

黄连内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究

杨 慧,李 钢,淮瑞平,杨丹妮,雷利杰,欧阳艳,熊莉丽*

西南交通大学生命科学与工程学院,成都 610031

摘要:为研究四川省峨眉地区黄连内生真菌多样性及菌株抑菌活性和机制,发掘黄连内生真菌资源,本研究从川黄连植株分离鉴定 14 株黄连内生真菌,分属于 2 纲,5 目,7 科,11 属。根状茎、茎、叶和须根中的内生真菌定殖率分别是 27.8%、56.7%、52.5% 和 39.6%。14 株黄连内生真菌对金黄色葡萄球菌均有抑菌效果,Cop S01、Cop L01、Cop FR01 的抑菌圈直径超过 35 mm,纸片扩散法测得 3 株内生真菌发酵液对金黄色葡萄球菌均有效,Cop L01 抑菌圈直径大于 20 mm,抑菌效果最好,其发酵产物最低抑菌浓度(MIC)为 10 mg/mL,最低杀菌浓度(MBC)为 11 mg/mL。初步探究 Cop L01 抑菌机制发现该菌株发酵产物破坏金黄色葡萄球菌细胞膜,引起胞内核酸及蛋白外泄,造成金黄色葡萄球菌死亡。本研究表明川黄连内生真菌具有丰富的多样性,部分菌株及其发酵产物对金黄色葡萄球菌均表现出较好的抑菌效果,预示着黄连内生真菌 Cop L01 具有产生新型抗菌活性物质的潜力,为后续深入开发这一资源宝库提供了新的菌种和思路。

关键词:黄连;内生真菌;抑菌活性

中图分类号:Q93-331

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)9-1465-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.9.002

Isolation, identification and antibacterial activity of endophytes of *Coptis chinensis* Franch.

YANG Hui, LI Gang, HUAI Rui-ping, YANG Dan-ni, LEI Li-jie, OUYANG-Yan, XIONG Li-li*

School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: To study on the diversity of endophyte and the antibacterial activity and mechanism of the strains in Emei area of Sichuan Province, and explored the endophytes resources of *Coptis chinensis* Franch., identified as 14 species by molecular biology and morphological microscopy, belonged to 2 classes, 5 orders, 7 families, 11 genera. The colonization rates of endophytes in rhizomes, stems, leaves, and fibrous roots were 27.8%, 56.7%, 52.5%, and 39.6%. Fourteen endophytes from *C. chinensis* have an antibacterial effect on *Staphylococcus aureus*, and the diameter of inhibition zone of Cop S01, Cop L01, and Cop FR01 strains is more than 35 mm, the fermentation broth of the three strains of endophytes was found to be effective against *S. aureus* by diffusion method, and the diameter of the inhibition zone of strain Cop L01 was greater than 20 mm. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the fermentation product of this strain was 10 mg/mL, its minimum bactericidal concentration (MBC) was 11 mg/mL. The inhibition mechanism of Cop L01 showed that the product damaged the cell membrane of *S. aureus*, caused the leakage of intracellular nucleic acid and protein, resulting in the death of *S. aureus*. This study showed that the endophytes of *C. chinensis* are rich in diversity, and some strains and their products showed good antibacterial effect on *S. aureus*. Cop L01 have potential to produce new antibacterial active substances. This provided new strains and ideas for later exploitation of endophyte.

Key words: *Coptis chinensis* Franch.; endophyte; antibacterial activity

黄连(*Coptis chinensis* Franch.)属于毛茛科、黄连属,在《本草纲目》中记载:黄连具有清热燥湿,泻

火解毒之效^[1]。黄连属植物约有 18 种,我国产 6 种,分别是黄连、三角叶黄连、云南黄连、峨眉黄连、五叶黄连、五裂黄连,一个变种:短萼黄连,以上前三种习称为“味连”“雅连”和“云连”。四川是黄连的主要产地之一,《名医别录》记载:“黄连生巫阳及蜀郡大

收稿日期:2022-04-06

接受日期:2022-07-08

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(2682020 ZT112);新疆维吾尔自治区高校科研计划(XJEDU20181018)

* 通信作者 Tel:86-018215533008; E-mail: lxiong@swjtu.edu.cn

山,二月八月采”^[2]。早在明代以前,四川峨眉地区就开始人工栽培黄连,目前四川峨眉地区就有 GAP 味连种植基地。传统中药黄连水煎液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等体外抑菌效果显著^[3]。黄连及其有效成分的抗菌机理是复杂多样的,包括破坏细菌细胞膜、抑制胞内大分子物质的合成、阻断细菌分裂和发育、干扰 Z 环的形成以抑制细胞分裂蛋白 FtsZ^[4]。

内生菌是指栖息在植物器官中的细菌或真菌,能够在植物内部组织中定居,且不会对宿主造成明显的伤害。植物内生菌是重要的生物活性产物的新来源^[5]。有学者从松果属植物 *Conocarpus erecta* 中分离到内生真菌 *Cytospora* sp., 在其发酵液中筛选出新型抗菌化合物 cytosporone D, 对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠杆菌以及白色念珠菌抑菌效果显著^[6]。日益严峻的抗生素耐药性已经对人类健康构成重大威胁^[7], 发掘药用植物内生真菌资源是寻找新型抗菌药物的新途径之一^[8]。

四川作为黄连主产地之一,目前对川黄连内生真菌多样性的相关研究仍为空白,同时对于黄连内生真菌代谢产物的抑菌活性和机制也未见有研究。目前已有的黄连内生菌研究集中于分离菌株代谢产物中的单体化合物^[9,10]以及筛选产小檗碱的黄连内生真菌^[11,12]。药用植物内生菌多样性及内生菌代谢产物的进一步研究等方面均具有深入研究的意义和价值,因此本研究依托于川黄连的产地优势,探究四川地区黄连内生真菌的多样性,进一步研究其代谢产物抑菌机制,为黄连内生真菌资源的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

基因扩增仪 A200(杭州朗基科学);真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(上海生工);Inspect 扫描电子显微镜(美国 FEI);E-1045 离子溅射装置(日立高新技术那珂事务所)。

1.2 植物材料

黄连采自四川省乐山市峨眉山市,经鉴定为一株五年生味连(*Coptis chinensis* Franch.)。

1.3 供试菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC25923(*Staphylococcus aureus*);大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)来自四川省人民医院/四川省医学科学院检验科。

1.4 黄连内生真菌分离纯化

将采集到的新鲜黄连洗净后对完整枝段及须根部分进行表面消毒后切成 0.5 cm × 0.5 cm 的组织

块,接种到加入青链霉素的 PDA 平板上,正置 28 °C 培养^[13]。设置对照实验组验证表面消毒程序有效及操作环境洁净。培养 5 ~ 7 天后,采用菌丝尖端接种法进行纯化,保存于 4 °C 冰箱。记录分离黄连组织块数目,按如下公式计算植株内生真菌定殖率。

内生真菌定殖率 =

$$(\text{分离菌株数目} / \text{分离组织块数目}) \times 100\%$$

1.5 内生真菌鉴定

形态学鉴定包括菌落形态特征描述及菌丝、孢子形态的观察。采用载玻片湿室培养法观察,经乳酸酚棉蓝染色液染色固定后在光学显微镜下观察菌丝及孢子形态。参考真菌分类学相关书籍^[14],对分离到的真菌进行初步分类。

分子生物学鉴定即采用内部转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)测序的方法,利用测序数据建立系统发育树,鉴定其亲缘关系^[15]。提取真菌 DNA,选择引物 ITS5/ITS4(北京擎科生物科技有限公司合成),ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')^[16]。PCR 条件:98 °C 预变性 30 s;98 °C 变性 10 s,57.3 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 4 s,28 个循环;72 °C 终延伸 1 min。序列数据经处理后与 NCBI 数据库 Blast 比对,采用邻接法构建进化树,自展值 5 000,对内生真菌的种属关系进行分类,如若进化树待测序列的自展支持值 > 90%,则基本认定为此种。

1.6 内生真菌抗菌性筛选

活化金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌,采用平板稀释法测定菌落数目,稀释菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL。内生真菌抗菌性筛选采用打孔法^[17]:在 LB 培养基上均匀涂布菌液,用 7 mm 打孔器在平板中央打去琼脂块,再将黄连内生真菌平板上最外缘打取菌块接种至涂布好菌液的 LB 固体平板上,每组设置 3 个平行,37 °C 培养,游标卡尺十字交叉法测量抑菌圈大小。

1.7 内生真菌发酵产物抑菌活性

“1.6”初筛到的抑菌菌株 Cop S01、Cop L01、Cop FR01 进一步扩大发酵收集代谢产物。活化后接种于 40 mL PDB 培养基后,28 °C 摇床 180 r/min,7 天后进一步扩大培养体积至 1 200 mL,菌丝菌液分离,二氯甲烷萃取菌液,收集有机相旋蒸后称量产物质量,甲醇溶解后备用。抑菌活性检测采用纸片扩散法^[18],*S. aureus* 作为受试菌株,菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL,均匀涂布于 LB 平板,将 Cop S01、Cop

L01、Cop FR01 发酵产物用甲醇充分溶解后制成 30% 的溶液,将无菌纸片放入无菌平皿内,在每张纸片上缓缓滴加 20 μL 发酵产物,使其全部吸收,每组设置 3 个平行。将含有发酵产物及空白对照的纸片用无菌镊子分别置于 LB 平板上,将平板正置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,后转入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 18 ~ 20 h 后观察实验结果。

1.8 Cop L01 发酵产物抑菌机制初探

Cop L01 发酵产物 MIC、MBC 值的测定:10 mL LB 培养基中加入 100 μL 浓度为 1×10^6 CFU/mL *S. aureus* 菌液,稀释产物浓度梯度为 0、2、4、6、8、10、11、12 mg/mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 培养。观察各个梯度浓度下菌液的浑浊度,肉眼不可见浑浊的最低浓度即为 MIC。取 100 μL 平板涂布后培养观察记录,每组设置 3 个平行。若该浓度下平板无菌落生长,则该浓度为 MBC 值。

S. aureus 生长曲线及给药前后胞外大分子物质含量测定:将浓度为 1×10^6 CFU/mL 菌液取 100 μL 加入 10 mL LB 培养基中,实验组加入 10 mg/mL

Cop L01 发酵产物,37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 振荡培养 18 h,每 2 h 取样,测量对照组、实验组 OD_{600 nm},绘制生长曲线。测定加入发酵产物对 *S. aureus* 细胞膜完整性的影响:核酸与蛋白质在 OD_{260 nm} 和 OD_{280 nm} 下有最大吸收值,因此在 0 ~ 18 h 内检测在该波长下的紫外吸光值可以估测胞外核酸和蛋白含量变化^[19]。

扫描电子显微镜检测 Cop L01 发酵产物对 *S. aureus* 形态的影响。收集生长至对数期的 *S. aureus* 细胞用 3% 戊二醛悬浮固定细菌,用无菌水漂洗 2 次,用梯度浓度乙醇脱水处理样品。最后加入 100% 酒精重悬后,离子溅射喷镀后电镜下观察^[20]。

2 结果与分析

2.1 内生真菌鉴定结果

实验从黄连中分离到 94 株内生真菌,经纯化去重后得到 14 株黄连内生真菌,以分离植株拉丁名和分离部位进行编号如下表 1。根状茎部位内生真菌定殖率是 27.8%,茎部位内生真菌定殖率是 56.7%,叶部位内生真菌定殖率是 52.5%,须根部位内生真菌定殖率是 39.6%。

表 1 黄连内生真菌分离纯化结果

Table 1 Separation and purification results of endophytes in *C. chinensis*

分离部位 Separation site	组织块数量 Number of tissue blocks	分离菌株数目 Number of isolates	纯化菌株数目 Number of purified strains	编号 Number
根状茎 Rhizome	72	20	7	Cop R01 ~ 07
茎 Stem	60	34	4	Cop S01 ~ 4
叶 Leaf	40	21	1	Cop L01
须根 Fibrous root	48	19	2	Cop FR01 ~ 02
总计 Total	218	94	14	-

纯化后的黄连内生真菌经传统的形态学鉴定如图 1 所示。提取真菌基因组 DNA 后扩增 ITS 序列,将扩增成功的 PCR 产物送样测序(北京擎科生物科技有限公司)。绘制黄连内生真菌系统发育树如图

2。共鉴定菌株 14 株,来自 5 目、7 科、11 属、11 个种,同时将测序数据上传至 NCBI 数据库,得到相应序列号。菌种鉴定结果如表 2。

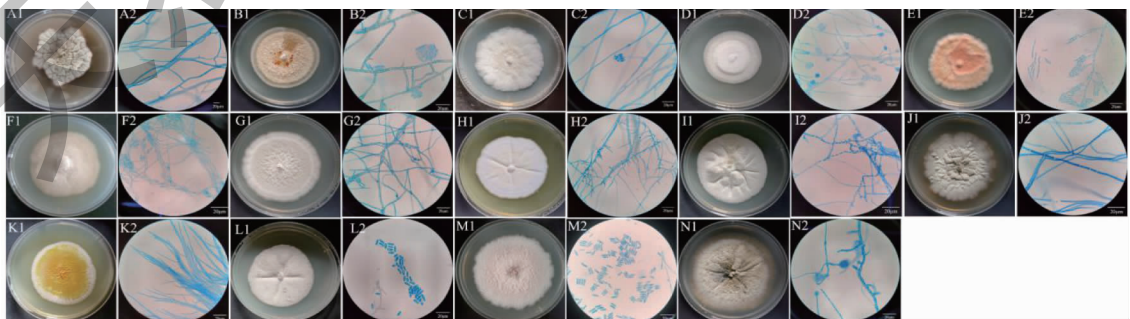


图 1 黄连内生真菌菌落形态及显微形态图

Fig. 1 Morphology and microscopic morphology of endophytes in *C. chinensis*

注:A ~ N 对应菌种编号 Cop R01 ~ 07、Cop S01 ~ 04、Cop L01、Cop FR01 ~ 02。A1 ~ N1 为菌种菌落,A2 ~ N2 为菌丝、孢子形态。Note:A ~ N correspond to Cop R01-07, Cop S01-04, Cop L01, Cop FR01-02. A1-N1 are fungal colonies, A2-N2 are mycelium and spore morphology.

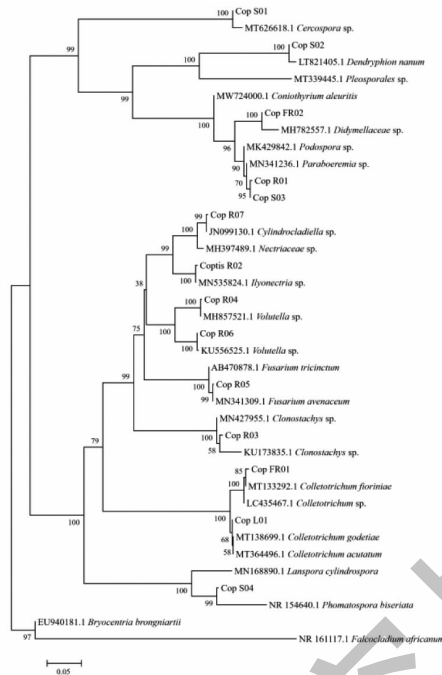


图2 基于 ITS rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on ITS rDNA sequences

表2 黄连内生真菌 ITS 鉴定结果

Table 2 ITS identification results of endophytes of *C. chinensis*

菌株编号 Strain number	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	序列号 Accession
Cop R01	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Paraboeremia</i>	<i>Paraboeremia</i> sp.	OM491198.1
Cop R02	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Ilyonectria</i>	<i>Ilyonectria</i> sp.	OM491199.1
Cop R03		Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys</i> sp.	OM491200.1
Cop R04		Nectriaceae	<i>Volutella</i>	<i>Volutella</i> sp.	OM491201.1
Cop R05			<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	OM491202.1
Cop R06			<i>Volutella</i>	<i>Volutella</i> sp.	OM491203.1
Cop R07			<i>Cylindrocladiella</i>	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	OM491204.1
Cop S01	Mycosphaerellales	Mycosphaerellaceae	<i>Cercospora</i>	<i>Cercospora</i> sp.	OM491205.1
Cop S02	Pleosporales	Torulaceae	<i>Dendryphion</i>	<i>Dendryphion nanum</i>	OM491206.1
Cop S03	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Paraboeremia</i>	<i>Paraboeremia</i> sp.	OM491207.1
Cop S04	Sordariomycetes incertae sedis	Phomatosporaceae	<i>Phomatospora</i>	<i>Phomatospora biseriata</i>	OM491208.1
Cop L01	Glomerellales	Glomerellaceae	Unclassified <i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	OM491209.1
Cop FR01					OM491210.1
Cop FR02	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Didymella</i>	<i>Didymellaceae</i> sp.	OM491211.1

2.2 内生真菌抗菌性结果

黄连内生真菌抗菌性结果如下表3所示。实验结果表明所有黄连内生真菌对 *S. aureus* 均具有抑菌作用,且 Cop S01、Cop L01、Cop FR01 对 *S. aureus* 有非常显著的抑菌活性,它们的抑菌环大小超过了 35 mm,他们分别属于 *Cercospora* sp.、*Colletotrichum*

sp.、*Colletotrichum* sp.。

2.3 内生真菌发酵产物抑菌结果

富集 Cop S01、Cop L01、Cop FR01 发酵产物质量分别为 738.7、472.8、446.4 mg。纸片扩散法测得黄连内生真菌发酵产物结果如下图3所示。Cop S01、Cop L01、Cop FR01 均对 *S. aureus* 有显著抑菌

表 3 纯化得到的 14 株黄连内生真菌抗菌性结果

Table 3 Antibacterial results of endophytes of *C. chinensis*

菌株号 Strains number	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	菌株号 Strains number	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>
Cop R01	++++	+	Cop S01	++++	+
Cop R02	++	+	Cop S02	+++	+
Cop R03	++++	+	Cop S03	++++	+
Cop R04	+++	+	Cop S04	++++	+
Cop R05	+++	+	Cop L01	++++	+
Cop R06	++++	+	Cop FR01	++++	+
Cop R07	++++	+	Cop FR02	++++	+

注:“+”表示无抑菌活性;“+”表示抑菌圈直径+10 mm;“++”表示抑菌圈直径11~20 mm;“+++”表示抑菌圈直径21~30 mm;“++++”表示抑菌圈直径31~35 mm;“+++++”表示抑菌圈直径>35 mm。

Note:“+” means no antibacterial activity;“+” means the diameter of the inhibition zone is +10 mm;“++” means the diameter of the inhibition zone is 11-20 mm;“+++” means the diameter of the inhibition zone is 21-30 mm;“++++” means the diameter of the inhibition zone is 31-35 mm;“+++++” means the diameter of the inhibition zone is >35 mm.

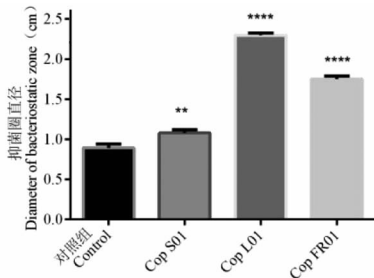


图 3 Cop S01、Cop L01、Cop FR01 代谢产物对金黄色葡萄球菌的抑菌效果图

Fig. 3 Antibacterial effect of Cop S01, Cop L01 and Cop FR01 metabolites on *S. aureus*

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$ 。Note: Compared with control, ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$.

作用,其中 Cop L01 抑菌效果极其显著,抑菌圈超过 20 mm。

2.4 Cop L01 代谢产物抑菌机制初探

测定 Cop L01 发酵产物 MIC、MBC 值。培养 18~24 h 后,10 mg/mL 浓度菌液澄清无浑浊,判定该浓度下 Cop L01 发酵产物能够极大程度地抑制 *S. aureus* 的生长,因此 Cop L01 发酵产物 MIC 值为 10 mg/mL。如图 4 所示,随着给药浓度不断加大,平板上菌落数不断减少,10 mg/mL 浓度下平板上菌落数减少至可数,11 mg/mL 和 12 mg/mL 浓度下平板上无菌落数,因此 Cop L01 发酵产物 MBC 值为 11 mg/mL。

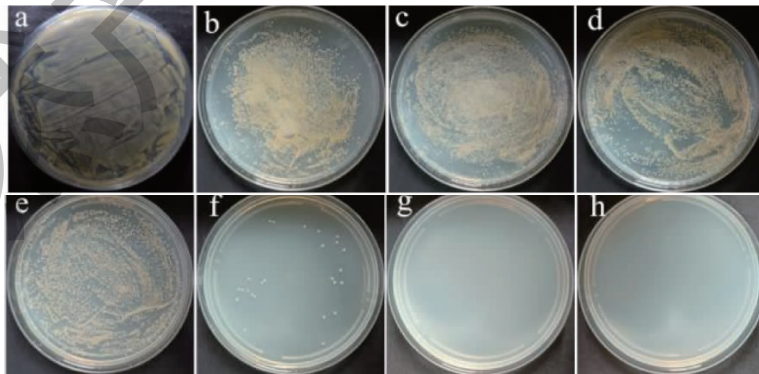


图 4 Cop L01 发酵产物 MIC 和 MBC 值测定

Fig. 4 Cop L01 fermentation product MIC and MBC value determination

注:a~h 分别对应浓度 0、2、4、6、8、10、11、12 mg/mL。Note:a-h correspond to concentrations of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12 mg/mL.

如图 5 所示,Cop L01 发酵产物在 MIC 浓度下明显抑制金黄色葡萄球菌生长,表现为加入发酵产物后即发挥抑菌作用。如图 6 所示,随着培养时间

延长,OD_{260 nm} 和 OD_{280 nm} 数值均较对照组有明显升高,胞外蛋白及核酸含量均有上升。说明培养时间越长,金黄色葡萄球菌细胞壁细胞膜完整性受到影

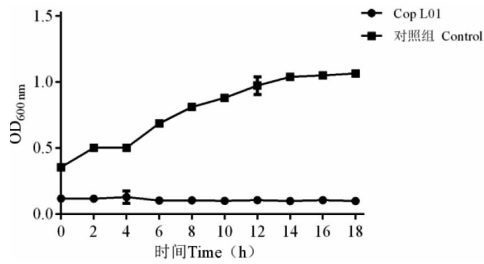


图5 Cop L01 发酵产物与 *S. aureus* 生长曲线

Fig. 5 Cop L01 fermentation product and *S. aureus* growth curve

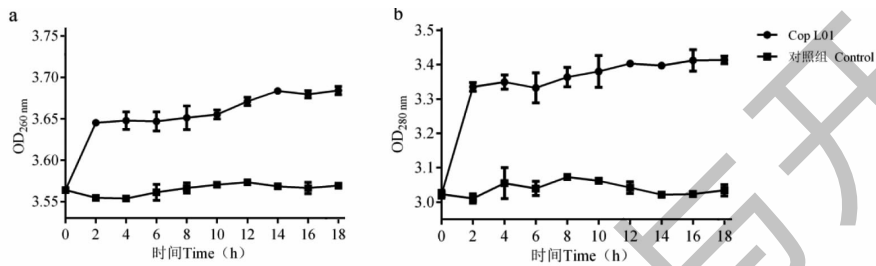


图6 Cop L01 发酵产物对 *S. aureus* 核酸、蛋白泄漏的影响

Fig. 6 Effects of Cop L01 fermentation products on *S. aureus* nucleic acid and protein leakage

注:a为核酸泄漏情况;b为蛋白质泄漏情况。Note:a is nucleic acid leakage;b is protein leakage.

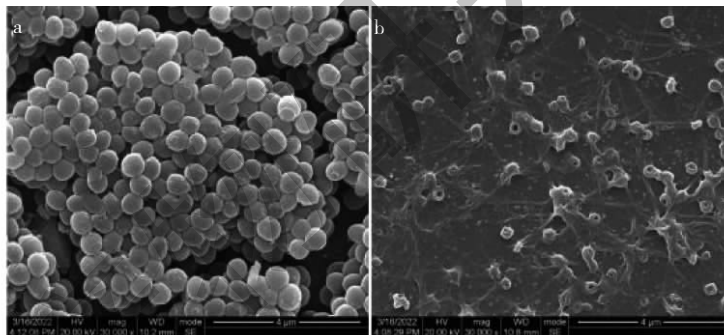


图7 Cop L01 发酵产物 MIC 浓度培养对 *S. aureus* 细胞形态的影响

Fig. 7 The effect of MIC of Cop L01 fermentation product on *S. aureus* morphology

注:a:正常生长 *S. aureus* 细胞形态;b:加入发酵产物培养后 *S. aureus* 细胞形态,标尺 4 μm 。Note:a:Normal growth *S. aureus* cell morphology; b:*S. aureus* cell morphology after fermentation product, scale bar 4 μm .

3 结论

本研究从川黄连植株根状茎、茎、叶和须根中分离得到 14 株内生真菌,包括 *Paraboeremia* sp.、*Ilyonectria* sp.、*Clonostachys* sp.、*Volutella* sp.、*Fusarium avenaceum*、*Cylindrocladiella* sp.、*Cercospora* sp.、*Dendryphion nanum*、*Phomatospora biseriata*、*Colletotrichum* sp.、*Didymellaceae* sp.。除去文献中已经报道的 *Ilyonectria* 属和 *Fusarium* 属^[9-12],其余 12 株内生真菌未见报道,因此本研究极大地丰富了四川地区黄连内生真菌物种多样性,为后期研究打下良好基础。

黄连作为传统中药,对抗菌抗炎具有良好作用,但在内生菌领域内却鲜有研究,本研究筛选出抑制

响,细胞内容物逐渐外泄,引起胞外大分子含量上升。

扫描电子显微镜结果如图 7 示,对照组细菌形态完整,呈现葡萄串状,表面光滑;加入 MIC 浓度 Cop L01 发酵产物培养 16 ~ 18 h 后,金黄色葡萄球菌表面出现明显粗糙,细胞间出现黏连,细胞凹陷破裂,细菌数量明显减少,菌体形态较正常 *S. aureus* 有显著变化。

S. aureus 生长的黄连内生真菌菌株 Cop L01,属于 *Colletotrichum* sp.。对比国内外文献发现,此类菌是常见的植物内生菌,包括青蒿^[21,22]、石斛^[23]、红豆杉^[24]等植物中均有分离到。同时对于该种菌代谢产物的抑菌活性研究已有不少成果,青蒿内生真菌 *Colletotrichum* sp. 代谢产物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉均有抑菌效果^[21];黄荆内生真菌 *Colletotrichum* sp. 甲醇提取物对多重耐药金黄色葡萄球菌表现出抗菌活性, MIC 值为 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[25]。综上所述,本研究得到的菌株 Cop L01 值得更深入研究,有必要对 Cop L01 代谢产物成分的组成、相关化合物的结构等做进一

步研究,文献中也报道出具有产小檗碱的黄连内生真菌,可进一步探寻黄连内生真菌是否能够产生与宿主相同或相似的次生代谢产物,亦或是有新型活性物质的出现。内生真菌是天然活性物质来源的一大宝库,研究者应全面深入地开发利用这一资源。

参考文献

- Zhao N, et al. Research status and prospect of traditional chinese medicine material named *Coptis chinensis* [J]. J Chongqing Univ Technol; Nat Sci (重庆理工大学学报:自科版), 2015, 29(1): 53-58.
- Editorial Committee of the Flora of China of Chinese Academy of Science. Flora of China (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1979, 27(41): 593-599.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 316-318.
- Wang J, et al. *Coptidis Rhizoma*: a comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. Pharm Biol, 2019, 57(1): 193-225.
- Bai XH, Liu XL, Liu Di, et al. Isolation and Identification of an endophytic bacterium from *Polygonatum cyrtonema* and its antibacterial activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 777-782.
- Brady SF, Wagenaar MM, Singh MP, et al. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus [J]. Org Lett, 2000, 2: 4043-4046.
- Murray CJL, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. Lancet, 2022, 399(10325): 629-655.
- An C, Ma SJ, Shi XW, et al. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of fungal endophytes from *Rohdea chinensis* (Baker) N. Tanaka (synonym *Tupistra chinensis* Baker) of Qinling Mountains, China [J]. PeerJ, 2020, 8: 20.
- Zhang FH, Xiang JH, Cui WX, et al. Isolation and identification of berberine from endophytic fungi HL-Y-3 [J]. China J Chin Mater Med (中药中药杂志), 2016, 41: 2998-3001.
- Li XX, Fang YP, Lai B, et al. Isolation and Identification of berberine-producing endophytic fungus from *Coptis chinensis* Franch. [J]. Acta Agr Sin (草地学报), 2013, 21: 1005-1011.
- Ai HL, Ke YE, Xiao LV, et al. Studies on the chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium tricinctum* of *Coptidis chinensis* [J]. J South-Cent Univ Natl; Nat Sci (中南民族大学学报:自科版), 2020, 39: 488-492.
- Lei XX, Wei PP, Xiao LV, et al. The chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium proliferatum* of *Coptis chinensis* [J]. J South-Cent Univ Natl; Nat Sci (中南民族大学学报:自科版), 2021, 40: 592-596.
- Guo SX. Medicinal Plant Endophyte Biology (药用植物内生真菌生物学) [M]. Beijing: Science Press, 2016: 688.
- Wei JC. Fungal Identification Manual (真菌鉴定手册) [M]. Shanghai: Science and Technology Press, 1979: 101-274.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al. A higher-level phylogenetic classification of the fungi [J]. Mycol Res, 2007, 111: 509-547.
- Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts [J]. Mol Ecol, 1993, 2(2): 113-118.
- Hu JJ, et al. The study on vitro bacteriostasis testing of different plant extracts [J]. J Tarim Univ Agr Reclam (塔里木农垦大学学报), 2004, 16(2): 5-8.
- Ding WJ, Li MZ, Chen ZL, et al. Metabolites of a symbiotic fungus *Aspergillus clavatus* XCE02 from *Plutella xylostella* and their antifungal activities [J]. J South China Agr Univ (华南农业大学学报), 2019, 41(2): 76-81.
- Deng L, Sun R, Yao JP, et al. Antibacterial mechanism of crude extract of *Bacillus velezensis* against *Staphylococcus aureus* [J]. Food Ferment Sci Technol (食品与发酵科技), 2021, 57(3): 1-9.
- Zhang YT, Guo M, Dong LY, et al. Antibacterial effect of *Freesia hybrida* Klatt. essential oil on *Staphylococcus aureus* and its mechanism [J]. Flavour Frag Cosmet (香料香精化妆品), 2021, 10(5): 14-19.
- Lu H, Zou WX, Meng JC, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua* [J]. Plant Sci, 2000, 151(1): 67-73.
- Zou WX, Meng JC, Lu H, et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica* [J]. J Nat Prod, 2000, 63: 1529-1530.
- Ma XY, Nontachaiyapoom S, Jayawardena RS, et al. Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* sp. in China and Northern Thailand [J]. Mycokeys, 2018, 43(6): 23-57.
- Wang YT, Lo HS, Wang PH. Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei* [J]. Bot Stud, 2008, 49(1): 39-43.
- Arivudainambi USE, Anand TD, Shanmugaiah V, et al. Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Fems Immunol Med Microbiol, 2011, 61: 340-345.