一株片栗内生真菌的分离鉴定及其次级代谢产物对癌细胞的抑制作用

鲁群[1]，浅井禎吾[2]，大島吉輝[2]

（1.华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）（2.日本东北大学药学研究科，宫城仙台 980-8578）

摘要：本文采用组织分离法从片栗叶部分离获得一株内生真菌，通过 28s rDNA 序列测定和系统发育树分析对此菌株进行了鉴定。用 PD 培养基和 YM 培养基分别发酵培养此菌株，其次级代谢产物通过高效液相色谱（HPLC）和质谱（MS）进行了分析。在 YM 培养基条件下对此菌株大量培养，利用硅胶层析等手段对其次级代谢产物进行分离纯化，采用 MTT 法测定了次级代谢产物对癌细胞的毒性。结果表明，从片栗叶部分离得到的内生真菌鉴定为 *Eupenicillium* sp. NF2_PD013。经 HPLC 和 MS 分析表明，此内生真菌的次级代谢产物在 YM 培养基条件下比在 PD 培养基条件下丰富且产量大。从 YM 培养基条件下的次级代谢产物中分离得到 4 个化合物，分别为 geodin，dihydrogeodin，3'-chlorotrypacidin 和 monochlorosulochrin，4 个化合物均含有氯元素。化合物 geodin 和 3'-chlorotrypacidin 对乳腺癌细胞 MCF-7 和肝癌细胞 HepG2 都有明显的增殖抑制作用。

关键词：片栗；内生真菌；次级代谢产物；细胞毒活性

文章篇号：1673-9078(2016)1-22-28 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.004

Isolation and Identification of an Endophytic Fungus from *Erythronium japonicum* Decne and Inhibitory Effect of Secondary Metabolites on Carcinoma Cells

LU Qun[1], Teigo Asai[2], Yoshiteru Oshima[2]

(1.School of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan)

Abstract: An endophytic fungus was isolated from *Erythronium japonicum* Decne. Using a tissue separation method, and this fungus was identified by 28S rDNA sequencing and phylogenetic analysis. The strains were cultured in potato dextrose (PD) and yeast and malt extract (YM) media, and their secondary metabolites were analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). This strain was cultivated on a large scale in YM medium, while the secondary metabolites were separated and purified using silica gel chromatography. The cytotoxicity of the compounds isolated from secondary metabolites was determined by MTT assay. The endophytic fungus from *Erythronium japonicum* Decne. was identified as *Eupenicillium sp.* NF2_PD013. HPLC and MS analyses indicated that there were more secondary metabolites of this endophytic fungus in YM medium with a higher yield than those in PD medium. The four chlorine-containing compounds obtained from the secondary metabolites in YM medium were identified as geodin, dihydrogeodin, 3'-chlorotrypacidin, and monochlorosulochrin. Geodin and 3'-chlorotrypacidin showed significant inhibitory effects on the proliferation of breast cancer cells MCF-7 and hepatocellular carcinoma cells HepG2.

Key words: *Erythronium japonicum* Decne.; endophytic fungi; secondary metabolite; cytotoxicity

片栗，也称猪牙花（*Erythronium japonicum* Decne.），是百合科猪牙花属多年生草本植物，主要分布于中国东北部、日本、韩国等地。片栗的鳞茎含有淀粉，在日本被加工做成片栗粉，炸天妇罗时经常会使用，片栗粉的主要作用是作料理勾芡，增加食物的黏稠度和光泽度。目前，国内外关于猪牙花的研究甚少，蔡恩博等曾研究猪牙花乙醇提取物，报道称猪牙花乙醇提取物具有很强的抑菌和抗氧化活性[1]。

植物内生真菌（endophytic fungi）是指在其生活史中部分或者全部时期生活在植物体内，而不会引起

收稿日期：2015-02-11

基金项目：中国国家留学基金委项目

作者简介：鲁群（1987-），女，博士研究生，研究方向：天然产物化学

通讯作者：大島吉輝（1952-），男，博士，教授，研究方向：天然产物化学

宿主植物产生明显病害症状的一类真菌[2]。内生真菌一般存活在植物的果实、花、叶和根等组织中，可以通过严格的表面消毒从植物组织中分离获得。因为生活在植物内部，内生真菌具有相对稳定的生存条件，不易受外界环境的影响，并且能利用植物提供的营养，在长期的共生过程中与宿主植物建立了互利互惠的关系，内生真菌不仅能促进宿主植物体内代谢产物的形成，而且自身次级代谢产物也相当丰富[3]。1993 年 Stierle 等[4]从短叶红豆杉的韧皮组织中分离得到一株产抗癌物质紫杉醇的内生真菌（*Taxomyces andreanae*），证明了内生真菌可以合成与宿主植物相同或相似的活性物质。同时，也有研究表明从内生真菌分离得到的活性物质中有 50%以上是新化合物[5]。内生真菌能合成黄酮、生物碱、萜类、甾体等多种化合物，其中大多数化合物具有抗菌、抗癌、生物防治等活性[6]。

目前关于片栗的活性成分及其内生真菌资源的研究很少，宿主植物与内生真菌在代谢产物上的相互关系的报道也很有限。本文尝试从片栗的植物组织中分离内生真菌，对其进行发酵培养并分析了其次级代谢产物，进一步从次级代谢产物中分离得到主要的化合物，并测定了各化合物的抗癌活性，以期为片栗及其内生真菌资源的开发和利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与培养基

片栗（Erythronium japonicum Decne.）采自日本东北大学药用植物园，培养丝状真菌的基础培养基为马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）。分离内生真菌的培养基为 PDA 中加入氯霉素，氯霉素属抑菌性广谱抗生素，可以抑制其他杂菌的生长。发酵培养时使用液体 PD 培养基和 YM 培养基。

1.2 主要仪器设备

TP600 梯度 PCR 仪，日本 TaKaRa 公司；PRISM™ 310 测序仪，美国 ABI 公司；Nanodrop 2000 分光光度计，美国 Thermo 公司；L-2000 型高效液相色谱仪，日本 HITACHI 公司；JMS-700 型质谱仪，日本电子株式会社（JEOL）；ECA-600 型核磁共振波谱仪，日本电子株式会社（JEOL）；YXQ-LS-50S11 立式压力蒸汽灭菌器，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；3111CO_2 培养箱，美国 Thermo 公司；KA-1000 台式离心机，上海安亭科技仪器厂；DNM-9602G 酶标仪，北京普朗新技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 内生真菌的分离纯化

采用严格的表面消毒法分离植物中的内生真菌[7]。采摘的新鲜植物样品先用流水冲洗干净除去表面泥沙，然后取片栗叶部位放入 80%乙醇溶液中消毒 1 min，再放入 1%次氯酸钠溶液中消毒 5 min，最后放入 80%乙醇溶液中消毒 1 min。取出消毒后的植物组织，置于无菌培养皿中，剪取组织中间部分约 0.5 cm×0.5 cm 大小的小块贴放于分离培养用平板中，每皿 4 块。记录植物名、部位、日期等，置于 25 ℃的恒温培养箱静止培养。每日观察平板情况，待植物组织周围长出菌落，仔细观察菌落形态特征，用接种针挑取少量菌丝接种于新培养基中，置于恒温培养箱中 25 ℃培养。培养数日后再挑取菌落边缘的菌丝到新培养基中，如此反复纯化。

1.3.2 内生真菌的鉴定

内生真菌基因组 DNA 的提取参考 SDS 法[8]，稍加改进。在超净台中挑取大小约 1~2 cm^2 的菌体于无菌离心管中，研钵置于冰上，加入少量液氮，将菌体倒入液氮中，迅速研磨，转移至离心管中。向离心管中加入 200 μL TE 和 200 μL 溶菌液（2% SDS，0.1 mol/L NaCl，10 mmol/L EDTA，50 mmol/L Tris-HCl），涡旋，静置 5 min，15000 r/min 离心 30 s，上清液转移到另一个离心管中。加入 400 μL 抽提液，抽提液为苯酚/氯仿/异戊醇（体积比 25:24:1），除去核酸中的蛋白质。涡旋，15000 r/min 离心 5 min，上清液转移到另一个离心管中。分别加入 1 mL 无水乙醇和 40 μL 3 mmol/L NaAc 于离心管中，颠倒混合，15000 r/min 离心 15 min，舍弃上清液。加入 200 μL 70%乙醇，颠倒混合，15000 r/min 离心 5 min，舍弃上清液，得到内生真菌 DNA。

真菌大亚基上的 28s rDNA 分子中 D1/D2 区域序列长度适中，适用于真菌鉴定[9]。以提取的内生真菌 DNA 为模板，利用 rDNA 的保守序列设计引物，PCR 扩增未知真菌的 28s rDNA D1/D2 区域。引物为 NL1（5’-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3’）和 NL4（5’-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3’）。使用 Prime STAR 体系，总体积为 15 μL 的反应体系：Prime STAR 4.4 μL，引物 NL1 0.3 μL，引物 NL4 0.3 μL，模板 DNA 1 μL，双蒸水 9 μL。PCR 的反应条件为：98 ℃预变性 1 min；98 ℃变性 10 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 40 s，40 次循环；4 ℃保存 PCR 产物。

使用 QIAEX II 胶回收试剂盒对 DNA 片段进行回收。PCR 产物用 0.8%琼脂糖（Gene pure）凝胶进行

电泳，电泳后取出胶块放入染色盒中，用 ViewaBlue 染色液进行染色 10 min。染色后多次浸洗，切出被染色的目的 DNA 的琼脂糖凝胶。将切出的凝胶转移至离心管中，称量。向离心管中加入 3 倍凝胶重量的溶胶液 Buffer Q 和 10 μL QIAEX，涡旋混合。50 ℃加热融化凝胶 10 min，每 2 min 取出涡旋混合，使凝胶充分融化。4 ℃下 12000 r/min 离心 30 s，舍弃上清液，加入 500 μL Buffer Q，涡旋混合。4 ℃下 12000 r/min 离心 30 s，舍弃上清液，加入 500 μL Buffer PE，涡旋混合。重复上一步操作，舍弃上清液，自然条件下完全风干。加入 20 μL 超纯水，涡旋，静置 5 min，4 ℃下 12000 r/min 离心 30 s，上清液转移到另一个离心管中。

回收得到的 DNA 片段进行测序，得到样品的碱基序列，将序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 序列相似性搜索，下载相似性高的菌株的序列，使用软件 ClustalX 1.8 进行多序列对比，再用软件 MEGA5.10 进行聚类分析，采用邻位相连算法（Neighbor-Joining），通过自举分析（bootstrap）进行置信度检测，自展次数为 1000，选择 Kimura 2 双参数模型计算进化距离，构建系统发育树。

1.3.3 内生真菌的发酵培养

分别使用液体 PD 和 YM 培养基对真菌进行培养。挑取纯化后的内生真菌，接种于装有 60 mL 培养液的 200 mL 三角瓶中，置于 150 r/min 摇床 25 ℃培养。每天观察真菌的生长情况。

1.3.4 内生真菌次级代谢产物的分析及分离鉴定

待菌体不再增长，回收培养液。取 20 mL 培养液于离心管中，加等体积乙酸乙酯，摇匀，离心，吸取上次清液于旋蒸瓶，旋转蒸发干有机试剂。用 HPLC 和 MS 分析次级代谢产物情况，HPLC 使用 Mightysil RP-18 柱（250 mm×4.6 mm，1.0 mL/min），流动相为乙腈:水（20:80~100:0）。次级代谢产物经过分析后，对内生真菌进行大量培养，回收培养液，乙酸乙酯萃取两次，得到次级代谢产物粗提物，利用硅胶柱层析等方法分离纯化，得到多种化合物，利用 NMR、MS 等波谱手段鉴定化合物结构。

1.3.5 内生真菌次级代谢产物对癌细胞毒性的测定

采用 MTT 法[10]测定内生真菌的次级代谢产物对人乳腺癌细胞 MCF-7 和人肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制作用。两株癌细胞分别用含 10%新生小牛血清的 DMEM 培养液（含青霉素 100 U/mL，链霉素 100 g/mL），于 37 ℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养。当癌细胞生长到对数生长期并且细胞密度达到培养瓶底面积的 80%~90%时，用含 0.25%胰酶和 0.02%EDTA 的消化液将细胞消化下来，调整细胞浓度至 5×10^5 个/mL，按每孔 100 μL 接种至 96 微孔板。细胞于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱内培养 12 h 后，吸出孔内培养液，每孔加入不同浓度的样品溶液 100 μL，同时设细胞对照组。细胞继续培养 24 h 后，倒置显微镜下观察细胞形态，吸出孔内培养液，用 PBS 清洗两次，每孔加入含 10 μL MTT（0.1%）的无血清培养基 100 μL，在 37 ℃，0.5% CO_2 培养箱中孵化 4 h。孵化后小心吸去培养液，每孔加入 150 mL DMSO，置低速振荡器上震荡 10 min 使结晶物充分溶解。用酶标仪 490 nm 下测各孔吸光值，样品对癌细胞抑制率的计算：

抑制率（%）=（1-As/Ao）×100%

注：As 为样品组吸光值，Ao 为对照组吸光值。

1.3.6 数据分析

细胞毒活性实验数据采用软件 SPSS 13.0 计算平均值和标准偏差，结果以平均值±标准偏差表示。

2 结果与讨论

2.1 内生真菌的菌落特征

从片栗叶部分离纯化得到一株内生真菌，如图 1 所示，记为 PLY。菌株 PLY 的菌体生长较慢，菌丝体初呈白色，后转为棕黄色，表面呈褶皱状，菌落背面呈棕黄色，菌株产生代谢产物致使培养基呈黄色。



图 1 片栗叶部分离得到的内生真菌的照片

Fig.1 Endophytic fungus strain isolated from the *Erythronium japonicum* Decne. leaf

2.2 内生真菌的鉴定结果

提取片栗叶部内生真菌 PLY 的 DNA，以其为模板，在特异性引物的引导下，PCR 扩增出 28s rDNA D1/D2 片段，纯化后经测序仪测序，扩增片段长度为 614 bp，将碱基序列提交到 NCBI 数据库中进行 BLAST 序列相似性搜索，菌株 PLY 的碱基序列与 *Eupenicillium cinnamopurpureum*（AY213698），*Penicillium lagena*（AB047234），*Penicillium oxalicum*

（KJ939432），*Eupenicillium* sp. NF2_PD013（FJ800556），*Penicillium guttulosum*（HQ646592），*Penicillium menonorum*（HQ646591），*Penicillium parvulum*（EF422846），*Eupenicillium parvum*（AF033460）和 *Penicillium pimiteouiense*（AF037431）的序列相似率都达到 99%，构建系统发育树，结果显示菌株 PLY 与 *Eupenicillium* sp. NF2_PD013（FJ800556.1）在同一发育分支上，鉴定菌株 PLY 为 *Eupenicillium* sp. NF2_PD013。

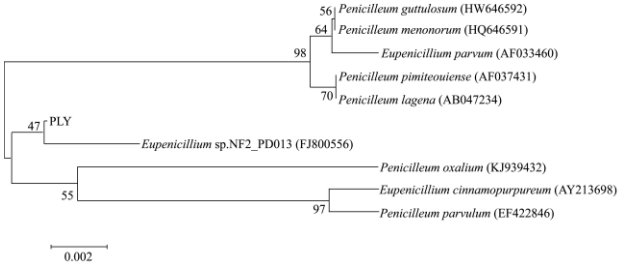


图 2 内生真菌 PLY 28s rDNA D1/D2 序列的聚类分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of 28s rDNA D1/D2 sequence of the endophytic fungus strain PLY

2.3 内生真菌次级代谢产物的分析

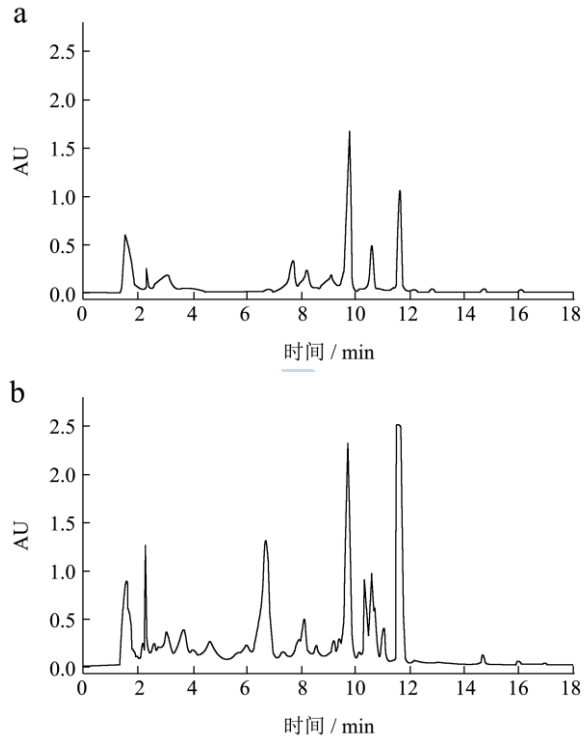


图 3 内生真菌 PLY 次级代谢产物的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms of secondary metabolites of the endophytic fungus strain PLY

注：a：PD 培养基；b：YM 培养基。

在 PD 和 YM 培养基条件下内生真菌 PLY 的次级代谢产物通过 HPLC 和 MS 进行分析，液相色谱图见图 3，质谱图见图 4。由图 3 可以看出，在 YM 培养基条件下内生真菌 PLY 的次级代谢产物比在 PD 培养基条件下丰富，并且产量高。

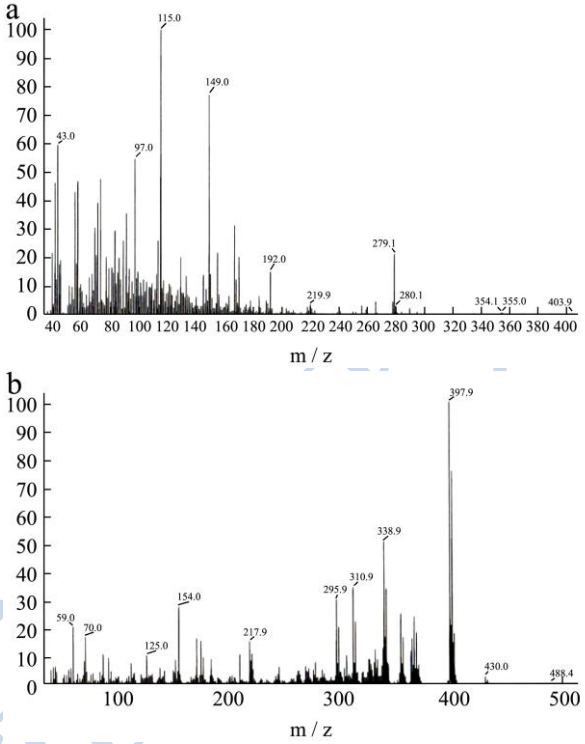


图 4 内生真菌 PLY 次级代谢产物的质谱图

Fig.4 Mass spectra of secondary metabolites of endophytic fungus strain PLY

注：a：PD 培养基；b：YM 培养基。

由图 4 可以看出，在 PD 培养基条件下内生真菌 PLY 的次级代谢产物的分子量较小，大多在 200 以下；而在 YM 培养基条件下，次级代谢产物的分子量增大，特别是在 m/z 300-400 之间，峰的数量明显增多。由图 4b 还可以看出，存在相邻碎片 m/z 397.9，398.9 和 399.9，提示 YM 培养基条件下内生真菌 PLY 的次级代谢产物中可能存在分子中含有两个氯原子的化合物。

综合上述分析，在 YM 培养基条件下的内生真菌 PLY 次级代谢产物值得进一步研究。

2.4 次级代谢产物的分离和结构鉴定

内生真菌 PLY 的次级代谢产物经过 HPLC 和 MS 分析之后，在 YM 培养基条件下进行大量培养。培养液回收后经乙酸乙酯萃取两次，旋转蒸发后得到培养液粗提物。取内生真菌 PLY 培养液粗提物，经硅胶柱层析，用环己烷-乙酸乙酯体系（39:1-19:1-9:1-0:1）洗脱，收集得到 4 个子馏分，依次记为 F1-F4。F1 经硅胶柱层析，用环己烷-乙酸乙酯梯度洗脱，收集合并后得到 4 个子馏分，依次记为 F11-F14。其中 F12 即为

化合物 1（PLY-1）；F13 经过制备 TLC（PTLC），以环己烷-乙酸乙酯（1:2）为展开剂，分离得到 4 个部分，依次记为 F131-F134。其中 F131 经过 PTLC，以氯仿-甲醇（19:1）为展开剂，纯化得到化合物 2（PLY-2）；F132 为化合物 3（PLY-3）。F2 经硅胶柱层析，用环己烷-乙酸乙酯（4:1）洗脱，得到化合物 4（PLY-4）。

共从内生真菌 PLY 培养液粗提物中分离得到 4 个主要化合物。通过对化合物的 NMR、MS 等波谱数据进行分析及相应的文献[11-14]数据比对，鉴定出化合物的结构，如图 5 所示，化合物 PLY-1 为 geodin，化合物 PLY-2 为 dihydrogeodin，化合物 PLY-3 为 3’-chlorotrypacidin，化合物 PLY-4 为 monochlorosulochrin，PLY-1 和 PLY-2 含有两个氯，PLY-3 和 PLY-4 含有一个氯，PLY-1 和 PLY-3 结构相似，PLY-2 和 PLY-4 结构相似。4 个化合物的核磁数据见表 1。

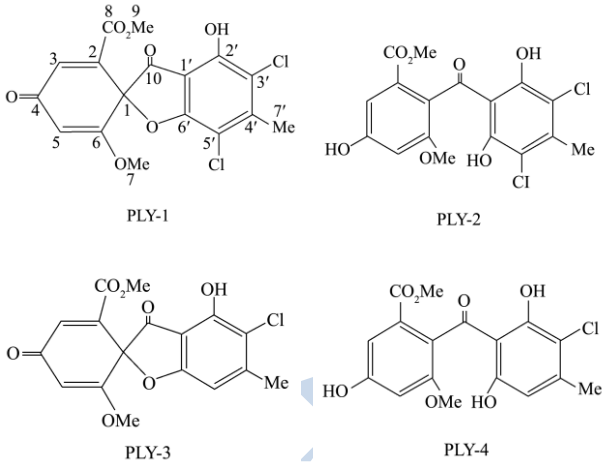


图 5 PLY 培养液粗提物中分离得到的化合物结构

Fig.5 Chemical structures of the compounds isolated from the crude PLY extracts

表 1 PLY 培养液粗提物中分离得到的化合物的 NMR 数据

Table 1 NMR data of the compounds isolated from the crude PLY extract

编号	PLY-1		PLY-2		PLY-3	PLY-4
	^{13}C	^{1}H	^{13}C	^{1}H	^{1}H	^{1}H
1	84.5		125.2			
2	137.5		128.7			
3	137.0	7.13（1H,d,*J*=1.5 Hz）	108.2	7.03（1H,d,*J*=2.1Hz）	7.14（1H,s）	7.00（1H,d,*J*=1.4Hz）
4	185.0		157.3			
5	104.4	5.81（1H,d,*J*=1.5 Hz）	103.4	6.64（1H,d,*J*=2.1Hz）	5.82（1H,s）	6.63（1H,d,*J*=1.4Hz）
6	165.5		158.5			
7	57.0	3.69（3H, s）	56.1	3.71（3H,s）	3.71（3H,s）	3.69（3H,s）
8	167.9		166.4			
9	53.1	3.73（3H, s）	52.3	3.72（3H,s）	3.73（3H,s）	3.70（3H,s）
10	193.2		199.7			
1’	109.4		110.1			
2’	149.3		154.3			
3’	108.8		113.0			
4’	146.5		142.0			
5’	114.7		113.0		6.53（1H,s）	6.32（1H,s）
6’	163.3		154.3			
7’	18.7	2.56（3H,s）	18.8	2.51（3H,s）	2.45（3H,s）	2.32（3H,s）

2.5 次级代谢产物对癌细胞的增殖抑制作用

通过 MTT 实验测定了内生真菌 PLY 次级代谢产物中分离得到的 4 个化合物对癌细胞 MCF-7 和 HepG2 的增殖抑制作用，结果见图 6。

由图 6a 可以看出，浓度大于 10 μg/mL 时，PLY-1 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的增值抑制效果非常明显，浓度达到 40 μg/mL 时已达到最高抑制效果。PLY-2 对细胞增值抑制效果随着浓度的增加而逐渐增强，但增殖抑制效果弱于 PLY-1。PLY-3 是样品中增殖抑制效果最强的，且从低浓度开始就有很强的抑制效果，浓度达到 20 μg/mL 时已达到最高抑制效果。PLY-4 对细胞增值抑制效果随着浓度的增加而逐渐增强，但增殖抑制效果弱于 PLY-3。整体上看，PLY-3 对乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖抑制作用最强；浓度高于 10 μg/mL 时，PLY-1 和 PLY-3 的增殖抑制效果明显强于 PLY-2 和

PLY-4。

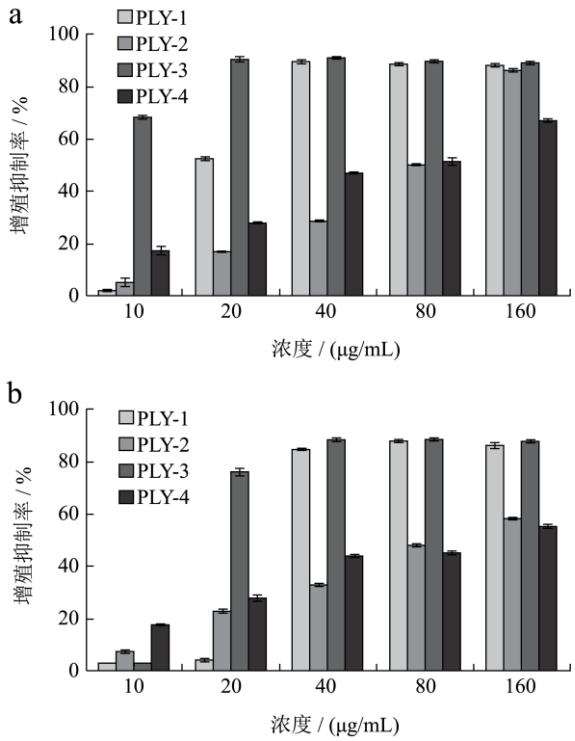


图 6 内生真菌 PLY 次级代谢产物对癌细胞的增殖抑制效果

Fig.6 Effects of secondary metabolites of endophytic fungus strain PLY on cell proliferation

注：a: MCF-7; b: HepG2。

由图 6b 可以看出，浓度在 10 μg/mL 时，4 个样品对人肝癌细胞 HepG2 的增殖基本没有抑制作用。浓度达到 40 μg/mL 时，PLY-1 的细胞增值抑制作用明显增强，基本已达到最高抑制效果。PLY-2 对细胞增值抑制作用随着浓度的增加而逐渐增强，低浓度时抑制效果略强于 PLY-1，高浓度时抑制作用明显弱于 PLY-1。浓度在 20 μg/mL 时，PLY-3 的抑制效果明显增强，说明从低浓度开始就有很强的抑制作用，浓度达到 40 μg/mL 时已达到最高抑制效果。PLY-4 的抑制作用随着浓度的增加而逐渐增强，但抑制效果弱于 PLY-1 和 PLY-3。整体上看，浓度达到 40 μg/mL 后 PLY-1 和 PLY-3 的抑制效果明显强于 PLY-2 和 PLY-4。

结果表明，内生真菌 PLY 次级代谢产物中分离得到的 4 个化合物对癌细胞 MCF-7 和 HepG2 都有一定的增殖抑制作用，其中化合物 PLY-1 与 PLY-3 具有很强的抑制作用。PLY-1 与 PLY-3 化学结构相似，PLY-2 与 PLY-4 化学结构相似，PLY-1 和 PLY-3 对癌细胞的增殖抑制作用明显强于 PLY-2 和 PLY-4，推测 PLY-1 与 PLY-3 的化学结构比 PLY-2 与 PLY-4 更能对癌细胞的增值产生抑制作用，对于化合物结构与抑制作用的相互关系及癌细胞增殖抑制作用机制，还有待于进一步深入研究。

3 结论

从片栗叶部分离纯化得到一株内生真菌 PLY，菌落呈白黄色且能分泌黄色代谢物，经分子鉴定此菌株为 *Eupenicillium* sp. NF2_PD013。分析了内生真菌 PLY 分别在 PD 和 YM 培养基条件下的次级代谢产物，YM 培养基条件下的次级代谢产物比 PD 培养基条件下的次级代谢产物种类多、产量大，推测 YM 培养基条件下的次级代谢产物中可能含有氯元素。从 YM 培养基条件下的次级代谢产物中分离纯化得到 4 含氯个化合物，geodin，dihydrogeodin，3’-chlorotrypacidin 和 monochlorosulochrin。4 个化合物对乳腺癌细胞 MCF-7 和肝癌细胞 HepG2 都有一定的增殖抑制作用，且随着样品浓度的增加，增殖抑制作用明显增强，其中化合物 geodin 和 3’-chlorotrypacidin 具有显著的癌细胞增殖抑制作用，其抗癌机制值得深入研究，具有开发成保健品或药品的潜力。

参考文献

[1] 蔡恩博,赵岩,杨智慧,等.猪牙花乙醇提取物抑菌活性、抗氧化作用及猪牙花中微量元素的测定[J].食品科学, 2010, 31(17):60-63
CAI En-bo, ZHAO Yan, YANG Zhi-hui, et al. Antibacterial and hydroxyl radical scavenging activities and trace element determination of ethanol extract from *Erythronium japonicum* Decne [J]. Food Science, 2010, 31(17): 60-63

[2] 谢仰熹,刘先意,郭子强,等.苍耳内生真菌的分离鉴定及抗菌活性研究[J].现代食品科技,2012,28(9):1142-1145
XIE Yang-xi, LIU Xian-yi, GUO Zi-qiang, et al. Isolation, identification and antimicrobial activity of endophyte fungi from plant *Xanthium sibiricum* Patr [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(9): 1142-1145

[3] Zhu YY, Ai C, Zhang J, et al. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi in plants [J]. Progress in Chemistry, 2011, 23(4): 704-730

[4] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew [J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216

[5] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive procducts [J]. Microbes and Infection, 2003, 5(6): 535-544

[6] Joseph B, Priya RM. Bioactive compound from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review [J]. American Journal of Biochemistry and

Molecular Biology, 2011, 1(3): 291-309

[7] Miller KI, Chen Q, Man-Yuen SD, et al. Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity [J]. Microbial Ecology, 2012, 64(2): 431-449

[8] 陈丹,苏林娟,陈思雅.一株茶树叶部内生木霉的分离和鉴定[J].福建林业科技,2010,37(2):15-18
CHEN Dan, SU Lin-juan, CHEN Si-ya. Isolation and identification of an endophytic *Trichoderma* from tea plants (*Camellia sinensis*) Leaf [J]. Journal of Fujian Forestry Science and Technology. 2010, 37(2): 15-18

[9] 马爱瑛. rDNA 分析在真菌分类鉴定中的应用[J].安徽农业科学,2010,38(32):18079,18081
MA Ai-ying. Application of rDNA analysis in the classification and identification of fungus [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(32): 18079, 18081

[10] 陈健,向莹.滑子菇多糖的免疫活性及抗肿瘤作用[J].现代食品科技,2013,29(8):1800-1804
CHEN Jian, XIANG Ying. Immunological and antitumor activities of the polysaccharides from *Pholiota nameko* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1800-1804

[11] Katoh T, Ohmori O. Studies toward the total synthesis of Sch 202596, an antagonist of the galanin receptor subtype GalR1: synthesis of geodin, the spirocoumaranone subunit of Sch 202596 [J]. Tetrahedron Letters, 2000, 41(4): 465-469

[12] 张继文,杨春平,姬志勤,等.苦皮藤内生真菌 Hd3 菌株抑菌活性成分分离及结构鉴定[J].农药学学报, 2009, 11(2): 225-229
ZHANG Ji-wen, YANG Chun-ping, JI Zhi-qin, et al. Isolation and identification of the antibacterial composition from the fermentation broth of endophytes in *Celastrus angulatus* (Strain Hd3) [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2009, 11(2): 225-229

[13] Inamori Y, Kato Y, Kubo M, et al. Studies on metabolites produced by *Aspergillus terreus* var. *aureus*. I. chemical structures and antimicrobial activities of metabolites isolated from culture broth [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1983, 31(12): 4543-4548

[14] Liu DH, Yan L, Ma, LY, et al. Diphenyl derivatives from coastal saline soil fungus *Aspergillus iizukae* [J]. Archives of Pharmacal Research, 2014, Ahead of Print

现代食品科技