

DOI:10.14188/j.ajsh.20260109001

南海岛礁抗风桐内生真菌的分离鉴定与药理活性筛选

靳永柯¹, 吕银萍¹, 丛明², 吕家森^{1*}

(1. 烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264000;

2. 烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264000)

摘要: 抗风桐是一种喜高温、高湿,耐盐碱,常见于海岸林地区的传统药用植物,其所具备的药理活性与内生真菌有极为密切的联系。该研究于2024年秋季从海南省三沙市永兴岛采集抗风桐树干,以PDA、MEA及Martin作为基础培养基,对内生真菌进行分离培养,共获得125株可培养内生真菌,经ITS序列分析鉴定,确定其隶属于2门6纲14目28属44种。利用滤纸片琼脂扩散法、DPPH法、ABTS法和MTT法分别对内生真菌进行抗菌、抗氧化和抗肿瘤的活性筛选,得到可以抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌生长的菌株P46,具有较强抗氧化活性的菌株M4和具备较强抗肿瘤细胞活性的菌株D60。该研究初步探究了秋季永兴岛抗风桐树皮内可培养内生真菌的多样性及药理活性,可为抗风桐真菌资源的开发利用提供理论基础。

关键词: 抗风桐;内生真菌;菌种鉴定;药理活性

中图分类号: Q939.5

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2026)02-0116-09

Isolation, identification and pharmacological activity screening of endophytic fungi from *Hernandia nymphaeifolia* in the south China sea islands and reefs

JIN Yongke¹, LÜ Yinping¹, CONG Ming², LÜ Jiasen^{1*}

(1. School of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264000, Shandong, China;

2. School of Ocean, Yantai University, Yantai 264000, Shandong, China)

Abstract: *Hernandia nymphaeifolia* is a traditional medicinal plant that thrives in high temperatures and humidity, tolerates saline-alkali conditions, and is commonly found in coastal forests. Its pharmacological activity is closely linked to its endophytic fungi. In this study, the stems of *H. nymphaeifolia* were collected from Yongxing Island, Sansha City, Hainan Province in the autumn of 2024. Endophytic fungi were isolated and cultured using PDA, MEA, and Martin as basal culture media, yielding a total of 125 culturable endophytic fungal strains. The identification of these strains was facilitated by means of ITS sequence analysis, which revealed their affiliation to 44 species, 28 genera, 14 orders, 6 classes and 2 phyla. Antimicrobial, antioxidant, and antitumor activities were screened using the filter paper disc diffusion method, DPPH assay, ABTS assay, and MTT assay, respectively. These screenings resulted in strain P46 that can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, strain M4 with strong antioxidant activity, and strain D60 with potent antitumor cell activity. This study preliminarily investigated the diversity and pharmacological activities of culturable endophytic fungi isolated from the bark of *H. nymphaeifolia* in Yongxing Island during autumn, which can provide a theoretical basis for the exploitation and utilization of fungal resources from *H. nymphaeifolia*.

Key words: *Hernandia nymphaeifolia*; endophytic fungi; strain identification; pharmacological activity

收稿日期: 2026-01-09 修回日期: 2026-03-30 接受日期: 2026-04-15

作者简介: 靳永柯(2000-),男,硕士生,研究方向为海洋生物学,E-mail:17860383317@163.com

*通信作者: 吕家森(1976-),男,博士,副教授,研究方向为海洋生物学,E-mail:lvjiasencong@aliyun.com

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2023MD059)

引用格式: 靳永柯, 吕银萍, 丛明, 等. 南海岛礁抗风桐内生真菌的分离鉴定与药理活性筛选[J]. 生物资源, 2026, 48(2): 116-124.

Jin Y K, Lü Y P, Cong M, et al. Isolation, Identification and Bioactivity Screening of Endophytic Fungi from *Hernandia nymphaeifolia* in the South China Sea Islands and Reefs [J]. Biotic Resources, 2026, 48(2): 116-124.

0 引言

抗风桐(*Hernandia nymphaeifolia*)是莲叶桐科(Hernandiaceae)莲叶桐属(*Hernandia*)的常绿乔木或灌木,主要分布于热带及亚热带沿海地区。该植物具有很好的生态适应性,常见于海岸林、红树林边缘及沙滩地带,其发达的根系和耐盐碱特性使其成为优良的海岸防风固沙树种。在传统应用方面,抗风桐的树皮和树干组织可以被用作外敷消炎的草药,但抗风桐代谢产物的研究尚不充分。在相关研究显示,莲叶桐属叶片的乙醇提取物含少量新生物碱,具有显著抗氧化与血管舒张活性,这也印证了抗风桐等莲叶桐属植物的研究价值。海南省三沙市永兴岛位于中国南海,属于七连屿的一部分,因其特殊的地理位置,受人类活动的影响较小。因此,对海岛微生物特别是抗风桐这类岛礁植物的研究更少。

内生真菌作为一种特殊生物环境中的微生物,在长期的进化过程中,可能具备与其宿主植物相似或特有的代谢途径^[1],在生长过程中可以产生多种次级代谢产物^[2],这些化合物在化学结构上与宿主植物组织存在相似性,并表现出相近的生物活性^[3-4]。研究表明,此类次级代谢产物具有广泛的药理作用,包括抑制病原微生物生长、清除自由基以及抗肿瘤活性等^[5-9]。这些特性使其在生物医药和农业生产等领域展现出重要的应用潜力,成为一种值得深入开发的微生物资源。因抗风桐长期生长在高盐、高温、干旱等特殊生境,这也代表其或许会产生特殊的代谢通路,在此基础上对植物的内生真菌进行开发利用,在有效避免病原微生物出现的同时,更大希望出现新的具备更强抗菌、抗氧化以及抗肿瘤细胞的化合物。有学者研究了草珊瑚(*Sarcandra glabra*)内生真菌次级代谢产物的抗菌活性,共筛选了5株内生真菌的次级代谢产物,其中4株草珊瑚内生真菌的次级代谢产物对植物病原真菌表现出比较好的抗菌活性,可高效地破坏生物细胞膜的抑菌活性^[10]。以发酵粗提液对2,2-二苯基-1-苯基肼基(DPPH)、3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)清除率为检测指标,从供试的5株瓦布贝母(*Fritillaria unibracteata*)内生真菌中筛选出高抗氧化菌株2株^[11],并通过共培养的方式进一步丰富了制备天然抗氧化剂的研究和理论基础。从紫苏(*Perilla frutescens*)中分离得到的20株内生真菌进行发酵培养并制备提取物,获得3株具有较强抗肿瘤细胞的活性菌株^[12],丰富了内生真菌的活性天然产物库,并为药物开发提供理论参考。

本研究以秋季采集的抗风桐树皮为样品,从中

分离、筛选并鉴定可培养内生真菌,并对其抗菌、抗氧化、抗肿瘤细胞等多种生理活性进行测定,为抗风桐内生真菌资源的开发及应用提供研究方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用菌株均为海南省三沙市长兴岛(北纬16°50',东经112°20')抗风桐树皮(采集时间:2024年10月)中筛选出的内生真菌。采用3种基础培养基进行内生真菌筛选工作,其配方如下:PDA培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂粉18 g,去离子水定容到1 000 mL,pH 5.6~6.0;Martin培养基:葡萄糖10 g,蛋白胨5 g,KH₂PO₄ 1 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,琼脂粉18 g,去离子水定容到1 000 mL,pH 5.6~6.0;MEA培养基:麦芽汁30 g,蛋白胨5 g,琼脂粉18 g,去离子水定容到1 000 mL,pH 5.4~5.8;抗生素采用100 µg/mL链霉素过滤除菌。

主要实验仪器包括SW-CJ-2F超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)、ZQLY-300F振荡培养箱(上海知楚仪器)、YXQ-LS-75立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、PL303电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)、UV-1200紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)、L420-A台式离心机(上海高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司)、水浴锅(郑州长城科工贸有限公司)等。

1.2 内生真菌的分离、筛选与鉴定

1.2.1 分离纯化

首先,刮下抗风桐树皮的韧皮部和木质部,用自来水反复冲洗干净,再用75%乙醇浸泡5 min,无菌水冲洗3次,4%次氯酸钠浸泡1 min,无菌水冲洗3次后,无菌条件下用无菌滤纸吸干表面水分;然后,将树皮切割成约0.5 cm×0.5 cm的小块,斜插于已加入适当链霉素(100 µg/mL)的PDA、MEA和Martin培养基平皿上,每个平板接种3个样品;最后,一次冲洗的无菌水在空白培养基上涂布作为CK(无任何菌落长出,则证明表面消毒彻底^[13])置于28℃培养3~8 d,每组设置3个对照。待植物组织边缘有菌丝长出后,挑取尖端菌丝移到新的固体平板上继续培养,不断转接分离后,得到纯化的内生真菌^[14]。根据菌落的形态、质地、颜色、湿度等指标,将分离纯化后的真菌进行编号,采用菌丝尖端接触法接种于冻存管,在冰箱4℃保藏备用。

1.2.2 菌株形态学观察

将分离得到的125株菌株菌丝在无菌环境下挑

取到平板培养,培养72 h后观察其菌落大小、质地、边缘以及颜色等指标。

1.2.3 分子生物学鉴定

通过ITS测序的方法对菌株进行分子生物学鉴定。PCR扩增采用通用引物ITS1(5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCC-GCTTATTGATATGC-3'),反应体系为Taq DNA Polymerase、dNTPs、 Mg^{2+} 、反应缓冲液和稳定剂共10 μ L,引物F(10 μ mol/L) 0.4 μ L,引物R(10 μ mol/L) 0.4 μ L, Template (DNA) 1 μ L, ddH₂O 9.20 μ L。PCR循环条件为96 $^{\circ}$ C预变性2 min、96 $^{\circ}$ C变性30 s、60 $^{\circ}$ C退火30 s、72 $^{\circ}$ C延伸60 s (30 cycle)、72 $^{\circ}$ C, 7 min终止反应。所得的PCR产物用1%琼脂糖电泳进行检测,扩增后的产物送睿博兴科(青岛)有限公司进行测序。在NCBI数据库中分析测序获得的ITS rDNA序列,并用MEGA 11软件Neighbor-Joining算法构建系统发育树。

1.3 菌株的活性筛选

1.3.1 发酵提取物制备

将上述分离得到的内生真菌平板用无菌水冲下孢子制成孢子悬浮液($10^5 \sim 10^7$ spores/mL),取100 μ L接种于PDA、MEA、Martin液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、150 r/min培养6d,真空抽滤获得菌丝体。

菌丝用等量无水乙醇浸泡24 h,8 000 r/min离心20 min后,取上清,真空旋蒸将乙醇浓缩至1 mL,4 $^{\circ}$ C保藏备用。无菌发酵液用等量乙酸乙酯萃取3次后,合并萃取液,在45 $^{\circ}$ C条件下旋蒸除去乙酸乙酯,加入40 mL甲醇复溶,40 $^{\circ}$ C条件下旋蒸浓缩至1 mL,4 $^{\circ}$ C保藏备用。

无菌发酵液提取物和菌丝提取物分别将有机溶剂在真空条件下旋转蒸发后,以适量二甲基亚砜(DMSO)溶解并梯度稀释后,作为琼脂块法、DPPH法、ABTS法及MTT法的样品(DMSO终浓度保持0.1%以内)。

1.3.2 抗菌活性的筛选

以大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为指示菌,用滤纸片琼脂扩散法^[15]对无菌发酵液提取物和菌丝提取物进行抑菌实验,取100 μ L指示菌在LB培养基涂布后,标号,加滤纸片,并用DMSO做空白对照,每组做3个平行,37 $^{\circ}$ C培养12 h后,测量透明圈直径。

1.3.3 抗氧化活性的筛选

DPPH自由基消除:用无水乙醇配制0.04 mg/mL DPPH溶液,现配现用。吸取供试溶液70 μ L+200 μ L DPPH溶液于96孔酶标板,27 $^{\circ}$ C

孵育10 min,重复3次;在517 nm处用酶标仪测定吸光度值,记作A;以无水乙醇70 μ L+200 μ L DPPH溶液的吸光度值做对照,记作A₀;空白为待测供试液70 μ L+无水乙醇200 μ L的吸光度值,记作B;得出供试液对DPPH自由基的清除率公式为:

$$\text{DPPH清除率} = 1 - (A - B) / A_0 \quad (1)$$

ABTS自由基清除:参照潘峰等^[11]的方法,配制ABTS工作液。称取0.384 g ABTS,用蒸馏水配制成7 mmol/L溶液;称取0.331 g过硫酸钾,用蒸馏水配制成2.45 mmol/L溶液,两者混合,需在室温、遮光条件下放置12~16 h,得到稳定的ABTS母液,在734 nm下,用无水乙醇将母液吸光度调整为0.700 $\pm$ 0.02,获得ABTS工作液,在30 $^{\circ}$ C下预热备用。

抗氧化活性的测定:参照邹坤林等^[16]的方法,吸取15 μ L供试液、180 μ L ABTS工作液于96孔酶标板,37 $^{\circ}$ C下孵育30 min。蒸馏水调零后,在734 nm处用酶标仪测定其吸光度。空白处理为供试液溶剂代替供试液加入ABTS工作液,每个组合3次重复,求平均值。ABTS清除率公式为:

$$\text{ABTS清除率} = (1 - A_{\text{组合}} / A_0) \quad (2)$$

式中, $A_{\text{组合}}$ 表示加入供试液后的吸光度; A_0 表示空白处理的吸光度。

1.3.4 抗肿瘤细胞活性的筛选

细胞培养:选取生长状况良好的人肝癌HepG2肿瘤细胞,当细胞生长至占培养皿底约80%时,胰酶消化传代,置于含100 U/mL青霉素与链霉素和10%FBS的细胞培养基中,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件的细胞孵箱中避光培养。

使用MTT法^[17]进行抗肿瘤活性的筛选,将适量DMSO溶解的样品用细胞培养基配制成不同梯度浓度的初始溶液,确保DMSO的最终浓度<0.1%。实验中细胞分为3组,包括实验组(菌株代谢产物样品给药浓度:12.5、25、50、100、200 μ g/mL)、阴性对照组(仅含0.1%DMSO的完全培养基)、空白组(无细胞的培养基),37 $^{\circ}$ C继续培养24 h。培养结束后,每孔加入20 μ L MTT溶液(终浓度1 mg/mL),轻轻混匀后继续培养4 h。轻轻吸弃上清,每孔加入150 μ L DMSO,低速振荡10 min至紫色结晶完全溶解,酶标仪测定OD₄₉₀值。细胞存活率M的公式为:

$$M = (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{阴性对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \quad (3)$$

2 结果与讨论

2.1 抗风桐内生真菌的分离

本实验通过颜色、质地、大小及形状等特征,从

海南省三沙市永兴岛抗风桐树干中筛选得到125株内生真菌(韧皮部123株、木质部2株),分别将其命名为D1至D61、M1至M40、P1至P54(间隔命名,非依次命名)。

将获得的菌株接种于相对应的PDA、MEA及Martin固体培养基中,28℃培养72 h后对125株菌进行形态观察(图1)。

2.2 菌株的分子生物学鉴定

对测序获得的ITS rDNA进行BLAST序列比对,发现从抗风桐树皮共分离培养得到的125株菌分属于44个内生真菌单体型。在门分类水平上,抗风桐树皮的真菌群落为子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota),以子囊菌门真菌为绝对优势真菌群落,分离比例占总门类的96.84%。在目分类水平上,抗风桐树干组织的优势真菌群为间座壳菌目(Diaporthales)、葡萄座腔菌目(Botryosphaeriales)和炭角菌目(Xylariales),分离比例分别占总目类的29.60%、10.40%和10.40%。在属分类水平上,分离比例较高的优势属为间作壳菌属(*Diaporthe*)、毛色二孢属(*Lasiodiplodia*)和炭角菌属(*Xylaria*),分离比例分别占总属类的29.60%、10.40%和10.40%,其余分离比例较高的优势属包括曲霉属(*Aspergillus*)、枝孢菌属(*Cladosporium*)、炭疽菌属(*Colletotrichum*)和炭团菌属(*Hypoxyton*)。在种水平上,分离比例较高的优势种为长孢间座壳(*Diaporthe longiconidialis*),分离比例为12.80%,如表1(属)和表2(种)所示。

将所测得的序列与GenBank数据库中核酸序列进行比对,并采用MEGA 11软件对菌株进行系统

发育树构建,得到系统发育树(图2),揭示抗风桐可培养内生真菌之间的进化关系和遗传差异,明确核心优势菌群的进化分支,理清内生真菌遗传差异与宿主生长环境、组织部位的相关性,以期为抗风桐-内生真菌共生体系的协同进化研究提供新的视角与数据支撑。

2.3 菌株的生物活性

2.3.1 菌株的抗菌活性

对获得的44株内生真菌产生的活性物质进行粗提取,共获得乙酸乙酯粗提取物44个,乙醇粗提取物44个。采用滤纸片琼脂扩散法测定乙酸乙酯粗提取物及乙醇粗提取物的抗菌活性。结果如表3所示,有3株菌株(曲霉属 *Aspergillus* sp. P46、篮状菌属 *Talaromyces* sp. P6和曲霉属 *Aspergillus* sp. D35)的乙酸乙酯提取物对某一种或两种指示菌有抑制作用,占总供测菌株的6.8%,其中曲霉属P46可抑制两种指示菌。曲霉属D35和曲霉属P46的乙酸乙酯提取物对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径分别为9.6 mm和16.33 mm;菌株 *Talaromyces* sp. P6和曲霉属P46的乙酸乙酯提取物对大肠埃希氏杆菌的抑菌圈分别为9.1 mm和10.3 mm(图3和图4)。

2.3.2 菌株的抗氧化活性测定

植物不同内生真菌菌丝及发酵液提取物抗氧化活性分析:不同植物内生真菌提取物DPPH抗氧化能力差异显著,结果如图5(a)所示,柄胞壳菌(*Podospora* sp.)D19的菌丝提取物对DPPH自由基清除率最高,为65.28%;由图5(b)可知,菌株青霉菌(*Penicillium* sp.)P3的发酵液提取物次之,对DPPH自由基清除率为31.19%。结果显示,不同菌

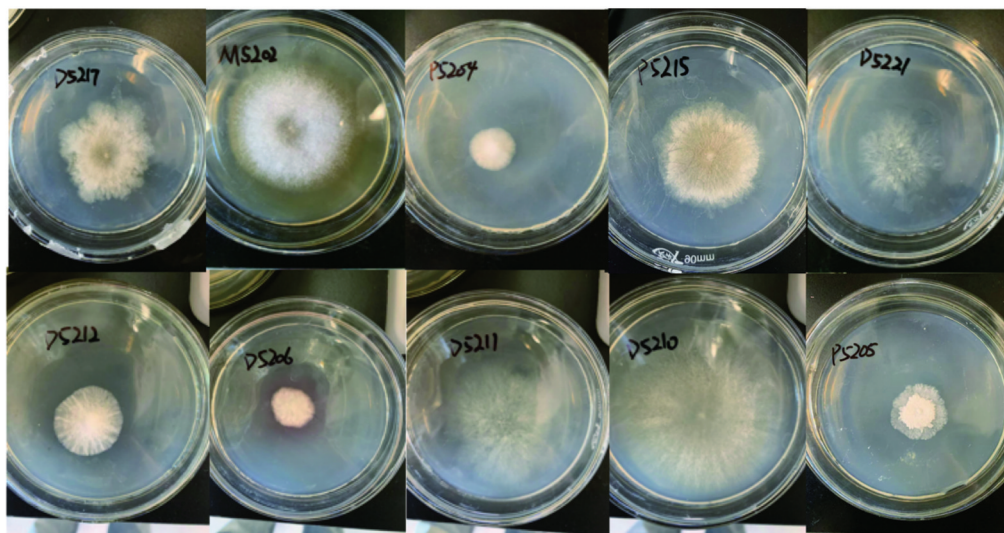


图1 部分抗风桐内生真菌形态

Figure 1 Morphological characteristics of some endophytic fungi isolated from *Hernandia nymphaeifolia*

表1 内生真菌的种类组成及分离比例(属)
Table 1 Composition and isolation ratio of endophytic fungi (genus)

分类单元/属	菌株数	分离比例/%	分类单元/属	菌株数	分离比例/%
碘囊炭角菌属(<i>Iodowynnea</i>)	1	0.80	假丝酵母属(<i>Candida</i>)	2	1.60
胶炭团菌属(<i>Camarops</i>)	1	0.80	地菇属(<i>Terfezia</i>)	1	0.80
炭疽菌属(<i>Colletotrichum</i>)	8	6.40	齿毛菌属(<i>Irpex</i>)	1	0.80
轮层炭壳菌属(<i>Daldinia</i>)	1	0.80	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	5	4.00
间座壳属(<i>Diaporthe</i>)	37	29.60	青霉属(<i>Penicillium</i>)	2	1.60
镰孢菌属(<i>Fusarium</i>)	2	1.60	篮状菌属(<i>Talaromyces</i>)	7	5.60
炭团菌属(<i>Hypoxylon</i>)	8	6.40	枝孢霉属(<i>Cladosporium</i>)	6	4.80
黑孢霉属(<i>Nigrospora</i>)	1	0.80	棒孢霉属(<i>Corynespora</i>)	1	0.80
柄孢壳属(<i>Podospora</i>)	1	0.80	双囊壳属(<i>Didymocyrtis</i>)	1	0.80
座坚壳菌属(<i>Rosellinia</i>)	1	0.80	新毛座霉属(<i>Neosetophoma</i>)	1	0.80
炭角菌属(<i>Xylaria</i>)	13	10.40	格孢菌属(<i>Pleosporales</i>)	4	3.20
结孢霉属(<i>Nodulisporium</i>)	1	0.80	普鲁西亚菌属(<i>Preussia</i>)	1	0.80
毛色二孢属(<i>Lasiodiplodia</i>)	13	10.40	皮思霉属(<i>Pithomyces</i>)	2	1.60
梅里埃酵母属(<i>Meyerozyma</i>)	2	1.60	<i>Ascomycota</i>	1	0.80

表2 内生真菌的种类组成及分离比例(种)
Table 2 Composition and isolation ratio of endophytic fungi (species)

分类单元/种	菌株数	分离比例/%	分类单元/种	菌株数	分离比例/%
可可球二孢菌(<i>Lasiodiplodia theobromae</i>)	1	0.80	刺孢曲霉(<i>Aspergillus aculeatus</i>)	1	0.80
季也蒙梅里埃酵母 (<i>Meyerozyma guilliermondii</i>)	2	1.60	雅致曲霉(<i>Aspergillus elegans</i>)	2	1.60
新毛座霉属未定种 PB-2018 (<i>Neosetophoma</i> sp. PB-2018)	2	1.60	黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	2	1.60
球黑孢霉(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	1	0.80	胶炭团菌属未定种 SR11(<i>Camarops</i> sp. SR11)	1	0.80
盾球壳属未定种 C2W502 (<i>Lophiostoma</i> sp. C2W502)	2	1.60	近平滑假丝酵母(<i>Candida parapsilosis</i>)	2	1.60
产黄青霉(<i>Penicillium chrysogenum</i>)	2	1.60	尖孢枝孢霉(<i>Cladosporium oxysporum</i>)	2	1.60
扩展青霉(<i>Penicillium expansum</i>)	2	1.60	类耐盐枝孢霉(<i>Cladosporium parahalotolerans</i>)	2	1.60
纸状假皮思霉(<i>Pseudopithomyces chartarum</i>)	2	1.60	细枝孢霉(<i>Cladosporium tenuissimum</i>)	2	1.60
穿透副盾座霉(<i>Parathyridaria percutanea</i>)	2	1.60	大孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gigasporum</i>)	2	1.60
柄孢壳属未定种 7GJ-4(<i>Podospora</i> sp. 7GJ-4)	1	0.80	胶孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	1	0.80
澳洲普鲁西亚菌(<i>Preussia australis</i>)	5	4.00	暹罗炭疽菌(<i>Colletotrichum siamense</i>)	5	4.00
圣克鲁斯座坚壳菌 (<i>Rosellinia sanctae-cruciana</i>)	1	0.80	山扁豆棒孢霉(<i>Corynespora cassicola</i>)	1	0.80
绳状篮状菌(<i>Talaromyces funiculosus</i>)	1	0.80	埃希轮层炭壳菌(<i>Daldinia eschscholtzii</i>)	1	0.80
松状篮状菌(<i>Talaromyces pinophilus</i>)	6	4.80	双孢间座壳(<i>Diaporthe biconispora</i>)	6	4.80
根状篮状菌(<i>Talaromyces radicus</i>)	16	12.80	长孢间座壳(<i>Diaporthe longiconidialis</i>)	16	12.80
克拉维地菇(<i>Terfezia clavayi</i>)	15	12.00	清爽间座壳(<i>Diaporthe tersa</i>)	15	12.00
费氏炭角菌(<i>Xylaria feejeensis</i>)	1	0.80	双囊壳属(<i>Didymocyrtis brachylaenae</i>)	1	0.80
番石榴炭角菌(<i>Xylaria psidii</i>)	2	1.60	砖红镰孢菌(<i>Fusarium incarnatum</i>)	2	1.60
炭角菌属分离株 1-1-11-2 (<i>Xylaria isolate</i> sp. 1-1-11-2)	1	0.80	红皮炭团菌(<i>Hypoxylon erythrostroma</i>)	1	0.80
美丽炭角菌(<i>Xylaria venustula</i>)	4	3.20	草莓形炭团菌(<i>Hypoxylon fragiforme</i>)	4	3.20
乳白齿毛菌(<i>Irpex lacteus</i>)	3	2.40	勒诺曼炭团菌(<i>Hypoxylon lenormandii</i>)	3	2.40
子囊菌未定种 FAE17(<i>Ascomycota</i> sp.FAE17)	1	0.80	耳状碘囊炭角菌(<i>Iodowynnea auriformis</i>)	1	0.80

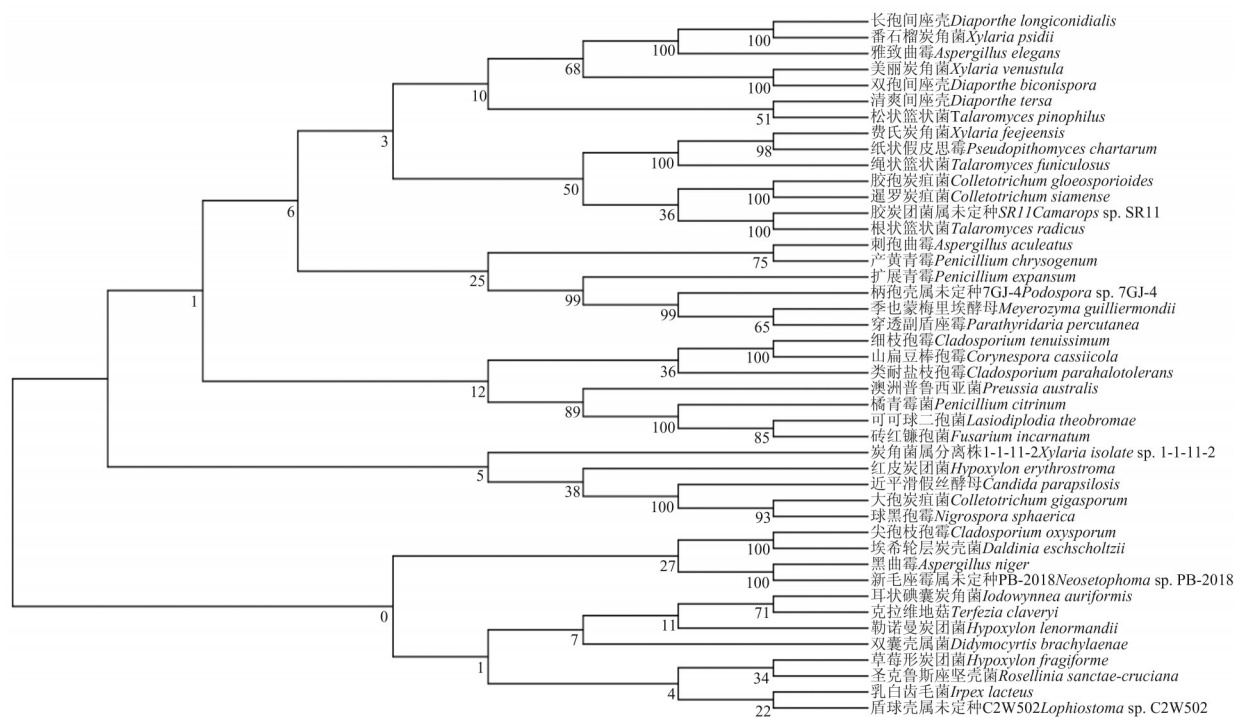


图2 不同单体型内生真菌的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of endophytic fungi from different haplotypes

表3 菌株粗提物对供试菌的抑制情况
Table 3 Inhibitory effects of crude extracts from test strains

菌株粗提物	抑菌圈直径/mm	
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
D35 菌液	9.6	—
D35 菌丝	—	—
P6 菌液	—	9.1
P6 菌丝	—	—
P46 菌液	16.33	10.3
P46 菌丝	—	—

株的不同提取物对 DPPH 自由基清除率集中在 1.64%~65.28%，大多表现出良好的抗氧化能力。

植物不同内生真菌菌丝及发酵液提取物对 ABTS 自由基清除率在 0.20%~72.24%，存在明显差异。如图 6(a) 所示，菌株多节胞属 (*Nodulisporium* sp.) M4 的菌丝提取物对 ABTS 自由基清除能力最强，清除率高达 72.24%；从图 6(b) 中可以看出，菌株 *Didymocyrtis* sp. M11 的发酵液提取物对 ABTS 自由基清除能力次之，为 70.75%。

综合 2 种不同抗氧化指标的评价结果，菌株多节胞属 M4 菌丝提取物在 DPPH 和 ABTS 自由基消除实验中均表现出较强的抗氧化性。

2.3.3 菌株的抗肿瘤活性的测定

内生真菌发酵液及菌丝提取物抗人肝癌 HepG2 肿瘤细胞活性分析：植物不同内生真菌提取

物抗人肝癌 HepG2 肿瘤细胞能力差异显著，用 MTT 比色法对稀释不同浓度 (1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4}) 的不同菌株菌丝及发酵液提取物进行抗肿瘤细胞实验，DMSO 溶解的样品稀释至 1×10^{-4} 后的细胞存活率介于 69.40%~99.59%，从图 7(a) 中可以看出，菌株枝孢菌 *Cladosporium* sp. D60 菌丝提取物的样品处理后细胞存活率最低，为 69.40%，其次是菌株炭豆菌 *Rosellinia* sp. M15 的菌丝提取物，为 70.76%。结果分析显示，菌株枝孢菌 *Cladosporium* sp. D60 的菌丝提取物和发酵液提取物均能抑制肿瘤细胞 HepG2 的生长，从而表现出良好的抗肿瘤能力。

3 结 论

本研究从抗风桐树干韧皮部和木质部中分离获得内生真菌，首先通过形态观察得到 125 株内生真菌，然后通过 ITS rDNA 序列比对将其划分为 44 株不同种属的内生真菌。分别采用滤纸片琼脂扩散法、DPPH 法、ABTS 法和 MTT 比色法，对提取物进行抗菌、抗氧化和抗肿瘤能力测定，在初始培养条件下，菌株曲霉 P46 的发酵液提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌圈结果最好，抑菌圈直径达到 16.33mm；菌株柄孢壳菌 *Podospora* sp. D19 的菌丝提取物和多节胞属 *Nodulisporium* sp. M4 的菌丝提取物分别在 DPPH 法和 ABTS 法中体现出最强的抗氧化活性，分别为 65.28%、72.24%；菌株枝孢菌 *Cladospo-*

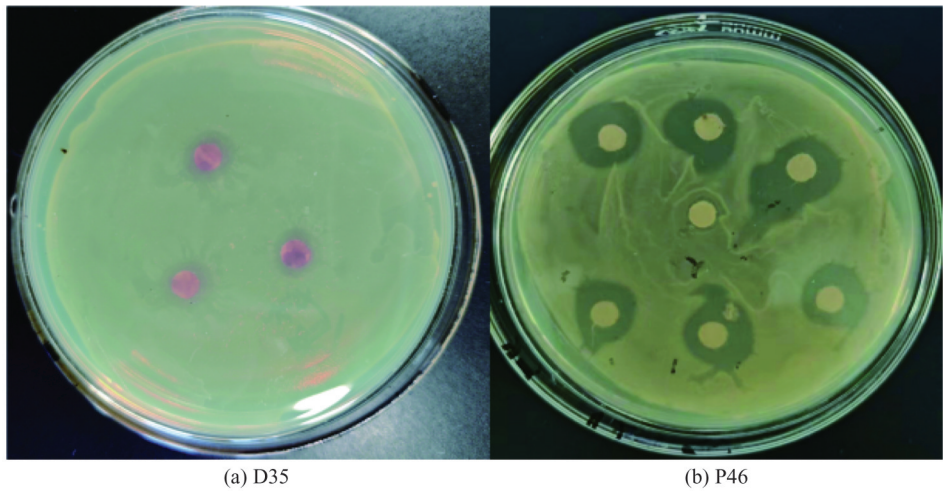


图3 D35和P46对金黄色葡萄球菌的抑菌圈

Figure 3 Antibacterial zones of strains D35 and P46 against *Staphylococcus aureus*

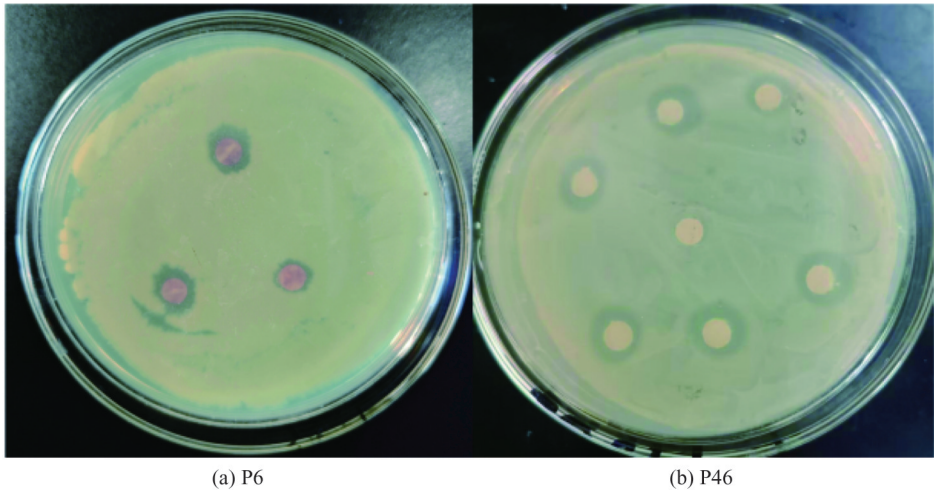


图4 P6和P46对大肠杆菌的抑菌圈

Figure 4 Antibacterial zones of strains P6 and P46 against *Escherichia coli*

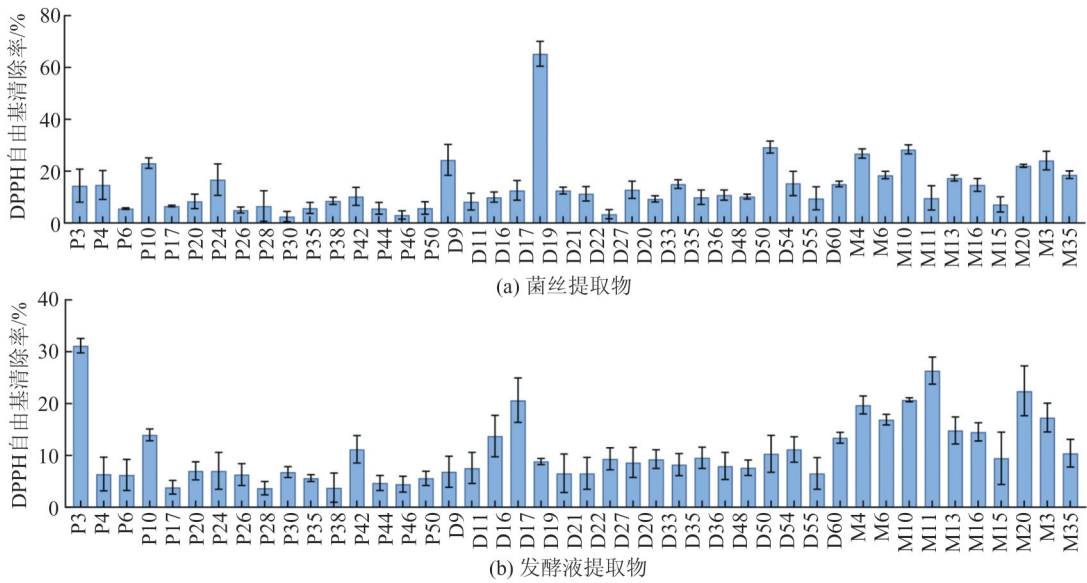


图5 内生真菌菌丝及发酵液提取物对DPPH自由基清除率

Figure 5 DPPH free radical scavenging activity of endophytic fungal mycelium and fermentation broth extracts

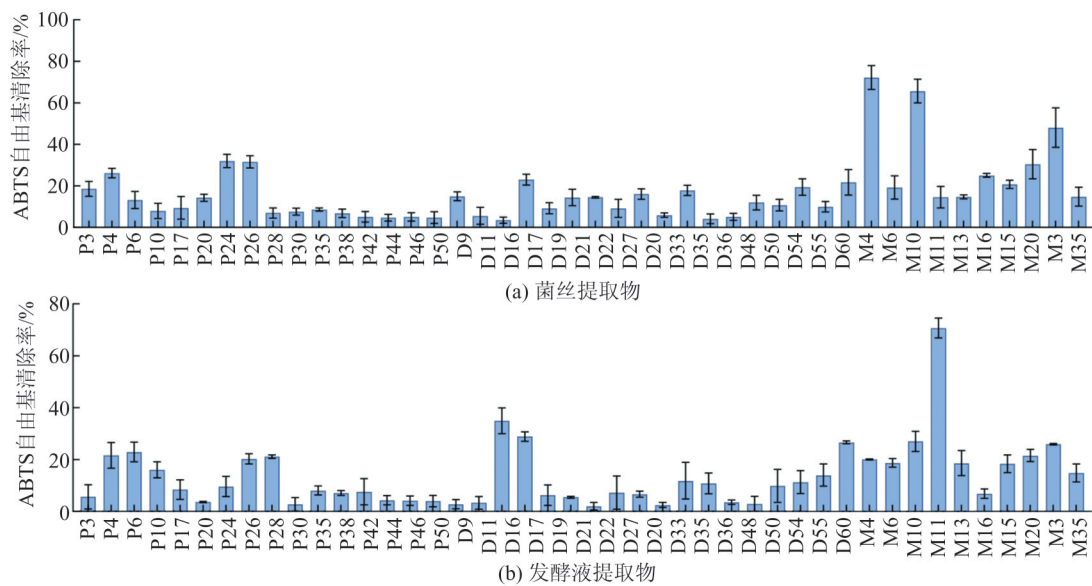


图6 内生真菌菌丝及发酵液提取物对ABTS自由基清除率

Figure 6 ABTS free radical scavenging activity of endophytic fungal mycelium and fermentation broth extracts

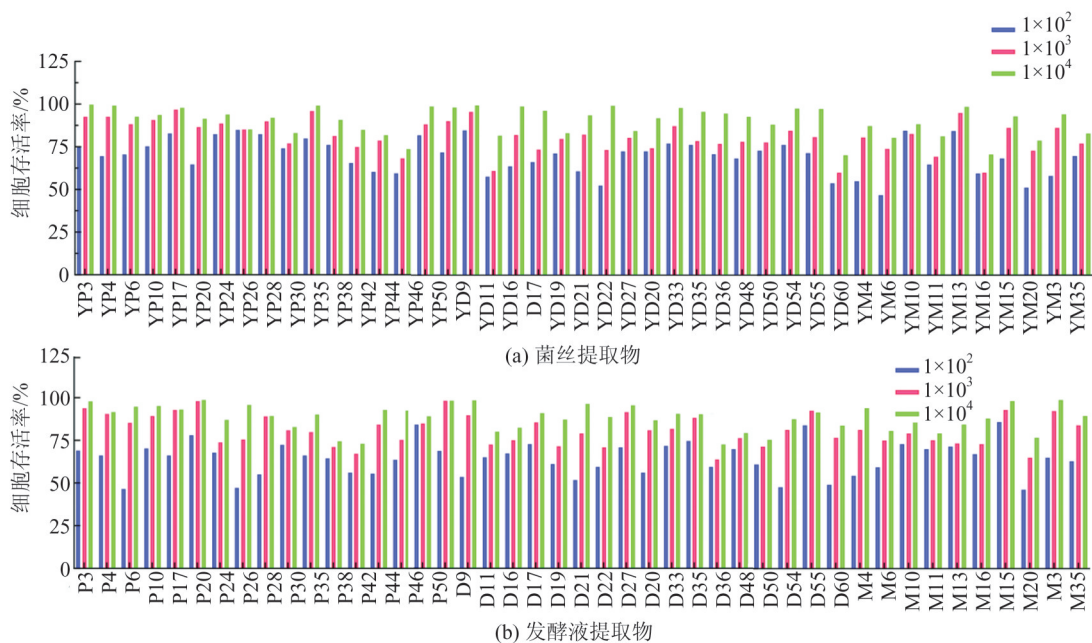


图7 内生真菌菌丝提取物及发酵液提取物对人肝癌HepG2肿瘤细胞抑制率

Figure 7 Inhibition rates of endophytic fungal mycelial extracts and fermentation broth extracts on human hepatoma HepG2 cells

rium sp. D60 的发酵液提取物抑制人肝癌细胞 HepG2 的效果最好,肿瘤细胞存活率为 69.40%。总之,本研究从抗风桐树干韧皮部和木质部中分离出 44 株内生真菌,体现抗风桐可培养内生真菌的多样性,从而加深对抗风桐的更多了解并加以应用。通过对内生真菌的抗菌、抗氧化和抗肿瘤细胞功能的测定,更好地体现了抗风桐内生真菌的功能多样性,筛选得到高效功能菌后对其进行次级代谢产物进行提取与纯化,可以得到更有效的抗菌、抗氧化或

抗肿瘤药物,应用于实际的农业生产或生物医药中,对抗风桐内生真菌的开发提供理论基础。

参考文献

- [1] Riche D M, Riche K D, East H E, et al. Impact of mulberry leaf extract on type 2 diabetes (Mul-DM): a randomized, placebo-controlled pilot study[J]. *Complementary Therapies in Medicine*, 2017, 32: 105-108.
- [2] 陈伶鑫, 葛校冉, 李小红, 等. 中华蚊母树内生真菌 *Clonostachys* sp. (Z3-1) 抗菌活性次级代谢产物研究

- [J/OL]. 中国抗生素杂志, 1-7.
- Chen L X, Ge X R, Li X H, et al. The antimicrobial secondary metabolites from the endophytic fungus *Clonostachys* sp. (Z3-1) of *Distylium chinense* [J/OL]. Chinese Journal of Antibiotics, 1-7.
- [3] 王宪菊, 许艳萍, 字淑慧, 等. 大麻(*Cannabis sativa* L.)内生细菌的分离与鉴定[J]. 分子植物育种, 2023, 21(12): 3946-3956.
- Wang X J, Xu Y P, Zi S H, et al. Isolation and identification of endophytic bacteria in *Cannabis sativa* L [J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(12): 3946-3956.
- [4] 李莎, 杨加虎, 王艳辉, 等. 桑树内生菌的分离鉴定及功能菌筛选[J]. 河南农业科学, 2025, 54(3): 77-86.
- Li S, Yang J H, Wang Y H, et al. Identification and functional characterization of endophytic microbes from mulberry tree (*Morus alba* L.) [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2025, 54(3): 77-86.
- [5] 代丛姗, 种玉飞, 夏文广, 等. 代谢组学视角下的轻度认知障碍生物标志物研究进展[J]. 生物资源, 2024, 46(6): 517-528.
- Dai C S, Chong Y F, Xia W G, et al. Progress on biomarkers of mild cognitive impairment from the perspective of metabolomics [J]. Biotic Resources, 2024, 46(6): 517-528.
- [6] 王静, 赵浩军, 刘梦龙, 等. 地茶属地衣内生真菌次级代谢产物抑菌、抗氧化活性研究[J]. 中成药, 2024, 46(7): 2429-2433.
- Wang J, Zhao H J, Liu M L, et al. Study on antibacterial and antioxidant activities of secondary metabolites of endophytic fungi in *Dictyophora japonica* Thunb [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2024, 46(7): 2429-2433.
- [7] 南亚梅. 百合活性内生真菌的筛选及其次级代谢产物的抗菌抗氧化活性研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2024.
- Nan Y M. Screening of active endophytic fungi from lily and study on antibacterial and antioxidant activities of its secondary metabolites [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2024.
- [8] Zhu S M, Ren F X, Guo Z, et al. Rogersonins a and B, imidazolone N-oxide-incorporating indole alkaloids from a *verG* disruption mutant of *Clonostachys rogersoniana* [J]. Journal of Natural Products, 2019, 82(3): 462-468.
- [9] Hou X T, Wang R K, Zhang C Y, et al. Rogersonins C-F, 9H-imidazo [2, 1-i] purine-incorporating adenine-polyketide hybrids from an *Ophiocordyceps*-associated *Clonostachys rogersoniana* [J]. Journal of Natural Products, 2024, 87(6): 1618-1627.
- [10] 韦坚芬. 两种草珊瑚内生真菌的抗菌物质研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2023.
- Wei J F. Study on the antimicrobial ingredients of two endophytic fungi from *Sarcandra glabra* [D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2023.
- [11] 潘峰, 苏天骄, 邓克莉, 等. 川贝母内生真菌 *Fusarium tricinctum* CBY11 抗氧化活性及代谢成分研究[J]. 菌物学报, 2017, 36(6): 752-765.
- Pan F, Su T J, Deng K L, et al. Antioxidant activities and metabolic constituents of endophytic *Fusarium tricinctum* CBY11 isolated from *Fritillaria cirrhosa* [J]. Mycosystema, 2017, 36(6): 752-765.
- [12] 张琪金. 紫苏内生真菌代谢产物及其抗肿瘤抗氧化活性研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2024.
- Zhang Q J. Studies on endophytic fungal metabolites of *Perilla frutescens* and their antitumor and antioxidant activities [D]. Shanghai: Naval Medical University, 2024.
- [13] 裴晓燕. 红树莓内生真菌次级代谢产物的抑菌活性研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2024.
- Pei X Y. Study on antibacterial activity of secondary metabolites from endophytic fungi of red raspberry [D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2024.
- [14] Kumari P, Singh A, Singh D K, et al. Isolation and purification of bioactive metabolites from an endophytic fungus *Penicillium citrinum* of *Azadirachta indica* [J]. South African Journal of Botany, 2021, 139: 449-457.
- [15] Hassan M G, Shahin M S A, Shafie F A, et al. Mycofabricated CuONPs and Ch-CuONPs conjugate mediated by the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* SM4 with *in vitro* antimicrobial, antibiofilm, antioxidant and anticancer activity [J]. Inorganic Chemistry Communications, 2025, 176: 114216.
- [16] 邹坤林, 姜△源, 魏亚静, 等. 不同植物来源内生菌提取物抗氧化、抗紫外及抑菌功能评价[J]. 植物研究, 2025, 45(3): 433-446.
- Zou K L, Jiang S Y, Wei Y J, et al. Evaluation of antioxidant, anti-ultraviolet radiation, and antibacterial functions of endophytic extracts from different plant sources [J]. Bulletin of Botanical Research, 2025, 45(3): 433-446.
- [17] 纪明妍. 地衣内生真菌弯颈霉属的新种鉴定及生物活性研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2024.
- Ji M Y. The identification and bioactivity study of novel endolichenic fungi in the genus *Tolypocladium* [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2024.