

产黄酮银杏内生真菌的分离与鉴定

何福林^{1,2,3}, 陈小明^{1,2,3,4}, 张 瑞¹, 吴 月¹, 袁志辉^{1,2,3*}¹湖南科技学院化学与生物工程学院; ²湖南省银杏工程技术研究中心;³湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室; ⁴湖南省恒伟药业股份有限公司, 永州 425199

摘要:本研究利用组织块培养法从健康的银杏根、茎中分离得到 116 株内生真菌。通过显色反应、高效液相色谱(HPLC)等方法对内生真菌的代谢产物进行分析,最终筛选出 2 株能够产黄酮的内生真菌,利用分光光度法测定其发酵液中总黄酮产量均达到 20 mg/L 以上。形态学特征和真菌 rDNA 间隔序列(Internal Transcribed Spacer, ITS)的系统进化分析结果表明两株菌分别属于青霉属和毛霉属,其中青霉属为产黄酮银杏内生真菌的首次报道。本研究为利用微生物发酵生产黄酮类化合物奠定了良好的基础。

关键词:银杏;内生真菌;黄酮类化合物;鉴定

中图分类号:Q939.95

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.7.011

Isolation and Identification of Two Flavonoid-Producing Endophytic Fungi from *Ginkgo biloba* Linn.HE Fu-lin^{1,2,3}, CHEN Xiao-ming^{1,2,3,4}, ZHANG Rui¹, WU Yue¹, YUAN Zhi-hui^{1,2,3*}¹College of Chemistry and Bioengineering in Hunan University of Science and Engineering;²Hunan Provincial Engineering Research Center for *Ginkgo biloba*;³Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources in Hunan South;⁴Hunan Hengwei Pharmaceutical Co., LTD, Yongzhou 425199, China

Abstract: Many studies have shown that endophytes can co-evolution with host, and can produce similar or identical physiologically active substances as host. Flavonoid is one of most active compounds in extracts of *Ginkgo biloba*. In the present study, the method of tissue culturing was used to isolate endophytic fungi from health ginkgo roots and stems. After repeated separation and purification, 116 *Ginkgo* endophytes were isolated. Metabolites of these fungi was preliminarily analyzed by color reaction and high performance liquid chromatography (HPLC), and two flavonoids producing endophytes were finally screened out. The production of flavonoids by these two strains were all more than 20 mg/L. These two endophytic fungi strain were identified as *Mucor* spp. and *Penicillium* spp. by morphology characteristics and Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences analysis, and *Penicillium* spp. was the first report in the flavonoid producing endophytic fungus from *G. biloba*. This study laid a good foundation for the production of flavonoids by microbial fermentation, and these two strains can be induced to improve the production of flavonoids by mutation breeding before they are used to produce flavonoids by fermentation.

Key words: *Ginkgo biloba*; endophytes; flavones; identification

植物内生微生物是指在植物组织内部度过其全部或部分生命周期的所有微生物^[1,2]。内生微生物对药用植物具有重要的诱导作用^[3],能转化植物次生代谢产物^[4],可促进植物有效成分的合成和积

累^[5]。且部分植物内生微生物可体外培养,通过基因工程或工业发酵手段可大量获得结构新颖、活性独特的次生物质,使得内生微生物成为活性天然产物资源开发和研究的热点之一^[6]。

银杏是一种古老的药用植物,银杏提取物(Extracts of *Ginkgo biloba*, EGb)的主要有效成分是黄酮类化合物和萜内酯类化合物。现有研究表明,银杏内生微生物具有合成与宿主植物相同或相似的活性成分的功能。王梅霞从银杏叶片中分离到一株产黄

收稿日期:2017-03-27 接受日期:2017-05-15

基金项目:湖南省教育厅科研项目(15C0585);湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室开放基金项目(XNZW15C11);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(2016-283)

* 通信作者 Tel:86-746-6381164; E-mail:zh_h_yuan@126.com

酮类化合物的内生真菌,经鉴定为刺盘孢属^[7];易大为从银杏树皮中分离出一株能够产银杏内酯的镰孢菌属^[8]。以上两项研究为寻找开发银杏黄酮及内酯类物质的新途径提供了思路。在此基础上,韩晓丽、梅宇飞、邓振山、张海龙、张洋等^[9-13]等都从银杏中分离出多株产黄酮类物质的内生真菌,包括镰孢菌属、毛霉属、炭疽菌属、单端孢霉属等,但黄酮类物质的产量较低。本研究以银杏为研究对象,利用组织块分离法从根、茎等部位分离内生真菌,并从中筛选出黄酮类物质产量较高的菌株,为后期利用微生物发酵生产黄酮类化合物奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

银杏组织材料取自湖南省永州市双牌县桐子坳村,树龄约为800年的银杏根、茎组织。样品放入经灭菌的广口瓶,在24 h内带入实验室进行处理。内生真菌分离采用PDA培养基和马丁氏(MMN)培养基,用前按30 mg/L加入链霉素。发酵采用不加琼脂的PDA培养液,即PDB培养液。芦丁、槲皮素和山奈酚标准品购自Sigma公司;乙醇、次氯酸钠、硼酸、NaOH、三氯化铝、KNO₃、K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、NaCl、FeSO₄·7H₂O、盐酸、链霉素、葡萄糖、琼脂等均为国产分析纯或色谱纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 银杏组织的表面消毒

参考席晓圆等的方法^[14],略作修改。分别选取新鲜的银杏根、茎,用清水将其洗净后,流水冲洗0.5 h,放入装有蒸馏水的烧杯中。

洗净的材料各取5 g,按照下面的方法进行表面消毒:

1.2.1.1 银杏根的无菌处理:首先用体积分数为75%酒精漂洗1 min,无菌水冲洗3次;再用0.1%的次氯酸钠漂洗1.5 min,无菌水冲洗3次;最后一次洗液置于灭菌的小烧杯中。

1.2.1.2 银杏茎的无菌处理:首先用体积分数为75%酒精漂洗1 min,无菌水冲洗3次;再用0.1%的次氯酸钠漂洗0.5 min,无菌水冲洗3次;最后一次洗液置于灭菌的小烧杯中。

表面消毒后的材料在空白PDA培养基上滚动数圈,将培养基置于37℃培养箱中2 d,检测消毒效果。

1.2.2 银杏内生真菌的分离、纯化和保藏

经无菌处理后,样品表面用无菌滤纸吸干,在超净工作台内,用灭菌的剪刀将茎剪成约0.5 cm长小段;根剪成大小适中的组织块。每个PDA和MMN平板放置4~5块组织块,尽量用切口面置于培养基上。最后将无菌处理过程中,样品的最后一次清洗液涂于培养基上培养,作为对照,分别进行编号记录。操作完成后置于28℃恒温培养箱中进行培养,每天观察并记录内生微生物生长情况。

待样品表面或边缘长出菌丝后,在超净工作台用无菌剪刀或挑针挑取菌丝转接到新的对应培养基上,进行编号。继续置于28℃恒温箱中进行闭光培养,并每天观察菌落生长情况。

待接种的菌体萌发后,用菌丝顶端分离法对分离到的内生真菌进行多次传代直至获得典型的纯化菌落。将已纯化的菌株分别转移置固体斜面培养基上,每株保存两支斜面,28℃恒温箱中培养,待菌株生长旺盛时,取出置4℃保藏。1~2月后转入新的斜面。

1.2.3 检测样品的制备

用打孔器在长满菌丝的培养基上打孔,将其接入装有100 mL PDA培养液的250 mL三角瓶中,每瓶接入3个菌丝块;置于恒温震荡培养箱中,温度28℃,120 rpm发酵培养5~7 d,3层纱布过滤分离菌体和发酵液。

取过滤后的发酵液50 mL,加入氯仿:甲醇(V:V=10:1)溶液20 mL进行萃取,萃取液在45℃条件下旋转蒸发至近干,加入2 mL甲醇溶解固体物质,并用0.22 μm滤膜过滤待用;菌丝体在55℃烘箱中烘干后取2 g于研钵中,加入10 mL 50%甲醇溶液充分研磨,加入氯仿:甲醇(V:V=10:1)溶液20 mL进行萃取,萃取液在45℃条件下旋转蒸发干燥,加入2 mL甲醇溶解固体物质,并用0.22 μm滤膜过滤待用。

1.2.4 样品中黄酮类物质的测定

1.2.4.1 显色反应

参考《黄酮体化合物鉴定手册》^[15]中的显色法对内生真菌所产黄酮类化合物进行初步鉴定。①三氯化铝(AlCl₃)反应:取样品40 μL点于滤纸上,喷洒质量分数为1%的AlCl₃乙醇溶液,吹干后,放在紫外灯下观察有无黄绿色荧光;②盐酸-镁粉(HCl-Mg)反应:取1 mL样品置于试管中,加入适量镁粉,然后滴加浓盐酸数滴,看有无颜色变化;③浓氨水反

应:取样品 40 μL 点于滤纸上,放在浓氨水上熏蒸 1-10 min,立即放在紫外灯下观察;④三氯化铁(FeCl_3)反应:取 1 mL 样品置于试管中,加入 0.02 g/mL 的 FeCl_3 溶液数滴,看有无酒红色出现;⑤氢氧化钠(NaOH)反应:取 1 mL 样品置于试管中,加入质量分数为 4% 的 NaOH 溶液数滴,看有无黄色出现。⑥硼酸反应:取样品 1 mL 置于试管中,加入质量分数为 2% 的硼酸溶液数滴,置于振荡器上摇匀,看有无棕黄色出现。

1.2.4.2 高效液相色谱(HPLC)

将颜色反应为阳性的样品进行 HPLC 分析,色谱条件参考韩晓丽等的方法^[9]。色谱柱 C_{18} 柱(25 cm \times 4 mm),柱温为 50 $^\circ\text{C}$;检测波长 360 nm,流动相为甲醇:水:磷酸(45:55:0.1, V/V/V),流速为 0.8 mL/min;进样量 20 μL 。对照为芦丁、槲皮素和山奈酚标准品(购自 Sigma 公司)。

1.2.4.3 样品中黄酮类物质总量的测定

采用氯化铝比色法测定样品中总黄酮类化合物的含量^[12]。吸取样品溶液 1.0 mL,加入质量分数为 1% 的 AlCl_3 水溶液至 10 mL,摇匀;10 min 后在 UV-5200 紫外分光光度仪上测定 420 nm 处的吸光度,重复 3 次取平均值,以质量分数为 1% 的 AlCl_3 为对照。计算公式:总黄酮苷 = $A \times 320 \times V_{\text{总}} \div V$,式中为 $V_{\text{总}}$ 样品溶液总体积, V 为吸取样品体积,320 为系数,即吸光度值为 1.0 时,相当于总黄酮苷含量 320 μg 。

1.2.5 产黄酮银杏内生真菌的鉴定

对经显色反应和 HPLC 分析后基本确定产黄酮类物质的银杏内生真菌菌株采用形态学特征和 ITS

序列分析方法进行鉴定。

形态学特征分析:挑取纯化的菌株尖端菌丝接种于 PDA 培养基上,培养一段时间后观察菌落的大小,颜色等形态特征;然后采用插片法进行菌丝体制片,在显微镜下观察菌丝体和分生孢子的形态等特征,根据《真菌鉴定手册》^[16]进行初步鉴定。

ITS 序列分析:采用 CTAB 法提取目标菌株的基因组 DNA^[17]。ITS 序列特异性引物^[18](北京六合华大基因科技有限公司合成)为 ITS1:5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4:5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3'。PCR 反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^\circ\text{C}$ 变性 1 min,55 $^\circ\text{C}$ 退火 0.5 min,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,25 个循环,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^\circ\text{C}$ 保存。扩增片段与 pMD19-T 载体(TaKaRa,大连)连接并转化至大肠杆菌感受态细胞,阳性克隆经菌落 PCR 鉴定正确后,交由北京六合华大基因科技有限公司测序。测序结果提交 NCBI 进行序列比对分析,选取同源性最高的前几条序列,利用 MEGA7.0 软件^[19],基于邻接法(Neighbor Joining Method)构建系统发育树,bootstrap 检验值 $\geq 50\%$,1000 次重复。

2 结果与分析

2.1 产黄酮内生真菌的筛选

从银杏根、茎组织中共分离出内生真菌 116 株,其中根茎中分别为 76 和 40 株。显色反应结果显示,其中有 2 株 Gbph052 和 Gbph101 的发酵液 6 种反应均为阳性(表 1),表明其中可能含有黄酮类物质。

表 1 银杏内生真菌发酵产物的显色结果

Table 1 Chromogenic results of fermentation products by endophytic fungi

菌株编号 Strain No.	显色反应 Chromogenic reactions					
	AlCl_3 反应 AlCl_3 reaction	HCl-Mg 反应 HCl-Mg reaction	浓氨水反应 Strong aqua ammonia	FeCl_3 反应 FeCl_3 reaction	NaOH 反应 NaOH reaction	硼酸反应 Boric acid
Gbph052	+	++	+	+	++	+++
Gbph101	+	+	+	+++	+	++

注:其中“-”表示无颜色变化,“+”、“++”、“+++”用以表示颜色深浅,“+”颜色最浅。

Note:“-” indicated no color changes;“+”,“++”,“+++” indicated different degrees of color changes. “+” indicated the lightest color changes.

之后进一步采用 HPLC 对样品进行分析,结果显示,菌株 Gbph052 的发酵液和菌丝提取物中含有与芦丁和山奈酚标准品相对应的色谱峰(图 1、2A、2B),表明菌株 Gbph052 可产生芦丁和山奈酚两种黄酮苷元,并且大部分存在于细胞之外。菌株 Gb-

ph101 的发酵液和菌丝提取物中有与芦丁和槲皮素相对应的色谱峰,表明菌株 Gbph101 可产生芦丁和槲皮素两种黄酮苷元,其中芦丁在菌体内外均有存在,而槲皮素则大部分分泌到菌体细胞之外(图 1、2C、2D)。除此之外,HPLC 色谱图上还存在对应 3

种标准品之外的吸收峰,说明发酵液和菌体中还含有其它种类的苷元。紫外分光光度法测定样品中黄酮类物质总量结果表明,菌株 Gbph101 的发酵液和菌丝提取物中黄酮类物质总量分别为 $(18.50 \pm$

$1.20)$ mg/L 和 (2.50 ± 0.30) mg/L, 菌株 Gbph101 的发酵液和菌丝提取物中黄酮类物质总量分别为 (12.80 ± 0.90) mg/L 和 (9.70 ± 0.70) mg/L。

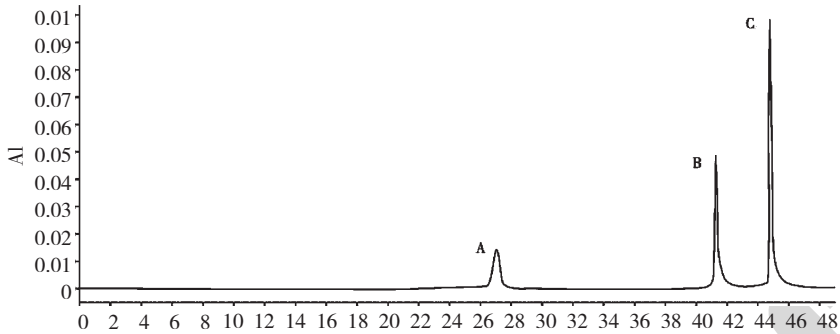


图1 黄酮类物质标准品的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of three flavonoids standards

A: 芦丁 Rutin; B: 槲皮素 Quercetin; C: 山奈酚 Campherol

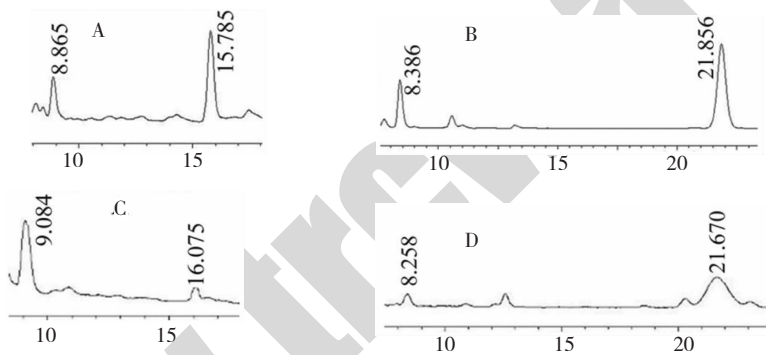


图2 银杏内生真菌产黄酮类物质的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of the flavonoids produced by *G. biloba* endophytic fungi

注: A: 菌株 Gbph101 发酵液提取物; B: 菌株 Gbph052 发酵液提取物; C: 菌株 Gbph101 菌丝提取物; D: 菌株 Gbph052 菌丝提取物

Note: A: Gbph101 fermentation liquid extract; B: Gbph052 fermentation liquid extract; C: Gbph101 mycelium extract; D: Gbph052 mycelium extract

2.2 产黄酮类物质菌株的鉴定

菌株 Gbph052 菌落及其分生孢子呈现青霉属真菌典型特征(图3)。在 28 °C 于 PDA 平板上菌落有纤毛状边缘;菌丝层呈绒状,初期为白色,平坦;菌落老熟时中心灰绿色,边缘白色至浅黄色;菌落背面呈橙黄色。气生菌丝的生长方式是菌丝顶端分支往外生长,菌丝有隔,无足细胞;分生孢子青绿色呈球形,分生孢子梗的顶端不膨大,孢子着生于指状分枝的小梗上,小梗顶端的分生孢子以链状簇拥成扫帚形。其 ITS 序列通过 BLAST 搜索后获取相关种属的 ITS 序列,用 MEGA 6.0 软件按邻接法构建系统进化树。结果显示,菌株 Gbph052 与 *Penicillium chrysogenum* G6 的序列最大相似性达到 99.5% (图

4)。综合菌落、菌体形态和 ITS 序列分析信息,将该菌株鉴定为青霉属。

菌株 Gbph101 在 PDA 培养基上生长较快,菌落形状多样,初期为疏松白色菌丝,中后期菌丝逐渐生长密集,颜色渐变为浅黄色,产生孢子后菌落整体呈浅黄至褐色茸毛状,菌落背面呈黄色;菌丝无隔,有分枝;菌丝顶生孢子囊,无囊托,含大量孢子,孢子呈椭圆形(图5)。其 ITS 序列通过 BLAST 搜索后获取相关种属的 ITS 序列,用 MEGA 6.0 软件按邻接法构建系统进化树。结果显示,菌株 Gbph101 与 *Mucor circinelloides* FSU6157 的序列最大相似性达到 99% (图6)。综合菌落、菌体形态和 ITS 序列分析信息,将该菌株鉴定为毛霉属。

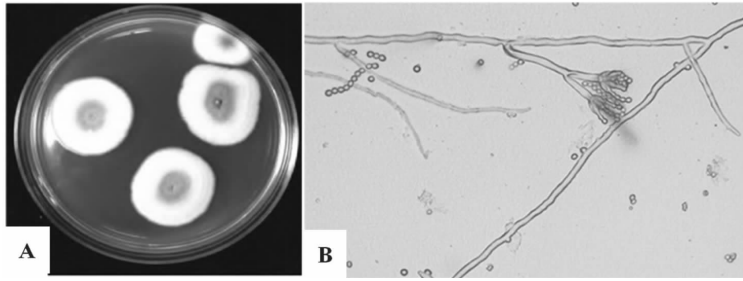


图3 菌株 Gbph052 菌落及其分生孢子形态(放大倍数:1000倍)

Fig. 3 Colonies and conidiophore characters of strain Gbph052

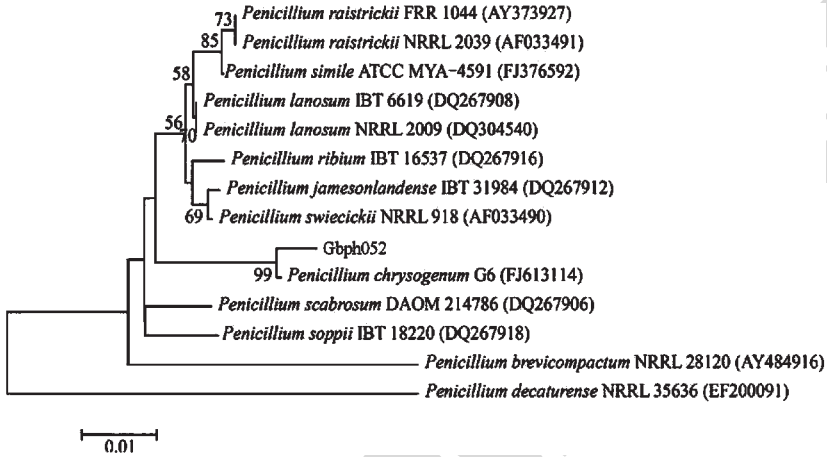


图4 基于 ITS 序列的菌株 Gbph052 与其相关种系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *G. biloba* endophytic fungi strain Gbph052

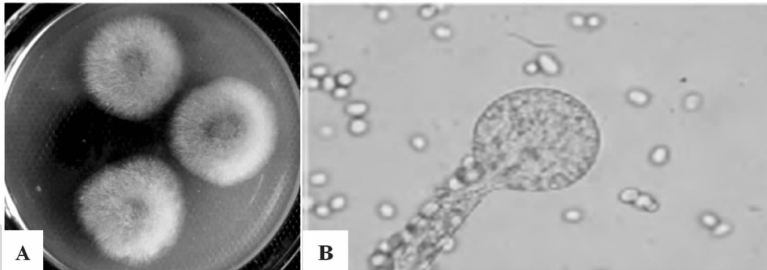


图5 菌株 Gbph101 菌落及其分生孢子形态(放大倍数:1000倍)

Fig. 5 Colonies and conidiophore characters of strain Gbph101

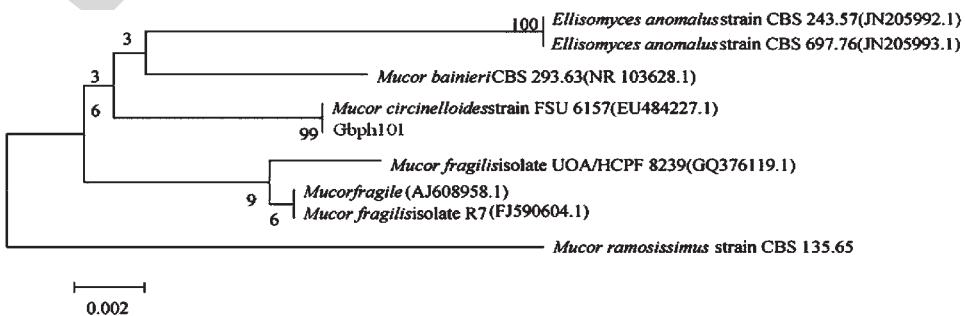


图6 基于 ITS 序列的菌株 Gbph101 与其相关种系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of *G. biloba* endophytic fungi strain Gbph101

3 讨论与结论

据现有报道, 珙桐^[20]、喜树^[21]、绶草^[22]、银杏^[7-13]等各种植物中能够产生黄酮类物质的内生真菌包括镰孢属^[9,12]、曲霉属^[23]、刺盘孢属^[7]、毛霉属^[12]、荃点霉属^[24]和青霉属^[22]等, 产黄酮能力各不相同。如韩晓丽等^[9]从银杏中分离出的镰孢属内生真菌产黄酮能力为 6.20 mg/L, Qiu 等^[20]分离的曲霉属银杏内生真菌的发酵液中黄酮产量达到 12.50 mg/L, 而张海龙等^[12]从银杏分离到的镰孢属和毛霉属内生真菌的黄酮产量则高达 14.50 mg/L 和 21.10 mg/L。本研究从银杏根、茎组织中分离到内生真菌 116 株。通过显色反应和 HPLC 分析, 从中筛选出产黄酮内生真菌 2 株, 即菌株 Gbph052 和菌株 Gbph101, 形态学和分子生物学鉴定结果显示分别为青霉属和毛霉属真菌, 其中菌株 Gbph052 为首次从银杏组织中分离筛选到的能够产黄酮类物质青霉属菌株。利用紫外分光光度法测定两株菌的总黄酮产量, 结果显示菌株 Gbph052 和菌株 Gbph101 的发酵液和菌丝体中总黄酮量分别达到 21.0 mg/L 和 22.5 mg/L, 因此可作为微生物发酵生产黄酮类物质的候选菌株, 具有较好的潜在科研和应用价值。

利用内生真菌生产药用活性成分才刚刚起步, 许多基础性工作有待深入研究, 还有若干关键问题有待解决。就银杏内生微生物而言, 虽然本研究筛选到的两株产黄酮内生真菌相对来说有较高的产量, 但目前发现的内生微生物极少达到工业化生产的标准。所以, 应继续扩大内生微生物分离的数量和种类, 筛选产量更高且植物体外传代产量稳定的菌株, 对分离得到菌株进行生理特性研究和菌体内黄酮代谢途径的研究, 并通过诱变选种、生长培养基设计、发酵条件和工艺优化等方法 and 手段, 一方面提高微生物发酵黄酮类物质的产量, 另一方面提高内生微生物植物体外传代的稳定性, 使利用微生物发酵生产黄酮类物质成为可能。

参考文献

- 1 Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, *et al.* The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol R*, 2015, 79:293-320.
- 2 Yuan ZH(袁志辉), Jiang QF(蒋琼凤), He FL(何福林). Review on the research of plant endophytic microbes and

- dark matter's exploring techniques. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:1156-1163.
- 3 Yan JF, Broughton SJ, Yang SL, *et al.* Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? *Fung Ecol*, 2015, 13:53-59.
- 4 Liu Y(刘颖), Wei XY(魏希颖). The microbial transformation of plant endophyte on plant secondary metabolites. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:300-303.
- 5 Wang XH(王兴红). Advances in studies on endophytic fungi and natural products. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), 2007, 38:140-143.
- 6 Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol R*, 2003, 67:491-502.
- 7 Wang MX(王梅霞), Chen SL(陈双林), Huo J(霍娟). A preliminary study on the isolation, identification and media of an endophytic fungus producing flavones. *J Nanjing Univ* (南京师范大学学报), 2003, 26:106-108.
- 8 Yi DW(易大为). Studies on the active components in the metabolites of endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University(沈阳药科大学), MSc. 2003.
- 9 Han XL(韩晓丽), Kang JC(康冀川), He J(何劲), *et al.* Isolation and identification of endophytic fungi of flavonoid-producing *Ginkgo biloba*. *J Fung Res* (菌物研究), 2008, 6(1):40-45.
- 10 Mei YF(梅宇飞), Xiong SS(熊尚森), Yu HZ(余海忠). Preliminary screening of a flavonoid-producing endophytic fungus in *Ginkgo biloba* L. *Amino Acids Biotic Res* (氨基酸和生物资源), 2012, 34(4):20-24.
- 11 Deng ZS(邓振山), Li J(李军), Su YJ(苏永杰), *et al.* Screening of an endophytic bacteria producing *Ginkgo biloba* L. flavonoids. *J Anhui Agr Sci* (安徽农业科学), 2011, 39:5735-5737.
- 12 Zhang HL(张海龙), Li SC(李善春), Lu WH(卢维浩), *et al.* Distribution and identification of flavonoid-producing endophytic fungi in *Ginkgo biloba* L. *Soil*, 2015, 47:135-141.
- 13 Zhang Y(张洋). A Study on the Separation and Flavonoids-producing of *Ginkgo biloba* L. Endophytic Fungi. Hefei: Anhui University(安徽大学), MSc. 2015.
- 14 Xi XY(席晓圆), Zhao SY(赵盛英), Zhang P(张鹏), *et al.* Isolation and identification of taxol-producing endophytic fungus N-15. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:1219-1222.
- 15 Shanghai Institute of Materia Medica Chinese Academy of Sciences(中国科学院上海药物研究所植物化学研究室). Flavonoids Identification Manual(黄酮体化合物鉴定手

- 册). Beijing: Science press, 1981; 394-601.
- 16 Wei JC(魏景超). Fungal Identification Manual(真菌鉴定手册). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1982. 1-780.
 - 17 Maropola MK, Ramond JB, Trindade M. Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). *J Microbiol Methods*, 2015, 112: 104-117.
 - 18 González-Teuber M, Vilo C, Bascuñán-Godoy L. Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. *Genom Data*, 2017, 11: 109-112.
 - 19 Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33: 1870-1874.
 - 20 He YX(何映霞), Ran XQ(冉雪琴), Wang JF(王嘉福). Isolation and identification of endophytic fungi strains producing flavonoids from *Davidia involucrate* Baill. *Guizhou Agric Sci(贵州农业科学)*, 2008, 36(3): 3-6.
 - 21 Yan X(颜霞), Li XY(李希尧), Li WG(李伟国). Isolation of endophytes from *Camptotheca acuminata* Decne and the Pilot study of Metabolites. *Acta Agricul Boreali-occidentalis Sin(西北农业学报)*, 2008, 17: 315-318.
 - 22 Liu ZY(刘紫英). Endophytic fungi producing flavonoids from *Spiranthes sinensis*. *Mycosystema(菌物学报)*, 2011, 30: 133-137.
 - 23 Qiu M, Xie RS, Shi Y, et al. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Annals Microbiol*, 2010, 60: 143-150.
 - 24 Qian L(钱龙), Yang MF(杨明飞), Ran XQ(冉雪琴), et al. Isolation and identification of endophytic fungi producing flavonoids from *Ginkgo biloba* L. *J Mount Agric Biol(山地农业生物学报)*, 2007, 26: 305-310.
-
- (上接第 1090 页)
- 12 Jin C(金成), Wu XM(邬晓敏), Chen GY(陈高阳). Clinical application of Jinshuibao capsule. *Capit Med(首都医药)*, 2005, 12: 42-43.
 - 13 Ministry of Health of the People's Republic of China(中华人民共和国卫生部). Regulations on the declaration and review of fungal health food (for trial). *Chin J Food Hygiene(中国食品卫生杂志)*, 2005, 17: 367-368.
 - 14 Gu JF(顾觉奋). Microbiological research and Development-new Technology, new Products and Market Information(微生物药品研发动态—新技术、新产品及市场信息). Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 50-53.
 - 15 Qi Z(齐志), Sun DC(孙东昌), Qiu JP(裘娟萍). Advances of methods for activating silent gene clusters in microorganisms. *Bull Sci Technol(科技通报)*, 2016, 32: 82-86.
 - 16 Zhao Q(赵琪), Min TL(闵涛玲), Hu HF(胡海峰). Studies on activating silent biosynthetic gene clusters to synthesize new natural products in microorganisms. *World Clin Drugs(世界临床药物)*, 2014, 35: 501-505.
 - 17 Zhang RF(张若飞), Xu DB(徐定邦). Mixed fermentation and application. *Food Ferment Ind(食品与发酵工业)*, 1984, 4: 29-36.
 - 18 Jiang SM(姜淑梅), Zhang L(张龙), Dai SK(戴世鲲). A quick and efficient method for genomic DNA extraction from Actinobacteria. *Biotechnology(生物技术)*, 2007, 2: 39-41.
 - 19 Spröer C, Reichenbach H, Stackebrandt E. The correlation between morphogenetic classification of myxobacteria. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49: 1255-1262.
 - 20 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596-1599.
 - 21 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406-425.
 - 22 Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microb*, 1989, 55: 1901-1906.
 - 23 Sheng N(盛楠), Gu JF(顾觉奋). Silent genes provide new ideas for microbial pharmaceutical research. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2014, 23: 2165-2168.
 - 24 Kurosawa K, Ghiviriga I, Sambandan TG, et al. Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 1126-1127.
 - 25 Oh DC, Kauffman CA, Jensen PR, et al. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. *J Nat Prod*, 2007, 70: 515-520.
 - 26 Cueto M, Jensen PR, Kauffman C, et al. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *J Nat Prod*, 2001, 64: 1444-1446.
 - 27 Losada L, Ajayi O, Frisvad JC, et al. Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus species*. *Med Mycol*, 2009, 47: S88-S96.
 - 28 Schroeckh V, Scherlach K, Nützmann HW, et al. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *P Natl Acad Sci*, 2009, 106: 14558-14563.