

皱边石杉内生真菌资源遗传多样性的 ISSR 分析

史云峰^{1,2}, 禹利君^{2,3*}, 黄 璜^{4*}, 胥锦桦^{2,3}, 朱楠楠^{2,3}

1. 湖南农业大学东方科技学院, 湖南 长沙 410128

2. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128

3. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128

4. 湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128

摘要: 目的 采用 ISSR 标记技术从分子水平探讨皱边石杉内生真菌资源的遗传多样性, 建立皱边石杉内生真菌资源遗传分化指纹图谱, 为筛选可产石杉碱甲的目标菌株提供快捷的判别依据。方法 以从皱边石杉中分离的 100 株内生真菌为材料, 建立其 ISSR 优化反应体系并分析其遗传多样性; TLC、HPLC 检测发酵产物。结果 优化筛选的 10 条 ISSR 引物对皱边石杉内生真菌进行遗传多样性分析, 共扩增出 3 975 条清晰条带, 多态性条带占 100%。遗传相似系数为 0.59~0.96, 在 0.64 水平, 皱边石杉内生真菌可分为 11 类; 在 0.67 水平, 第 I 类又可分为 5 个亚类。采用引物 UBC868 对 13 号菌株及皱边石杉基因组 DNA 扩增, 在 500、200 bp 均具有清晰的扩增条带, 发酵产物经 TLC 和 HPLC 检测, 发现 13 号菌株与宿主植物皱边石杉同样可产生石杉碱甲。结论 皱边石杉内生真菌资源遗传多样性高, 遗传距离较远, 遗传基础较宽, 与 13 号菌株同属一类的内生真菌可作为石杉碱甲生产的潜力菌株进行重点筛选和诱变。

关键词: 皱边石杉; 内生真菌; ISSR 标记; 遗传多样性; 石杉碱甲

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)11-2266-06

ISSR analysis on genetic diversity of endophytic fungi of *Huperzia crispata*

SHI Yun-feng^{1,2}, YU Li-jun^{2,3}, HUANG Huang⁴, XU Jin-hua^{2,3}, ZHU Nan-nan^{2,3}

1. College of Orient Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals, Changsha 410128, China

3. College of Horticulture and Gardening, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

4. College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: Objective To study the genetic diversity of endophytic fungi of *Huperzia crispata* using ISSR markers at molecular level, to establish the fingerprint for genetic differentiation, and to provide the reference for screening the endophytic fungi strains which could biosynthesize huperzine A (Hup A). **Methods** Endophytic fungi (100) isolated from *H. crispata* were selected as materials, their optimized ISSR reaction systems were established, and the genetic diversity was analyzed. TLC and HPLC were used to detect the fermentation products. **Results** Ten ISSR primers were screened to analyze the genetic diversity of endophytic fungi of *H. crispata*. A total of 3 975 bands were amplified and all of them were polymorphic bands. The genetic similarity (GS) among the tested genotypes ranged from 0.59 to 0.96, and the tested strains were classified into 11 groups at GS 0.64. At GS 0.67, group I could be classified into five subgroups. Primer UBC868 was used to amplify No.13 strain and DNA of *H. crispata*, and unambiguous bands were appeared at 500 and 200 bp. The fermentation products were detected and analyzed by TLC and HPLC and No.13 strain was found to produce Hup A same as the host plant *H. crispata*. **Conclusion** Higher genetic distance and wider genetic base exist among endophytic fungi of *H. crispata*. The same ISSR category fungus as No.13 strain is the most important potential screening and inducing mutation strain.

Key words: *Huperzia crispata* (Ching) Ching; endophytic fungi; ISSR marker; genetic diversity; huperzine A (Hup A)

收稿日期: 2012-05-13

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (11JJ3040); 湖南省大学生科技创新研究项目 (DFCXS201003)

作者简介: 史云峰 (1970—), 男, 土家族, 湖南永顺人, 副教授, 硕士生导师, 从事药用植物种质资源及生物信息学研究。

Tel: (0731)84638206 E-mail: shiynfenghn@yahoo.com.cn

*通讯作者 禹利君 Tel: (0731)84611249 E-mail: yulijunhn@yahoo.cn

黄 璜 E-mail: hh863@126.com

网络出版时间: 2012-10-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121019.1040.009.html>

皱边石杉 *Huperzia crispata* (Ching) Ching 为石杉科石杉属植物^[1-3], 在湖南省湘西自治州原始次生林有零散分布, 其内含有石杉碱甲 (huperzine A, Hup A), 能有效改善阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 患者的记忆、认知功能, 表现出多靶点治疗机制^[4-5], 是治疗 AD 的首选用药^[5-6]。皱边石杉中 Hup A 的量为蛇足石杉 *H. serrata* (Thunb. ex Murray) Trev 的 1.86 倍^[7], 已引起国内学者的格外关注^[8]。前期对皱边石杉进行组织培养, 发现与蛇足石杉等其他石杉科植物一样, 存在内生真菌污染严重的问题, 难以培养成功^[9]。至今为止, 未见人工栽培或以其他方式大量生产 Hup A 成功的报道。随着世界人均寿命延长, 越来越多的老年人群忍受着 AD 带来的痛苦^[10]。Hup A 临床用药需求不断增加, 野生资源逐步减少, 利用植物内生菌生产 Hup A 具有十分重要的意义。已有实验研究^[9-11]从蛇足石杉组织培养外植体中分离纯化出部分内生真菌, 证实了石杉科植物有内生真菌存在。石杉科植物内生真菌的研究当前主要集中于菌株的分离纯化、形态学初步鉴定^[9,11-12], 相关分子标记研究尚未见报道。本实验采用 ISSR 标记技术, 建立皱边石杉内生菌资源遗传多样性分化图谱, 并与其宿主植物 ISSR-PCR 图谱比对分析, TLC 和 HPLC 技术检测潜力菌株目标发酵产物, 旨在为皱边石杉内生真菌种质资源评价奠定基础, 为可产 Hup A 潜力菌株提供快捷的筛选、判别依据。

1 材料

新鲜皱边石杉 *Huperzia crispata* (Ching) Ching 样品采自湖南省湘西自治州永顺县小溪原始次生林自然保护区, 并经湖南农业大学周朴华教授鉴定。从中分离纯化的 100 株内生真菌保存于湖南农业大学国家植物功能成分利用工程技术研究中心。

2 方法

2.1 ISSR-PCR 反应

2.1.1 DNA 提取 将保存菌株活化培养 2~3 次, 马铃薯液体培养基发酵培养获得菌丝体, 抽滤、无菌超纯水洗涤 2~3 次, 作为 DNA 提取材料。DNA 提取方法参考氯化苄法^[13]进行, 改研磨破壁为超声破壁处理^[14], 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA。

2.1.2 ISSR 引物退火温度及多态性筛选 选用加拿大哥伦比亚大学公布的 100 对 ISSR 引物, 交 Invitrogen 公司合成。对提取的 DNA 随机混合分成 10 组作为 PCR 扩增模板, 根据各引物 T_m 值将其分成

15 组, 在 T_m 值上下各浮动 7.5 °C, Biometra T-Gradient Thermoblock PCR 仪对混合 DNA 样本进行 PCR 扩增。参考宋育红等^[15]ISSR-PCR 反应体系, 设定 25 μL 基础反应体系中含 10 $\times$ PCR 缓冲液 (Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L) 2.5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL , 引物 (10 pmol/ μL) 1.25 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (1 U/ μL) 1.25 μL , DNA 模板 (10 ng/ μL) 2.5 μL , 无菌 ddH₂O 17 μL 。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s、适宜温度下 (最适退火温度因引物而异) 退火 45 s、72 °C 延伸 60 s, 30 次循环; 72 °C 延伸 5 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 2 h, 于自动凝胶成像系统进行观察照相。以扩增带型清晰、多态性高、重现性好的温度作为该引物的适宜退火温度, 确定适合皱边石杉内生真菌 DNA 扩增的 ISSR 引物, 并用其扩增皱边石杉新鲜材料基因组 DNA。

2.1.3 ISSR-PCR 反应体系优化 确定了适宜的 ISSR 引物及其最适退火温度, 25 μL 基础 PCR 反应体系中分别设定 DNA 模板用量 10、20、30、40、50 ng 5 个梯度; *Taq* DNA 聚合酶用量 1.0、1.5、2.0、2.5、3 U 5 个梯度; Mg^{2+} 浓度 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 6 个梯度; dNTPs 浓度 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 5 个梯度。在单因素试验的基础上, 采用正交设计 $L_9(3^4)$ 对影响 ISSR-PCR 反应的 DNA 模板用量、*Taq* DNA 聚合酶用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度 4 个因素, 各设置 3 水平进行试验, 共 9 个处理, 见表 1。每个处理设置平行反应, 筛选最优 PCR 反应体系。

2.1.4 数据处理与分析 对清晰可辨的电泳条带进行统计分析, 重复性不好的弱带不予记录, 按照从上到下的读带方向, 根据扩增条带的有无计数, 在相同的迁移位置上, 出现扩增条带赋值为“1”, 不

表 1 ISSR-PCR 的 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal design for ISSR-PCR

编号	DNA 聚合酶 浓度 / U	Mg^{2+} 浓度 / (mmol·L ⁻¹)	dNTP 浓度 / (mmol·L ⁻¹)	DNA 模板 浓度 / ng
1	1.5	1.0	0.4	10
2	2.0	1.5	0.6	10
3	3.0	2.0	0.8	10
4	1.5	1.5	0.8	20
5	2.0	2.0	0.4	20
6	3.0	1.0	0.6	20
7	1.5	2.0	0.6	30
8	2.0	1.0	0.8	30
9	3.0	1.5	0.4	30

存在的赋值为“0”，用 NTSYS2.1 软件分析内生真菌资源之间的遗传相似系数，非加权配对算术平均法进行聚类分析，绘制系统聚类图。

2.2 菌株形态学观察及种属鉴定

点植法接种进行菌落形态学观察，斜插片法进行菌丝体、孢子形态学观察；参照《真菌鉴定手册》、《中国真菌志》对所获真菌进行形态学初步鉴定。

在形态学鉴定基础上，设计 ITS1/ITS4、ITS4/ITS5 两对引物对核糖体 5.8S rDNA ITS 保守区域进行 PCR 扩增，扩增产物纯化、测序，测序结果提交 NCBI 在线 BLAST 同源性比较，构建 NJ 系统进化树，鉴定菌株种属。

2.3 TLC、HPLC 检测目标菌株的发酵产物

内生真菌经活化培养、马铃薯液体发酵，400 mL 发酵液真空减压浓缩至 10 mL，等份分取并分别与等体积的无菌超纯水、无水乙醇混匀，10 000 r/min 离心 10 min，吸取 8 μ L 上清液点于已活化的高效硅胶 G 预制板上，与 Hup A 对照品共薄层。参考《中国药典》2010 年版检测方法^[16]，展开剂为：正丁醇-冰醋酸-超纯水（7：1：2），于 365 nm 处扫描拍照，Camag Hptlc Scanner 3 系统分析目标菌株产 Hup A 的量。

根据 TLC 初步检测结果，对潜力菌株放大培养至 4 L，真空减压浓缩至 40 mL，按 1：3 比例加入乙醇，索式提取 12 h，乙醇层减压浓缩蒸干，加入 4 mL 甲醇溶解，pH 值调节至 8~10，0.45 μ m 有机膜滤过用于 HPLC 分析。分析条件参考 Yu 等^[7]的方法进行。

3 结果与分析

3.1 ISSR-PCR 反应体系优化

根据 $L_9(3^4)$ 正交试验，对皱边石杉内生真菌

菌丝体 DNA 混合模板进行 ISSR-PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳检测（图 1）。由图 1 的电泳结果可知，以 7 号处理多态性条带最为丰富、平行样重复性好。25 μ L ISSR-PCR 优选体系为：10 $\times$ PCR 缓冲液（ Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L）2.5 μ L，dNTPs（10 mmol/L）0.6 μ L，引物（10 pmol/ μ L）2.0 μ L，Taq DNA 聚合酶（1 U/ μ L）1.5 μ L，DNA 模板（10 ng/ μ L）3 μ L，无菌 ddH₂O 15.4 μ L。

3.2 内生真菌 ISSR 多态性分析

将所有内生真菌菌丝体 DNA 随机混合分成 10 份，结合探索各引物退火温度，从 100 条 ISSR 引物中筛出 41 条备选引物，再从 41 条备选引物中筛出 10 条谱带清晰、多态性高的引物，对其内生真菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增。结果见表 2。按照形态学初步归类比对结果，将相似性很高菌株的 ISSR-PCR 产物邻接点样，扩增产物大小介于 200~2 000 bp（图 2）。10 条引物共扩增出 3 975 条谱带，均为多态性谱带。平均每个引物扩增条带数为 39.75。用 Popgene32 软件分析，Nei's 基因多样性平均为 0.280 4，Shannon's 信息指数为

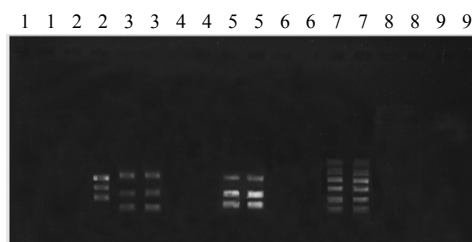


图 1 ISSR-PCR 优化体系扩增电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of optimized ISSR-PCR reaction system

表 2 10 条用于 ISSR-PCR 扩增的引物及各引物扩增的条带数

Table 2 Ten primers and amplified bands for ISSR-PCR

引物编号	序列	退火温度 / $^{\circ}$ C	扩增条带数	多态性条带数	多态性百分率 / %
UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	50	382	382	100
UBC 848	CACACACACACACARG	41	309	309	100
UBC 850	GTGTGTGTGTGTGTGYC	46	419	419	100
UBC 856	ACACACACACACACYA	41	282	282	100
UBC 861	ACCACCACCACCACCACC	61	409	409	100
UBC 864	ATGATGATGATGATGATG	47	495	495	100
UBC 868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	46	531	531	100
UBC 873	GACAGACAGACAGACA	47	513	513	100
UBC 880	GGAGAGGAGAGGAGA	41	272	272	100
UBC 887	DVDTCTCTCTCTCTCTC	40	363	363	100
合计			3 975	3 975	100

D = A, G, T V = A, C, G

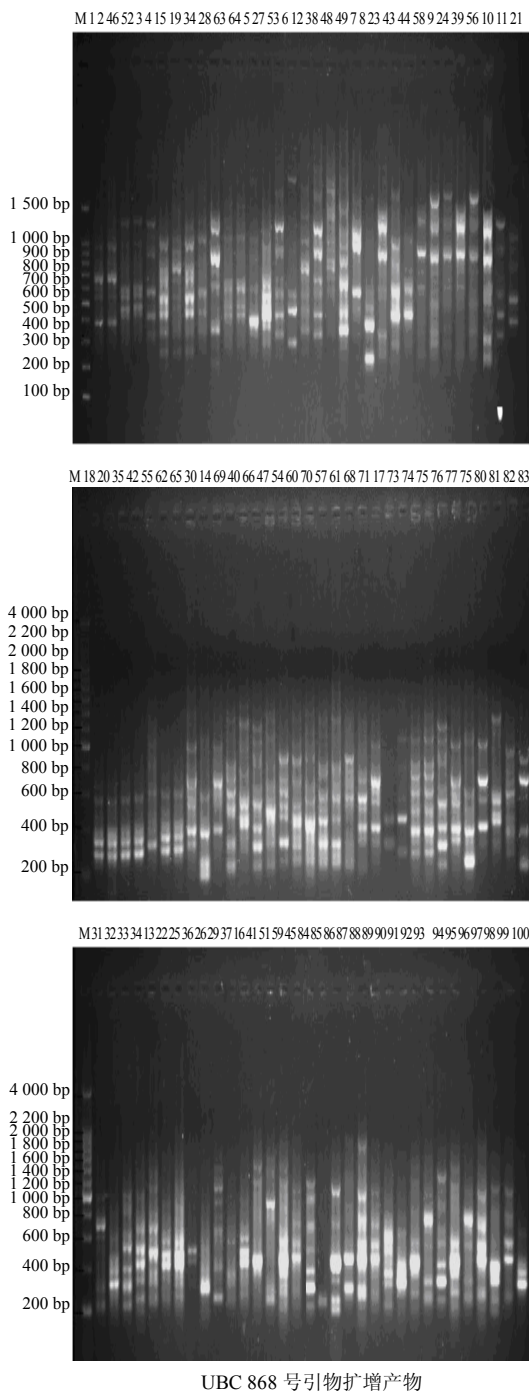


图 2 引物 UBC 868 对皱边石杉内生真菌 DNA 的扩增结果
Fig. 2 Amplification of *H. crispata* endophytic fungi DNA by Primer UBC 868

0.439 2。由表 2、图 2 可知皱边石杉内生真菌资源的 ISSR 多态性水平较高,这 10 条引物可作为石杉科植物内生真菌多样性分析的首选引物。

3.3 皱边石杉内生真菌资源遗传多样性及聚类分析

以优化筛选出的 10 条引物对所有菌株 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增,构建其分子进化系统树(图 3)。

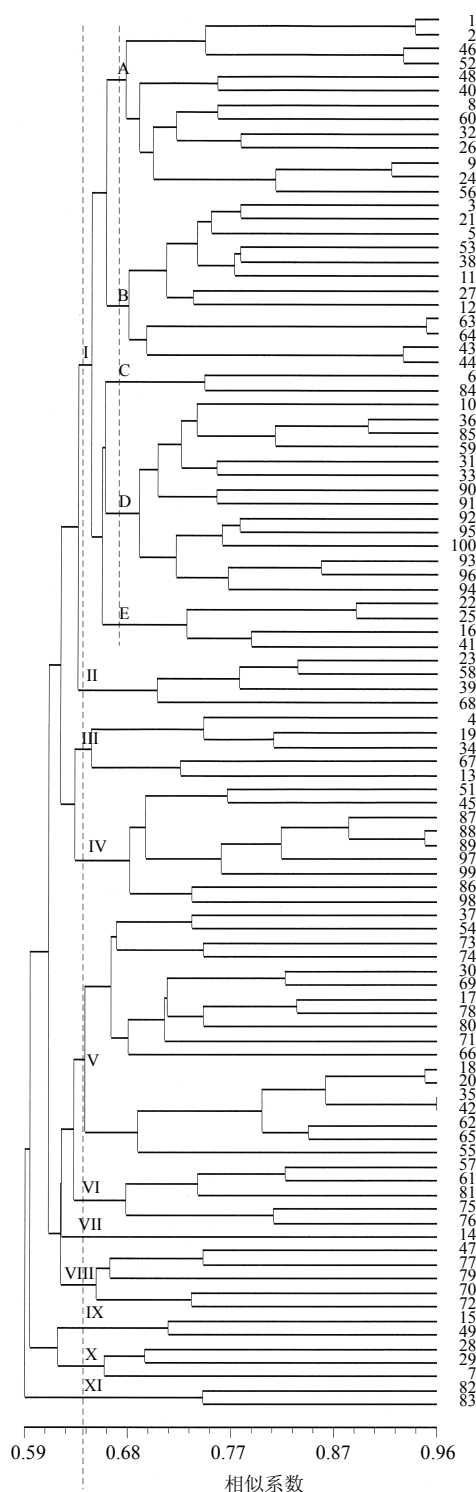


图 3 基于 ISSR 数据构建的内生真菌系统聚类图
Fig. 3 Dendrogram of endophytic fungi based on ISSR

由图 3 可知,在相似性系数为 0.64 时,内生真菌资源可分为 11 个大类。其中第 I 大类在相似系数为 0.67 时,又可细分为 A、B、C、D、E 5 个小类,

分别包括: 1、2、46、52、48、40、8、60、32、26、9、24 和 56 号; 3、21、5、53、38、11、27、12、63、64、43 和 44 号; 6 和 84 号; 10、36、85、59、31、33、90、91、92、95、100、93、96 和 94 号; 22、25、16 和 41 号。由此可见, 皱边石杉内生真菌资源遗传多样性非常丰富。

3.4 皱边石杉基因组 DNA 的 ISSR 分析

以 10 条优选的 ISSR 引物对皱边石杉新鲜材料基因组 DNA 进行 PCR 扩增(图 4), UBC 842、UBC 850、UBC 861、UBC 868、UBC 873 均可扩增出清晰的多态性条带。UBC842 扩增获得 1 条清晰条带(大小约 400 bp)、UBC 850 扩增获得 2 条清晰条带(大小约 350 bp 和 400 bp)、UBC 861 扩增获得 5 条清晰条带(大小约 1 000, 600, 550, 400、300 bp)、UBC 868 扩增获得 3 条清晰条带(大小约 500、350、200 bp)、UBC 873 扩增获得 4 条清晰条带(大小约 1 000、600、400、350 bp)。由此可知, 优化的 10 条 ISSR 引物有 5 条可对皱边石杉基因组 DNA 进行良好的 ISSR 扩增。

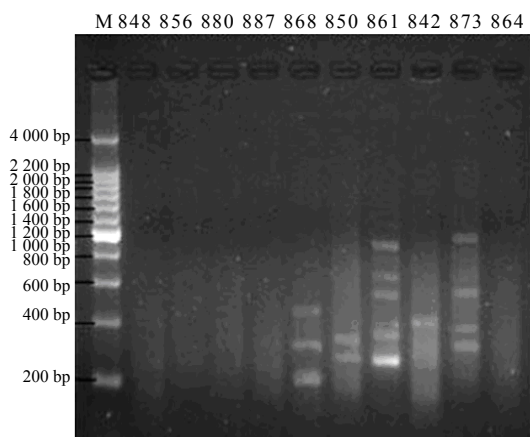


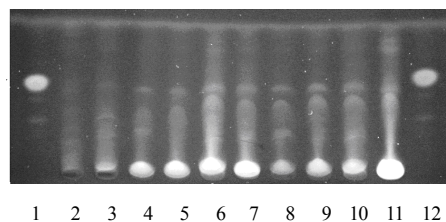
图 4 10 条 ISSR 引物对皱边石杉 DNA 的扩增结果

Fig. 4 Amplification of *H. crispata* DNA by 10 selected ISSR primers

3.5 内生真菌发酵生产 Hup A 的 TLC、HPLC 分析

由于 13 号菌株发酵液醇提物、水提物均与对照品 Hup A 有相同 Rf 值的迁移条带, 因此选定 13 号作为重点研究对象, 据此可初步推断 13 号菌株具有生产 Hup A 的潜力, 见图 5。

根据菌株形态学观察及种属鉴定结果, 13 号菌株在 PDA 培养基上, 菌落初期呈白色不规则圆形, 蔓延生长, 成熟后略带灰色, 周围有白色气生菌丝, 气生菌丝较为发达, 长绒毛状; 镜检菌丝无隔膜, 无



1 和 12-Hup A 对照品 2~5-发酵液水样 6~11-发酵液醇样
1 and 12-Hup A reference substance 2—5-fermentation aqueous samples 6—11-fermentation ethanol samples

图 5 13 号菌株发酵液水样和醇样的 TLC 分析

Fig. 5 TLC analysis on water and ethanol samples extracted from No.13 strains fermentation

细胞核, 呈分枝丝状体, 产生孢子器, 圆形分生孢子, 但不明显。参照《真菌鉴定手册》、《中国真菌志》, 初步推断 13 号菌株为半知菌类真菌。扩增 5.8 S rDNA ITS 保守区序列, ITS1/ITS4 引物扩增结果 BLAST 源性比对发现 13 号菌与胶孢炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* ITS 区之间的源性为 99%; ITS4/ITS5 引物扩增结果 BLAST 源性比对发现 13 号菌株与胶孢炭疽病菌亲缘关系最近 (NJ 置信度为 76%), 由此可知, 13 号菌株为胶孢炭疽病菌一变种。

对 13 号菌进行放大发酵培养, 发酵液经前处理之后进行 HPLC 分析。从图 6 可知, 13 号菌株发酵液放大样与 Hup A 对照品有相同的保留时间, 且峰形尖锐, 无杂质峰干扰。由图 5、6 的 TLC 和 HPLC 分析结果可知, 13 号菌株具有诱导生产 Hup A 的潜能。

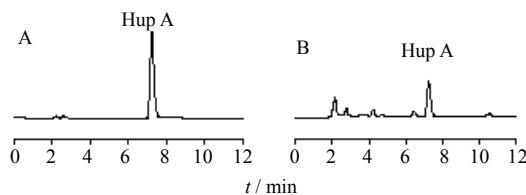


图 6 石杉碱甲对照品 (A) 和 13 号菌株放大培养 (B) 的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC chromatograms of Hup A reference substance (A) and No.13 strain enlarged fermentation (B)

4 讨论

由 ISSR 分子标记指纹图谱及菌落形态可知: 53 和 38 号、27 和 12 号、31 和 33 号、19 和 34 号、15 和 49 号菌株聚类分析各归为一小类, 但其 ISSR-PCR 扩增条带多态性有差异, 其菌落形态特征、菌丝体结构也有所不同; 40 和 48 号、8 和 60 号、32 和 26 号、23 和 58 号、67 和 13 号、37 和 54 号、30 和 69 号、28 和 29 号、18 和 20 号、57 和

61号菌株聚类分析结果各归为一小类,其对应的ISSR指纹图谱存在明显差异,菌落形态特征、菌丝体结构、孢子体形态也明显不同;9和24号、22和25号、16和41号、62和65号菌株聚类分析各归为一小类,ISSR-PCR扩增条带较为接近,菌落形态特征相似,但菌丝体结构存在明显差异。仅有1和2号、46和52号、63和64号、43和44号、35和42号这5对菌株亲缘关系极近,且菌落形态特征、菌丝体显微镜观察结果极为类似,比较对应的ISSR指纹图谱各自吻合,可推定这5对菌株各有1个重复样本。100个菌株,通过形态学鉴定可归为7个属类,而ISSR分子标记聚类分析可将其分为11大类。第I大类在相似系数为0.67时,又可细分为A、B、C、D、E 5个小类。一些在形态学鉴定为同一个种属的菌株,经过ISSR分子标记归类并不归在同一个类群中。由此可知,皱边石杉内生真菌资源遗传多样性丰富,ISSR分子标记细化并矫正了形态分类结果,为后期开发利用这些真菌资源提供丰富的遗传参考。

以UBC 868扩增皱边石杉所有内生真菌基因组DNA(图2),条带清晰、丰富,以其对皱边石杉植物样本DNA进行扩增,在500、350、200 bp处均有清晰扩增条带(图4),其中13号菌株在500、200 bp均有清晰的扩增条带,可获知13号菌株与宿主植物存在某些基因序列相同的片段。13号菌株可产生与宿主皱边石杉相同的功能成分——Hup A,由“内共生理论”可推测皱边石杉及其内生真菌形成了“真菌-宿主”共生体系,并在代谢产物中表现出趋同效果^[17],因而产生相同的次生代谢产物。利用内生真菌生产药用植物活性成分,一方面可保护珍稀药用植物资源,另一方面可发挥真菌繁殖快、生产量大等优势,前景广阔。但目前研究大部分集中于菌种的分离纯化及发酵产物的分析,对所获菌株需要发酵筛选,若没有筛选出最优发酵条件,一些潜力菌株会被淘汰。本试验建立的皱边石杉内生真菌ISSR遗传分化图谱(图3),从其遗传进化关系上分析:13号菌株所在的第III类菌株可作为Hup A生产的重点筛选、诱变对象;此遗传分化图谱对有目的性选择、开发其他目标功能菌株也具有重要的参考价值。

参考文献

- [1] Ma X Q, Jiang S H, Zhu D Y. Alkaloid patterns in *Huperzia* and some related genera of *Lycopodiaceae* *Sensu Lato* occurring in China and their contribution to classification [J]. *Biochem Syst Ecol*, 1998, 26(7): 723-728.
- [2] Ma X Q, Tan C, Zhu D Y, et al. Huperzine A from *Huperzia* species—An ethnopharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113(1): 15-34.
- [3] Ma X Q, Gang D R. *In vitro* production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(10): 2022-2028.
- [4] Haigh J R, Johnston S R, Peppernay A, et al. Protection of red blood cell acetylcholinesterase by oral huperzine A against *ex vivo* soman exposure: next generation prophylaxis and sequestering of acetylcholinesterase over butyrylcholinesterase [J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 175(1/3): 380-386.
- [5] Myers T M, Sun W, Saxena A, et al. Systemic administration of the potential countermeasure huperzine reversibly inhibits central and peripheral acetylcholinesterase activity without adverse cognitive-behavioral effects [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2010, 94(3): 477-481.
- [6] Wang R, Tang X C. Neuroprotective effects of huperzine A. A natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Neurosignals*, 2005, 14(1/2): 71-82.
- [7] Yu L J, Shi Y F, Huang J A, et al. Modification and validation of a high-performance liquid chromatography method for quantification of huperzine A in *huperzia crispata* [J]. *JAOAC Int*, 2010, 93(5): 1428-1435.
- [8] 裴刚, 周朴华, 蒋丽娟. 药用蕨皱边石杉的形态解剖学研究 [J]. 湖南林业科技, 2003, 30(4): 22-23.
- [9] 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.
- [10] Chiu H F, Zhang M. Dementia research in China [J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2000, 15(10): 947-953.
- [11] 龚玉霞, 蒋继宏, 陈凤美, 等. 蛇足石杉内生真菌的分离和抗植物病原真菌活性 [J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2007, 30(6): 689-691.
- [12] 张琳, 段紫英, 耿欣, 等. 蛇足石杉内生菌的分离与鉴定 [J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2010, 31(5): 79-84.
- [13] 禹利君, 高思青, 史云峰, 等. 皱边石杉内生真菌DNA提取有效方法比较 [J]. 生物技术, 2010, 20(1): 39-42.
- [14] 史云峰, 禹利君, 胥锦桦, 等. 皱边石杉内生真菌DNA快速有效提取的研究 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(6): 183-188.
- [15] 宋育红, 叶祖禄, 张杭颖, 等. 长柄石杉 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交优化 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(21): 37-42.
- [16] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [17] 曾松荣, 徐成东, 王海坤, 等. 药用植物内生真菌及其具宿主相同活性成分的机制初探 [J]. 中草药, 2000, 31(4): 306-308.