

一株川贝母内生真菌的分离鉴定及其产贝母类生物碱分析

潘峰, 苏雪梅, 杨楠, 蔡世美, 侯凯, 吴卫*

四川农业大学农学院, 成都 611130

摘要: 本文利用组织匀浆法从川贝母鳞茎中分离出一株内生真菌 CBY4, 采用形态学和分子生物学方法, 该菌株被鉴定为 *Fusarium tricinctum*。采用生物碱显色沉淀反应, 高效液相色谱-蒸发光检测器 (HPLC-ELSD) 色谱法和超高效液相色谱-质谱仪 (UPLC-MS) 色谱法对其产贝母生物碱特征进行分析, 结果显示 *F. tricinctum* CBY4 能够产生贝母类生物碱贝母辛和贝母素乙。同时利用 HPLC-ELSD 测定目标生物碱在发酵液中的产量, 其分别为 0.020 6 mg/L 和 0.010 4 mg/L。本文首次报道川贝母内生真菌产生物碱特性, 该研究表明内生真 *F. tricinctum* CBY4 通过液体发酵能够产生贝母辛和贝母素乙, 并且具有利用生物发酵技术生产贝母辛和贝母素乙的潜在利用价值。

关键词: 川贝母; 分离鉴定; 内生真菌; 生物碱

中图分类号: R284.1; Q946.91

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.7.009

Isolation, Identification and the Analysis of Fritillaria-type Alkaloid-producing of an Endophytic Fungus from *Fritillaria cirrhosa* D. Don

PAN Feng, SU Xue-mei, YANG Nan, CAI Shi-mei, HOU Kai, WU Wei*

Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: An endophytic fungus CBY4 was isolated from the bulb of *Fritillaria cirrhosa* D. Don (FC) using tissue homogenate method. And this strain was identified as *Fusarium tricinctum* based on phylogenetic analysis and molecular biology analysis. In addition, the characteristics of fritillaria-type alkaloid (FTA) production were tested using alkaloid-chromogenic reaction, high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD) and ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), followed by determining the yield of FTA using HPLC-ELSD method. And the results showed that *F. tricinctum* CBY4 could produce two kinds of FTA (peimisine and peiminine), and whose yields were 0.020 6 mg/L, 0.010 4 mg/L in the culture filtrate, respectively. It is the first report that the characteristic of fritillaria-type alkaloid production of endophytic fungus from FC. And the work showed that endophytic fungal *F. tricinctum* CBY4 produced peimisine and peiminine, and has the potential value to produce peimisine and peiminine by fermentation techniques.

Key words: *Fritillaria cirrhosa* D. Don; isolation and identification; endophytic fungi; alkaloid

川贝母 (*Fritillaria cirrhosa* D. Don.) 为百合科贝母属植物, 又称为卷叶贝母, 历年药典均将其收录为川贝母药材的基源种之一。其以鳞茎入药, 主要功效为清热润肺, 化痰止咳。因其生长年限长, 产量相对较低, 对环境要求苛刻, 多生长在海拔 3 000 ~ 4 000 m 的川西高原, 加上市场需求的快速增长, 加重了川贝母资源濒危程度, 已成为我国三级保护物种^[1,2]。贝母鳞茎的主要活性成分是生物碱, 而川

贝母中已经分离并确定结构的生物碱主要有西贝碱、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙、云贝酮、异梭砂贝母碱等贝母类生物碱^[3]。如果寻找到可以以其他技术或者途径生产贝母类生物碱的方法, 既能拓展贝母生物碱的来源, 也可减少从川贝母等药材获取相应生物碱的需求。

植物内生真菌 (Endophytic fungi) 指存在于健康植株的组织器官中, 对宿主不形成明显侵染的真菌。宿主植物特殊的内部物理化学环境能够一定程度改变真菌的代谢产物^[4]。近年来, 对葱、蕨类植物、杨树、龙血树、罗汉松、红豆杉等许多经济、药用植物内生真菌的研究发现, 内生真菌能产生与宿主相同或

收稿日期: 2017-12-29 接受日期: 2018-03-02

基金项目: 高等学校博士学科点专项 (20115103110009)

* 通信作者 Tel: 86-28-86290870; E-mail: ewuwei@sicau.edu.cn

相似的具有生理活性的代谢产物^[5]。例如从红豆杉内生真菌发现可以产紫杉醇的菌株^[6],从蛇足石杉内生真菌中发现可产石杉碱甲的菌株^[7]。这对于一些濒危的药用植物来说,通过筛选可以产生与其宿主相同或相似的活性成分的内生真菌,并通过人工改造达到高效地生产生物活性成分,无疑对这些药用植物的野生资源的保护和其微生物资源的开发利用有着重要的理论和现实意义。

本课题组曾从渐危药用植物川贝母分离了多株内生真菌,研究发现不同菌株具有不同的研究潜力,其中菌株 CBY11 表现了良好的抗氧化活性^[8],而菌株 CBY4 可以产生生物碱,此外部分菌株的代谢产物还有良好的抑制酪氨酸酶活性^[9]。更值得注意的是本课题组曾从川贝母的近源植物瓦布贝母的内生真菌中获得可以产贝母类生物碱的菌株,如 WBS007^[10]。这提示从川贝母内生真菌中获取与宿主植物相同或相似的活性成分具有现实可行性。为此,本文对此株产生物碱内生真菌进行了鉴定,然后对其产生物碱特性,尤其是贝母类生物碱特性进行了分析,以期获得产贝母类生物碱内生真菌。

1 材料和方法

1.1 植物材料

植物材料为成都恩威集团新都桥川贝母基地采集的3年生川贝母健康鳞茎,采集的植物材料由四川农业大学农学院吴卫教授鉴定为川贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don.)。

1.2 内生真菌分离

川贝母内生真菌的分离步骤参考文献^[8]。消毒后的贝母鳞茎采用“三印法”(将材料在培养基上按正-反-正的顺序印三次)置于PDA培养基平板上培养,于28℃培养箱中暗培养,3~4天后观察有无菌落产生,若发现皿中无菌落生成则证明该材料表面消毒彻底。最后将所得菌株转到含PDA的斜面试管中用石蜡封存,置4℃冰箱中保存菌种。

1.3 形态学特征

用打孔器取直径为6 mm的菌饼接种到新的PDA培养基中心,28℃培养7天,挑取少量菌丝,用乳酸棉兰染色后做成临时装片,在光学显微镜(Model BX51, Olympus, 日本)观察菌丝体、孢子、孢子梗等形态特征。根据《真菌鉴定手册》^[11]进行初步鉴定。

1.4 分子生物学鉴定

分子生物学鉴定参考文献^[8]进行。对扩增出来的PCR产物进行切胶纯化后送交成都擎科梓熙生物技术有限公司(北京,中国)进行测序,将所测序列提交到NCBI GenBank数据库上进行BLAST比对,根据比对结果选取相似度最大且具有代表性菌株和保藏的标准菌株序列利用MEGA5.10软件采用neighbor-joining(NJ)法进行聚类分析。Bootstrap检测值(50%,1 000次重复)。

1.5 内生真菌发酵及供试液及标准液的制备

取川贝母内生真菌菌种,挑取少量菌丝,接入PDA培养基于28℃活化培养4天。取直径为6 mm的活化菌块接种到马铃薯葡萄糖培养液PDB中(100 mL/250 mL),每瓶接种5个菌块,置于28℃恒温摇床中130 rpm培养4天作为种子液。然后转接到PDB液体培养基(150 mL/250 mL)扩大发酵7天。发酵完毕,收集培养物过滤后,用浓氨水将发酵液调pH9~11,加二氯甲烷萃取2~3次,二氯甲烷用量为发酵液体积的四分之一,收集二氯甲烷层,水浴锅中用蒸发皿挥干,残渣用2 mL甲醇复容后用0.22 μm有机滤膜过滤得所需制备液。

配置贝母辛,西贝母碱和贝母素乙标准品溶液,浓度约为1 mg/mL,然后混合稀释到合适浓度。

1.6 菌株筛选及目标成分分析

1.6.1 生物碱沉淀显色实验

生物碱显色反应操作如下:碘化铋钾试剂、碘-碘化钾试剂、碘化汞钾试剂、改良碘化铋钾试剂,其均参照《中国药典》2010版一部配制。以贝母辛和贝母素乙标准品溶液作为阳性对照品。取样品制备液和阳性对照品各约0.2 mL分别于1.5 mL离心管中,每个样品重复4次,分别单独滴加1~2滴以下试剂:碘化铋钾试剂、碘-碘化钾试剂、碘化汞钾试剂、改良碘化铋钾试剂,室温下轻轻震荡后观察每一种试剂单独加入样品后颜色变化,用空培养基为阴性对照,阳性对照液为阳性对照。若产生桔黄色沉淀,则为阳性反应;若产生青褐色浑浊,即为阴性反应。

1.6.2 HPLC-ELSD分析

所用仪器为:安捷伦1260 HPLC系统(Agilent, USA)并串联Alltech ELSD 2000ES旋转蒸发光检测器(Alltech, USA),并且配备一台SY-601/24空气压缩机(Shanghai Sheng-yan Air Compressor Co., Ltd., 上海,中国)。色谱工作站为ELSD 2 000控制软件

(Alltech, USA)。色谱条件:色谱柱为 Inertsil ODS-3, 4.6×150 mm, $5 \mu\text{m}$; 流动相为乙腈(A)和含 0.1% 三乙胺的超纯水(B), 采用程序梯度洗脱: 0 ~ 10 min, 线性梯度 45% ~ 52% A; 10 ~ 18 min, 52% ~ 62% A; 18 ~ 25 min, 62% ~ 62%, 25 ~ 28 min, 62% ~ 90% A; 28 ~ 36 min, 90% ~ 90% A; 36 ~ 37 min, 90% ~ 45% A。流速为 1.0 mL/min。柱温为 25 °C; 进样量为 20 μL 。ELSD 参数设置为: 以压缩空气为载气, 流速为 3.0 L/min, 漂移管温度 100 °C。

将四种标准品混合溶液稀释 5 倍, 分别进样 5、10、15 μL ; 同时将未稀释混标品溶液分别进样 5、10、15、20 μL 。测定不同浓度下的色谱峰面积, 考察标准曲线。内生真菌样品溶液中目标生物碱的含量根据标准曲线进行测定。

1.6.3 UPLC-MS 分析

供试样品制备: 由于 HPLC-ELSD 检测到发酵液中只有贝母辛和贝母素乙相同保留时间的峰, 因此本试验只选择此两种标准溶液进一步试验。发酵液提取物制备同上。仪器型号: 美国 Waters 的 UPLC - Xevo™ TQ MS; 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH- C_{18} 柱 (2.1×50 mm, $1.7 \mu\text{m}$, Waters, USA), 流动相为 0.1% 甲酸水(A)和乙腈(B), 流速 0.4 mL/min, 采用梯度洗脱, 5% ~ 45% A (0 ~ 10 min), 45% ~ 45% A (10 ~ 12 min), 45% ~ 70% A (12 ~ 15 min), 70% ~ 95% B (15 ~ 17 min), 95% ~ 5% b (18 ~ 20 min); 柱温 50 °C; 样品盘温度: 15 °C, 进样量 2

μL 。质谱(MS)条件: 去溶剂化温度 400 °C, 去溶剂化气流速 400 L/h, 离子源温度 150 °C, 毛细管电压 3 KV, 锥孔电压 30 V, 扫描范围 m/z 为 400 ~ 700, 离子源: 电喷雾电离(ESI)。数据在软件 Mass Lynx Version 4.1 (Waters Co.) 上进行处理。根据与标准品的保留时间和离子碎片峰判断目标成分是否存在^[12]。

2 结果与分析

2.1 内生真菌的分离及鉴定

从不同的川贝母鳞茎个体中得到多株内生真菌, 其中一株在 PDA 培养基 28 °C 条件生长良好的菌株编号为 CBY4。同时该菌株保存在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC), 保存编号为 9719。显微特征如图 1 所示。菌丝有隔, 大型分生孢子镰刀形, 纺锤形至宽镰刀形, 多为 3 ~ 5 隔, 着生于分生孢子梗顶端, 大小约为 $28 \sim 40 \times 3 \sim 4 \mu\text{m}$, 两端较尖(图 1C、D)。小型分生孢子棒状或卵圆形, 单孢, 棒状孢子大小约为 $6 \sim 10 \times 2 \sim 3 \mu\text{m}$, 卵圆形孢子直径约为 $2.2 \sim 4.1 \mu\text{m}$ (图 1A)。厚垣孢子呈球形, 壁光滑, 间生或顶生, 多个成串, 直径约为 $5 \sim 10 \times 5 \sim 8.5 \mu\text{m}$ (图 1B)。

菌株 CBY4 的 ITS1-5.8SrDNA-ITS2 序列提交到 NCBI GenBank 数据库上, 得到序列编号(Accession No.): MG734910。将其在 NCBI GenBank 数据库数据上进行 Blast 比对后发现其与 *Fusarium tricinctum*

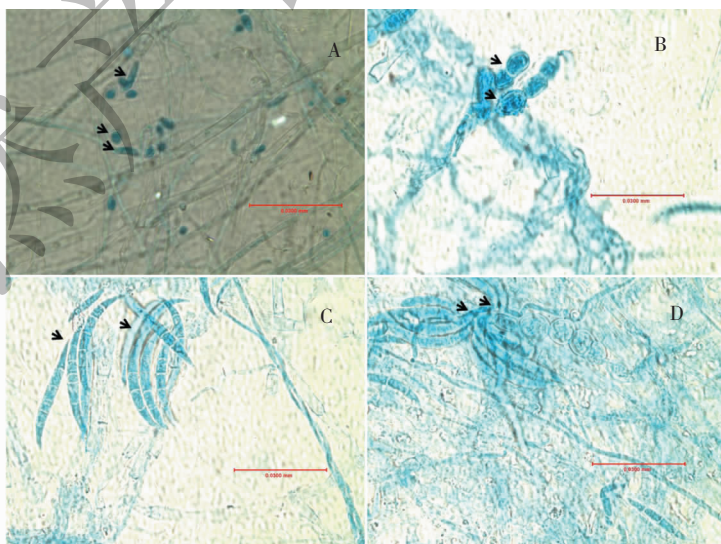


图 1 川贝母内生真菌 CBY4 的显微结构图

Fig. 1 The microstructure of endophytic fungal strain CBY4 from *Fritillaria cirrhosa*

注: A, 小型分生孢子; B, 厚垣孢子; C, 大型分生孢子; D, 大型分生孢子梗。bar = 0.030 0 mm。

Note: A, microconidia; B, chlamydospores; C, macroconidia; D, an apical cluster of conidia morphology. bar = 0.030 0 mm.

isolate:TB4-3 (Accession No. AB369468.1) 相似度最大,达到 98%。同时选取前 11 株相似度高且具有代表性的序列利用 MEGA5.1 软件采用 Neighbor-Joining (NJ) 法构建系统进化树(图 4)。结果显示 CBY4 与 *F. tricinctum* isolate HG52 (Accession No. KX099672.1) 聚类在一起。所以结合形态学特征,确认 CBY4 为三线镰刀菌(*F. tricinctum*)。

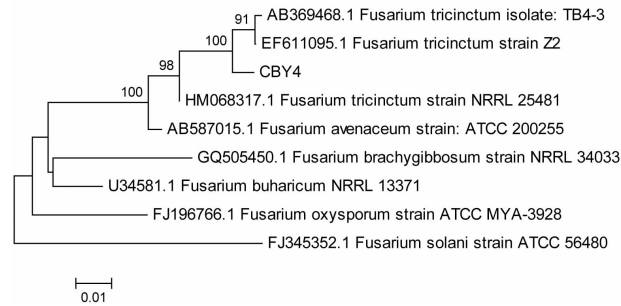


图 2 邻接法构建的川贝母内生真菌 CBY4 ITS 序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the ITS sequences of endophytic fungal strain CBY4 from *F. cirrhosa* using Neighbor-joining method

2.2 内生真菌 CBY4 产贝母生物碱分析

当向内生真菌 CBY4 制备液中滴加碘化铋钾试剂、碘-碘化钾试剂、碘化汞钾试剂、改良碘化铋钾试剂,均产生桔黄色沉淀。与向阳性对照样品中滴加此四种试剂反应过程相似。表明内生真菌 CBY4 产生生物碱类代谢产物。进一步用 HPLC-ELSD 分析发现,内生真菌 CBY4 色谱图 5.7 min 和 19.0 min 处有两个色谱峰(图 3B)与标准品贝母辛和贝母素乙(图 3A)具有相同的保留时间。表明内生真菌 CBY4 能够产生与贝母辛和贝母素乙相同或者相似的化合物。为了确认内生真菌 CBY4 是否可以产生贝母辛和贝母素乙,利用 UPLC-MS 进一步进行了试验。如图 4 所示,样品中有 2 个离子峰的出峰时间与贝母辛和贝母素乙一致。而且图 4A 中的 1 号峰其对应的离子扫描图谱(图 5B)与图 4B 贝母辛标品所对应离子扫描图谱(图 5A)有相同质荷比(m/z)的分子;同样图 4A 中的 2 号峰其对应的离子扫描图谱(图 5D)与图 4C 贝母素乙标品所对应离子扫描图谱(图 5C)有相同质荷比(m/z)的分子。因此结合以上分析可以证明川贝母内生真菌三线镰刀菌(*F. tricinctum*) CBY4 能够产生贝母辛和贝母素乙两种贝母类生物碱。

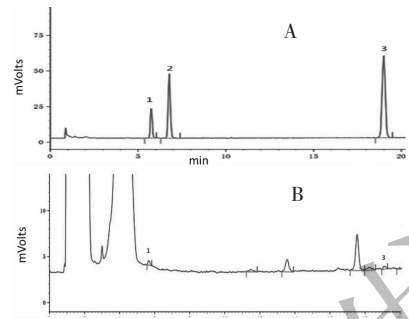


图 3 川贝母内生真菌 CBY4 发酵液二氯甲烷提取物 (A) 和三种标准品 (B), (1, 贝母辛; 2, 西贝母碱; 3, 贝母素乙) 的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 3 The HPLC-ELSD chromatograms of the dichloromethane extract from endophytic fungal strain CBY4 associated with *F. cirrhosa* (A) and three standard analytical compounds (1, peimisine; 2, sipeimine; 3, peiminine)

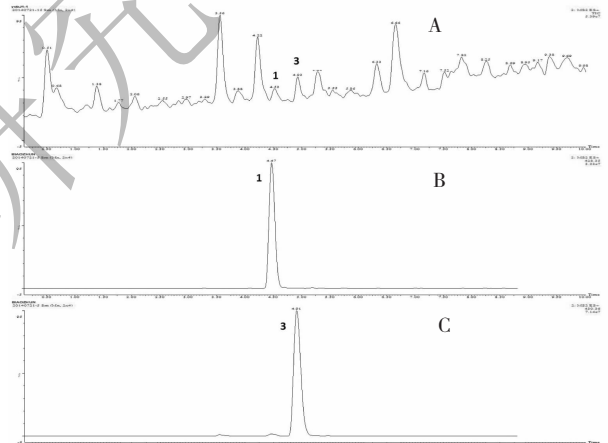


图 4 川贝母内生真菌 CBY4 发酵液二氯甲烷提取物 (A), 贝母辛 (B) 和贝母素乙 (C) 的 UPLC-MS 的总离子流图

Fig. 4 The UPLC-MS total ion chromatograms of the dichloromethane extract from endophytic fungal strain CBY4 associated with *F. cirrhosa* (A), peimisine (B) and peiminine (C)

此外,以 HPLC-ELSD 色谱峰面积的自然对数为纵坐标,标准品含量的自然对数为横坐标绘制标准曲线,经回归处理,得贝母辛和贝母素乙回归曲线分别是: $Y = 1.6899X + 11.22$ ($R^2 = 0.9992$), $Y = 1.8197X + 12.705$, ($R^2 = 0.9997$)。根据回归方程,算得贝母辛的产量为 0.0206 mg/L,而贝母素乙的产量为 0.0104 mg/L。

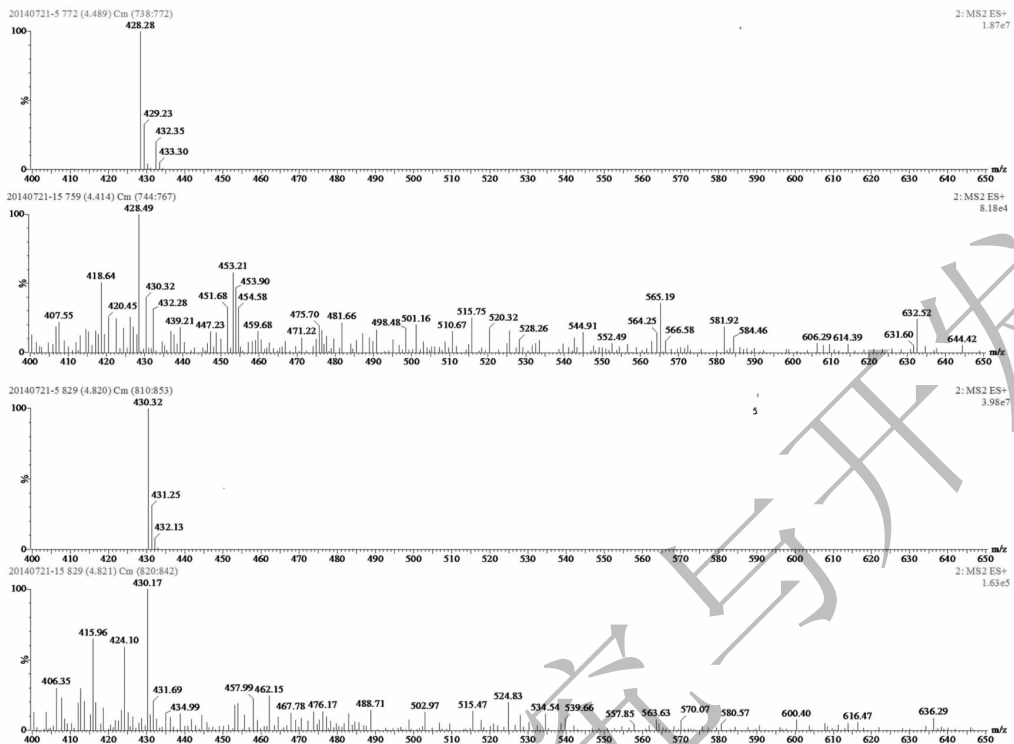


图5 川贝母内生真菌CBY4发酵液二氯甲烷提取物中的贝母辛和贝母素乙以及标准品贝母辛和贝母素乙的质谱图

Fig. 5 MS spectrums of peimisine (a) and peiminine (c) derived from the standards; and peimisine (b) and peiminine (d) of the DCM extracts from endophytic fungal strain CBY4 associated with *F. cirrhosa*

3 讨论

本文报道了从川贝母鳞茎中分离出一株内生真菌菌株CBY4,结合形态学特征和分子生物学特征,其被鉴定为*F. tricinctum*。关于瓦布贝母内生真菌的研究表明,镰刀菌属真菌在瓦布贝母内生真菌中获得的概率较大^[13]。这也表明,在川贝母中,与瓦布贝母类似,镰刀菌属也可能是其优势菌属。此外,镰刀菌作为常见的病原菌,能够与贝母和谐共处,可能是由于贝母体内的化学成分或其代谢过程能够影响到生活在其体内的镰刀菌菌株,使其能够稳定的存在贝母鳞茎中。

内生真菌普遍存在于植物体内,并且受植物生长状态,植物所处环境等众多因素的影响^[14],不仅能够产生丰富的新型结构的活性成分^[15],如22-oxa-[12]-cytochalasins;而且也能产生与宿主植物相同或相似的活性物质^[5],如长春新碱,喜树碱,小檗碱,苦马豆素,苦参碱,麦角生物碱,大叶龙胆,大黄素,印楝素,金丝桃素,鬼臼毒素,匙羹藤新苷元等。研究表明植物活性成分紫杉醇不仅能够从同一种植物的多个内生真菌获得,而且也可以从多种植物的

不同内生真菌代谢产物获得^[16]。可见可以从植物内生真菌寻找多株产目标植化成分的菌株,通过对这些菌株的深入研究,可以为利用内生真菌生产某些植化成分奠定基础。本课题组曾从瓦布贝母新鲜健康的鳞茎中分离得到能够产生贝母生物碱的内生真菌^[10,17],但是其产量极低。为了获得更好的可以产生贝母类生物碱的内生真菌,同时,充分挖掘药用植物中具有重要科研价值的内生真菌资源,本课题组又从川贝母鳞茎中分离内生真菌并寻找能够产生贝母生物碱的菌株。

在本试验中,生物碱显色反应和HPLC-ELSD分析表明川贝母内生真菌CBY4液体发酵可能产生贝母辛和贝母素乙化合物。而UPLC-MS分析进一步确认CBY4能够产生贝母辛和贝母素乙两种贝母类生物碱。此结果也首次表明,除了平贝母内生真菌^[18],瓦布贝母内生真菌外^[17],分离自川贝母的内生真菌也可以产生贝母类生物碱。可见,从植物内生真菌中筛选能够产生与植物活性化合物相同或相似的菌株具有广泛的可行性。而且,从内生真菌中筛选具有产生宿主植物相同或相似化合物潜力的菌株虽然是很关键的第一步。但是,通常,此类活性成

分产量很低,加上脱离植物内环境后,内生真菌代谢活动发生变化,导致其产量的减少,这会给此类菌株的开发利用带来困难。例如,本试验中,贝母辛的产量为0.020 6 mg/L,而贝母素乙的产量为0.010 4 mg/L,均无法直接用于工业化生产。为此,除了进一步筛选产量更高,遗传稳定性更优的菌株外,通过物理化学刺激,或者利用分子生物学进行基因改造等对此类菌株的开发利用也非常重要。

总之,本文首次从川贝母内生真菌中获得一株生长良好,且能够产生贝母辛和贝母素乙的内生真菌 *F. tricinctum* CBY4,其具有通过发酵技术生产贝母类生物碱的潜力。这也为进一步开发和利用川贝母内生真菌资源奠定了基础。

参考文献

- Xu HF(徐宏发), Jian ZG(蒋志刚). The protection and sustainable utilization of Chinese medicinal and animal resources(中国药用动植物资源保护和可持续利用)[M]. Shanghai: East China Normal University Press, 2003: 158-160
- Zhang TC(张体操), Qiao Q(乔琴), Zhong Y(钟扬). Current status and prospect of biological resources development in Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Chin Bull Life Sci*(生命科学), 2013, 25: 446-450.
- Zhao GQ(赵高琼), Ren B(任波), Dong XP(董小萍), et al. The research progress of Chuanbeimu[J]. *Phar Clin Chin Mater Med*(中药与临床), 2012, 3(6): 59-64.
- Jia M, Chen L, Xin HL, et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review[J]. *Front Microb*, 2016, 7: 906.
- Zhao J, Shan T, Mou Y, Zhou L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011; 11: 159-168.
- Wang YM(汪友明), Ma ZY(马忠友), Hu FL(胡丰林), et al. Isolation and screening of endophytic fungi producing taxol from *Taxus chinensis* of Huangshan[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014; 26: 1624-1627.
- Han WX(韩文霞), Li WZ(李伟泽), Li XF(李小峰), et al. Isolation and identification of endophytic fungus producing Huperzine A from *Huperzia serrata*[J]. *Microb China*(微生物学通报), 2017, 44: 2153-2160.
- Pan F(潘峰), Su TJ(苏天骄), Deng KL(邓克莉), et al. Antioxidant activities and metabolic constituents of endophytic *Fusarium tricinctum* CBY11 isolated from *Fritillaria cirrhosa*[J]. *Mycosystema*(菌物学报), 2017, 36: 752-765.
- Su TJ(苏天骄), Wu C(吴超), Liu Q(刘琼), et al. Tyrosinase inhibition activity of the fermented product of endophytic fungi isolated from *Fritillaria cirrhosae* Bulbus[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1368-1373.
- Pan F, Hou K, Gao F, et al. Peimisine and peiminine production by endophytic fungus *Fusarium* sp. isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabensis*[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 1104-1109.
- Wei JC(魏景超). Fungal identification manual(真菌鉴定手册)[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 1-780.
- Kumara PM, Zuehlke S, Priti V, et al. *Fusarium proliferatum*, an endophytic fungus from *Dysoxylum binectariferum* Hook. f., produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anticancer activity[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2012, 101: 323-329.
- Pan F, Su TJ, Cai SM, et al. Fungal endophyte-derived *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*: diversity, antioxidant capacities *in vitro* and relations to phenolic, flavonoid or saponin compounds[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42008.
- Wang ZW(王志伟), Chen YG(陈永敢), Wang QC(王庆臻), et al. Progresses and perspectives of studies on plant endophytic microbes in China[J]. *Microb China*(微生物学通报), 2014, 41: 482-496.
- Schulz B, Boyle C, Draeger S, et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites[J]. *Mycol Res*, 2002, 106: 996-1004.
- Ma YC(马玉超), Zhao K(赵凯), Wang SW(王世伟), et al. Biological diversity of taxol-producing endophytic fungi[J]. *J Fungal Res*(菌物研究), 2003, 1: 28-32.
- Pan F, Su X, Hu B, et al. *Fusarium redolens* 6WBY3, an endophytic fungus isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*, produces peimisine and imperialine-3 β -d-glucoside[J]. *Fitoterapia*, 2015, 103: 213-221.
- Chen JL(陈娟丽). Studies on endophytic fungi with sipeimine production ability from a vulnerable medicinal plant *Fritillaria ussuriensis* Maxim [D]. Xi'an: Dissertation of Northwest university(西北大学生命科学学院), 2007.