

云南不同产地阳春砂内生真菌多样性分析及其活性研究

俞 静,李宜航,尹翠云,邓招游,唐德英,张丽霞*

中国医学科学院药用植物研究所云南分所 云南省南药可持续利用研究重点实验室,景洪 666100

摘要:分析云南西双版纳和马关产阳春砂(*Amomum villosum* Lour.)内生真菌的分布、种群差异及其抗氧化、抗菌潜力,并为获取新型天然活性代谢产物提供资源。通过植物组织表面灭菌法分离纯化阳春砂内生真菌,利用 ITS 序列分析进行种属鉴定。同时用滤纸片法评价真菌发酵物对 5 株细菌的抑制作用,采用总还原力、DPPH 自由基和羟基自由基清除法评价真菌发酵物的抗氧化活性。从两个产区阳春砂中共分离鉴定出 77 株内生真菌,其中西双版纳阳春砂中鉴定了 39 株,优势菌属为 *Penicillium*、*Colletotrichum*、*Xylaria*、*Daldinia* 和 *Diaporthe*;马关阳春砂中鉴定了 38 株,优势菌属为 *Penicillium*、*Phanerochaete*、*Pyrenochaetopsis*、*Neopestalotiopsis* 和 *Cladosporium*。马关阳春砂内生真菌的 Shannon 多样性指数、辛普森多样性指数和均匀度均高于西双版纳阳春砂,二者间的 Jaccard 相似性系数为 0.222 2。抗菌结果显示菌株 BSR 18、BSR 32、BSR 34 和 MSR 15 具有较强活性;而抗氧化结果表明菌株 BSR 10 和 BSR 18 具有较强活性。本研究初步探讨了两地阳春砂内生真菌多样性,并进一步对其活性进行了筛选。两地间内生真菌存在明显的差异性和丰富的多样性,部分菌株具有良好的抗菌和抗氧化活性,可作为开发天然活性物质的来源进行深入研究。

关键词:阳春砂;内生真菌;分离鉴定;多样性分析;生物活性

中图分类号:R284.1;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)9-1540-14

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.9.008

Diversity and biological activity of endophytic fungi isolated from *Amomum villosum* Lour. in different regions of Yunnan Province

YU Jing, LI Yi-hang, YIN Cui-yun, DENG Zhao-you, TANG De-ying, ZHANG Li-xia*

Yunnan Key Laboratory of Southern Medicine Utilization, Yunnan Branch Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Jinghong 666100, China

Abstract: The distribution and population differences of endophytic fungi in *Amomum villosum* Lour. from Xishuangbanna and Maguan in Yunnan were studied, as well as their antioxidant and antibacterial potentials, in order to provide resources for the acquisition of new naturally active metabolites. Here, we isolated and purified endophytic fungi using plant tissue surface sterilization and identified them through ITS sequence analysis. Meanwhile, the activities of fermented endophytes culture extracts against five strains of bacteria were determined using filtering paper method, and antioxidant activity was evaluated by assessing the total reducing power, including scavenging activities based on DPPH radical and hydroxyl radical. As a result, a total of 77 strains of endophytic fungi were identified from *A. villosum* distributed in Xishuangbanna and Maguan, including 39 strains isolated from Xishuangbanna *A. villosum*, and 38 strains isolated from Maguan *A. villosum*. The dominant genera in Xishuangbanna *A. villosum* were *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Xylaria*, *Daldinia*, and *Diaporthe*, while the dominant genera in Maguan *A. villosum* were *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pyrenochaetopsis*, *Neopestalotiopsis*, and *Cladosporium*. Additionally, the Shannon diversity index, Simpson diversity index, and evenness of endophytic fungi in Maguan *A. villosum* were higher than those in Xishuangbanna *A. villosum*, and the Jaccard similarity coefficient between them was 0.222 2. Strains BSR 18, BSR 32, BSR 34, and MSR 15 showed higher antibacterial activity, while strains BSR 10 and BSR 18 had strong antioxidant activity. Our research preliminary discussed the diversity of endophytic fungi from Xishuangbanna and Maguan, and furthermore screened

收稿日期:2023-02-22 接受日期:2023-05-22

基金项目:云南省重大科技专项(202102AA100020);云南省科技人才和平台计划(202205AF150071);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-031)

*通信作者 Tel:86-013988194288; E-mail:13988194288@163.com

the activity of endophytic fungi from *A. villosum*. There were significant differences and affluent diversity among endophytic fungi from *A. villosum* distributed in Xishuangbanna and Maguan. Therefore, strains with good antibacterial and antioxidant activities could be used as sources of natural active compounds for further study.

Key words: *Amomum villosum* Lour.; endophytic fungi; isolation and identification; diversity analysis; biological activity

砂仁始载于唐代《药性论》,是中国“四大南药之一”,其主要为姜科豆蔻属草本植物阳春砂 *A. villosum* 的干燥成熟果实,具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎的功效^[1]。现代研究表明砂仁的特征性成分主要为挥发油和黄酮类成分,具有抗消化性溃疡、抗胃溃疡、抗氧化、抗炎镇痛等药理活性^[2,3]。阳春砂广泛分布在我国广东、云南、广西和福建等地,其中云南已成为我国阳春砂的最大产区^[4]。

内生真菌是定殖于健康植物不同组织部位的微生物类群,其种群类型和多样性受宿主植物种类、部位、生态环境、种植位置等不同因素的共同影响。橡胶林下和自然条件两种生境下艾纳香叶片内生真菌组成和优势菌属均存在显著差异^[5];甘肃、内蒙和宁夏3个产区的甘草内生真菌分离率、种属多样性等都具有较大差异性^[6]。内生真菌和宿主植物存在复杂的共生关系,与植物的生长发育以及次生代谢产物的积累也有密切联系。药用植物地黄中内生真菌 GG22 可明显促进地黄梓醇及毛蕊花糖苷等物质的积累^[7];丹参中内生真菌 U104 能提高丹参酮的积累^[8];人参内生真菌 *Chaetomium* sp. 与宿主植物人参在最佳的共培养诱导条件下能显著提高人参不定根中人参皂苷的含量^[9]。内生真菌在长期的进化过程中形成了丰富的代谢系统,会产生结构新颖和活性多样的代谢产物,也会产生与宿主植物相似或相同的物质。北桑寄生的内生真菌 *Nemania* sp. 可产生与宿主植物相同类型的黄酮类成分^[10];从黄连内生真菌 *Albifimbria viridis* 次生代谢产物中发现了对于乳腺癌细胞具有显著抑制作用的大环内酯类化合物^[11]。综上研究表明,对宿主植物与其内生真菌间的联系进行探讨具有重要意义,同时从药用植物中分离和筛选具有活性的菌株也可作为获取天然活性物质的潜在来源。

阳春砂的外观性状和品质始终是药材市场首要考虑因素,课题组前期调研发现,云南西双版纳和马关产的阳春砂样品存在一定差异性,为初步探究二者差异性的原因及阳春砂宿主植物与其内生真菌间的作用机制。本研究分别以西双版纳和马关自然林下的阳春砂作为研究材料,对其根、茎、叶部位内生

真菌进行分离鉴定,分析和比较了两地阳春砂内生真菌的多样性,为进一步探讨影响阳春砂品质的因素,同时为充分利用和开发砂仁内生真菌资源提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

两年生阳春砂于2021年12月分别采自云南西双版纳勐腊县勐腊镇和云南文山马关县八寨镇,两地采集的新鲜无病害阳春砂植株均为自然林下种植,经中国医学科学院药用植物研究所云南分所张丽霞研究员鉴定为阳春砂 *Amomum villosum* Lour.。阳春砂植株标本(YJ-SR08和YJ-SR09)均保存在中国医学科学院药用植物研究所云南分所南药重点研究实验室。

1.2 供试菌株

细菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC6538)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC25922)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, ATCC6633)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*, ATCC13048)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*, CMCC(B)50071)均购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.3 试剂

甲醇(批号:20221005,分析纯)、乙酸乙酯(批号:20211028,分析纯)、次氯酸钠(批号:P2079439,分析纯)、硫酸亚铁(批号:20210807,分析纯)、水杨酸(批号:P1372875,99%)、30%过氧化氢均购自昆明仁科商贸有限公司;硫酸链霉素(批号:P1926944,720 IU/mg)、2,2-联苯基-1-苦基胍基(批号:Z6B8N-SO,97%)、抗坏血酸(批号:P1552401,99%)、铁氰化钾(批号:P1586039,99%)、三氯乙酸(批号:P2067948,99%)、三氯化铁(批号:P1599135,99%)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、琼脂粉、酵母提取物、真菌基因组DNA快速抽提试剂盒均购自上海泰坦科技股份有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 内生真菌的分离纯化

新鲜阳春砂植株洗净,于超净工作台用50%

的次氯酸钠溶液浸泡 1 min,取出洗净,再用 75% 的乙醇溶液浸泡 2 min,取出洗净,消毒过程中暴露的末端舍去,余下的用于接种。培养皿恒温培养 3 ~ 15 d,每天观察待组织边缘长出菌落时,转接于新培养皿中,重复 4 ~ 5 次,纯化至得到形态颜色完全一致的单菌落。最后一次清洗样品的无菌水作为样品观察其无任何菌落生长,以保证分离得到的菌株为内生真菌且无染菌。已纯化的菌株于 PDA 斜面上保存。

1.4.2 内生真菌的鉴定

菌株用液氮研磨至粉末状,提取 DNA,用 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增。由昆明硕擎生物科技有限公司对扩增结果进行测序,测序片段用 BLAST 处理,运用 MEGA 7.0 中的邻接法 (neighbor-joining methods, NJ)、基于 Kimura 2-parameter 距离构建菌株系统发育树,并以自展法 (bootstrap) 进行检测,自展次数设为 1 000 次。

1.4.3 统计分析方法

1.4.3.1 内生真菌的分离频率 (isolation frequency, IF): 用来衡量阳春砂中不同种或属真菌的优势度,计算公式为: $IF = N_1/N \times 100\%$, N_1 为同一种或属真菌的株数, N 为真菌总株数。 $IF > 10\%$ 为优势种 (属); $1\% \leq IF \leq 10\%$ 为常见种 (属); $IF < 1\%$ 为稀有种 (属)^[12]。

1.4.3.2 香农-威纳多样性指数 (Shannon-Wiener index, H'): 用以研究内生真菌种类多样性 (适用于不同群落生物多样性高低的比较), 计算公式为: $H' = -\sum_{i=1}^n P_i \ln P_i$, $P_i = N_i/N$, P_i 表示第 i 个种占总数的比例; N_i 表示某一类真菌的数量。 H' 越大, 真菌群落多样性越高。

1.4.3.3 辛普森多样性指数 (Simpson, D): 用于研究内生真菌种类多样性 (用于比较同一个群落生物多样的高低), 计算公式为: $D = 1 / \sum P_i^2$, 数值范围为 0 ~ 1, D 越大, 相应群落内生真菌多样性越高。

1.4.3.4 种类均匀度 (species evenness, E): 表示内生真菌种类的均匀程度, 计算公式为: $E = H' / \ln S$, S 表示种类的丰富度。

1.4.3.5 相似性系数 (Jaccard, C_j): 用于比较不同产地两种植物间内生真菌种类组成的相似程度, 计算公式为: $C_j = j / (a + b - j)$, j 为 2 个产地阳春砂共有内生真菌种数或属数, a 为西双版纳产阳春砂内

生真菌种数或属数, b 为马关产阳春砂内生真菌种数或属数。

1.4.4 抑菌活性测定

1.4.4.1 供试品的制备

菌株接种于大米培养基中室温静置培养 30 d, 乙酸乙酯超声萃取后减压蒸干即得浸膏。用甲醇将浸膏分别配成 5.0 mg/mL 的待测溶液, 阳性对照链霉素也配成相同浓度溶液备用。供试菌株活化后接种于 LB 液体培养基, 37 °C 震荡培养 16 ~ 17 h, 将培养液稀释至菌落个数为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/mL, 即得供试菌液。

1.4.4.2 滤纸片法抑菌试验

取 200 μ L 稀释菌液加到 LB 固体培养基上, 用涂抹棒均匀涂抹。分别各取 20 μ L 待测溶液和链霉素溶液滴加到直径 6 mm 的圆形滤纸片上, 待溶剂挥干, 用镊子置于含菌培养皿上, 同时滴加相同体积甲醇的滤纸片作为阴性对照。于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h, 用游标卡尺测量抑菌圈大小, 所有操作均重复三次^[13]。

1.4.5 抗氧化活性评价

1.4.5.1 DPPH 自由基清除能力测定

浸膏用无水乙醇配成 0.5 mg/mL 的溶液备用。取 1 mL 试样溶液和 3 mL 0.1 mmol/mL 的 DPPH 溶液置于 10 mL 离心管中静置 30 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 在 517 nm 下测定吸光度为 A_1 。将 DPPH 溶液换成无水乙醇重复操作测定吸光度 A_2 , 将试样溶液换成超纯水重复操作测定吸光度 A_0 。将清除率对受试物浓度对数进行非线性回归拟合抑制曲线计算 IC_{50} 值。阳性对照为 Vc, 同一试样重复 3 次^[14]。按下式计算清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

1.4.5.2 羟基自由基清除能力测定

浸膏用无水乙醇配成 0.5 mg/mL 的溶液备用。取 1 mL 试样溶液于 10 mL 离心管中, 依次加入 1 mL 9 mmol/L 的硫酸亚铁溶液和 1 mL 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液, 摇匀后静置 6 min, 再加入 1 mL 过氧化氢溶液。摇匀后 2 500 r/min 离心 20 min, 在 510 nm 下测定吸光度为 A_1 。用超纯水替代过氧化氢测定吸光度为 A_2 , 用无水乙醇代替样品溶液测定吸光度为 A_0 。将清除率对受试物浓度对数进行非线性回归拟合抑制曲线计算 IC_{50} 值。以 Vc 作为阳性对照, 同一试样重复 3 次^[14]。清除率计算公式与 DPPH 自由基清除相同。

1.4.5.3 总还原力测定

浸膏用无水乙醇配成 0.5 mg/mL 的溶液备用。取 2.5 mL 试样溶液于 15 mL 离心管中,依次加入 2.5 mL 0.2 mol/mL pH = 6.6 的磷酸盐缓冲溶液和 2.5 mL 1% 的铁氰化钾溶液。混匀后置于 50 °C 水浴保温 20 min 后取出,迅速冷却。再加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸溶液,混匀后 2 000 r/min 离心 10 min。取上层清液 2.5 mL,依次加入 2.5 mL 超纯水和 0.5 mL 0.1% 的三氯化铁溶液,摇匀后静置 10 min。在 700 nm 处测定吸光度(A),以 Vc 作为阳性对照,同一试样重复三次。将 Vc 用无水乙醇配成浓度梯度为 0.005、0.01、0.02、0.04、0.05、0.1 mg/mL 的待测溶液,按同法测定吸光度(A),以 Vc 的浓

度值为横坐标,测得的吸光度值(A)为纵坐标绘制标准曲线图^[14]。

2 结果与分析

2.1 阳春砂内生真菌鉴定及菌落组成

2.1.1 西双版纳阳春砂内生真菌鉴定

从西双版纳阳春砂根、茎和叶中共分离纯化出 39 株内生真菌,其中根部 18 株、茎部 12 株、叶部 9 株,归属为 13 目 23 科(含 4 个未知科)27 属(含 3 个未知属)。根据菌株的分子生物学进行结果鉴定(见表 1),内生真菌系统发育进化分析见图 1(菌株 BSR 19、36-37 因 ITS 系列相似度低于 97%,不能准确地比对到目前已知的种类)。

表 1 西双版纳阳春砂内生真菌分离鉴定及相对分离频率

Table 1 Isolation, identification, and relative frequency of endophytic fungi from Xishuangbanna *A. villosum*

菌株编号 Strain number	门 Phyla	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	分离频率 IF
BSR 1-2	子囊菌门 Ascomycota	子囊菌纲 Sordariomycetes	肉座菌目 Hypocreales	从壳科 Nectriaceae	镰刀菌属 Fusarium	5.13
BSR 3				肉座菌科 Hypocreaceae	木霉菌属 Trichoderma	2.56
BSR 4-5				分类地位未定 incertae sedis	枝顶孢属 Acremonium	5.13
BSR 6						2.56
BSR 7			炭角菌目 Xylariales	Hypoxylaceae	多形环纹炭团菌 Annulohyphylon	2.56
BSR 8-9					轮层炭壳菌属 Daldinia	5.13
BSR 10				炭角菌科 Xylariaceae	Biscogniauxia	2.56
BSR 11						2.56
BSR 12-13					炭角菌属 Xylaria	5.13
BSR 14-15				圆孔壳科 Sporocadaceae	新拟盘多毛孢属 Neopestalotiopsis	5.13
BSR 16					拟盘多毛孢属 Pestalotiopsis	2.56
BSR 17-18			间座壳菌目 Diaporthales	间座壳科 Diaporthaceae	间座壳属 Diaporthe	5.13
BSR 19			大角间座壳目 Magnaporthales	巨座壳科 Magnaporthaceae	禾顶囊壳属 Gaemannomyces	2.56
BSR 20				Pyriculariaceae	梨形孢属 Pyricularia	2.56
BSR 21-24			小丛壳目 Glomerellales	小丛壳科 Glomerellaceae	刺盘孢属 Colletotrichum	10.26
BSR 25				分类 地位未定 incertae sedis	Malaysiasca	2.56

续表 1 (Continued Tab. 1)

菌株编号 Strain number	门 Phyla	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	分离频率 IF
BSR 26	子囊菌门 Ascomycota	座囊菌纲 Dothideomycetes	葡萄座腔菌目 Botryosphaeriales	叶点霉科 Phyllostictaceae	叶点霉属 Phyllosticta	2.56
BSR 27			格孢腔菌目 Pleosporales	隔孢假壳科 Didymosphaeriaceae	Montagnula	2.56
BSR 28				小球腔菌科 Leptosphaeriaceae	小球腔霉属 Leptosphaeria	2.56
BSR 29						2.56
BSR 30				亚隔孢壳科 Didymellaceae	茎点霉属 Phoma	2.56
BSR 31			Cladosporiales	枝孢霉科 Cladosporiaceae	枝孢属 Cladosporium	2.56
BSR 32 - 35		散囊菌纲 Eurotiomycetes	散囊菌目 Eurotiales	曲霉科 Aspergillaceae	青霉菌属 Penicillium	10.26
BSR 36			刺盾灸目 Chaetothyriales	小疱毛壳科 Herpotrichiellaceae	外瓶霉属 Exophiala	2.56
BSR 37		锤舌菌纲 Leotiomycetes	柔膜菌目 Helotiales	蜡盘菌科 Rutstroemiaceae	邓氏兰伯特盘菌 Lambertella	2.56
BSR 38	毛霉菌门 Mucoromycota	毛霉菌纲 Mucoromycetes	毛霉菌目 Mucorales	毛霉菌科 Mucoraceae	毛霉菌属 Mucor	2.56
BSR 39	担子菌门 Basidiomycota	伞菌纲 Agaricomycetes	红菇目 Russulales	隔孢伏革菌科 Peniophoraceae	隔孢伏革属 Peniophora	2.56

2.1.2 马关阳春砂内生真菌鉴定

从马关阳春砂根、茎和叶中共分离纯化出 38 株内生真菌,其中根部 18 株、茎部 9 株、叶部 11 株,归属为 15 目 24 科(含 3 个未知科)30 属(含 2 个未知

属)。根据菌株的分子生物学进行结果鉴定(见表 2),内生真菌系统发育进化分析见图 2(菌株 MSR 9、MSR 14、MSR 23 因 ITS 系列相似度低于 97%,不能准确地比对到目前已知的种类)。

表 2 马关阳春砂内生真菌分离鉴定及相对分离频率

Table 2 Isolation, identification, and relative frequency of endophytic fungi from Maguan *A. villosum*

菌株编号 Strain number	门 Phyla	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	分离频率 IF
MSR 1 - 2	子囊菌门 Ascomycota	子囊菌纲 Sordariomycetes	炭角菌目 Xylariales	圆孔壳科 Sporocadaceae	新拟盘多毛孢属 Neopestalotiopsis	5.26
MSR 3				Microdochiaceae	微座孢属 Microdochium	2.63
MSR 4				Hypoxylaceae	炭团菌属 Hypoxylon	2.63
MSR 5				分类地位未定 incertae sedis	Hansfordia	2.63
MSR 6				梨孢假壳科 Apiosporaceae	梨孢假壳属 Apiospora	2.63
MSR 7				炭角菌科 Xylariaceae		2.63
MSR 8					炭角菌属 Xylaria	2.63

续表 2 (Continued Tab. 2)

菌株编号 Strain number	门 Phyla	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	分离频率 IF
MSR 9	子囊菌门 Ascomycota	子囊菌纲 Sordariomycetes	炭角菌目 Xylariales	圆孔壳科 Sporocadaceae	炭垫菌属 Nemania	2.63
MSR 10 - 11			肉座菌目 Hypocreales	丛赤壳科 Nectriaceae	镰刀菌属 Fusarium	5.26
MSR 12					Gliocladiopsis	2.63
MSR 13				肉座菌科 Hypocreaceae	木霉属 Trichoderma	2.63
MSR 14				分类地位未定 incertae sedis	枝顶孢属 Acremonium	2.63
MSR 15 - 16			小丛壳目 Glomerellales	小丛壳科 Glomerellaceae	刺盘孢属 Colletotrichum	5.26
MSR 17			间座壳菌目 Diaporthales	间座壳科 Diaporthaceae	间座壳属 Diaporthe	2.63
MSR 18			大角间座壳目 Magnaporthales	Pyriculariaceae	梨形孢属 Pyricularia	2.63
MSR 19 - 20		座囊菌纲 Dothideomycetes	Cladosporiales	枝孢霉科 Cladosporiaceae	枝孢属 Cladosporium	5.26
MSR 21			格孢腔菌目 Pleosporales	Periconiaceae	黑团孢霉属 Periconia	2.63
MSR 22 - 23				孢腔菌科 Pleosporineae	拟棘壳孢属 Pyrenochaetopsis	5.26
MSR 24					茎点霉属 Phoma	2.63
MSR 25			球腔菌目 Mycosphaerellales	球腔菌科 Mycosphaerellaceae	平脐疣孢属 Zasmidium	2.63
MSR 26					尾孢菌属 Cercospora	2.63
MSR 27			葡萄座腔菌目 Botryosphaeriales	叶点霉科 Phyllostictaceae	叶点霉属 Phyllosticta	2.63
MSR 28			酵母目 Saccharomycetes	法夫酵母科 Phaffomycetaceae	Barnettozyma	2.63
MSR 29 - 31		散囊菌纲 Eurotiomycetes	散囊菌目 Eurotiales	曲霉科 Aspergillaceae	青霉菌属 Penicillium	7.89
MSR 32	担子菌门 Basidiomycota	伞菌纲 Agaricomycetes	多孔菌目 Polyporales	平革菌科 Phanerochaetaceae	烟管菌属 Bjerkandera	2.63
MSR 33 - 34					平革菌属 Phanerochaete	5.26
MSR 35						2.63
MSR 36			伞菌目 Agaricales	粉褶菌科 Entolomataceae	斜盖伞属 Clitopilus	2.63
MSR 37			红菇目 Russulales	隔孢伏革菌科 Peniophoraceae	隔孢伏革属 Peniophora	2.63
MSR 38			锈革孔菌目 Hymenochaetales	刺革菌科 Hymenochaetaceae	红皮孔菌属 Pyrrhoderma	2.63

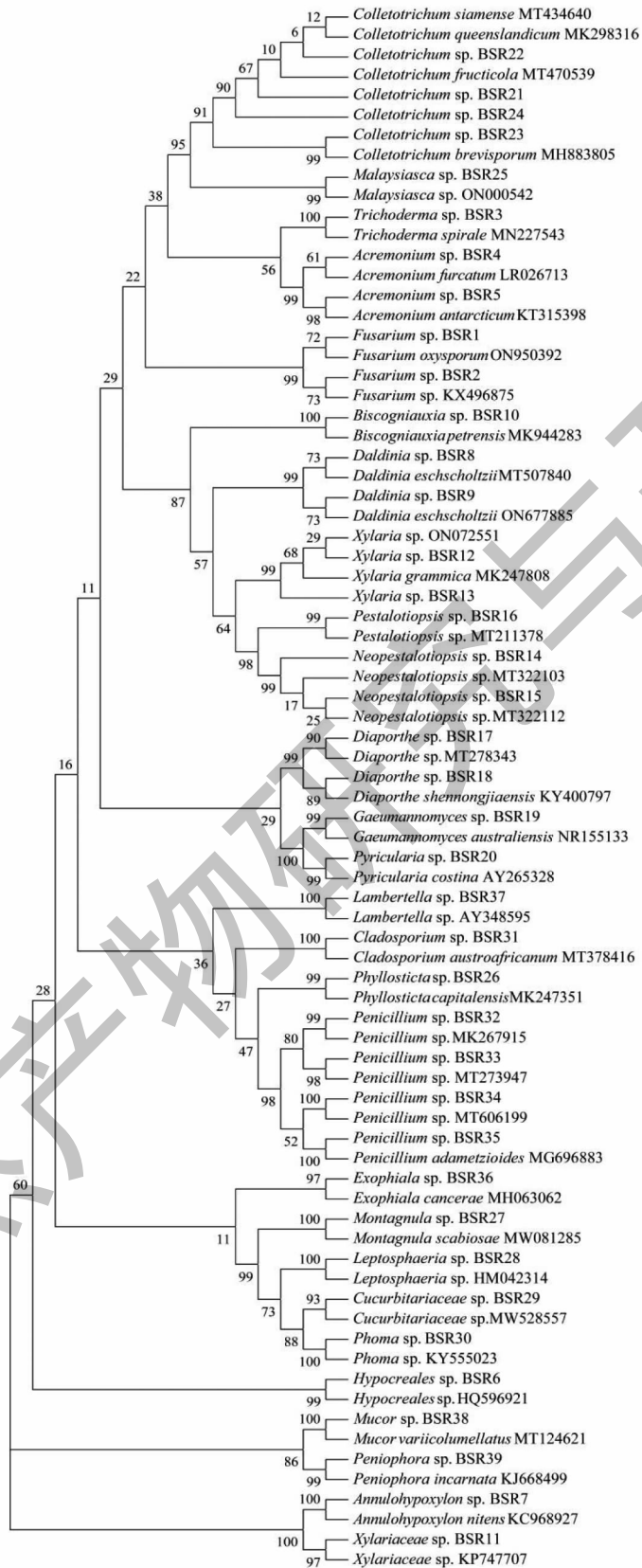


图1 基于 ITS 序列的西双版纳阳春砂内生真菌系统发育进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of rDNA-ITS sequences of endophytic fungi separated from Xishuangbanna *A. villosum*

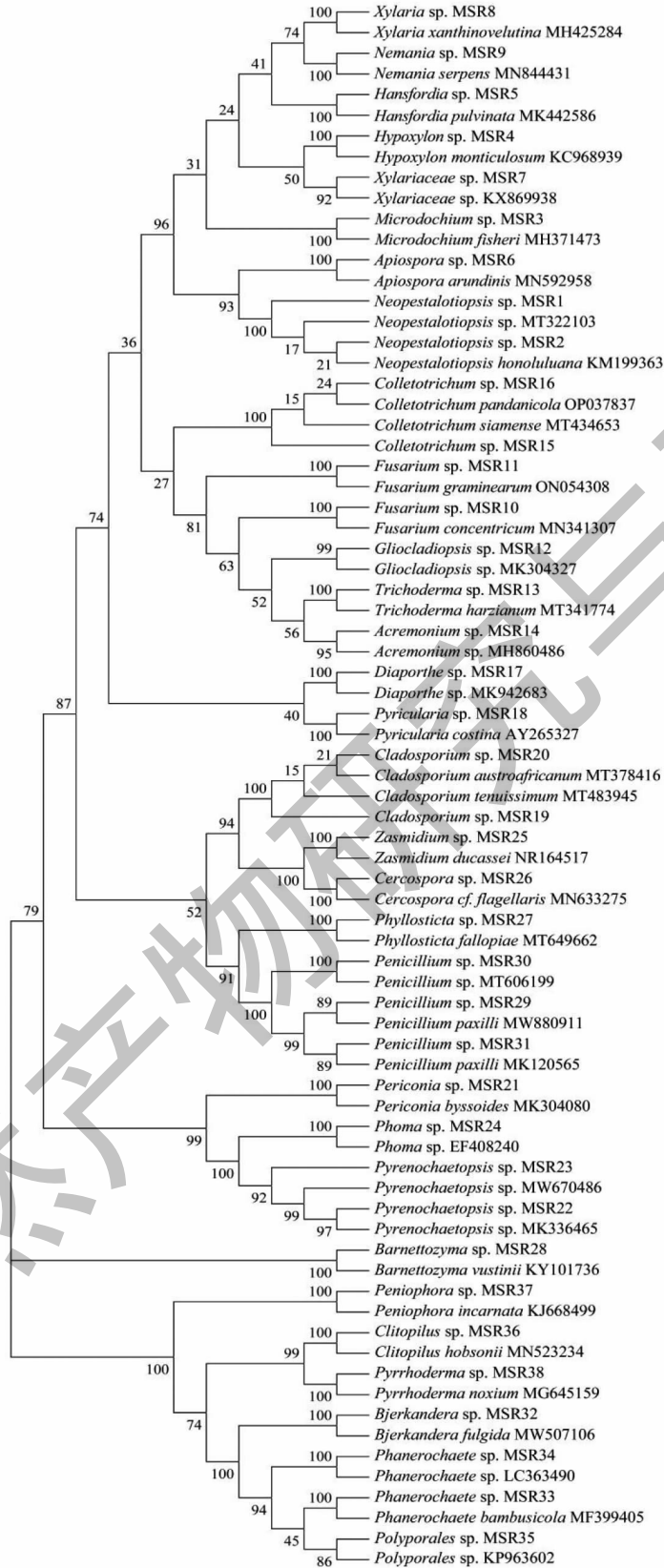


图2 基于 ITS 序列的马关阳春砂内生真菌系统发育进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of rDNA-ITS sequences of endophytic fungi separated from Maguan *A. villosum*

2.1.3 云南阳春砂内生真菌菌群组成

综合整理表 1 和表 2 可知,从采自云南西双版纳和马关两个地区产阳春砂的根、茎和叶中共分离获得 77 株内生真菌。从分离频率来看,西双版纳与马关阳春砂内生真菌的优势菌群存在一定差异,西双版纳阳春砂中分离频率最高的菌群为 *Penicillium* 和 *Colletotrichum*, 占总菌株数的 10.26%, 其次是占总菌株数 5.13% 的 *Xylaria*、*Daldinia*、*Diaporthe* 等; 而马关阳春砂中分离频率最高的是 *Penicillium*, 占总菌株数的 7.89%, 其次是占总菌株数 5.26% 的 *Phanerochaete*、*Pyrenochaetopsis*、*Neopestalotiopsis* 和 *Cladosporium*, 说明西双版纳和马关阳春砂内生真菌菌群组成存在一定差异性。

总体上来看,77 株内生真菌分布在子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota) 和毛霉菌门 (Mucoromycota)。其中子囊菌门为优势门类,分离率为 88.31% (68/77)。其中子囊菌纲为优势纲,共 43 株,分离率为 55.84%, 包括炭角菌目、肉座菌目、小丛壳目、间座壳菌目等; 座囊菌纲共 16 株,分

离率为 20.78%, 包括球腔菌目、格孢腔菌目、葡萄座腔菌目等; 散囊菌纲共 8 株,分离率为 10.39%, 包括散囊菌目和刺盾炱目。锤舌菌纲 1 株,分离率最低,为 1.30%, 只检出柔膜菌目。担子菌门的分离率为 10.39% (8/77), 8 株均为伞菌纲, 包括锈革孔菌目、多孔菌目、红菇目和伞菌目; 毛霉菌门的分离率最低, 1.30% (1/77), 仅有毛霉菌纲。从种属水平上看,所有菌群均为常见种属。

2.2 阳春砂内生真菌多样性

通过对阳春砂样品根、茎和叶三个不同组织中分离得到内生真菌的多样性进行分析,结果见表 3。分离鉴定的 77 个种群,其中根 36 个,茎 21 个,叶 20 个。阳春砂根部、茎部和叶部的 H' 分别为 3.029 9、2.682 0 和 2.595 4, 阳春砂根部、茎部和叶部的 D 分别为 0.942 9、0.949 0 和 0.876 5。综上表明,根、茎和叶三个部位的内生真菌多样性存在一定差异,且种类丰富度也各不相同,其中根部内生真菌种类较多,叶部较少。三个组织内生真菌总 H' 和 D 分别为 3.485 1 和 0.965 6。

表 3 阳春砂不同组织部位内生真菌多样性

Table 3 Diversity of endophytic fungi from different tissues of *A. villosum*

分类单元 Taxon	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	分离株数 Number of separated plants
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	4	-	-	4
叶点霉属 <i>Phyllosticta</i>	1	-	1	2
木霉菌属 <i>Trichoderma</i>	2	-	-	2
<i>Montagnula</i>	1	-	-	1
<i>Biscogniauxia</i>	1	-	-	1
间座壳属 <i>Diaporthe</i>	2	1	-	3
轮层炭壳菌属 <i>Daldinia</i>	1	1	-	2
青霉菌属 <i>Penicillium</i>	4	2	1	7
平脐疣孢属 <i>Zasmidium</i>	-	1	-	1
枝顶孢属 <i>Acremonium</i>	2	1	-	3
新拟盘多毛孢属 <i>Neopestalotiopsis</i>	3	1	-	4
邓氏兰伯特盘菌 <i>Lambertella</i>	1	-	-	1
外瓶霉属 <i>Exophiala</i>	1	-	-	1
禾顶囊壳属 <i>Gaeumannomyces</i>	1	-	-	1
<i>Hypocreales</i>	-	1	-	1
<i>Pleosporales</i>	-	1	-	1
多形环纹炭团菌 <i>Annulohypoxyylon</i>	-	1	-	1
小球腔霉属 <i>Leptosphaeria</i>	-	1	-	1
刺盘孢属 <i>Colletotrichum</i>	2	-	4	6

续表 3 (Continued Tab. 3)

分类单元 Taxon	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	分离株数 Number of separated plants
拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	-	-	1	1
<i>Malaysiasca</i>	-	-	1	1
梨形孢属 <i>Pyricularia</i>	-	-	2	2
微座孢属 <i>Microdochium</i>	1	-	-	1
<i>Gliocladiopsis</i>	1	-	-	1
拟棘壳孢属 <i>Pyrenochaetopsis</i>	-	2	-	2
炭团菌属 <i>Hypoxylon</i>	1	-	-	1
<i>Hansfordia</i>	1	-	-	1
黑团孢霉属 <i>Periconia</i>	1	-	-	1
梨孢假壳属 <i>Apiospora</i>	-	1	-	1
<i>Barnettozyma</i>	-	1	-	1
尾孢菌属 <i>Cercospora</i>	-	-	1	1
<i>Xylariaceae</i>	1	1	-	2
炭垫菌属 <i>Nemania</i>	-	-	1	1
枝孢属 <i>Cladosporium</i>	1	2	-	3
茎点霉属 <i>Phoma</i>	-	-	2	2
炭角菌属 <i>Xylaria</i>	-	1	2	3
隔孢伏革属 <i>Peniophora</i>	1	1	-	2
斜盖伞属 <i>Clitopilus</i>	1	-	-	1
烟管菌属 <i>Bjerkandera</i>	-	1	-	1
红皮孔菌属 <i>Pyrrhoderma</i>	-	-	1	1
<i>Polyporales</i>	-	-	1	1
平革菌属 <i>Phanerochaete</i>	-	-	2	2
毛霉菌属 <i>Mucor</i>	1	-	-	1
真菌总分离类群数 Total isolated fungus group number	36	21	20	77
S	24	18	13	43
H'	3.029 9	2.682 0	2.595 4	3.485 1
D	0.942 9	0.949 0	0.876 5	0.965 6

注:“—”表示在阳春砂相应组织中未分离得到该种属内生真菌。

Note:“—” indicates that the endophytic fungus is not isolated from corresponding tissues of *A. villosum*.

由表 4 可知,马关阳春砂内生真菌的 H' 为 3.271 8, D 为 0.963 2 均高于西双版纳阳春砂内生真菌,其 H' 为 3.111 5, D 为 0.953 1,表明马关产区阳春砂内生真菌类群多样性较西双版纳产区丰富。从两个产区真菌均匀度来看,马关的 E 为 0.899 4,也高于西双版纳。此外,马关和西双版纳阳春砂内生真菌的 C_j 为 0.222 2,属于极不相似程度,说明两地阳春砂内生真菌存在显著差异性。

2.3 阳春砂内生真菌发酵物抗菌活性

据表 5 可知,综合分析共有 29 株阳春砂内生真

菌发酵物表现出抑菌作用,其中对三株细菌同时具有抑制作用的内生真菌 2 株,菌株 BSR 18 抑制活性较强;对两株细菌同时具有抑制作用的 11 株,菌株 BSR 32 抑制活性较强;对一株细菌表现抑制作用的 16 株。对大肠杆菌抑制作用最强的菌株为 BSR 34,对枯草芽孢杆菌抑制作用最强的菌株为 BSR 32 和 MSR 15,对伤寒沙门氏菌抑制作用最强的菌株为 BSR 10 和 BSR 32。而所有菌株发酵物对金黄色葡萄球菌和产气肠杆菌的抑制活性均不强。

表4 不同样品采集地阳春砂内生真菌多样性指数

Table 4 Diversity index of endophytic fungi in *A. villosum* from different sampling sites

采样地 Sampling site	真菌分离总类群数 Total number of fungal isolated groups	多样性指数 Index of diversity		<i>E</i>
		<i>H'</i>	<i>D</i>	
西双版纳 Xishuangbanna	39	3.111 5	0.953 1	0.849 3
马关 Maguan	38	3.271 8	0.963 2	0.899 4

表5 内生真菌发酵产物的抑菌活性

Table 5 Bacteriostatic activity of endophytic fermentation products

菌株编号 Strain number	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	伤寒沙门氏菌 <i>S. typhi</i>	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	链霉素(阳性对照) Streptomycin (positive control)	甲醇(阴性对照) Methanol (negative control)
BSR 2	-	-	-	-	+	+++	-
BSR 10	-	+	-	+++	-	+++	-
BSR 11	+	-	-	-	-	+++	-
BSR 18	++	++	++	-	-	+++	-
BSR 22	+	-	-	-	-	+++	-
BSR 23	-	-	-	-	+	+++	-
BSR 26	+	-	+	-	-	+++	-
BSR 29	+	-	-	-	-	+++	-
BSR 30	++	+	+	-	-	+++	-
BSR 32	-	-	+++	+++	-	+++	-
BSR 33	-	-	++	-	+	+++	-
BSR 34	-	+++	-	+	-	+++	-
BSR 37	-	+	-	-	-	+++	-
MSR 3	-	-	-	++	+	+++	-
MSR 4	+	-	-	-	-	+++	-
MSR 6	-	-	-	+	-	+++	-
MSR 8	++	-	-	-	-	+++	-
MSR 10	-	-	-	-	+	+++	-
MSR 11	-	+	-	++	-	+++	-
MSR 13	+	-	-	-	+	+++	-
MSR 15	-	-	+++	-	-	+++	-
MSR 20	-	-	+	-	+	+++	-
MSR 24	-	+	-	-	-	+++	-
MSR 25	-	+	-	-	-	+++	-
MSR 30	+	-	-	-	-	+++	-
MSR 31	-	+	++	-	-	+++	-
MSR 32	-	+	-	-	-	+++	-
MSR 34	-	-	-	-	+	+++	-
MSR 35	++	-	-	-	+	+++	-

注:“-”表示抑菌圈直径6 mm,“+”表示抑菌圈直径6~8 mm,“++”表示抑菌圈直径8~10 mm,“+++”表示抑菌圈直径>10 mm。

Note:“-” indicates that the diameter of bacteriostatic zone is 6 mm,“+” indicates that the diameter of bacteriostatic zone is 6~8 mm,“++” indicates that the diameter of bacteriostatic zone is 8~10 mm,and“+++” indicates that the diameter of bacteriostatic zone is >10 mm.

2.4 内生真菌发酵物的抗氧化能力

2.4.1 DPPH 自由基清除能力

由表 6 可知,除分自马关阳春砂中 MSR 5 和 MSR 22 外,其他 77 株内生真菌发酵物均对 DPPH 自由基表现出一定程度的清除活性,其中 BSR 10 和 BSR 18 较强,清除率分别为 84.87% 和 81.34%, IC_{50} 值分别为 71.17 和 84.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$,分属于 *Biscogniauxia* 和 *Diaporthe* 属,菌株 BSR 10 来源于根部,BSR 18 来源于茎部。

2.4.2 羟基自由基清除能力

由表 6 可知,77 株内生真菌发酵物对羟基自由基均表现出一定程度的清除活性,其中清除率超过 80% 的菌株有 7 株,分别为 BSR 2、BSR 11、MSR 11、MSR 16、MSR 19、MSR 21、MSR 28,清除率依次为 84.95%、90.68%、87.56%、86.69%、83.05%、87.03%、88.98%, IC_{50} 值分别为 88.66、57.23、82.

60、81.72、81.46、69.55、66.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。包括 *Fusarium*、*Xylariaceae*、*Colletotrichum*、*Cladosporium*、*Periconia*、*Barnettozyma* 属,除菌株 MSR 28 来源于茎部,其余 6 株来源于根部。

2.4.3 总还原力

由表 6 可知,77 株内生真菌发酵物均表现出一定程度的总还原力,其中维生素 C 当量超过 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的菌株有 9 株,分别为 BSR 10、BSR 18、BSR 22、BSR 32、MSR 1、MSR 13、MSR 23、MSR 27、MSR 31,维生素 C 当量依次为 16.50、16.82、22.96、20.42、16.36、16.86、17.04、19.89、16.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$,包括 *Biscogniauxia*、*Diaporthe*、*Colletotrichum*、*Penicillium*、*Neopestalotiopsis*、*Trichoderma*、*Pyrenochaetopsis*、*Phyllosticta* 属。菌株 BSR 18 和 MSR 23 来源于茎部,BSR 22、MSR 27 和 MSR 31 来源于叶部,其余 4 株来源于根部。

表 6 内生真菌发酵产品的抗氧化活性

Table 6 Antioxidant activity of endophytic fermentation products

菌株编号 Strain number	DPPH 清除率 DPPH radical scavenging rate (%)	羟基清除率 Hydroxyl radical scavenging rate (%)	总还原力 Total reducing capacity ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	菌株编号 Strain number	DPPH 清除率 DPPH radical scavenging rate (%)	羟基清除率 Hydroxyl radical scavenging rate (%)	总还原力 Total reducing capacity ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.5 mg/mL Vc	96.12 \pm 0.31	98.77 \pm 0.11	-	BSR 39	17.19 \pm 0.48	37.65 \pm 0.78	6.18 \pm 0.28
BSR 1	28.91 \pm 2.37	54.27 \pm 1.44	10.50 \pm 0.12	MSR 1	36.61 \pm 0.80	27.94 \pm 2.59	16.36 \pm 0.65
BSR 2	13.07 \pm 0.36	84.95 \pm 1.80	9.47 \pm 0.26	MSR 2	4.04 \pm 0.20	75.46 \pm 2.50	7.15 \pm 0.75
BSR 3	21.02 \pm 0.67	14.99 \pm 1.00	7.28 \pm 0.95	MSR 3	71.82 \pm 0.35	67.29 \pm 1.13	12.01 \pm 0.37
BSR 4	23.63 \pm 1.27	34.12 \pm 0.62	11.07 \pm 0.31	MSR 4	49.75 \pm 1.97	75.18 \pm 1.95	9.09 \pm 0.49
BSR 5	10.94 \pm 0.57	43.62 \pm 1.50	5.17 \pm 0.30	MSR 5	0.00 \pm 0.00	10.25 \pm 0.98	8.82 \pm 0.39
BSR 6	12.37 \pm 0.33	16.84 \pm 1.05	6.68 \pm 0.54	MSR 6	9.76 \pm 0.27	74.39 \pm 0.98	14.78 \pm 0.52
BSR 7	33.81 \pm 0.36	25.78 \pm 0.61	9.66 \pm 0.30	MSR 7	40.53 \pm 0.22	62.12 \pm 0.79	13.97 \pm 0.32
BSR 8	23.04 \pm 0.78	20.49 \pm 1.62	5.90 \pm 0.18	MSR 8	6.79 \pm 0.35	43.23 \pm 1.26	11.81 \pm 0.91
BSR 9	18.14 \pm 0.37	18.18 \pm 1.07	5.74 \pm 0.04	MSR 9	8.40 \pm 0.66	67.27 \pm 1.78	8.03 \pm 0.40
BSR 10	84.87 \pm 0.90	68.23 \pm 2.88	16.50 \pm 0.71	MSR 10	2.71 \pm 0.33	79.19 \pm 1.13	10.86 \pm 1.05
BSR 11	13.98 \pm 0.57	90.68 \pm 2.02	8.19 \pm 0.35	MSR 11	8.70 \pm 0.58	87.56 \pm 1.59	10.54 \pm 0.53
BSR 12	3.20 \pm 0.62	20.04 \pm 0.97	5.22 \pm 0.14	MSR 12	14.72 \pm 1.24	54.58 \pm 1.97	9.49 \pm 0.70
BSR 13	4.63 \pm 0.71	35.95 \pm 4.00	5.55 \pm 0.06	MSR 13	60.98 \pm 0.70	71.34 \pm 1.41	16.86 \pm 0.79
BSR 14	7.72 \pm 0.87	19.72 \pm 1.32	7.67 \pm 0.73	MSR 14	38.32 \pm 1.01	60.23 \pm 0.98	10.18 \pm 0.40
BSR 15	11.20 \pm 0.09	32.36 \pm 1.68	6.06 \pm 0.14	MSR 15	38.20 \pm 1.69	73.89 \pm 1.77	10.18 \pm 1.10
BSR 16	23.11 \pm 0.64	41.45 \pm 1.49	9.63 \pm 0.37	MSR 16	77.05 \pm 0.56	86.69 \pm 1.28	10.61 \pm 0.77
BSR 17	24.25 \pm 0.67	23.01 \pm 2.03	7.65 \pm 0.27	MSR 17	21.36 \pm 0.78	73.21 \pm 1.62	9.13 \pm 0.60
BSR 18	81.34 \pm 0.50	32.41 \pm 1.63	16.82 \pm 0.17	MSR 18	25.96 \pm 1.31	37.32 \pm 2.03	13.95 \pm 0.74

续表 6(Continued Tab. 6)

菌株编号 Strain number	DPPH 清除率 DPPH radical scavenging rate(%)	羟基清除率 Hydroxyl radical scavenging rate(%)	总还原力 Total reducing capacity ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	菌株编号 Strain number	DPPH 清除率 DPPH radical scavenging rate (%)	羟基清除率 Hydroxyl radical scavenging rate (%)	总还原力 Total reducing capacity ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
BSR 19	23.11 ± 0.36	59.31 ± 0.82	7.75 ± 0.14	MSR 19	34.14 ± 0.92	83.05 ± 0.52	12.46 ± 0.80
BSR 20	27.13 ± 0.18	65.44 ± 3.23	10.58 ± 0.15	MSR 20	9.21 ± 0.83	25.93 ± 1.79	13.15 ± 1.23
BSR 21	26.32 ± 0.52	43.11 ± 2.41	11.03 ± 0.08	MSR 21	25.17 ± 0.92	87.03 ± 1.12	11.19 ± 0.39
BSR 22	31.53 ± 2.81	51.44 ± 3.75	22.96 ± 0.40	MSR 22	0.00 ± 0.00	16.46 ± 1.21	12.35 ± 0.82
BSR 23	15.32 ± 0.19	46.32 ± 3.25	13.68 ± 1.34	MSR 23	34.36 ± 0.86	60.24 ± 1.54	17.04 ± 0.73
BSR 24	6.16 ± 0.67	58.38 ± 1.58	10.87 ± 0.02	MSR 24	7.37 ± 0.81	68.78 ± 0.98	8.42 ± 0.75
BSR 25	7.39 ± 0.19	34.64 ± 0.95	8.08 ± 0.10	MSR 25	71.77 ± 0.14	69.44 ± 0.98	9.57 ± 0.67
BSR 26	33.76 ± 1.17	25.26 ± 0.82	10.57 ± 0.27	MSR 26	22.12 ± 0.88	15.32 ± 2.02	10.62 ± 1.11
BSR 27	25.65 ± 0.53	30.35 ± 3.49	7.47 ± 0.32	MSR 27	52.89 ± 1.40	18.41 ± 1.47	19.89 ± 0.43
BSR 28	25.22 ± 1.53	27.50 ± 0.71	5.93 ± 0.10	MSR 28	64.38 ± 0.65	88.98 ± 1.47	9.97 ± 0.24
BSR 29	10.76 ± 2.29	23.91 ± 1.75	5.94 ± 0.29	MSR 29	50.10 ± 0.58	64.63 ± 1.90	10.68 ± 0.89
BSR 30	7.61 ± 2.55	75.50 ± 1.00	7.32 ± 0.31	MSR 30	33.38 ± 0.22	73.71 ± 1.30	12.90 ± 1.40
BSR 31	1.82 ± 0.43	74.11 ± 1.77	6.84 ± 0.27	MSR 31	70.41 ± 0.36	76.05 ± 1.21	16.35 ± 0.36
BSR 32	36.02 ± 0.65	31.37 ± 0.53	20.42 ± 0.40	MSR 32	9.52 ± 0.60	19.41 ± 0.97	12.92 ± 0.90
BSR 33	19.32 ± 0.39	41.05 ± 1.49	12.73 ± 0.28	MSR 33	9.32 ± 2.01	21.23 ± 1.02	4.41 ± 0.36
BSR 34	27.88 ± 1.14	24.84 ± 0.75	12.06 ± 0.43	MSR 34	14.42 ± 1.79	20.26 ± 1.16	7.24 ± 0.50
BSR 35	27.91 ± 0.31	50.72 ± 1.21	14.30 ± 0.56	MSR 35	31.06 ± 1.32	6.45 ± 0.16	11.41 ± 0.80
BSR 36	28.30 ± 0.95	27.45 ± 2.02	10.65 ± 0.28	MSR 36	9.79 ± 0.97	28.00 ± 1.92	8.27 ± 1.15
BSR 37	28.91 ± 0.59	44.82 ± 1.00	11.53 ± 0.64	MSR 37	18.31 ± 0.51	29.36 ± 1.89	11.85 ± 0.81
BSR 38	22.63 ± 2.54	7.14 ± 0.42	15.72 ± 0.72	MSR 38	9.37 ± 1.50	23.21 ± 2.81	7.43 ± 0.41

3 讨论与结论

关于砂仁内生真菌方面的研究已有部分报道, Xiao 等^[15]分析比较了广东阳春市阳春砂和云南泸水市阳春砂茎和叶内生真菌的差异性,结果表明二者内生真菌种类较多,且组成具差异性,各自有不同的优势菌株,但缺少对根部内生真菌相关的研究; Cao 等^[16]将内生真菌的解磷功能作为切入点,以云南红河产区的阳春砂为研究对象,在根部发现有 8 株内生真菌具有解磷能力; Zhang 等^[17]仅对阳春砂内生真菌多样性进行了初步分析。本实验对云南西双版纳和马关两个地区阳春砂根、茎和叶部位内生真菌进行了分离鉴定,共 77 株,归属为 18 目 35 科(含 7 个未知科)44 属(含 5 个未知属),根部菌株种类丰富,茎和叶部位菌株种类较根部少。对二者间多样性进行比较发现,西双版纳与马关阳春砂内生真菌的优势菌群和总体菌落组成均存在差异性。另外,马关产区阳春砂内生真菌类群多样性较西版纳

纳产区丰富,上述研究可为深入探讨宿主植物阳春砂的差异提供一定的参考依据。

砂仁可作为开发具抑菌和抗氧化作用物质的来源之一, Cao 等^[18]分析了阳春砂叶和秆乙醇提取物对常见细菌的抑制作用,结果表明砂仁叶乙醇提取物对金黄色葡萄球菌抑制效果最好,砂仁秆乙醇提取物对枯草芽孢杆菌的抑制效果最好; Cao 等^[19]还发现砂仁生品的石油醚萃取物对大肠杆菌的抑菌效果最显著;砂仁水提物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌也具有抑制作用^[20]; Tang 等^[21]发现部分砂仁粗提物表现出较强的体外抗氧化活性。另外, Zhang 等^[22]从砂仁内生真菌 *Letendreaa helminthicola* A696 的次生代谢产物中发现了一个新的倍半萜类化合物。基于上述研究,本研究通过 DPPH 自由基清除、羟基自由基清除和总还原力实验分析了从云南西双版纳和马关阳春砂中获得的 77 株内生真菌发酵粗提物的抗氧化活性,并通过滤纸片法评价了粗提物

的抗菌活性,结果显示部分菌株兼具抗菌和抗氧化活性,其中 BSR 10、BSR 18 和 BSR 32 可作为进一步挖掘天然生物活性先导化合物的新途径,也可实现对阳春砂资源的充分可持续利用与开发。

参考文献

- Li WX, Li JL, He JJ, et al. Genetic diversity and population structure of germplasm resources of *Amomum villosum* based on SSR markers[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47: 4618-4626.
- Gui XJ, Fan XH, Ma R, et al. Herbalogical study of *Amomum villosum*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2022, 45: 1765-1771.
- Qu HJ, Ou HY, Lin KW, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Amomum longiligulare* T. L. Wu[J]. J Hainan Med Univ(海南医学院学报), 2023, 29: 72-75.
- Chen JS, Li HT, Tang DY, et al. The industrialization status and development countermeasures of *Amomum villosum* Lour. in Yunnan province[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2015, 17: 690-693.
- Shu XC. The secondary metabolites of endophytic fungi from *Blumea balsamifera* (L.) DC. of two biotopes[D]. Haikou: Hainan University(海南大学), 2020.
- Liu WJ, Li LQ, Tang JH, et al. Study on the diversity and antibacterial activity of endophytic fungi from *Glycyrrhiza uralensis*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33: 256-267.
- Peng SP, Dong CM, Zhu YH. Cloning and expression analysis of two key genes of jasmonic acid synthesis in response to endophytic infection from *Rehmannia glutinosa*[J]. Bull of Bot Res(植物研究), 2021, 41: 294-301.
- Jiang Y, Wang L, Lu S R, et al. Transcriptome sequencing of *Salvia miltiorrhiza* after infection by its endophytic fungi and identification of genes related to tanshinone biosynthesis[J]. Pharm Biol, 2019, 57: 760-769.
- Xu XD, Liang WX, Lu Y, et al. Production of ginsenoside by *Chaetomium* sp. and its effect on enhancing the contents of ginsenosides in *Panax ginseng* adventitious roots[J]. Biochem Eng J, 2021, 174: 108100.
- Zheng ZY, Chai ST, Chen J, et al. Isolation and identification of flavonoid-producing endophytes with antioxidant and antibacterial activities from *Loranthus tanakae* [J]. Microbiol China(微生物学通报), 2022, 49: 3798-3812.
- Ai HL, Ma XJ, Wei PP, et al. The chemical constituents from endophytic fungus *Albifimbria viridis* of *Coptidis chinensis* [J]. J South-cent Minzu Univ; Nat Sci(中南民族大学学报:自科版), 2022, 41: 536-541.
- Sun SS, Zhang XJ, Ma CG, et al. Study on diversity of culturable endophytic fungi from *Achyranthes bidentata* Blume[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2022, 50: 149-151.
- Yuan C, Shu XC, Zhang YB, et al. Antibacterial and anti-anthraxose activities of endophytic fungi colonized in *Blumea balsamifera* (L.) DC. [J]. Chin Agric Sci Bull(中国农学通报), 2021, 37: 38-44.
- Mou Y, Liu SF, Yin CY, et al. Isolation, identification and biological activities of endophytic fungi from *Baphicacanthus cusia*[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2022, 44: 1191-1197.
- Xiao JJ, Wang LG, Cui YX, et al. Study on molecular identification of endophytic fungi in *Amomum villosum* Lour. from different habitats[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报), 2021, 38: 590-595.
- Cao GH, Zhang X, Ma ST, et al. Phosphate-solubilizing function evaluation and taxonomic identification of endophytic fungi separated from roots of *Amomum villosum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51: 1316-1323.
- Zhang YX, Yang J, Huang JH, et al. Study on biodiversity of endophytic fungi of *Amomum villosum*[J]. J Zhongkai Univ Agric Eng(仲恺农业工程学院学报), 2010, 23: 15-17.
- Cao GH, Zhang X, Chen YY, et al. Comparison of bacteriostatic activities of ethanol extracts from leaves and stems of *Amomum villosum* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2020, 42: 1914-1917.
- Cao GH, Zhang X, Wang XF, et al. Comparison of bacteriostatic effects of different extracts from *Fructus Amomi* and its slat-processed products [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2020, 41: 82-87.
- Tang CL, Chen JL, Zhou Y, et al. Exploring antimicrobial mechanism of essential oil of *Amomum villosum* Lour through metabolomics based on gas chromatography-mass spectrometry in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Microbiol Res, 2021, 242: 126608.
- Tang CL, Chen JL, Zhang RF, et al. Determination of total phenolic and flavonoid content and study on antioxidant activity of *Amomum villosum* from various producing areas[J]. Chin Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2021, 36: 122-126.
- Zhang J, Liu HX, Liu ZM, et al. Secondary metabolites of endophytic fungus *Letendreaea helminthicola* derived from *Amomum villosum*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33: 773-778.