

于 森,杨 梅,张连茹. 南方红豆杉内生真菌的初步研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):332-335.

南方红豆杉内生真菌的初步研究

于 森¹, 杨 梅², 张连茹²

(1. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏银川 750021; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005)

摘要:从共生理论出发,对采自福建省龙岩山区的药用植物南方红豆杉的内生真菌进行分离。从南方红豆杉的树叶、短茎和树皮中共分离得到 107 株内生真菌。抗菌、抗氧化和抗肿瘤活性检测结果显示,其中有 8 株菌对 1 种或者几种指示菌有一定的抗菌活性,占供测菌株的 7.48%;有 40 株菌对 HeLa 细胞有较强的细胞毒活性,占供测菌株的 37.38%;有 2 株菌对 DPPH· 有机自由基有较强清除活性,占供测菌株的 1.87%。从南方红豆杉内生真菌 *Xylariales* sp. 的固体发酵产物中初步分离并鉴定出化合物 10,11 - dihydroxynerylol,该化合物表现出了一定的抗氧化作用。说明南方红豆杉植物中含有丰富的菌种资源,具有开发生物活性物质的潜力。

关键词:南方红豆杉;内生真菌;生物活性

中图分类号: Q178.531 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0332-04

微生物与植物有极其密切的关系,其中根瘤菌与豆科植物、菌根真菌与木本植物的共生关系早已为人们所熟知。植物内生真菌是指那些在其生活史中的某一段时期生活在植物组织内部而不会引起植物组织产生明显病害症的真菌^[1]。1898 年 Vogl 从黑麦草 (*Lolium temulentum* L.) 种子中分离发现了第 1 株内生真菌^[2],至今已有 100 多年的历史。植物内生真菌普遍存在于各种陆生及水生植物中,具有非常广泛的宿主多样性。由于植物内生真菌生活环境的多样性和特殊性,在其次级代谢产物合成方面具有以下明显特点:不仅能产生一些结构独特、骨架新颖的活性化合物,而且很有可能合成与其宿主相同或相似的生理活性物质。自 1993 年 Strobel 等从短叶红豆杉的树皮中分离到 1 株产紫杉醇的内生真菌——安德氏紫杉霉 (*Taxomyces andreanae*)^[3] 以后,从植物内生菌中寻找和发现新的活性化合物逐渐成为内生菌的研究热点,目前从植物内生真菌中得到的次生代谢产物包括抗生素、抗肿瘤和抗氧化等多种活性化合物^[4]。

红豆杉科红豆杉属 (*Taxus*) 植物为第 3 纪孑遗植物,在地球上已生存繁衍了 250 万年^[5]。20 世纪 70 年代,Wani 等从短叶红豆杉 (*T. brevifolia*) 提取分离得到的天然抗癌化合物紫杉醇,具有独特的抑制微管解聚和稳定微管作用,对卵巢癌、乳腺癌、肺癌、食道癌、前列腺癌以及直肠癌均有疗效^[6]。自 1992 年 12 月 29 日美国 FDA 正式批准上市后,它立即成为全球最畅销的抗癌明星药物,保持着 20% 左右的年增长率^[7],是最近 40 余年来全世界发现的最重要的抗肿瘤药物之一。

红豆杉属植物的药用价值引起了世界性的研究机构和制药企业的高度重视。研究、开发和利用这一抗肿瘤药用植物资源的活动在世界范围内普遍展开。从红豆杉属植物中分离得到的 200 多种成分中,抗癌活性较强的紫杉烷类二萜及生

物碱尤其引人瞩目^[7-8]。但由于红豆杉生长缓慢、资源短缺、树皮中有效成分含量很少,提取利用受到极大限制,因此,开展红豆杉内生真菌的分离及其代谢产物的研究,将为人类从微生物角度寻找抗癌药物开辟一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 试验样品

南方红豆杉树皮、短茎、短叶等植物样品于 2007 年 3 月采自福建省龙岩山区。

1.2 抗菌活性测定用指示菌

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*)、白色假丝酵母 (*Candida albicans*),均为宁夏大学生命科学学院实验室保存菌种。

1.3 肿瘤细胞株

人宫颈癌 HeLa 细胞,购于中科院上海细胞所。

1.4 常用的培养基

细胞培养基(DMEM):10 g 干粉 DMEM 溶于 1 L 双蒸水中,加入 3.17 g NaHCO₃搅拌均匀,溶解后加 10%~15% 已灭活(56℃ 温浴 30 min)的小牛血清及 1% 三抗,混匀后用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜过滤除菌。

马铃薯葡萄糖培养基(PDA):马铃薯 200 g(去皮,切成小块,加水煮沸 30 min,4~6 层纱布过滤,收集滤液),葡萄糖 20 g,用水定容至 1 000 mL,固体培养基则加入 1.5%~2% 的琼脂,121℃ 高压灭菌 20 min。

水琼脂培养基:水中加入 1.5%~2% 的琼脂,121℃ 高压灭菌 20 min。

1.5 内生真菌的分离

2007 年 3 月于福建省龙岩山区采集百年南方红豆杉植物的树叶、短枝、树皮 3 种组织。将采集的新鲜树叶、短枝、树皮用自来水冲洗干净,然后用 75% 乙醇溶液浸泡,振荡 10 min,表面消毒,用无菌水冲洗 3 遍,无菌滤纸吸干表面无菌水。树叶用无菌刀片剪成约 5 mm×3 mm 的小块;树皮用

收稿日期:2013-03-21

作者简介:于 森(1984—),男,宁夏银川人,硕士,实验师,从事天然产物活性物质提取与活性研究工作。E-mail:klimsman@163.com。
通信作者:张连茹,博士,副教授,从事天然产物中基于分子靶点的潜在小分子药物的开发。E-mail:ru898@xmu.edu.cn。

无菌刀片去除外皮层和木质部,取内皮层及韧皮部,用无菌刀片将上述样品剪成约 10 mm × 10 mm 的小块;短枝剪成约 5 mm × 3 mm 的小块。将各个组织块接种在水琼脂平板上,25 ℃ 恒温霉菌培养箱倒置培养,待菌丝长出后,挑出尖端菌丝于 PDA 平板上,并多次纯化得到内生真菌。

1.6 菌株的鉴定

采用 ITS 测序鉴定法进行菌株种属鉴定^[9]。以 ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)和 ITS5(5′-GGAAG-TAAAAAGTCGTAACAAGG-3′)为引物,通过 PCR 操作扩增菌株 ITS 间区序列,经上海英骏生物技术公司测序并与 GenBank 数据库中的序列比对,得到鉴定结果。

1.7 菌株的培养及发酵粗提液的制备

107 株南方红豆杉内生真菌各发酵 100 mL 粗提液的制备:挑取菌丝块接种于 PDA 培养基平板上,1 株菌发酵 100 mL,于 25 ℃ 恒温霉菌培养箱中培养 14 d。培养物切成小块,用 100 mL 甲醇进行等量提取,提取液过滤除去甲醇不溶物,作为活性测定的母液。

菌株 *Xylariales* sp. 发酵 10 L 粗提物的制备:以 PDA 固体培养基平板发酵 10 L,于 28 ℃ 培养箱内培养 15 d。将培养物切割成小块后用乙酸乙酯、甲醇、乙酸(体积比 80:15:5)的混合溶液提取,利用旋转蒸发仪 40 ℃ 减压浓缩得到发酵提取浸膏,浸膏加入水、乙酸乙酯(体积比 1:1)的混合溶液 600 mL 萃取 6 次,合并乙酸乙酯相,并用旋转蒸发仪 40 ℃ 减压浓缩至干,用甲醇溶解过滤,蒸干后得到粗提物。

1.8 抗菌活性的测定

用牛津杯法测定菌株抗菌活性^[10]。

1.9 抗氧化活性的测定

采用改进的 DPPH 法测定样品的抗氧化活性^[11]。利用多功能酶标仪在 517 nm 处测定吸光度 D_0 ;然后每孔加入 50 μmol/L DPPH · 150 μL,避光反应 30 min,再于 517 nm 处测定吸光度 D_1 。抑制率计算公式如下:

抑制率 = $(D_{1\text{样品}} - D_{0\text{样品}}) / (D_{1\text{空白}} - D_{0\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.10 内生菌发酵液抗肿瘤活性的测定

采用 MTT 法,并选取 HeLa 细胞进行抗肿瘤活性的研究。利用多功能酶标仪分别测定 570、630 nm 波长处吸光度,由如下公式求出抑制率^[12]:

抑制率 = $[(D_{1\text{对照}} - D_{0\text{对照}}) - (D_{1\text{样品}} - D_{0\text{样品}})] / (D_{1\text{对照}} - D_{0\text{对照}}) \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 南方红豆杉内生真菌的分离结果

对采自福建龙岩山区的南方红豆杉植物组织样品进行内生真菌分离,用水琼脂法从叶片、短枝、韧皮部中共分离得到 107 株内生真菌,其中分离自叶片、短枝、韧皮部的分别有 31、23、53 株,分别占总数的 29.0%、21.5%、49.5%。结果表明,南方红豆杉内生真菌组织分布具有差异性,在植物韧皮部的分布较叶片和短茎内多。

2.2 抗菌活性的测定

以白色假丝酵母(CA)、金黄色葡萄球菌(SA)、枯草芽孢杆菌(BS)、短小芽孢杆菌(BP)、大肠杆菌(EC)、藤黄八叠球菌(SL)为指示菌,采用牛津杯法对分离到的 107 株南方红豆

杉内生真菌进行抗菌活性测定,抑菌结果见表 1。从表 1 中可见,在 107 株供测菌中,有 8 株对 1 种或者几种指示菌显示出一定的抗菌活性,占供测菌株的 7.48%。其中抗 SA 的有 6 株,占供测菌株的 5.61%;抗 CA 的有 3 株,占供测菌株的 2.80%。Hds59 菌株对金黄色葡萄球菌和白色假丝酵母均有一定的抑制作用。

表 1 南方红豆杉内生真菌的抗菌活性

菌株号	抑菌圈直径(mm)					
	BS	BP	EC	SA	SL	CA
Hds3	-	-	-	10	-	-
Hds9	-	-	-	12	-	-
Hds57	-	-	-	11	-	-
Hds59	-	-	-	16	-	10
Hds79	-	-	-	11	-	-
Hds96	-	-	-	11	-	-
Hds106	-	-	-	-	-	11
Hds107	-	-	-	-	-	11

注:“-”表示无抗菌活性。

2.3 抗氧化活性的测定

南方红豆杉内生真菌抗氧化活性测定采用 DPPH 法,测定结果如表 2 所示。

107 株供测菌株的发酵提取液稀释 10 倍后,对 DPPH · 有机自由基的抑制率大于 20% 的有 5 株,占供试菌株的 4.67%;抑制率小于 10% 的有 46 株,占供试菌株的 43.00%;抑制率在 10% ~ 20% 之间的有 56 株,占供试菌株的 52.33%。107 株供测菌株的发酵提取液稀释 20 倍后,抗氧化抑制率大于 20% 的有 2 株,占供试菌株的 1.87%;抑制率小于 10% 的有 83 株,占供试菌株的 77.57%;抑制率在 10% ~ 20% 之间的有 22 株,占供试菌株的 20.56%。说明所分离到的南方红豆杉内生真菌中具有强抗氧化活性的菌株较少。

2.4 抗肿瘤活性测定结果

用 MTT 法测定南方红豆杉内生真菌的抗肿瘤活性,选用 HeLa 作为指示细胞株。将发酵提取液分别稀释 50、500 倍后进行测定,结果如表 3 所示。

由表 3 可知,当所分离到的南方红豆杉内生真菌发酵提取液稀释 500 倍后仍具有抗肿瘤活性的共有 35 株,占有供测菌株的 32.71%。其中,对 HeLa 细胞抑制率大于 10% 的有 4 株,占有供测菌株的 3.74%。抑制率在 0 ~ 10% 之间的有 31 株,占有供测菌株的 28.97%。抗肿瘤活性最高的菌株是 Hds65,选择该菌株进行进一步代谢产物研究。

2.5 南方红豆杉内生真菌 *Xylariales* sp. 代谢产物分析

抗肿瘤高活性菌株 Hds65 经过 ITS 引物扩增和基因序列比对,其 ITS 序列与 *Xylariales* sp. 相似度为 99%,因此将菌株 Hds65 鉴定为炭角菌(*Xylariales* sp.)。

菌株 *Xylariales* sp. 以 PDA 固体培养基发酵培养 10 L,经提取蒸干,共得到粗提物 3.81 g。通过中压液相、正相及凝胶层析,分离到化合物 1(图 1),经 NMR 及 MS 鉴定为 10,11-dihydroxynerolidol。

化合物 1 无色透明油状物 ESI-MS m/z :257.2 [M + H]⁺, m/z , 279.2 [M + Na]⁺, 295.2 [M + K]⁺。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) 5.08 (d, 11, H-1), 5.24 (d, 17, H-1), 5.94 (dd, 11, 17, H-2), 1.58 (m, H-4), 2.07 (m, H-5),

表 2 南方红豆杉内生真菌的抗氧化活性

菌株号	抑制率(%)		菌株号	抑制率(%)		菌株号	抑制率(%)		菌株号	抑制率(%)	
	稀释 10 倍	稀释 20 倍		稀释 10 倍	稀释 20 倍		稀释 10 倍	稀释 20 倍		稀释 10 倍	稀释 20 倍
Hds1	10.2	7.8	Hds28	6.2	5.5	Hds55	6.7	5.8	Hds82	5.6	3.0
Hds2	21.9	14.6	Hds29	10.3	7.9	Hds56	11.3	8.0	Hds83	4.6	2.6
Hds3	7.0	7.5	Hds30	9.9	6.7	Hds57	13.3	12.5	Hds84	3.9	3.0
Hds4	5.0	4.5	Hds31	17.2	9.8	Hds58	13.0	8.3	Hds85	1.8	0
Hds5	7.6	5.5	Hds32	16.6	11.1	Hds59	15.7	10.9	Hds86	23.9	11.4
Hds6	6.6	6.3	Hds33	14.2	7.3	Hds60	12.6	6.9	Hds87	8.0	6.3
Hds7	9.6	9.1	Hds34	13.3	11.8	Hds61	13.2	4.5	Hds88	11.4	4.6
Hds8	15.4	10.9	Hds35	11.7	9.0	Hds62	9.8	7.2	Hds89	6.0	1.6
Hds9	7.6	3.0	Hds36	10.4	10.1	Hds63	9.2	8.2	Hds90	3.5	0.5
Hds10	3.7	2.9	Hds37	12.7	10.2	Hds64	13.9	6.5	Hds91	2.7	0
Hds11	10.0	7.0	Hds38	11.3	5.2	Hds65	18.2	16.3	Hds92	18.6	16.3
Hds12	14.1	8.9	Hds39	13.1	5.5	Hds66	10.9	4.2	Hds93	12.1	11.6
Hds13	10.5	6.5	Hds40	17.5	5.9	Hds67	4.1	0.4	Hds94	12.0	9.2
Hds14	6.8	5.6	Hds41	11.6	6.2	Hds68	5.2	2.6	Hds95	16.9	7.5
Hds15	7.9	7.0	Hds42	12.6	6.8	Hds69	13.7	2.2	Hds96	11.6	6.9
Hds16	9.9	6.1	Hds43	12.8	8.4	Hds70	9.2	9.4	Hds97	11.5	8.9
Hds17	9.7	5.5	Hds44	7.8	7.3	Hds71	15.2	7.5	Hds98	57.8	40.9
Hds18	5.3	5.5	Hds45	9.6	6.1	Hds72	5.8	4.9	Hds99	16.9	11.7
Hds19	12.8	5.6	Hds46	15.8	4.6	Hds73	9.5	5.1	Hds100	14.4	10.7
Hds20	17.8	10.3	Hds47	10.8	3.6	Hds74	7.2	4.7	Hds101	12.2	10.1
Hds21	5.7	2.5	Hds48	11.9	4.9	Hds75	3.9	3.5	Hds102	14.9	4.5
Hds22	2.3	0.6	Hds49	14.1	7.4	Hds76	4.3	0	Hds103	34.1	22.2
Hds23	8.7	7.5	Hds50	12.6	4.9	Hds77	2.9	2.3	Hds104	12.1	7.4
Hds24	2.4	1.1	Hds51	10.3	6.4	Hds78	5.9	9.5	Hds105	18.3	16.9
Hds25	13.2	11.7	Hds52	13.1	10.8	Hds79	9.5	7.4	Hds106	16.7	15.0
Hds26	7.4	5.5	Hds53	11.1	11.9	Hds80	7.9	5.1	Hds107	31.8	18.7
Hds27	10.9	7.4	Hds54	4.4	3.4	Hds81	7.5	5.1			

表 3 南方红豆杉内生真菌的抗肿瘤活性

菌株号	抑制率(%)		菌株号	抑制率(%)		菌株号	抑制率(%)		菌株号	抑制率(%)	
	稀释 50 倍	稀释 500 倍		稀释 50 倍	稀释 500 倍		稀释 50 倍	稀释 500 倍		稀释 50 倍	稀释 500 倍
Hds1	11.0	7.0	Hds28	7.3	—	Hds55	14.9	—	Hds82	26.2	3.3
Hds2	52.1	23.0	Hds29	—	—	Hds56	7.1	—	Hds83	3.7	—
Hds3	8.3	—	Hds30	—	—	Hds57	25.4	—	Hds84	—	—
Hds4	5.7	3.5	Hds31	—	—	Hds58	—	—	Hds85	4.5	—
Hds5	25.5	5.1	Hds32	1.9	—	Hds59	51.3	3.2	Hds86	14.2	0.5
Hds6	16.0	5.0	Hds33	5.2	—	Hds60	7.9	—	Hds87	2.1	—
Hds7	28.6	8.2	Hds34	—	—	Hds61	0.9	0.1	Hds88	19.6	—
Hds8	7.2	1.3	Hds35	—	0.2	Hds62	6.2	—	Hds89	5.4	1.0
Hds9	8.2	5.0	Hds36	6.3	—	Hds63	10.8	2.3	Hds90	—	—
Hds10	10.6	—	Hds37	5.3	1.9	Hds64	10.4	3.9	Hds91	1.6	—
Hds11	1.6	—	Hds38	3.0	—	Hds65	90.4	43.9	Hds92	2.1	—
Hds12	17.9	—	Hds39	2.6	1.0	Hds66	8.9	4.1	Hds93	—	—
Hds13	17.7	—	Hds40	11.2	0.2	Hds67	2.3	—	Hds94	—	—
Hds14	—	—	Hds41	26.4	24.0	Hds68	24.1	—	Hds95	6.1	—
Hds15	2.9	—	Hds42	14.4	—	Hds69	10.6	—	Hds96	7.0	—
Hds16	2.6	—	Hds43	20.7	13.1	Hds70	9.4	2.2	Hds97	5.4	—
Hds17	—	—	Hds44	11.5	7.7	Hds71	9.9	0.9	Hds98	—	—
Hds18	—	—	Hds45	9.2	4.8	Hds72	11.9	3.7	Hds99	—	—
Hds19	—	—	Hds46	20.6	8.3	Hds73	7.6	0.9	Hds100	2.7	—
Hds20	13.1	—	Hds47	12.9	9.2	Hds74	—	—	Hds101	2.2	—
Hds21	20.8	—	Hds48	10.1	3.4	Hds75	—	—	Hds102	6.1	—
Hds22	5.9	—	Hds49	3.5	—	Hds76	—	—	Hds103	10.5	—
Hds23	9.7	—	Hds50	39.4	7.4	Hds77	2.5	—	Hds104	8.6	—
Hds24	17.1	—	Hds51	0.3	—	Hds78	11.0	—	Hds105	13.0	—
Hds25	18.8	—	Hds52	4.4	—	Hds79	5.9	—	Hds106	11.2	—
Hds26	—	—	Hds53	20.0	3.5	Hds80	13.4	2.1	Hds107	11.2	—
Hds27	—	—	Hds54	1.7	—	Hds81	2.0	—			

注:“—”表示无抗肿瘤活性。

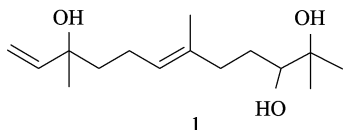


图1 化合物 1 的化学结构

5.24(m, H-6), 2.23(m, H-8), 1.58(m, H-9), 3.35(d, 11, H-10), 1.20(s, H-12), 1.16(s, H-13), 1.62(s, H-14), 1.29(s, H-15); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 150 MHz) 111.3(C-1), 145.3(C-2), 73.5(C-3), 42.4(C-4), 22.5(C-5), 126.0(C-6), 135.1(C-7), 28.6(C-8), 29.6(C-9), 77.9(C-10), 73.0(C-11), 26.4(C-12), 23.2(C-13), 23.5(C-14), 27.6(C-15)。与文献[13]报道的核磁数据对比进一步确定了化合物 1 的结构为 10, 11-dihydroxynerolidol。

采用 DPPH 法测定化合物 1 的抗氧化活性, 将化合物浓度配制为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 测得其对 DPPH·自由基的清除率为 6.97%。采用 MTT 法测定化合物 1 的抗肿瘤活性, 在指示细胞株为 Hela、化合物浓度在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 该化合物对肿瘤细胞株 Hela 的细胞毒活性。采用滤纸片法测定化合物 1 对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、白色假丝酵母指示菌的活性, 在每张滤纸片含有 50 μg 样品时, 没有显示出对指示菌株的抑制活性。以上试验结果与橙花叔醇类化合物常常应用于美白类产品的抗氧化功能相吻合。

3 结论与讨论

微生物是活性天然产物的重要来源, 而植物内生微生物与宿主植物联系紧密, 其次生代谢可能受到植物调控^[14]或者利用植物成分或代谢产物作为生物合成的前体, 通常被认为会产生活性很强的新代谢产物^[15]。因此, 从药用植物中分离到具有较强生理活性的内生微生物的概率较大, 例如国内外不少学者从红豆杉植物中不仅筛选到了产生紫杉醇、紫杉烷及其类似物的内生真菌, 而且不断分离到具有产生强细胞毒性或抗菌活性的新化合物能力的内生真菌^[16]。

本试验对南方红豆杉内生真菌的分离及活性进行了研究, 结果表明: 南方红豆杉内生真菌多种多样, 在宿主植物内呈差异性分布, 并呈现出广泛的生物活性, 且个别菌株表现出强抗氧化或细胞毒活性。采用滤纸片法对所分离到的 107 株菌进行抗菌活性筛选, 有 8 株对 1 种或者几种指示菌显示出一定的抑制活性, 占总菌数的 7.48%。采用 MTT 法进行细胞毒性筛选, 在发酵提取液稀释 500 倍后仍具有抗肿瘤活性的共有 35 株, 占有供测菌株的 32.71%。其中, Hds65 菌株细胞毒活性最强, 在其发酵液稀释 50、500 倍后, 对 HeLa 细胞的抑制率分别是 90.4%、43.9%。采用 DPPH 法对 107 株供测菌进行抗氧化活性筛选, 在发酵提取液稀释 20 倍后有 104 株仍具有一定的抗氧化活性, 占有供测菌株的 97.20%, 同时 Hds98 对 DPPH·有氧自由基抑制率为 40.9%, 显示出了强抗氧化活性。这些强活性菌株可以作为活性物质结构研究或者活性物质追踪的出发菌株, 为强生物活性化合物的开发提供了研究基础。

化合物 1 即 10, 11-dihydroxynerolidol, 是橙花叔醇的衍

生物, 属于倍半萜醇。此类化合物具有木香、花样香气, 可作为高级化妆品的定香剂, 也可作为食品添加剂和医药中间体^[17], 大部分产自芳香植物。红豆杉内生真菌 *Xylariales* sp. 产生了与宿主植物相似的代谢产物, 进一步证实了内共生理理论的正确性。而该化合物抗氧化活性较弱, 估计来自于其结构中 3 个羟基。

对药用植物内生真菌次级代谢产物的扩大研究, 不仅为新药的开发提供了丰富、可靠的资源, 同时保护了日益稀少的药用植物资源。本研究结果为开发药用植物内生真菌、寻找新颖的生物活性物质提供了具有参考价值的科学依据。

参考文献:

- [1] Petrini O. Microbial ecology of leaves [M]. Heidelberg: Springer-Verlag, 1991: 179-197.
- [2] Vogl A E. Mehl und die anderen mehlprodukte der cerealien und leguminosen [J]. Nahrungs-Unters Hyg Warenk, 1898, 12: 25-29.
- [3] Strobel G A. A proposed new taxon for a bulbififerous hyphomycetes associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. Mycotaxon, 1993, 107: 71-80.
- [4] Li H Y, Liu L. Recent advances on bioactive compounds producing endophytes [J]. Nat Prod Res Dev, 2004, 16: 482-485.
- [5] 郑万钧, 傅立国. 中国植物志: 第七卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 438.
- [6] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. Journal of the American Chemical Society, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [7] 张小伟. 抗癌植物红豆杉 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995: 56.
- [8] 费永俊. 红豆杉药用价值评价及解决药源危机的途径 [J]. 时珍国药研究, 1997, 8(4): 463.
- [9] White T J, Bruns T, Lee S. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes//Innis M A. PCR protocols: A guide to methods and applications [C]. New York: Academic, 1990: 15-22.
- [10] 陈炳华, 王明兹, 刘剑秋. 闽产前胡根挥发油的化学成分及其抑菌活性 [J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(4): 366-370.
- [11] 阎雪芬, 黄丹虹, 代宇博, 等. 海洋真菌抗氧化活性物质的初步研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(3): 418-421.
- [12] 杨丽珊, 黄耀坚, 郑忠辉, 等. 红树植物内生真菌的种群动态及生物活性 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(增刊): 95-99.
- [13] Diaz J G, Goedken V L, Herz W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Mikania rimachii* and *Mikania microptera* [J]. Phytochemistry, 1992, 31: 597-608.
- [14] Loh J, Pierson E A, Pierson L S, et al. Quorum sensing in plant-associated bacteria [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5: 285-290.
- [15] Tan R X, Zou W X. Endophytes: a rich source of functional metabolites [J]. Natural Product Reports, 2001, 18(4): 448-459.
- [16] Stierle D B, Stierle A A, Kunz A. Dihydromulosein from *Botrytis* sp [J]. Journal of Natural Products, 1998, 61(10): 1277-1278.
- [17] 程必强, 马信祥, 许勇. 橙花叔醇植物资源利用与研究 [J]. 林产化学与工业, 1996, 16(2): 23-27.