

网络出版时间:2024-01-05 15:15 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2024.07.015
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1390.S.20240104.0945.003

鱼腥草中产槲皮素内生真菌的分离鉴定

贾方芳¹, 方玉鹏², 孟娜¹, 石文立¹, 王妍¹, 李勤凡¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 华中农业大学 动物医学院, 湖北 武汉 430070)

【摘要】【目的】探索鱼腥草(*Houttuynia cordata* Thunb.)中是否存在产槲皮素的内生真菌。【方法】采用组织块法对鱼腥草内生真菌进行分离培养,分离纯化后收集菌丝利用薄层色谱(TLC)和高效液相色谱(HPLC)检测其代谢产物中的槲皮素,并分析其产量。采用形态学和内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列分析鉴定产槲皮素的内生真菌。【结果】从鱼腥草不同部位共分离得到 9 株内生真菌,其中由根中分离得到的菌株 YXC-G1 具有产生槲皮素的能力,为笋顶孢属(*Acrostalagmus* sp.)真菌,菌丝中槲皮素的含量为 8.296 mg/g。【结论】从鱼腥草根部分离到 1 株产槲皮素的内生真菌 YXC-G1,其可作为生产槲皮素的备选菌株。

【关键词】 鱼腥草;内生真菌;槲皮素;分子鉴定;次级代谢产物

【中图分类号】 Q949.32;S567.23

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2024)07-0136-07

Isolation and identification of endophytic fungi producing quercetin from *Houttuynia cordata* Thunb.

JIA Fangfang¹, FANG Yupeng², MENG Na¹,
SHI Wenli¹, WANG Yan¹, LI Qinfan¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: 【Objective】 This study explored the presence of quercetin-producing endophytic fungi in *Houttuynia cordata* Thunb. 【Method】 The endophytic fungi in *Houttuynia cordata* Thunb. were isolated and cultured by tissue block method. After separation and purification, the mycelia were collected to detect quercetin in their metabolites by TLC and HPLC, and the yield was analyzed. The quercetin-producing endophytic fungi were identified by morphology and ITS sequence analysis. 【Result】 Nine endophytic fungi were isolated from different parts of *Houttuynia cordata* Thunb. and the strain YXC-G1 isolated from roots had the ability to produce quercetin. It was *Acrostalagmus* sp. and the content of produced quercetin in the mycelia extract was 8.296 mg/g. 【Conclusion】 One quercetin-producing endophytic fungus YXC-G1 was isolated from roots of *Houttuynia cordata* Thunb., which could be used as an alternative strain for quercetin production.

Key words: *Houttuynia cordata* Thunb.; endophytic fungi; quercetin; molecular identification; secondary metabolites

鱼腥草(*Houttuynia cordata* Thunb.)又名折耳根、蕺菜,是三白草科蕺菜属中一种多年生草本植

【收稿日期】 2023-04-28

【基金项目】 宁夏回族自治区重点研发计划项目(K3031122043)

【作者简介】 贾方芳(2000—),女,河南许昌人,在读硕士,主要从事动物临床疾病防控研究。E-mail:a1744712590@163.com

【通信作者】 李勤凡(1968—),男,甘肃天水人,教授,主要从事动物临床疾病防控研究。E-mail:liqf1131@163.com

物^[1],广泛分布于我国中部以南地区。其富含挥发油、黄酮类、有机酸、多糖等多种活性物质,具有清热解毒、消肿排脓、利尿通淋、化痰止咳等功效^[2]。现代药理学研究表明,槲皮素($C_{15}H_{10}O_7$)是鱼腥草中一种含量较高的黄酮类化合物,具有抗病毒、抗炎、抑菌、抗氧化、抗凋亡、改善内皮功能等多种生物学活性作用^[3-4],且对人体无毒,长期使用安全性高,是一种理想的天然药用化合物^[5],临床上多用于心血管、内分泌、消化系统疾病以及肿瘤的治疗^[6]。然而目前从植物中分离提取槲皮素存在产量低、成本高以及工艺复杂等问题,因此寻找一种新的可获取槲皮素的方法,解决工业生产问题,具有重要的现实意义。

目前,有关药用植物内生真菌的研究主要集中在菌株的分离鉴定、多样性分析及其代谢产物活性等方面,如崔文霞等^[7]从鱼腥草中分离得到3 822株内生真菌,分属于19个属。内生真菌定植于植物组织内部,但并不危害宿主生长,而与之和谐共生^[8-9]。纪红燕等^[10]从雷公藤中分离出5株对金黄色葡萄球菌具有显著抑菌活性的内生真菌。Talukdar等^[11]从鱼腥草中分离出一株可产酪醇的球炭疽菌(*Colltotrichum coccodes*)。Khalil等^[8]研究发现,麻黄内生真菌的一些代表菌株具有产生可促进宿主植物生长的活性物质的能力。研究表明,植物内生真菌具有多种功能,不仅可以促进植物生长发育、增强植物的抗逆性,还具有合成与宿主相同或相似活性物质的能力^[12],因此从植物中分离筛选出具有生物活性的内生真菌,从中获得活性代谢产物,是目前药用植物资源替代的重要途径^[13-15]。有报道显示,一些内生真菌的代谢产物含有槲皮素及其类似物,如刘佳佳等^[16]从银杏树根部分离得到一株内生真菌GH01,该菌可以产槲皮素糖苷;程庭峰等^[17]从麻花苳组织中分离出一株可产异牡荆黄素、槲皮素、异荛草素的内生真菌GS-6;沈书庆^[18]从杜仲茎部分离出一株可产槲皮素的内生真菌DZ11。然而,目前有关内生真菌产槲皮素的研究主要见于杜仲、银杏和珙桐等植物^[18-20],而其他药用植物内生真菌产槲皮素的研究却鲜见报道。本试验选择鱼腥草作为研究对象,从中分离出产槲皮素的内生真菌,采用形态学和内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列分析对其进行鉴定,以期为槲皮素新药源的开发及鱼腥草药用价值的发掘提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鱼腥草全草样品采自陕西省杨陵区,随机采取10株,去除表面泥土,采集48 h内分离内生真菌。植物材料由西北农林科技大学动物医学院生物毒素实验室鉴定。

主要仪器有:高效液相色谱仪(美国 Waters)、PCR 基因扩增仪(美国 Biorad)、FR-200 紫外可见成像分析系统(上海复日)、EPS604 稳压稳流电泳仪(南京科宝)。槲皮素标准品购自中国药品生物制品检定所,纯度>98%。DNA 聚合酶等分子生物学试剂购自宝日医生物技术有限公司。真菌 PCR 扩增通用引物 ITS1 和 ITS4 购自南京金斯瑞生物科技有限公司。高效液相色谱所用试剂为色谱纯,有机试剂均为分析纯。

改良马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar medium, PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 17 g,去离子水 1 L,121 °C 高压蒸汽灭菌 35 min,冷却至 50 °C 加入青霉素和链霉素各 200 mg。

1.2 鱼腥草内生真菌的分离纯化与保存

采用组织块法,分别取新鲜鱼腥草根、茎、叶组织,无菌水冲洗 3~4 遍;吸干水分,将组织切成 0.5 cm×0.5 cm×1 cm 大小的小块置于表面消毒的培养皿中。选用 3 种不同的方法比较消毒效果:①体积分数 75%乙醇润洗 2 min,无菌水冲洗 3~4 遍;②质量分数 1%次氯酸钠润洗 2 min,无菌水冲洗 3~4 遍;③体积分数 75%乙醇润洗 2 min,质量分数 1%次氯酸钠消毒 2 min,无菌水冲洗 3~4 遍。消毒后组织块剪去边缘后接种于 PDA 培养基上,20 °C 避光培养 7~10 d。并设置对照试验以检验消毒效果,具体方法为:经消毒处理的植物组织不剪去边缘直接接种于 PDA 培养基上,置于相同条件下进行培养,当植物组织周围没有真菌长出并且重复 3~4 次结果一致均未发现有菌丝生长时,认为表面消毒彻底;否则表明消毒不彻底,分离出的真菌有可能是表面的附生菌而非植物内生真菌。

待组织块边缘长出菌丝,挑取不同形态菌丝前端接种于 PDA 培养基上进行纯化后,转接到 PDA 斜面上,20 °C 培养 2~4 d,保存于 4 °C 冰箱。

1.3 鱼腥草产槲皮素内生真菌的筛选

1.3.1 鱼腥草内生真菌菌丝提取液的制备 将分离纯化的内生真菌接种于 PDA 培养基上,20 °C 培养 15 d。刮取菌丝,45 °C 烘干,称取 1 g,加入 10

mL 甲醇盐酸混合液,超声破碎 30 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液即为菌丝提取液,用于薄层色谱(TLC)和高效液相色谱(HPLC)检测。

1.3.2 TLC 检测 取菌丝提取液和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素标准品溶液分别点样于硅胶板,用展开剂(V(乙酸乙酯):V(甲酸):V(蒸馏水)=8:1:1)展开,20 g/L AlCl_3 溶液显色,比较斑点颜色,计算比移值(Rf 值),初步筛选产槲皮素的内生真菌。

1.3.3 HPLC 检测 色谱条件: C_{18} (250 mm \times 4.6 nm,4 μm)色谱柱,Waters-2489 紫外检测器,柱温 30 $^\circ\text{C}$,检测波长为 360 nm,流动相为甲醇-体积分数 0.06%磷酸(体积比 60:40),流速为 1.0 mL/min,进样量 20 μL 。

精确称量槲皮素标准品 1 mg,溶解于 1 mL 甲醇溶液中。分别配制 1,2,4,6,8 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的槲皮素标准溶液,0.45 μm 微孔滤膜过滤后取 20 μL 进样。以槲皮素标准品溶液质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)确定线性关系,建立回归方程。取菌丝提取液进样,测定峰面积,根据回归方程,计算样品中槲皮素的含量。

1.4 鱼腥草产槲皮素内生真菌的鉴定

1.4.1 形态学 采用点植法对筛选所得菌株进行培养,挑取少量菌丝接种于 PDA 培养基上,20 $^\circ\text{C}$ 培养 3~5 d,观察菌落形态,记录菌落特征。采用插片法对内生真菌显微结构进行观察,记录图片数据与镜下形态特征。依据真菌的形态分类学方法,初步确定产槲皮素菌株的种属地位。

1.4.2 分子生物学 采用改良 CTAB 法^[21] 提取真菌基因组 DNA,以其作为模板,利用 PCR 扩增技术,选用真菌通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3') 和 ITS4(5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3') 对分离真菌 DNA 的 5.8S rDNA-ITS 序列进行扩增,并设置阴性对照(DNA 模板为 ddH₂O)和空白对照(反应体系中只加 50 μL ddH₂O)。PCR 反应体系为 50 μL ,各组分如下:DNA 模板 1.5 μL ,上下游引物各 2 μL ,Ex Taq 酶 25 μL ,ddH₂O 19.5 μL 。PCR 反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;96 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,52 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,33 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^\circ\text{C}$ 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,进行测序。利用 NCBI 数据库中 BLAST 程序进行序列比对,挑选同源性较高的 ITS 序列,利用软件 MEGA 11 构建系统发育树,对本试验产槲皮素菌株种属进行进一步的分类。

2 结果与分析

2.1 鱼腥草内生真菌的分离纯化

3 种不同消毒方法的对照试验结果显示:方法①和②处理后组织块周围有菌株长出,表明消毒不彻底;而方法③处理后组织块周围无菌株长出,表明消毒效果良好。采用方法③对样品消毒后进行内生真菌分离,结果从鱼腥草根、茎、叶中各分离得到 3 株内生真菌,分别命名为 YXC-G1、YXC-G2、YXC-G3、YXC-J1、YXC-J2、YXC-J3、YXC-Y1、YXC-Y2、YXC-Y3。

2.2 鱼腥草内生真菌的 TLC 初步检测

采用 TLC 对上述菌株的菌丝提取液进行分析,结果显示,YXC-G1 和 YXC-J2 的菌丝提取液与槲皮素标准品中均出现了比移值(Rf)为 0.8 的淡黄色斑点(图 1),初步确定这 2 株真菌疑似可产槲皮素,而在其他菌株的菌丝提取液中均未检出槲皮素。



A. 槲皮素标准品;B. YXC-G1 菌丝提取液;
C. YXC-J2 菌丝提取液。

A. Standard quercetin;B. Mycelium extraction of YXC-G1;C. Mycelium extraction of YXC-J1.

图 1 槲皮素标准品和鱼腥草 YXC-G1 及 YXC-J2 菌丝提取液的 TLC 分析

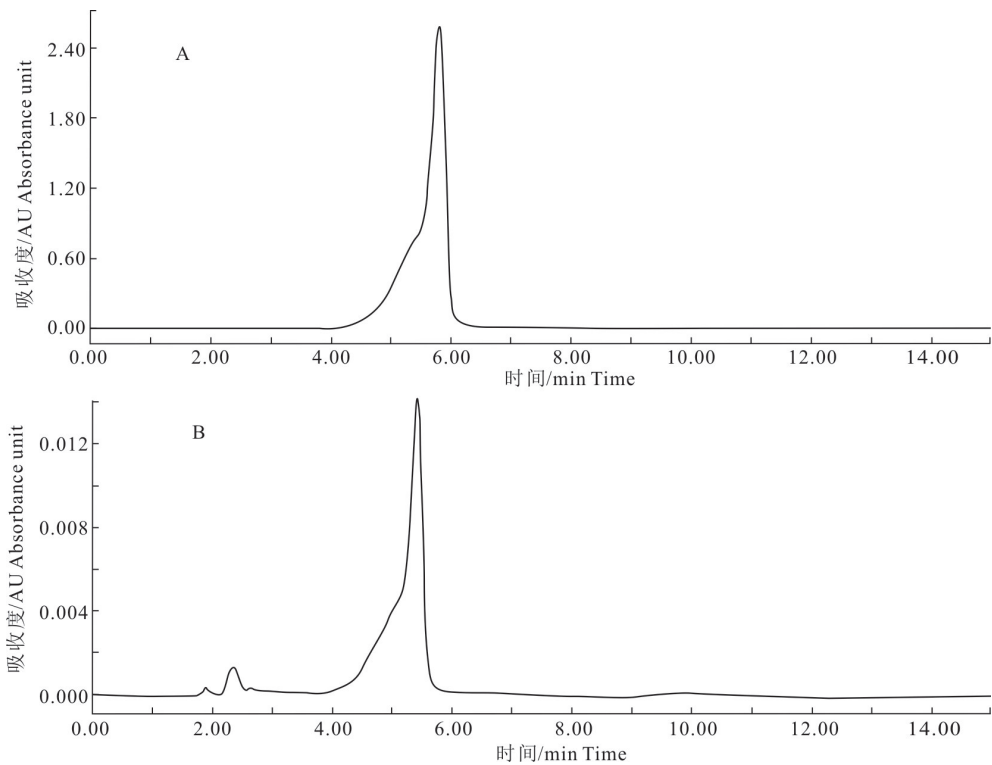
Fig. 1 TLC analysis of standard quercetin and mycelium extraction of *Houttuynia cordata* Thunb. YXC-G1 and YXC-J2

2.3 鱼腥草内生真菌的 HPLC 分析

利用 HPLC 进一步分析菌株 YXC-G1 和 YXC-J2 的菌丝提取液,结果显示,槲皮素标准品在 5.43 min 出现峰值,YXC-G1 菌丝提取液在 5.428 min 有分离峰,且峰形较尖锐,与标准品的保留时间相近(图 2);而 YXC-J2 的菌丝提取液中未出现分离峰,表明 YXC-G1 菌株的菌丝提取液中含有槲皮素,该菌株为鱼腥草内生产槲皮素内生真菌。

以槲皮素标准品溶液的质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),得线性回归方程 $Y = 93\ 118X + 39\ 368$, $R^2 = 0.961\ 4$ 。表明在 1~10

$\mu\text{g/mL}$,槲皮素质量浓度与峰面积呈良好线性关系。测定 YXC-G1 菌丝提取液的峰面积为 1 348 131 mAU,经计算可知菌丝中槲皮素含量为 8.296 mg/g。



A. 槲皮素标准品;B. YXC-G1 菌丝提取液。

A. Standard quercetin;B. Mycelium extraction of YXC-G1.

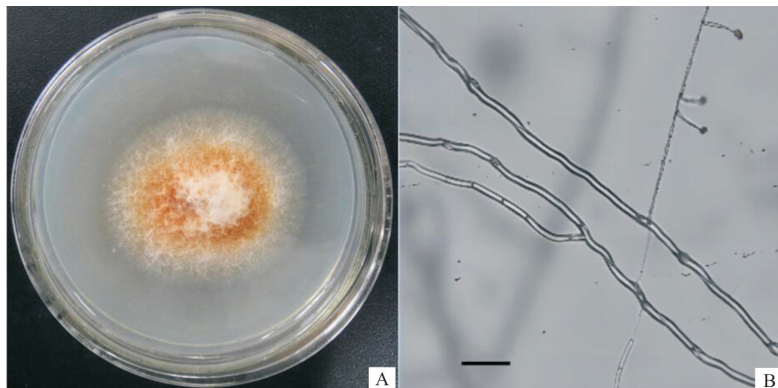
图 2 槲皮素标准品和鱼腥草 YXC-G1 菌丝提取液的 HPLC 分析

Fig.2 HPLC analysis of standard quercetin and mycelium extraction of *Houttuynia cordata* Thunb. YXC-G1

2.4 鱼腥草内生真菌 YXC-G1 的形态学鉴定

YXC-G1 在 PDA 培养基上平均生长速度为 3.5 mm/d,14 d 以后停止生长,随着培养时间的延长,菌落呈现橘黄色,菌落圆形,扁平,中央凸起,菌

丝较密集(图 3-A)。菌丝呈树枝状,边缘光滑,有横膈膜,有孢子,孢子呈椭圆形,卵形(图 3-B),符合笋顶孢属(*Acrostalagmus* sp.)的属级特征^[22]。



A. YXC-G1 菌落 B. YXC-G1 菌丝。

A. The colony of YXC-G1;B. The hyphae of YXC-G1.

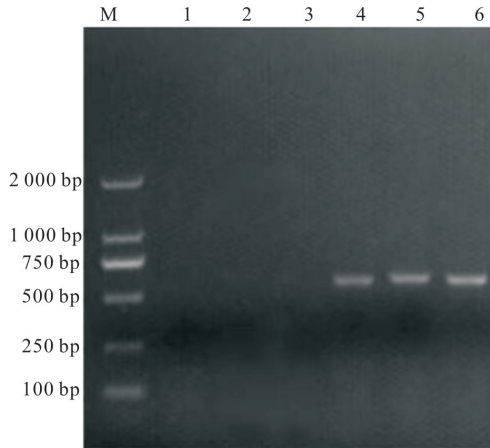
图 3 鱼腥草内生真菌菌落和菌丝的形态(标尺长度为 20 μm)

Fig.3 Morphology of endophytic fungal colonies and hyphae of *Houttuynia cordata* Thunb. (Bar=20 μm)

2.5 鱼腥草内生真菌 YXC-G1 的分子生物学鉴定

测序结果显示,菌株 YXC-G1 的 5.8S rDNA-

ITS 片段长度为 502 bp(图 4)。



M. DNA Maker 2000; 1. 阴性对照; 2, 3. 空白对照;
4, 5, 6. YXC-G1 的 PCR 产物。

M. DNA Maker 2000; 1. Negative control; 2, 3. Blank
control; 4, 5, 6. The PCR product of YXC-G1.

图 4 鱼腥草内生真菌样品 5.8S rDNA-ITS 序列
扩增片段的凝胶电泳分析

Fig. 4 Gel electrophoresis of amplified 5.8S rDNA-ITS
region of endophytic fungal samples of
Houttuynia cordata Thunb.

BLAST 结果显示, YXC-G1 的 5.8S rDNA-ITS 序列与笋顶孢属真菌 JZ-172 相应序列 (GenBank 编号 HQ637290.1) 的相似度达到 99%。

基于 5.8S rDNA-ITS 序列, 对 YXC-G1 与 11



图 5 鱼腥草内生真菌 YXC-G1 的 5.8S rDNA-ITS 序列系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on 5.8S rDNA-ITS sequences of endophytic fungal YXC-G1 in
Houttuynia cordata Thunb.

从天然植物中直接提取槲皮素较为困难, 存在产量低、工艺复杂和成本高等问题, 因此直接从植物中提取槲皮素在生产中实用性不大, 而植物内生真菌可以产生多种次级代谢产物以及与宿主植物相同或相似的生物活性成分, 具有培养周期短、成本低、易于规模化生产等优点, 已成为天然药物开发的一

个其他种属真菌进行系统发育分析, 结果(图 5)表明, 菌株 YXC-G1 与笋顶孢属真菌 JZ-172 聚为一支, 因此鉴定该菌为笋顶孢属 (*Acrostalagmus* sp.)。

3 讨论

本研究采用表面消毒法对鱼腥草不同组织进行前期处理, 采用组织块法和 PDA 培养基对鱼腥草内生真菌进行分离纯化与培养, 以期筛选出产槲皮素的菌株应用于工业生产。为确保能够分离得到内生真菌, 选择合适的消毒方法尤为重要。植物组织表面消毒不彻底, 可能导致杂菌污染或者分离所得菌株不纯^[23], 给后续工作带来困难。本试验对植物内生真菌分离常用的 2 种消毒剂乙醇和次氯酸钠的使用进行对比, 结果发现以上 2 种消毒剂消毒不彻底, 培养基表面有杂菌污染, 不能保证分离得到的真菌为内生真菌, 但选取体积分数 75% 乙醇和质量分数 1% 次氯酸钠结合的方法消毒效果良好。另外, 消毒剂可通过渗透作用进入植物组织内部, 消毒时间过长可能会杀死部分内生真菌, 故消毒时间不同可能有不同的消毒效果, 分离的菌株可能有所不同。关于乙醇和次氯酸钠对鱼腥草的最佳消毒时间还有待进一步研究确定。

种潜在资源^[24]。有学者已从银杏、麻花苧等植物中分离得到产槲皮素等黄酮类物质的内生真菌, 如曲霉属中的烟曲霉菌、裂褶属中的内生裂褶菌、镰孢属的次盘孢菌等^[16-17]; 沈书庆^[18]也从杜仲分离得到一株内生真菌 DZ11, 其发酵液中的槲皮素质量浓度为 0.418 mg/L, 但目前尚未见鱼腥草内生真菌产槲皮

素的报道。本试验从鱼腥草中分离出可产槲皮素的内生真菌,通过TCL和HPLC对分离菌株YXC-G1进行活性产物分析,发现鱼腥草内生真菌YXC-G1具有产槲皮素的能力,菌丝中槲皮素含量为8.296 mg/g。结合形态学和5.8S rDNA-ITS序列分析鉴定,确定YXC-G1为笋顶孢属真菌,证明鱼腥草中的槲皮素可由内生真菌产生,分离菌株可作为备选菌株应用于工业生产,有利于槲皮素新药源的开发及鱼腥草潜在价值的发掘。

本试验选用TLC和HPLC检测鱼腥草中的槲皮素,其中TLC操作简便、经济高效,可以初步确定产槲皮素菌株,但该方法准确性低,且易出现假阳性结果;而HPLC特异性强、灵敏度高^[25],可以进一步筛选出产槲皮素的内生真菌,同时可通过回归方程计算出槲皮素产量,因此结合以上2种方法,可以对菌丝中的槲皮素进行定性和定量检测。结果表明,YXC-G1菌丝中含有槲皮素,且产率较高,这可能与菌株特性有关,后续研究可进行菌株选育,通过诱变筛选、优化发酵工艺和培养条件等进一步提高功能性成分的产量,为工业化槲皮素生产提供良好的菌株来源。

植物内生真菌作为一种潜在的自然资源,拥有巨大的开发潜力和应用前景^[9]。研究发现,不同内生真菌可以通过不同的方式对药用植物性状、生长以及有效成分积累等产生影响,最终导致地道药材和非地道药材品质的差异^[26]。鱼腥草是我国一种常见的中药,其内生真菌可能对其分布和地道性具有重要影响,但内生真菌是否与鱼腥草中槲皮素等活性成分合成有关,是否对鱼腥草的抗逆适应存在影响,还有待于进一步研究。同时,还需进一步开展鱼腥草产物如挥发油、生物碱、多糖等成分的内生真菌的研究,充分发掘鱼腥草的药用价值,为新药源的开发和利用提供新的研究思路与方法。

4 结 论

从鱼腥草中分离得到了9株内生真菌,采用薄层色谱和高效液相色谱法对真菌菌丝提取液进行检测,确定YXC-G1的菌丝中含有槲皮素,其产量为8.296 mg/g;经形态学特征和ITS序列分析,确定YXC-G1为笋顶孢属(*Acrostalagmus* sp.)真菌。结果表明,鱼腥草中存在产槲皮素的内生真菌。

[参考文献]

[1] 齐晓宾,王林光,谢春梅,等. 宣白承气散和鱼腥草对后备母猪

肺热腑实证的效果评价[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(12): 91-96.

Qi X B, Wang L G, Xie C M, et al. Effect of Xuan Bai Cheng Qi powder and *Houttuyniae cordata* on lung heat organ sthenia syndrome of gilts [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2022, 58(12): 91-96.

[2] 罗益远,陈宏降,刘师行,等. 鱼腥草中总黄酮的工艺筛选及其抗氧化性研究[J]. 人参研究, 2020, 32(5): 35-39.

Luo Y Y, Chen H J, Liu S X, et al. Study on extraction process and antioxidant activity of flavonoids in *Houttuynia cordata* [J]. Ginseng Research, 2020, 32(5): 35-39.

[3] Zou H, Ye H, Kamaraj R, et al. A review on pharmacological activities and synergistic effect of quercetin with small molecule agents [J]. Phytomedicine, 2021, 92: 1-10.

[4] Ghosh A, Ghosh B, Parihar N, et al. Nutraceutical prospects of *Houttuynia cordata* against the infectious viruses [J]. Food Bioscience, 2022, 50: 1-15.

[5] 陆晓珊,林也,唐琳,等. 鱼腥草的化学成分与安全性研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(3): 144-147.

Lu X S, Lin Y, Tang L, et al. Research progress on chemical constituents and safety of *Houttuynia cordata* [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2021, 39(3): 144-147.

[6] 陈勃麟,曾琨鹏,王宇辰,等. 槲皮素治疗帕金森病机制的网络药理学分析及验证[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 8(8): 1-19.

Chen B L, Zeng K P, Wang Y C, et al. Network pharmacology analysis and verification of the mechanism of quercetin in the treatment of Parkinson's disease [J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2023, 8(8): 1-19.

[7] 崔文霞,陈睿,张峰华,等. 鱼腥草内生真菌多样性分析[J]. 西北农业学报, 2017, 26(10): 1513-1519.

Cui W X, Chen R, Zhang F H, et al. Diversity analysis of endophytic fungi in *Houttuynia cordata* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2017, 26(10): 1513-1519.

[8] Khalil A M A, Hassan S E, Alsharif S M, et al. Isolation and characterization of fungal endophytes isolated from medicinal plant *Ephedra pachyclada* as plant growth-promoting [J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 1-19.

[9] 侯建平,黄旭文,周鹏,等. 铁皮石斛内生真菌的鉴定及菌株205509的次级代谢产物研究[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(7): 661-669.

Hou J P, Huang X W, Zhou P, et al. Identification of endophytic fungi from *Dendrobium officinale* and isolation and identification of secondary metabolites from strain 205509 [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(7): 661-669.

[10] 纪红燕,许贤瑞,赵瑞,等. 药用植物雷公藤内生真菌分离及其抑菌活性筛选研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(2): 197-203.

Ji H Y, Xu X R, Zhao R, et al. Study on isolation of endophytes from the medicinal plant *Tripterygium Wilfordii* and

- screening of its antibacterial activity [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2023, 40(2): 197-203.
- [11] Talukdar R, Padhi S, Rai A K, Masi M, et al. Isolation and characterization of an endophytic fungus *Colletotrichum coccodes* producing tyrosol from *Houttuynia cordata* Thunb. using ITS2 RNA secondary structure and molecular docking study [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 650247.
- [12] Kusar S, Verma V C, Lamshoef M, et al. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(3): 1287-1294.
- [13] Ellsworth K T, Clark T N, Gray C A, et al. Isolation and bioassay screening of medicinal plant endophytes from eastern Canada [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2013, 59(11): 761-765.
- [14] 厉秀秀, 方玉鹏, 赖毕, 等. 黄连产小檗碱内生真菌的分离鉴定 [J]. 草地学报, 2013, 21(5): 1005-1011.
Li X X, Fang Y P, Lai B, et al. Isolation and identification of berberine-producing endophytic fungi from *Coptis chinensis* [J]. Acta Agrestia Sinica, 2013, 21(5): 1005-1011.
- [15] Ye H T, Luo S Q, Yang Z N, et al. Endophytic fungi stimulate the concentration of medicinal secondary metabolites in *Houttuynia cordata* Thunb. [J]. Plant Signaling & Behavior, 2021, 16(9): 1929731.
- [16] 刘佳佳, 陈淑娟, 龚汉祥, 等. 一株产槲皮素类色素的银杏内生真菌的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(2): 246-250.
Liu J J, Chen S J, Gong H X, et al. An endophytic fungus producing orange pigment isolated from *Ginkgo Biloba* L. [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(2): 246-250.
- [17] 程庭峰, 吕东晋, 王环, 等. 麻花苳产黄酮类物质内生真菌的分离与鉴定及抗氧化活性分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(19): 6541-6549.
Cheng T F, Lü D J, Wang H, et al. Isolation, identification and antioxidant activity of endophytic fungi producing flavonoids from *Gentiana straminea* Maxim. [J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(19): 6541-6549.
- [18] 沈书庆. 濒危药用植物杜仲产活性成分内生真菌的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2008.
Shen S Q. Study on endophytic fungi producing active components from endangered medicinal plant *Eucommia ulmoides* [D]. Xi'an: Northwest University, 2008.
- [19] 韩晓丽, 康冀川, 段宝玲, 等. 一株银杏内生裂褶菌的鉴定及其产黄酮的初步研究 [J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2011, 31(2): 113-116.
Han X L, Kang J C, Duan B L, et al. Preliminary study on identification of and flavonoid production from an endophytic fungus from *Ginkgo biloba* L. [J]. Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2011, 31(2): 113-116.
- [20] 何映霞, 冉雪琴, 王嘉福. 珙桐产黄酮内生真菌的分离和鉴定 [J]. 贵州农业科学, 2008, 218(3): 3-6.
He Y X, Ran X Q, Wang J F. Isolation and identification of endophytic fungi strains producing flavonoids from *Davidia involucrate* Baill. [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2008, 218(3): 3-6.
- [21] 张颖慧, 魏东盛, 邢来君, 等. 一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 466-469.
Zhang Y H, Wei D S, Xing L J, et al. A modified method for isolating DNA from fungus [J]. Microbiology China, 2008, 35(3): 466-469.
- [22] 中国科学院微生物研究所. 真菌名词与名称 [M]. 北京: 科学出版社, 1976.
Institute of Microbiology at Chinese Academy of Sciences. Fungal noun and name [M]. Beijing: Science Press, 1976.
- [23] 吴可欣, 唐诗雨, 朱奕儒, 等. 野生型斜茎黄芪内生真菌分离鉴定及苦马豆素分析 [J]. 草地学报, 2022, 30(7): 1692-1700.
Wu K X, Tang S Y, Zhu Y R, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from wild-type *Astragalus adsurgens* and analysis of swainsonine [J]. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(7): 1692-1700.
- [24] 郭玉华, 舒雪纯, 张影波, 等. 基于超高效液相色谱-电喷雾-质谱、天然产物词典和活性筛选的艾纳香内生真菌次生代谢产物 [J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 552-561.
Guo Y H, Shu X C, Zhang Y B, et al. Screening of bioactive secondary metabolites of endophytes associated with *Blumea balsamifera* (L.) D C. by UPLC-QToF-MS, DNP and bioassay [J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 552-561.
- [25] 邓哲, 荆文光, 刘安. 薄层色谱法在当前中药质量标准中的应用探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 201-206.
Deng Z, Jing W G, Liu A. Discussion about application of thin layer chromatography in current quality standard control [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 25(7): 201-206.
- [26] Jia M, Chen L, Xin H L, et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1-14.