

18 株植物内生真菌的分离纯化及鉴定

鲁 群¹, 浅井禎吾², 大島吉輝²

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070;

2. 日本东北大学药学研究科, 宫城仙台 980-8578)

摘要:植物内生真菌生活环境特殊、种类多, 通过大量的分离和筛选得到有价值的内生真菌, 可以为新型天然产物的获得提供更丰富的来源。本实验随机采摘了 12 种植物, 采用组织分离法从中有选择性地分离纯化得到了 18 株内生真菌, 通过 28S rDNA 序列测定和系统发育树分析, 对 18 株真菌进行了鉴定。结果表明, 这 18 株内生真菌主要属于 *Cladosporium*, *Paramicrothyrium*, *Mycosphaerella*, *Colletotrichum*, *Corynespora*, *Sarocladium*, *Guignardia*, *Phoma*, *Pseudocercospora*, *Collembolispora*, *Alternaria*, *Glomerella* 等属, 说明了植物内生真菌的丰富多样性。得到的 18 株内生真菌中有 3 株不常见真菌和一株新真菌, 其次级代谢产物值得进一步研究。

关键词:内生真菌, 分离, 鉴定

Isolation and identification of 18 strains of endophytic fungi from plants

LU Qun¹, TEIGO Asai², YOSHITERU Oshima²

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

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

Abstract: Plant endophytic fungi have the characteristics of special living environment and variety. By a large number of isolation and screening to obtain valuable endophytic fungi, it can provide more sources for novel natural products. In this study, 12 kinds of plants were randomly picked. 18 strains of endophytic fungi were isolated by traditional artificial separation method. These endophytic fungi were identified using 28S rDNA sequencing and phylogenies. The results showed that 18 strains of endophytic fungi mainly belonged to *Cladosporium*, *Paramicrothyrium*, *Mycosphaerella*, *Colletotrichum*, *Corynespora*, *Sarocladium*, *Guignardia*, *Phoma*, *Pseudocercospora*, *Collembolispora*, *Alternaria* and *Glomerella* sp., indicating the rich diversity of endophytic fungi. Among these fungi, there were three rare strains and a new strain of fungi. The secondary metabolites of these fungi were worth further studying.

Key words: endophytic fungi; isolation; identification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)21-0152-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.21.023

植物内生真菌(endophytic fungi)是指在其生活中部分或者全部时期生活在植物体内, 而不会引起宿主植物产生明显病害症状的一类真菌^[1]。内生真菌广泛存在于植物体中, 来源广、种类繁多, 可以通过传统的人工组织分离法获得, 操作简便、成本低。内生真菌次级代谢产物非常丰富, 可以合成与宿主植物相同或不同的活性物质^[2]。1993 年美国 Stierle 等^[3]从短叶红豆杉的韧皮组织中分离得到一株内生真菌(*Taxomyces andreanae*), 也可以合成抗癌物质紫杉醇; 另外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^[4]。

内生真菌合成的黄酮、生物碱、萜类、甾体等多种化合物大多具有抗菌、抗癌、生物防治等活性^[5-6]。目前关于天然产物的研究中, 对植物的研究较多, 以

至于植物的过度使用。内生真菌的开发不仅可以解决资源问题, 而且对新型天然产物的获得具有重大意义。由于不同地域不同环境中植物的内生真菌有所不同, 不能准确预测从某种植物中能分离得到哪些内生真菌或是否能分离得到新菌株, 所以本实验采取随机采摘, 采摘的 12 种植物大多数为药用植物, 希望能获得产活性物质的内生真菌。分离得到的内生真菌采用分子手段对其进行鉴定, rDNA 序列分析是鉴定真菌的常用方法, 其中 28S rDNA 基因序列进化缓慢、相对保守, 通过测定未知真菌的该序列, 再与数据库中的序列进行比较来鉴定真菌。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期: 2015-02-12

作者简介: 鲁群(1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物化学与食品功能因子, E-mail: luqun@mail.hazu.edu.cn。

基金项目: 中国国家留学基金委资助。

表1 采集植物信息
Table 1 Information of plants

名称	学名	种属	主要功效及用途	采摘部位
万龙	<i>Ardisia crenata</i>	紫金牛科紫金牛属	清热降火、消肿解毒、活血化痰	果实、叶、茎
水龙骨	<i>Polypodiodes niponica</i>	水龙骨科水龙骨属	化湿清热、祛风通络,治痢疾、腰痛	叶、柄、根
肉桂	<i>Cinnamomum cassia</i>	樟科樟属	药材、调味料,健胃、活血、散寒	叶、茎
翡翠木	<i>Crassula ovate</i>	景天科青锁龙属	叶片肥厚,主要用于观赏	叶、茎
吐根	<i>Carapichea ipecacuanha</i>	茜草科头九节属	有催吐功效,主要治疗痢疾	叶、根
红果仔	<i>Eugenia uniflora</i>	桃金娘科番樱桃属	盆栽,果肉多汁可食,制作优质软糖	果实、叶、茎
月橘	<i>Murraya paniculata</i>	芸香科九里香属	祛风除湿、行气活血、散瘀止痛	果实、叶、茎
半夏	<i>Pinellia ternata</i>	天南星科半夏属	用于痰多咳喘,眩晕,呕吐反胃	叶、根
青木	<i>Aucuba japonica</i>	桃叶珊瑚科桃叶珊瑚属	园林装饰及盆栽,保护肝功能	果实、叶、茎
舟山新木姜子	<i>Neolitsea sericea</i>	樟科新木姜子属	平喘,抗心律失常,抗真菌	叶
水蜡树	<i>Ligustrum obtusifolium</i>	木犀科女贞属	清热解毒、消肿止痛	叶、茎
山茶花	<i>Camellia japonica</i>	山茶科山茶属	凉血止血、散瘀、消痰肿	叶

植物样品 日本东北大学药用植物园,分别采集植物的果实、叶、茎、根等部位,并做好详细记录,见表1; Prime STAR TAKARA 公司; QIAEX II Gel Extraction Kit 德国 Qiagen 公司; 选择性分离培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)加氯霉素,氯霉素终浓度为 50 μg/mL。

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; 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; KA-1000 台式离心机 上海安亭科技仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 植物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^[7-8]。采摘新鲜植物样品,用流水冲洗干净除去表面泥沙,组织较柔软部位,如叶、花,放入 80% 乙醇溶液中消毒 2 min; 组织较硬部位,如根,先放入 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 °C 的恒温培养箱静止培养。植物内生的真菌相对生长缓慢,大约培养后的第三天才开始缓慢生长,培养过程中根据菌落长出的时间、形态和颜色的差异等,分别挑取菌落边缘的少量菌丝接于新的平板上,继续培养并仔细观察菌落特征,再挑取菌落边缘的菌丝接于新的平板上,反复纯化,最后得到纯化的植物内生真菌。

1.2.2 植物内生真菌 DNA 的提取 内生真菌基因组 DNA 的提取参考 SDS 法^[9],稍加改进。具体提取步骤如下:在超净台中挑取约 1~2 cm² 的菌体于无菌离心管中,研钵置于冰上,加入少量液氮,倒入菌体,迅速充分研磨,转移至离心管。加 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。加 400 μL 抽提液,抽提液为

苯酚/氯仿/异戊醇(体积比 25:24:1)。涡旋, 15000 r/min 离心 5 min, 上清液转移。加 1 mL 无水乙醇和 40 μL 3 mmol/L NaAc, 15000 r/min 离心 15 min, 舍弃上清液。加 200 μL 70% 乙醇, 15000 r/min 离心 5 min, 舍弃上清液。

1.2.3 目标 DNA 片段的 PCR 扩增 真菌基因组中编码核糖体的基因 28S rDNA 中 D1/D2 区域序列长度适中,适用于真菌鉴定^[10]。以提取的 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,反应液总体积为 15 μL,其组成见表 2。

表2 PCR 反应体系

Table 2 Reaction of PCR

组分	Prime STAR	引物 NL1	引物 NL4	模板 DNA	dH ₂ O
体积(μL)	4.4	0.3	0.3	1	9

PCR 的反应条件为:98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 40s, 40 次循环; 4 °C 保存。

1.2.4 DNA 片段的回收 使用 QIAEX II 胶回收试剂盒对 DNA 片段进行回收,具体操作步骤:PCR 产物用 0.8% 琼脂糖(Gene pure)凝胶电泳后,用 ViewBlue 染色 10 min。多次浸洗,切出被染色的目的 DNA 的琼脂糖凝胶,称重。加入 3 倍凝胶重量的溶胶液 Buffer Q 和 10 μL QIAEX,涡旋。50 °C 加热 10 min。4 °C 12000 r/min 离心 30 s, 舍弃上清液,加 500 μL Buffer Q, 涡旋。与上一步相同操作,加 500 μL Buffer PE, 涡旋。重复上一步,舍弃上清液,风干。加 20 μL 超纯水, 涡旋, 静置 5 min, 4 °C 12000 r/min 离心 30 s, 上清液转移。重复此步骤。Nanodrop 2000 测定仪测定 DNA 浓度。计算其在 260 nm 和 280 nm 的光吸收值的比值(OD₂₆₀/OD₂₈₀)。

1.2.5 测序 使用 Big Dye 测序试剂盒,将回收的 DNA 片段再一次 PCR 扩增,引物 NL1、NL4 分别稀释 100 倍。每个真菌样品分别做两个反应,一管中加入

表4 植物内生真菌的形态特征

Table 4 Morphological characteristics of endophytic fungi from plants

编号	真菌代号	来自植物部位	特征
1	WLY	万龙叶	菌丝呈绿色,生长慢
2	WLJ	万龙茎	菌丝白色,菌落表面光滑
3	SLGB	水龙骨柄	菌丝呈深绿色,生长慢
4	SLGG	水龙骨根	菌丝白色,中心绿色
5	RGY-1	肉桂叶	菌丝白色,中心有黄色颗粒
6	RGY-2	肉桂叶	菌丝白色,毛绒状,菌落厚度较大
7	FCMY	翡翠木叶	菌丝白色,菌落小,生长慢
8	TGJ	吐根茎	菌丝白色,中心灰色
9	HGZY	红果子叶	菌丝绿色,菌落表面有粉状颗粒
10	HGZG	红果子果实	菌丝白色,中心棕黄色
11	YJJ	月橘茎	菌丝白色,菌落小,生长慢
12	BXG	半夏根	菌丝黄色,菌落表面光滑
13	QMY	青木叶	菌丝绿色,菌落表面不光滑
14	QMG	青木果实	菌丝白黄色,中心黄色
15	ZSY-1	舟山新木姜子叶	菌丝黄绿色,菌落表面光滑
16	ZSY-2	舟山新木姜子叶	菌丝开始白色,后变为黄色,中心棕色
17	SLSY	水蜡树叶	菌丝开始白色,后变为棕色,菌丝毛绒状
18	SCHY	山茶花叶	菌丝开始呈白色,后变为红色

引物 NL1,另一管中加入引物 NL4,以保证测序的准确性,反应液总体积为 10.6 μL ,其组分见表 3。

表3 测序用 PCR 反应体系

Table 3 Reaction of PCR for sequencing

组分	Big Dye	引物 NL1/NL4	模板 DNA	dH ₂ O
体积(μL)	4	1.6	1	4

PCR 的反应条件为:96 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;96 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 40 min,25 次循环;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。产物全部转移到离心管中,加 30 μL 无水乙醇和 0.625 μL 0.5 mol/L EDTA,静置 15 min,14000 r/min 离心 20 min。舍弃上清液,加 30 μL 70% 乙醇溶液,14000 r/min 离心 5 min。舍弃上清液,风干,加 26 μL HI-DI 甲酰胺。96 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min,置于冰上,将待测品全部转移到测序管中,用 DNA 测序仪进行序列测定。

1.2.6 测序结果分析 测序仪测定后,得到真菌 28S rDNA D1/D2 区域序列。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。分离得到的内生真菌全部鉴定后,用上述方法进行多序列对比及构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菌落形态特征

本实验共采摘 12 种植物,对果实、叶、茎等 27 个部位进行表面消毒后培养。培养过程中,选择性的

分离纯化了 18 株内生真菌(表 4),菌落形态见图 1。从表 4 和图 1 可以看出,选择的植物内生真菌大多从叶片中分离得到,菌落大多具有颜色,与平时常见的

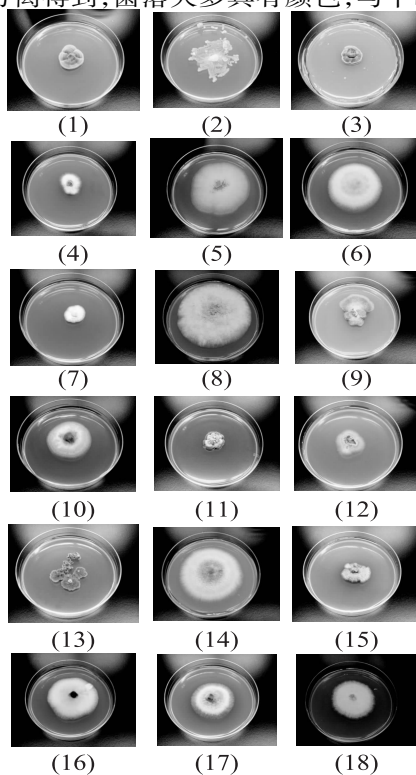


图1 植物内生真菌的照片

Fig.1 Photos of endophytic fungi from plants
注:(1) WLY,(2) WLJ,(3) SLGB,(4) SLGG,(5) RGY-1,(6) RGY-2,(7) FCMY,(8) TGJ,(9) HGZY,(10) HGZG,(11) YJJ,(12) BXG,(13) QMY,(14) QMG,(15) ZSY-1,(16) ZSY-2,(17) SLSY,(18) SCHY。

丝状真菌相比形态较为特别。

2.2 PCR 产物的检测

提取植物内生真菌的基因组 DNA,以其为模板,在特异性引物的引导下,PCR 扩增出内生真菌 28S rDNA D1/D2 片段,回收目的 DNA 片段,进一步纯化。测定 DNA 的浓度并计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值,结果见表 5。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.6~2.0 之间,说明 DNA 没有蛋白质、RNA 等杂质污染;OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8 左右说明 DNA 纯度最高。由表中可以看出,18 组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.6~2.0 之间,表明回收的 DNA 片段纯度较高。

表 5 回收 DNA 片段的定量

Table 5 Quantification of purified DNA fragments

编号	真菌代号	DNA 浓度 (ng/μL)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
1	WLY	15.1	1.90
2	WLJ	15.7	1.88
3	SLGB	14.0	1.90
4	SLGG	14.1	1.95
5	RGY-1	15.7	1.93
6	RGY-2	11.9	1.98
7	FCMY	23.2	1.92
8	TGJ	24.1	1.75
9	HGZY	14.3	1.77
10	HGZG	17.6	1.99
11	YJJ	15.6	1.95
12	BXG	20.7	1.96
13	QMY	16.1	1.88
14	QMG	13.3	1.98
15	ZSY-1	17.0	1.75
16	ZSY-2	14.0	1.67
17	SLSY	14.2	1.80
18	SCHY	14.4	1.88

2.3 28S rDNA D1/D2 区域序列的分析

测序仪测序得到 18 株植物内生真菌的 28S rDNA D1/D2 区域碱基序列长均为 600 bp 左右,长度符合此区域序列。测序得到的序列与 NCBI 数据库中的已知序列进行比对分析,搜索出相似性高的序列,相似率达到 99% 以上说明相似性很高,再结合菌落形态特征和系统发育分析,鉴定出内生真菌(表 6)。

菌株 WLJ、SLGB、SLGG、RCY-1、RGY-2、FCMY、HGZG、YJJ、QMY、QMG 和 SLSY 的序列在数据库中均搜索到一株相似率最高的菌株,结果见表 6。菌株 WLY、TGJ、ZSY-2、SCHY 的序列分别与 *Cladosporium*、*Colletotrichum*、*Alternaria*、*Glomerella* 属的多株菌株的序列相似率最高,所以分别鉴定为 *Cladosporium* sp.、*Colletotrichum* sp.、*Alternaria* sp.、*Glomerella* sp.。菌株 HGZY 与 *Guignardia mangiferae* (KF955298.1)、*Guignardia vaccinii* (EU167584.1)、*Phyllosticta fallopiae* (AB454307.1)、*Dothideomycetes* sp.genotype 233 (JQ760442.1) 等多株菌株的序列相似率都达到 100%,结合菌落形态特征分析,鉴定为 *Guignardia mangiferae*。菌株 BXG 与 *Phialophora* sp.

5H1-P3-P7-2(KM232467.1)、*Acremonium* sp.5H1_P3_P5_1(KM232466.1)、*Mollisia dextrinospora* (HM116757.1)、*Protoventuria* sp. M1069-OL (AB831875.1) 和 *Collembolispora barbata* (KC005812.1) 的序列相似率都达到 99%,构建系统发育树(图 2),结果显示菌株 BXG 与 *Collembolispora barbata* 在同一发育分支上,故鉴定为 *Collembolispora barbata*。

表 6 内生真菌鉴定结果

Table 6 The identification results of endophytic fungi

编号	真菌代号	序列长度 (bp)	真菌属种	相似性 (%)
1	WLY	608	<i>Cladosporium</i> sp.	100
2	WLJ	606	<i>Paramicrothyrium chinensis</i>	99
3	SLGB	614	Fungal sp.F185	100
4	SLGG	598	<i>Mycosphaerella</i> sp.H41b4	100
5	RGY-1	604	<i>Colletotrichum boninense</i>	99
6	RGY-2	615	<i>Corynespora torulosa</i>	99
7	FCMY	607	<i>Sarocladium bacillisporum</i>	100
8	TGJ	606	<i>Colletotrichum</i> sp.	99
9	HGZY	614	<i>Guignardia mangiferae</i>	100
10	HGZG	614	<i>Phoma minor</i>	100
11	YJJ	603	<i>Pseudocercospora nephrolepidicola</i>	100
12	BXG	615	<i>Collembolispora barbata</i>	99
13	QMY	602	Fungal endophyte	99
14	QMG	614	Uncultured fungus	100
15	ZSY-1	616	-	-
16	ZSY-2	614	<i>Alternaria</i> sp.	100
17	SLSY	615	<i>Corynespora cassiicola</i>	99
18	SCHY	605	<i>Glomerella</i> sp.	100

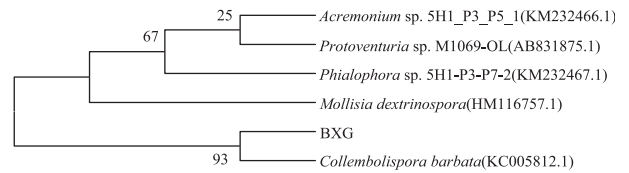


图 2 内生真菌 BXG 28S rDNA D1/D2 序列的聚类分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of

28S rDNA D1/D2 sequence of endophytic fungus strain BXG 菌株 ZSY-1 与数据库中搜索到的菌株的序列相似率都在 87% 以下,说明 ZSY-1 可能是新菌株,其 28S rDNA D1/D2 区域碱基序列如下:

```
GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCTCAGT
AACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAGATTTGAAAAGCTGGCCCCC
TCGGGGTCCGCGTTGTAATCTGCAGAGGACGCCTCGGGTGGCGGGT
TCGCTAAGTCCCTGGAACGGGGCGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGT
GAGCGGAACGCCTAGCCCTGTGAGGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAG
TTGGGAATGCTGCTCTAAACGGGAGGTGAATTCCTTAAAGGCTAAA
TACCCGCCAGAGACCGATAGCGCAACAAGTAGTAAACGAAGGTGA
AAAGCACCCTGGAGAGAGGGTTAAACAGAACGTGAAATGTCTGAAA
GGGAAGCGCTAGCGATCAGACGCGGGCCGACCGGTTTCCCCAGCCTC
GCGGCTGGGTCACTCCGGCGGGCCGGCCAGCACC GGCTCTCGCC
CGGGTTGATGGCGGGGACGTGGCTCCCTCGGGGAGTGTATA
ACCCCGCTCGATGCTCGGGCGGGGTCGAGTACCTCGCCCTCG
GGCACGGGTGCTGGCGTAATGGTCAATAGCGACCCGCTTGTGAAAC
GGACC
```

2.4 构建系统发育树

18株植物内生真菌鉴定后,使用软件 ClustalX 1.8对18株真菌的28S rDNA D1/D2序列进行多重对比,再使用 MEGA5.10构建系统发育树,结果见图3。从图中可以直接看出各菌株的亲缘关系和进化地位;图中显示RGY-2和SLSY、RGY-1和TGJ的亲缘关系高,与BLAST搜索得出的结果一致,RGY-2鉴定为 *Corynespora torulosa*、SLSY鉴定为 *Corynespora cassicola*,两株真菌都是 *Corynespora* 属,RGY-1鉴定为 *Colletotrichum boninense*、TGJ鉴定为 *Colletotrichum* sp.,两株真菌都是 *Colletotrichum* 属,但从菌落特征上看,TGJ和RGY-1明显不是同一株真菌;BLAST搜索结果中有3株不常见真菌SLGB、QMY和QMG,虽然可以在数据库中搜索到,但尚没有属种名称,从图3中可以看出QMG和HGZG(*Phoma minor*)的亲缘关系高;在数据库中未搜索到的菌株ZSY-1在图中与其他菌株的亲缘关系低。

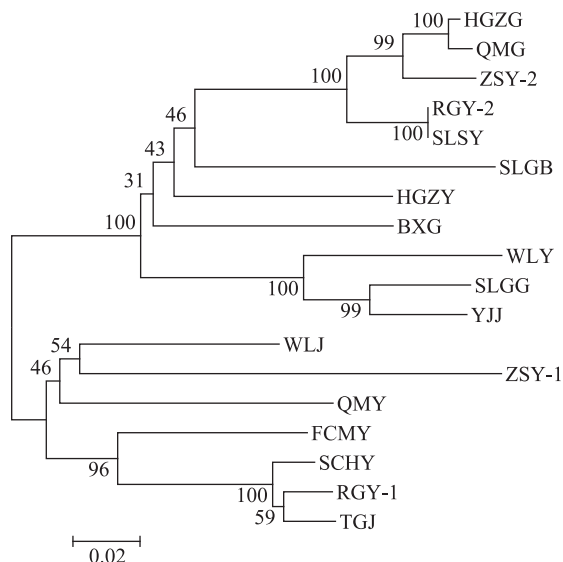


图3 基于28S rDNA D1/D2序列分析构建的内生真菌的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree constructed for endophytic fungi based on 28S rDNA D1/D2 sequence

3 结论

采用组织分离法从12种植物中选择性分离纯化得到18株内生真菌,通过28S rDNA序列测定和

系统发育树分析鉴定出18株植物内生真菌主要属于 *Cladosporium*, *Paramicrothyrium*, *Mycosphaerella*, *Colletotrichum*, *Corynespora*, *Sarocladium*, *Guignardia*, *Phoma*, *Pseudocercospora*, *Collembolispora*, *Alternaria*, *Glomerella* 等属,其中菌株SLGB、QMY和QMG为3株不常见真菌,真菌ZSY-1经数据库检索未搜索到相似序列,可能是新菌株。本研究结果说明了植物内生真菌的丰富多样性,是一类具有潜在应用价值的微生物资源,值得更充分深入的研究;本实验分离得到的内生真菌,特别是新菌株,为天然产物的获得和开发提供了更丰富的来源,其次级代谢产物值得进一步研究。

参考文献

- [1]胡凤,程玉鹏,王振月,等.药用植物内生真菌研究现状及其应用前景[J].生物技术通讯,2008,19(5):781-783.
- [2]Zhu YY, Ai C, Zhang J, et al. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi in plants[J]. Prog Chem, 2011, 23(4): 704-730.
- [3]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.
- [4]Strobel G A. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes Infect, 2003, 5(6): 535-544.
- [5]Joseph B, Priya R M. Bioactive compound from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review[J]. Am J Biochem Mol Biol, 2011, 1(3): 291-309.
- [6]Li J Y, Strobel G, Harper J, et al. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*[J]. Org Lett, 2000, 2(6): 767-770.
- [7]Miller K I, Chen Q, Man - Yuen S D, et al. Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity[J]. Microb Ecol, 2012, 64(2): 431-449.
- [8]Huang Y J, Wang J F, Li G L, et al. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis* [J]. FEMS Immunol Med Mic, 2001, 31(2): 163-167.
- [9]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.
- [10]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.

(上接第151页)

Helicobacter pylori[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50: 1134-1136.

[7]Chen X, Tian F, Liu X, et al. *In vitro* screening of lactobacilli with antagonistic activity against *Helicobacter pylori* from traditionally fermented foods [J]. J Dairy Sci, 2010, 93: 5627-5634.

[8]Chen X, Liu X M, Tian F, et al. Antagonistic activities of lactobacilli against *Helicobacter pylori* growth and infection in human gastric epithelial cells[J]. J Food Sci, 2012, 77: M9-14.

[9]卢小平. 筛选乳酸杆菌优良菌株的研究[J]. 中国饲料, 2001, 09: 21-22.

[10]田丰伟, 翟齐啸, 孙媛媛, 等. 缓解铅毒性植物乳杆菌CCFM8661的微生物学性质及其应用的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 04: 1010-1015.

[11]郭壮, 王记成, 闫丽雅, 等. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 对酸奶风味、质地及感官特性的影响[J]. 中国乳品工业, 2009, 01: 14-20.

[12]毛健, 宁佳, 赵建新, 等. 不同酸奶发酵剂菌株发酵性质的评价[J]. 中国乳品工业, 2010, 12: 8-11.

[13]杨晓宇, 张七斤, 于晨龙, 等. 不同来源乳酸菌的耐酸耐胆盐实验[J]. 动物医学进展, 2014, 02: 73-77.