

川楝内生真菌的遗传及 PKS、NRPS 基因的多样性

任 丹¹, 张 波¹, 张小平^{1*}, 腾 芸¹, 李小林², 辜运富¹

1. 四川农业大学 资源环境学院微生物系, 四川 成都 611130

2. 四川省农业科学院土壤肥料研究所, 四川 成都 610066

摘 要: 目的 探明川楝 *Melia toosendan* 内生真菌遗传、聚酮合成酶基因 (PKS)、非核糖体多肽合成酶基因 (NRPS) 多样性, 为寻找合成生物活性物质的潜在菌株奠定基础。方法 对分离自药用植物川楝的 39 株内生真菌进行形态学鉴定, 并通过 PCR 技术扩增其 ITS 序列、PKS 基因和 NRPS 基因, 测序后进行 BLAST 比较和系统发育分析。结果 39 株菌株的表型鉴定和系统发育显示, 川楝内生真菌分属于青霉属、曲霉属、木霉属等 25 个属, 其中曲霉属 (17.9%)、青霉属 (15.4%) 为川楝内生真菌的优势真菌类群; 共得到 12 个 PKS 基因和 6 个 NRPS 基因, 其中 NRPS 基因都为青霉属。结论 川楝内生真菌具有非常丰富的遗传多样性和较强合成生物活性物质的潜在能力, 对青霉属和曲霉属内生真菌可以进行深入研究。

关键词: 川楝; 内生真菌; 系统发育; 聚酮合成酶; 非核糖体多肽合成酶

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)10-1461-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.10.020

Inheritance in endophytic fungi from *Melia toosendan* and diversity of genes of PKS and NRPS

REN Dan¹, ZHANG Bo¹, ZHANG Xiao-ping¹, TENG Yun¹, LI Xiao-lin², GU Yun-fu¹

1. Department of Microbiology, College of Resource and Environment, Sichuan Agriculture University, Chengdu 611130, China

2. Soil and Fertilizer Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

Abstract: Objective To explore the inheritance in endophytic fungi from *Melia toosendan* and the diversity of the genes of PKS and NRPS and to lay the foundation of looking for the synthesis of the potential strains of bioactive substances. **Methods** To identify the morphology of 39 strains of endophytic fungi separated from the medicinal plant *M. toosendan*; The ITS sequences and the genes of PKS and NRPS were obtained using PCR method, compared by BLAST and analyzed by phylogenesis after sequencing. **Results** The morphological identification and phylogenetic analysis on 39 strains showed that all strains of endophytic fungi from *M. toosendan* belonged to 25 categories, mainly *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Trichoderma*. The dominant fungus species were *Aspergillus* (17.9%), and *Penicillium* (15.4%). PKS (12) and NRPS (6) genes were detected in this study, All NRPS genes were *Penicillium*. **Conclusion** The endophytic fungi of *M. toosendan* have a rich genetic diversity and strong potential of synthesis of bioactive substances. Further research on *Penicillium* and *Aspergillus* should be carried out.

Key words: *Melia toosendan* Sieb. et Zucc.; endophytic fungi; phylogenesis; PKS; NRPS

川楝 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. 是楝科 (Meliaceae) 楝属 *Melia* Linn. 的落叶乔木^[1], 主要分布于四川、贵州、云南, 主要有效成分为川楝素 (toosendanin, C₃₀H₃₈O₁₁), 有驱虫、抗癌、抗毒素等作用^[2]。川楝虽然分布广泛, 但川楝素的产量却较低, 而药用植物内生菌可以产生与宿主相同或相似的天

然活性物质^[3], 如苦楝素^[4]、鬼臼毒素类似物^[5]。

聚酮类化合物 (polyketide, PK) 与非核糖多肽 (nonribosomal peptide, NRP) 是 2 类具有代表性的天然产物, 可用作抗生素、抗真菌剂、抗癌药物、免疫制剂、抗病毒药物等^[6-7]。催化这些天然产物合成途径的酶称为聚酮合成酶 (polyketide synthase, PKS) 和非核糖体多肽合成酶 (nonribosomal peptidesynthetase, NRPS)。已有研究发现, 禾本科

收稿日期: 2013-12-20

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2013AA102802-05)

作者简介: 任 丹 (1987—), 女, 四川南充人, 硕士研究生, 主要从事植物微生物多样性研究。E-mail: 979253954@qq.com

*通信作者 张小平 E-mail: zhangxiaopingphd@126.com

植物内生真菌^[8]中存在 NRPS, 番荔枝 *Annona squamosa* L. 内生真菌中存在 PKS^[9]。但是目前对药用植物内生真菌 PKS 和 NRPS 的研究相对较少。

传统真菌的鉴定以形态、生化等表型特征为基础, 过程复杂, 同时不产孢菌株用此方法鉴定较为困难。而分子生物学的发展为真菌的鉴定提供了更全面、科学的依据。ITS 序列在核苷酸序列上的高度变异性和长度上的保守型, 可以获得足够的信息来反映真菌种水平间的差异, 目前已应用于药用植物内生真菌的鉴定^[10]。

本研究对川楝内生真菌进行了形态学鉴定, 通过 PCR 扩增其 ITS 序列、PKS 和 NRPS 基因, 进行 BLAST 比较和系统发育分析, 以期了解川楝内生真菌的遗传多样性, 为川楝内生真菌资源的开发利用提供依据, 同时丰富 PKS 和 NRPS 基因数据库。

1 材料

采集四川省雅安市、攀枝花市、宜宾市、广元市、成都市、乐山市、西昌市、绵阳市、达州市 9 个地点, 经四川农业大学胡超讲师鉴定为川楝 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. 的根、茎、叶、皮、果, 从中共分离得到了 126 株内生真菌, 经去重和限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析后选取 39 株多样性明显的菌株作为本研究的目标菌株。

2 方法

2.1 内生真菌表型鉴定

用 PDA 培养基对 39 株菌株进行插片培养, 观察菌落特征和显微形态特征, 参照魏景超^[11]的方法将其鉴定到属。

2.2 内生真菌总 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法^[12]提取川楝内生真菌的 DNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量和大小, 置于 -20 °C 保存备用。

2.3 ITS-PCR 扩增

ITS-PCR 扩增所用引物为 ITS1 (5'-TCCGTAG-TGTAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')^[13]由上海生工合成。

ITS-PCR 扩增的反应体系 (30 μL): 2×PCR Mix 15 μL, ITS1 (10 pmol) 1 μL, ITS4 (10 pmol) 1 μL, DNA 1 μL, 无菌重蒸水补足至 30 μL。反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环, 72 °C 延

伸 10 min, 产物于 4 °C 恒温保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物的大小。

2.4 PKS 基因的扩增

PKS 基因扩增所用引物为 KAF (5'-GARKSICAYGGIACIGGIAC-3')、KAR1 (5'-C-CAYTGIGCICCRTGICIGARAA-3') 和 KAR2 (5'-CCAYTGIGCICCYTGICIGTRAA-3')^[14]由上海生工合成。

PKS 扩增的反应体系 (30 μL): 2×PCR Mix 15 μL, KAF (10 pmol) 1 μL, KAR1 或 KAR2 (10 pmol) 1 μL, DNA 2 μL, 无菌重蒸水补足至 30 μL。反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 产物于 4 °C 恒温保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物的大小。

2.5 NRPS 基因的扩增

NRPS 基因扩增所用引物为 AUG003 (5'-CCGGCACCACCGNAARCCHAA-3') 和 AUG007 (5'-CCGGACCATGTCGCCNGTBYKRT-A-3')^[15]由上海生工合成。

NRPS 扩增的反应体系 (30 μL): 2×PCR Mix 15 μL, AUG003 (10 pmol) 1 μL, AUG007 (10 pmol) 1 μL, DNA 2 μL, 无菌重蒸水补足至 30 μL。反应程序: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 产物于 4 °C 恒温保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物的大小。

2.6 测序及序列分析

将 ITS 的产物和得到的 PKS、NRPS 基因片段直接送华大基因科技有限公司测序。将所得序列在 GenBank 中进行 BLAST 同源性检索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), 将获得的同源序列和测定序列用 Clustal X 进行分析, 采用 MEGA 5.0 软件包中的 Kimura-2-Parameter Distance 模型进行多序列匹配, 用邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, Bootstrap 1 000 次检测各分支的置信值。将所测的序列提交到 GenBank 数据库, 获得登录号。

3 结果与分析

3.1 川楝内生真菌的鉴定

本实验共分离得到 126 株内生真菌, 经初步去重和限制性片段多态性分析后选择 39 株为代表菌株进行进一步分析, 见表 1。经过表型鉴定 (部分

表 1 川楝内生真菌形态学鉴定

Table 1 Morphological identification of endophytic fungi from *M. toosendan*

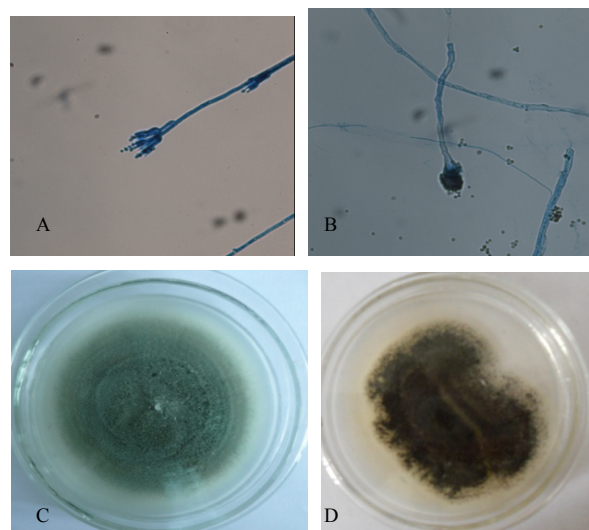
属	菌落特征	分生孢子形态	菌株
青霉属	菌落黄绿色、橄榄绿、深石板灰、深绿色毡状或毯状,边缘树枝状	分生孢子梗有横隔,顶端排列成帚状的间枝,单个孢子椭圆形	SCAU-F-121, SCAU-F-191, SCAU-F-109, SCAU-F-3, SCAU-F-50, SCAU-F-213
木霉属	菌落白色,边缘整齐,表面有绿色粉末,气生菌丝发达,绒毛状,产黄绿色色素	分生孢子梗直立,分支,分枝上有产孢小梗,分生孢子球形,	SCAU-F-194
曲霉属	菌落橄榄绿、黄绿色、黑色粉粒状、贴基、疏松,背面中间部分老化是为黄色	分生孢子梗光滑,顶端膨大呈球形,分生孢子串生于小梗顶端,做辐射状排列,圆形	SCAU-F-44, SCAU-F-46, SCAU-F-99, SCAU-F-1, SCAU-F-142, SCAU-F-27, SCAU-F-173
交链孢霉属	菌落灰白色、深石板灰灰色绒毛状、凸起,边缘整齐或树枝状	分生孢子梗暗色,单枝,长短不一,有隔膜,顶部有孢子链	SCAU-F-70, SCAU-F-133, SCAU-F-91, SCAU-F-176
黑葱花霉属	菌落石板灰毯状,凸起,背面黑色	分生孢子梗直立,有帚状分枝;分生孢子圆形,链生	SCAU-F-210
附球霉属	菌落粉红色绒毛状,边缘整齐,背面桃红色,疏松	分生孢子梗密集成簇,不分枝,短直;分生孢子单胞,球形,有不规则的分隔	SCAU-F-77
镰孢霉属	菌落白色毯状,贴基,边缘不规则,产紫红色色素	分生孢子梗浅色,瓶梗状,直立;分生孢子椭圆形	SCAU-F-29
枝顶孢霉属	菌落中间深绿色毯状,边缘白色、整齐	分生孢子梗直立,有分枝,无隔;分生孢子卵圆形	SCAU-F-74
多节孢属	菌落白色绒毛状,隆起,边缘树枝状,气生菌丝表生	分生孢子侧生,排成辐射状,分生孢子梗无色,有隔,不分枝	SCAU-F-143
肉座菌属	菌落白色凸起,边缘树枝状,气生菌丝绒毛状	孢子球形	SCAU-F-116
毛壳菌属	菌落灰黑色,绒毛状,背面黑褐色,边缘树枝状	子囊果表生,顶生附属毛,子囊孢子近圆形,子囊孢子两端尖的椭圆形	SCAU-F-57
脉孢菌属	菌落绿色毡状,致密,贴基,边缘整齐,背面橙色	分生孢子梗浅色,直立,分枝,有隔;分生孢子,单个,球形	SCAU-F-49
拟茎点霉属	菌落白色绒毛状,背面深灰色,边缘树枝状,菌丝体表生	分生孢子梗无色,直立,有隔,分生孢子单胞,椭圆形,有油滴	SCAU-F-188
枝孢霉属	菌落灰白色、疏松、凸起,气生菌丝短绒毛状,	分生孢子梗直立,有分枝,有隔,分生孢子卵圆形,单胞,可形成孢子链	SCAU-F-176
节孢霉属	菌落白色,有絮状的气生菌丝,产孢位置在气生菌丝上形成小黑点	分生孢子梗无色有隔,分生孢子单胞,椭圆形	SCAU-F-53
茎点霉属	菌落毯状,灰黑色,气生菌丝表生	分生孢子椭圆形	SCAU-F-167
短梗蠕孢霉属	菌落深橄榄绿毯状,边缘白色,整齐,背面橙红色	分生孢子短,椭圆形	SCAU-F-208

菌株的表型见图 1),能够鉴定到属的内生真菌菌株为 31 株,分属于 17 个属。部分菌株由于未产孢而没有鉴定到属。它们分别为青霉属 *Penicillium* Lk. ex Frise、木霉属 *Trichoderma* Pers. ex Fr.、曲霉属 *Aspergillus* Micheli ex Fr.、交链孢属 *Alternaria* Nees ex Wallr.、黑葱花霉属 *Periconia* Tode ex Schw.、附球菌属 *Epicoccum* Lk. ex Wallr.、镰孢霉属 *Fusarium* Lk. ex Fr.、枝顶孢霉属 *Acremonium* Lk. ex Fr.、多节孢属 *Nodulisporium* Press、肉座菌属 *Hypocrea* Fr.、

毛壳菌属 *Chaetomium* Kunze et Schmidt、脉纹孢菌属 *Neurospora* Shear et Dodge、拟茎点霉属 *Phomopsis* Sacc.、芽枝霉属 *Cladosporium* Link ex Fr.、节孢霉属 *Arthrimum* Kunze、茎点菌属 *Phoma* Sacc. 和短梗蠕孢霉属 *Trichocladium* Harz.

3.2 川楝内生真菌的系统发育分析

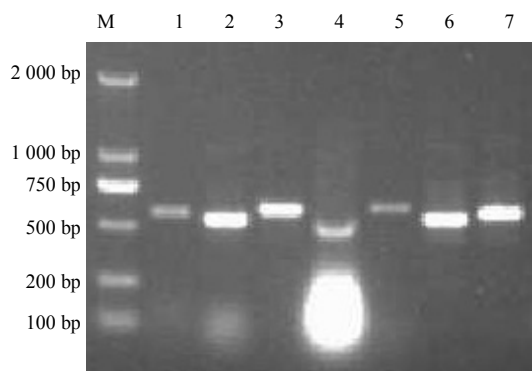
川楝内生真菌菌株 DNA 用引物 ITS1 和 ITS4 扩增得到的 PCR 产物,大小在 500~600 bp (图 2)。



A、B—光学显微镜的形态特征，C、D—PDA 培养基上的菌落（培养时间为 14 d，温度为 28 °C）；A、C—青霉属，B、D—曲霉属
A and B—morphological characteristics by optical microscope; C and D—colonies on PDA (culture time = 14 d, culture temperature = 28 °C); A and C—*Penicillium*; B and D—*Aspergillus*

图 1 部分川楝内生真菌菌株的表型鉴定

Fig. 1 Phenotype identification on some strains of endophytic fungi from *M. toosendan*



M—Marker 1—SCAU-F-1 2—SCAU-F-3 3—SCAU-F-12
4—SCAU-F-27 5—SCAU-F-29 6—SCAU-F-44 7—SCAU-F-46

图 2 部分菌株 ITS-PCR 扩增电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of ITS-PCR amplification of some strains

通过用 BLAST 在 Genbank 数据库序列对比分析发现，川楝内生真菌种群结构具有非常丰富的资源多样性。在本研究中，序列相似性最低的为 SCAU-F-210，与相似性最高的 *Periconia macrospinosa* 相似性仅为 86%；产孢 (SCAU-F-182) 与 *Botryotinia fuckeliana* 相似性最高，为 100%。

系统发育树 (图 3) 显示，川楝内生真菌分属于短梗蠕孢霉属、微壳色单隔孢属 *Microdiplodia*

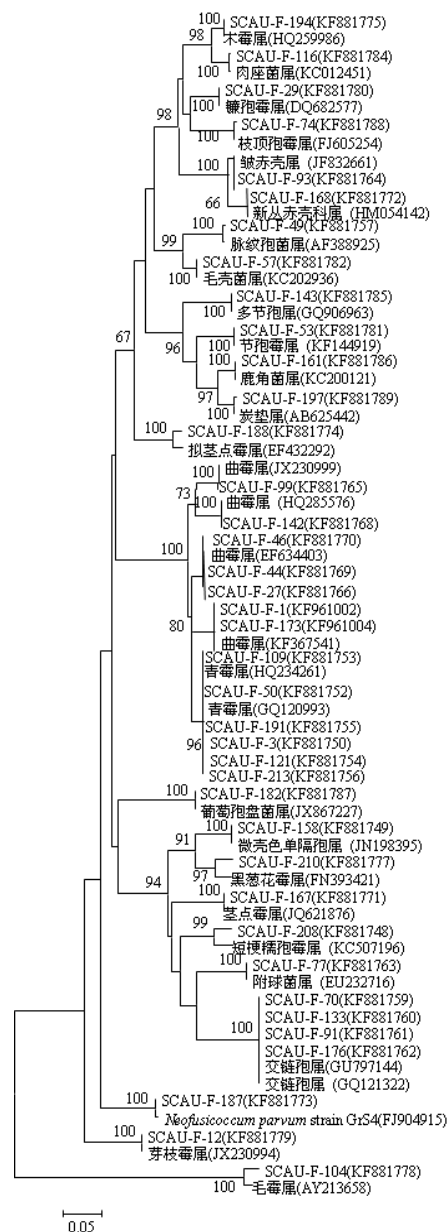


图 3 川楝内生真菌 ITS 序列的系统发育树

Fig. 3 Phyllogenetic tree of ITS sequences of endophytic fungi from *M. toosendan*

All、青霉属、交链孢属、脉纹孢菌属、附球霉属、新丛赤壳科属 *Neonectria* Wollenw.、曲霉属、芽枝霉属、拟茎点霉属、木霉属、茎点霉属、*Neofusicoccum parvum* Crous、黑葱花霉属、镰孢霉属、毛霉属 *Mucor* Micheli ex Fries、节孢霉属、毛壳菌属、皱赤壳属 *Rugonectria* P. Chaverri et Samuels、多节孢属、肉座菌属、鹿角菌属 *Xylaria* Hill ex Grev.、葡萄孢盘菌属 *Botryotinia* Whetzel、枝顶孢霉属和炭垫属 *Nemania* S. F. Gray 25 个属。所得 39 个序列中有 7 个序列归属于曲霉属 (17.9%)，6 个归属于青霉属

(15.4%)，为川楝内生真菌的优势属。

3.3 PKS 基因的分析

部分菌株的 PKS 基因扩增电泳图见图 4，由图可见产物条带在 600 bp 左右。

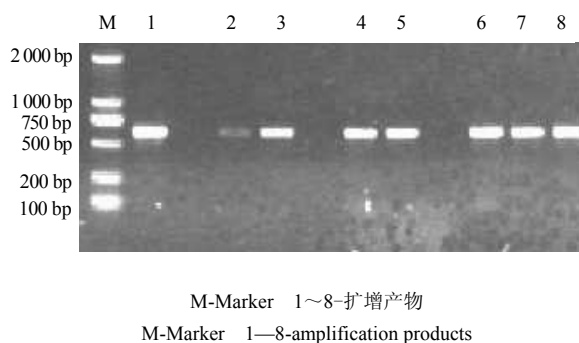


图 4 部分菌株的 PKS 基因扩增电泳图

Fig. 4 Electrophoretogram of PKS gene amplification of some strains

共得到 12 个 PKS 基因片段，占总量的 30.8%。将测序得到的 PKS 基因片段用 BLAST 比对，结果见表 2。本研究得到的 PKS 片段与 GenBank 中已知 PKS 序列的相似度较高，从 99%~100%。本研究得到的 PKS 基因均为 I 型的 PKS。PKS 基因的系统发育树（图 5）显示，它们分属于曲霉属、交链孢属、镰孢霉属、葡萄孢盘菌属，其中有 7 个为曲霉属。

表 2 川楝内生真菌 PKS 基因的相似菌株及相似度

Table 2 Similar strains and similarity of PKS genes of endophytic fungi from *M. toosendan*

菌株	最相似菌株	相似性 / %	登录号
SCAU-F-44	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af	99	KF960991
SCAU-F-46	293 (XM748048)	100	KF960994
SCAU-F-27		99	KF960990
SCAU-F-1		99	KF954544
SCAU-F-173		99	KF960996
SCAU-F-99	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 (XM001398484)	99	KF960993
SCAU-F-70	<i>Alternaria alternata</i> ATCC	99	KF960998
SCAU-F-133	66981 (JX103638)	99	KF960995
SCAU-F-176		100	KF960997
SCAU-F-142	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 (XM003190451)	99	KF960999
SCAU-F-182	<i>Botryotinia fuckeliana</i> (AY495613)	99	KF961000
SCAU-F-29	<i>Fusarium</i> sp. x11-77-1 (HQ234253)	99	KF961001

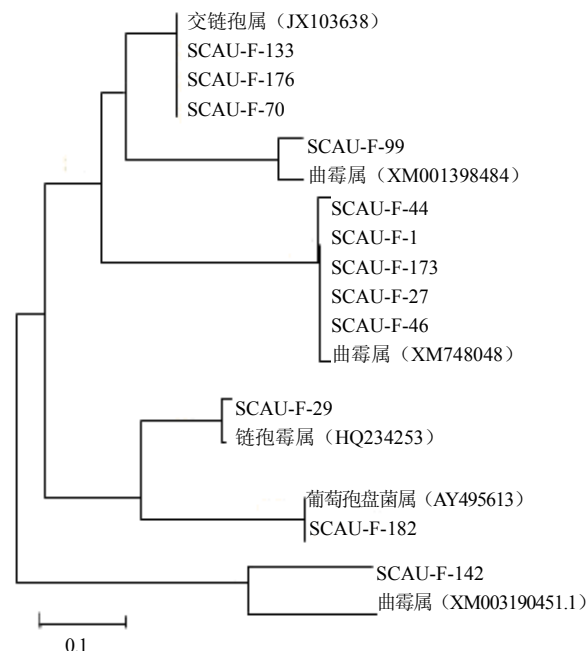


图 5 川楝内生真菌 PKS 基因的系统发育树

Fig. 5 Phyllogenetic tree of PKS genes of endophytic fungi from *M. toosendan*

3.4 NRPS 基因的分析

菌株的 NRPS 基因扩增电泳图见图 6，由图可见产物条带在 700 bp 左右。本研究共得到了 6 个 NRPS 基因片段，占总量的 15.4%。将测序得到的 NRPS 基因片段用 BLAST 比对，结果见表 3。本研究得到的 NRPS 片段与 GenBank 中已知 NRPS 序列的相似度很高，从 99%~100%。

得到的 6 个 NRPS 基因的相似序列都为 *Penicillium* sp.，因此 NRPS 的系统发育树省略。

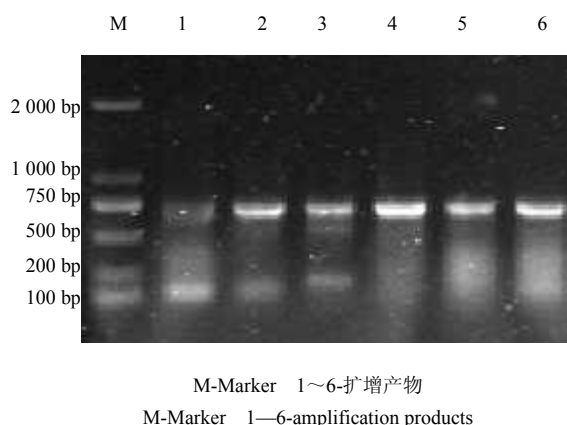


图 6 菌株的 NRPS 基因扩增电泳图

Fig. 6 Electrophoretogram of NRPS gene amplification of strains

表3 川楝内生真菌 NRPS 基因的相似菌株及相似度

Table 3 Similar strains and similarity of NRPS genes of endophytic fungi from *M. toosendan*

编号	最相似菌株	相似性 / %	登录号
SCAU-F-3	<i>Penicillium</i> sp.	99	KF929293
SCAU-F-109	(HQ234261)	99	KF929292
SCAU-F-121		99	KF929294
SCAU-F-191		100	KF929295
SCAU-F-213		100	KF929291
SCAU-F-50		99	KF982875

4 讨论

研究发现,药用植物具有非常丰富的内生真菌资源。而楝科植物内生真菌的研究主要集中在苦楝 *M. azedarach* L. 和印楝 *Azadirachta indica* A. Juss. 上,本研究弥补了对川楝内生真菌研究的不足。Geris 等^[16]从巴西苦楝分离出 55 株内生真菌,分属于 8 个属,青霉属和曲霉属是最多的。陈远友等^[17]从安徽农大校园等地苦楝分离出了 290 株,分属于 11 个属,其中匍柄霉属 *Stemphylium* Wallr.、交链孢属、刺盘孢属 *Colletotrichum* Corda 和拟茎点霉属是优势属。邵士成等^[18]从云南印楝分离出 372 株,分属于 50 个属,分布广泛的是刺盘孢属、交链孢属、鹿角菌属。Verma 等^[19]从印度印楝中分离出了 233 株,分属于 18 个属,拟茎点霉属、枝孢霉属、拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* Steys. 为优势属。本研究对川楝内生真菌的形态学鉴定和系统发育分析表明,川楝内生真菌分属于 25 个属,青霉属、曲霉属为优势属,可能植物种类和地理位置对内生真菌的资源多样性、优势种群有很大的影响。其他研究人员对川楝和印楝内生真菌的研究大多采取形态学鉴定的方法,而本研究采取形态学鉴定和分子生物学鉴定相结合的方法,弥补了不产孢菌株鉴定的不足,使川楝内生真菌的资源多样性较为完整,同时也证明了 ITS 结果的可靠性。但是,由于数据库还不够完善,有的菌株并没有鉴定到种。川楝内生真菌在资源的多样性上为寻找产生生物活性物质的菌株奠定了基础。

研究人员已经从印楝和苦楝的内生真菌中发现了多种生物活性物质。Geris 等^[20]从苦楝内生真菌青霉属分离得到了有抑菌活性的 3 个化合物。Campos 等^[21]从苦楝内生真菌 *Aspergillus aculeatus* Iizuka 中首次分离到 2 个聚酮类化合物。Yang 等^[22]

从苦楝内生真菌 *Fusarium* sp. LN-10 发酵产物中分离得到了有较强的海虾致死活性的化合物。本研究从川楝内生真菌中筛选出了 12 株含 PKS 基因的菌株和 6 株含 NRPS 基因的菌株,这些菌株隶属于青霉属、曲霉属、匍孢盘菌属、交链孢属、镰孢霉属。本研究从 6 株青霉属菌株中筛选出了 NRPS 基因,7 株曲霉属菌株中筛选出了 PKS 基因,表明川楝的内生真菌还是有发掘潜力的,其中青霉属和曲霉属值得深入研究。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [2] 张建楼, 钟秀会. 川楝素的药理作用研究概况 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2007(5): 65-67.
- [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] 王 琪, 傅育红, 高锦明, 等. 苦楝内生真菌的初步分离和筛选 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 224-227.
- [5] 曾绍荣, 邵 华, 张玲琪. 从南方荷叶中分离出一株产鬼臼毒素类似物的内生真菌 [J]. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 116-119.
- [6] 冯建飞, 周日成, 郭兴庭, 等. 聚酮类化合物及其应用 [J]. 现代农业科技, 2011(3): 24-26.
- [7] 王世媛. 非核糖体肽合成酶 (NRPSs) 作用激励与应用的研究进展 [J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 734-737.
- [8] 王 永, 纪燕玲, 王 晗, 等. 禾本科植物内生真菌研究 13: 禾本科植物内生真菌的分离鉴定及基因组 DNA 的快速提取 [J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(3): 52-56.
- [9] 林 筱. 番荔枝内生真菌的分离、鉴定、活性筛选及次级代谢产物的初步研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2008.
- [10] 魏希颖, 张黎光, 姚玉秀, 等. 产黄芩苷内生真菌的筛选与鉴定 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(6): 819-823.
- [11] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [12] 单淑芳. 苦楝内生真菌生物多样性及其代谢产物生物活性的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009.
- [13] 燕 勇, 李卫平, 高雯洁, 等. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 1958-1961.
- [14] Nicholson T, Rudd B, Dawson M, et al. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide

- synthases [J]. *Chem Biol*, 2001, 8(2): 157-178.
- [15] Slightom J L, Metzger B P, Luu H T, *et al*. Cloning and molecular characterization of the gene encoding the aureobasidin A biosynthesis complex in *Aureobasidium pullulans* BP-1938 [J]. *Gene*, 2009, 431(1/2): 67-79.
- [16] Geris dos S, Regina M, Rodrigues-Fo E, *et al*. Endophytic fungi from *Melia azedarach* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2003, 19(8): 767-770.
- [17] 陈远友, 单淑芳. 苦楝内生真菌的生物多样性研究 [J]. 安徽农学通报, 2009, 15(14): 60-63.
- [18] 邵士成, 吴少华, 陈有为, 等. 云南元江印楝植物内生真菌的种类组成 [J]. 生物多样性, 2008, 16(1): 63-67.
- [19] Verna V C, Gond S K, Kumar A, *et al*. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem Tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India) [J]. *Microb Ecol*, 2007, 54(1): 119-125.
- [20] Geris dos S, Regina M, Rodrigues-Fo E. Meroterpenes from *Penicillium* sp. found in association with *Melia azedarach* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(8): 907-912.
- [21] Campos F R, Barison A, Daolio C, *et al*. Complete ¹H and ¹³CNMR assignments of aurasperone A and fonsecinone A, two bis-naphthopyrones produced by *Aspergillus aculeatus* [J]. *Magn Reson Chem*, 2005, 43(11): 962-965.
- [22] Yang S X, Gao J M, Zhang Q, *et al*. Toxic polyketides produced by *Fusarium* sp., an endophytic fungus isolated from *Melia azedarach* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(6): 1887-1889.