

文章编号:1007-2985(2011)06-0081-06

## 蛇足石杉内生真菌 TL 的分离鉴定与药敏研究\*

张琳<sup>1</sup>, 魏志刚<sup>2</sup>, 齐丽霞<sup>2</sup>, 杜鹃<sup>2</sup>, 漆可<sup>2</sup>, 胡颂平<sup>2</sup>

(1. 江西农业大学理学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

**摘要:**从蛇足石杉植株中分离出内生真菌,通过马铃薯培养基(PDA)培养菌株,利用三点接种法分离纯化,筛选出一株优势菌株 TL 作为供试菌株通过菌落形态和培养特性观察以及显微摄影技术进行形态观察,对照《真菌鉴定手册》,经鉴定为半知菌亚门(Amon imperfect fungi)丝孢纲(Hyphomycetes)丛梗孢科(Moniliaceae)单端孢属(*Trichothecium Link ex Fries*)通过单因素试验与正交试验相结合,最终发现对供试菌株具有最佳抑菌效果的药物浓度组合

**关键词:**蛇足石杉;内生真菌;抑菌

中图分类号:Q93-331

文献标志码:B

蛇足石杉(*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.),又名千层塔,为石杉科石杉属蕨类植物<sup>[1]</sup>。民间常用其全草治疗跌打损伤、毒蛇咬伤、淤血肿痛和精神分裂等疾病。多年生土生植物。茎直立或斜生,高 10~30 cm,中部直径 1.5~3.5 mm,枝连叶宽 1.5~4.0 cm,2~4 回二叉分枝,枝上部常有芽胞。叶螺旋状排列,疏生,平伸,狭椭圆形,向基部明显变狭,通直,长 1~3 cm,宽 1~8 mm,基部楔形,下延有柄,先端急尖或渐尖,边缘平直不皱曲,有粗大或略小而不整齐的尖齿,两面光滑,有光泽,中脉突出明显,薄革质。孢子叶与不育叶同形。孢子囊生于孢子叶的叶腋,两端露出,肾形,黄色。蛇足石杉分布较广,性喜阴湿,适应于中亚热带常绿阔叶林和南亚热带季风常绿阔叶林的气候条件中生长。全国除华北、西北地区部分省区外,均有分布。生于海拔 300~2 700 m 的林下、路旁、灌丛下。亚洲其他国家和地区(如日本、朝鲜、泰国、中南半岛、印度、尼泊尔、缅甸、斯里兰卡、马来西亚、菲律宾、印度尼西亚等)、太平洋地区、俄罗斯、大洋州、中美洲有分布。

现代医学研究表明,蛇足石杉所含有的石杉碱甲(Hup-A)具有高选择性的抑制乙酰胆碱酯酶活性,对提高学习记忆力和改善老年人记忆功能及治疗重症肌无力和早期老年痴呆有显著疗效<sup>[2-3]</sup>。这种生物活性碱,能渗透大脑有关记忆组织,迅速提高大脑记忆力,全面改善脑功能。它是迄今为止,世界上唯一一种从纯天然植物中提取的用于改善大脑记忆的新药<sup>[4]</sup>。蛇足石杉现已成为药学界最瞩目的研究热点之一。

植物内生真菌是指那些生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部或细胞间隙而没有引起宿主明显病害症状的真菌<sup>[5]</sup>,富的生物类群具有丰富而强大的生物学作用,能够有效的促进宿主植物生长,增强宿主抗病能力和对环境胁迫的抗性<sup>[6]</sup>。

早在 100 多年前人们就已发现在健康植物组织的内部也有微生物存在,但由于这些微生物生活在没有外在感染症状的健康植物的组织内部,其存在和作用长期以来一直为人们所忽视。自 20 世纪 30 年代发现造成

\* 收稿日期:2011-07-18

基金项目:江西农业大学青年基金资助项目;江西农大人事基金资助项目;上海市农业生物基因中心重点资助项目(沪农基 200903)

作者简介:张琳(1979-),女,湖南长沙人,江西农业大学理学院讲师,主要从事生物化学与微生物资源利用研究

通讯作者:胡颂平(1969-),男,湖南湘潭人,江西农业大学生物工程学院硕士生导师,主要从事植物分子生态与植物真菌资源利用研究。e-mail:husongping1969@163.com

畜牧业重大损失的牲畜中毒是由于食用了感染内生真菌的牧草,内生菌的研究才得以广泛深入地开展起来。迄今有关蛇足石杉资源、药用成分等方面已有较多报道,但有关蛇足石杉内生菌资源的研究方面,仅见 2005 年石玮等从蛇足石杉分离出 4 株内生真菌的报道<sup>[7]</sup>,且尚未有对其价值进一步研究的报道。

由于石杉碱甲(Hup-A)在全草中含量甚微,结构复杂,人工合成十分困难,目前药品生产完全依赖野生资源,价格昂贵。长期采挖势必破坏蛇足石杉天然资源的保存与可持续开发<sup>[8]</sup>,由于蛇足石杉资源分散,而且许多相对集中的产地均位于自然保护区和风景区范围内,同时蛇足石杉是一种多年生、生长缓慢的小草本,年净生物量的增长速率极为有限,长成一颗高 12 cm 的成苗,在自然条件下大约需要 6~7 d 的时间,资源更新周期较长,不可大规模开采<sup>[9]</sup>。因此,开展蛇足石杉快速繁殖技术研究显得尤为必要。在各种人工繁殖技术中,组织培养技术应该是其中的佼佼者,因为它具有需要材料少、条件可控、不受季节限制、周期短、重复性强等优点且据有关文献报道,组织培养能针对性的提高植物中有效成分含量,如:Wojciech Szypuła, Agnieszka Pietrosiuk 等,曾以伏贴石杉 *Huperzia selago* (Linn.) Bernh. 为材料进行了组织培养,在获得成功的同时还发现组织苗中的石杉碱甲含量高于野生植株<sup>[10]</sup>,所以该技术必将成为蛇足石杉快速繁殖和大规模工厂化生产的理想手段。

然而蛇足石杉的组织培养往往植株成活率很低,出现这一现象的一个重要原因就是蛇足石杉中存在许多内生真菌,造成蛇足石杉外植体的灭菌工作变得困难,在培养过程中易被真菌污染。要解决这一难题,比较常用的方法就是在组织培养基中加入相关的抑菌药物,通过抑制内生真菌的生长繁殖,从而达到成功培养蛇足石杉的目的。本研究对通过三点接种法分离提纯得到优势菌株并对其进行药敏研究,旨在找到能有效抑制这种内生真菌繁殖的药物配方,为蛇足石杉的组织培养和大规模细胞培养提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料、仪器和药品

1.1.1 植物材料 蛇足石杉 *Huperzia Serrata* (Thunb.) Trev. 植株,采自江西农业大学中草药园,由江西农业大学胡颂平教授鉴定。

1.1.2 培养基 (1)蛇足石杉内生菌分离提纯及药敏试验用基础培养基。马铃薯培养基(PDA 培养基):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 值自然。(2)蛇足石杉内生真菌菌悬液培养基。PD 液体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,水 1 000 mL,pH 值自然。

1.1.3 主要仪器设备 SKY-2102 震荡培养箱;SHP-250 恒温培养箱;精达 250D 恒温光照培养箱;超净工作台等。

1.1.4 主要药品试剂 两性霉素 B(Amphotericin B);制霉菌素(Nystatin);链霉素(Streptomycin);氨苄西林(Ampicillin);孔雀石绿(Malachite Green Dyestuff);升汞(Mercuric Chloride);N,N-二甲基甲酰胺(AR)等。

### 1.2 试验方法

1.2.1 试验流程 诱导植物材料内生菌长出→分离纯化内生菌→选取供试菌株并鉴定→牛津杯法测定供试药物抗菌性→筛选出对供试菌株具抗菌作用的药物→运用有重复观测值正交试验设计找到最佳抗菌药物或最佳药物组合。

1.2.2 内生真菌的诱导生长与分离纯化 (1)内生真菌的分离。先将新鲜蛇足石杉植株用自来水冲洗干净,75%乙醇漂洗 2~3 min,无菌水冲洗 3~4 次,于 0.1 L 汞溶液中浸泡 15 min 后无菌水冲洗 4~5 次,再在超净工作台上将切取 1 cm 茎段、叶片和不定根分别接种于 PDA 培养基上,置于 28 °C 恒温培养箱培养。1 周后再以升汞灭菌 1 次,观察发现外植体的边缘部分仍然有菌丝长出。用接种针挑取不同部位的菌丝,分别接种于 PDA 培养基上,28 °C 恒温培养,长出新的菌落,供鉴定用。将上述表面 2 次灭菌处理的材料不作切割置于同样条件下培养,检查表面消毒是否彻底,辨别真菌是否为内生。

(2)内生真菌的纯化。用接种针挑取菌株尖端菌丝,用三点接种法接种于 PDA 培养基的适当位置,使成三角形的 3 个点,倒置于恒温培养箱中 28 °C 下培养,如此重复,直到长出的菌落形态特征一致。至此,内生真菌的分离提纯工作结束。

1.2.3 内生真菌的鉴定方法 利用传统方法进行鉴定分析. 首先,通过宏观观察蛇足石杉组培体中分离纯化出的真菌菌落的形态特征,包括形状、质地、颜色、边缘特征等情况,进行初步确认. 其次,通过制作玻片,利用显微摄影,对菌种的孢子、菌丝、孢子囊等微观形态进行观察记录<sup>[11]</sup>. 最后,比照《真菌鉴定手册》<sup>[12]</sup>,确定所分离的内生真菌的种属.

1.2.4 供试菌株菌悬液的制备 用接种环挑取少量的供试菌株菌丝移入已灭菌的盛有 PD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,用封口膜盖住三角瓶瓶口,轻轻震荡,使菌丝充分散开. 整个过程必须在超净工作台中完成,所有用的实验工具事先皆需灭菌处理,以确保无杂菌感染.

接种后的三角瓶至于恒温培养箱中 28 °C 恒温培养 2 d,即得供试菌株液. 保存至 5 °C 冰箱中待用.

1.2.5 供试药物的配置 本实验采用两性霉素 B、制霉菌素、链霉素、氨苄西林、孔雀石绿以及升汞 6 种药物进行药敏试验. 这 6 种药物的性状<sup>[13-15]</sup>如表 1 所示,采用灭过菌的移液枪将药物配成不同质量浓度的无菌药液如表 2,装于已灭菌的试管中,盖上橡皮塞保存于冰箱中以待用.

表 1 供试药物简介及性状

药品名称	特性	性状	溶剂及稀释剂
两性霉素 B	不溶于水,光和温度影响其稳定性	黄色或橙黄色粉末	N, N-二甲基甲酰胺 (AR)
制霉菌素	不稳定,避光、密封冷藏,水影响其活性	黄色或黄棕色粉末	N, N-二甲基甲酰胺 (AR)
链霉素	干燥制品常温下稳定,不耐碱和强酸	白色或类白色的粉末	无菌蒸馏水
氨苄西林	耐酸碱,碱性增加溶解度,常温下很稳定	白色结晶性粉末	无菌蒸馏水
孔雀石绿	性质稳定,具毒性和高残留性,可作染料	蓝色粉末	无菌蒸馏水
升汞	有剧毒,刺激性大,能腐蚀金属	无色或白色斜方性晶块或针晶或白色结晶性粉末	无菌蒸馏水

表 2 6 种抗菌药物配制表

两性霉素 B/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	制霉菌素/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	链霉素/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	氨苄西林/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	孔雀石绿/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	升汞/%
250	250	1	1	2.5	0.01
500	500	10	10	5	0.05
1 000	1 000	100	100	10	0.1
2 000	2 000	1 000	1 000	100	0.2

1.2.6 牛津杯法测定抗菌药物对供试菌中的抑菌效果 牛津杯法又称管碟法<sup>[16]</sup>,为常用的药敏试验方法.

制备新的含 PDA 的培养基平板. 凝固后使培养基水分干燥透,用液枪吸取 400  $\mu\text{L}$  供试菌液接种于 PDA 培养基上,用灭过菌刮铲平板上的菌悬液均匀涂布,涂布后以平板无可见水滴为准,然后用灭过菌的镊子将无菌的牛津杯轻轻放入培养皿中,在水平放置的平皿中均匀地放置 5 只牛津杯. 此时的平板立刻进行抑菌试验.

用液枪吸取同一药物的 4 个不同浓度的药物 200  $\mu\text{L}$  至同一皿的 4 个牛津杯中,剩下一个加入等量的无菌水作对照,每次吸取都要换个新的枪头,注意不要将菌悬液溢出牛津杯外.

将制好的培养皿贴上标签小心转移到 28 °C 很稳培养箱中培养 2 d. 观察有无抑菌圈并采用交叉法背面测量抑菌圈直径.

1.2.7 有重复观测值的正交试验的因素与水平设定 以药物为因素,不同药物浓度为水平,抑菌圈直径为指标,选择合适的正交表,必须按单因素实验结果中有抑菌效果的药物进行正交试验.

1.2.8 有重复观测值的正交试验结果分析 得出实验结果后通过方差分析进行 F 检验. 首先检验  $\text{MSe}_1$  (模型误差均方)与  $\text{MSe}_2$  (实验误差均方)差异的显著性. 若经 F 检验不显著,则可将其平方和与自由度分别合并,计算出合并的误差均方,进行 F 检验与多重比较,以提高分析的精度,最后得出药物抑菌效果的显著性;若 F 检验显著,说明存在交互作用,二者不能合并,此时只能以  $\text{MSe}_2$  进行 F 检验与多重比较,最后得

出最优药物浓度组合<sup>[1,7]</sup>.

## 2 结果分析

### 2.1 供试菌株 TL 的确定与鉴定结果

通过严格的筛选,最终确定由 14 粉红培养瓶中分离提纯出的编号为 TL 的菌株为供试菌株. 该菌株生长速度快,在用三点接种法接种的培养皿 36 h 就能长满整个培养皿,菌丝发达细长,菌落表面粉红色,呈棉絮状,背面深紫色(图 1). 镜检下分生孢子梗单生洋梨形(图 2),菌丝有少数横隔细而长(图 3). 对照《真菌鉴定手册》得出供试菌株 TL 属半知菌亚门(Amon imperfect fungi)丝孢纲(Hyphomycetes)丛梗孢科(Moniliaceae)单端孢属(*Trichothecium Link ex Fries*).

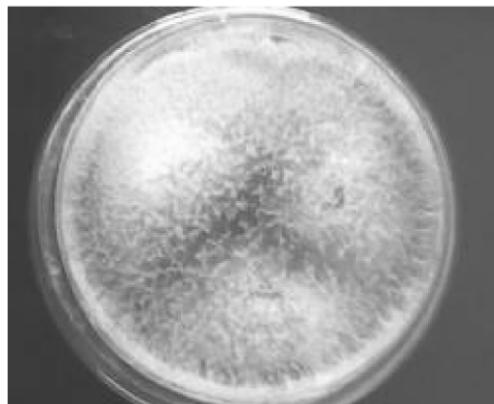


图 1 菌株 TL 在 PDA 培养基上 5 d 后的形态



图 2 菌株 TL 的分生孢子梗(100×)



图 3 菌株 TL 的菌丝(100×)

### 2.2 抗菌药物的单因素抑菌活性测试实验结果与分析

通过牛津杯法分别对 6 种供试药物进行抑菌活性测定,按照表 2 的各药物浓度进行药敏试验,结果有 4 种药物(两性霉素 B、制霉菌素、孔雀石绿、升汞)产生了抑菌圈,即对供试菌株 TL 有抑菌效果. 将未产生抑菌圈的药物浓度提高 10 倍仍不产生抑菌圈. 由此可以得出结论这 2 种药物(氨苄西林、链霉素)对供试菌株 TL 没有抑菌效果. 各药物各浓度的抑菌圈大小详见表 3.

由表 3 可以得知,抑菌圈直径随药物浓度增大而增大. 通过上述实验证明,可以将抑菌圈直径作为筛选供试药物的依据. 单因素试验结果表明:表 3 中 4 种药物均对供试菌株 TL 有抑菌作用,但是升汞由于具有强烈的毒性,不能作为常规组织培养的抑菌添加剂,所以不作进一步研究.

### 2.3 有重复观测值的正交试验

以筛选出来对菌株 TL 有抑菌作用的供试药物两性霉素 B、制霉菌素、孔雀石绿作为因素,每个因素取 3 个水平进行  $L_9(3^4)$  正交试验,留一个空白列作为“误差列”(见表 4)该 9 组试验均采用牛津杯法,以抑菌圈直径作为试验指标,得出正交试验抑菌结果.

表 3 药敏试验结果

供试药物	抑菌圈直径/mm			
	1	2	3	4
两性霉素 B	0	0	9.5	12
制霉菌素	0	0	14	19
孔雀石绿	0	0	7.5	18.5
升汞	0	15.5	21.5	29

表 4 因素水平表

水平	因素			
	两性霉素 B(A) /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	制霉菌素(B)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	孔雀石绿(C) /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	空白(D)
1	167	167	17	—
2	333	333	33	—
3	667	667	333	—

利用直尺测得各药物浓度组合抑菌圈大小数据(表5),各处理方差分析见表6.

表5 正交试验结果表

试验号	因素				抑菌圈直径大小/mm		
	A	B	C	D	单位组 I	单位组 II	Tl
1	1	1	1	1	8	9	17
2	1	2	2	2	15	15	30
3	1	3	3	3	25	25.5	50.5
4	2	1	2	3	14.5	14.5	29
5	2	2	3	1	27	27	54
6	2	3	1	2	17	17	34
7	3	1	3	2	25	24.5	49.5
8	3	2	1	3	14.5	14.5	29
9	3	3	2	1	16	15.5	31.5
T <sub>1</sub>	97.5	95.5	80	102.5	162	162.5	324.5(T)
T <sub>2</sub>	117	113	90.5	113.5			
T <sub>3</sub>	110	116	154	108.5			
$\bar{X}_{i1}$	16.25	15.9	13.3	17			
$\bar{X}_{i2}$	19.5	18.8	15.1	18.9			
$\bar{X}_{i3}$	18.3	19.3	25.7	18.1			

表6 方差分析表

变异来源	SS	df	MS	F	F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
A	32.54	2	16.27	154.95**	4.1	7.55
B	40.88	2	20.44	194.9759**	4.1	7.55
C	534.38	2	267.19	2544.67**	4.1	7.55
单位组	0.03	1	0.03	0.29	4.96	10.01
误差(e <sub>1</sub> )	10.08	2	5.04	45.82**		
误差(e <sub>2</sub> )	0.84	8	0.11			
综合	618.75	17				

F 检验表明两性霉素(A)、制霉菌素(B)、孔雀石绿(C)3个因素对 TL 的抑制作用都很显著,其中孔雀石绿(C)效果最显著,单位组间差异不显著.多重比较结果表明:两性霉素 B(A)、制霉菌素(B)、孔雀石绿(C)各水平抑菌圈直径大小差异都显著,各因素的最优水平为 A<sub>2</sub> B<sub>3</sub> C<sub>3</sub>,即它们的最优抑菌效果组合为两性霉素(A)333 μg/mL,制霉菌素(B)667 μg/mL、孔雀石绿(C)333 μg/mL.

### 3 讨论

#### 3.1 本研究的不足

由于研究以 PDA 培养基为分离纯化培养基,有些菌株对培养基有特异选择性,所以可能有些未知菌株并没有被分离出来.

利用传统方法通过观察菌种的形态特征进行初步鉴定有一定局限性,所鉴定出来的供试菌株 TL 需要运用现代分子生物学方法进行进一步鉴定.

#### 3.2 应该要注意的问题

(1) 在分离纯化过程中,由于不断地转接可能引起菌种的老化和退化,所以在分离纯化过程中应该尽量避免过多的传代次数,注意菌种的保藏工作.

(2) 在药敏试验中,应该充分考虑药物的自身特性(如光敏,热敏等),充分保证其原有的抗菌性,尽量做到药物现配现用,防止过多的人为干扰因素影响抑菌效果.

(3) 本研究需要严格的无菌操作,大多数实验器材需灭菌处理,超净工作台需用酒精擦拭然后紫外灯照射 15 min,实验过程严格按照好无菌操作规范,避免染菌.

(4) 牛津杯实验过程中,避免药物洒在培养基上面,液枪枪头不能有水珠,否则药物实际浓度被稀释

降低。

#### 4 结论

综上所述,本实验从蛇足石杉的内生真菌中分离提纯出 TL 优势菌,通过传统鉴定方法,此菌株为:半知菌亚门(Amon imperfect fungi)丝孢纲(Hyphomycetes)丛梗孢科(Moniliaceae)单端孢属(*Trichothecium Link ex Fries*)通过单因素实验及有重复观测值的正交试验,得出能用于蛇足石杉植物组培抑制该内生真菌的 3 种抗菌药物,他们分别是:两性霉素 B,制霉菌素和孔雀石绿,最后得出最优抗菌效果的药物组合为两性霉素 B333  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,制霉菌素 667  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、孔雀石绿 333  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 参考文献:

- [1] 鲁润龙,周忠泽,鲍时来,等.药用植物蛇足石杉的生物学特性[J].中国科技大学学报,1999,29(1):118-121.
- [2] 余红英,孙远明,杨跃进.草药蛇足石杉的研究进展[J].中草药,2001,32(3):279-281.
- [3] 洪思佳,王一涛,李铭源.石杉碱甲药理与临床研究进展[J].中药药理与临床,2007,23(1):83-86.
- [4] 李沛玲,郭水良.石杉科植物研究综述[J].安庆师范学院学报:自然科学版,2005,11(1):56-61.
- [5] STONE J K, BACON C W, WHITE J F. An Overview of Endophytic Microbes; Endophytism Defined [M]//BACON C W, WHITE J F R. Microbial Endophytes. New York: Marcel Dekker, 2000: 3.
- [6] 郭良栋.内生真菌研究进展[J].菌物系统,2001,20(1):148-152.
- [7] 石 玮,罗建平,丁振华,等.千层塔内生真菌分离鉴定的初步研究[J].中草药,2005,36(2):281-283.
- [8] 张 磊,万谦宏,高文远.石杉碱甲的研究进展[J].中草药,2005,36(9):1 422-1 426.
- [9] 冯正波.中国蛇足石杉资源调查与评估[J].自然资源学报,2005,20(1):59-67.
- [10] SZYPULA W, PIETROSIUK A, SUCHOCKI P, et al. Somatic Embryogenesis and in Vitro Culture of *Huperzia Selago* Shoots as a Potential Source of Huperzine A [J]. Plant Science, 2005, 168: 1 443-1 452.
- [11] 宋大新,范长胜,徐德强,等.微生物学实验技术教程[M].上海:复旦大学出版社,1992.
- [12] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [13] 卓 然.医学微生物实验学[M].第 2 版.北京:科学出版社,1998:26-29.
- [14] 戴自英.实用抗菌素学[M].上海:人民出版社,1977:19-27.
- [15] 徐英黔,宫瑞丰,刘理想.噻吩类杂环化合物抗白色念珠菌药敏研究[J].辽宁科技大学学报,2008,31(5):460-461.
- [16] 钱存柔,黄仪秀.微生物学实验教程[M].北京:北京大学出版社,2000:207-208.
- [17] 道 绪.生物统计附实验设计[M].第 3 版.北京,中国农业出版社,2001.

### Isolation and Identification of Endophytic Fungi TL from *Huperzia Serrata* and Antibiotics Sensitivity Research

ZHANG Lin<sup>1</sup>, WEI Zhi-gang<sup>2</sup>, QI Li-xia<sup>2</sup>, DU Juan<sup>2</sup>, QI Ke<sup>2</sup>, HU Song-ping<sup>2</sup>

(1, Science College of Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2, College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** Endophytic fungi was isolated from the plant *Huperzia serrata*. The strains was cultured through the medium of potato (PDA) and purified by three-point inoculation. Finally a dominant strain named TL was seleted as the tested strains. Through the observation of colony morphology and culture characteristics and microscopic morphology by photographic technology, TL was identified as Amon imperfect fungi, Hyphomycetes Moniliaceae, Trichothecium Link ex Fries according to the Identification Handbook of Fungus. Through the single-factor experiment and orthogonal test, the authors found the best combination of effective drug concentration with the best inhibitory effect on the tested strains.

**Key words:** *Huperzia serrata*; endophytic fungi; antimicrobial activity

(责任编辑 易必武)