

北桑寄生产黄酮内生菌的分离鉴定及其抗氧化和抑菌活性评价

郑紫云¹, 柴书彤¹, 陈婕¹, 杨虹¹, 白红娟², 杨官娥^{*1}

1 山西医科大学药学院, 山西 晋中 030600

2 中北大学环境与安全工程学院, 山西 太原 030051

郑紫云, 柴书彤, 陈婕, 杨虹, 白红娟, 杨官娥. 北桑寄生产黄酮内生菌的分离鉴定及其抗氧化和抑菌活性评价[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3798-3812

Zheng Ziyun, Chai Shutong, Chen Jie, Yang Hong, Bai Hongjuan, Yang Guan'e. Isolation and identification of flavonoid-producing endophytes with antioxidant and antibacterial activities from *Loranthus tanakae*[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3798-3812

摘要: 【背景】北桑寄生(*Loranthus tanakae*)植物中黄酮类化合物成分含量较高, 生物活性较好。由于植物资源短缺, 导致其生物活性成分的研究受限。【目的】从北桑寄生中分离、筛选和鉴定产黄酮类化合物的内生菌, 并评估其体外抗氧化和抑菌活性。【方法】以北桑寄生枝条为研究对象分离内生菌, 通过显色反应和薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)筛选产黄酮类化合物的内生菌, 并采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法测定其总黄酮含量。利用清除自由基和抑菌的体外实验来初步评估产黄酮内生菌的生物活性。【结果】共筛选出 4 株产黄酮内生菌, 其中 3 株为内生真菌, 1 株为内生细菌, 通过形态学和分子生物学方法将其分别鉴定为 *Botryosphaeria* sp. (ZC020)、*Phoma* sp. (ZZ105)、*Nemania* sp. (ZS042)和 *Pseudomonas* sp. (ZC026)。4 株菌中 ZC020 和 ZS042 的总黄酮含量较高, 分别为 (44.58 ± 0.72) mg/L 和 (31.98 ± 0.18) mg/L ($P < 0.05$, $n = 3$), 并且 ZS042 可产生与北桑寄生植物相同类型的黄酮类化合物。ZC026 和 ZS042 表现出优异的抗氧化活性, 其 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)和 2,2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS]

基金项目: 山西省国际科技合作项目(201803D421065); 中央引导地方科技发展资金项目(YDZX20201400001443); 国家自然科学基金(81173473); 太原市科学技术发展计划人才扶持专项(120247-08); 山西省科学技术研究项目(201901D211341); 山西省重点研发计划(201903D321083)

Supported by: Shanxi International Science and Technology Cooperation Project (201803D421065); Central Government Guides Local Scientific and Technological Development Fund Project (YDZX20201400001443); National Natural Science Foundation of China (81173473); Taiyuan Science and Technology Project Special Talents Star Project (120247-08); Science and Technology Research Project of Shanxi Province (201901D211341); Key Research and Development Program of Shanxi Province (201903D321083)

*Corresponding author: E-mail: yangguane@aliyun.com

Received: 2022-01-14; Accepted: 2022-03-15; Published online: 2022-04-02

自由基清除率分别为 72.85%±0.66% (ZC026)、57.01%±0.89% (ZS042)和 85.36%±0.75% (ZC026)、88.17%±0.15% (ZS042) ($P<0.05$, $n=3$)。ZZ105 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑制作用。【结论】从北桑寄生枝条中分离出 4 株产黄酮类化合物的内生菌, 其中有一株为内生细菌。这项工作为北桑寄生黄酮类化合物的生产提供了新的资源, 也为其他珍稀药用植物和材料的开发和保护提供了参考。

关键词: 北桑寄生; 内生菌; 黄酮类化合物; 抗氧化活性; 抑菌活性

Isolation and identification of flavonoid-producing endophytes with antioxidant and antibacterial activities from *Loranthus tanakae*

ZHENG Ziyun¹, CHAI Shutong¹, CHEN Jie¹, YANG Hong¹, BAI Hongjuan², YANG Guan'e^{*1}

1 School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Jinzhong 030600, Shanxi, China

2 School of Environmental and Safety Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, Shanxi, China

Abstract: [Background] *Loranthus tanakae* has rich flavonoids with good pharmacological activities, whereas the studies of the flavonoids are limited because of the shortage of plant resources. [Objective] To isolate and identify the flavonoid-producing endophytes from *L. tanakae* and study their antioxidant and antibacterial activities *in vitro*. [Methods] The flavonoid-producing endophytes were isolated from the twigs of *L. tanakae* and screened by color reaction and thin-layer chromatography (TLC). The total flavonoid content was determined via NaNO₂-Al(NO₃)₃ colorimetry. The biological activities of flavonoid-producing endophytes were preliminarily evaluated by experiments of scavenging free radicals and inhibiting bacteria *in vitro*. [Results] A total of four flavonoid-producing endophytes, including three fungal strains and one bacterial strain, were screened out and identified as *Botryosphaeria* sp. (ZC020), *Phoma* sp. (ZZ105), *Nemania* sp. (ZS042), and *Pseudomonas* sp. (ZC026) based on morphological and molecular characteristics. ZC020 and ZS042 had higher total flavonoid content, which was (44.58±0.72) mg/L and (31.98±0.18) mg/L ($P<0.05$, $n=3$), respectively. Notably, ZS042 produced the same flavonoids as *L. tanakae*. ZC026 and ZS042 exhibited excellent antioxidant activity, which showed the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging rates of 72.85%±0.66% and 57.01%±0.89% and the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging rates of 85.36%±0.75% and 88.17%±0.15%, respectively ($P<0.05$, $n=3$). ZZ105 had inhibitory effects on both Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria. [Conclusion] Four flavonoid-producing endophytes were isolated from *L. tanakae* and one of them was a bacterial strain. This work provides a new resource for the production of flavonoids by *L. tanakae* and a reference for developing and conserving other rare and precious medicinal plants and materials.

Keywords: *Loranthus tanakae*; endophytes; flavonoids; antioxidant activity; antibacterial activity

北桑寄生为桑寄生科(*Loranthaceae*)桑寄生属半寄生植物,主要分布于朝鲜半岛和中国北部。茎、叶、果实均可入药,有强筋骨、祛风湿、降血压等功效。文献只有北桑寄生生态、性状等方面的报道,其化学成分和生理活性鲜有报道^[1]。Kim等2004年首次对韩国北桑寄生的化学成分进行了研究,分离鉴定了鼠李素-3-O- α -L-鼠李糖苷(α -rhamnnetin-3-O- α -L-rhamnoside, ARR)、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、鼠李柠檬素-3-O- α -L-鼠李糖苷和山奈酚-3-O- α -L-鼠李糖苷这4种黄酮类化合物,并发现其对多种人癌细胞系(非小细胞肺癌 A549、卵巢癌 SK-OV-3、皮肤癌 SK-MEL-2、中枢神经系统 XF498 和结肠癌 HCT-15)具有细胞毒性和血管抑制活性^[2]。课题组前期研究表明,北桑寄生的主要活性成分是黄酮类化合物,总黄酮含量高达10.58%,其中ARR单体含量占总黄酮的70%^[3]。研究表明,ARR通过抑制NF- κ B通路激活Nrf2通路,对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的RAW264.7细胞的炎症反应发挥良好的抗炎药理作用^[4]。由于北桑寄生的寄生习性比较特殊,对环境和宿主的选择条件比较严格,其种群逐渐减少,在一些地区已成为濒危物种,亟需保护^[5]。为解决资源问题,本课题组对北桑寄生进行了组织培养。在此过程中,发现北桑寄生拥有大量的内生菌资源。

内生菌以互利共生关系存在于宿主的内部组织和植物细胞内,但不会对宿主造成明显的伤害^[6]。由于宿主与内生菌之间可能存在水平基因转移的作用,使得内生菌具有合成其宿主产生的活性化学成分类似物的潜力,是重要次生代谢物的储存库^[7]。因此,利用从原植物组织中分离、筛选产活性物质的内生菌来解决因某些药用植物生长缓慢或濒临灭绝等原因引起的药源匮乏、耐药致病菌的发生等问题并保护

植物生态,逐渐成为农业、医药和工业领域的研究热点。大量研究表明,一些内生菌的代谢产物富含黄酮类化合物,一些产生类黄酮的内生真菌已被成功分离出来,如来自 *Gentiana straminea* Maxima.的内生真菌可生产多种天然类黄酮成分,包括异牡荆素、槲皮素和异荜草素^[8]。Seetharaman等^[9]从 *Passiflora incarnata* L. 分离出能生产具有抗癌和自由基清除活性的生物活性化合物(FChR)的内生真菌(*A. alternata* KT380662、*C. capsici* KT373967 和 *C. taiwanense* PI-3 KX580307)。

关于桑寄生科植物内生菌方面的研究较少,仅发现一篇关于北桑寄生内生菌的研究报道了从北桑寄生叶片中分离纯化得到一株具有较高抗氧化和抑菌活性的内生真菌菌株 *Alternaria alternata*^[10]。本实验以北桑寄生新鲜枝条为研究对象,分离其内生菌并对产黄酮类化合物菌株进行鉴定,以期为北桑寄生新的药用资源的利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品

2020年9月,从位于中国陕西省凤县马家梁山的成熟、健康的树木中采集了北桑寄生的健康枝条,将样品储存在4℃备用。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) (ATCC33694)、奇异变形杆菌(*Proteus hauseri*) (ATCC13315)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) (ATCC23857)、副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphoid*) (CMCC50094)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (ATCC25923)由山西医科大学微生物实验室提供。

1.2 主要试剂和仪器

1/2 MS培养基(不含蔗糖和琼脂)、Ezup柱式基因组DNA抽提试剂盒、4S Red Plus核酸染色剂(10 000×水溶液)和Taq PCR Master Mix

(2×, blue dye), 生工生物工程(上海)股份有限公司; DL2000 Marker、革兰氏染色试剂盒和细菌全基因组提取试剂盒, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)和 2,2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS), 北京索莱宝生物科技有限公司。显微镜, Nikon 公司; 紫外分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 全自动数码凝胶成像分析系统, 北京赛智创业科技有限公司; 恒温振荡器和生化培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司; 全波长多功能酶标仪和超高效液相色谱高分辨质谱联用仪, 赛默飞世尔科技公司。

1.3 培养基

1.3.1 分离内生菌培养基

察氏琼脂培养基(CDA)参考文献[11]配制。

沙氏琼脂培养基 SDA (g/L): 蛋白胨 10.0, 葡萄糖 40.0, 琼脂 20.0; pH 7.0-7.5。

1/2 MS 蔗糖琼脂培养基(g/L): 1/2 MS 培养基(不含蔗糖和琼脂) 2.3, 蔗糖 30.0, 琼脂 8.0; pH 5.5-6.0。

1.3.2 抑菌实验所用培养基

参考卢丹丹等^[10]抑菌实验, 配制营养琼脂培养基(NA)及营养液体培养基(NB)。

1.4 内生菌的分离与纯化

取新鲜的北桑寄生枝条, 流水冲洗枝条表面 30 min, 用无菌纱布将表面水分拭干。在超净工作台中用无菌水冲洗 3 次, 无菌滤纸吸干水分。然后依次用 75%乙醇(1 min)、2% NaClO 溶液(5 min)进行表面灭菌。无菌水冲洗干净枝条后, 使用灭菌处理后的解剖刀将其切成 1-2 cm 的小块组织, 并呈“品”字形接种至固体培养基上, 每个培养基重复 5 组实验。将已接种的平板置于 27 °C 恒温培养箱中培养。当培养基上观

察到明显的菌落时, 用接种针或接种环将形态不同的真菌及细菌分别挑出, 接种到新的相应培养基上进行菌种纯化, 重复实验直至得到单一菌株。纯化后菌株于 4 °C 保存。

同时, 为了确保分离出的菌为北桑寄生的内生菌, 设置了 2 个对照组。一组用消毒过的未切割的枝条在平板上进行印迹涂抹; 另一组用最后一次冲洗的无菌水进行平板涂布。如果 2 个对照组的平板均无任何微生物生长, 则可以确定获得的是北桑寄生的内生菌。

1.5 产黄酮类化合物菌株筛选

1.5.1 内生菌的发酵培养

将分离得到的北桑寄生内生菌分别接种在新鲜的固体培养基上, 27 °C 黑暗条件下进行活化培养 3-7 d。内生真菌: 取 1 cm×1 cm 的带琼脂内生真菌接种至对应的液体培养基中, 27 °C、160 r/min 条件下摇床发酵培养 7 d。内生细菌: 用接种环挑取一环菌种, 接种于液体培养基(分离培养基, 不加琼脂)中, 27 °C、160 r/min 条件下摇床发酵培养 7 d。

1.5.2 供试样品的制备

内生真菌的菌体与发酵液通过抽滤分离; 内生细菌菌体与发酵液通过 4 °C、5 000 r/min 离心 15 min 分离。发酵液于旋转蒸发仪上 50 °C 减压浓缩至原体积的十分之一, 然后用 2 倍体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液, 50 °C 减压浓缩后得乙酸乙酯层提取物。5 mL 甲醇定容, 并用 0.22 μm 过滤器过滤, 存放于 4 °C 备用。

1.5.3 黄酮类化合物显色反应

由于酚羟基和 γ-吡喃酮环的存在, 通过一系列化学显色反应分析黄酮类化合物的存在^[12]。

盐酸-镁粉反应: 取待测液 1 mL 至试管中, 加入少量镁粉, 然后滴加浓盐酸 3-4 滴。

FeCl₃ 反应: 取待测液 1 mL 至试管中, 加入 2% 的 FeCl₃ 溶液数滴。

NaOH 反应: 取待测液 1 mL 至试管中, 加

入 5% 的 NaOH 溶液数滴。

AlCl₃ 反应: 取待测液滴于滤纸片上, 滴加 1% 的 AlCl₃ 乙醇溶液, 于 365 nm 紫外灯下观察。

1.5.4 Thin-layer chromatography (TLC) 鉴别

样品为内生菌乙酸乙酯提取物, 对照品为北桑寄生总黄酮样品, 展开剂为二氯甲烷: 甲醇: 甲酸(17:2:1, 体积比), 显色剂为 1% AlCl₃ 乙醇溶液, 365 nm 紫外灯下观察。

1.5.5 总黄酮含量的测定

将产黄酮内生真菌接种到 100 mL 新鲜液体培养基(分离培养基, 不加琼脂)中, 在恒温摇床上 27 °C、160 r/min 培养 7 d。样品制备同 1.5.2。

乙酸乙酯提取物的总黄酮含量通过 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 比色法进行评估。首先, 精密称定 20 mg 芦丁对照品置于 50 mL 容量瓶中, 用 60% 乙醇溶解定容。移取 25 mL 溶液到 50 mL 容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁对照品溶液。在 25 mL 容量瓶中分别加入 0.1、0.5、1、3、5、7 和 10 mL 芦丁对照品溶液, 然后加入 1 mL 5% NaNO₂, 静置 6 min, 加入 1 mL 10% Al(NO₃)₃, 静置 6 min, 加入 10 mL 1 mol/L NaOH。最后, 用 30% 乙醇溶液定容, 摇匀后静置 15 min, 在 510 nm 处测定混合物的吸光度。以吸光度为纵坐标(Y)、质量浓度为横坐标(X)作标准曲线图。发酵液总黄酮浓度按上述标准体系测定, 每组设 3 个平行对照。参照芦丁标准曲线计算各样品的黄酮含量。

总黄酮含量=(质量浓度×稀释倍数×甲醇溶液体积)/发酵液总体积×100%。

1.6 产黄酮内生菌的鉴定

1.6.1 形态学鉴定

菌株接种至不同的固体平板上(CDA、SDA、1/2MS)于 27 °C 培养 12 d。观察并记录菌落的宏观特征, 如菌落直径、质地、颜色和形态。挑取内生真菌菌丝于载玻片上, 用乳酚棉

蓝染色剂进行染色; 吸取内生细菌菌液于载玻片, 使用革兰氏染色试剂盒方法对其进行染色。用显微镜在 10×40 视野下观察菌丝及细菌的形态。最后, 根据《真菌鉴定手册》^[13]及《伯杰氏系统细菌学手册》^[14]对这些内生菌进行分类。

1.6.2 分子生物学鉴定

内生真菌在含有 100 mL 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中 27 °C、160 r/min 培养 12 d。4 °C、5 000 r/min 离心 15 min 收集菌体并加入液氮迅速研磨成粉, 北桑寄生内生真菌的基因组 DNA 采用柱式真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取。真菌内部转录间隔区(ITS)用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAATGC-3') 进行扩增。内生细菌基因组 DNA 的提取采用细菌全基因组提取试剂盒, 并用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 进行扩增。PCR 反应体系(20 μL): Taq PCR Master Mix 10 μL (2×), 上、下游引物各 0.8 μL (0.4 μmol/L), DNA 模板(5 μg/mL), 无菌双蒸水补充至 20 μL。内生真菌 PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。内生细菌 PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序成功的序列在 NCBI BLAST 上进行比对分析, 下载相似度较高的序列, 使用 MEGA 7.0 软件和 neighbor-joining 法进行聚类分析, 构建系统发育树进行物种鉴定。

1.7 内生菌粗提物的抗氧化活性分析

样品制备同 1.5.2。无水乙醇溶解样品和阳性对照(抗坏血酸, Vc), 将乙酸乙酯提取物和阳性对照调至 7 种浓度(0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、

1.0 和 2.0 mg/mL)进行 2 种抗氧化活性测定^[15]。

1.7.1 DPPH 自由基清除活性的测定

精确称取 DPPH 粉末(25 mg), 用 100 mL 无水乙醇溶解配制成 0.25 mg/mL DPPH-乙醇溶液, 储存在 4 °C 冰箱中备用。将 100 μ L DPPH-乙醇溶液和 100 μ L 梯度样品溶液加入酶标板中, 37 °C 避光孵育 30 min。在 517 nm 处测量 OD 值, 每个实验组设置 3 个平行对照。清除率计算公式为: 清除率(%)=[1-(A_1-A_2)/ A_0] \times 100。

式中, A_0 为 100 μ L DPPH 溶液加 100 μ L 无水乙醇的吸光度, A_1 为 100 μ L DPPH 溶液与 100 μ L 梯度样品溶液混合的吸光度, A_2 为 100 μ L 梯度样品溶液加 100 μ L 无水乙醇的吸光度。

1.7.2 ABTS 自由基清除活性的测定

精确称取 78 mg ABTS 粉末, 加入 13.2 mg 过硫酸钾, 超纯水定容至 20 mL, 4 °C 避光保存 16 h。在进行 ABTS 自由基清除实验之前, 用无水乙醇将 ABTS 原液稀释至吸光度为 0.700 \pm 0.002。然后, 将 800 μ L ABTS 溶液与 200 μ L 梯度样品溶液混合并孵育 10 min。吸取 200 μ L 上清液并加入酶标板中, 在 734 nm 处测量吸光度, 每个实验组有 3 个平行对照。清除率的计算公式为: 清除率(%)=[1-(A_0-A_1)/ A_0] \times 100。

式中, A_0 为 800 μ L ABTS 溶液与 200 μ L 无水乙醇混合后的吸光度, A_1 为 800 μ L ABTS 溶液与 200 μ L 梯度样品溶液混合后的吸光度。

1.8 内生菌粗提物的抑菌活性分析

根据纸片扩散法(K-B 法)评估粗提物的抗菌活性^[16]。使用麦氏比浊法, 将活化好的 5 种试验病原菌(大肠杆菌、奇异变形杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和副伤寒沙门氏菌)原液稀释成 1×10^{-6} - 1×10^{-8} CFU/mL 测试菌溶液。将 200 μ L 测试细菌溶液加入 20 mL NA 培养基中。将内生真菌发酵液提取物溶解在二甲

基亚砷(DMSO)中, 配制成浓度为 50 mg/mL 的溶液。在无菌环境中, 将浸有 50 μ L 样品的无菌 6 mm 滤纸放在含有细菌的琼脂平板上。氨苄青霉素和链霉素分别为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的阳性对照, DMSO 为阴性对照。每个实验组设 3 个平行对照。在 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h 后, 观察并记录相应的抑菌圈大小。

通过连续稀释方法确定最小抑菌浓度。将 100 μ L NB 培养基加入酶标板的每个孔中(1-7)。取 100 μ L 样品转移至 1 号孔中, 混匀后取 100 μ L 加入 2 号孔中, 以此类推, 连续稀释至 7 号孔。提取物终浓度为 25.000、12.500、6.250、3.125、1.563、0.782 和 0.391 mg/mL。病原体过夜培养物用无菌 NB 培养基稀释至 1×10^{-6} - 1×10^{-8} CFU/mL。将 100 μ L 测试菌溶液转移到每个孔中混匀, 并在 30 °C 培养 24 h。无菌 NB 培养基和测试细菌溶液用作对照。24 h 后, 孔中培养液澄清的最低浓度为最小抑菌浓度(MIC)。将显示无细菌生长的培养液(50 μ L)在无菌 NA 板上涂布, 并于 30 °C 孵育 24 h。平板上无任何微生物生长的最低浓度为最小杀菌浓度(MBC)。每个测定重复 3 次以获得统计上有效的结果。

2 结果与分析

2.1 北桑寄生生产黄酮内生菌的分离与筛选

使用 3 种分离培养基从北桑寄生的新鲜枝条组织中共分离出 112 株内生菌株, 将相应的内生菌依次编号, 分离结果见表 1。根据显色反应(表 2)和薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)分析(图 1)的结果筛选出 4 株可产黄酮类化合物的内生菌(ZC020、ZC026、ZS042 和 ZZ105)。由图 1 可知, 喷洒 $AlCl_3$ 显色剂后, 4 个菌株的粗提物在紫外光下

均呈现出不同程度的黄色荧光斑点,表明筛选出的4株菌均可产黄酮类成分。ZS042菌株的粗提物与对照品在紫外光下具有迁移率相同、颜色一致的黄绿色荧光斑点,表明ZS042菌株可产与北桑寄生植物相同类型的黄酮类化合物。

表2 菌株粗提物显色反应结果

Table 2 Results of the color test of strains crude extracts

Reagent	ZC020	ZC026	ZS042	ZZ105
HCl-Mg	Yellow	Yellow	Brick red	Pink
1% AlCl ₃	Violet fluorescence	Blue-green fluorescence	Blue-green fluorescence	Blue fluorescence
2% FeCl ₃	Dark yellow	Yellow	Orange	Yellow
4% NaOH	Brownish-yellow	Light yellow	Light yellow	Light yellow



图1 薄层色谱分析 A: 北桑寄生总黄酮; B: ZC020粗提物; C: ZC026粗提物; D: ZS042粗提物; E: ZZ105粗提物。箭头所指为ZS042菌株的粗提物与对照品迁移率相同,颜色一致的黄绿色荧光斑点

Figure 1 Thin-layer chromatographic analysis. A: Total flavonoids of *Loranthus tanakae*; B: Crude extract of ZC020; C: Crude extract of ZC026; D: Crude extract of ZS042; E: Crude extract of ZZ105. Arrows were used to indicate the yellow-green fluorescent spots with the same migration rate and the same color between the crude extract of ZS042 strain and the control substance.

表1 北桑寄生中内生菌的分离结果

Table 1 The separation result of endophytes from *Loranthus tanakae*

Type of medium	Strain No.	Total	Isolation frequency (%)
CDA	ZC001-ZC031	31	27.68
SDA	ZS032-ZS075	44	39.28
1/2 MS	ZZ076-ZZ112	37	33.04

采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 比色法建立芦丁标准曲线($Y=0.1834X-0.0006$, $R^2=0.9994$),并在此基础上测定了上述4个菌株发酵液中的总黄酮含量。结果显示,菌株ZC020的总黄酮含量最高,为(44.58±0.72) mg/L; ZS042次之,其总黄酮含量为(31.98±0.18) mg/L ($P<0.05$, $n=3$); ZC026和ZZ105的总黄酮含量未达到10.00 mg/L,分别为(3.65±0.36) mg/L和(1.46±0.14) mg/L ($P<0.05$, $n=3$)。

2.2 产黄酮内生菌的鉴定结果

菌株ZC020 (GenBank登录号为OM232081)菌落在CDA培养基上生长较快,培养7 d菌落直径达到60-70 mm。初期为疏松白色菌丝,中后期菌丝逐渐生长密集,菌落中央颜色渐变为灰色。菌丝有明显节状结构,内含横隔膜,有分枝,多数菌丝联结成网状;在菌丝的侧边有囊状突起,孢子呈卵形或椭圆形(图2)。其ITS序列在BLAST系统中获取相关种属的ITS序列,用MEGA 7.0软件按邻接法构建系统发育树(图3)。结果显示,菌株ZC020与*Botryosphaeria dothidea* (MT919156.1)的序列最大相似性达到99.27%,综合菌落、菌体形态和ITS序列分析信息,将该菌株初步鉴定为*Botryosphaeria* sp.。

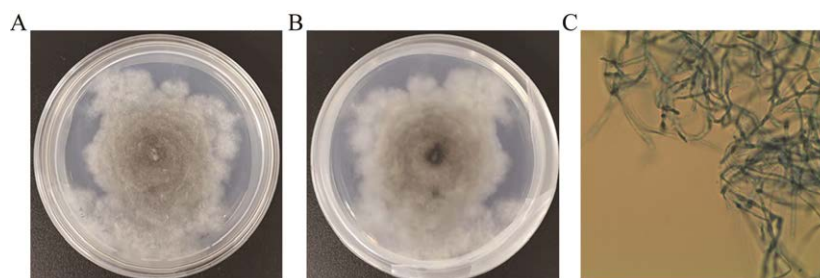


图 2 内生真菌 ZC020 的形态特征及显微形态图 A: 菌株 ZC020 正面特征; B: 菌株 ZC020 背面特征; C: 菌株 ZC020 菌丝显微形态图(400×)

Figure 2 Morphological characteristics and micromorphology of endophytic fungi ZC020. A: Surface characteristics of strain ZC020; B: Reverse characteristics of strain ZC020; C: Micromorphology of hyphae of strain ZC020 (400×).

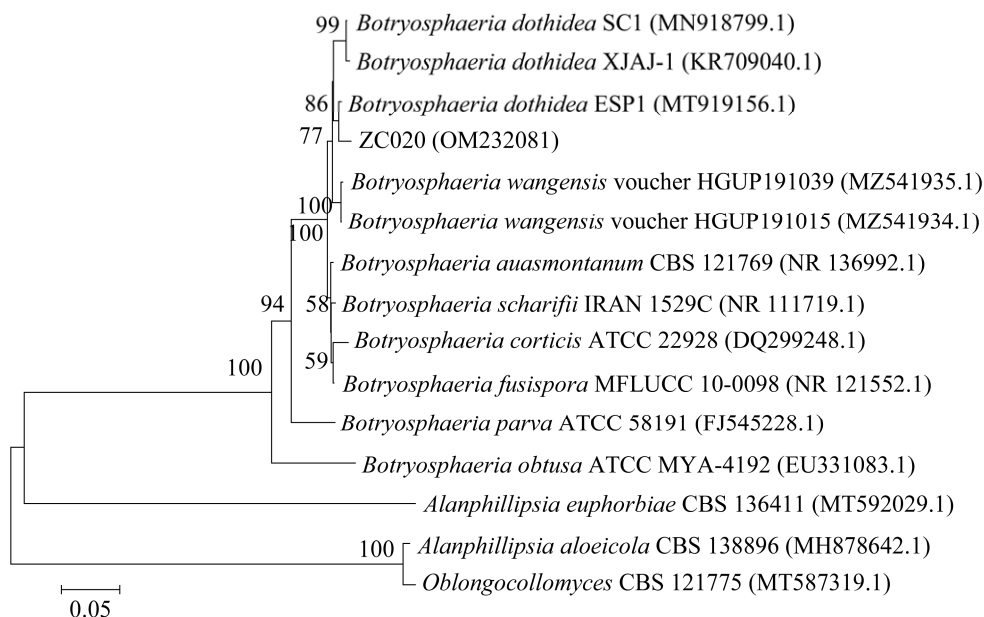


图 3 内生真菌 ZC020 的系统发育树 分支上的数字为 1 000 次 bootstrap 分析所得值, 仅显示大于 50% 的值; 标尺 0.05 为进化距离; 标准菌为 *Botryosphaeria auasmontanum* CBS 121769、*Botryosphaeria corticis* ATCC 22928、*Botryosphaeria parva* ATCC 58191 和 *Botryosphaeria obtusa* ATCC MYA-4192; outgroup 为 *Alanphillipsia euphorbiae* CBS 136411、*Alanphillipsia aloecicola* CBS 138896 和 *Oblongocollomyces* CBS 121775

Figure 3 Phylogenetic tree of endophytic fungi ZC020. Bootstrap values >50% based on 1 000 replications are shown at branch nodes; Bar, 0.05 substitutions per amino acid positions; *Botryosphaeria auasmontanum* CBS 121769, *Botryosphaeria corticis* ATCC 22928, *Botryosphaeria parva* ATCC 58191 and *Botryosphaeria obtusa* ATCC MYA-4192 were used as type strains; *Alanphillipsia euphorbiae* CBS 136411, *Alanphillipsia aloecicola* CBS 138896 and *Oblongocollomyces* CBS 121775 were used as outgroups.

菌株 ZC026 (GenBank 登录号为 OM232080) 菌落在 CDA 培养基上生长缓慢, 培养 7 d 菌落直径约 20–30 mm。菌落表面平坦, 边缘不规则。颜色为白色至浅黄色, 质地呈黏稠状。菌体呈小杆

状或略弯曲, 革兰氏染色后呈红色, 鉴定为革兰氏阴性细菌(图 4)。根据其 16S rRNA 基因序列在 BLAST 系统中下载相关种属的基因序列, 用 MEGA 7.0 软件按邻接法构建系统发育树(图 5)。

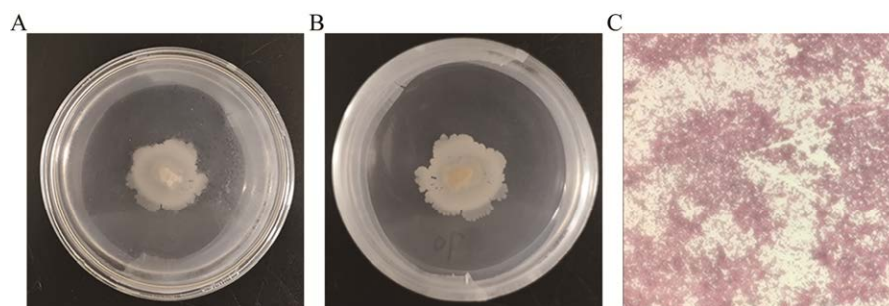


图 4 内生细菌 ZC026 的形态特征及显微形态图 A: 菌株 ZC026 正面特征; B: 菌株 ZC026 背面特征; C: 菌株 ZC026 显微形态图(400×)

Figure 4 Morphological characteristics and micromorphology of endophytic bacteria ZC026. A: Surface characteristics of strain ZC026; B: Reverse characteristics of strain ZC026; C: Micromorphology of strain ZC026 (400×).

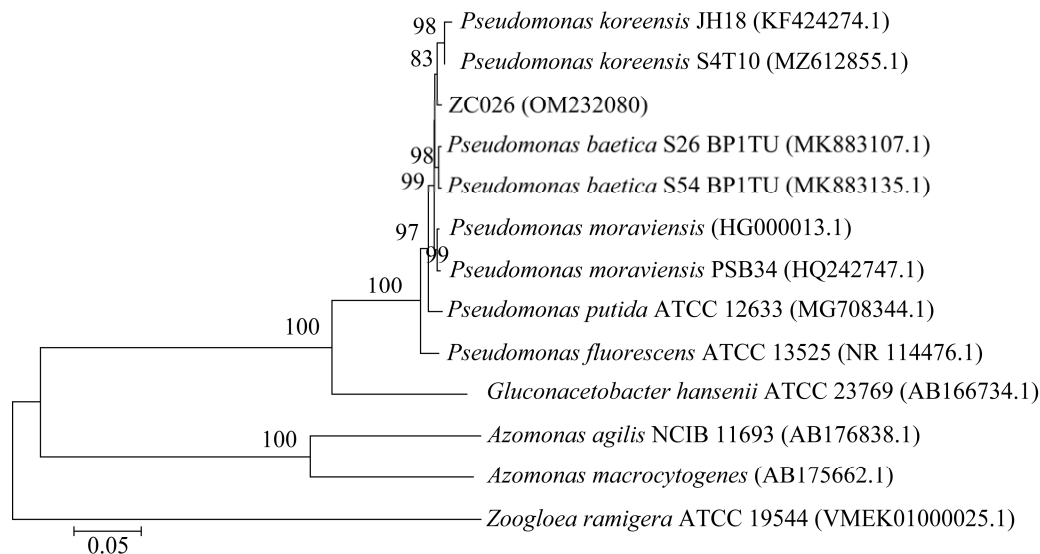


图 5 内生细菌 ZC026 的系统进化树 分支上的数字为 1 000 次 bootstrap 分析所得值, 仅显示大于 50% 的值; 标尺 0.05 为进化距离; 标准菌为 *Pseudomonas putida* ATCC 12633 和 *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525; outgroup 为 *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769、*Azomonas agilis* NCIB 11693、*Azomonas macrocytogenes* 和 *Zoogloea ramigera* ATCC 19544

Figure 5 Phylogenetic tree of endophytic bacteria ZC026. Bootstrap values >50% based on 1 000 replications are shown at branch nodes; Bar, 0.05 substitutions per amino acid positions; *Pseudomonas putida* ATCC 12633 and *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 were used as type strains; *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, *Azomonas agilis* NCIB 11693, *Azomonas macrocytogenes* and *Zoogloea ramigera* ATCC 19544 were used as outgroups.

结果显示, 菌株 ZC026 与 *Pseudomonas koreensis* (KF424274.1) 的序列最大相似性达到 99.03%, 综合菌落、菌体形态和 16S rRNA 基因序列分析信息, 将该菌株初步鉴定为 *Pseudomonas* sp.。

菌株 ZS042 (GenBank 登录号为 OM232082) 菌落在 SDA 培养基上生长较快, 培养 7 d 菌落直

径达到 50–60 mm。菌落中心凸起, 质地疏松, 菌落表面和背面的颜色均为乳白色, 未产生色素。菌落边缘呈分枝状。菌丝有横隔膜, 有分枝, 多数菌丝联结成网状; 无孢子产生(图 6)。其 ITS 序列在 BLAST 系统中获取相关种属的 ITS 序列, 用 MEGA 7.0 软件按邻接法构建系统进化树(图 7)。

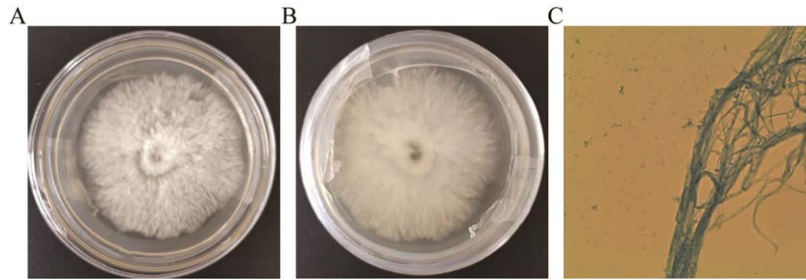


图 6 内生真菌 ZS042 的形态特征及显微形态图 A: 菌株 ZS042 正面特征; B: 菌株 ZS042 背面特征; C: 菌株 ZS042 菌丝显微形态图(400×)

Figure 6 Morphological characteristics and micromorphology of endophytic fungi ZS042. A: Surface characteristics of strain ZS042; B: Reverse characteristics of strain ZS042; C: Micromorphology of hyphae of strain ZS042 (400×).

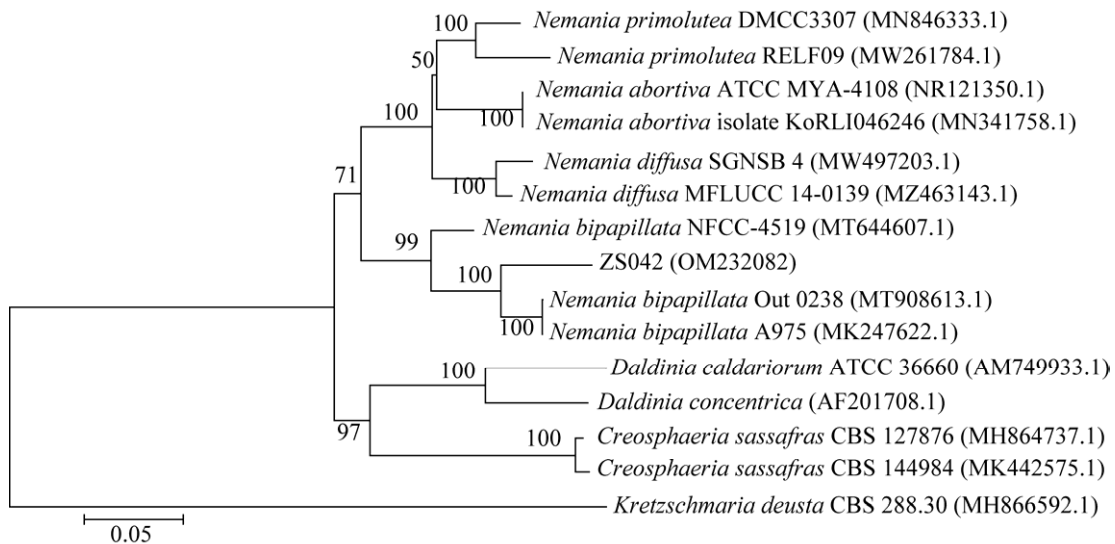


图 7 内生真菌 ZS042 的系统发育树 分支上的数字为 1 000 次 bootstrap 分析所得值, 仅显示大于 50% 的值; 标尺 0.05 为进化距离; 标准菌为 *Nemania abortiva* ATCC MYA-4108; outgroup 为 *Daldinia caldariorum* ATCC 36660、*Daldinia concentrica*、*Creosphaeria sassafras* CBS (127876、144984) 和 *Kretzschmaria deusta* CBS 288.30

Figure 7 Phylogenetic tree of endophytic fungi ZS042. Bootstrap values > 50% based on 1 000 replications are shown at branch nodes; Bar, 0.05 substitutions per amino acid positions; *Nemania abortiva* ATCC MYA-4108 was used as type strain; *Daldinia caldariorum* ATCC 36660, *Daldinia concentrica*, *Creosphaeria sassafras* CBS (127876, 144984) and *Kretzschmaria deusta* CBS 288.30 were used as outgroups.

结果显示, 菌株 ZS042 与 *Nemania bipapillata* (MT908613.1) 的序列最大相似性达到 96.47%, 综合菌落、菌体形态和 ITS 序列分析信息, 将该菌株初步鉴定为 *Nemania* sp.。

菌株 ZZ105 (GenBank 登录号为 OM232083) 菌落在 1/2 MS 培养基上生长较慢, 培养 7 d 菌落直径达到 30–40 mm。菌落表面平坦, 质地紧

密, 边缘光滑。菌落表面颜色为浅棕色至白色, 由于有色素的分泌, 背面颜色中心呈棕黑色包围灰色, 外周颜色呈黄白色。菌丝无隔, 有分枝, 多数菌丝联结成网状; 无孢子产生(图 8)。其 ITS 序列在 BLAST 系统中获取相关种属的 ITS 序列, 用 MEGA 7.0 软件按邻接法构建系统发育树(图 9)。结果显示, 菌株 ZZ105 与 *Phoma moricola*

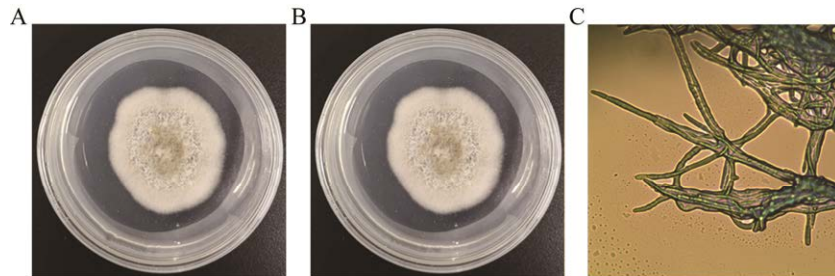


图 8 内生真菌 ZZ105 的形态特征及显微形态图 A: 菌株 ZZ105 正面特征; B: 菌株 ZZ105 背面特征; C: 菌株 ZZ105 菌丝显微形态图(400×)

Figure 8 Morphological characteristics and micromorphology of endophytic fungi ZZ105. A: Surface characteristics of strain ZZ105; B: Reverse characteristics of strain ZZ105; C: Micromorphology of hyphae of strain ZZ105 (400×).

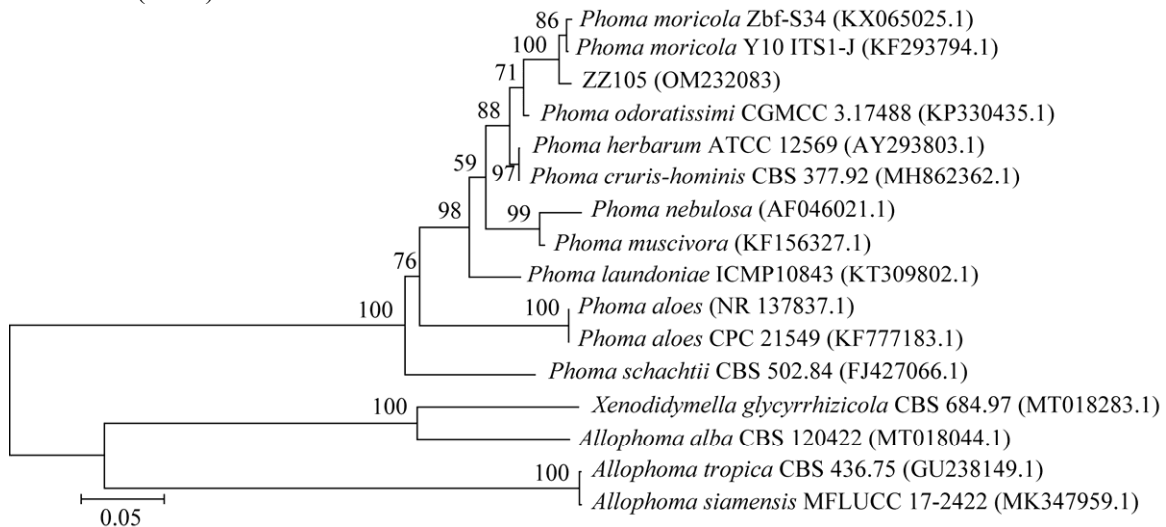


图 9 内生真菌 ZZ105 的系统发育树 分支上的数字为 1 000 次 bootstrap 分析所得值; 标尺 0.05 为进化距离; 标准菌为 *Phoma odoratissimi* CGMCC 3.17488、*Phoma herbarum* ATCC 12569 和 *Phoma laundoniae* ICMP 10843; outgroup 为 *Xenodidymella glycyrrhizicola* CBS 684.97、*Allophoma alba* CBS 120422、*Allophoma tropica* CBS 436.75 和 *Allophoma siamensis* MFLUCC 17-2422

Figure 9 Phylogenetic tree of endophytic fungi ZZ105. Bootstrap values based on 1 000 replications are shown at branch nodes; Bar, 0.05 substitutions per amino acid positions; *Phoma odoratissimi* CGMCC 3.17488, *Phoma herbarum* ATCC 12569 and *Phoma laundoniae* ICMP 10843 were used as type strains; *Xenodidymella glycyrrhizicola* CBS 684.97, *Allophoma alba* CBS 120422, *Allophoma tropica* CBS 436.75 and *Allophoma siamensis* MFLUCC 17-2422 were used as outgroups.

(KX065025.1)的序列最大相似性达到 99.80%, 综合菌落、菌体形态和 ITS 序列分析信息, 将该菌株初步鉴定为 *Phoma* sp.。

2.3 内生菌粗提物抗氧化活性

四个样品在 0.2–2.0 mg/mL 浓度范围内均可以清除 DPPH 自由基, 并且该活性与样品浓度呈正相关(图 10A)。各样品在最高浓度(2.0 mg/mL)的 DPPH 自由基清除率依次为 96.76%±0.11% (Vc)、72.85%±0.66% (ZC026)、57.01%±0.89% (ZS042)和 31.75%±2.05% (ZZ105) ($P<0.05$, $n=3$)。它们的 IC_{50} 值分别为(0.83±0.05) mg/mL (ZC026)、(1.24±0.02) mg/mL (ZS042)、(5.22±0.25) mg/mL (ZZ105)和 0.10 mg/mL (Vc) ($P<0.05$, $n=3$)。ZC020 的清除率未达到 10%。

各样品在最高浓度(2.0 mg/mL)下的 ABTS 自由基清除率依次为 88.42%±0.72% (Vc)、88.17%±0.15% (ZS042)、85.36%±0.75% (ZC026)、67.18%±3.74% (ZZ105)和 50.00%±2.07% (ZC020) ($P<0.05$, $n=3$)。在 2.0 mg/mL

时, ZS042 和 ZC026 的 ABTS 自由基清除率与抗坏血酸的清除率基本相同(图 10B)。这些样品的 IC_{50} 值分别为(0.19±0.03) mg/mL (ZS042)、(0.05±0.01) mg/mL (ZC026)、(1.20±0.07) mg/mL (ZZ105)、(1.89±0.14) mg/mL (ZC020)和 0.11 mg/mL (Vc) ($P<0.05$, $n=3$)。

通过 2 个抗氧化实验表明, 菌株 ZC026 和 ZS042 具有很强的抗氧化活性, 作为抗氧化剂具有巨大潜力, 值得进一步研究。

2.4 内生菌粗提物的抑菌活性

在本研究中, 仅发现 ZZ105 具有抗菌活性。菌株 ZZ105 对革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性菌副伤寒沙门氏菌、奇异变形杆菌均有抑制作用, 对大肠杆菌未表现出抑制作用(图 11)。ZZ105 粗提物对奇异变形杆菌、副伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 值分别为 3.125 mg/mL 和 6.250 mg/mL; 对枯草芽孢杆菌的 MIC 和 MBC 值分别为 1.563 mg/mL 和 1.563 mg/mL。

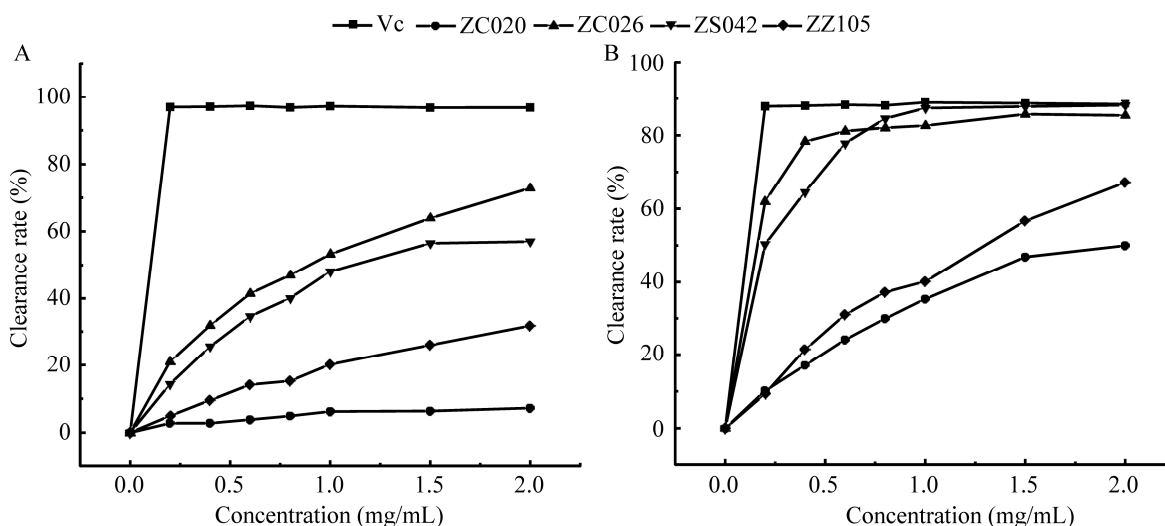


图 10 产黄酮内生菌的自由基清除活性 A: DPPH 自由基清除活性; B: ABTS 自由基清除活性

Figure 10 Free radical scavenging activity of flavonoid-producing endophytes. A: Activity of DPPH radical scavenging; B: Activity of ABTS radical scavenging.

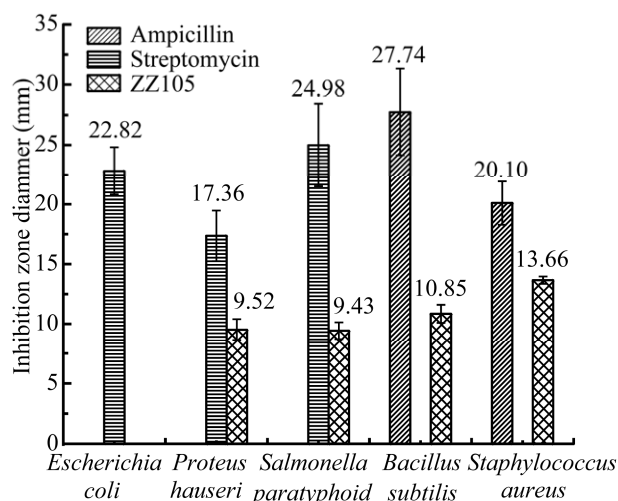


图 11 菌株 ZZ105 粗提物的抑菌活性

Figure 11 Antibacterial activity of crude extract of strain ZZ105.

3 讨论

内生菌作为植物发育和代谢的重要组成部分,在植物的胁迫、应用代谢和生长中发挥着重要作用。其组成特征和群落结构也受寄主植物内部环境和基因的影响,具有数量众多、种群结构多样的特点^[17-18]。1993年,Stierle等^[19]从太平洋紫杉中分离出一种内生真菌,发现其可以产生与寄主植物相同的抗肿瘤物质紫杉醇,启发了国内外研究人员从植物内生真菌中寻找生物活性物质。本实验以北桑寄生总黄酮为对照品,对显色反应阳性的粗提物进行薄层色谱鉴定,筛选出4种具有产黄酮类化合物特性的内生菌,其中菌株 ZS042 可产与北桑寄生植物相同类型的黄酮类成分。在菌株形态和 ITS 或 16S rRNA 基因序列分析的帮助下,4株菌分别被鉴定为 *Botryosphaeria* sp. (ZC020)、*Phoma* sp. (ZZ105)、*Nemania* sp. (ZS042) 和 *Pseudomonas* sp. (ZC026)。

Tang 等^[15]从 *Conyza blinii* H.Lév 中分离出一种产生类黄酮的内生真菌 CBL11,总黄酮含

量为(50.78±2.4) mg/L。本文中菌株 ZC020 与 ZS042 的总黄酮含量较高,分别为(44.58±0.72) mg/L 和(31.98±0.18) mg/L。从目前的研究结果来看,我们筛选出的具有黄酮类合成能力的内生菌产量较低,不能满足市场需求,需要进一步研究。

自由基水平升高会破坏由抗氧化防御系统维持的稳定状态,最终可能导致氧化应激,其中自由基水平的升高可能会攻击某些生物分子(DNA、RNA、蛋白质脂质和碳水化合物),从而对体内的细胞、组织和器官造成损害并形成疾病^[20]。从北桑寄生中分离出的内生细菌 *Pseudomonas* sp. ZC026 和内生真菌 *Nemania* sp. ZS042 在清除 ABTS 自由基方面表现出优异的抗氧化能力。ZC026 表现出最高的清除活性, IC_{50} 为(0.05±0.01) mg/mL,其次是 ZS042 [IC_{50} 为(0.19±0.03) mg/mL]。根据最新的研究, Tang 等^[15]分析了产黄酮内生真菌 CBL12 的 ABTS 自由基清除能力,其 IC_{50} 为(0.2±0.01) mg/mL。由此可见, ZC026 和 ZS042 的抗氧化能力比较突出,显示出巨大的探索潜力。综合黄酮类化合物含量和抗氧化性能, ZS042 具有较高的黄酮类化合物含量及较高的抗氧化活性,而且其含有和北桑寄生相同类型的黄酮类化合物,值得进一步研究优化提高其黄酮类化合物的产量。

抑菌圈直径大于 7 mm 判为有抑菌作用。大于 7 mm 小于 10 mm 判为钝敏;大于 10 mm 小于 20 mm 判为中敏;大于 20 mm 为高敏^[21]。在本研究中,内生真菌 *Phoma* sp. ZZ105 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑制作用。其中奇异变形杆菌和副伤寒沙门氏菌对 ZZ105 粗提物表现为钝敏,枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌对 ZZ105 粗提物表现为中敏。

考虑到植物物种的逐渐减少和生物多样性保护的重要性,从自然资源中收获植物材料的替代方法迫在眉睫。大多数药用天然产物在植

物中的含量较低, 难以提取和分离。与植物相比, 微生物具有培养周期更短、基因操作更容易等优点, 已成为研究二次代谢工程的成熟工具。此外, 微生物生物合成比化学合成更环保^[22]。总而言之, 内生真菌可用于生产大量有价值的黄酮类化合物, 并为提取这些化合物提供了新的途径, 而不仅仅是从植物中获取, 这将促进黄酮类化合物的开发和应用。

4 结论

本研究从珍贵药用植物北桑寄生中分离得到 4 株产黄酮内生菌, 其中有一株产黄酮内生细菌。通过形态学鉴定和分子生物学鉴定发现这 4 株菌分别属于 *Botryosphaeria* sp. (ZC020)、*Phoma* sp. (ZZ105)、*Nemania* sp. (ZS042) 和 *Pseudomonas* sp. (ZC026)。其中, 菌株 ZC020 和 ZS042 的黄酮类化合物产量较高, 菌株 ZC026 和 ZS042 具有很强的抗氧化活性, ZZ105 表现出良好的抗菌活性。这项工作弥补了对北桑寄生生产黄酮内生菌研究的缺乏, 为北桑寄生黄酮类化合物提供了新的来源。

目前寻找到的内生菌中黄酮类化合物的产量不足以满足市场需求, 我们将继续优化其发酵条件来促进黄酮类化合物的生产, 以期从这些来源中寻找更多新的化合物, 并探索这些内生菌是否可以加速北桑寄生生长或促进次生代谢物的积累。

REFERENCES

- [1] Ghimeray AK, Lee HW, Lee BD, Sharma P, Shim IS, Park CH. Effect of storage conditions and scarification on *in vitro* seed germination in *Loranthus tanakae* hosok[J]. Korean Journal of Plant Resources, 2014, 27(3): 263-270
- [2] Kim YK, Kim YS, Choi SU, Ryu SY. Isolation of flavonol rhamnosides from *Loranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines[J]. Archives of Pharmacal Research, 2004, 27(1): 44-47
- [3] 许宁宁, 白云娥, 薛强强, 张守元, 杨官娥. 北桑寄生化学成分系统预实验[J]. 中国药物与临床, 2012, 12(6): 762-763
- [4] Xu NN, Bai YE, Xue QQ, Zhang SY, Yang GE. Preliminary experiment of chemical composition system of *Loranthus tanakae* Franch. et Sav[J]. Chinese Remedies & Clinics, 2012, 12(6): 762-763 (in Chinese)
- [4] Zhou J, Ren K, Hou J, Chen J, Yang GE. A-rhamnrtin-3- α -rhamnoside exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated RAW_{264.7} cells by abrogating NF- κ B and activating the Nrf2 signaling pathway[J]. Molecular Medicine Reports, 2021, 24(5): 799
- [5] 王锡华, 李京东. 仰天山北桑寄生研究初报[J]. 山东科学, 2001, 14(2): 16-20
- [5] Wang XH, Li JD. The report of studies on *Loranthus tanakae* Franch. et Savat in Mountain Yangtian[J]. Shandong Science, 2001, 14(2): 16-20 (in Chinese)
- [6] Ababutain IM, Aldosary SK, Aljuraifani AA, Alghamdi AI, Alabdall AH, Al-Khaldi EM, Aldakeel SA, Almandil NB, AbdulAzeez S, Borgio JF. Identification and antibacterial characterization of endophytic fungi from *Artemisia sieberi*[J]. International Journal of Microbiology, 2021, 2021: 6651020
- [7] Zhao J, Shan T, Mou Y, Zhou L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi[J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2011, 11(2): 159-168
- [8] 程庭峰, 吕东晋, 王环, 陈世龙, 张辉, 林鹏程, 沈建伟, 邢睿, 周党卫. 麻花苧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, 2021. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210313.0843.004.html>
- [8] Cheng TF, Lü DJ, Wang H, Chen SL, Zhang H, Lin PC, Shen JW, Xing R, Zhou DW. Isolation, identification and antioxidant activity of endophytic fungi producing flavonoids from *Gentiana straminea* maxim[J]. Molecular Plant Breeding, 2021. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210313.0843.004.html> (in Chinese)
- [9] Seetharaman P, Gnanasekar S, Chandrasekaran R, Chandrakasan G, Kadarkarai M, Sivaperumal S. Isolation and characterization of anticancer flavone chrysin (5,7-dihydroxy flavone)-producing endophytic fungi from *Passiflora incarnata* L. leaves[J]. Annals of Microbiology, 2017, 67(4): 321-331
- [10] 卢丹丹, 郑鼎玉, 陈婕, 杨官娥. 北桑寄生内生真菌的分离及其次级代谢产物分析[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(3): 447-452
- [10] Lu DD, Zheng DY, Chen J, Yang GE. Isolation of

- endophytic fungi from *Loranthus tanakae* and analysis of its secondary metabolites[J]. *Natural Product Research and Development*, 2020, 32(3): 447-452 (in Chinese)
- [11] 赵庆云. 产黄酮银杏内生菌的分离、纯化与液态培养[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2007
- Zhao QY. Isolation and optimization of flavone-producing endophytes from *Ginkgo biloba* L.[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2007 (in Chinese)
- [12] 李艳宾, 张琴. 甘草内生真菌的分离及产黄酮类化合物菌株的筛选[J]. *天津农业科学*, 2012, 18(5): 15-18
- Li YB, Zhang Q. Isolation of licorice endophytic fungi and screening of flavones-producing strains[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2012, 18(5): 15-18 (in Chinese)
- [13] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- Wei JC. *Manual of Identifying Fungi*[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979 (in Chinese)
- [14] Georeg MG, Julia AB, Timothy GL. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition)*[M]. New York: Springer, 2004: 1-401
- [15] Tang ZZ, Wang YS, Yang JY, Xiao YR, Cai Y, Wan YJ, Chen H, Yao HP, Shan Z, Li CL, et al. Isolation and identification of flavonoid-producing endophytic fungi from medicinal plant *Conyza blinii* H.Lév that exhibit higher antioxidant and antibacterial activities[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8978
- [16] 卢丹丹. 北桑寄生内生真菌的分离鉴定及 *Alternaria alternata* 次级代谢产物研究[D]. 太原: 山西医科大学硕士学位论文, 2020
- Lu DD. Isolation, identification of endophytic fungi from *Loranthus tanakae* and study on secondary metabolites of *Alternaria alternata*[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Shanxi Medical University, 2020 (in Chinese)
- [17] 何亦男. 内生菌与植物的互作关系及对药用植物的影响[J]. *农业技术与装备*, 2021(6): 69-70
- He YN. Interaction between endophytes and plants and their effects on medicinal plants[J]. *Agricultural Technology & Equipment*, 2021(6): 69-70 (in Chinese)
- [18] Nisa H, Kamili AN, Nawchoo IA, Shafi S, Shameem N, Bandh SA. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 82: 50-59
- [19] 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
- [20] Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, 75(2): 199-212
- [21] 胡兴娟, 沈飏, 余辉, 张静, 滕跃, 徐君辉. 不同贝壳煨烧粉的杀菌及抑菌效果[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(24): 76-79
- Hu XJ, Shen B, Yu H, Zhang J, Teng Y, Xu JH. Bactericidal and inhibitory effect of different calcined shell powder[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(24): 76-79 (in Chinese)
- [22] Khare E, Mishra J, Arora NK. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2732-2743