

杜仲叶和果实中内生真菌的分离及抑菌活性

张维瑞, 郭秀春, 李 钦, 闫兴民, 李家梦, 温艳华, 袁王俊*

河南大学中药研究所, 河南 开封 475004

摘要: 目的 从杜仲 *Eucommia ulmoides* 叶和果实中分离具有抑菌作用的内生真菌。方法 采用平板培养法从杜仲叶片和果实中分离内生真菌, 通过对峙法和生长速率法考察这些内生真菌的抑菌活性, 并通过 HPLC 法考察其具有代谢产生杜仲有效活性成分的能力。对具有良好抑菌效果和能够代谢杜仲活性成分的内生真菌进行 ITS 序列测定, 鉴定其归属。结果 从健康叶片和果实中分离到 52 株内生真菌, 其中 2 个菌株的提取液中含有绿原酸, 11 个菌株至少对 4 种病原菌具有抑制作用, 其中 29 号菌株(链格孢属 *Alternaria* sp.) 对芽孢杆菌 *Fusarium graminearum* 的抑制效果最好, 其抑制率高达 82.6%。通过与 GenBank 数据比对, 这些内生真菌分别属于链格孢属 *Alternaria*、黑孢属 *Nigrospora* 和座囊菌纲(Dothideomycetes)。结论 从杜仲叶和果实中分离到 11 株具有抑菌作用的内生真菌, 这些具有抑菌作用的内生真菌可用于生物制药和农业产业。

关键词: 杜仲; 内生真菌; 抑菌活性; 分子鉴定; 芽孢杆菌

中图分类号: R282.15 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)16-2921-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.025

Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from leaf and fruit of *Eucommia ulmoides*

ZHANG Wei-ruì, GUO Xiu-chun, LI Qin, YAN Xing-min, LI Jia-meng, WEN Yan-hua, YUAN Wang-jun

Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng, 475004, China

Abstract: Objective To isolate endophytic fungi from the leaves and fruits of *Eucommia ulmoides* and evaluate their antimicrobial activity. **Methods** The endophytic fungi from the leaves and fruits of *E. ulmoides* were isolated by plate culture method, the antimicrobial activity was evaluated by standoff method, and the ability of producing bioactive compounds of *E. ulmoides* was investigated by HPLC. **Results** A total of 52 endophytic fungi were isolated from segments of healthy the leaves and fruits *E. ulmoides*. Extract of two strains had a retention time identical to that of authentic chlorogenic acid. Eleven out of 52 strains exhibited antimicrobial activity to four or more fungal pathogens. The strain 29 (*Alternaria* SP.) showed maximum inhibition against *Fusarium graminearum*, and the radial growth inhibition was 82.6%. These endophytic fungi belonged to genus *Alternaria*, *Nigrospora*, and Dothideomycetes compared with the fungal sequence database at GenBank. **Conclusion** Plenty of endophytic fungi from the leaves and fruits of *E. ulmoides* are found and 11 strains have antimicrobial activity. The antimicrobial activity of these endophytic fungi could be exploited in the biotechnological medicine and agricultural industry.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; endophytic fungi; antagonistic activity; molecular identification; *Fusarium graminearum*

内生真菌是在其生活史或生活史中某一段时间生活在植物组织内, 但不会引起植物组织明显病害症状的真菌, 其广泛存在于不同地域、不同种类的植物组织内^[1]。内生真菌在长期协同进化过程中与宿主逐渐形成了互惠关系。宿主为内生真菌提供生长所需的营养物质, 内生真菌则可促进宿主生长^[2-3]、

提高宿主对病虫害、环境胁迫等方面的抗性^[4-5]。研究表明, 内生真菌不仅与宿主的次生代谢产物的合成有关, 还能直接影响药用植物的品质。内生真菌还可产生具有特殊结构或者新颖的生物活性的化合物, 是一类筛选新药、农药活性物质的重要微生物资源, 在农业、医药及食品工业中具有很大的应用

收稿日期: 2015-08-27

基金项目: 河南省教育厅自然科学重点项目(15B360001); 中国博士后基金项目(2013M531668); 河南大学科研基金项目(ZZJJ20140047)

作者简介: 张维瑞, 实验师, 主要从事药用植物资源研究。E-mail: azhangwr@163.com

*通信作者 袁王俊, 博士, 副教授, 主要从事药用植物资源研究。E-mail: yuanwangjun@henu.edu.cn

潜力^[6]。杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 是杜仲科 (Eucommiaceae) 现存唯一的一个种^[7], 其树皮和叶入药, 具有补肝肾、强筋骨、安胎的作用^[8]。杜仲主要次生代谢产物有绿原酸、桃叶珊瑚苷、京尼平苷等, 它们均具有抗菌、抗肿瘤等药理活性^[7], 因此, 杜仲是提取绿原酸的主要资源之一。由于杜仲野生植物资源的过度开发, 杜仲现为我国二级保护植物。从杜仲植物体中分离内生真菌产生这些活性成分是保护资源和满足药用资源的有效途径。Chen 等^[9]从杜仲茎皮和叶片中分离到一株产绿原酸的内生真菌。杨明琰等^[10]从慈利、略阳和遵义 3 个产地杜仲皮中分离到 152 个菌株, 结果发现, 不同产地杜仲皮内生真菌的组成结构上存在差异。目前, 杜仲内生真菌研究主要集中于陕西、四川、上海等地^[9-10], 分离部位主要为茎皮。河南位于我国中部, 目前杜仲内生菌研究还处于空白。叶片最容易受到病菌侵害, 其内生菌在其抗病中起着重要作用, 但从叶片中分离内生菌的研究很少, 果实内生菌的分离更是空白。本研究拟从河南栽培的杜仲叶片和果实中分离内生真菌, 筛选具有抑菌活性的菌株, 为下一步筛选活性物质, 用于生物制药和农业产业打下基础。

1 材料

1.1 材料

2013 年 11 月和 2014 年 5 月在河南大学药用植物园随机选取 5 棵无病虫害的杜仲树, 采取新鲜叶片和果实置于保鲜袋中备用, 由笔者鉴定为杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 叶片和果实。供试病原菌由河南工业大学伊艳杰博士提供。植物源病菌有禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* Van der Hoeven, 小麦根腐病菌 *Drechslera Sofokiniana* (Sacc.) Subram. Gain., 禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* Schw., 蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* Frankland; 人类致病菌有金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 白色念珠菌 *Monilia albican*, 猪霍乱沙门氏菌 *Salmonella choleraesuis*, 大肠杆菌 *Escherichia coli*。

1.2 仪器与试剂

对照品绿原酸由日本养命酒株式会社中央研究院 Deyama 先生赠送, 经归一化法测定质量分数为 99.2%。; 高效液相色谱仪为 Agilent 1260 型 (美国 Agilent 公司, 包括 G1311C 四元梯度泵、G1329B 自动控温自动进样器、G1316A 柱温箱、G1314B 可变波长紫外检测器、ChemStation6.01 色谱工作站)。

2 方法

2.1 分离培养基的制备

分离及抑菌活性检验培养基为马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 固体培养基, 其做法是将去皮马铃薯切成小片在去离子水中煮沸 30 min, 用纱布滤过得到马铃薯汤汁, 加入 2% 葡萄糖、2% 琼脂, 不需调 pH。发酵以及鉴定培养基用 PDA 液体培养基。

2.2 杜仲内生真菌的分离和纯化

将杜仲叶片或果实分切成长 1.5 cm 左右, 宽 1 cm 左右的小片, 先用 75% 乙醇处理 30 s, 然后用 2% 次氯酸钠溶液处理灭菌 2、3、5 min, 无菌水冲洗 5~6 遍, 接种于 PDA 固体培养基上。用最后一次洗叶片的无菌水作空白对照。将接种后的培养基放置于 28 °C 恒温培养室中培养, 5 d 后产生的菌丝用 1/4 画线法进行分离纯化。纯化后的菌种移至 PDA 固体培养基的试管斜面上, 培养至稳定期后在 4 °C 条件下保存。

2.3 产杜仲活性成分菌株筛选

将各菌株接种于 100 mL PDA 液体培养基中, 30 °C、120 r/min 发酵 7 d。发酵液用超声波细胞破碎仪处理 30 min, 破碎液在 14 000 r/min 条件下离心 10 min。上清液用 0.22 μm 滤膜滤过后进行 HPLC 分析^[8]。色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ 型 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。以杜仲活性成分绿原酸为对照品, 对杜仲内生真菌代谢产物粗提液进行检测。流动相为 1.0% 磷酸水溶液-甲醇 (72:28), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 360 nm, 柱温 25 °C。

2.4 拮抗菌株筛选

2.4.1 对峙法 将供试菌和测试菌饼放在同一个倒有新鲜固体 PDA 培养基的培养皿中, 2 个菌饼相距 3 cm。将接好菌饼的培养皿放置在 30~32 °C 恒温条件下培养 4~5 d, 测量抑菌环宽度。以无菌蒸馏水和 PDA 培养基提取物作为阴性对照, 以 50 μg/mL 绿原酸溶液作为阳性对照。每个菌株与每个病原菌作为 1 个处理, 接种 5 个培养皿, 每种处理设置 3 次重复。

2.4.2 生长速率法 为了排除病原菌对供试菌株的抑制作用, 将对峙法中检测有抑菌活性的内生真菌在 PDA 液体培养基中培养 5 d, 离心取上清液 30 mL 倒入含 1 L 的 PDA 固体培养基中制成发酵液平板, 每个培养皿放入 3 个菌柄, 在 30~32 °C 恒温条件下培养 4~5 d, 测量致病菌菌落半径。同样以无菌

蒸馏水和 PDA 培养基提取物作为阴性对照, 以 50 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸溶液作为阳性对照。每种处理设置 3 次重复。

数据分析用 Excel 2003 对统计数据计算, 用 SPSS 13.0 软件进行显著性方差分析。

2.5 菌种分子鉴定

对于抑菌效果良好和产杜仲活性成分的内生真菌, 测定 ITS 序列鉴定其归属。液体培养 5 d 的菌液, 进行抽滤收集菌丝体。使用宝生物工程(大连)有限公司植物基因组 DNA 抽提试剂盒(DV811A)提取真菌基因组 DNA, 操作流程按试剂盒说明书进行。以 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量。扩增 ITS 区所用引物为 ITS-1: 5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3' 和 ITS-4: 5'-GGAAGTAAAAG-TCGTAACAAGG-3'。引物、Taq 聚合酶等均来自上海生工生物工程技术有限公司。PCR 总反应体系为 20 μL , 含 30 ng 模板 DNA、引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs、2 mmol/L MgCl_2 及 0.5 U Taq DNA 聚合酶。PCR 扩增反应在 S1000 Thermal cyclor PCR 仪上进行。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后, 进行 30 个循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 55 s, 再经 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。检测成功后将 PCR 反应产物寄往北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。所得序列在 GeneBank 上进行 Blast 比对, 确定其归属。

3 结果与分析

3.1 杜仲内生真菌的分离

将在 PDA 固体培养基上培养 5 d 后得到的杜仲内生真菌用 1/4 划线法进行分离纯化, 根据其菌落形态进行初步分类。2013 年 11 份采集的叶片和果实中共分离纯化得到 39 株真菌, 2014 年 5 月采集的叶片和果实中分离得到 52 株真菌, 将 2 次采集杜仲样本分离得到的内生真菌进行菌落形态分析, 最终确认得到 52 株真菌(编号 1~52)。

3.2 产杜仲活性成分菌株

用 HPLC 法对分离到的 52 株杜仲内生真菌进行产绿原酸能力鉴定, 结果发现, 4 和 7 号 2 个菌株可以产生绿原酸, 质量浓度分别为 0.210 和 0.205 mg/L。绿原酸对照品的 HPLC 图谱见图 1, 样品的色谱图见图 2。

3.3 抑菌菌株筛选

将分离获得的 52 株杜仲内生真菌通过对峙培养法进行拮抗筛选, 结果表明, 有 11 个菌株对 8

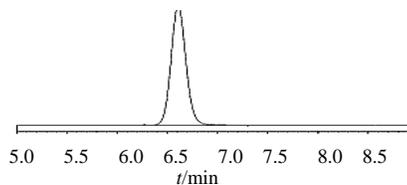


图 1 绿原酸对照品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of chlorogenic acid reference substance

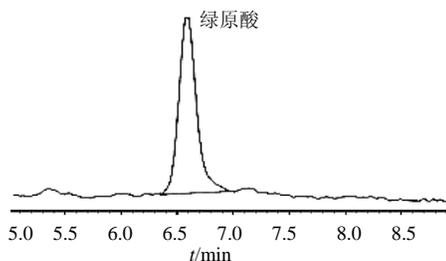


图 2 4 号菌株的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of stain 4

种供试致病菌分别呈现出不同程度的抑制作用(表 1)。对禾谷丝核菌有拮抗作用的有 8 个菌株, 其中 9、18、41、42 号菌株抑菌环宽度达到 3 mm 以上。对小麦根腐病有抑菌效果的有 9 个菌株, 其中 41 号菌株抑菌环达到 3 mm。对禾谷镰孢菌有抑菌效果的有 10 个菌株, 其中 18 号和 42 号菌株抑菌环为 3 mm。对蜡样芽孢杆菌有抑菌效果的有 7 个菌株, 18 号菌株抑菌环为 3.5 mm; 对金黄色葡萄球菌有拮抗作用有 9 个菌株, 其中 18 号菌株抑菌环高达 4 mm, 27 和 42 号菌株抑菌环为 3 mm。对白色念珠菌有拮抗效果的有 5 个菌株。对猪霍乱沙门氏菌和大肠杆菌有拮抗效果的有 3 个菌株。总之, 杜仲内生真菌对植物源的病原菌拮抗作用较好, 而在人类致病菌中仅对金黄色葡萄球菌拮抗作用较好, 对其余 3 种人类致病菌拮抗作用则较弱。

将对峙法中检测具有抑菌作用的内生真菌再用生长速率法检测其抑菌活性(表 2)。结果发现对禾谷丝核菌抑制率高达 60% 以上有 3 个菌株, 分别为 7、9 和 41 号菌株, 然而在对峙法中拮抗作用最好的 42 号菌株却对禾谷丝核菌无抑制作用。对小麦根腐菌抑制率达 60% 以上的菌株有 7、23、27、41 和 42 号菌株, 而在对峙法中无抑菌作用的 27 号菌株抑制率却高达 69.0%。对禾谷镰孢菌抑制率达 60% 以上有 9 个菌株, 其结果与对峙法基本一致。无论是对峙法还是生长速率法, 7 号菌株均表现较好的抑菌作用, 图 3 显示了其对禾谷镰孢菌的抑菌效果。对蜡样芽孢杆菌抑制率与对峙法结果基本一致, 但在对峙法中有微弱抑菌作用的 1 号菌株抑制率却达

表 1 对峙法抑菌实验结果

Table 1 Results of antimicrobial activity through standoff method

编号	抑菌环宽度/mm							
	禾谷丝核菌	小麦根腐病菌	禾谷镰孢菌	蜡样芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	猪霍乱沙门氏菌	大肠杆菌
1	1.0 b	2.0 b	2.0 b	0.5 b	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a
2	0.0 a	1.5 b	1.0 b	1.0 b	2.0 b	0.0 a	0.0 a	0.0 a
7	2.0 b	2.0 b	2.5 c	3.0 c	1.0 b	1.0 b	0.0 a	1.0 b
9	3.0 c	1.5 b	1.5 b	1.0 b	2.0 b	0.0 a	0.0 a	1.5 b
18	3.0 c	1.0 b	3.0 c	3.5 c	4.0 d	1.5 b	0.0 a	0.0 a
23	0.0 a	1.0 b	2.0 b	0.0 a	2.0 b	1.5 b	1.0 b	0.0 a
27	2.0 b	0.0 a	0.0 a	2.0 b	3.0 c	0.0 a	0.0 a	0.0 a
29	1.5 b	2.0 b	2.0 b	2.5 c	2.5 c	2.0 b	0.0 a	0.0 a
41	3.0 c	3.0 c	2.5 c	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a
42	3.5 c	1.0 b	3.0 c	0.0 a	3.0 c	0.0 a	2.5 c	0.0 a
46	0.0 a	0.0 a	2.5 c	0.0 a	1.5 b	1.0 b	1.0 b	2.5 c
阴性对照	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a
阳性对照	3.0 c	2.5 c	3.0 c	3.0 c	2.0 b	1.5 b	2.5 c	3.0 c

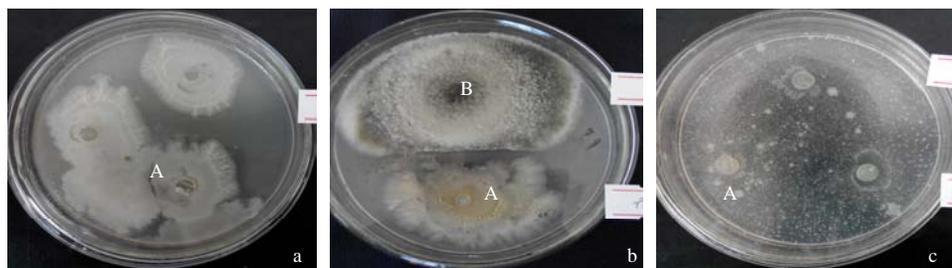
小写字母表示差异显著性, $P < 0.05$, 下同

Lowercase letters show significantly difference, $P < 0.05$, same as below

表 2 菌丝生长速率法抑菌实验结果

Table 2 Results of antimicrobial activity through growth rate method

编号	抑制率/%							
	禾谷丝核菌	小麦根腐病菌	禾谷镰孢菌	蜡样芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	猪霍乱沙门氏菌	大肠杆菌
1	26.7 b	52.7 c	71.7 d	69.0 d	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a
2	0.0 a	29.1 b	60.9 c	47.6 c	4.8 b	12.0 b	0.0 a	0.0 a
7	71.1 d	80.0 e	69.6 d	78.6 d	0.0 a	8.0 b	4.3 b	0.0 a
9	62.2 d	30.9 b	26.1 b	50.0 c	9.5 b	0.0 a	8.7 b	3.3 b
18	33.3 b	25.5 b	71.7 e	33.3 b	0.0 a	20.0 c	13.0 b	13.3 b
23	0.0 a	70.9 d	63.0 c	0.0 a	4.8 b	0.0 a	0.0 a	0.0 a
27	6.7 b	69.0 d	0.0 a	42.9 c	20.8 b	0.0 a	4.3 b	10.0 b
29	51.1 c	56.4 c	82.6 e	76.2 d	0.0 a	0.0 a	0.0 a	6.7 b
41	68.9 d	78.2 d	69.6 c	0.0 a	0.0 a	4.0 b	13.0 b	13.3 b
42	0.0 a	81.8 e	67.4 c	0.0 a	14.3 b	12.0 b	8.7 b	0.0 a
46	0.0 a	0.0 a	80.4 e	0.0 a	19.1 b	8.0 b	0.0 a	10.0 b
阴性对照	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a				
阳性对照	58.2 c	72.9 d	69.8 d	66.7 d	52.3 c	61.4 d	56.7 c	61.6 c



a-对照 b-对峙法抑菌活性 c-生长速率法抑菌活性 A-禾谷镰孢菌 B-7号菌株

a-control b-Antimicrobial activity on standoff method c-antimicrobial activity on growth rate method A-*Fusarium graminearum* B-stain 7

图 3 7号菌株对禾谷镰孢菌的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of endophytic fungus stain 7 on *F. graminearum*

到 69.0%，而抑制作用最好的 18 号菌株的抑制率仅为 33.3%。对整个人类致病菌的拮抗作用都不明显，抑制率最高的 27 号菌株对金黄色葡萄球菌仅为 20.8%。在对峙法中有拮抗作用的 7、18 和 29 号菌株在生长速率法中抑制率均为 0。

3.4 菌种鉴定

对具有良好抑菌效果的 11 个杜仲内生真菌菌株进行 ITS 序列测定，经 Blast 比对发现，1、2、7、9、18、23、27、29、42、46 号菌株 ITS 序列与链格孢属 *Alternaria* 的数个种类序列相似度为 100%，因此，这些菌株均属于链格孢属 *Alternaria* sp.。41 号菌株 ITS 序列与叶点霉属 *Phyllosticta*、派伦霉属 *Peyronellaea*、茎点霉属 *Phoma* 的一些种类序列相似度也为 100%，只能确定其归属为子囊菌门 (Ascomycota) 座囊菌纲 (Dothideomycetes)。对能够代谢产生杜仲活性成分绿原酸的 4 号菌株进行 ITS 序列测定，经 Blast 比对发现，4 号菌株与黑孢属 *Nigrospora* sp. 数个菌株相似度为 99%，确定其隶属于黑孢属 *Nigrospora* sp.。

4 讨论

杜仲传统上是以茎皮入药，而本研究选择从杜仲叶片和果实中分离内生真菌，一方面叶中可能有丰富的内生菌，Arnold^[11]认为叶中的内生真菌要多于茎中，Souza 等^[12]从 *Strychnos cogens* 和 *Palicourea longiflora* 中分离内生真菌，也发现叶中内生真菌高于茎中，甚至高于根中。其次，目前杜仲内生菌的研究主要集中于茎皮，从叶中分离杜仲内生菌的研究较少，果实更是没有研究，更重要的是本研究的目的是分离具有抑菌作用的内生真菌，叶更容易受到病害侵害，更容易分离到有拮抗作用的内生真菌。

Strobel 等^[13]于 1993 年首次从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 的韧皮部中分离到一株产生其活性成分紫杉醇的内生真菌 *Taxomyces andreanal* Nutt.。这一发现为人类寻找活性成分资源提供了新思路，掀起了对植物内生菌及其活性物质开发的热潮。从杜仲内生菌分离活性成分也有一定研究，Chen 等^[9]从四川成都的杜仲皮中分离到 1 株产绿原酸的真菌。刘超等^[14]和李爱华等^[7]从采自陕西杨凌带杜仲皮分离到 8 株产松脂醇二葡萄糖苷的内生真菌。本研究发现 2 个菌株能产生绿原酸。

Strobel 等^[15]认为植物内生真菌能产抗菌物质 (如肽、有机酸、萜等)，可以保护宿主植物免受

其他的细菌、真菌、病毒等的侵害，同时也对某些人类病原菌有一定的拮抗作用，内生真菌是筛选抗菌活性成分的重要资源。本研究分别用对峙法和生长速率法检测了杜仲内生真菌对一些植物和人类病原菌的抑菌活性，目的是筛选抑菌效果明显的真菌，为进一步分离抗菌活性物质筛选真菌资源。对峙法抑菌实验中抑菌环宽度是评价抑菌活性的重要参考指标，且抑菌环的宽度与抑菌作用呈正比。结果发现，筛选得到的 11 个活性菌株对 8 种致病菌中至少 3 种有抑制作用，尤其是 10 个菌株 (90.9%) 对禾谷镰孢菌都有抑制作用，且 9 个抑菌环宽度大于 1 mm，而对猪霍乱沙门氏菌和大肠杆菌有拮抗作用的仅 3 个菌株 (27.3%)，且抑菌环较小。可见，内生真菌对植物源的病原菌拮抗作用要显著高于对人类致病菌的拮抗作用。生长速率法与对峙法结果基本一致，但一些对峙法中拮抗效果明显的菌株在生长速率法中却无任何效果，如 42 号菌株对禾谷丝核菌在对峙法中抑菌环高达 3.5 mm，而在生长速率法中抑制率为 0，可能是对峙法中病原菌抑制了内生菌的生长，即内生菌对病原菌无拮抗作用。本研究得到的 11 株内生真菌至少对植物病原菌有显著拮抗作用，现已大批量发酵培养部分内生真菌，为下一步筛选活性物质提供材料。

参考文献

- [1] Mcgee A P. Distribution of the Orchid Mycorrhizal Fungus, *Rhizoctonia solani*, in Relation to Its Host, *Pterostylis acuminata*, in the Field [J]. *Austr J Bot*, 1995, 43(6): 565-575.
- [2] Redlin S C, Carris L M. *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants: Systematics, Ecology, and Evolution* [M]. St. Paul, Minn: APS Press, 1996.
- [3] Gamboa M A, Laureano S, Bayman P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? [J]. *Mycopathologia*, 2002, 156(1): 41-45.
- [4] W01li P R, Ahlholm J U, Helander M, et al. Occurrence and genetic structure of the systemic grass endophyte *Epichloa festucae* in fine fescue populations [J]. *Microb Ecol*, 2007, 53(1): 20-29.
- [5] Rudgers J A, Fischer S, Clay K. Managing plantsymbiosis: fungal endophyte alters plant community composition [J]. *J Appl Ecol*, 2010, 47(2): 468-477.
- [6] Arnold A E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers [J].

- Fungal Biol Rev*, 2007, 21: 51-66.
- [7] 李爱华, 樊明涛, 师俊玲. 杜仲内生菌的分离及产PDG菌株的筛选 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(3): 616-619.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [9] Chen X, Sang X, Li S, *et al.* Studies on a chlorogenic acid-producing endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37(5): 447-454.
- [10] 杨明琰, 田 稼, 马 瑜, 等. 杜仲内生真菌的分离鉴定及抗菌活性研究 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(1): 193-198.
- [11] Arnold A E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers [J]. *Fungal Biol Rev*, 2007, 21: 51-56.
- [15] Souza A Q L D, Souza A D L D, Astolfi Filho S, *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) riché *Strychnos cogens* bentham [J]. *Acta Amaz*, 2004, 34(2): 185-195.
- [12] Strobel G, Stierle A, Stierle D, *et al.* *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*) [J]. *Mycotaxon*, 1993, 47: 71-80.
- [13] 刘 超, 师俊玲, 周小娟, 等. 产PDG杜仲内生菌的分离筛选和分类鉴定及生长条件研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39(1): 203-209.
- [14] Strobel G A, Miller R V, Miller C, *et al.* Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiosis cf. quercina* [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 1919-1926.