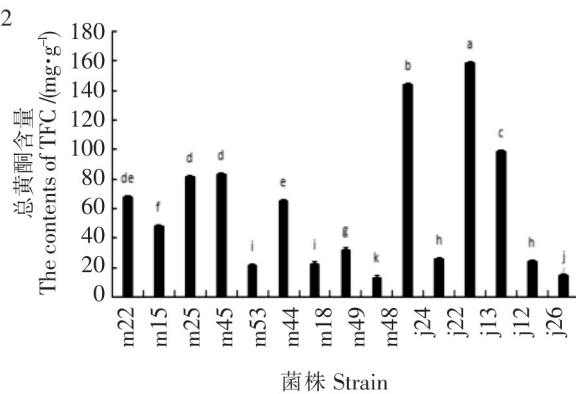


图 5 次生代谢产物总黄酮含量
Fig.5 Total TFC content of the secondary metabolite

2.5 ABTS⁺ 自由基清除能力 于 732 nm 处测定吸光度, Trolox 标准品浓度为横坐标(X), 吸光值为纵坐标(Y) 绘制标准曲线。所得线性回归方程: $y = -0.0004x + 0.6354$, $R^2 = 0.9936$ (图 6), 表现出显著的量效相关性。ABTS 是一种较稳定的自由基, 其溶液呈蓝绿色, 当有自由基清除剂存在时, ABTS 溶液颜色

变浅,吸光值减小。15种诺丽内生真菌均具有一定程度的ABTS活性(图7),在浓度为 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,j22号ABTS清除活性接近100%,m44号和m48号ABTS清除活性也较高,约是m52,m18号的4倍,差异十分显著。

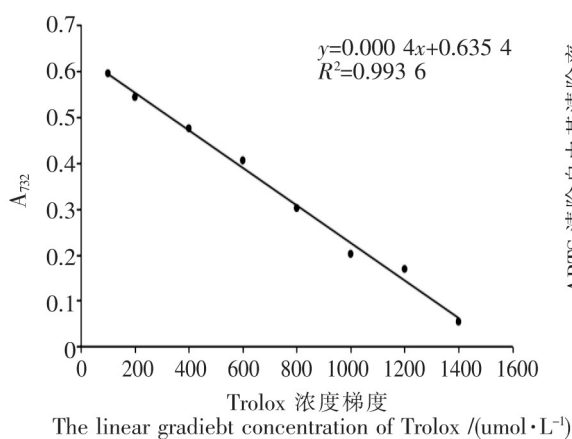


图6 ABTS法标准曲线(732 nm)

Fig.6 ABTS standard curve (732 nm)

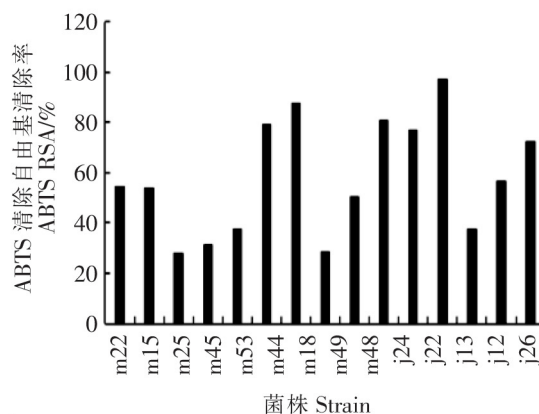


图7 ABTS法测定菌株的抗氧化活性

Fig.7 Determination of antioxidant activity of the strains by ABTS

3 讨论

Strobel G等调查结果表明,传统药用价值的植物具有产生内生真菌的更大可能性,这些内生真菌是产生药理学价值的天然产物^[17-18]。因此,植物的药用属性可能部分归因于其寄生的内生真菌^[19]。植物内生真菌存在于植物体内的特殊微生物环境中,有些内生真菌即使在体外环境中可以培养,但不会出现具有种属特征的有性分生孢子,这使得内生真菌菌种的鉴定困难重重,因此不能单纯地从形态学上鉴定,要利用分子生物学的技能确定其种属关系^[20]。本研究通过对诺丽果和叶内生真菌的分离鉴定,从诺丽果和叶中提取到的内生真菌32株,属于10个属15个种,种类繁多具有较为丰富的多样性。其中从果中分离出11种,从叶中分离出4种,蔷薇色酵母属(*Rhodotorula*)为优势种。与Wu et al^[21]在夏威夷分离提取诺丽内生真菌种类不一致,他从叶中分离出12种,果中分离出3种。虽然都属于子囊菌门和担子菌门,但相同属只有一种,可能由于地理位置、环境条件及处理方法的不同而导致分离结果不同。15种内生真菌的次生代谢产物都具有一定的抗氧化活性,且m48,j22不仅含有较高含量的总酚、总黄酮且ABTS清除自由基能力显著。真菌生长周期短,操作简单,通过发酵技术生产相应的活性物质比植物本身更具优势。这对植物资源的保护和可持续利用具有重要的价值,诺丽内生真菌具有较丰富的多样性,并具有产生抗氧化活性物质的潜力,其在医药健康领域具有重要应用价值且前景广泛。

参考文献:

- [1] Ma Y M, Li Y, Liu J Y, et al. Anti-Helicobacter pylori metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* [J]. *Fitoterapia*, 2004, 75(5): 451-456.
- [2] 郑春英, 陆欣媛, 王满玉, 等. 药用植物五味子内生真菌的分离及其抑菌活性研究[J]. *中国药学杂志*, 2009, 44(9): 661-664.
- [3] 王雪松, 孙剑秋, 臧威, 等. 从Strobel的发现看植物内生真菌研究的未来[J]. *生物学通报*, 2012, 47(10): 1-4.
- [4] Patrick A W, Roger A A, Thomas B. Distribution of fungal endophyte genotypes in doubly infected host grasses [J]. *Mycologia*, 1996, 83(3): 72-81.
- [5] 广东省植物研究所. 海南植物志(第三卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1974, 330-331.
- [6] 龚敏, 苏奎, 杨先会, 等. 诺丽鲜果与诺丽发酵汁化学成分研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(2): 341-342.
- [7] 邓墨渊. 抗菌活性植物内生菌筛选及其发酵条件优化[D]. 重庆: 重庆大学, 2007: 11-17.
- [8] 龚敏, 苏奎, 杨先会, 等. 诺丽鲜果与诺丽发酵汁化学成分研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(2): 341-342.
- [9] 潘峰, 陈艾萌, 朱小庆, 等. 暗紫贝母内生真菌 *Fusarium* sp. A14 次生代谢产物抗氧化活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(3): 376-381.

- [10] 郑帅. 刺五加内生真菌抗氧化活性研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学 2015: 23 – 28.
- [11] Gião M S , Pereira C I , Pintado M E , et al. Effect of technological processing upon the antioxidant capacity of aromatic and medicinal plant infusions: From harvest to packaging[J]. LWT-Food Science Technology , 2013 , 50(1) : 320 – 325.
- [12] 杨正强 张耀兮 陈小静 等. 华重楼内生菌 SS02 的分离与抗菌活性的初步研究[J]. 微生物学通报. 2006 33(2) : 54 – 57.
- [13] 彭小伟 杨丽源 陈有为 等. 黄花夹竹桃内生真菌抗病原细菌的初步研究[J] 菌物研究. 2003 1(1) : 33 – 36
- [14] Liu J Y , Song Y C , Zhang Z , et al. *Aspergillus fumigatus* CY018 , an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites [J]. Journal of Biotechnology , 2004 , 114: 279 – 287.
- [15] Liu C H , Zou W X , Lu H , et. al. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi [J]. Journal of Biotechnology 2001 , 88: 277 – 282
- [16] 李萌. 蔬菜内生放线菌的分离和生物活性初探[D]. 大连: 中国科学院研究生院(大连化学物理研究所) 2003: 23 – 26
- [17] Strobel , G , Daisy , B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2003 , 67: 491 – 502.
- [18] Strobel , G , Daisy , B , Castillo , U , et al. Natural products from endophytic micro-organisms [J]. Journal of Natural Products 2004 , 67: 257 – 268.
- [19] Zhao , K , Penttinen , P , Guan , T , et al. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau , China [J]. Current Microbiology 2011 , 62: 182 – 190.
- [20] 王利梅 角建林 陈丽玲 等. 金叶女贞内生真菌分离及抑菌活性[J]. 昆明医科大学学报 2016(3) : 18 – 21.
- [21] Wu Y G , Girmay S , Silva V M , et al. The role of endophytic fungi in the anticancer activity of *Morinda citrifolia* Linn. (Noni) [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine , 2015 , 60: 182 – 189.

Antioxidant Activity of Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus Isolated and Identified from Noni (*Morinda Citrifolia* Linn.)

MA Wenting , WU Yougen , HU Zhengbo , ZHANG Jufeng , YU Jing

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China)

Abstract: Fruits and leaves of noni (*Morinda citrifolia* Linn.) were collected in Wanning , Danzhou , Qionghai , Sanya , Lingao and Haikou , Hainan Province , from which 32 strains of endophytic fungi were isolated , cultured at 25 °C and then identified by using 26S rDNA D1/D2 and ITS rDNA sequencing. The results showed that these 32 strains belonged to the phylum Basidiomycota and the phylum Ascomycota. Of the 32 strains 13 belonged to 3 genera , i. e. *Aureobasidium* , *Rhodotorula* and *Cryptococcus* , and 5 species , and 19 belonged to 7 genera , i. e. *Colletotrichum* , *Diaporthe* , *Hypoxylon* , *Cladosporium* , *Fusarium* , *Phyllosticta* and *Gibberella* , and 10 species. The secondary metabolites were extracted with ethyl acetate as solvent from 15 fermented solutions of noni endophytic fungi , and their antioxidant activity was evaluated with ABTS⁺·-free radical scavenging assay. The total polyphenols content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of the secondary metabolites were determined by using Folin-reagent method and AlCl₃ colorimetric method. The antioxidant assay showed that ethyl acetate extract from 15 solutions of endophytic fungi was full of antioxidant activity , and that the antioxidant activity of M48 and J22 was significantly different. Noni endophytic fungi had abundant diversity and the potential to produce antioxidant substances which have important application value and broad prospect in healthcare and medical sector.

Keywords: *Morinda Citrifolia* Linn. ; endophytic fungi; isolation and identification; antioxidant activity