

北沙参内生真菌的抑菌活性与分类研究

侯晓强^{1,2}, 任秀艳^{1,2}, 付亚娟^{1,2}, 王浩¹, 左秀丽¹, 吕寒聪¹, 张志丽¹

1. 廊坊师范学院生命科学学院, 河北 廊坊 065000

2. 河北省高校食用菌资源开发应用技术研发中心, 河北 廊坊 065000

摘要: **目的** 研究北沙参内生真菌的抗菌活性, 鉴定活性真菌的分类地位。**方法** 采用植物组织分离法从北沙参基原植物珊瑚菜 *Glehnia littoralis* 中分离内生真菌。以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色假丝酵母为指示菌株, 采用牛津杯法研究北沙参内生真菌的抑菌活性, 对具有抑菌活性的内生真菌进行分子鉴定。**结果** 有 4 株内生真菌对大肠杆菌具有抑制作用, 内生真菌发酵浓缩液抑菌圈直径与 4 U/mL 硫酸庆大霉素抑菌圈直径的比值 (d/D) 最大可达 1.07; 有 15 株内生真菌对金黄色葡萄球菌具有抑制作用, d/D 值最大为 0.65; 有 3 株内生真菌对白色假丝酵母具有抑制作用, 内生真菌发酵浓缩液与 0.2 mg/mL 氟康唑的 d/D 值最大可达 1.27。19 株具有抑菌活性的内生真菌归于 4 个目, 5 个科, 7 个属, 8 个种。**结论** 北沙参植物中存在多种抑菌活性的内生真菌, 对于北沙参内生真菌资源的开发及药材道地性的评价具有一定的指导意义。

关键词: 北沙参; 内生真菌; 抑菌活性; 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌; 白色假丝酵母; 真菌鉴定

中图分类号: R282.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)19-2932-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.19.019

Study on antimicrobial activity and classification of endophytic fungi from *Glehnia littoralis*

HOU Xiao-qiang^{1,2}, REN Xiu-yan^{1,2}, FU ya-juan^{1,2}, WANG Hao¹, ZUO Xiu-li¹, LV Han-cong¹, ZHANG Zhi-li¹

1. College of Life Science, Langfang Teachers University, Langfang, 065000, China

2. Edible and Medicinal Fungi Research and Development Center of Hebei Universities and Colleges, Langfang, 065000, China

Abstract: Objective To screen the endophytic fungi with antimicrobial activity from *Glehnia littoralis* and identify the taxonomy of these fungi. **Methods** The endophytic fungi were isolated from *G. littoralis* by method of tissue isolation. The oxford-cup test was used in screening the endophytic fungi with antimicrobial activity for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* respectively. And the rDNA ITS1-5.8S-ITS2 sequences were applied for the taxonomy of endophytic fungi. **Results** Nineteen strains of fungi with antimicrobial activity were attributed to four genera, five families, seven orders, and eight species. In these fungi, there were four strains with antimicrobial activity to *E. coli* (the max d/D value was 1.07), Fifteen strains with antimicrobial activity to *S. aureus* (the max d/D value was 0.65), and three strains with antimicrobial activity to *C. albicans* (the max d/D value was 1.27). **Conclusion** Many kinds of fungi with antimicrobial activity inhabit in *G. littoralis*. This study is helpful to develop the recourses of endophytic fungi and to evaluate the genuineness of *G. littoralis*.

Key words: *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.; endophytic fungi; antimicrobial activity; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Candida albicans*; fungal identification

北沙参为伞形科植物珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq. 的干燥根, 主要分布于山东、辽宁、河北、江苏、浙江、广东、福建、台湾等地, 生长于沿海沙地。北沙参作为传统中药在临床上广泛使用, 具有养阴清肺、益胃生津之功效, 用于肺

热燥咳、劳嗽痰血、胃阴不足、热病津伤、咽干口渴等症^[1]。野生珊瑚菜资源稀少, 加上海滨沙滩不断开发, 生境遭受破坏, 其种群数量急剧减少。1999年, 珊瑚菜被列为国家 II 级重点保护野生植物^[2]。北沙参主要含香豆素类、聚炔类、糖苷、挥发油等

收稿日期: 2015-02-05

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究青年基金项目 (2011108, QN2014129); 廊坊师范学院微生物学重点学科项目 (2015001)

作者简介: 侯晓强 (1979—), 男, 博士, 副教授, 主要从事药用植物菌根生物学研究。E-mail: xqhou1979@126.com

化学成分^[3], 其中聚炔类成分 Falcarindiol 具有很强的抗革兰氏阳性菌活性^[4]。

植物内生真菌是生活史中的某一段时期生活在植物组织内, 对植物组织没有引起明显病害症状的真菌。内生真菌能够对植物生长发育进行积极调控, 具有促生抗逆等重要生物学功能, 并可以产生与宿主相同或相似的生理活性物质^[5]。来源于药用植物的许多内生真菌都具有抗菌活性, 所产生的抗菌活性物质种类繁多^[6]。本实验以北沙参为材料, 筛选内生真菌的抗菌活性, 为北沙参内生真菌资源开发奠定理论基础。

1 材料

北沙参于 2011 年 9 月采自山东省烟台海滨, 由廊坊师范学院侯晓强副教授鉴定为伞形科植物珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq. 的根。

大肠杆菌 *Escherichia coli* (1.797)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (1.2465) 和白色假丝酵母菌 *Candida albicans* (2.3990) 购自中国普通微生物菌种保藏中心。

PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH。察氏培养基: 硝酸钠 3 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 蔗糖 30 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH。牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 琼脂 15 g, pH 7.0~7.2。酵母培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH。

2 方法

2.1 内生真菌的分离与纯化

采用植物组织分离法分离北沙参内生真菌。从 5 株北沙参健康植株上随机选取根、茎、叶, 清水洗净, 切成 1 cm 左右小段。70%乙醇浸泡 30 s, 无菌水洗涤 1 次, 3% NaClO 浸泡消毒, 根、茎、叶消毒时间分别为 4、3、1 min, 无菌水洗涤 3 次。无菌条件下, 将材料剪成 0.2 cm 小段, 置于 PDA 培养基上, 25 °C 黑暗培养。待植物材料长出真菌菌丝, 挑取菌丝先端接种至 PDA 培养基上, 25 °C 黑暗培养 6~7 d, 根据内生真菌的菌落形态和显微形态特征, 对内生真菌进行纯化。

2.2 内生真菌的发酵液制备

内生真菌接种于 PDA 培养基平板上, 25 °C 黑暗培养 7 d, 用直径 6 mm 打孔器在菌落边缘打孔, 挑取 5 块菌盘接种于装有 100 mL 察氏培养基的锥形瓶中,

160 r/min、25 °C 黑暗培养 10 d。离心分离去除菌丝体, 发酵液用真空冷冻干燥机浓缩至 1/10 体积, 备用。

2.3 抑菌实验

大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别接种至液体牛肉膏蛋白胨培养基, 37 °C、200 r/min 黑暗培养 24 h。白色假丝酵母菌接种至液体酵母培养基, 25 °C、160 r/min 黑暗培养 48 h。用生理盐水分别对各指示菌菌液进行梯度稀释, 稀释至浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL。

采用牛津杯扩散法^[7]进行抑菌实验。分别取稀释的指示菌菌液 0.1 mL 均匀涂布在相应的固体培养基平板上, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上, 白色假丝酵母菌涂布于酵母培养基上。在涂布指示菌的平板上放置 3~5 只牛津杯, 其中 1 只牛津杯中加入 100 μ L 浓缩 10 倍的察氏培养基作为阴性对照, 另 1 只牛津杯中加入 100 μ L 抗生素溶液作为阳性对照(大肠杆菌和金黄色葡萄球菌平板以 4 U/mL 硫酸庆大霉素为阳性对照; 白色假丝酵母菌平板以 0.2 mg/mL 氟康唑为阳性对照), 其余牛津杯中分别加入不同内生真菌发酵液的浓缩液 100 μ L。指示菌平板 4 °C 放置 24 h 后, 置于相应的培养条件下培养(大肠杆菌和金黄色葡萄球菌平板 37 °C 黑暗培养 24 h, 白色假丝酵母菌平板 25 °C 黑暗培养 48 h), 平行实验重复 3 次, 分别测定抑菌圈直径。

2.4 抑菌活性内生真菌的鉴定

具有抑菌活性的内生真菌, 依据 rDNA 的内部转录间隔区(ITS)序列进行分子鉴定。内生真菌基因组 DNA 采用柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物有限公司)提取, 用通用引物 ITS1: (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4: (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS1 5.8 S 的全序列^[8]。PCR 反应体系 50 μ L: 1 \times PCR 缓冲液, MgCl₂ 3 mmol/L, 4 种 dNTP 各 200 mmol/L, 上下游引物各 0.3 μ mol/L, Taq 酶 2.0 U, DNA 模板 2 μ L。反应程序: 94 °C 预变性 3 min, 进入循环, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 8 min。PCR 产物送上海生工测序。将不同真菌的 ITS 序列在 GenBank 中进行 BLAST 分析, 寻找与查询序列相似性大于 95% 的 rDNA ITS 序列^[9], 利用 ClustalX 2.0.11 软件^[10]进行全序列比对, 用 MEGA 5.0 软件^[11]进行聚类分析, 构建最大邻接树。根据聚类结果, 对内生真菌进行

分子鉴定。

3 结果与分析

3.1 北沙参内生真菌的分离

从 5 株北沙参材料中共分离得到内生真菌 69 株，其中从根中分离得到 30 株，占分离菌株数的 43.5%；茎中分离得到 22 株，占分离菌株数的 31.9%；叶中分离得到 17 株，占分离菌株数的 24.6%。可见北沙参中存在着丰富的内生真菌。

3.2 内生真菌的抑菌活性

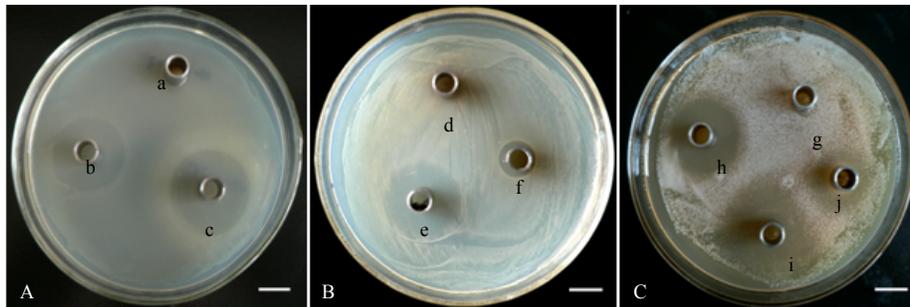
北沙参内生真菌中，有 19 株真菌至少对 1 种指示菌具有抑菌活性，活性菌株占内生真菌总数的 27.5%，有 2 株真菌同时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有抑菌活性，有 1 株真菌同时对金黄色葡萄球菌和白色假丝酵母菌有抑菌活性。

北沙参内生真菌中有 4 株真菌对大肠杆菌有不同程度的抑制作用，分别为 02-S-12、02-S-21、02-R-3、02-R-9，其中菌株 02-R-3 的发酵浓缩液对大肠杆菌的抑菌效果最好，抑菌圈直径达 (32.92±0.34) mm (图 1-A)，其抑菌圈直径与 4 U/mL 硫酸庆大霉素抑菌圈直径比值 (*d/D*) 达 1.07 (表 1)。

有 15 株内生真菌 (02-L-8、02-L-10、02-L-11、02-L-15、02-L-21、02-L-22、02-S-3、02-S-10、02-S-12、02-S-15、02-S-21、02-S-22、02-S-32、02-R-5、02-R-11) 发酵液对金黄色葡萄球菌表现出不同程度的抑菌活性，部分内生真菌的抑菌圈见图 1-B。内生真菌对金黄色葡萄球菌抑制作用结果见表 2。其中 02-L-22 的发酵浓缩液抑菌效果最佳，其发酵浓缩液抑菌圈直径与对照 4 U/mL 硫酸庆大霉素抑菌圈 *d/D* 值达 0.65。

有 3 株内生真菌的对白色假丝酵母菌有不同程度的抑制作用，菌株分别为 02-S-2、02-S-22、02-S-23 (图 1-C)。内生真菌对白色假丝酵母菌的抑菌效果见表 3，其中 02-S-2 对白色假丝酵母菌的抑菌效果最好，抑菌圈直径为 (31.5±0.41) mm，其发酵浓缩液抑菌圈直径与对照 0.2 mg/mL 氟康唑抑菌圈 *d/D* 值为 1.27。

菌株 02-S-12 和 02-S-21 同时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有抑菌活性，其对大肠杆菌的 *d/D* 值分别为 0.30 和 0.91；对金黄色葡萄球菌的 *d/D* 值分别为 0.23 和 0.40。菌株 02-S-22 同时对金黄色葡萄球菌和白色假丝酵母菌有抑菌活性，其 *d/D* 值分别为 0.41 和 0.81。



A-大肠杆菌 B-金黄色葡萄球菌 C-白色假丝酵母菌 a、d、g-培养基 10 倍浓缩液 b、e-4 U/mL 硫酸庆大霉素 h-0.2 mg/mL 氟康唑 c-02-R-3 发酵浓缩液 f-02-L-10 发酵浓缩液 i-02-S-2 发酵浓缩液 j-02-S-22 发酵浓缩液
A-*E. coli* B-*S. aureus* C-*C. albicans* a, d, g-concentrated solution of 10 times of medium b, e-gentamycin sulfate (4 U/mL) h-fluconazole (0.2 mg/mL) c-concentrated solution of 02-R-3 f-concentrated solution of 02-L-10 i-concentrated solution of 02-S-2 j-concentrated solution of 02-S-22

图 1 内生真菌发酵液的抑菌圈

Fig. 1 Antimicrobial effects of endophytic fungal fermented liquid

表 1 北沙参内生真菌发酵浓缩液对大肠杆菌的抑菌作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Antibacterial effects of endophytic fungal fermented liquid on *E. coli* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌株编号	发酵浓缩液抑菌圈直径/mm	硫酸庆大霉素抑菌圈直径/mm	<i>d/D</i>
02-S-12	8.25±0.20	27.50±0.41	0.30
02-S-21	22.50±0.41	24.75±0.20	0.91
02-R-3	32.92±0.34	30.67±0.00	1.07
02-R-9	10.75±0.20	26.25±0.61	0.41

3.3 内生真菌的鉴定

对抑菌活性菌株 ITS 序列和与其相似性大于 95% 的已知真菌的 ITS 序列进行 BLAST 分析，构建最大邻接树，获得与待测菌株聚在同一分支且相似性最大的已知真菌，结果见表 4。根据相似性 ≥99%，可以鉴定到种；相似性在 95%~99%，可以鉴定到属，而相似性 <95%，只能鉴定到科的序列相似性原则^[12]，19 株活性菌株与匹配菌株相似性均 ≥99%，可鉴定到种，其分类地位与匹配菌株一致 (表 4)，但菌株 02-R-3 的匹配菌株只鉴定到属，因

表 2 北沙参内生真菌发酵浓缩液对金黄色葡萄球菌的抑菌作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Antibacterial effects of endophytic fungal fermented liquid on *S. aureus* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌株编号	发酵浓缩液抑菌圈	硫酸庆大霉素抑菌圈	d/D
	直径/mm	直径/mm	
02-L-8	13.00±1.08	31.50±0.41	0.41
02-L-10	7.10±0.08	27.20±0.22	0.26
02-L-11	10.42±0.59	24.92±0.24	0.42
02-L-15	15.00±1.47	29.00±4.30	0.52
02-L-21	7.23±0.21	29.83±0.24	0.24
02-L-22	20.50±0.71	31.50±0.41	0.65
02-S-3	7.67±0.62	27.50±0.41	0.28
02-S-10	10.17±1.43	26.00±0.41	0.39
02-S-12	7.00±0.00	30.25±0.20	0.23
02-S-15	17.00±0.82	31.50±0.41	0.54
02-S-21	10.50±0.41	26.00±0.41	0.40
02-S-22	11.20±0.22	27.17±0.24	0.41
02-S-32	14.23±0.21	22.50±2.04	0.63
02-R-5	11.50±0.41	27.17±0.85	0.42
02-R-11	12.00±2.16	25.50±2.16	0.47

表 3 北沙参内生真菌发酵浓缩液对白色假丝酵母菌的抑菌作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Antimicrobial effects of endophytic fungal fermented liquid on *C. albicans* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌株编号	发酵浓缩液抑菌圈	氟康唑抑菌圈	d/D
	平均值/mm	直径/mm	
02-S-2	31.50±0.41	24.83±0.41	1.27
02-S-22	20.00±0.27	24.83±0.41	0.81
02-S-23	8.63±0.10	27.38±0.51	0.32

而菌株 02-R-3 只能鉴定到属为 *Leptosphaeria* sp.。19 株抑菌活性菌株经分类鉴定, 归于 4 个目, 5 个科, 7 个属, 8 个种。在这些内生真菌中, 归属于同一个种的不同菌株的抑菌谱及抑菌作用存在差异, 如 *C. destructivum*、*C. gloeosporioides* 和 *A. alternata*。可能是内生真菌种下亚种的分化或株系间存在的差异, 导致次生代谢产物种类及产量的不同。Mapperson 等^[13]在光黑壳属 *Preussia* Fuckel 内生真菌抗菌活性研究中发现, *P. isomera* 的不同菌株的抑菌谱及抑菌作用也存在差异。

4 讨论

以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色假丝酵母菌为指示菌, 研究北沙参内生真菌发酵液的抑菌活

表 4 聚类分析获得的与抑菌活性内生真菌相似性最大的菌株
Table 4 Endophytic fungi and their closest relatives from GenBank

菌株	GenBank 比对 (ITS 序列)		
	相似性最大的匹配菌株	序列号	相似度/%
02-L-8	互格交链孢菌 <i>Alternaria alternata</i>	KJ526175	100
02-L-10	毁灭炭疽菌 <i>Colletotrichum destructivum</i>	JQ619816	99
02-L-11	毁灭炭疽菌	JX625171	99
02-L-15	茄萁柄霉菌 <i>Stemphylium solani</i>	KF999031	99
02-L-21	互格交链孢菌	KJ008700	99
02-L-22	毁灭炭疽菌	JX625169	100
02-S-2	胶胞炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KF053199	99
02-S-3	毁灭炭疽菌	GU935874	99
02-S-10	互格交链孢菌	KF644352	100
02-S-12	互格交链孢菌	KJ008700	99
02-S-15	毁灭炭疽菌	JX625171	100
02-S-21	毁灭炭疽菌	GU935874	99
02-S-22	芸蓴炭疽菌 <i>Colletotrichum higginsianum</i>	KF550281	99
02-S-23	毁灭炭疽菌	GU935874	99
02-S-32	胶胞炭疽菌	JX878503	99
02-R-3	小球腔菌属 <i>Leptosphaeria</i> sp.	KF657727	99
02-R-5	青霉菌 <i>Penicillium venetum</i>	AJ005485	99
02-R-9	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	GU479910	99
02-R-11	柱孢葡萄穗霉菌 <i>Stachybotrys eucylindrospora</i>	KF294232	99

性。内生真菌发酵液的抑菌圈直径大小可以反映出抑菌活性的高低, 但研究中发现, 同一浓度的抗生素溶液在同一种指示菌的不同平板上的抑菌圈大小存在差异。内生真菌发酵液抑菌活性测定时, 在每个指示菌平板上, 以内生真菌发酵培养基作为阴性对照, 以抗生素作为阳性对照, 以内生真菌发酵液的抑菌圈直径与抗生素抑菌圈直径的比值作为衡量内生真菌抑菌活性的指标, 更能准确地反映内生真菌发酵液抑菌活性的强弱。

植物内生真菌是新天然产物及活性物质发现的重要来源, 本研究从北沙参中获得了 19 株具有抑菌活性的内生真菌, 经分类鉴定归于 4 个目, 5 个科, 7 个属, 8 个种。部分活性内生真菌的同种或同属内生真菌已有抗菌活性化合物的报道, 黄花蒿内生真菌 *C. gloeosporioides* 产生的 colletotric acid 对真菌具有很强的抑制作用^[14]; Zhou 等^[15]从红树植物 *Bruiera sexangula* Lour. 内生真菌 *Stemphylium* sp.

中获得的 2 种新的具有抑菌活性的 α 吡喃酮衍生物 Infectopyrones A、B; Strongman 等^[16]从红树内生真菌 *Leptosphaeria oraemaris* Linder. 中发现一种具有抗菌活性的倍半萜 culmorin。交链孢属 *Alternaria* (Nees) 内生真菌能够产生多种抑菌活性物质, 如从黄精分离的交链孢属真菌可产生三萜皂苷^[17], 从 *Dendronephthya hemprichi* Klunzinger 分离的真菌 *A. alternata* 可产生 7 种萘骈- γ -吡酮(naphtho- γ -pyrone) 类衍生物^[18]; 从 *Terminalia chebula* Retz. 分离的真菌 *A. alternata* 可产生 altenusin^[19]。由此可见, 北沙参抑菌活性内生真菌具有产生多种抑菌活性物质的潜力, 其中 *A. alternata* 也可能产生与北沙参聚炔类抑菌成分相类似的抑菌化合物。内生真菌产生化合物的种类, 可能与宿主植物协同进化有关。Kim 等^[20]发现寄生植物菟丝子和寄主植物之间存在 RNA 的自由交换, 进而影响各自的生长过程。内生真菌生活在植物体内, 二者之间也可能存在着 RNA 的交换, 从而影响二者的次生代谢过程, 这或许是不同产地药材道地性差异的原因之一。因此, 研究北沙参内生真菌的抑菌活性, 有助于从药用植物北沙参内生真菌中寻找新的抑菌活性物质, 有助于了解内生真菌和北沙参在次生代谢方面的相互影响, 对于北沙参药材质量评价具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 国家重点保护野生植物名录 (第 1 批) [M]. 北京: 国家林业局、农业部, 1999.
- [3] 辛 华, 丁雨龙. 北沙参的生物学与化学成分的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1275-1277.
- [4] Yuan Z, Tezuka Y, Fan W, et al. Constituent of the underground parts of *Glehnia littoralis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(1): 73-77.
- [5] 毕江涛, 何 萍, 吕 雯, 等. 桃儿七内生真菌分离及其抑菌活性初步研究 [J]. 中草药, 2013, 43(12): 1667-1672.
- [6] 施琦渊, 陈晓梅, 郭顺星. 植物内生真菌来源的抗菌活性物质研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(11): 804-807.
- [7] 邵 颖, 陈宏伟, 柴文波, 等. 蛹拟青霉发酵液中抑菌活性成分的分纯化 [J]. 食品科学, 2012, 33(23): 116-120.
- [8] *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* [M]. New York: Academic Press, 1990.
- [9] Sánchez M S, Bills G F, Zabalgogezcoa I. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses [J]. *Fungal Divers*, 2008, 33(1): 87-100.
- [10] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2. 0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [12] Landeweert R, Leeftang P, Kuyper T W, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 327-333.
- [13] Mapperson R R, Kotiw M, Davis R A, et al. The diversity and antimicrobial activity of *Preussia* sp. endophytes isolated from Australian dry rainforests [J]. *Curr Microbiol*, 2014, 68(1): 30-37.
- [14] Lu H, Zou W X, Meng J C, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua* [J]. *Plant Sci*, 2000, 151(1): 67-73.
- [15] Zhou X M, Zheng C J, Song X P, et al. Antibacterial α -pyrone derivatives from a mangrove-derived fungus *Stemphylium* sp. 33231 from the South China Sea [J]. *J Antibiot* (Tokyo), 2014, 7(5): 401-403.
- [16] Strongman D B. A culmorin by marine fungi *Leptosphaeria oraemaris* [J]. *J Bot Mar*, 1986, 30(1): 21-25.
- [17] 李艳玲, 王德才, 史仁玖, 等. 泰山黄精内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1490-1494.
- [18] Shaaban M, Shaaban K A, Abdel-Aziz M S. Seven naphtho- γ -pyrones from the marine-derived fungus *Alternaria alternata*: structure elucidation and biological properties [J]. *Org Med Chem Lett*, 2012, 2(1): 6-13.
- [19] Phaopongthai J, Wiyakrutta S, Meksuriyen D, et al. Azole-synergistic anti-candidal activity of altenusin, a biphenyl metabolite of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Terminalia chebula* Retz [J]. *J Microbiol*, 2013, 51(6): 821-828.
- [20] Kim G, LeBlanc M L, Wafula E K, et al. Plant science. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts [J]. *Science*, 2014, 345(6198): 808-811.