

灯盏花产黄酮内生真菌的筛选及其产黄酮能力的初步研究

何永美,湛方栋,宣 灵,祖艳群,高召华,李 元

(云南农业大学资源与环境学院,云南 昆明 650201)

摘 要:通过黄酮类物质特异颜色反应和可见分光光度法,筛选产黄酮的灯盏花内生真菌,研究灯盏花产黄酮内生真菌在 PDA 和查氏培养基上的产黄酮能力。结果表明,28 株灯盏花内生真菌中,7 株菌的镁粉+浓盐酸、氯化铝、浓氨水 3 种颜色反应均呈阳性,能够产生黄酮。灯盏花产黄酮内生真菌的生长、菌丝体黄酮含量和产量在 PDA 培养基上均高于在查氏培养基上。7 株灯盏花产黄酮内生真菌中,菌株 ELF3-1 和 ERF3-1 的生长较好,菌株 ELF'3-1、ELF3-2 和 ERF3-1 菌丝体黄酮含量较高,菌株 ERF3-1 菌丝体黄酮产量最高。

关键词:灯盏花;内生放线菌;黄酮

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:1672-2043(2010)增刊-0226-04

Selection and Flavonoid Producing Capacity of Endophytic Fungi Isolated from *Erigeron breviscapus*

HE Yong-mei, ZHAN Fang-dong, XUAN ling, ZU Yan-qun, GAO Zhao-hua, LI Yuan

(Resources and Environmental College of Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The endophytic fungi isolated from *Erigeron breviscapus* that could produce flavonoid were selected by the way of characteristic color reaction and visible spectrophotometry of flavonoid, their flavonoid producing capacity was studied on PDA and Czapek media, the results showed that: the reactions with Mg and concentrated hydrochloric acid, $AlCl_3$ and concentrated ammonia liquor of 7 strains in 28 endophytic fungi strains isolated from *Erigeron breviscapus* were positive, that meant this 7 strains could produce flavonoid. The hyphae biomass, flavonoid content and production of flavonoid producing endophytic fungi on PDA medium were greater than on Czapek medium. In the 7 flavonoid producing endophytic fungi strains, the growth of strains ELF3-1 and ERF3-1 were best, while the hyphae flavonoid content of strain ELF'3-1, ELF3-2 and ERF3-1 were great, the flavonoid production of strain ERF3-1 was highest.

Keywords: *Erigeron breviscapus*; endophytic fungi; flavonoid

植物内生菌是指全部或部分生活周期内生活于健康植物组织内部的微生物,包括真菌、放线菌和其他细菌,它们与宿主植物共生或寄生,或者在几种关系中转换,但并不引发植物产生明显病症^[1]。它们不仅可以促进植物生长、增加植物抗逆性,还可以产生丰富的次生代谢产物。尤其在 1993 年 Stierle 等从短叶紫杉中发现产紫杉醇的内生真菌后^[2],植物内生菌

成为天然活性产物开发的热点,研究发现许多药用植物内生真菌能够产生类似宿主植物药效成分的生物活性物质^[3-6],具有极大的开发价值,引起了人们越来越多的关注。

灯盏花是云南省一种具有重要经济价值的药用植物,黄酮是灯盏花重要的药效成分之一^[7]。灯盏花已被云南省列为重点发展的五大系列药品之一,灯盏花的社会需求量不断增加,药用灯盏花资源已越来越不能满足当前的需求。鉴于药用植物内生菌也能合成宿主植物药效成分类似化合物,目前有关灯盏花内生菌的研究甚少,只有李治滢等报道分离获得 5 个目 7 个科 22 个属的灯盏花内生真菌^[8],而有关灯盏花

收稿日期:2009-08-14

基金项目:国家自然科学基金项目(30660040);云南省教育厅青年科研基金项目(A3003106)

作者简介:何永美(1980—),女,云南大姚人,讲师,硕士,主要从事紫外辐射生态研究。E-mail: Heyongmei06@126.com

通讯作者:李 元 E-mail: liyuan03@yahoo.com.cn

内生真菌生物活性产物的研究尚未报道。对灯盏花根茎叶中分离到的内生真菌进行了黄酮的定性检测,筛选产黄酮的内生真菌,研究产黄酮内生真菌的黄酮产生能力,为探索灯盏花药效成分新的生产途径提供材料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试的内生真菌菌株分离自成苗期、花期和果熟期的灯盏花(*Erigeron breviscapus*)根茎叶中。

1.2 液体发酵培养

采用马铃薯葡萄糖培养基(PDA)和查氏培养基^[9],挑取活化后的斜面培养基上的菌丝块,接种于装有100 mL液体培养基的250 mL三角瓶内,并置于28℃,150 r·min⁻¹摇床上振荡培养10 d。

1.3 检测样品的制备

液体发酵培养物3500 rpm离心15 min,取沉淀,于60℃烘24 h后,称重,研磨成粉末。取粉末状菌丝体,按固液比1:20加入70%乙醇于60℃浸提2次,每次3 h,合并2次滤液后减压浓缩,并加入70%乙醇定容至25 mL,制得检测样品^[10]。

1.4 黄酮的颜色反应检测

盐酸-镁粉反应:取待测样品的乙醇溶液1 mL,加放少量镁粉,然后加浓盐酸4~5滴,置沸水浴中加热2~3 min,呈现红色到紫红色、显蓝或绿色,表明含有黄酮类化合物。

三氯化铝反应:取待测样品的乙醇溶液点于滤纸片上。干后喷雾1% AlCl₃乙醇试液,在紫外光灯下观察,呈现黄色、绿色、橙色等荧光,表明含有黄酮类化合物^[10]。

浓氨水反应:取待测样品的乙醇溶液点于滤纸片上(干后再点一次,使其溶液集中),干后,在氨蒸汽下熏几分钟,呈现亮黄、绿或橙黄色,表明含有黄酮类化合物。

1.5 黄酮含量标准曲线绘制

称取干燥的无水芦丁10.0 mg,置于50 mL容量瓶中,加适量60%乙醇,水浴溶解并定容摇匀;精密量取25 mL于50 mL容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度。制成标准曲线。吸取标准溶液0,2.5,5.0,7.5,10.0,12.5 mL,分别于25 mL容量瓶中加入30%乙醇至12.5 mL;加入5%的NaNO₂溶液0.75 mL,放置6 min;加入10% Al(NO₃)₃溶液0.75 mL摇匀放置6 min;最后加入1.0 mol·L⁻¹的NaOH溶液10.0 mL,以30%乙醇定容至刻度,放置15 min。在510 nm波

长下测定吸光度,并以吸光度为横坐标,浓度为纵坐标绘制标准曲线^[11]。回归得到以下方程:

$$y = 64.107x - 0.4491 (r = 0.9936)$$

1.6 菌丝体黄酮含量与产量测定

称取菌丝体粉末0.20 g,按固液比1:20加入70%乙醇于60℃浸提2次,每次3 h,合并2次滤液后减压浓缩,加入70%乙醇定容至25 mL,在510 nm波长下测定吸光度,并通过标准曲线获得菌丝体黄酮含量。进而得到:

$$\text{黄酮产量} = \text{菌丝体生物量} \times \text{黄酮含量}$$

1.7 数据分析

所得数据采用DPS7.05统计软件,Duncan新复极差法分析不同培养基和菌株间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 灯盏花产黄酮内生真菌的筛选

28株供试灯盏花内生真菌中,7个菌株菌丝体乙醇提取物的盐酸-镁粉反应呈阳性,16个菌株氯化铝反应呈阳性,22个菌株浓氨水反应呈阳性,上述3种反应均呈阳性的有7个菌株(ELF1-1、ELF3-1、ELF3-2、ELF'3-1、ERF2-1、ERF3-1和ERF'1-3),表明这7个菌株能够产生黄酮物质,进而研究它们在PDA和查氏培养基上的生长与产黄酮能力。

2.2 内生真菌的生长情况

除菌株ELF3-1和ERF3-1外,其余5个菌株的生物量在PDA培养基上均较在查氏培养基上大,但只有菌株ELF3-2在PDA培养基和查氏培养基上的生物量差异极显著,其余6个菌株的生物量在2种培养基上差异不显著。可见与查氏培养基相比较,在PDA培养基上灯盏花产黄酮内生真菌菌株的生长略好一些。

在PDA培养基上,除菌株ELF'3-1的生物量显著小于较大的ELF3-1、ERF3-1和ERF'1-3 3个菌株外,其余菌株间差异不显著。在查氏培养基上,菌株ELF3-1生物量最大,显著大于其余6个菌株,菌株ERF3-1次之,显著大于其余较小的5个菌株。7个灯盏花产黄酮内生真菌菌株中,菌株ELF3-1和ERF3-1在2种培养基上生长均较好(图1)。

2.3 内生真菌菌丝体的黄酮含量

从图2可知,除菌株ERF2-1和ERF'1-3外,其余5个菌株菌丝体的黄酮含量均在PDA培养基上较大,其中菌株ELF3-1和ELF'3-1在PDA培养基上的菌丝体黄酮含量极显著大于在查氏培养基上的菌丝体黄酮含量,其余3个菌株在PDA培养基上的

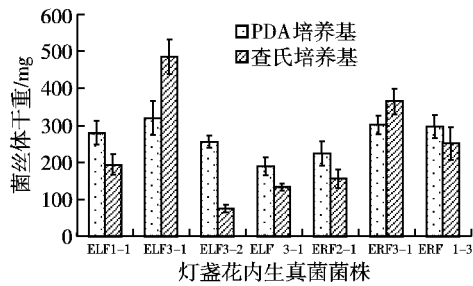


图1 灯盏花产黄酮内生真菌在 PDA 和查氏培养基上的生长情况

Figure 1 Growth of the endophytic fungi from *Erigeron breviscapus* on PDA and Czapek media

菌丝体黄酮含量显著大于在查氏培养基上的菌丝体黄酮含量,可见与查氏培养基相比较,在 PDA 培养基上灯盏花产黄酮内生真菌菌丝体的黄酮含量较高。

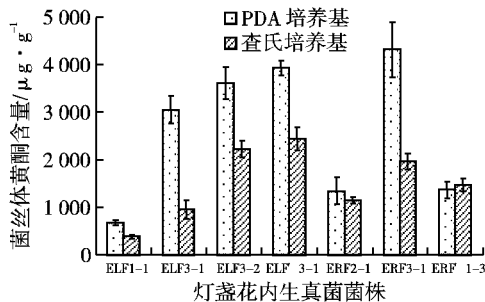


图2 PDA 和查氏培养基上灯盏花产黄酮内生真菌的黄酮含量

Figure 2 Flavonoid contents of the endophytic fungi on PDA and Czapek medium

在 PDA 培养基上,菌株 ERF3-1、ELF'3-1、ELF3-2 和 ELF3-1 菌丝体黄酮含量较大,极显著大于较小的 3 个菌株。在查氏培养基上,菌株 ELF'3-1、ELF3-2 和 ERF3-1 菌丝体的黄酮含量较高,显著大于较小的 4 个菌株。可见,7 个灯盏花产黄酮内生真菌菌株中,在 PDA 和查氏培养基上,菌株 ELF'3-1、ELF3-2 和 ERF3-1 菌丝体黄酮含量较高。

2.4 内生真菌菌丝体的黄酮产量

从图 3 可以看出,菌株 ELF3-2 菌丝体黄酮产量在 PDA 培养基上极显著大于在查氏培养基上的菌丝体黄酮产量,菌株 ELF1-1、ELF'3-1 和 ERF3-1 菌丝体黄酮产量在 PDA 培养基上显著大于在查氏培养基上的菌丝体黄酮产量,其余的 3 个菌株菌丝体黄酮产量也在 PDA 培养基上较大,但 2 种培养基上菌丝体黄酮产量差异不显著。可见,相对于查氏培养基,在 PDA 培养基上灯盏花产黄酮内生真菌的黄酮产量较大。

在 PDA 培养基上,菌株 ERF3-1 的黄酮产量最高,显著大于较小的 4 个菌株,菌株 ELF3-1、ELF3-2 和 ELF'3-1 次之;在查氏培养基上,也是以菌株 ERF3-1 的黄酮产量最高,显著大于其余 6 个菌株,菌株 ELF3-1、ERF'1-3 和 ELF'3-1 次之。可见 7 个灯盏花产黄酮内生真菌菌株中,菌株 ERF3-1 在 2 种培养基上的黄酮产量均最高,菌株 ELF3-1 和 ELF'3-1 次之。

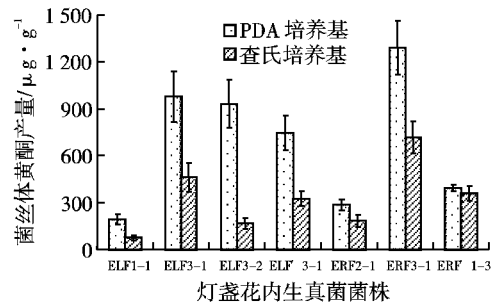


图3 PDA 和查氏培养基上灯盏花产黄酮内生真菌的黄酮产量

Figure 3 Flavonoid productions of the endophytic fungi on PDA and Czapek medium

3 讨论

药用植物是在人们认识和利用的植物资源中具有特殊的化学成分及生理功能,对人体疾患及动物病害具有保健或治疗作用的一类植物的总称。虽然我国药用植物的生物多样性非常丰富,但是由于对生物资源保护和可持续利用的意识薄弱,在开发应用方面,已经出现野生资源严重减少、栽培药材品质下降等问题。药用植物内生菌能够产生的多种生物活性物质,某些内生菌具备合成与宿主药用植物药效成分相似代谢产物的能力,利用药用植物内生菌开发新药源具有极大的可能性,成为药用植物资源保护与利用研究的一个新热点。黄酮是许多药用植物的重要药效成分之一,目前从银杏^[12-14]、杜仲^[10, 15]、珙桐^[16]和喜树^[17]等药用植物分离出一些具有产黄酮能力的内生真菌,本文筛选得到 7 个能够产生黄酮类物质的灯盏花内生真菌,在不同的培养基上均保持一定的产黄酮能力,具有潜在的应用价值。

每一种药用植物就是内生菌的一个资源库,利用药用植物内生菌产生与宿主相同或相似活性物质方面表现出了巨大潜力,但药用植物内生菌产生的活性物质离大规模的工业生产还相距甚远,瓶颈之一是内生菌产生的生物活性物质产量过低,这与目前我们对药用植物内生菌可以产生与宿主相同或相似的生物

活性物质的机制尚不清楚有关。因此,进一步探索药用植物内生菌合成生物活性物质的具体机制,建立科学的筛选模型,提高药用植物活性物质产生菌的筛选效率,获得产量高的适合生产的菌株,并以传统的育种手段结合原生质体、基因工程等现代育种技术,对已有优良性状菌株进行基因改良,进而探索发酵条件,优化生产工艺,最终为活性物质产生菌实现产业化奠定基础,有效的开发利用药用植物内生菌资源,将有利于我国利用药用植物内生菌资源进行药物生产,也有利于野生珍贵药用植物资源的保护,具有重大的生态学意义。

参考文献:

- [1] 曹理想,周世宁. 植物内生放线菌研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 93-96.
CAO Li-xiang, ZHOU Shi-ning. Research of plant endophytic actinomycetes[J]. *Microbiology*, 2004, 31(4): 93-96.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* and endophytic fungus of Pacific yew[J]. *Science*, 1993, 260: 214-216.
- [3] 刘仕平,曾松荣,郭仕平,等. 中华山荷叶内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究[J]. 中国药物与临床, 2003, 3(3): 227-228.
LIU Shi-ping, ZENG Song-rong, GUO Shi-ping, et al. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus from *Diphylllea sineusis* and its fermentation to produce active therapeutic principle[J]. *Chinese Remedies & Clinics*, 2003, 3(3): 227-228.
- [4] 李爱华,樊明涛,师俊玲. 杜仲内生菌的分离及产PDA菌株的筛选[J]. 西北植物学报, 2007, 27(3): 616-619.
LI Ai-hua, FAN Ming-tao, SHI Jun-ling. Isolation of endophytes from *Eucommia ulmoides* Oliv. and screening for strains with PDA production[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2007, 27(3): 616-619.
- [5] 张晓洁,汤丽丽,王一丁. 产甾体皂甙华重楼内生真菌、放线菌的分离与筛选[J]. 现代医学进展, 2007, 7(3): 358-360.
ZHANG Xiao-jie, TANG Li-li, WANG Yi-ding. Isolating and screening of steroidal saponins-producing endophytic Fungi, Actinomycete from *Pris polyphylla* var. *chinensis* Franch[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2007, 7(3): 358-360.
- [6] Gullo V P, McAlpine J, Lam K S, et al. Drug discovery from natural products[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006, 33(7): 523-531.
- [7] 张俭,肖逢连,阳小燕. 灯盏花生物学特性及其药用功效[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 25-27.
ZHANG Jian, XIAO Feng-Lian, YANG Xiao-yan. The biological characteristics and pharmacological function of *Erigeron breviscapus* [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2007, 18(12): 25-27.
- [8] 李治滢,杨丽源,周斌,等. 灯盏细辛内生真菌的研究 I: 菌种分离及其分类鉴定[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2003, 25(1): 65-68.
LI Zhi-ying, YANG Li-yuan, ZHOU Bin, et al. Study on endophytic fungi in *Erigeron breviscapus* I: Isolation and identification of endophytic fungi[J]. *Journal of Yunnan University*, 2003, 25(1): 65-68.
- [9] 杨文博. 微生物学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 217-221.
YANG Wen-bo. Experiment of microbiology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 217-221.
- [10] 沈书庆,殷红,刘芸,等. 产杜仲黄酮内生真菌的初步研究[J]. 菌物研究, 2008, 6(1): 46-49.
SHEN Shu-qing, YIN Hong, LIU Yun, et al. Primary studies on flavonoid-producing endophytic fungi isolated from a medicinal plant *Eucommia ulmoides*[J]. *Journal of Fungal Research*, 2008, 6(1): 46-49.
- [11] 马陶陶,张群林,李俊,等. 三氯化铝比色法测定中药总黄酮方法的探讨[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 54-55.
MA Tao-tao, ZHANG Qun-lin, LI Jun, et al. AlCl₃ colorimetry for determination of total flavonoids[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2008, 19(1): 54-55.
- [12] 赵伟,李莉,王志学,等. 一株产黄酮类物质内生真菌的初步研究[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(2): 88-91.
ZHAO Wei, LI Li, WANG Zhi-xue, et al. Isolation and production identification of a flavonoid-producing endophytic fungus[J]. *Journal of Microbiology*, 2008, 28(2): 88-91.
- [13] 赵庆云,樊明涛,师俊玲. 银杏植株中内生菌的分离及产黄酮菌株的筛选[J]. 农业机械学报, 2007, 38(9): 199-201.
ZHAO Qin-yun, FAN Ming-tao, SHI Jun-ling. Isolation and selection of endophytic microorganisms producing flavonoids from *Ginkgo biloba* L. [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery*, 2007, 39(9): 199-201.
- [14] 钱龙,杨明飞,冉雪琴,等. 银杏产黄酮内生真菌的分离与鉴定[J]. 山地农业生物学报, 2007, 26(4): 305-310.
QIAN Long, YANG Ming-fei, RAN Xue-qin, et al. Isolation and identification of endophytic fungi producing flavonoids from *Ginkgo biloba* L. [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2007, 26(4): 305-310.
- [15] 霍娟,陈双林. 杜仲内生真菌抗氧化活性[J]. 南昌大学学报, 2004, 28(3): 270-275.
HUO Juan, CHEN Shuang-lin. A preliminary study on anti oxidative activity of endophytic fungus *chaetomella* SP. From *Eucommia ulmoides*[J]. *Journal of Nanchang University*, 2004, 28(3): 270-275.
- [16] 何映霞,冉雪琴,王嘉福. 珙桐产黄酮内生真菌的分离和鉴定[J]. 贵州农业科学, 2008, 36(3): 3-6.
HE Ying-xia, RAN Xue-qin, WANG Jia-fu. Isolation and identification of endophytic fungi strains producing flavonoids from *Davidia involucre* Baill[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2008, 36(3): 3-6.
- [17] 颜霞,李希尧,李伟国. 喜树内生真菌的分离及其代谢产物的初步研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 315-318.
YAN Xia, LI Xi-yao, LI Wei-guo. Isolation of endophytes from *Camptotheca acuminata* decne and the pilot study of metabolites[J]. *Acta Agricultural Boreali-occidentalis Sinica*, 2008, 17(3): 315-318.