

# 知母内生真菌多样性及其 对浅表感染真菌的体外拮抗活性\*

李佳琪<sup>1</sup>, 胡海艳<sup>2</sup>, 姚华雄<sup>1</sup>, 李鉴滨<sup>1</sup>, 陈美琪<sup>1</sup>, 王俊彦<sup>1</sup>, 周晓铃<sup>1</sup>, 邓祖军<sup>1</sup>

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:** 分析药用植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* 根、茎、叶中内生真菌的多样性及其次级代谢产物对浅表感染真菌的抑菌活性, 为寻找皮肤真菌病的潜在药物奠定基础。从河北省太行山采集到 5 株健康的野生知母, 采用组织块法分离根、茎、叶的内生真菌; 结合形态学和分子生物学方法分类鉴定内生真菌; 并分别采用菌丝生长抑制速率法和琼脂扩散法筛选对 5 种浅表感染真菌具有抑制活性的菌株。本研究从知母中共分离获得 438 株内生真菌, 隶属于 23 个属。根、茎、叶的真菌定殖率分别为 99.33%、74.00% 和 47.33%, 其中根部的优势类群为镰刀菌属 *Fusarium* (60.29%) 和棘壳孢属 *Setophoma* (33.97%); 茎部的优势类群为镰刀菌属 (91.50%) 和粘帚霉属 *Clonostachys* (7.19%); 叶部的优势类群为镰刀菌属 (35.53%) 和链格孢属 *Alternaria* (14.47%)。香农多样性指数显示, 叶中的物种多样性最高, 其次是根和茎。对 30 株代表性菌株发酵液的抑菌实验结果表明: 对犬小孢子菌 *Microsporum canis*、红色毛癣菌 *Trichophyton rubrum*、黏膜毛孢子菌 *Trichosporon mucoides*、糠秕马拉色菌 *Malassezia furfur* 和白色念珠菌 *Candida albicans* 具有抑制活性的菌株分别占总数的 96.67%、100.00%、100.00%、3.33% 和 3.33%, 其中菌株 ZMR35 对 4 种浅表感染真菌均具有较强的抑制活性, 菌株 ZML33 则对犬小孢子菌、红色毛癣菌、黏膜毛孢子菌的抑制率均高于 70%, 经分子鉴定两者分别属于黑团孢属 *Periconia* 和曲霉属 *Aspergillus*。知母蕴含较为丰富的内生真菌资源, 其中还有较高比例菌株的发酵产物对浅表感染真菌表现出良好的拮抗活性, 这为浅表感染真菌病药物的筛选提供了潜在资源库。

**关键词:** 知母 *Anemarrhena asphodeloides*; 内生真菌; 多样性; 浅表感染真菌; 抑菌活性

中图分类号: R289; R22; R33 文献标志码: A 文章编号: 2097-0137(2022)05-0084-10

## Species diversity of endophytic fungi from *Anemarrhena asphodeloides* and their antagonistic activity *in vitro* against superficial pathogenic fungi

LI Jiaqi<sup>1</sup>, HU Haiyan<sup>2</sup>, YAO Huaxiong<sup>1</sup>, LI Jianbin<sup>1</sup>,  
CHEN Meiqi<sup>1</sup>, WANG Junyan<sup>1</sup>, ZHOU Xiaoling<sup>1</sup>, DENG Zujun<sup>1</sup>

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:** The study investigated the diversity of endophytic fungi in the roots, stems and leaves of the medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* and the antimicrobial activity of their secondary metabolites provide references for discovering new potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts

\* 收稿日期: 2021-09-28 录用日期: 2021-12-15 网络首发日期: 2022-01-21  
基金项目: 国家自然科学基金 (31971384)  
作者简介: 李佳琪 (1996年生), 女; 研究方向: 基础医学; E-mail: 940141585@qq.com  
通信作者: 邓祖军 (1979年生), 男; 研究方向: 微生物资源学; E-mail: dengzujun@gdpu.edu.cn

and dermatophytes. Samples of roots, stems and leaves of 5 healthy wild *A. asphodeloides* plants were collected from the Taihang Mountain in Hebei Province. The endophytic fungi of *A. asphodeloides* were isolated by tissue block isolation method, and were identified by morphological and molecular biological methods. The antimicrobial activity of opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes of endophytic fungi were studied by the agar diffusion and mycelial growth inhibition methods, respectively. A total of 438 isolates of endophytic fungi were isolated from *A. asphodeloides* tissues, these isolates belong to 23 genera. The colonization rate of the endophytic fungi in the roots, stems and leaves were 99.33%, 74.00% and 47.33% respectively. *Fusarium* (60.29%) and *Setophoma* (33.97%) were the dominant genera in the roots, *Fusarium* (91.50%) and *Clonostachys* (7.19%) were the dominant genera in the stems, and *Fusarium* (35.53%) and *Alternaria* (14.47%) were the dominant genera in the leaves. The Shannon diversity index shows that the species diversity in leaves is the highest, followed by roots and stems. The antibacterial results of 30 representative strains by performing fermentation broth showed that: 96.77%, 100.00%, 100.00%, 3.33% and 3.33% of the isolated endophytic fungi had inhibitory activity against *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichosporon mucoides*, *Malassezia furfur* and *Candida albicans*, respectively. Among them, the strain ZMR35 has a strong inhibitory activity against four kinds of superficial fungi. The inhibition rates of the fermentation broth of strain ZML33 against *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichosporon mucoides* were all higher than 70%. The results indicated that the species diversity of *A. asphodeloides* endophytic fungi was rich and the colonization of these species showed tissue specificity. Two of the strains ZMR35 and ZML33 exhibited significant inhibitory effects on a variety of superficial pathogenic fungi *in vitro*. Our results indicate that the secondary metabolites produced by the endophytic fungi of *A. asphodeloides* can be used as natural drug candidates for the treatment of superficial mycosis.

**Key words:** *Anemarrhena asphodeloides*; endophytic fungi; diversity; superficial pathogenic fungi; antimicrobial activities

浅表感染真菌感染 (SFIs, superficial fungal infections) 常由皮肤癣菌、念珠菌和马拉色菌这3类亲人性病原真菌引起。皮肤癣菌侵犯人的皮肤、指甲和毛发引起手足癣、甲癣、头癣等皮肤癣菌病<sup>[1]</sup>。白色念珠菌 *Candida albicans* 主要引起阴道、胃肠道和口腔的浅表感染, 马拉色菌则与花斑癣、毛囊炎以及脂溢性皮炎有关<sup>[2]</sup>。现有流行病学调查结果表明, 全球 SFIs 的发生率高达 20%~25%, 已成为影响人类健康的重要疾病之一<sup>[3]</sup>。目前浅表感染真菌的耐药率越来越高<sup>[4-5]</sup>, 而且针对 SFIs 的治疗药物抑菌活性较差、起效时间较慢, 治疗过程中也存在易复发、稳定性较差等问题, 从而导致现有药物治疗的临床效果不佳<sup>[6]</sup>, 因此寻找和开发新的抗 SFIs 药物显得十分必要<sup>[7]</sup>。

知母 *Anemarrhena asphodeloides* 属于百合科 Liliaceae 知母属 *Anemarrhena*, 是1种多年生草本药用植物, 其干燥根状茎是我国的传统中药, 味苦、性寒, 具有清热泻火、滋阴退蒸、生津止渴的功效, 在外感风热、肺热燥咳、肠燥便秘等症

的治疗中有着广泛的使用<sup>[8-9]</sup>。现有研究证明知母提取物对浅表感染真菌具有较好的抑制活性。例如, 吴润标等<sup>[10]</sup>发现知母提取物在体外对疣状毛癣菌 *Trichophyton verrucosum* 具有较强抑制作用。Lida 等<sup>[11]</sup>采用生物细胞示踪法分离出知母中的 Nyasol 对毛癣菌属、念珠菌属等多株供试皮肤真菌有抗菌活性。巨艳红等<sup>[12]</sup>发现知母提取物乳膏对豚鼠的须癣毛癣菌 *Trichophyton mentagrophytes* 感染具有良好的治疗作用, 且对皮肤无明显致敏作用及毒性。知母的  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解物对4种皮肤真菌: 白色念珠菌、须癣毛癣菌、石膏样小孢子菌 *Microsporum gypseum*、红色毛癣菌 *Trichophyton rubrum* 均有显著的抑制活性, 对石膏样小孢子菌的抑制活性甚至优于氟康唑<sup>[13]</sup>。随着知母药材出口量和国内市场需求量的不断增加以及随之而来的过度采挖, 致使野生知母资源已近枯竭<sup>[9]</sup>, 因此寻找知母药用资源的替代利用方式显得非常必要。药用植物内生真菌由于长期与宿主的协同进化, 可能会产生与宿主植物相同或相似的药用

活性成分<sup>[14-16]</sup>,而且其所产生的次级代谢产物化学结构新颖,具有抑菌、抗癌、抗病毒、抗氧化、抗炎症和免疫抑制等多种生物活性,代谢产物的类型超过了其植物代谢产物的范围<sup>[17]</sup>,因而药用植物内生真菌已成为寻找新型活性物质的重要新资源<sup>[18]</sup>,同时也为药用植物资源的保护与替代利用提供了新途径。但目前未见关于知母内生真菌类群及其抗真菌活性的研究报道。本研究拟系统分析知母内生真菌的多样性,并对其发酵液对红色毛癣菌、犬小孢子菌 *Microsporum canis*、黏膜毛孢子菌 *Trichosporon mucoides*、糠秕马拉色菌 *Malassezia furfur* 和白色念珠菌等 5 种浅表感染真菌的体外抗菌活性进行分析,以期筛选出具有良好抗性的内生真菌菌株,为知母药用资源的挖掘与利用提供新途径,同时也为抗 SFIs 新药开发提供新的菌种资源库。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 供试药用植物** 供试植株为河北保定太行山北部东麓采集的 3 年生以上的健康野生知母。采样地区属于温带季风气候,年平均气温 13.0 °C,年平均降雨量 532 mm。采样时,将知母整株拔出(根带土)置于 4 °C 冰箱保存,48 h 内进行内生真菌的分离。

**1.1.2 供试病原真菌** 犬小孢子菌 *Microsporum canis*、红色毛癣菌 *Trichophyton rubrum*、黏膜毛孢子菌 *Trichosporon mucoides*、糠秕马拉色菌 *Malassezia furfur*、白色念珠菌 *Candida albicans*,菌株来自广东药科大学病原生物学与免疫学实验室。

**1.1.3 主要试剂** 引物(ITS1 和 ITS4)、DNA-Marker,生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR 预混液 2×ProTaq Master Mix(dye plus),湖南艾科瑞生物工程有限公司;真菌 DNA 小量提取试剂盒 HiPure Fungal DNA Mini Kit, Magen 公司;马铃薯葡萄糖固体(PDA)和液体(PDB)培养基、糠秕马拉色菌培养基,广东环凯生物技术有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 内生真菌的分离与纯化** 采用 Deng 等<sup>[19]</sup>的方法从知母中分离内生真菌:将知母植株在流水下进行充分清洗,去除表面尘土后用消毒剪刀将根、茎、叶其剪成适当长度,放至载有无菌滤纸的无菌玻璃皿中将表面水分吸干。样品经过表面消毒( $\varphi=75\%$ 酒精 2 min,  $w=5\%$ 有效氯的次氯

酸钠溶液 1 min)后,用无菌水冲洗 3 遍,取最后 1 次清洗的无菌水涂布 PDA 平板,对表面消毒效果进行检测。晾干后的样品用无菌剪刀将组织剪成小片,接种至 PDA 平板,每个平板上 5 个组织块,28 °C 暗培养,每日观察。观察到菌丝从组织切口处长出,及时用接种针挑取转至另一新的 PDA 平板上,如此数次直至菌落形态典型无杂菌时即可转入斜面试管中培养保存。

**1.2.2 内生真菌的鉴定** 根据 Yu 等<sup>[20]</sup>的方案使用传统的形态学鉴定和分子生物学的方法来鉴定内生真菌。从纯化的菌落中挑取菌丝和分生孢子,置于载玻片上,在光学显微镜下观察,根据菌丝和分生孢子的形态特征,对其进行初步的鉴定<sup>[21]</sup>。使用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA(gDNA),经电泳检测合格的 PCR 产物送去生工生物工程(上海)股份有限公司测序。利用 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在 GenBank 中获取该序列的相似序列信息,然后使用 MEGA 7.0 软件,采用邻接法构建系统发育树<sup>[22]</sup>。

**1.2.3 知母内生真菌的液体发酵** 加入 1 个内生真菌的菌饼(直径 0.5 cm)于 100 mL PDB 培养基中,28 °C、180 r·min<sup>-1</sup> 孵育 7~10 d,将发酵液依次用灭菌纱布和无菌滤纸进行粗滤,最后用 0.22 μm 的一次性膜过滤器对粗滤液过滤除菌,待用<sup>[23]</sup>。

**1.2.4 抗浅表感染真菌活性菌株的筛选** 采用菌丝生长抑制法分析内生真菌对犬小孢子菌、黏膜毛孢子菌、红色毛癣菌体外抗菌活性<sup>[24]</sup>:制备 PDA 培养基,称量、溶解、分装至大试管,每管分装 9 mL 灭菌备用。将除菌过滤后的内生真菌发酵液分别取 1 mL 至培养皿中,再将灭菌分装好的 PDA 迅速倒入加好发酵液的培养皿中充分混匀后静置凝固。平板静置过夜无菌生长后即可将 3 种皮肤癣菌的菌饼接种至平板中央,以未加发酵液的 PDA 平板接种同样大小的皮肤真菌菌饼作为对照,一同放入 28 °C 培养 7 d,处理组与对照组的菌落直径( $d$ )均采用十字交叉法测量。

菌丝生长抑制率计算公式为

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{d_{\text{对照菌落}} - d_{\text{处理菌落}}}{d_{\text{对照菌落}}} \times 100\%.$$

菌株发酵液对糠秕马拉色菌和白色念珠菌的活性测定采用琼脂扩散法<sup>[25]</sup>:将糠秕马拉色菌和白色念珠菌分别接种于马拉平板和 PDA 上 30 °C 活化 48 h,接种环挑取平板上的纯培养菌落,置于 5 mL 灭菌生理盐水中研磨混匀,用 1.0 号麦氏标

准比浊管将菌悬液浓度调整为  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL。移液枪吸取菌悬液 100  $\mu$ L 至已倒好的平板上, 涂布棒涂布均匀, 待菌液稍干后用孔径 6 mm 的打孔器分别在每个培养基上打 4 个孔, 每孔加 20  $\mu$ L 融化的培养基封底, 3 个孔各加入 50  $\mu$ L 发酵液, 1 个孔加生理盐水作阴性对照, 4  $^{\circ}$ C 低温扩散 2 h, 30  $^{\circ}$ C 培养 36~48 h 后观察并记录孔洞周围的抑菌圈大小, 每个菌株平行测定 3 次。

### 1.3 数据分析

知母内生真菌的定殖率(CR)、分离率(IF)、相对分离频率(RF)、多样性指数( $H'$ )、均匀度指数( $E$ )以及相似性指数( $C_s$ )参考文献[26]进行计算, 不同部位的比较采用 Duncan 多重比较法, 统计显著水平值设为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 知母内生真菌的分离率与定殖率

表面消毒后的冲洗水样未见菌生长, 这表明分离到的菌株来源于知母植株内部, 属于内生真菌。共有 438 株 (隶属于 23 个属) 内生真菌从知母根、茎、叶分离到, 其根 209 株、茎 153 株、叶 76 株 (表 1)。根部内生真菌的分离率与定殖率最高 (分别为 139.33% 和 99.33%), 其次为茎部 (102.00%、74.00%), 叶部最低 (50.67%、47.33%)。

表 1 内生真菌在知母中的分离率和定殖率<sup>1)</sup>

Table 1 The isolation rate and colonization rate of fungal endophytes of *A. asphodeloides*

植株部位	组织块数	长菌组织块数	分离真菌数	分离率/%	定殖率/%
根	150	149	209	139.33 <sup>a</sup>	99.33 <sup>a</sup>
茎	150	111	153	102.00 <sup>b</sup>	74.00 <sup>b</sup>
叶	150	71	76	50.67 <sup>c</sup>	47.33 <sup>c</sup>
总计	450	331	438	97.33	73.56

1) 同列的不同小写英文字母表示根、茎、叶之间具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 知母内生真菌的类群结构

对 438 株知母内生真菌经形态学特征观察和分子鉴定后归为 23 个属, 其中镰刀菌属 *Fusarium* 和棘壳孢属 *Setophoma* 为主要类群, 分别占总数的 66.89% 和 16.21% (表 2)。知母不同部位内生真菌的类群结构存在差异: 根部真菌有 9 个属, 其中镰刀菌属 (60.29%) 和棘壳孢属 (33.97%) 为优势类群, 帚枝霉属 *Sarocladium*、棘壳孢属、小球腔霉

属 *Leptosphaeria*、黑团孢属 *Periconia* 和 *Dictyocheirospora* 仅分布在根部; 茎部以镰刀菌属 (91.50%) 和粘帚霉属 *Clonostachys* (7.19%) 为优势类群, 粘帚霉属只分布在茎部; 叶部共有 16 个属, 以镰刀菌属 (35.53%) 和链格孢属 *Alternaria* (14.47%) 为主要类群, 链格孢属、炭疽菌属 *Colletotrichum*、尾孢菌属 *Cercospora*、枝孢菌属 *Cladosporium* 和拟星衣属 *Arthopyrenia* 等只在叶中分离到。

### 2.3 知母不同部位内生真菌的多样性和相似性分析

由表 3 可以看出, 知母总的内生真菌多样性指数 ( $H'$ ) 为 1.33, 不同部位的多样性指数由高到低分别为叶 (2.14)、根 (0.96)、茎 (0.33); 叶的均匀度指数 ( $E$ ) 最高 (0.77), 其次为根 (0.44) 和叶 (0.30)。分析不同部位之间的相似性系数可以看出: 根和茎 ( $C_{s_{\text{root-stem}}} = 0.50$ ) 之间的群落组成为中等相似, 茎和叶 ( $C_{s_{\text{stem-leaf}}} = 0.12$ )、根和叶 ( $C_{s_{\text{root-leaf}}} = 0.32$ ) 之间的群落组成分别为极不相似和中等不相似 (表 3)。

### 2.4 知母内生真菌的抗真菌活性

本研究从分离到的内生真菌挑选出 30 株代表菌株 (表 4) 用于抗浅表感染真菌活性的筛选。从表 5 可以看出, 对犬小孢子菌、红色毛癣菌、黏膜毛孢子菌、糠秕马拉色菌和白色念珠菌具有抑制活性的菌株分别占总数的 96.67%、100.00%、100.00%、3.33% 和 3.33%; 检测的所有内生真菌都至少对 1 种浅表感染真菌具有抑制作用; 同时对这 3 种皮肤真菌 (犬小孢子菌、红色毛癣菌和黏膜毛孢子菌) 具活性的菌株占 96.67%。其中菌株 ZML33 和 ZMR35 的抑制效果最明显, 菌株 ZML33 的发酵液对犬小孢子菌、红色毛癣菌、黏膜毛孢子菌 3 种皮肤真菌的抑制率都高于 70%, 其中对犬小孢子菌的抑制活性高达 89.65%。菌株 ZMR35 的发酵液则除了对犬小孢子菌 (55.12%)、红色毛癣菌 (57.49%)、黏膜毛孢子菌 (49.52%) 这 3 种皮肤真菌有较强的活性外, 还能抑制糠秕马拉色菌的生长, 琼脂扩散实验显示其抑菌圈直径大于 18 mm (表 5)。在 GenBank 中 BLAST 比对发现菌株 ZML33 的 ITS 序列与 *Aspergillus niger* (KF496078.1) 的一致性高达 99.65%, 在系统发育树中可与 2 个 *Aspergillus niger* 参考序列形成一个支持度为 100% 的支 (图 1), 因而将其鉴定为 *Aspergillus niger*; 菌株 ZMR35 的 ITS 序列与黑团孢属中的 *Periconia macrospinosa* (MT446142.1)

表2 知母内生真菌的种类组成  
Table 2 The taxa of endophytic fungi in *A. asphodeloides* %

菌属	内生真菌的相对分离频率			总计
	根	茎	叶	
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	60.29	91.50	35.53	66.89
棘壳孢属 <i>Setophoma</i>	33.97	0.00	0.00	16.21
小球腔霉属 <i>Leptosphaeria</i>	1.44	0.00	0.00	0.69
<i>Dictyocheirospora</i>	1.44	0.00	0.00	0.69
黑团孢属 <i>Periconia</i>	0.96	0.00	0.00	0.46
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	0.96	0.00	1.32	0.69
帚枝霉属 <i>Sarocladium</i>	0.48	0.00	0.00	0.23
木霉属 <i>Trichoderma</i>	0.48	1.31	0.00	0.69
漆斑菌属 <i>Myrothecium</i>	0.48	0.00	1.32	0.46
粘帚霉属 <i>Clonostachys</i>	0.00	7.19	0.00	2.51
链格孢属 <i>Alternaria</i>	0.00	0.00	14.47	2.51
炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>	0.00	0.00	11.84	2.06
尾孢菌属 <i>Cercospora</i>	0.00	0.00	9.21	1.60
枝孢菌属 <i>Cladosporium</i>	0.00	0.00	6.58	1.14
拟星衣属 <i>Arthopyrenia</i>	0.00	0.00	2.63	0.46
弯孢属 <i>Curvularia</i>	0.00	0.00	2.63	0.46
毛壳菌属 <i>Collariella</i>	0.00	0.00	1.32	0.23
<i>Latorua</i>	0.00	0.00	1.32	0.23
毛霉菌属 <i>Mucor</i>	0.00	0.00	1.32	0.23
棒孢霉属 <i>Corynespora</i>	0.00	0.00	1.32	0.23
刚毛藻属 <i>Setophoma</i>	0.00	0.00	1.32	0.23
匍柄霉属 <i>Stemphylium</i>	0.00	0.00	5.26	0.91
茎点霉属 <i>Phoma</i>	0.00	0.00	2.63	0.46
总计	100.00	100.00	100.00	100.00

表3 知母根、茎、叶中内生真菌的多样性<sup>1)</sup>  
Table 3 The diversity of endophytic fungi in roots, stems and leaves of *A. asphodeloides*

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	209	9	0.96 <sup>b</sup>	0.44 <sup>b</sup>	1	0.50	
茎	153	3	0.33 <sup>c</sup>	0.30 <sup>b</sup>		1	0.12
叶	76	16	2.14 <sup>a</sup>	0.77 <sup>a</sup>	0.32		1
总计	438	23	1.33	0.43			

1) 同列的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 ( $P < 0.05$ )。

的一致性高达 99.81%，在系统发育树中与 2 个 *Periconia macrospinosa* 参考序列聚类成一个支持度为 91% 的分支 (图 2)，因而将其鉴定为 *Periconia macrospinosa*。

### 3 讨论

本研究从河北保定太行山野生知母的根、茎和叶子中分离出了 23 属 438 株内生真菌，表明药

表4 知母内生真菌的分子鉴定  
Table 4 The molecular identification of endophytic fungi from *A. asphodeloides*

菌株编号	植株部位	最相似菌株	一致性/ %	属
ZMR8	根	<i>Leptosphaeria</i> sp. strain daef42 (MH550512.1)	99.26	小球腔霉属 <i>Leptosphaeria</i>
ZMR9	根	<i>Setophoma terrestris</i> . isolate ACR09 (KX823407.1)	99.80	棘壳孢属 <i>Setophoma</i>
ZMR10	根	<i>Setophoma terrestris</i> . isolate TVD (KF494172.1)	99.80	棘壳孢属 <i>Setophoma</i>
ZMR12	根	<i>Setophoma terrestris</i> . isolate NRRL (JN615482.1)	99.80	棘壳孢属 <i>Setophoma</i>
ZMR13	根	<i>Dictyocheirospora rotunda</i> . isolate KUMCC (MT627718.1)	93.60	<i>Dictyocheirospora</i>
ZMR25	根	<i>Myrothecium</i> sp. isolate P6367 (MH063659.1)	99.38	漆斑菌属 <i>Myrothecium</i>
ZMR35	根	<i>Periconia macrospinoso</i> . strain ZMXR37 (MT446142.1)	99.81	黑团孢属 <i>Periconia</i>
ZMR36	根	<i>Fusarium solani</i> . genes (MT446142.1)	99.03	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>
ZMR40	根	<i>Trichoderma</i> sp. isolate SDAS203184 (MT446142.1)	99.81	木霉属 <i>Trichoderma</i>
ZMR48	根	<i>Periconia macrospinoso</i> . isolate DEPMDA-7 (KU901558.1)	96.63	黑团孢属 <i>Periconia</i>
ZMS4	茎	<i>Fusarium falciforme</i> . isolate ITCC-6846 (KU901558.1)	100.00	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>
ZMS16	茎	<i>Clonostachys rosea</i> . strain S3 (MK361146.1)	99.81	粘帚霉属 <i>Clonostachys</i>
ZMS17	茎	<i>Fusarium solani</i> . isolate 25# (MH730448.1)	99.81	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>
ZMS26	茎	<i>Fusarium oxysporum</i> . isolate Fo1 (MN995067.1)	100.00	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>
ZMS36	茎	<i>Clonostachys rosea</i> . isolate R2-5 (KT876553.1)	100.00	粘帚霉属 <i>Clonostachys</i>
ZMS37	茎	<i>Trichoderma</i> sp. isolate SDAS203184 (MK870442.1)	100.00	木霉属 <i>Trichoderma</i>
ZML2	叶	<i>Colletotrichum spaethianum</i> . strain CSSX3 (GQ485584.1)	100.00	炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>
ZML8	叶	<i>Cercospora beticola</i> . strain 3-31 (MW581361.1)	99.80	尾孢菌属 <i>Cercospora</i>
ZML12	叶	<i>Collariella bostrychodes</i> . isolate MN4 (MH931826.1)	100.00	毛壳菌属 <i>Collariella</i>
ZML16	叶	<i>Latorua caligans voucher</i> . UFMGCB9618 (KX788212.1)	99.54	<i>Latorua</i>
ZML17	叶	<i>Mucor circinelloides</i> . strain CMRC558 (MT603942.1)	100.00	毛霉菌属 <i>Mucor</i>
ZML28	叶	<i>Cladosporium</i> sp. strain J3 (MT729888.1)	100.00	枝孢菌属 <i>Cladosporium</i>
ZML29	叶	<i>Arthopyrenia</i> sp. strain CKG57 (MW064166.1)	100.00	拟星衣属 <i>Arthopyrenia</i>
ZML30	叶	<i>Alternaria tenuissima</i> . isolate VGAT14-1 (MF688911.1)	100.00	链格孢属 <i>Alternaria</i>
ZML31	叶	<i>Albifimbria verrucaria</i> . strain M144 (MK497782.1)	100.00	漆斑菌属 <i>Albifimbria</i>
ZML33	叶	<i>Aspergillus niger</i> . strain FCBP416 (KF496078.1)	99.65	曲霉属 <i>Aspergillus</i>
ZML36	叶	<i>Curvularia geniculata</i> . strain FB (KX022495.1)	99.81	弯孢属 <i>Curvularia</i>
ZML41	叶	<i>Setophoma terrestris</i> . isolate TVD (KF494169.1)	100.00	刚毛藻属 <i>Setophoma</i>
ZML42	叶	<i>Stemphylium</i> sp. 112 (KU195824.1)	100.00	匍柄霉属 <i>Stemphylium</i>
ZML44	叶	<i>Phoma</i> sp. FL-2018c (MT796105.1)	100.00	茎点霉属 <i>Phoma</i>

用植物知母中的内生真菌资源丰富。知母内生真菌总的定殖率和分离率分别为73.56%和97.33%，总的多样性指数为1.33，与孙剑秋<sup>[27]</sup>报道的我国北方地区15科18种常见药用植物内生真菌的多样性结果相似。与Park等<sup>[28]</sup>的研究结果类似的是，知母根部内生真菌的分离率和定殖率最高。植物根部长期与土壤接触，土壤中的微生物非常丰富且容易通过根部开口侵染植物，这可能是根部内

生真菌定殖率和分离率高的原因，而叶子的生命期较短可能是其定殖率和分离率低的原因<sup>[29]</sup>。内生真菌在知母不同部位的类群结构与分布也具有一定的专一性和差异性：知母根部、茎部和叶部的优势类群均是镰刀菌属，这与同为百合科药用植物的贝母*Fritillaria thnbergi*、黄精*Polygonatum sibiricum*、剑叶龙血树*Dracaena cochinchinensis*的研究结果一致<sup>[30-32]</sup>。有19个属的内生真菌只定殖

表 5 知母内生真菌发酵液对 5 种浅表感染真菌的抑制活性( $\bar{x}\pm s, n=3$ )<sup>1)</sup>  
 Table 5 Inhibitory activity of endophytic fungi fermentation broth from *A. asphodeloides*  
 against five superficial pathogenic fungi( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

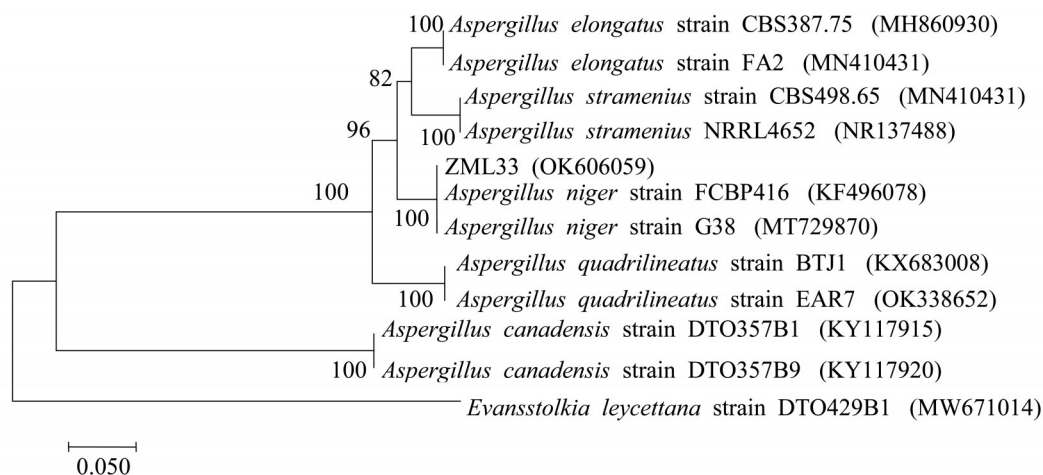
菌株	抑制率 / %			抑菌活性	
	犬小孢子菌	红色毛癣菌	黏膜毛孢子菌	白色念珠菌	糠秕马拉色菌
<i>Leptosphaeria</i> sp. ZMR8	8.88±0.04	7.19±0.03	10.14±0.03	—	—
<i>Setophoma</i> sp. ZMR9	14.53±0.04	38.06±0.03	11.21±0.03	—	—
<i>Setophoma</i> sp. ZMR10	23.40±0.01	11.49±0.02	29.10±0.03	—	—
<i>Setophoma</i> sp. ZMR12	-1.69±0.03	9.70±0.07	5.14±0.01	—	—
<i>Dictyocheirosora</i> sp. ZMR13	7.17±0.03	10.97±0.01	12.54±0.04	—	—
<i>Myrothecium</i> sp. ZMR25	11.16±0.02	15.23±0.04	17.08±0.04	—	—
<i>Periconia</i> sp. ZMR35	55.12±0.05	57.49±0.01	49.52±0.02	—	+++
<i>Fusarium</i> sp. ZMR36	15.49±0.03	39.96±0.02	9.30±0.01	—	—
<i>Trichoderma</i> sp. ZMR40	15.49±0.03	19.61±0.03	60.29±0.04	—	—
<i>Periconia</i> sp. ZMR48	7.17±0.01	20.56±0.03	6.61±0.06	—	—
<i>Fusarium</i> sp. ZMS4	2.30±0.06	1.34±0.04	11.46±0.02	—	—
<i>Clonostachys</i> sp. ZMS16	5.31±0.02	9.67±0.10	12.07±0.02	—	—
<i>Fusarium</i> sp. ZMS17	5.24±0.05	5.44±0.05	7.69±0.00	—	—
<i>Fusarium</i> sp. ZMS26	1.73±0.02	3.94±0.06	15.01±0.01	—	—
<i>Clonostachys</i> sp. ZMS36	39.79±0.14	23.01±0.03	62.32±0.03	—	—
<i>Trichoderma</i> sp. ZMS37	28.37±0.07	18.70±0.01	60.58±0.04	—	—
<i>Colletotrichum</i> sp. ZML2	7.23±0.03	6.06±0.44	11.44±0.03	—	—
<i>Cercospora</i> sp. ZML8	4.48±0.02	3.83±0.44	8.36±0.02	—	—
<i>Collariella</i> sp. ZML12	5.03±0.03	5.09±0.02	2.84±0.04	—	—
<i>Latorua</i> sp. ZML16	6.45±0.01	17.36±0.02	9.93±0.04	—	—
<i>Mucor</i> sp. ZML17	1.41±0.02	1.17±0.04	1.00±0.05	—	—
<i>Cladosporium</i> sp. ZML28	12.31±0.03	21.73±0.07	36.58±0.04	—	—
<i>Arthopyrenia</i> sp. ZML29	3.14±0.02	12.85±0.04	8.09±0.03	—	—
<i>Alternaria</i> sp. ZML30	12.44±0.03	8.05±0.03	25.70±0.04	—	—
<i>Albifimbria</i> sp. ZML31	9.19±0.02	9.57±0.05	17.66±0.03	+++	—
<i>Aspergillus</i> sp. ZML33	89.65±0.00	72.32±0.03	74.61±0.02	—	—
<i>Curvularia</i> sp. ZML36	11.20±0.03	6.71±0.03	11.71±0.03	—	—
<i>Setophoma</i> sp. ZML41	4.73±0.03	28.08±0.05	1.09±0.03	—	—
<i>Stemphylium</i> sp. ZML42	7.08±0.03	3.86±0.03	7.12±0.02	—	—
<i>Phoma</i> sp. ZML44	1.73±0.02	5.51±0.03	15.19±0.02	—	—

1) “—”: 无抑菌活性; “+++”: 抑菌圈直径  $d \geq 1.5$  cm。

于根、茎、叶的其中一个部位, 帚枝霉属 *Sarocladium*、棘壳孢属、小球腔霉属 *Leptosphaeria*、黑团孢属 *Periconia* 和 *Dictyocheirosora* 仅分布在根部, 粘帚霉属只分布在茎部, 链格孢属、炭疽菌属 *Colletotrichum*、尾孢菌属 *Cercospora*、枝孢菌属 *Cladosporium* 和拟星衣属 *Arthopyrenia* 等则只在叶

中分离到。这一结果可能是由于知母不同部位的组织结构及营养条件不同所导致<sup>[33]</sup>。

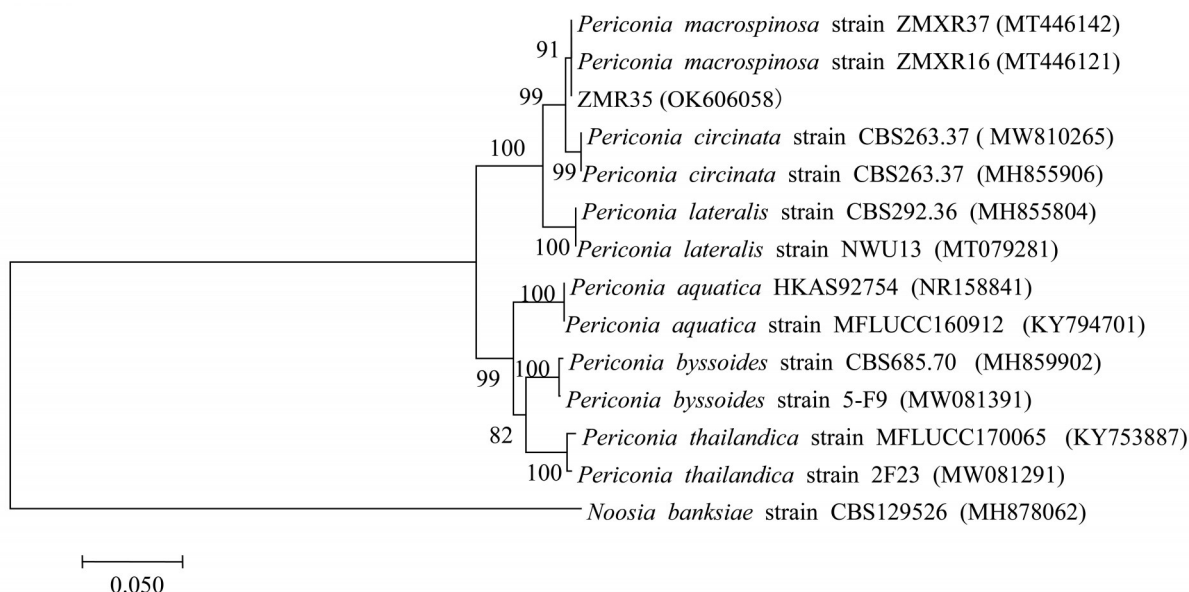
SFIs 在全球的发病率和复发率均较高, 而现有的药物存在抑菌能力较差、起效慢、容易耐药、治疗效果不稳定、易复发等问题, 总体治疗效果不理想<sup>[6]</sup>, 因此寻找新的活性物质和药物显得十



采用Neighbor-Joining法基于内生真菌的ITS rDNA序列构建; *Evansstolkia leycettana* strain DTO429B1 (MW671014)为外类群; 发育树上的数字为1 000次重复后的自展值, 标尺长度表示遗传距离。

图1 基于ITS rDNA序列构建的内生真菌菌株ZML33系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the ITS rDNA gene sequence of endophytic fungus strain ZML33



采用Neighbor-Joining法基于内生真菌的ITS rDNA序列构建; *Noosia banksiae* strain CBS129526 (MH878062)为外类群; 发育树上的数字为1 000次重复后的自展值, 标尺长度表示遗传距离。

图2 基于ITS rDNA序列构建的内生真菌菌株ZMR35系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the ITS rDNA gene sequence of endophytic fungus strain ZMR35

分必要<sup>[7]</sup>。药用植物内生真菌由于长期生活在植物内部, 与宿主植物存在“协同进化”的过程, 它们可能产生与宿主植物相同或相似的生物活性物质<sup>[14-16]</sup>, 另外也可能合成植物本身没有的新型次生代谢产物<sup>[17]</sup>, 因而药用植物内生真菌已成为新药开发的一个重要资源库<sup>[18]</sup>。有研究表明知母对毛癣菌属、念珠菌属等皮肤真菌有较强的抑制作用, 但关于知母内生真菌抗浅表感染真菌的活性研究未见报道。本研究对30株代表性知母内生

真菌发酵液的抑菌实验结果表明: 对犬小孢子菌、红色毛癣菌、黏膜毛孢子菌、糠秕马拉色菌和白色念珠菌具有抑制活性的菌株分别占总数的96.67%、100.00%、100.00%、3.33%和3.33%, 其中菌株*P. macrospinoso* ZMR35对除白色念珠菌外的4种皮肤真菌均有较强的抑制作用, 菌株*A. niger* ZML33则对犬小孢子菌、红色毛癣菌、黏膜毛孢子菌这3种皮肤真菌的抑制率高于70%。Bajpai等<sup>[34]</sup>和Shin等<sup>[35]</sup>的研究也证明了*Aspergillus*

和 *Periconia* 对白色念珠菌、须癣毛癣菌、红色毛癣菌等人类病原真菌具有强效活性。知母内生真菌代谢产物对毛癣菌属、小孢子菌属、念珠菌属具有抑制活性,这与知母植物提取物的研究结果相似<sup>[10-13]</sup>。内生真菌 *P. macrospinoso* ZMR35 对糠

秕马拉色菌具有良好的抑菌活性,而在知母提取物中却未见相关报道。以上研究表明,知母内生真菌为开发新的抗 SFIs 治疗药物提供了重要的资源库。

#### 参考文献:

- [1] HAVLICKOVA B, CZAIKA V A, FRIEDRICH M, et al. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide [J]. *Mycoses*, 2008, 51: 2-15.
- [2] KAUSHIK N, PUJALTE G G, REESE S T, et al. Superficial fungal infections [J]. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 2015, 42(4): 501-516.
- [3] RAI M. *Medical mycology: Current trends and future prospects* [M]. Boca Raton: Crc Press, 2015.
- [4] YAMADA T, MAEDA M, ALSHAHNI M M, et al. *Terbinafine* resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(7): 15-17.
- [5] GOLABEK K, STRZELCZYK J, OWCZAREK A, et al. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2015, 62(2): 247-251.
- [6] 冯美茹, 施文广, 李佳琪, 等. 白花曼陀罗内生真菌多样性及抗皮肤真菌活性分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(11): 187-194.
- [7] MARTINEZ R, NILCE M, BITENCOURT T A, et al. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: Mechanisms and prospectus [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9(2): 1108-1125.
- [8] LEE H A, CASTRO A V, ABBAI R, et al. Rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* as mediators of the eco-friendly synthesis of silver and gold spherical, face-centred cubic nanocrystals and its anti-migratory and cytotoxic potential in normal and cancer cell lines [J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2018, 46(2): 285-294.
- [9] 时凯旋, 马春英. 不同栽培模式下知母种子质量及良种选育研究 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(4): 967-970.
- [10] 吴润标, 李前勇, 李奥, 等. 山羊疣状毛癣菌鉴定与敏感天然药物的体外筛选试验 [J]. *吉林农业大学学报*, 2018, 40(3): 358-363.
- [11] LIDA Y, OH K B, SAITO M, et al. Detection of antifungal activity in *Anemarrhena asphodeloides* by sensitive BCT method and isolation of its active compound [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(2): 584-587.
- [12] 巨艳红, 甄清, 李勇, 等. 知母提取物抗真菌作用实验研究 [J]. *特产研究*, 2009, 31(3): 23-24+27.
- [13] 张晟安, 陶春晓, 路璐, 等. 生物酶解技术对中药知母抗真菌作用的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2019, 33(5): 67-72.
- [14] 方荣锋, 李浩浩, 张培及, 等. 产紫杉醇内生真菌 TMS-26 的分离和鉴定 [J]. *生物工程学报*, 2017, 33(12): 1945-1954.
- [15] SINGH A, SINGH D K, KHARWAR R N, et al. Fungal endophytes as efficient sources of plant-derived bioactive compounds and their prospective applications in natural product drug discovery: Insights, avenues, and challenges [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 197-243.
- [16] MISHRA S, SAHU P K, AGARWAL V, et al. Exploiting endophytic microbes as micro-factories for plant secondary metabolite production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(18): 6579-6596.
- [17] NICOLETTI R, FIORENTINO A. Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of spermatophyta [J]. *Agriculture*, 2015, 5(4): 918-970.
- [18] KUMAR A, RADHAKRISHNAN E K. *Microbial endophytes: Functional biology and applications* [M]. UK: Woodhead Publishing, 2020.
- [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]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(3): 2346-2357.
- [20] YU J, WU Y, HE Z, et al. Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Camellia oleifera* [J]. *Mycobiology*, 2018, 46(2): 85-91.
- [21] BARNETT H L, HUNTER B B. *Illustrated genera of*

- imperfect fungi [M]. 4th ed. American: The American Phytopathological Society Press, 1998.
- [22] 刘军, 刘艳明, 徐在超, 等. 檀香内生真菌多样性及其抗菌与促生特性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17): 3477-3483.
- [23] 谢华蓉, 徐在超, 刘军, 等. 广藿香内生真菌多样性及其对青枯菌的拮抗活性 [J]. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1171-1181.
- [24] RÓNAVÁRI A, IGAZ N, GOPISSETTY M K, et al. Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimicrobials against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes [J]. International Journal of Nanomedicine, 2018, 13: 695.
- [25] 张政. 北极副球菌(*Paracoccus* sp. Arc7-R13)发酵液介导合成纳米颗粒及其特性研究 [D]. 青岛: 自然资源部第一海洋研究所, 2019.
- [26] SADEGHI F, SAMSAMPOUR D, SEYAHOOEI M A, et al. Diversity and Spatiotemporal distribution of fungal endophytes associated with *Citrus reticulata* cv. *siyahoo* [J]. Current Microbiology, 2019, 76(3): 279-289.
- [27] 孙剑秋. 我国北方常见药用植物内生真菌多样性与生态分布 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [28] PARK Y H, KIM Y, MISHRA R C, et al. Fungal endophytes inhabiting mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng* Meyer.): Diversity and biocontrol activity against ginseng pathogens [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-10.
- [29] LIU Y H, WEI Y Y, MOHAMAD O A A, et al. Diversity, community distribution and growth promotion activities of endophytes associated with halophyte *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. 3 Biotech, 2019, 9(4): 1-12.
- [30] 潘峰, 苏雪梅, 杨楠, 等. 一株川贝母内生真菌的分离鉴定及其产贝母类生物碱分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(7): 1149-1154.
- [31] 邓克莉. 川贝母内生真菌介导纳米银的生物合成及其活性分析 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.
- [32] 樊锐锋, 王若凡, 杜艳秋, 等. 黄精根际及药用部位内生真菌群落组成和生态功能分析 [J]. 广西植物, 2021, 41(5): 799-807.
- [33] ARORA P, WANI Z A, AHMAD T, et al. Community structure, spatial distribution, diversity and functional characterization of culturable endophytic fungi associated with *Glycyrrhiza glabra* L. [J]. Fungal Biology, 2019, 12(5): 373-383.
- [34] BAJPAI V K, KANG S C. The antidermatophytic potential of the marine isolate of *Aspergillus* sp. collected from south coast of Korea [J]. Korean Journal of Environmental Agriculture, 2008, 27(1): 80-85.
- [35] SHIN D S, OH M N, YANG H C et al. Biological characterization of periconicins, bioactive secondary metabolites, produced by *Periconia* sp. OBW-15 [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 15(1): 216-220.

(责任编辑 张冰)