

绶草内生真菌化学成分相关性的研究

程玉鹏^{1,2}, 匡海学¹, 高宁¹, 胡凤¹, 侯素云³, 王振月^{1*}

1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025

3. 石家庄以岭药业股份有限公司, 河北 石家庄 050035

摘要: **目的** 探讨绶草内生真菌与其宿主化学成分的相关性, 为阐明药用植物真菌与宿主植物产生相同或相似化学成分的机制奠定基础。**方法** 采用 HPLC 法对绶草及其内生真菌各提取部位进行色谱分析, 并利用 SPSS16.0 软件对色谱结果进行聚类, 得到绶草内生真菌之间化学成分的相关性。**结果** 绶草内生真菌石油醚提取物的聚类规律不明显; 醋酸乙酯提取物及水饱和正丁醇提取物均表现为分离自同一部位的真菌倾向于聚类在同一分支, 相同种属的内生真菌同样倾向于聚类在同一分支, 且以醋酸乙酯提取物表现最为明显。**结论** 绶草内生真菌石油醚提取物之间的相关性最小, 醋酸乙酯提取物与真菌分离部位相关性最为明显, 与真菌的种属同样存在较大的相关性。

关键词: 绶草; 药用植物; 内生真菌; 聚类分析; HPLC

中图分类号: R282.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)11-2305-07

Correlations of chemical constituents in endophyte isolated from *Spiranthes sinensis*

CHENG Yu-peng^{1,2}, KUANG Hai-xue¹, GAO Ning¹, HU Feng¹, HOU Su-yun³, WANG Zhen-yue¹

1. Pharmaceutical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. College of life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China

3. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China

Abstract: Objective To discuss correlations between the chemical constituents of different endophytic fungi and their host and provide basis of researching the mechanism of some endophytic fungi which have the abilities to produce the same or similar chemical constituents as their host plant product. **Methods** Chemical compounds derived from the endophytic fungi and their host *Spiranthes sinensis* were tested by HPLC, and the correlation data were analysed by SPSS16.0. **Results** The clustering is not obvious between petroleum ether extracts of fungi; the result of study on the ethyl acetate extracts and water-saturated *n*-butanol extracts showed that fungi isolated from the same organ tended to cluster together and the same species fungi tended to cluster together. **Conclusion** Correlation among the petroleum ether extracts of the fungi is not obvious. The correlation between the ethyl acetate extracts are the most obvious in organ from which the fungi isolated and within the species.

Key words: *Spiranthes sinensis* (Pers) Ames; medicinal plants; endophyte; cluster analysis; HPLC

绶草 *Spiranthes sinensis* (Pers) Ames 为兰科绶草属多年生草本植物, 生于湿草地、山坡林下或草丛中, 全国各地均有分布, 被列为国家二级濒危保护植物^[1], 具有益气养阴、清热解毒的功效。在民间用作治疗糖尿病、呼吸系统疾病、抗病毒、抗肿瘤等, 极具开发前景^[2]。然而绶草植株矮小、资源稀缺, 严重制约了这一药用植物的研究与利用。植

物内生真菌的研究表明, 某些植物内生真菌能够产生与宿主相同或相似的化学成分^[3], 特别是一些药用植物内生真菌能够产生宿主植物的有效成分, 这就为药用植物的开发及濒危药用植物资源的保护提供了新的思路, 并为解决绶草的稀缺问题找到了解决方案^[4-5]。然而, 目前对于内生真菌与其宿主产生相同成分的机制还并不清晰^[6], 相关理论也仅停留

收稿日期: 2011-04-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30970300); 黑龙江中医药大学重点基金资助项目(200506); 黑龙江省博士后基金资助项目(LBH-Z08008)

作者简介: 程玉鹏(1966—), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 副教授, 主要从事药用植物内生真菌与宿主相关性及其分子机制的研究。

Tel: (0451)82195994 E-mail: yupengcheng@msn.com

*通讯作者 王振月 Tel: 13314514353 E-mail: Wangzhen_yue@163.com

在假说和推演的阶段^[7-8], 缺乏实践支持, 这使得相关内生真菌的筛选缺少相应的理论指导, 盲目性与随机性较大, 降低了筛选的效率与成功率。

本实验以本课题组分离得到的绶草内生真菌作为实验材料, 采用 3 种不同极性的溶剂分步提取, 得到绶草及其内生真菌的次生代谢产物, 利用 HPLC 对内生真菌及其宿主的化学成分进行了研究, 采用 SPSS16.0 分析了绶草内生真菌与其宿主化学成分之间的相关性, 为阐明内生真菌产生与宿主具有相同或相似化学成分的机制提供科学依据。

1 材料与仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪、Waters 2996 二极管阵列检测器、Empower 工作站 (美国 Waters 公司)、Inertsil ODS-3 C₁₈ 反向色谱柱 (日本 GL Sciences 公司)、HZQ—F160 振荡培养箱 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)、二级 B2 型生物安

全柜 (北京东联哈尔仪器制造有限公司)。

色谱甲醇 (DIMA Technology INC)、纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、蔗糖等均为分析纯。

绶草采自黑龙江省大兴安岭地区图强林业局, 经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为兰科绶草属植物 *Spiranthes sinensis* (Pers) Ames。内生真菌为本课题组自绶草中分离得到^[4], 见表 1。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

采集绶草全草, 蒸馏水洗净, 60 ℃ 烘干, 粉碎, 过 80 目筛, 得绶草药材粉末。取 1.0 g 绶草药材粉末, 依次用 50 mL 石油醚、50 mL 醋酸乙酯、50 mL 水饱和正丁醇, 各提取 2 次, 每次超声提取 30 min, 合并溶剂并回收至干, 得相应部位的提取物。

内生真菌接种于马铃薯蔗糖液体培养基中, 28℃、

表 1 绶草内生真菌鉴定结果

Table 1 Identification of endophyte isolated from *S. sinensis*

编 号	种 属	编 号	种 属
R1	柱格孢属 <i>Ramularia</i> Sacc.	S9	小尾孢属 <i>Cercospora</i> Sacc.
R2	镰刀孢属 <i>Fusarium</i> Link ex Fr.	S10	曲霉属 <i>Aspergillus</i> (Mich.) Link
R3	镰刀孢属 <i>Fusarium</i> Link ex Fr.	S11	青霉属 <i>Penicillium</i> Link ex Fr.
R4	镰刀孢属 <i>Fusarium</i> Link ex Fr.	S12	枝孢属 <i>Cladosporium</i> Link
R5	镰刀孢属 <i>Fusarium</i> Link ex Fr.	S13	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
R6	镰刀孢属 <i>Fusarium</i> Link ex Fr.	S14	未知
R7	镰刀孢属 <i>Fusarium</i> Link ex Fr.	L1	未知
R8	曲霉属 <i>Aspergillus</i> (Mich.) Link	L2	未知
R9	青霉属 <i>Penicillium</i> Link ex Fr.	L3	未知
R10	曲霉属 <i>Aspergillus</i> (Mich.) Link	L4	未知
R11	瘤菌根菌属 <i>Epulorhiza</i>	L5	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
R12	曲霉属 <i>Aspergillus</i> (Mich.) Link	L6	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
R13	瘤菌根菌属 <i>Epulorhiza</i>	L7	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
R14	小尾孢属 <i>Cercospora</i> Sacc.	L8	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
R15	瘤菌根菌属 <i>Epulorhiza</i>	L9	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
R16	瘤菌根菌属 <i>Epulorhiza</i>	L10	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
R17	瘤菌根菌属 <i>Epulorhiza</i>	L11	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
S1	镰刀孢属 <i>Fusarium</i> <i>Fusarium</i> Link ex Fr.	L12	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
S2	未知	L13	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
S3	小尾孢属 <i>Cercospora</i> Sacc.	L14	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
S4	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.	L15	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
S5	长蠕孢属 <i>Helminthosporium</i> Link ex Fr.	L16	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
S6	长蠕孢属 <i>Helminthosporium</i> Link ex Fr.	L17	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
S7	未知	L18	链格孢属 <i>Alternaria</i> Nees ex Wallr.
S8	曲霉属 <i>Aspergillus</i> (Mich.) Link		

R-从根中分离得到, S-从茎中分离得到, L-从叶中分离得到
R-obtained from roots, S-obtained from stems, L-obtained from leaves

160 r/min 振荡培养 7~10 d。将发酵液与菌体共同倒入蒸发皿中, 60 °C 水浴蒸干得内生真菌发酵产物。取 5 g 内生真菌发酵产物, 依次用 200 mL 石油醚、200 mL 醋酸乙酯、200 mL 水饱和正丁醇, 超声提取 30 min, 回收溶剂至干, 得相应部位的绶草内生真菌提取物。

称取绶草及其内生真菌各部位提取物, 将石油醚与醋酸乙酯部位提取物溶解, 制得 20 mg/mL 溶液, 将正丁醇部位提取物制成 50 mg/mL 溶液。经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

取 300 mL 马铃薯蔗糖液体培养基, 60 °C 水浴蒸干, 依次用 200 mL 石油醚、200 mL 醋酸乙酯、200 mL 水饱和正丁醇, 超声提取 30 min, 回收溶剂至干, 将石油醚与醋酸乙酯部位提取物溶解制得 20 mg/mL 溶液, 将正丁醇部位提取物定容成 50 mg/mL 溶液。经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 得相应部位空白对照。

2.2 色谱条件的选择^[9]

利用二极管阵列检测器对绶草样品进行全波长扫描, 综合考虑出峰数量、各色谱峰吸收强度与分离情况等, 采用 254 nm 作为检测波长。色谱柱为 Inertsil ODS-3 C₁₈ 反向色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 40 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μ L。流动相甲醇(A)-水(B); 石油醚提取物线性梯度洗脱, 0 min, 65% A; 0~50 min, 100% A; 醋酸乙酯提取物线性梯度洗脱, 0 min, 50% A; 0~50 min, 85% A; 50~51 min, 100% A; 51~60 min, 100% A; 水饱和正丁醇提取物线性梯度洗脱, 0 min, 5% A; 0~50 min, 80% A; 50~51 min, 100% A; 51~60 min, 100% A。

2.3 精密度试验

取绶草供试品溶液, 连续进样 5 次, 色谱峰相对保留时间的 RSD 小于 3.0%, 主要色谱峰相对峰面积 RSD 小于 5.0%。

2.4 稳定性试验

取绶草供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 各主要色谱峰相对保留时间 RSD 小于 3.0%, 相对峰面积 RSD 小于 5.0%。

2.5 重现性试验

分别称取 5 份绶草药材粉末, 按“2.1”项中所述方法制备供试品溶液, 按“2.2”项中所述测定其 HPLC 图谱, 各主要色谱峰保留时间与相对峰面积 RSD 均小于 3.0%。

2.6 样品的测定

分别制备绶草及其内生真菌各部位提取物的供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 记录绶草及其内生真菌色谱图中各色谱峰的保留时间与峰面积。绶草不同极性提取部位的色谱图, 见图 1。

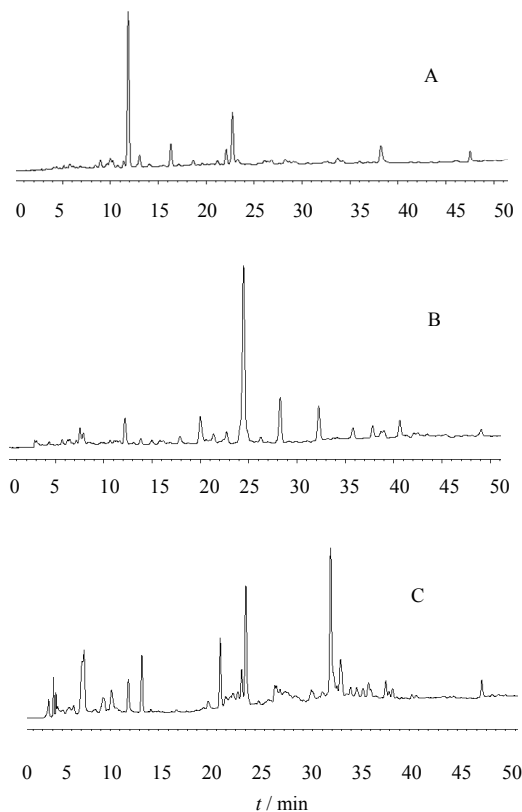


图1 绶草石油醚(A)、醋酸乙酯(B)和正丁醇(C)提取部位 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of petroleum ether (A), ethylacetate (B), and *n*-butanol (C) extracting fractions from *S. sinensis*

2.7 绶草内生真菌及其宿主化学成分相关性分析

采用 SPSS16.0 软件中的 Hierarchical Cluster 程序对结果进行分析, Z score 法消除各变量数量极差后, 选取 Between-groups linkage 和 Euclidean distance 方法聚类, 得出各样品化学成分相似性, 并绘制出聚类结果树状图。

3 结果与分析

3.1 绶草及其内生真菌石油醚部位化学成分聚类分析结果

除菌 R11 (被污染) 外, 对绶草及其 48 个内生真菌菌株进行聚类分析, 见图 2。绶草及其内生真菌的石油醚提取物主要分为 5 组。菌 R3、S2、L5、

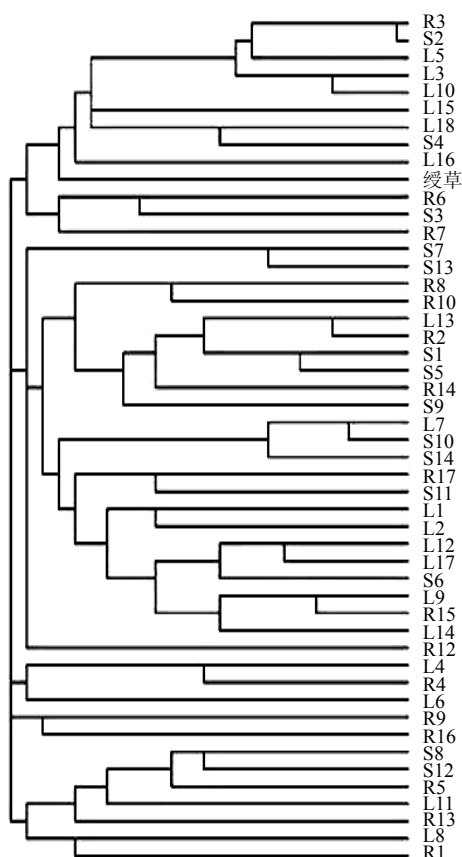


图 2 纓草及其内生真菌石油醚提取物聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of petroleum ether extracts from *S. sinensis* and its endophyte

L3、L10、L15、L18、S4、L16、R6、S3、R7 与纓草归为一组；菌 S7、S13、R8、R10、L13、R2、S1、S5、R14、S9、L7、S10、S14、R17、S11、L1、L2、L12、L17、S6、L9、R15、L14、R12 归为一组；L4、L6、R4 归为一组；R9、R16 归为一组；S8、S12、R5、L11、R13、L8、R1 归为一组。菌 L19、L3、L10 处于同一分类组，且化学成分相近，三者均从叶中分离得到。L18、S4 成分相近，二者均为链格孢属真菌。S7、S13 化学成分相近，二者均从茎中分离得到。R8、R10 化学成分相近，二者均为根中分离得到的曲霉属真菌。S1、S5 化学成分相近，二者均从茎中分离得到。L1、L2 化学成份相近，二者均从茎中分离得到。L12、L17 化学成分相近，二者均为叶中分离得到的链格孢属真菌。由纓草及其内生真菌石油醚部分的聚类分析结果可以看出，部分内生真菌表现出其化学成分与其种属及分离部位存在一定的相关性。然而，其他菌种聚类的规律性不明确，与其种属及分离部位不存在明显相关性。

3.2 纓草及其内生真菌醋酸乙酯部位化学成分聚类分析结果

除菌 R16（被污染）外，对纓草及其 48 个内生真菌菌株进行聚类分析，见图 3。纓草及其内生真菌的醋酸乙酯提取物主要分为 8 组。菌 R2、R3、R13、R6、R4、R17、R12、R1、R5、S1、S4、S5、R8、R10 归为一组；L4、L17、R14、L5、S2、L8、L10、L9、L6、S10、S6、L16、L15、L14、S13 归为一组；L3、L18 归为一组；L11、S9、S8、L13、L12、L7、L2、S12、S7、L1 归为一组；S3、S14 归为一组；另外，菌 R9、R15 以及纓草分别独立成组，与其他真菌化学成分相关性较小。根中分离得到的内生真菌除菌 R9、R14 与 R15 外，其余都聚类于同一组中，且该组除还含有三株茎中分离得到的内生真菌外，与其他部位分离得到的内生真菌相关性较低；表明相同组织部位分离得到的内生真菌其化学成分具有一定的相似性。叶中分离得到的内生真菌中，菌 L4、L17、L5、L8、L10、L9、L6、L16、L15、L14 处于同一组中，菌 L3 与 L18 处于同一组中，菌 L11、L13、L12、L7 与 L1 处于同一组中，且除菌 L1 外，其他各菌在组内距离均较近，相关性较高，同样表现出宿主体内环境对内生真菌化学成分的影响。茎中内生真菌中，菌 S4 与 S5 距离较近、菌 S10 与 S6 距离较近、菌 S8 与 S9 距离较近、菌 S12 与 S7、菌 S3 与 S14 距离较近，然而，总体来说，茎中分离得到的内生真菌散布在各分支内部，表明茎中分离得到的内生真菌各菌株化学成分之间相关性较差。在各菌种属间化学成分对比分析来看，菌 R2、R3、R7、R6、R4 同属于镰刀孢属，在聚类分析结果中也处于同一分支，距离较近；菌 R8 与 R10 同属于曲霉属，在聚类分析结果中处于同一分支，距离较近；菌 R9 作为青霉属真菌独立分支，与其他种属内生真菌相似度均较低；菌 L8、L10、L9、L6 同为链格孢属，聚类分析结果显示其距离较近，相似度较高；菌 L16、L14、L15、S13 同为链格孢属，聚类分析结果显示其距离较近，相似度较高；以上结果能够反映出内生真菌的醋酸乙酯部位提取物具有一定的种属特异性，然而，从总体分布来看，聚类在一起的同属内生真菌基本都是从相同组织部位分离得到的，不同部位分离得到的同属内生真菌其相关性并不明显。可以看出，纓草及其内生真菌醋酸乙酯部位提取物相关性主要表现为内生真菌分离部位的组织特异性，而菌种之间的种属特异性不明显。

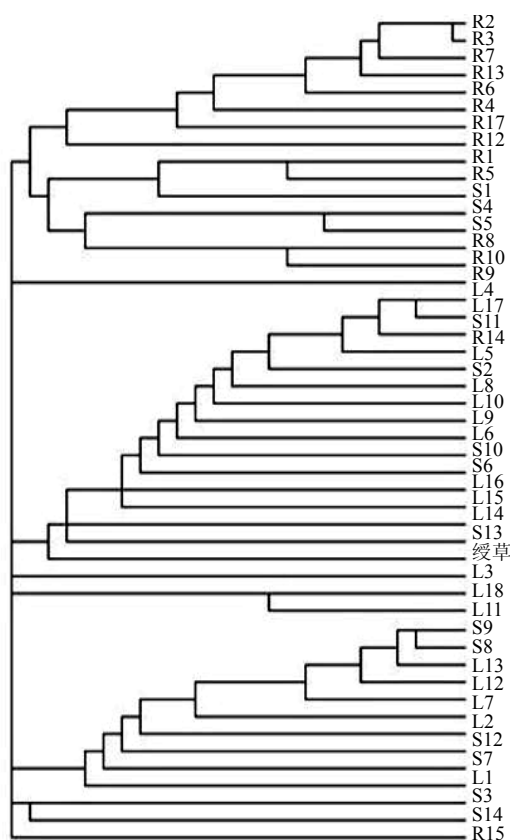


图 3 缙草及其内生真菌醋酸乙酯提取物聚类分析图

Fig. 3 Dendrogram of ethyl acetate extracts from *S. sinensis* and its endophyte

3.3 缙草及其内生真菌水饱和正丁醇部分化学成分聚类分析结果

从图 4 可以看出, 缙草及其内生真菌水饱和正丁醇提取物共可分为 4 组。菌 L3、L18 归为一组; 菌 S12、缙草分别独立成组; 其他真菌归为一组。菌 R2、R5、R3 化学成分相近, 处于同一分支, 且都为根中分离得到的镰刀菌属真菌。菌 L5、L17 化学成分相近, 处于同一分支, 且都为叶中分离得到的链格孢属真菌。菌 L14、L15、L16 化学成分相近, 处于同一分支, 且均为叶中分离得到的链格孢属真菌。菌 S8、S9 处于同一分支, 均为茎中分离得到的内生真菌。菌 R4、R7、S1 化学成分相近, 处于同一分支, 且均为镰刀孢属真菌, 特别是 R4 与 R7 同为根中分离得到, 二者的相似度大于与菌 S1 的相似度, 表现出一定的组织特异性。菌 R8、R9、S12 为枝孢霉属真菌, 其化学成分与其他种属真菌化学成份相近, 且均为根中分离得到的内生真菌。菌 R16、R17 化学成分较近, 处于同一分支, 二者均为根中分离得到的瘤菌根菌属真菌。菌 L3、L18

化学成分相近, 且均为根中分离得到的内生真菌。缙草药材水饱和正丁醇提取物与其内生真菌提取物也无明显相关性, 独立分支。综合看来, 缙草内生真菌的水饱和正丁醇提取物与真菌分离部位及其种属存在一定相关性, 但并不明显, 并未见到多数分离自同一部位或同一种属的内生真菌聚类在同一分支, 可见, 缙草内生真菌的水饱和正丁醇提取物仅在部分菌株之间表现出与组织来源及种属具有一定的相关性。

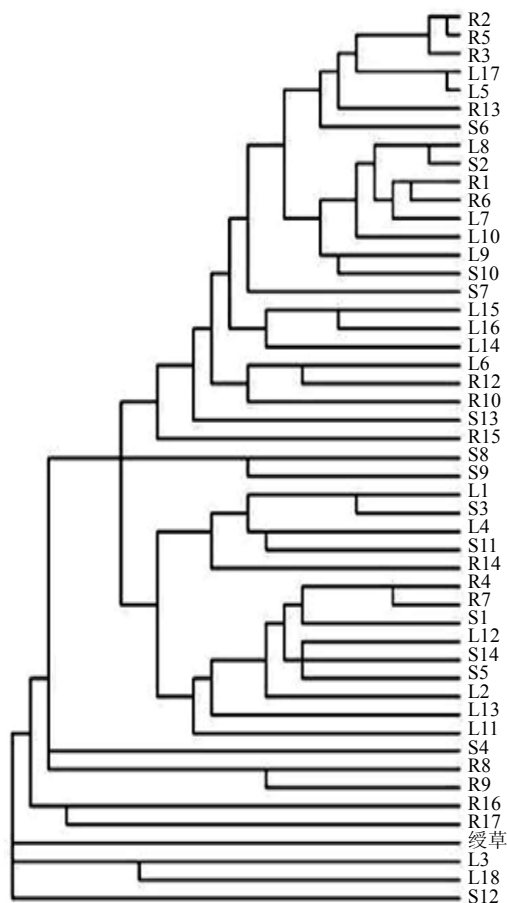


图 4 缙草及其内生真菌水饱和正丁醇提取物 HPLC 聚类分析图

Fig. 4 Dendrogram of water-saturated *n*-butanol extracts from *S. sinensis* and its endophyte

4 讨论

4.1 缙草与内生真菌之间化学成分的相关性

通过化学成分对比分析发现, 缙草内生真菌石油醚提取物之间的相关性最小, 聚类的规律性并不明显; 水饱和正丁醇提取物则在部分菌株之间表现出一定的组织来源与种属的特异性。而缙草内生真菌醋酸乙酯提取物的组织来源特异性最为明显, 同

时表现出一定的种属特异性。具体表现为,在绶草及其内生真菌醋酸乙酯提取物分析过程中发现,大部分从根中分离得到的内生真菌明显聚成一类,从叶中分离得到的内生真菌同样具有较近的距离。

这一结果如按照现有的“内共生理论”解释^[10],可以理解为,作为兰科植物的绶草,其在生长过程中需要内生真菌为其提供营养并促进种子萌发^[11],绶草及其内生真菌在根与茎中分别形成了局部的“真菌-宿主”共生体系^[12],真菌与宿主及真菌与真菌之间均存在显著影响^[13]。在长期的进化过程中,“绶草及其内生真菌共生体”内宿主或某些真菌的部分有益的生化途径传入到共生体内,同时这些生化途径同样能够通过共生体传递到其他真菌中,被其他真菌所利用,因此共生体内各真菌表现出了较明显的“协同进化”^[8],并在代谢产物中体现出趋同的趋势,形成了绶草内生真菌次生代谢产物的组织特异性^[14]。

同时,分析发现,茎中分离得到的绶草内生真菌在各极性提取物中均未表现出趋同的情况,即各菌种散布于整个聚类分解结果的各个分支。分析其原因,可能是由于不同于根与叶中形成的长期稳定的“宿主-真菌”共生体系,绶草的茎每年仅在开花时生长,随后枯萎,生长时间短,因此其各菌之间相互作用时间短、影响小、没有一个稳定的共生体,使得茎中分离得到的内生真菌依然保持原来的化学成分特点,并未出现趋同的变异趋势,因此茎中分离得到的内生真菌之间化学成分相关性较小。

4.2 培养基对分析结果的影响

内生真菌长期与宿主共生^[15],二者代谢活动相互影响,使得内生真菌的代谢产物在宿主体内与体外培养时存在一定差异^[16]。马铃薯蔗糖培养基是完全营养的培养基,能够满足真菌生长的营养要求,因此本实验选用其作为真菌发酵的培养基以期能够使内生真菌的次生代谢产物充分产生。实验早期,本课题组曾在培养基中添加少量绶草提取物用以模拟内生真菌在宿主体内的环境,然而结果并不尽如人意。首先,所加提取物的浓度对真菌生长发育有一定影响,高浓度提取物还表现出抑制某些真菌生长的情况,因此在一定程度上加大了所需考察的因素,并使后期的各组内生真菌相关性数据分析的可比性大大降低;其次,向培养基中添加绶草提取物使得后续的检测工作难度加大,特别是一些与宿主相同的色谱峰,难以判断该色谱峰是由于真菌本身基因产生、抑或转化宿主成分所得、更或者是培养

基本身的宿主提取物所致;第三,内生真菌与宿主细胞是共生关系,二者之间存在相互作用及物质交流,但其相互的物质交流是有一定选择性的,而保证这一交流顺利进行需要完整的细胞结构,因此单纯的向培养基中添加宿主成分无法准确模拟内生真菌在宿主体内的真实情况。本课题组进一步拟通过建立植物细胞与内生真菌共培养体系的办法,考察真菌与宿主细胞共生情况下的代谢产物及其之间的关系,并与真菌在完全培养基中的代谢产物进行对比,探讨宿主细胞对内生真菌代谢产物的调控作用。

4.3 检测手段的选择

高效液相色谱法具有高效、快速、灵敏等特点,是目前药用植物内生真菌次生代谢产物研究的主要手段之一,广泛应用于各种属植物的内生真菌及植物分析研究中^[17-19]。当然,其局限性也是比较明显的,主要表现为 HPLC 是以化合物的极性作为分离依据的,无法判断具有相同色谱峰的化合物是具有相同的化学结构,抑或仅为具有相同母核的不同衍生物,深入研究还需要将相应的化合物分离纯化并进行波谱分析才能确定。考虑到目前检测技术的发展情况,有条件的实验室可以采用 LC-MS 以及 LC-MS/MS 方法进行检测,将有助于加快实验进程,降低后续的化合物鉴定分析的工作量,从而达到提高实验效率的目的。相关工作将在后续研究中开展。

参考文献

- [1] 国家环境保护总局. 中国珍稀濒危保护植物名录 [M]. 北京: 中国科学院植物研究所, 1987.
- [2] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [3] Stierle A, Strobel G A, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* [J]. *Science*, 1993, 260: 214-216.
- [4] 程玉鹏, 王振月, 李慧玲, 等. 盘龙参内生真菌分布特征的研究 [J]. 中国林副特产, 2008(2): 22-23.
- [5] 陈雪英, 都晓伟, 李 演. 内生菌与药用植物活性成分相关性研究进展 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2008, 23(2): 47-51.
- [6] Priti V, Ramesha B T, Singh S, *et al.* How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites [J] *Curr Sci*, 2009, 97(4): 477-478.
- [7] Hawksworth D L. *The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role in Sustainable Agriculture* [M]. London: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 1991.

- [8] 曾松荣, 徐成东, 王海坤, 等. 药用植物内生真菌及其宿主相同活性成分的机制初探 [J]. 中草药, 2000, 31(4): 306-307.
- [9] 王振月, 左月明, 康毅华, 等. 不同产地毛脉酸模药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1385-1388.
- [10] Otero J T, Ackerman J D, Bayman P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-link fungi from tropical orchids [J]. *Am J Bot*, 2002, 89(11): 1852-1858.
- [11] Smith S E, Read D J. *Mycorrhizal symbiosis* [M]. London: Academic Press, 1997.
- [12] Kumar D, Hyde K D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii* [J]. *Fungal Diver*, 2004, 17: 69-90.
- [13] Krohn K, Ullah Z, Hussain H, et al. Massarilactones E—G, new metabolites from the endophytic fungus *Coniothyrium* sp., associated with the plant *Artimisia maritima* [J]. *Chirality*, 2007, 19(6): 464-470.
- [14] Tao G, Liu Z Y, Hyde K D, et al. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae) [J]. *Fungal Diver*, 2008, 33: 101-122.
- [15] Redman R S, Dunigan D D, Rodriguez R J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader [J]. *New Phytol*, 2001, 151: 705-716.
- [16] Arnold A E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers [J]. *Fungal Biol Revi*, 2007, 21: 51-66.
- [17] 沈 智, 张文婷, 黄琴伟, 等. RP-HPLC 法测定菊花中 3, 5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷和绿原酸 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 307-310.
- [18] 郑国栋, 蒋 林, 杨得坡, 等. HPLC 法同时测定不同产地广陈皮中 5 种活性黄酮成分 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 652-655.
- [19] Yin H, Zhao Q, Sun F M, et al. Gentiopicroin-producing endophytic fungus isolated from *Gentiana macrophylla* [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(8): 793-797.

欢迎订阅 2012 年《中国新药杂志》

《中国新药杂志》创刊于 1992 年, 是由国家食品药品监督管理局主管, 中国医药科技出版社、中国医药集团总公司和中国药学会共同主办的国家级药学核心期刊, 主编为全国人大常委会副委员长桑国卫院士, 编委会成员包括我国医药界 18 名院士在内的 147 名药学领军专家。是中国科技核心期刊、中国科技论文统计源期刊、全国中文核心期刊、中国精品科技期刊、中国期刊方阵‘双效’期刊。

本刊跟踪世界新药研发前沿, 报道我国新药注册信息和审评技术, 刊登最新临床试验研究成果, 介绍近 1~2 年世界上市新药, 登载药物经济学、药理学、毒理学、药物化学、药剂学、药物分析、生物化学、微生物学、分子生物学及其相关学科的原创研究论文和综述。本刊兼具权威性、前沿性、学术性、创新性、时效性、实用性的特点, 深受广大医药工作者喜爱, 读者已经遍布 33 个国家和地区。《中国新药杂志》是我国药学领域高水平学术期刊, 在医院、高等院校、研发机构、制药企业、药检部门等拥有广泛的读者, 年发行量 30 万册。现已被美国《化学文摘 (CA)》、荷兰《医学文摘 (EmBase)》、《国际药学文摘 (IPA)》、《中国药学文摘》、中国学术期刊综合评价数据库等多家国内外权威检索数据库收录。

《中国新药杂志》为半月刊, 每月 15 日和 30 日出版, 国内外公开发行。国外定价: 12 美元/期, 全年 288 美元; 国内定价: 30 元/期, 全年 720 元。国际连续出版物号 ISSN: 1003-3734, 国外代号: M4240, 国内统一刊号 CN11-2850/R, 邮发代号: 82-488。

邮局汇款: 北京市西城区北三环中路乙 6 号伦洋大厦 8 层 邮编: 100120

全 称: 《中国新药杂志》有限公司

银行汇款: 建行北京科技馆支行账号: 1100 1059 1000 5926 1092

全 称: 《中国新药杂志》有限公司

电 话: 010-82282303, 010-82282289 (传真) 联系人: 达娃卓玛

网 址: <http://www.newdrug.cn> E-mail: xyzz711@sohu.com