

厚朴内生真菌 HPFJ3 菌丝体中抑菌活性物质的 分离纯化及结构鉴定

姜 华 年

(丽水学院 生态学院,浙江 丽水 323000)

摘要: 为了促进厚朴内生真菌资源的开发利用,以一株对小麦全蚀病菌具有较高抑菌活性的厚朴内生真菌黑孢霉 HPFJ3 菌株(*Nigrospora* sp. HPFJ3)为研究材料,对发酵菌丝体甲醇粗提物中能够抑制植物病原菌生长的活性物质进行分析。通过活性指导下的色谱分离,从甲醇提取物中得到3种化合物,质谱(MS)和核磁共振波谱(NMR)鉴定结果表明,3种化合物分别为麦角甾醇、对羟基苯甲酸以及4-羟基-18碳酸。活性检测试验显示,麦角甾醇和对羟基苯甲酸2种化合物对小麦全蚀病菌均具有生长抑制作用,且麦角甾醇的抑菌活性较强,抑菌率达到66.70%;而4-羟基-18碳酸对小麦全蚀病菌无生长抑制作用。

关键词: 内生真菌;黑孢霉;小麦全蚀病菌;化学成分;结构鉴定;抑菌活性

中图分类号: S476;O657 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2016)12-0082-07

Isolation and Identification of Antifungal Compounds from the Mycelium of *Magnolia officinalis* Endophytic Fungus HPFJ3

JIANG Huanian

(College of Ecology, Lishui University, Lishui 323000, China)

Abstract: The methanol extract of the mycelium of *Magnolia officinalis* endophytic fungus *Nigrospora* sp. HPFJ3 having antifungal activity was analyzed to promote exploitation of *Magnolia officinalis* endophytic fungi resources. By means of bioactivity guided isolation by column chromatography and high performance chromatography, three pure compounds were obtained, which were identified as ergosterol, p-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-18 carbonic acid respectively with the methods of MS and NMR. Antifungal activities of the three pure compounds were traced, and the results showed that ergosterol and p-hydroxybenzoic acid exhibited antifungal activity, and ergosterol showed stronger activity against *Gaeumannomyces graminis* with inhibition rate of 66.70%. However, the compound 4-hydroxy-18 carbonic acid showed no inhibitory effect.

Key words: endophytic fungi; *Nigrospora*; *Gaeumannomyces graminis*; chemical constituent; structural identification; antifungal activity

由禾顶囊壳小麦变种(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)侵染小麦引起的全蚀病(wheat take-all)是一种重要的小麦根部病害^[1],主要危害小麦的根部和茎基部,在我国主要小麦产区均有广泛发生,严重制约小麦产量和品质性状的提高。目前,主

要是利用化学药剂防治该病,然而化学农药在使用过程中容易引起环境污染、药害、农产品农药残留超标、农田生态平衡和生物多样性被破坏等问题^[2]。因此生物防治逐步发展成为小麦全蚀病的重要绿色防控技术。

收稿日期:2016-08-01
基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY13C140005)
作者简介:姜华年(1965-),男,浙江遂昌人,副教授,硕士,主要从事植物栽培基础科学的教学与研究。
E-mail:jhn2585736@163.com
网络出版时间:2016-11-25 14:24:33
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/41.1092.S.20161125.1424.030.html>

植物内生菌(endophytic fungus)是指在其生活史的一定阶段或全部阶段生活在健康植物的各组织和器官内部,并不引起植物组织产生明显病害症状的微生物^[3]。内生菌能够与寄主植物协同进化,形成互惠共生的关系,研究表明,植物内生菌及其次生代谢产物不但可以促进寄主植物的生长发育,且能够提高植物抗逆、抗病等方面的能力^[4-7],是筛选开发新型微生物源农药或增产菌剂的重要资源。目前,关于植物内生菌的研究主要集中在药用植物^[8]、农作物^[9]以及特殊生境植物^[10]等,其中从药用植物内生菌代谢产物中寻找新型活性物质,仍是当前内生菌研究的主流之一^[8,11-12]。厚朴(*Magnolia officinalis*)属于木兰科木兰属乔木,为我国特有的经济树种。相关研究表明,厚朴的化学成分主要为厚朴酚、槲皮苷、生物碱等,这些化学成分在医学上具有抗菌、消炎、镇痛等作用,因此,厚朴拥有较大的应用价值和开发价值^[13-14]。丽水学院生态学院植物学课题组前期自厚朴健康茎组织中分离到一株内生真菌 HPFJ3,其在离体条件下对小麦全蚀病菌具有较高抑菌活性,本试验通过抑菌活性指导下的色谱分离技术,对该菌株发酵菌丝体的甲醇粗提物进行分离、纯化、鉴定,以期发现具有抑制植物病原菌活性的化合物,为后续进行微生物源农药的开发奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 生防菌 HPFJ3 为丽水学院生态学院植物学课题组分离自厚朴健康茎组织中的一株内生真菌,在离体条件下对小麦全蚀病菌具有较高抑菌活性,经鉴定其属于黑孢霉属(*Nigrospora*)真菌(NCBI 登录号:KP795394)。

抑菌活性测试菌株为小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*),由丽水学院生态学院植物学课题组保存。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g、水 1 000 mL,pH 值自然。121 ℃ 灭菌 20 min。

马铃薯葡萄糖液体培养基(PD):马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、水 1 000 mL、pH 值自然。121 ℃ 灭菌 20 min。

1.1.3 仪器和试剂 主要仪器:SENCO R-502B 型旋转蒸发器由上海申胜生物技术公司生产;SIG-MA3K30 高速台式冷冻离心机由北京博励行仪器有限公司生产;高效液相色谱仪(SP930D 高压泵、

UV730D 检测器、Autochro2000 色谱工作站、SDV30 混合器)由韩国 YOUNGLIN 公司生产;分析柱 ODS₂ C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)、制备柱 ODS₂ C₁₈(20 mm×250 mm,5 μm)均为美国 Waters 公司生产;HPLC-MS、ESI 离子源(6210 Time of Flight LC/MS)均为美国 Agilent 公司生产;核磁共振仪(400 MHz)由美国 BRUKER 公司生产。

主要试剂:柱层析硅胶(70~150 μm)由中国医药集团上海化学试剂公司生产;GF254 高效薄层硅胶板由青岛海洋化工厂分厂生产;色谱纯甲醇、色谱纯乙腈由江苏恒安试剂公司生产;分析纯乙酸乙酯、分析纯甲醇及分析纯石油醚均为上海一試化学试剂有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 厚朴内生真菌 HPFJ3 的发酵及甲醇粗提物制备 种子液制备:将 HPFJ3 菌株接种至装有 100 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,在(26±2)℃、150 r/min 条件下摇床培养 4~5 d,获得种子液;发酵产物制备:相同条件下,将种子液分别转接到装有 300 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基的 1 000 mL 锥形瓶中,摇床培养 7 d,共获得发酵产物 30 L。

菌株 HPFJ3 的发酵产物经离心机离心、过滤,分别得到发酵液和菌丝体。将菌丝体冷冻干燥至恒质量后称质量,在固液比 1:5、40~50 ℃ 的条件下,依次用分析纯甲醇浸提 3 次,每次 8~10 h,浸提液于 50 ℃ 真空浓缩蒸干,得浸膏 6.48 g,即为 HPFJ3 菌丝体的甲醇粗提物。

1.2.2 厚朴内生真菌 HPFJ3 甲醇粗提物的分离与纯化 将 HPFJ3 菌丝体的甲醇提取物(6.48 g)用适量甲醇溶解后,用薄层层析硅胶 H60(15 g)拌样,石油醚饱和薄层层析硅胶 H60 装柱(层析柱直径 4.5 cm、高 100 cm),利用柱层析技术对甲醇提取物进行初步分离纯化,分离过程中利用石油醚:乙酸乙酯:甲醇洗脱系统进行梯度洗脱,自动收集,逐管点样进行薄层分析(展开剂为乙酸乙酯:甲醇=10:1,显色剂为硫酸-水溶液和碘化铋钾试剂)^[15],最终得到 10 个组分。

1.2.3 10 个组分的抑菌活性检测 将 10 个不同组分低温浓缩称质量,分别取样品若干,用无菌水配制成 2 mg/mL 的母液。吸取 10 个不同组分的母液各 500 μL 于无菌培养皿(直径 9 cm)内,与 10 mL PDA 培养基迅速混匀,制成混合平板,以加入无菌水为空白对照。采用菌丝生长速率法^[16-18]对 10 个不同组分进行抑菌活性检测,处理组和空白对照组

各设 3 个重复,25 ℃ 恒温培养,待空白对照满皿后,用十字交叉法测量处理组菌落直径。处理组对小麦全蚀病菌菌丝生长的抑制率按如下公式计算:菌丝生长抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。

1.2.4 活性组分抑菌物质的分离纯化和结构鉴定

1.2.4.1 活性组分 5 中抑菌物质分离纯化 将活性组分 5 配制成约 1 mg/mL 的样品溶液,进行高效液相色谱(HPLC)分析,以甲醇 0~100%、水 100%~0 的梯度进行梯度洗脱,洗脱速度为 1 mL/min,洗脱时间 30 min。二极管阵列检测器(DAD)检测波长为 200~400 nm。

根据活性组分 5 的 HPLC 分析结果,将活性组分 5 溶于甲醇中,配成 50 mg/mL 的质量浓度,进样 0.8 mL,进行样品制备。制备柱为 Waters ODS₂ 反相 C₁₈,规格为 20 mm×250 mm,粒径 5 μm;流动相:0~5 min 100% 水,5~15 min 20% 甲醇,15~25 min 40% 甲醇,25~40 min 60% 甲醇,40~60 min 80% 甲醇,60~80 min 100% 甲醇。洗脱速度 15 mL/min,检测波长 210 nm。80% 甲醇梯度洗脱得化合物 1。

1.2.4.2 活性组分 8 中抑菌物质分离纯化 将活性组分 8 配制成约 1 mg/mL 的样品溶液,进行 HPLC 分析,以甲醇 0~100%、水 100%~0 的梯度进行梯度洗脱,洗脱速度为 1 mL/min,洗脱时间 40 min。DAD 检测波长为 200~400 nm。

根据活性组分 8 的 HPLC 分析结果,将活性组分 8 溶于甲醇中,配成 125 mg/mL 的质量浓度,进样 0.6 mL,进行样品制备。制备柱为 Waters ODS₂ 反相 C₁₈,规格为 20 mm×250 mm,粒径 5 μm;流动相:0~10 min 100% 水,10~20 min 20% 甲醇,20~25 min 40% 甲醇,25~40 min 60% 甲醇,40~60 min 100% 甲醇。洗脱速度 15 mL/min,检测波长 260 nm。分别于 20% 甲醇和 100% 甲醇梯度下洗脱得化合物 2 和化合物 3。

1.2.4.3 化合物的结构鉴定 借助液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)、核磁共振波谱分析(¹H-NMR、¹³C-NMR)等技术对获得的化合物进行结构鉴定。

1.2.5 3 种化合物的抑菌活性检测

采用菌丝生长速率法检测 3 种化合物对小麦全蚀病菌生长的抑制作用。3 种化合物分别用无菌水配制成 0.5 mg/mL 的母液,接下来的操作同 1.2.3。设置无菌水为空白对照,75% 多菌灵可湿性粉剂(购自江苏省江阴农药厂)稀释 800 倍液为阳性对照。25 ℃ 恒温培养,待空白对照长满皿后,用十字

交叉法测量处理组菌落直径,计算 3 种化合物对小麦全蚀病菌菌丝生长的抑制率。

2 结果与分析

2.1 厚朴内生真菌 HPFJ3 甲醇粗提物的分离纯化结果

本研究利用常压硅胶柱色谱、高效液相色谱等技术对厚朴内生真菌 HPFJ3 甲醇粗提物以及活性化合物进行分离、纯化和制备。

2.1.1 活性组分的初步分离 对厚朴内生真菌 HPFJ3 甲醇粗提物过柱后的 10 个组分进行抑菌活性测定,发现小麦全蚀病菌可在含组分 1、组分 2 以及组分 10 的培养基上生长,说明这 3 个组分对小麦全蚀病菌的生长无抑制作用;其余 7 个组分中,组分 5 和组分 8 有较好的抑菌活性,其在 0.1 mg/mL 的质量浓度下对小麦全蚀病菌的生长抑制率分别达到 44.62%、33.52%(表 1)。在后续试验中,对上述 2 个组分进行分离纯化,以期得到具有抑菌活性的化合物单体。

表 1 甲醇粗提物过柱后的 10 个组分对小麦全蚀病菌的抑菌活性

组分编号	含量/mg	菌丝生长抑制率/%
1	93	-10.4±0.72
2	105	-7.3±1.16
3	134	0.85±0.38
4	612	5.6±1.42
5	1 750	44.62±0.84
6	1 200	16.86±1.37
7	602	20.52±0.98
8	710	33.52±0.24
9	920	8.1±1.45
10	854	-0.5±1.36

2.1.2 活性组分的分离纯化 利用甲醇-水梯度洗脱法对活性组分 5 和组分 8 分别进行分离纯化,共得到 3 种化合物,色谱分析发现此 3 种化合物在洗脱过程中均仅有 1 个主峰出现,试管收集主峰,进一步的高效薄层色谱分析(HPTLC)和 HPLC 分析均表明主峰为纯化合物,制备收集化合物,经脱溶、真空冷冻干燥最终得到化合物 1(12.6 mg)、化合物 2(6.3 mg)和化合物 3(11.4 mg)。

2.2 3 种化合物的结构鉴定结果

2.2.1 化合物 1

2.2.1.1 质谱分析 取纯化后的冻干粉配制成 0.1 mg/mL 的甲醇溶液进行 HPLC-MS 分析。结果显示,阳离子模式 M/Z:397.297 5(M+H)⁺ 峰(图 1)。由于化合物 1 的分子量和氢分子量的和为

397,可知化合物 1 的分子量为 396,可能分子式为 $C_{28}H_{44}O$ 。

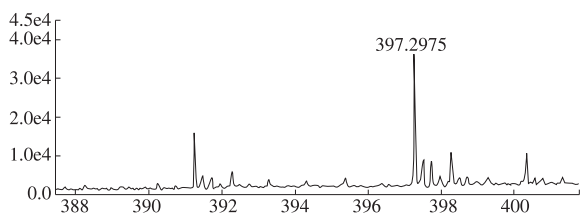


图 1 化合物 1 的质谱分析 (+Q)

利用 Chapman & Hall 天然产物数据库检索分子量为 396 的相关化合物,发现麦角甾醇(9-glucopyranosyl theophylline)的分子量为 396;此外,麦角甾醇为白色粉末状化合物,与本研究得到的化合物 1 物理性状一致。因此,初步推断化合物 1 可能为麦角甾醇。

2.2.1.2 核磁共振波谱分析(NMR) 为进一步证实前面的推断,本研究继续用 NMR 进行分析。¹H 图谱(图 2)显示该化合物具有典型的甾醇类化合物特征,经与标准谱对照,发现该图谱与麦角甾醇的图谱一致,在此基础上又进行了碳谱(图 3)及 DEPT 135 图谱(图 4)分析。¹³C 谱给出了 28 个碳的信号,而 DEPT 135 图谱表明该化合物有多个 CH_2 和处于环交接处的 CH 峰,因此,结合¹³C 谱与 DEPT 135 图谱分析可知,该化合物有 5 个季碳、6 个甲基、7 个亚甲基、10 个次甲基,其中 6 个不饱和和碳分别为甾醇的 5、6、7、8、22、23 位的碳原子,位移值为 70.35 的是接羟基的碳原子,这些与麦角甾醇完全一致。结合质谱、氢谱以及碳谱,可知此化合物为麦角甾醇(图 5)。

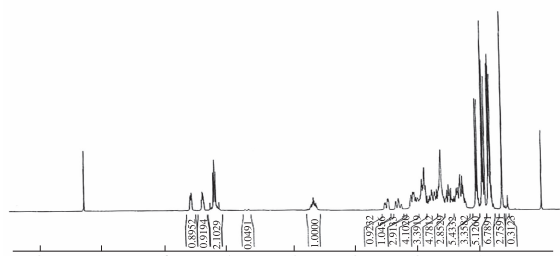


图 2 化合物 1 的核磁共振氢谱

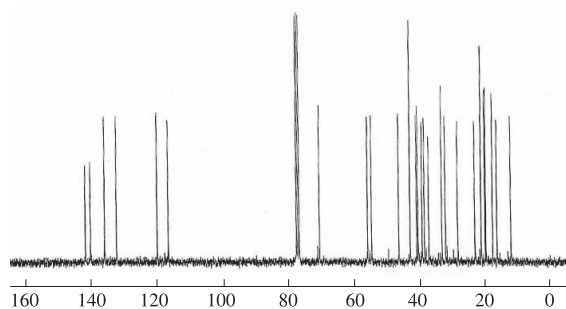


图 3 化合物 1 的核磁共振碳谱

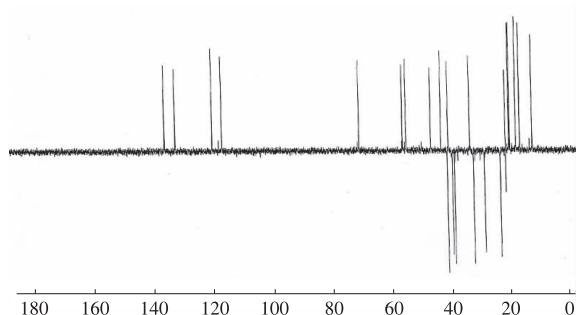


图 4 化合物 1 的 DEPT 135 图谱

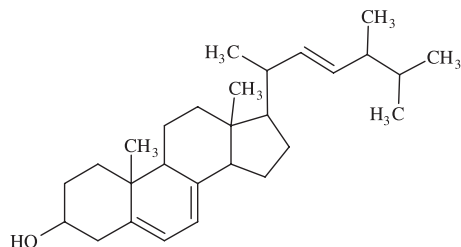


图 5 麦角甾醇结构

2.2.2 化合物 2

2.2.2.1 质谱分析 质谱分析表明,该化合物阴离子流信号较强,而阳离子流信号相对较弱,说明该化合物可能是一种偏酸性的化合物。阴离子模式 M/Z :137.0254 ($M - H$) 峰,93.0362 ($M - COOH$) 峰(图 6);阳离子模式 M/Z :139.0507 ($M + H$) 峰(图 7)。由此可知,化合物 2 的分子量为 138,含有 1 个羧基,可能分子式为 $C_7H_6O_3$ 。

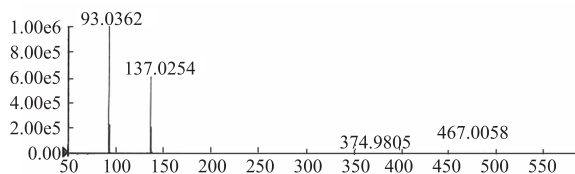


图 6 化合物 2 的质谱分析 (-Q)

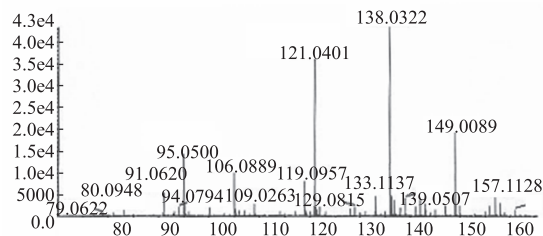


图 7 化合物 2 的质谱分析 (+Q)

利用 Chapman & Hall 天然产物数据库检索分子量为 138 的相关化合物,发现目前报道的对羟基苯甲酸的分子量恰好是 138,因此,可初步推断化合物 2 为对羟基苯甲酸。

2.2.2.2 ¹H 核磁共振图谱分析 该化合物在位移值为 6.8 和 7.8 处有 2 个相互耦合的峰,耦合常数

为 8.2 左右,可能是苯环对位取代后 2 组相互耦合的氢,也可能是苯环上 2 个偶位耦合的氢(图 8)。结合质谱分析结果(该化合物含有 1 个羧基),可知该化合物为对羟基苯甲酸,结构式见图 9。

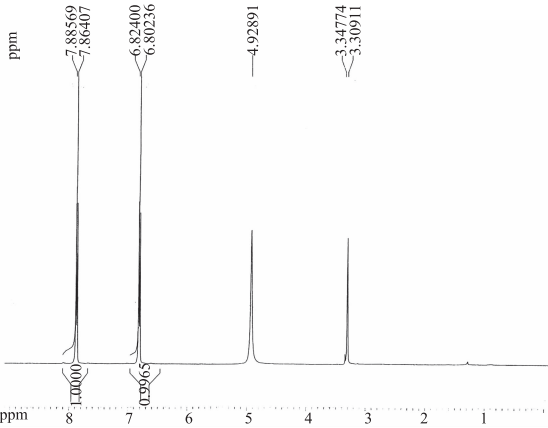


图 8 化合物 2 的核磁共振氢谱

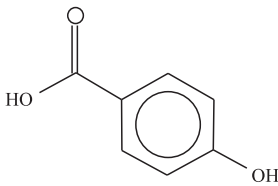


图 9 对羟基苯甲酸结构

2.2.3 化合物 3

2.2.3.1 质谱分析 化合物 3 的阳离子图谱如图 10,结合其碳谱(图 11)及氢谱(图 12),可分析推断 $M/Z = 323.2$ 为化合物 3 的 $M + Na^+$ 峰,而相对于 323.2 的其他峰 $M/Z = 274.4$ 、 $M/Z = 246.3$ 等均为杂质峰,化合物 3 的分子量为 300.0,分子式可能为 $C_{18}H_{36}O_3$,且不饱和度 = 1。

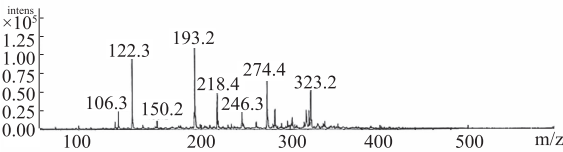


图 10 化合物 3 的质谱分析 (+Q)

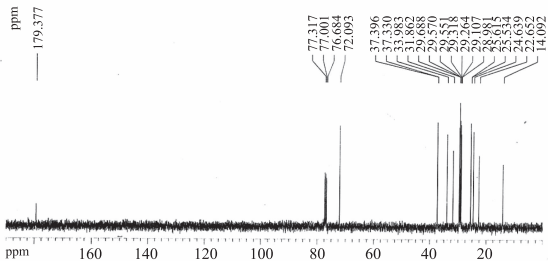


图 11 化合物 3 的核磁共振碳谱

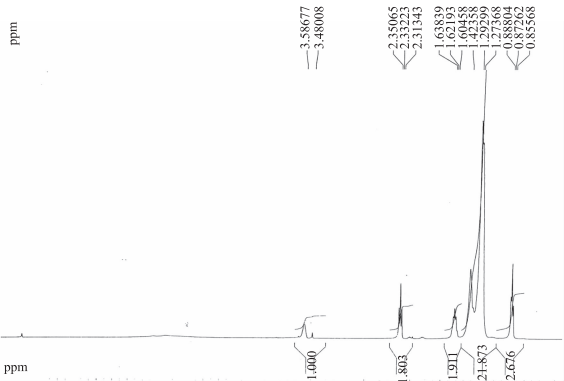


图 12 化合物 3 的核磁共振氢谱

2.2.3.2 NMR 分析 化合物 3 的碳谱(图 11)显示,在 $\delta = 179.377$ ppm 处有 1 个羧基碳,说明此化合物为羧酸类物质,其含有的 3 个氧中有 2 个属于羧酸,而 $\delta = 72.093$ ppm 处有一连杂原子的碳,因此可推断出 $\delta = 72.093$ ppm 处的碳必然连有羟基。在此化合物的 ^{13}C 图谱上可明显看到, $\delta = 14.092$ ppm 处有一甲基碳, $\delta 22 \sim \delta 37$ 之间恰好是 16 个脂肪碳。此外,由碳谱上可观察到有 3 个碳信号峰 ($\delta 31 \sim \delta 37$) 偏向低场,它们可能是靠近羧基和羟基,而另外 3 个偏向较高场的碳信号峰 ($\delta 14 \sim \delta 24$) 应是末端甲基和亚甲基,中间信号较相近的则是脂肪烃的中间重复的亚甲基。推断该化合物可能是 4 - 羟基 - 18 碳酸。

在该化合物的氢谱(图 12)上可看到典型的脂肪烃的特征,从氢的总数上来看,氢的总数为 30,少于分子式中的 36,此结果可能与测试仪器存在的误差有关。从 $\delta = 3.5$ ppm 的大致位移来看,可能是羟基氢的位移值,此分析结果与碳谱推断的结果一致。而且图中 $\delta = 2.3$ ppm 处的 3 重峰是临近羰基碳的氢,而 $\delta = 1.6$ ppm 处的则为临近连羟基碳的氢,此推论与前面估计羟基在 4 位的推断一致。通过对化合物 3 的核磁共振分析,可知此化合物为 4 - 羟基 - 18 碳酸,结构式见图 13。

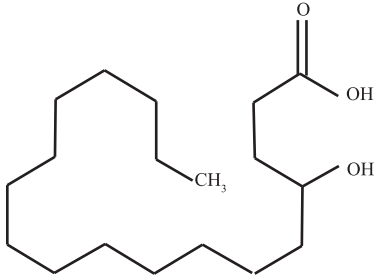
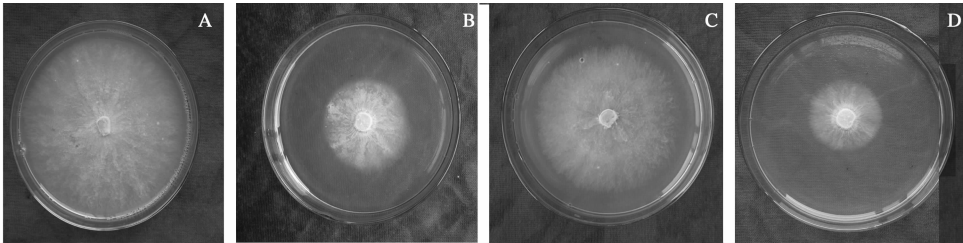


图 13 4 - 羟基 - 18 碳酸结构

2.3 3 种化合物的抑菌活性

从表 2 可看出,化合物 4 - 羟基 - 18 碳酸对小

麦全蚀病菌的生长无抑制作用,全蚀病菌可以在含有 4-羟基-18 碳酸的培养基上生长;麦角甾醇和对羟基苯甲酸均对小麦全蚀病菌的生长有抑制作用(图 14),其中麦角甾醇对小麦全蚀病菌的抑制作用最强,达 66.70%,与阳性对照多菌灵溶液对小麦全蚀病菌的抑制率(68.09%)相当。



A. 无菌水(阴性对照);B. 麦角甾醇;C. 对羟基苯甲酸;D. 75% 多菌灵可湿性粉剂 800 倍液(阳性对照)

图 14 2 种化合物对小麦全蚀病菌菌丝生长的抑制作用

3 结论与讨论

本研究从厚朴内生黑孢霉 HPFJ3 液体发酵产物菌丝体的甲醇提取物中分离鉴定了 3 个化合物,分别为麦角甾醇、对羟基苯甲酸、4-羟基-18 碳酸。黑孢霉属(*Nigrospora*)真菌在多种植物体内广泛存在^[19-21],能够产生多种活性代谢产物,如从药用植物红豆杉中分离得到的内生黑孢霉菌株能产生紫杉醇^[19],从一种蕨类植物分离的稻黑孢霉可产生具有抗细菌活性的萜醌类化合物卷线孢菌素^[22],且卷线孢菌素已作为重要的生防化合物应用于植物病害的防治。本试验中,对上述 3 种化合物进行抑菌活性测试发现,麦角甾醇、对羟基苯甲酸对小麦全蚀病菌具有抑菌活性,且麦角甾醇的抑菌活性较显著,对小麦全蚀病菌的抑菌率达到 66.70%。相关研究报告^[23],麦角甾醇大量存在于食药菌中,是微生物细胞膜的重要组成部分,也是一种极其重要的医药化工原料,可以用来生产黄体酮、可的松等药物。本试验首次发现麦角甾醇对小麦全蚀病菌有较强的抑菌作用,产生这一现象可能是因为麦角甾醇在和植物病原真菌互作的过程中形成氧化产物-麦角甾醇过氧化物,这种过氧化物具有促进肿瘤细胞凋亡、抗炎、抗氧化等药理作用^[24-26],从而在一定程度上抑制小麦全蚀病菌的生长。该推测有待于进一步的研究证明。

黑孢霉属真菌能够产生比较丰富的生物活性物质,是发现活性代谢产物的主要真菌类群之一^[19-22]。本试验表明,厚朴内生黑孢霉 HPFJ3 发酵菌丝体含有具抑菌活性的化合物麦角甾醇、对羟基苯甲酸。此外,在研究过程中由于一些代谢产物含

表 2 3 种化合物对小麦全蚀病菌的抑菌活性	
样品	菌丝生长抑制率/%
化合物 1(麦角甾醇)	66.70a
化合物 2(对羟基苯甲酸)	33.42b
化合物 3(4-羟基-18 碳酸)	-3.50c
多菌灵(阳性对照)	68.09a

注:表中所列数据为 3 个重复的平均值,同列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

量较低或其组成较为复杂,不能对其进行有效地分离和结构鉴定,因此,在后续试验中还需进一步优化发酵条件,并尽可能采用精确的分离纯化技术,深入挖掘 HPFJ3 次生代谢产物中的活性物质,以促进该类真菌资源及其活性代谢产物的开发与应用。

参考文献:

[1] 刘亚飞,刘振东,郭瑞林. 小麦全蚀病抗病性研究进展及其育种途径探讨[J]. 河南农业科学,2012,41(9): 6-9.

[2] 彭娟. 小麦内生细菌对小麦全蚀病的生物防治研究[D]. 开封:河南大学,2008.

[3] 孙辉. 植物内生真菌多样性及其共生作用[J]. 现代农业科技,2012(18):143-145.

[4] Wäli P R, Helander M, Saloniemi I, et al. Variable effects of endophytic fungus on seedling establishment of fine fescues[J]. Oecologia,2009,159(1):49-57.

[5] Ghimire S R, Charlton N D, Craven K D. The mycorrhizal fungus, *Sebacina vermifera*, enhances seed germination and biomass production in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) [J]. Bioenergy Research,2009,2:51-58.

[6] Frank W, Beate A, Helmut B, et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2005,102(38):13386-13391.

[7] Istifadah N, Saleeba J A, Mcgee P A. Isolates of endophytic *Chaetomium* spp. inhibit the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* in vitro[J]. Canadian Journal of Botany,2006,84(84):1148-1155.

[8] Ji Z Q, Wu W J, Wang M A, et al. Identification of fungicidal compounds from endophytic fungi *Fusarium proliferans*

- eratum* in *celastrus angulatus* [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forest, 2005, 33 (5): 61-64.
- [9] Yu H, Zhang L, Li L, *et al.* Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes [J]. Microbiological Research, 2010, 165 (6): 437-449.
- [10] Kumaresan V, Suryanarayanan T S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community [J]. Mycological Research, 2001, 105 (11): 1388-1391.
- [11] 李凯, 袁鹤. 植物病害生物防治概述 [J]. 山西农业科学, 2012, 40 (7): 807-810.
- [12] 俞婕, 赵凯鹏, 董飞, 等. 野生铁皮石斛内生菌的分离及促生作用研究 [J]. 现代农业科技, 2010 (9): 96-97.
- [13] 张淑洁, 钟凌云. 厚朴化学成分及其现代药理研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36 (5): 838-843.
- [14] 李慧. 厚朴中有效成分活性检测及结构鉴定 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2010.
- [15] 丁婷, 邵颖, 樊美珍. 中国被毛孢发酵液中一种镇静催眠活性物质的分离纯化和结构鉴定 [J]. 菌物学报, 2008, 27 (6): 956-963.
- [16] 赵淑莉, 任飞娥, 刘金亮, 等. 玉米大斑病生防放线菌的筛选鉴定及发酵条件优化 [J]. 微生物学报, 2012, 52 (10): 1228-1236.
- [17] 孙微微, 丁婷. 杜仲内生真菌中抗苹果炭疽病活性菌株的筛选 [J]. 安徽农业大学学报, 2013, 40 (6): 981-987.
- [18] 孙微微. 杜仲内生真菌的分离纯化及活性菌株在小麦中的定殖研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- [19] Ruiz-Sanchez J, Flores-Bustamante Z R, Dendooven L, *et al.* A comparative study of Taxol production in liquid and solid-state fermentation with *Nigrospora* sp. a fungus isolated from *Taxus globosa* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109 (6): 2144-2150.
- [20] Xu J, Aly A H, Wray V, *et al.* Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata* [J]. Tetrahedron Letters, 2011, 52 (1): 21-25.
- [21] Lopes A A, Pupo M T. Biosynthesis of aphidicolin proceeds via the mevalonate pathway in the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica* [J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2011, 22 (1): 80-85.
- [22] Tanaka M, Fukushima T, Tsujino Y, *et al.* Nigrosporins A and B, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae* [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61 (11): 1848-1852.
- [23] 樊晓飞. 食药菌中麦角甾醇的免疫活性及其 VD 转化 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- [24] Takei T, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, *et al.* Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2005, 69 (1): 212-215.
- [25] Kobori M, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, *et al.* Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells [J]. British Journal of Pharmacology, 2007, 150 (2): 209-219.
- [26] Kim S W, Park S S, Min T J, *et al.* Ergosterol peroxide (5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 β -ol) in *Armillariella mellea* [J]. Bulletin of Korean Chemical Society, 1999, 20 (7): 819-823.