

# 大孔树脂对内生真菌 *Berkleasium* sp. Dzf12 中 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 积累的促进作用

牟燕, 周开谊, 徐丹, 于瑞婷, 李京, 岳阳, 周立刚\*

中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193

**摘要:** 研究了3种大孔吸附树脂 D3520、DS-8 和 DM-301 对内生真菌 *Berkleasium* sp. Dzf12 中螺二萜类化合物 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 积累的影响。3种树脂均显著促进 Palmarumycin C<sub>12</sub> 产量的提高, 仅树脂 DM-301 同时有利于 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 产量的提高, 总产量中 81.3% ~ 95.8% 的 Palmarumycin C<sub>12</sub> 被大孔树脂吸附。当树脂 DM-301 以浓度 4.17% (g/mL) 于第 9 d 添加到内生真菌 Dzf12 培养液, 共培养 112 h 后, Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 的产量分别达到 122.72 mg/L 和 55.99 mg/L, 分别为对照 (2.19 mg/L 和 29.86 mg/L) 的 56.04 倍和 1.88 倍。结果表明, 在内生真菌 Dzf12 液体发酵培养中添加大孔吸附树脂能有效提高螺二萜类化合物 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 的产量。

**关键词:** 内生真菌; *Berkleasium* sp. Dzf12; 螺二萜类化合物; Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub>; 大孔树脂; 代谢调控

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.02.002

## Enhancement of Palmarumycins C<sub>12</sub> and C<sub>13</sub> Production by Macroporous Resins in Liquid Culture of Endophytic Fungus *Berkleasium* sp. Dzf12

MOU Yan, ZHOU Kai-yi, XU Dan, YU Rui-ting, LI Jing, YUE Yang, ZHOU Li-gang\*

College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** The effects of three macroporous adsorption resins D3520, DS-8 and DM-301 on the production of palmarumycins C<sub>12</sub> and C<sub>13</sub> in liquid culture of endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12 were investigated in this study. All the tested resins enhanced the production of palmarumycin C<sub>12</sub>. Only resin DM-301 enhanced the production of both palmarumycins C<sub>12</sub> and C<sub>13</sub>. 81.3% to 95.8% of palmarumycin C<sub>12</sub> was distributed in the resins. When resin DM-301 was applied to the medium at 4.17% (g/mL) on day 9, and then harvested after 112 h incubation, the maximal yields of palmarumycins C<sub>12</sub> and C<sub>13</sub> were obtained as 122.72 mg/L and 55.99 mg/L, which were 56.04-fold and 1.88-fold in comparison with those (2.19 mg/L and 29.86 mg/L) of the control, respectively. It can be an effective strategy for producing palmarumycins C<sub>12</sub> and C<sub>13</sub> in future large-scale culture of *Berkleasium* sp. Dzf12 by adding macroporous resins.

**Key words:** endophytic fungus; *Berkleasium* sp. Dzf12; spirobisanthralene; palmarumycins C<sub>12</sub> and C<sub>13</sub>; macroporous resins; metabolic regulation

植物内生真菌 (Plant endophytic fungi) 是历史中的某一或全部阶段生活在健康植物组织内部, 并不引起宿主植物出现明显病害症状的真菌<sup>[1]</sup>。内生真菌能产生结构类型多样的代谢产物, 具有抗菌、杀虫、抗病毒、细胞毒、抗肿瘤以及调节植物生长等多种生物活性, 其在农业、医药和食品等领域有着重要的应用前景<sup>[2,3]</sup>。螺二萜类化合物 (Spirobis-

naphthalenes) 是一类含有双环二氧代萜结构的真菌代谢产物, 具有多种生物活性<sup>[4]</sup>。我们研究小组前期从药用植物盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis*) 根状茎中分离到一株能产生螺二萜类化合物的内生真菌 *Berkleasium* sp. Dzf12<sup>[5,6]</sup>, 其中 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 是内生真菌 *Berkleasium* sp. Dzf12 中两个主要的螺二萜类化合物, 并能分泌到胞外<sup>[7,8]</sup>。Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 具有抗菌、杀藻、细胞毒、抑制磷脂酶 D 等多种生物活性<sup>[4,9]</sup>。为了加速 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 的开发与应用, 有必要提高内生真菌 *Berkleasium* sp. Dzf12 中 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 的

收稿日期: 2014-07-09 接受日期: 2014-09-03

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2011AA10A202); 国家自然科学基金 (31071710)

\* 通讯作者 Tel: 86-10-62731199; E-mail: lgzhou@cau.edu.cn

含量和产量。可采用改变渗透压、变温处理、添加前体物质、优化培养基条件、两相培养(如添加大孔吸附树脂)、多糖和寡糖诱导子、金属离子,以及共培养等多种物理、化学和生物等方法来提高真菌代谢产物的含量和产量<sup>[10-13]</sup>。对于分泌到胞外的代谢产物,在发酵液中添加大孔树脂吸附代谢产物,可以减少产物对真菌代谢的抑制、有利于产物的提取和制备、防止产物的降解、便于连续培养和降低生产成本等,从而有效促进代谢产品的生产,这方面已有许多成功的报道<sup>[14-17]</sup>。本研究采用3种大孔吸附树脂(D3520、DS-8和DM-301)分别添加到培养液中,研究其添加量和收获时间对Palmarumycins C<sub>12</sub>和C<sub>13</sub>产量积累的影响,为将来培养内生真菌*Berkleasmium* sp. Dzf12大规模生产Palmarumycins C<sub>12</sub>和C<sub>13</sub>提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

内生真菌*Berkleasmium* sp. Dzf12(GenBank登录号:EU543255)由本研究小组从盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis*)根状茎中分离得到,于4℃下保存在马铃薯-葡萄糖-琼脂(PDA)平板上<sup>[5]</sup>。从PDA试管斜面上挑取少许内生真菌Dzf12菌丝到PDA平板上活化15~20 d,然后挑取活化的菌丝接种于三角瓶中,每300 mL体积的三角瓶装PDB培养基100 mL,在25℃、150 rpm条件下悬浮培养3~4 d后得

到内生真菌Dzf12种子培养液。将制备好的种子培养液(3 mL)接种到装有30 mL发酵培养基,体积为125 mL的三角瓶中,在25℃、150 rpm条件下悬浮培养13 d后收获。培养基组成为:葡萄糖(40 g/L)、蛋白胨(10 g/L)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1.0 g/L)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.5 g/L)、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.05 g/L),培养基初始pH值调节至为6.5。

### 1.2 仪器与试剂

AL-104型电子分析天平(Mettler Toledo仪器上海有限公司);FLC-3型超净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);LS-B55L型立式压力蒸汽灭菌锅(江阴滨江医疗仪器厂)、DRP-9162型电热恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司)、DELTA-320型pH计(Mettler Toledo仪器上海有限公司)、RE50型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、TTL-30C型超纯水器(北京同泰科技发展有限公司)、LC-20AT高效液相色谱仪分析系统(日本岛津公司)等。

大孔吸附树脂D3520、DS-8和DM301购自天津海光化工有限公司,其物理和化学特性如表1。大孔树脂使用前用甲醇浸泡,超声处理30 min,然后过滤除去甲醇,用蒸馏水清洗三次,过滤后称量湿重(W<sub>1</sub>),65℃烘干至恒重(W<sub>2</sub>),水分含量(%)=100×(W<sub>1</sub>-W<sub>2</sub>)/W<sub>1</sub>。二氯甲烷,甲醇等试剂均为色谱纯或分析纯。

表1 供试大孔吸附树脂的物理化学特性

Table 1 Chemical and physical properties of the tested macroporous resins

大孔树脂 Macroporous resin	极性 Polarity	颗粒大小 Particle size (mm)	表面积 Surface area (m <sup>2</sup> /g)	平均孔径 Average pore diameter (nm)	水分含量 Moisture content (%)
D3520	Non-polar	0.30~1.25	480~520	8.5~9	71.56±0.18
DS-8	Weak-polar	0.30~1.25	500~550	12~14	63.55±0.10
DM-301	Middle-polar	0.30~1.25	≥330	14~17	65.48±1.32

注:除了树脂的含水量,其他数据由厂家提供。

Note: The information was provided by the manufacture except the moisture content.

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 大孔吸附树脂的预处理及添加

将3种大孔吸附树脂用无水乙醇在室温下浸泡24 h,用蒸馏水洗3~5次,至洗出液不显浑浊为止。然后用1 mol/L NaOH溶液浸泡12 h,蒸馏水洗至中性,再用1 mol/L HCl溶液浸泡12 h,用蒸馏水洗至中性<sup>[18,19]</sup>。分别称取已处理好的大孔吸附树脂0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00 g包装在一

层尼龙膜中,浸泡在超纯水中于121℃灭菌20 min,用滤纸吸去表面水分,于第9 d分别添加至培养瓶(内装30 mL培养液)中,树脂添加浓度分别为:1.67%、2.50%、3.33%、4.17%、5.00%、5.83%和6.67%(g/mL)。培养0、16、32、48、64、80、96、112、128、144 h后分别收获。对照为不添加大孔吸附树脂,每个处理重复3次。

### 1.3.2 菌丝生物量的测定

大孔吸附树脂与内生真菌 Dzf12 菌丝共培养至收获期后,采用减压抽滤的方法将菌丝和菌液分开,菌丝用蒸馏水冲洗三次。然后将菌丝置于 50 ~ 55 °C 的烘箱中烘干至恒重,称量得到菌丝的干重。

### 1.3.3 螺二萜类化合物的提取

菌丝中螺二萜类化合物的提取:将烘干至恒重的菌丝研磨成粉末,准确称取 50.0 mg 置于 15 mL 的玻璃试管中,向其加入氯仿-甲醇(1:9, v/v) 提取液,超声浸提 3 次,每次 60 min,合并提取液。过滤,滤液减压浓缩后,向其加入 1 mL 色谱纯甲醇,使其充分溶解,用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤,用于 HPLC 分析。

菌液中螺二萜类化合物的提取:取 3 mL 菌液,减压浓缩至干,向其加入氯仿-甲醇(1:9, v/v) 提取液,超声浸提 3 次,每次 60 min,合并提取液。其它步骤同上。

大孔吸附树脂中螺二萜类化合物的提取:用甲醇浸提大孔吸附树脂,共 3 次,合并提取液。过滤,将滤液减压浓缩至干,向其加入 30 mL 色谱纯甲醇,使其充分溶解,用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤,用于 HPLC 分析。

### 1.3.4 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 产量的定量分析

螺二萜类化合物 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 标准品由本实验室提供<sup>[7]</sup>。采用 HPLC 方法分析样品中 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 的产量<sup>[13]</sup>,分析条件为:Ultimate TM XB C<sub>18</sub> 反相柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Welch Materials, Inc., Ellicott, MD, USA);流动相为甲醇-水(50:50, v/v),流速为 1 mL/min,检测时间 20 min,柱温 40 °C;SPD-M20A 二极管阵列检测器,检测波长 226 nm,样品进样量为 10 μL,Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 的保留时间分别为 14.33 min 和 9.49 min。菌丝提取物的 HPLC 图谱见图 1。根据标准品,分别建立峰面积(Y)与目标产物浓度(X)的标准曲线,求得 Palmarumycin C<sub>12</sub> 的线性回归方程: $Y = 121295.5 X + 175236.8 (R = 0.9997)$ ;Palmarumycin C<sub>13</sub> 的线性回归方程: $Y = 121362.5 X + 256167.5 (R = 0.9997)$ 。

### 1.3.5 统计分析

所有的处理均设置三个重复,结果用平均值 ± 标准差表示,并通过 SAS version 8.2 软件进行显著性差异分析,当  $P \leq 0.05$  时,表明各处理间差异达到显著水平。

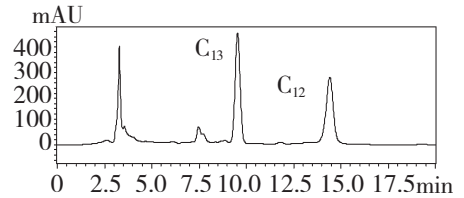


图 1 菌丝提取物的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of the mycelia extract

## 2 结果与分析

### 2.1 大孔树脂对内生真菌 Dzf12 菌丝生长、Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 产量的影响

在培养第 9 d,分别添加浓度为 5.00% (g/mL) 的大孔吸附树脂于内生真菌 Dzf12 发酵液中,共培养 96 h 后,检测 3 种大孔吸附树脂对内生真菌 Dzf12 菌丝生长、Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 分别在菌丝、菌液和树脂中产量积累的影响。结果(见表 2)表明,除大孔吸附树脂 DS-8 外,D3520 和 DM-301 对内生真菌 Dzf12 菌丝生长的影响不显著。3 种大孔吸附树脂均能够有效吸附螺二萜类化合物 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub>。3 种树脂能显著促进 Palmarumycin C<sub>12</sub> 产量的提高,且 81.3% ~ 95.8% 的 Palmarumycin C<sub>12</sub> 被大孔树脂吸附,树脂 DM-301 能够促使 Palmarumycin C<sub>12</sub> 的产量达到 109.02 mg/L,为对照(2.00 mg/L)的 54.51 倍。只有树脂 DM-301 能够促进 Palmarumycin C<sub>13</sub> 的产量提高,树脂 DS-8 和 D3520 对 Palmarumycin C<sub>13</sub> 产量的积累表现出抑制作用。

综合考虑 3 种大孔吸附树脂的吸附性能和对两种目标化合物(Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub>) 积累的影响,树脂 DM-301 表现出最好的促进效果,并用于后续的树脂添加量和共培养收获时间的研究。

### 2.2 树脂 DM-301 添加量对内生真菌 Dzf12 菌丝生长、Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 产量的影响

树脂 DM-301 分别以浓度为 1.67%、2.50%、3.33%、4.17%、5.00%、5.83% 和 6.67% 于第 9 d 添加至内生真菌 Dzf12 发酵液中,共培养 96 h 后,检测大孔吸附树脂 DM-301 不同添加量对内生真菌 Dzf12 菌丝生长、Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 积累的影响,其结果见图 2。树脂 DM-301 不同添加量对内生真菌 Dzf12 菌丝生长没有显著影响(图 2A)。根据图 2B,树脂 DM-301 促进 Palmarumycin C<sub>12</sub> 大量分泌

表2 大孔吸附树脂对内生真菌 *Dzf12* 菌丝生长和 Palmarumycins  $C_{12}$  和  $C_{13}$  产量的影响Table 2 Effects of macroporous resins on mycelia growth, palmarumycins  $C_{12}$  and  $C_{13}$  yield in liquid culture of *Berkleasium* sp. *Dzf12*

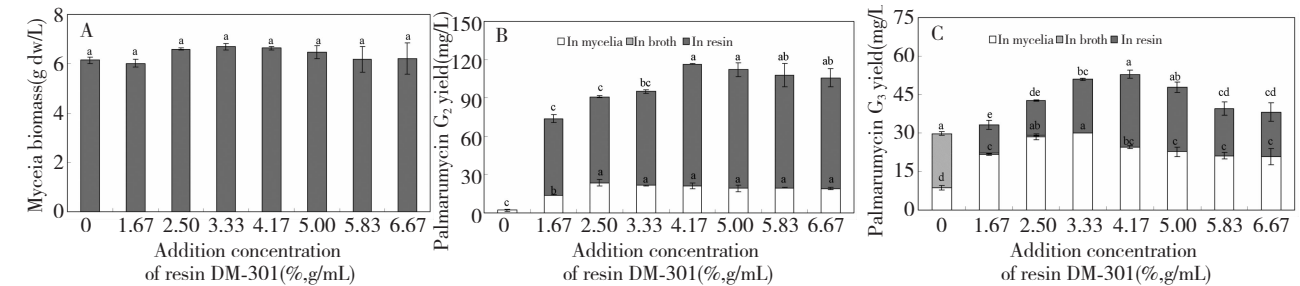
菌丝生物量或代谢物产量 Biomass or yield	大孔树脂 Macroporous resin			
	CK	D3520	DS-8	DM-301
Mycelia biomass (g dw/L)	6.47 ± 0.12 a	6.58 ± 0.37 a	5.21 ± 0.02 b	6.70 ± 0.05 a
Palmarumycin $C_{12}$ yield in mycelia (mg/L)	2.00 ± 0.46 d	9.20 ± 0.45 c	3.98 ± 0.11 b	18.38 ± 0.21 a
Palmarumycin $C_{12}$ yield in broth (mg/L)	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
Palmarumycin $C_{12}$ yield in resin (mg/L)	–	40.08 ± 1.85 b	89.58 ± 2.74 a	90.64 ± 1.32 a
Total yield of palmarumycin $C_{12}$ (mg/L)	2.00 ± 0.56 d	49.28 ± 2.38 c	93.55 ± 2.97 b	109.02 ± 2.59 a
Palmarumycin $C_{13}$ yield in mycelia (mg/L)	10.45 ± 0.46 c	14.62 ± 0.39 b	3.36 ± 0.53 d	23.27 ± 0.63 a
Palmarumycin $C_{13}$ yield in broth (mg/L)	20.28 ± 1.21 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Palmarumycin $C_{13}$ yield in resin (mg/L)	–	10.00 ± 1.29 c	16.44 ± 1.14 b	27.71 ± 1.18 a
Total yield of palmarumycin $C_{13}$ (mg/L)	30.73 ± 1.87 b	24.62 ± 2.53 c	19.80 ± 2.59 c	50.98 ± 1.67 a

注:表中数据为平均值 ± 标准差。CK 表示为培养基中不添加树脂。

Note: The values were expressed as means ± standard deviations ( $n = 3$ ). Different letters indicated significant differences among the treatments in each row at  $P = 0.05$  level. CK meant no resin was added in the medium.

到胞外,便被树脂 DM-301 吸附,其菌液中 Palmarumycin  $C_{12}$  的产量与对照相比显著降低。当添加树脂 DM-301 浓度为 4.17% 时,Palmarumycin  $C_{12}$  总产量达到最大值(116.53 mg/L),为对照(2.13 mg/L)的

54.71 倍;Palmarumycin  $C_{13}$  总产量也同样达到最大(52.84 mg/L),为对照(29.86 mg/L)的 1.77 倍(图 2C)。由此确定树脂 DM-301 的最佳添加浓度为 4.17%。

图2 树脂 DM-301 添加量对内生真菌 *Dzf12* 菌丝生长 (A)、Palmarumycins  $C_{12}$  (B) 和  $C_{13}$  (C) 产量的影响Fig. 2 Effects of resin DM-301 on mycelia growth (A), palmarumycins  $C_{12}$  (B) and  $C_{13}$  (C) yield in liquid culture of *Berkleasium* sp. *Dzf12*

Note: Different letters indicated significant differences among the data of each situation at  $P = 0.05$  level. The error bars are standard deviations,  $n = 3$ .

### 2.3 树脂 DM-301 收获时间对内生真菌 *Dzf12* 菌丝生长、Palmarumycins $C_{12}$ 和 $C_{13}$ 产量的影响

将无菌处理的大孔吸附树脂 DM-301 添加至内生真菌 *Dzf12* 发酵培养液中,研究收获时间(即共培养时间)对菌丝生长、Palmarumycins  $C_{12}$  和  $C_{13}$  总产量积累的影响,结果如图 3 所示。菌丝生长量随着共培养时间延长并没有出现显著变化。而 Palmarumycins  $C_{12}$  和  $C_{13}$  的总产量随着共培养时间的增加而增加,然后逐渐平稳。当树脂 DM-301 于第 9 d 添加,添加量为 4.17% (g/mL),共培养 112 h 后,Palmarumycins  $C_{12}$  和  $C_{13}$  的产量(122.72 mg/L 和 55.99

mg/L) 均达到最大值,分别为对照(2.19 mg/L 和 29.86 mg/L)的 56.04 倍和 1.88 倍。由此确定添加树脂 DM-301 后最佳收获时间为共培养 112 h。

## 3 结论

本研究比较了 3 种大孔吸附树脂(D3520、DS-8 和 DM-301)对内生真菌 *Berkleasium* sp. *Dzf12* 菌丝生长、螺二萜类化合物 Palmarumycins  $C_{12}$  和  $C_{13}$  产量积累的影响。3 种树脂均显著促进 Palmarumycin  $C_{12}$  产量的提高,且 81.3% ~ 95.8% 的 Palmarumycin  $C_{12}$  被大孔树脂吸附。只有树脂 DM-301 同时有利于

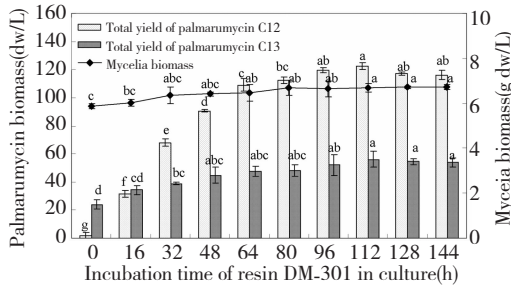


图3 添加树脂 DM-301 后收获时间对内生真菌 Dzf12 菌丝生长和 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 产量的影响

Fig. 3 Effects of incubation time of resin DM-301 on mycelia growth, palmarumycins C<sub>12</sub> and C<sub>13</sub> yield in liquid culture of *Berkleasium* sp. Dzf12

Note: Different letters indicate significant differences among the data of each situation at  $P = 0.05$  level. The error bars are standard deviations,  $n = 3$ .

两种螺二萜类化合物 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 产量的提高。当树脂 DM-301 以浓度 4.17% (g/mL) 于第 9 d 添加、共培养 112 h 后, Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 的产量分别达到 122.72 mg/L 和 55.99 mg/L, 分别为对照 (2.19 mg/L 和 29.86 mg/L) 的 56.04 倍和 1.88 倍。添加树脂 DM-301 对 Palmarumycin C<sub>13</sub> 积累有一定的促进作用, 但远不如对 Palmarumycin C<sub>12</sub> 积累的促进作用, 树脂 D3520 和 DS-8 对 Palmarumycin C<sub>13</sub> 的积累还有一定的抑制作用 (表 1), 由于 Palmarumycin C<sub>12</sub> 是 Palmarumycin C<sub>13</sub> 的生物合成的直接前体<sup>[20,21]</sup>, 添加大孔树脂后, 造成了 Palmarumycin C<sub>12</sub> 大量分泌到胞外, 从而使 Palmarumycin C<sub>13</sub> 产量减少, 这一现象尚需进一步研究。在真菌发酵培养中, 代谢产物常常能分泌到胞外, 典型的例子有内生真菌芬芳镰刀菌 (*Fusarium redolens*) Dzf2 发酵培养生产白僵菌素 (Beauvericin)<sup>[15]</sup>, 灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 发酵培养生产灵芝酸 (Ganoderic acids)<sup>[22]</sup>。本研究涉及的内生真菌 *Berkleasium* sp. Dzf12 代谢产物 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 能分泌到胞外, 为添加大孔吸附树脂吸附胞外的代谢产物, 降低胞外产物浓度, 减少产物抑制创造了条件, 最终有效提高 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 的产量。

不同大孔吸附树脂对内生真菌 Dzf12 中 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 产量积累的影响存在显著差异, 可能与大孔吸附树脂的极性、表面积、孔径大小、螺二萜类化合物极性等因素相关。本研究所筛选的大孔树脂种类有限, 有必要扩大树脂的类型, 筛选到更

为合适的树脂。另外, 所筛选的大孔吸附树脂 (如树脂 DM-301) 对螺二萜类化合物的吸附和解吸动力学有待进一步研究。本论文结果为今后大规模培养内生真菌 *Berkleasium* sp. Dzf12 生产 Palmarumycins C<sub>12</sub> 和 C<sub>13</sub> 提供了依据。

#### 参考文献

- 1 Porras-Alfaro A, Bayman P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu Rev Phytopathol*, 2011, 49:291-315.
- 2 Kaul S, Gupta S, Ahmed M, et al. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochem Rev*, 2012, 11:487-505.
- 3 Zhao J, Shan T, Mou Y, et al. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini-Rev Med Chem*, 2011, 11:159-168.
- 4 Zhou L, Zhao J, Shan T, et al. Spirobisnaphthalenes from fungi and their biological activities. *Mini-Rev Med Chem*, 2010, 10:977-989.
- 5 Zhang RF (张瑞芬), Li PQ (李培琴), Zhao JL (赵江林), et al. Endophytic fungi from *Dioscorea zingiberensis* and their effects on the growth and diosgenin production of the host plant cultures. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22:11-15.
- 6 Cai X, Shan T, Li P, et al. Spirobisnaphthalenes from the endophytic fungus Dzf12 of *Dioscorea zingiberensis* and their antimicrobial activities. *Nat Prod Commun*, 2009, 4:1469-1472.
- 7 Li Y, Shan T, Mou Y, et al. Enhancement of palmarumycins C<sub>12</sub> and C<sub>13</sub> production in liquid culture of the endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12 by oligosaccharides from its host plant *Dioscorea zingiberensis*. *Molecules*, 2012, 17:3761-3773.
- 8 Li Y, Li P, Mou Y, et al. Enhancement of diepoxin ζ production in liquid culture of endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12 by polysaccharides from its host plant *Dioscorea zingiberensis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28:1407-1413.
- 9 Cai YS, Guo YW, Krohn K. Structure, bioactivities, biosynthetic relationships and chemical synthesis of the spirodioxynaphthalenes. *Nat Prod Rep*, 2010, 27:1840-1870.
- 10 Yu JH, Keller N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 2005, 43:437-458.
- 11 Shwab EK, Keller NP. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycol Res*, 2008, 112:225-230.