

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201712030

引文格式: 邓振山, 高飞, 刘玉珍, 等. 一株酸枣内生菌的鉴定及其抗菌活性物质的初步分离 [J]. 广西植物, 2018, 38(11): 1486–1492
DENG ZS, GAO F, LIU YZ, et al. Identification of an endophytic strain from *Ziziphus jujube* and preliminary separation of its antimicrobial active substances [J]. *Guihaia*, 2018, 38(11): 1486–1492

一株酸枣内生菌的鉴定及其抗菌活性物质的初步分离

邓振山*, 高飞, 刘玉珍, 魏婷婷, 李静, 李征霆

(延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000)

摘要: 为了从酸枣中筛选出内生菌并分析其代谢产物中的活性成分,用于开发和生产药物,该研究通过组织块分离法和划线分离法,从陕北野生酸枣植株体内分离得到内生菌,采用平板对峙法测定其对7株供试指示菌的抗菌活性,以心神宁片提取液为对照,对各拮抗菌株的发酵液进行薄层层析和高效液相色谱分析。结果表明:从野生酸枣中共分离得到121株内生菌,其中内生细菌49株,内生放线菌6株,内生真菌66株;通过抗菌试验,发现54株内生菌(细菌33株,真菌21株)对1~7种指示菌具有抗菌活性,占分离菌株总菌数的44.63%,其中A-04、A-05、B-03、C-03、C-06和D-04共6株菌株的抗菌谱较广,对7种供试指示菌均具有抑菌活性;薄层层析检测结果显示菌株B-03发酵产物在 R_f 值为0.46处有与酸枣提取液层析带迁移率相同的显色带,液相色谱分析结果显示其属于黄酮类物质;通过16S rRNA基因序列分析结果显示菌株B-03与*Bacillus axarquiensis*的相似性为99%。菌株B-03能发酵产生黄酮类或产生与黄酮类类似的化合物,表明酸枣内生菌具有合成黄酮类药物的潜力。

关键词: 酸枣, 内生菌, 代谢产物, 黄酮类物质

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)11-1486-07

Identification of an endophytic strain from *Ziziphus jujube* and preliminary separation of its antimicrobial active substances

DENG Zhenshan*, GAO Fei, LIU Yuzhen, WEI Tingting, LI Jing, Li Zhengting

(College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China)

收稿日期: 2018-05-28

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程项目(2016TTC-N-3-1); 延安市科技局重大专项项目(2014CGZH-06); 陕西省教育厅服务地方专项计划项目(16JF029); 延安市菌草工程研究中心专项基金; 延安市生物资源开发与利用科技创新团队专项基金; 延安大学“陕北微生物资源与利用研究中心”科研机构专项基金; 延安大学产学研合作研发项目 [Supported by Science and Technology Coordinating Innovation Program of Shaanxi (2016TTC-N-3-1); Major Special Program of Yan'an City(2014CGZH-06); Service Local Special Plan Program of the Department of Education of Shaanxi Province (16JF029); Special Fund of Juncao Engineering Research Center of Yan'an City; Special Fund of Technology Innovation Team for the Development and Utilization of Biological Resources of Yan'an City; Special Fund Scientific Research Institutions “North of Shaanxi Microbial Resources and Utilization Research Center” of Yan'an University; Fund for Research Cooperative and Development Program in Yan'an University]。

作者简介: 邓振山(1969-),男,陕西黄陵人,博士,副教授,主要从事植物内生菌资源开发和利用及环境微生物研究,(E-mail) zhenshandeng214@163.com。

*通信作者

Abstract: The purpose of this study was to identify endophytic strains from *Ziziphus jujube* and analyze the active components of their metabolites for the development and production of drugs. Wild *Ziziphus jujube* plants from North Shaanxi were adopted as experimental materials, and endophyte strains were isolated by approaches of tissue separation and streak plate, then they were screened and tested on the bacteriostatic activity by adopting indicators of seven strains from face-to-face cultivation in PDA media. The fermentation liquor of antagonistic strain was detected using thin layer, chromatography(TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The experimental results showed that a total number of 121 strains of endophytes were isolated from *Ziziphus jujube*, including 49 strains of endophytic bacteria, 6 strains of endophytic actinomycetes, and 66 strains of endophytic fungi. Among of them, 54 strains (33 bacteria and 21 fungi) had obvious antagonistic activity against 1-7 indicative bacteria, accounting for 44.63% of the total, and six strains (A-04, A-05, B-03, C-03, C-06 and D-04) had a broad spectrum of antibacterial and antibacterial activity against seven strains of indicator microbes. Results from the analysis of TLC and HPLC showed that liquor in B-03 strain has the same color band with the migration rate of *Ziziphus jujube* extract in R_f value of 0.46, and its belonged to flavonoids. According to 16S rRNA gene sequences analysis. The similarity between strain B-03 and *Bacillus axarquiensis* was 99%. The strain of B-03 could produce flavonoids or similar compounds, which showed that the endophytes from *Ziziphus jujube* had the potential ability to produce new drugs of flavonoids.

Key words: *Ziziphus jujube* var. *spinosa*, endophyte, product of metabolism, flavonoids

植物内生菌是定植于健康植物组织内,不引起明显外观病症的一类微生物(Chihaoui et al, 2015; Mufti et al, 2015)。迄今为止已发现的内生菌普遍存在于高等植物中,主要包括三类即内生细菌、内生真菌和内生放线菌(Pandya et al, 2015)。内生菌与药用植物在长期的协同进化过程中一方面形成了特殊的互惠共生关系,内生菌对药用植物的生长、道地性、产量、质量、功效成分、抗逆性等方面都产生了重要影响;另一方面,药用植物内生菌自身产生的一些药用活性物质,在新药研发、菌肥开发、生防菌研发、工业化酶生产应用等方面都显示出巨大的开发潜力。我国药用植物资源极为丰富,其中蕴含着大量不为人知的内生菌类群,这一宝贵资源亟待人们去探索与开发(邢晓科, 2018)。Stierle et al(1993)的研究结果表明内生菌能产生与宿主植物相同或相似的药用活性物质。之后,陆续有相关的研究报道如从植物内生菌中发现抑菌、抗肿瘤等活性物质。从植物内生菌中分离得到的活性物质约有 51% 为新化合物(罗红丽等, 2012)。由此可见,药用植物内生菌在活性物质分离方面具有重要的研究价值。

酸枣(*Ziziphus jujube* var. *spinosa*),为鼠李科枣

属植物,果肉、种仁、叶和根均可入药,具有养肝静心、安神敛汗的作用,经济与药用价值极高(郑强卿等, 2014)。近年来,关于酸枣仁生物碱及脂肪酸类成分的研究很多,如从酸枣种仁中分离出环肽类生物碱 jubanine(Pandey & Sin, 2008)。迄今为止,大多对酸枣的研究主要集中在酸枣仁的药理药效和化学成分方面(曹琴和王凯伟, 2009),而关于酸枣产生药用活性成分内生菌的报道则鲜见有报道。因此,本研究以陕北野生酸枣植株为材料,从中分离筛选出具有抗菌活性的菌株,并对其次生代谢产物进行初步研究,以期寻找新型化合物产生菌和开发利用新型活性物质提供重要线索。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 新鲜野生酸枣植株体(包括根在内),于 2013 年 4—11 月份采自陕西省延安市延安大学文汇山和凤凰山,取样后避光保存于 4℃ 下,2 d 内处理完毕。

1.1.2 指示菌株 本研究所用的指示菌株均由延安大学医学院提供,保藏于延安大学生命科学学

院微生物实验室中,具体见表 1。

表 1 供试指示菌株

Table 1 Tested indicator microbe

菌株编号 Code of strain	种名 Species name
F-01	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
F-02	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
F-03	伤寒杆菌 <i>Salmonella enterica</i>
F-04	柠檬色葡萄球菌 <i>Staphylococcus citreus</i>
F-05	福氏痢疾杆菌 <i>Shigella boydii</i>
F-06	白色葡萄球菌 <i>Staphylococcus albus</i>
F-07	白色念珠菌 <i>Monilia albican</i>

1.1.3 供试培养基 固体分离培养基:(1)牛肉膏蛋白胨培养基;(2)马铃薯葡萄糖琼脂培养基;(3)高氏 I 号培养基;(4)察氏培养基;(5)水琼脂培养基;(6)改良无机盐淀粉培养基(可溶性淀粉 2 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4$ 0.5 g, KNO_3 1 g, NaCl 0.4 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.2);(7)酵母膏培养基(酵母浸膏 0.25 g, K_2HPO_4 0.5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.2);(8)液体发酵培养基(PDA 不加琼脂)。

1.2 方法

1.2.1 内生菌的分离与纯化

1.2.1.1 内生真菌的分离纯化 内生真菌的分离采用组织块法(张新国等,2016)。分离材料用自来水冲洗,进行预处理,然后依次用 95% 的酒精浸泡 1~5 min 后无菌水冲洗 4~5 次,0.1% 的升汞浸泡 3~8 min 后无菌水冲洗 7~8 次,75% 的酒精浸泡 3~5 min,无菌水冲洗 4~5 次进行表面消毒。最后在无菌状态下切成 0.2 cm×0.2 cm 的小块,接到 PDA 固体培养基中,每平板接 2~4 个组织,于 (27±1)℃ 恒温静置培养 2~3 d;观察材料切口处菌丝(菌落),挑取切口处菌丝,转接到新的 PDA 培养基上继续培养,然后对所分离的内生真菌进行纯化,纯化后转接到 PDA 斜面上编号并保存。同时,将最后一次淋洗的无菌水涂布在培养基上作为对照,于恒温培养箱中静置培养,检验表面消

毒效果。

1.2.1.2 内生细菌的分离纯化 采用组织块分离法和划线分离法对酸枣中的内生细菌进行筛选(刘学周等,2014),在超净工作台下对酸枣植株体表面进行消毒,表面消毒方法同内生真菌。将表面消毒好的材料在无菌状态下切成 0.2 cm×0.2 cm 的小块,接到牛肉膏蛋白胨固体培养基和高氏 I 号培养基中,每平板接 2~4 个组织,于 (27±1)℃ 恒温静置培养 2~3 d。待培养基中有可见菌落时,挑取周围菌落移入相应培养基纯化,并进行菌落形态描述和编号,于 4℃ 冰箱中保存备用。将最后一次冲洗的无菌水涂布于培养基上作为对照,于恒温静置培养,检验消毒效果。

1.2.2 内生菌抗菌活性测定 采用打孔注入法测定上述分离得到的内生菌的抗菌活性。将分离纯化好的内生菌菌种和 7 株供试指示菌分别接种于 PDA 平板上,待菌株生长旺盛后,用接种环挑取少量菌体,接种于已灭菌的发酵培养基中,置于恒温摇床上振荡培养,温度 28℃,转速 160 r·min⁻¹,振荡培养时间 1~2 d 后,用已灭菌的棉签将供试指示菌均匀涂布于 PDA 固体培养基上,在涂好的培养基上用已灭菌的打孔器(r=0.5 cm)在四周打上四个孔,用移液枪将待测的内生菌发酵液注入孔中,以注入无菌水为对照,置于 28℃ 恒温培养箱中培养 2~3 d 后,观察各菌株的抑制作用,待抑菌圈不再变化时,用刻度尺测量抑菌圈大小(邓振山等,2016;郑艳等,2016)。

1.2.3 活性菌株液体发酵及产物的提取 从斜面挑取纯化拮抗菌种接种于 PDA 液体发酵培养基中,置于恒温摇床上振荡培养,温度 (27±1)℃,转速 160 r·min⁻¹,振荡培养 6~7 d 后,用 16 层纱布过滤,分为菌体和发酵液两部分,发酵液先后用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取,于旋转蒸发器中减压浓缩至 5 mL 左右,再用 5 mL 甲醇溶解,所得液体经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,浓缩后于 4℃ 冰箱中保存备用(姚晓玲等,2014)。

1.2.4 薄层层析(TLC)分析 对上述分离得到的样品进行 TLC 分析,展开剂为氯仿:甲醇(8:1, v/v),用碘粉熏蒸显色,并通过紫外光下的显色反应作进一步验证(梅宇飞等,2012)。

1.2.5 高效液相色谱(HPLC)分析 分别取少量芦丁甲醇溶液、菌株发酵液和心神宁片提取液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,再进行 HPLC 分析。HPLC 分析的检测条件:Shimadzu ODS C18 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流动相为甲醇:0.2% 磷酸溶液($v:v$) = 1:1,进样量 10 μL ,流速 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 260 nm(张仁堂等,2012)。

表 2 PCR 反应体系

Table 2 PCR reaction system

试剂 Reagent	50 μL
2 \times Es Taq MasterMix (Dye)	25 μL
P1	2 μL
P6	2 μL
模板 DNA Template DNA	2 μL
ddH ₂ O	19 μL

表 3 PCR 反应条件

Table 3 PCR reaction conditions

步骤 Step	温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	时间 Time
预变性 Initial denaturation	94	5 min
变性 Denaturation	94	30 s
退火 Annealing	55	30 s
延伸 Extension	72	30 s
终延伸 Final extension	72	3 min

1.2.6 菌株 B-03 的鉴定 (1)形态特征观察:将菌株 B-03 划线接种在牛肉膏蛋白胨培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察记录单菌落形态;采用革兰氏染色法判断是革兰氏阴性还是阳性菌。(2)分子鉴定:对 B-03 菌株 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增(正向引物 P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAGAACGAACGCT-3',反向引物 P6:5'-TACGGCJ'ACCTTGTTACGACTTACACCC-3'),PCR 反应体系及条件见图 2 和图 3。将 PCR 扩增产物送至上海

生工生物工程股份有限公司测序,所得序列与 GenBank 数据库进行比对,采用 MEGA5.0 软件构建系统进化树,分析菌株的系统发育学特征,获得 GenBank 登录号(王艳等,2017)。

2 结果与分析

2.1 酸枣内生菌的分离结果

对酸枣植株体进行内生菌分离,得到 121 个菌株。其中从叶中分离到 38 株,分别为 C-01~C-38,占分离总菌数的 31.40%,从根中分离到 34 株,占分离总菌数的 28.10%,从茎中分离到 29 株,占分离总菌数的 23.97%,从果实中分离到 20 株。可见酸枣叶中分离的内生菌最多,果实中的最少。分离得到内生真菌 66 株,占总菌数的 54.55%,细菌 49 株,占总菌数的 40.50%,放线菌 6 株,占总菌数的 4.96%,可见本研究从酸枣中分离的内生真菌最多,细菌次之,放线菌最少见。

2.2 抗菌活性的测定结果

抗菌活性结果表明,从酸枣植株体分离的 121 株内生菌中有 54 株对一种或多种指示菌具有一定的抑制作用,占筛选菌株的 44.63%。表 3 列举了 15 株不同内生菌的抗菌测试结果,它们多数具有广谱抗性。由表 5 可知,A-04、A-05、B-03、C-03、C-06 和 D-04 这 6 株内生菌对 7 种指示菌均有不同程度的抑制效果,占筛选菌株的 13.33%,结果表明这 6 株内生菌具有较广的抗菌谱和较高的抗性。其中菌株 B-03 抑菌效果最明显,最大抑菌圈直径达到 35 mm,因此将其选作进一步研究的菌株。

2.3 TLC 分析结果

薄层层析(TLC)检测结果表明,菌株 B-03 在 R_f 为 0.46 处有与心神宁片提取液颜色相同,迁移率相当的显色斑,紫外光下显黄色荧光,初步判断 B-03 菌株具有能够发酵产生与心神宁片中相似的部分化学物质的能力。

2.4 HPLC 分析结果

经过分离纯化的发酵产物的 HPLC 图谱显示,芦丁标准品在保留时间 $R_f = 5.015$ min 处有一主要吸收峰,心神宁片提取液出峰顺序依次为组分 A

表 4 酸枣不同组织中内生菌的分离结果

Table 4 Results of isolating endophytic from different tissues of *Ziziphus jujube*

类别 Sort	分离部位数量 Number of endophytes in different tissue					菌株总计 Total strains isolated
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	果实 Fruit		
内生细菌 Entophytic bacteria	13	12	15	9		49
内生真菌 Entophytic actinomycete	18	16	22	10		66
内生放线菌 Entophytic fungi	3	1	1	1		6
菌株总计 Total strains isolated	34	29	38	20		121

表 5 内生菌对供试指示菌的抑制作用

Table 5 Inhibition of endophytes against test indicator

分离部位 Isolation tissue	菌株编号 Code of strain	抑菌圈直径 Antibiotic circle diameter (d, mm)						
		供试指示菌 Microbe as indicator of inhibitory test						
		F-01	F-02	F-03	F-04	F-05	F-06	F-07
根 Root	A-04	++	+++	+++	+	+	++	++
	A-05	++	++	+++	+++	++	+++	+
	A-08	—	++	—	++++	++	+++	—
	A-24	—	—	—	++	++	++	—
	A-34	++	—	+	++	—	—	++
茎 Stem	B-02	—	+	—	++	—	+	—
	B-03	++	++	++++	+++	++	++	++
	B-06	—	+	—	—	++	+	—
	B-07	—	++	—	+	—	++	+
	B-08	+	+	+++	+	++	++	++
叶 Leaf	C-03	+	+	++	++	+	+	—
	C-06	+	+	++	++	+	+	+
果实 Fruit	D-01	—	+	—	+	—	+	++
	D-04	+	++	++	++	++++	+	++
	D-08	—	+	—	++	+	—	+

注: 抑菌圈直径 “+” 表示 $d \leq 10$ mm; “++” 表示 $10 \text{ mm} < d \leq 20$ mm; “+++” 表示 $20 \text{ mm} < d \leq 30$ mm; “++++” 表示 $d > 30$ mm; “—” 表示无抗性。

Note: Antibiotic circle diameter “+” means $d \leq 10$ mm; “++” means $10 \text{ mm} < d \leq 20$ mm; “+++” means $20 \text{ mm} < d \leq 30$ mm; “++++” means $d > 30$ mm; “—” means none inhibitory activity.

在保留时间 $R_f = 2.015$, 组分 B 在保留时间 $R_f = 2.375$, 组分 C 在保留时间 $R_f = 2.952$, 组分 D 在保

留时间 $R_f = 3.394$, 组分 F 在保留时间 $R_f = 4.986$ 各有一主要吸收峰。菌株 B-03 的发酵产物的出峰顺

序依次为组分 a 在保留时间 $R_f = 2.023$, 组分 b 在保留时间 $R_f = 3.398$, 组分 c 在保留时间 $R_f = 3.932$, 组分 d 在保留时间 $R_f = 5.782$ 各有一主要吸收峰。由此可知, 组分 a 与 A、b 与 D 的保留时间接近, 组分 d 与芦丁标准品主要吸收峰保留时间接近, 初步判断该菌株能够发酵产生与心神宁片成分相似的黄酮类物质。

2.5 菌株 B-03 的鉴定

2.5.1 形态特征观察 菌株 B-03 在牛肉膏蛋白胨培养基上形成的菌落呈淡黄色, 不透明, 不粘稠, 边缘整齐; 通过光学显微镜观察发现菌体呈杆状, 革兰氏染色呈阳性。

2.5.2 分子鉴定 菌株 B-03 的 16S rRNA 序列(登陆号 KY848236) 与 GenBank 数据库进行 Blast 比对分析, 与其同源性较高的菌株均属于芽孢杆菌属, 其中与 *Bacillus axarquiensis* 同源性最高(99.3%)。

3 讨论

本研究结果表明酸枣根、茎、叶、果实组织中均存在大量内生菌, 其中一部分内生菌对人体 7 种常见致病菌具有不同程度的活性抑制作用, 这与毕江涛等(2012)植物内生菌具有抗菌活性的结果是一致的, 表明药用植物酸枣内生菌具有广泛的抗菌活性, 为筛选具有广谱性和选择性的抗菌药物提供了资源。然而, 在筛选优势内生菌方面, 对传统的筛选条件还有待于进一步改进, 采用新型的筛选方法和技术, 从而充分挖掘优势植物内生菌资源。

王梅霞等(2003)发现银杏内生菌可以产生黄酮类化合物; 杨晓军等(2006)从湖北恩施蛇足中分离到 1 株真菌, 并从其发酵液中得到一种异黄酮。这进一步证明了药用植物内生菌具有产生与宿主活性成分相同或相似化合物的能力。然而, 由于实验过程中提取方法、展开剂、显色剂、柱压等条件的限制, 菌株 B-03 的次级代谢产物也并非仅限于黄酮类化合物, 故仍需利用其它生物化学手段进行提取、纯化、鉴定, 从而充分挖掘该菌株次级代谢产物的多样性。

本研究采用薄层层析、高效液相色谱等方法对产与心神宁片化学成分相同或相似化合物的内生菌次级代谢产物进行分析, 但并未涉及其他拮抗菌株产抑菌活性物质的研究。因此, 还需要从以下几个方面对酸枣内生菌进行研究: (1) 对供试菌有较强抑制作用的内生菌生物防治方面的进一步研究; (2) 菌株 B-03 发酵液中所含成分的进一步鉴定, 发酵条件和提取方法的优化; (3) 菌株是否具有药用活性, 以便为今后利用内生菌发酵生产天然药用活性成分提供有利的理论依据。相对于已经有很多研究的其它微生物来说, 药用植物内生菌作为一类新的微生物资源具有很好的开发潜力及潜在的商业价值。

参考文献:

- BI JT, LI P, MA F, et al, 2012. Isolation of endophytic fungi from *Ammopiptanthus mongolicus* Cheng f. and its microbial inhibition activity [J]. Chin Agric Bull, 28(30): 40-48. [毕江涛, 李萍, 马飞, 等, 2012. 濒危药用植物沙冬青内生真菌分离及其抑菌活性初步研究 [J]. 中国农学通报, 28(30): 40-48.]
- CAO Q, WANG KW, 2009. Studies on the chemical constituents of the seeds of *Zizyphus jujuba* Mill [J]. J Pharm Pract, 27(3): 209-210, 213. [曹琴, 王凯伟, 2009. 中药酸枣仁的化学成分研究 [J]. 药学实践杂志, 27(3): 209-210, 213.]
- CHIHAI S, TRABELSI D, JDEY A, et al, 2015. *Agrobacterium* sp. 10C2 affects richness and structure of rhizosphere bacterial communities and enhances nodulation and growth [J]. Arch Microbiol, 197:805-813.
- DENG ZS, LI C, HE Y, 2016. Screening of endophytes from *Cucurbita moschata* Duch. and analysis of their secondary metabolites [J]. Food Sci, 23: 216-221. [邓振山, 李超, 何园, 2016. 南瓜中内生菌筛选及其次级代谢产物的分析 [J]. 食品科学, 23: 216-221.]
- LIU XZ, LI SB, ZHAO ZL, et al, 2014. Isolation of endophytes from *Panax quinquefolium* and screening and identification of strains with antagonistic activity [J]. Chin Trad Herb Drugs, 45(22): 3332-3336. [刘学周, 李绍宾, 赵智灵, 等, 2014. 西洋参内生菌株的分离及拮抗活性菌株的筛选和鉴定 [J]. 中草药, 45(22): 3332-3336.]
- LUO HL, LIN XZ, ZHANG LM, et al, 2012. Isolation, classification and biosynthetic potential of endophytic actinomycetes from *Stemona* [J]. Acta Microbiol Sin, 52(3): 389-395. [罗红丽, 林显钊, 张利敏, 等, 2012. 百部内生放线菌的分离、分类及次级代谢潜力 [J]. 微生物学报, 52(3): 389-395.]
- MEI YF, XIONG SS, YU HZ, 2012. Preliminary screening of a

- favonoid-producing endophytic fungus in *Ginkgo biloba* L. [J]. *Amino Acids & Biotic Res*, 34(4): 20–24. [梅宇飞, 熊尚森, 余海忠, 2012. 一株产银杏黄酮内生真菌的初步筛选 [J]. *氨基酸和生物资源*, 34(4): 20–24.]
- MUFTI R, AMNA RAFIQUE M, HAQ F, et al, 2015. Genetic diversity and metal resistance assessment of endophytes isolated from *Oxalis corniculata* [J]. *Soil Environ*, 34:89–99.
- PANDEY MB, SIN AK, 2008. Three new cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus* species [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 10(7): 719.
- PANDYA M, RAJPUT M, RAJKUMAR S, 2015. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiate* [J]. *Microbiology*, 84:80–89.
- STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D, 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic fungus of *Pacific yew* [J]. *Science*, 260(5105): 214–216.
- SHANTJ, SUN WB, LOU JF, 2012. Antibacterial activity of the endophytic fungi from medicinal herb, *Maclaya cordata* [J]. *Afr J Biotechnol*, 11(19): 4354–4359.
- TANG LJ, LIU WW, SHI DH, et al, 2009. Application of thin-layer chromatography in flavonoids of plants [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 20(12): 2917–2918. [唐丽娟, 刘玮炜, 史大华, 等, 2009. 薄层层析在植物黄酮类化合物研究中的应用 [J]. *时珍国医国药*, 20(12): 2917–2918.]
- WANG MX, CHEN SL, YAN SZ, et al, 2003. A preliminary study on the isolation, identification and media of an endophytic fungus producing flavones [J]. *J Nanjing Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 26(1): 106–110. [王梅霞, 陈双林, 闫淑珍, 等, 2003. 一株产黄酮银杏内生真菌的分离鉴定与培养基质的初步研究 [J]. *南京师范大学学报(自然科学版)*, 26(1): 106–110.]
- WANG Y, MA SJ, DANG Y, et al, 2017. Isolation of endophytic fungi from *Ardisia crenata* sims and identification of bacteria producing antibacterial active substances [J]. *Shaanxi Agric Sci*, 63(9): 32–36. [王艳, 马赛箭, 党永, 安超, 2017. 富贵子内生真菌的分离及抗菌活性物质产生菌的鉴定 [J]. *陕西农业科学*, 63(9): 32–36.]
- XING XK, 2018. Endophytic fungal resource of medicinal plants—a treasure need to be developde urgently [J]. *Mycosystema*, 1: 14–21. [邢晓科, 2018. 药用植物内生真菌资源——一个亟待开发的宝库 [J]. *菌物学报*, 1:14–21.]
- YAO XL, KANG QJ, XIONG SZ, et al, 2014. Isolation and identification of endophytic actinomycetes from the seeds of *Camptotheca acuminata* Decne. and isolation of antimicrobial substances from those endophytic actinomycetes [J]. *Microbiology*, 41(6): 1109–1120. [姚晓玲, 康前进, 熊顺子, 等, 2014. 喜树种子内生放线菌的分离鉴定及抗菌活性物质初分离 [J]. *微生物学通报*, 41(6): 1109–1120.]
- YANG XJ, GUO HQ, GAO X, et al, 2006. Studies on the secondary metabolism of endophytes YD-01I. [J]. *J Chin Pharm Univ*, 37(5): 479–480. [杨晓军, 郭海清, 高霞, 等, 2006. 内生真菌 YD-01 次生代谢产物的研究I. [J]. *中国药科大学学报*, 37(5): 479–480.]
- ZHENG QQ, LI PC, LI M, et al, 2014. Analyzing the characters and nourishment components of wild jujube seed resources [J]. *Hubei Agric Sci*, 53(1): 102–105. [郑强卿, 李鹏程, 李铭, 等, 2014. 酸枣种子性状及营养成分分析 [J]. *湖北农业科学*, 53(1): 102–105.]
- ZHANG RT, QIN J, SUN X, et al, 2012. Extraction, separation and purification of flavones in onion skin [J]. *Chin Food Nutr*, 18(8): 50–54. [张仁堂, 秦静, 孙欣, 等, 2012. 洋葱皮中黄酮类物质的提取及分离纯化研究 [J]. *中国食物与营养*, 18(8): 50–54.]
- ZHANG XG, TANG P, LIU YJ, et al, 2016. Antioxidant activity of endophyte extracts isolated from six medicinal plants [J]. *Mod Food Sci Technol*, 32(4): 66–74. [张新国, 唐鹏, 刘英娟, 等, 2016. 6 种药用植物内生菌提取物的抗氧化活性研究 [J]. *现代食品科技*, 32(4): 66–74.]
- ZHEN Y, DAI JJ, GUAN YX, et al, 2016. Isolation of endophyte from tree peony and identification of antibacterial activity [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 41(1): 45–50. [郑艳, 戴婧婧, 管玉鑫, 等, 2016. 凤丹内生菌的分离鉴定及抑菌活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 41(1): 45–50.]