

研究报告



厦门杏林湾红树林根际真菌分离及活性分析

郭梦捷 赵箫杨 韩佳卉 魏尚竹 徐秀丽*

中国地质大学(北京)海洋学院 北京 100083

摘要:【背景】海洋微生物是天然药物资源宝库,海洋环境中的微生物能够产生很多区别于陆生微生物的天然产物。红树林生长于陆地与海洋交界带的滩涂浅滩,是陆地向海洋过渡的特殊生态系统,可能蕴含着丰富的微生物资源和潜在的大量结构新颖的代谢产物。【目的】以厦门杏林湾红树林根际海泥和海水为研究对象,探索其中可培养海洋真菌的多样性及其发酵提取物的抗菌和抗真菌活性,以期为发现新的药物先导化合物提供菌株资源。【方法】样品预处理后涂布于 GPY、PDA、Martin 和 MEA 这 4 种培养基,28 °C 倒置培养,待培养基上长出合适大小的菌落后,挑取单菌落接种于 PDA 培养基纯化。利用纸片扩散法对发酵提取物进行抗菌活性筛选,通过高效液相色谱分析提取物的化学多样性,并采用形态观察结合 rDNA ITS 序列分析对活性较好的 4 株真菌进行菌种鉴定。【结果】共分离出 71 株真菌,其中 49 株真菌对金黄色葡萄球菌有抗性,6 株真菌对白色念珠菌有抗性,2 株真菌对大肠杆菌有抗性,菌株 HS5-MEA-4 和 HS6-MEA-10 初步鉴定为土曲霉,菌株 HS5-GPY-7 和 HS6-GPY-15 分别为棘孢曲霉和 *Aspergillus templicola*。【结论】初步认知了厦门杏林湾红树林环境真菌多样性及其发酵提取物的活性和化学多样性特征,为后续海洋真菌次级代谢产物研究提供了依据。

关键词: 杏林湾, 海泥, 海水, 海洋真菌, 鉴定, 抗菌活性

Isolation and activity analysis of fungi from the rhizosphere of mangroves in Xinglin Bay, Xiamen

GUO Mengjie ZHAO Xiaoyang HAN Jiahui WEI Shangzhu XU Xiuli*

School of Ocean Sciences, China University of Geosciences (Beijing), Beijing 100083, China

Abstract: [Background] Marine microorganism is a treasure pool of natural medicine resources. Marine microorganisms produced many natural products that are different from those produced by terrestrial microorganisms. Mangroves grow in tidal flats at the junction of land and ocean, it is a special ecosystem transitioning from land to ocean, and may contains abundant microbial resources and potentially a large number of metabolites with novel structures. [Objective] This study takes sea mud and sea water from the rhizosphere of mangroves in Xinglin Bay, Xiamen as the research object, to explore the diversity of

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFC0311001); Innovation and Entrepreneurship Training Program of China for College Students of China University of Geosciences (Beijing) (201911415086)

*Corresponding author: Tel: 86-10-82322162; E-mail: xuxl@cugb.edu.cn

Received: 21-08-2020; Accepted: 25-10-2020; Published online: 15-01-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0311001); 中国地质大学(北京)大学生创新创业训练计划(201911415086)

*通信作者: Tel: 010-82322162; E-mail: xuxl@cugb.edu.cn

收稿日期: 2020-08-21; 接受日期: 2020-10-25; 网络首发日期: 2021-01-15

culturable marine fungi and the antibacterial and antifungal activities of the extracts, to provide strain resources for the discovery of new drug lead compounds. **[Methods]** After pretreatment, the samples were coated on GPY, PDA, Martin and MEA media respectively, and were cultured upside down at 28 °C. Single colonies were selected and inoculated in PDA media to yield fungal strains. The antimicrobial activity of the extracts of the isolated fungi were screened by disk diffusion test and the biodiversity of the crude extracts were evaluated by high performance liquid chromatography, and four active fungi were identified by colony morphology and rDNA ITS sequence analysis. **[Results]** A total of 71 fungi were isolated, 49 of which showed bioactivity against *Staphylococcus aureus*, 6 against *Candida albicans* and 2 against *Escherichia coli*. HS5-MEA-4 and HS6-MEA-10 were identified as *Aspergillus terreus*, HS5-GPY-7 and HS6-GPY-15 were identified as *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus templicola*, respectively. **[Conclusion]** The activity characteristics of fungal extracts from the marine sedimentary environment of Xinglin Bay, Xiamen were preliminarily revealed, which provides resources for the subsequent biodiversity of antibacterial and antifungal secondary metabolites.

Keywords: Xinglin Bay, sea mud, sea water, marine fungi, identification, antibacterial activity

海洋是生命的摇篮, 蕴藏着全球 80%以上的物种^[1], 而且由于海洋环境具有高盐、缺氧、避光、低温、寡营养等特点^[2], 能够产生很多有别于陆生微生物的结构新颖、活性独特的天然产物, 如萜类、大环内酯类、醌类、生物碱等^[3]。海洋生物次级代谢产物与陆地生物相比有着很大的化学多样性, 并且结构和生理功能均与陆地生物有很大不同, 主要表现在分子骨架的重排、迁移和高度氧化, 以及分子结构庞大、复杂与手性原子多等, 因此海洋天然产物的特异结构和药理作用是其他化合物无可比拟的^[4]。海洋天然产物被认为是天然药物资源宝库, 其中海洋微生物、海藻与海洋无脊椎动物是海洋天然活性物质的三大来源^[5]。随着陆生生物资源日渐匮乏, 从海洋微生物的次级代谢产物中寻找开发有别于陆栖微生物产生的生理活性物质, 已经成为当前天然产物研究的一个重要方向^[6-7]。

福建沿海位于我国东海和南海交汇地带, 其物质与能量信息分别来自东海和南海, 具有强潮流, 受黑潮及其分支、南海暖流和东海环流等多种不同水系的影响, 形成了独具特色的海洋沉积环境^[8-10]。红树林生长于陆地与海洋交界带的滩涂浅滩, 是陆地向海洋过渡的特殊生态系统, 被认为是充满活力的生态圈, 可能蕴含着丰富的微生物资源和大量潜在的结构新颖的代谢产物^[11-12]。本研究以厦门杏林湾红树林根际海泥和海水为研究对象, 探索其可培

养海洋真菌的多样性及其抗细菌、抗真菌活性, 以期发现新的药物先导化合物提供菌株资源。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 样品和活性检测指示菌

海泥和海水样品采集于厦门杏林湾, 共采集红树林根际周围 1 个海水样品(HS1)和 7 个海泥样品(HS2-8)。

抗菌指示菌株为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923)、白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC10231)和大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC11775), 本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

甲醇(分析纯)、二氯甲烷(分析纯), 北京化工厂; 甲醇(色谱纯), 天津市康科德科技有限公司; 氯霉素, 上海阿拉丁试剂有限公司; 链霉素, 北京博迈德基因技术有限公司。超净工作台, 苏州宏瑞科技有限公司; 恒温干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司; 高效液相色谱仪, Agilent Technologies Incorporated 公司。

1.1.3 培养基

真菌分离纯化选用葡萄糖蛋白胨酵母膏培养基(GPY)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马丁培养基(Martin Medium)和麦芽提取物琼脂培养基(MEA)这 4 种常用培养基^[13]。

真菌发酵选用大米培养基:称取 20.00 g 大米于 250 mL 锥形瓶中,加入 30 mL 蒸馏水浸泡。

1.2 方法

1.2.1 分离纯化

将配制好的分离培养基倒于锥形瓶,用封口膜覆盖瓶口, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min,室温下冷却至合适温度(60 °C 左右),分别加入氯霉素和链霉素至终浓度为 200 μ g/mL,摇匀,以抑制原核微生物生长,倒平板^[14]。将海泥样品置于超净工作台吹干 12 h,称取 1 g 于 9 mL 无菌水中,再从中取 1 mL 加入 9 mL 无菌水,分别取 200 μ L 均匀涂布于 GPY、PDA、Martin 和 MEA 培养基;海水样品直接取 200 μ L 均匀涂布于上述 4 种培养基。

待培养基晾干,放入培养箱中,28 °C 倒置培养,观察并记录真菌的生长情况。待培养基上长出合适大小的菌落后,挑取单菌落接种于 PDA 培养基^[15],根据采样点以及菌落形态、大小、色泽等的不同逐步分离菌落,并分别接种于 PDA 培养基,在 28 °C 下培养纯化^[7,16]。

1.2.2 真菌发酵及活性分析

将配制好的大米培养基装入 250 mL 锥形瓶,包好封口膜 1×10^5 Pa 灭菌 20 min,60%甘油管灭菌(1×10^5 Pa, 20 min) 3 次。

接种针灭菌并烘干,用接种针切取约 1 cm² 菌体于 60%甘油保存备用,同时切取约 1 cm² 菌体接于大米培养基进行小试发酵,28 °C 培养 30 d,观察菌株生长情况并记录。

固体发酵产物用乙酸乙酯:甲醇(8:2, 体积比)提取,500 W 超声 20 min。提取液使用孔径 11 μ m 的定性滤纸过滤后(过滤前若混合液分层,弃下层水层),使用旋转蒸发仪减压浓缩至干燥,加入 1 mL 甲醇:二氯甲烷(1:1, 体积比)混合溶剂溶解提取物,摇匀后取 100 μ L 于 1.5 mL 的离心管,剩余加入 96 孔深孔板,再向圆底烧瓶加入甲醇,洗出提取物,加入离心管和 96 孔深孔板。

将离心管中提取物配平,13 000 r/min 离心 3 min,取上清液于高效液相色谱(HPLC, Agilent 1200)样

品瓶,用于 HPLC 分析(进样量 10–30 μ L),采用 Agilent Eclipse XDB-C8 Column, 5 μ L, 150 mm \times 4.6 mm 色谱柱^[17],设置进样条件如表 1 所示。

采用纸片扩散法^[15]进行抑菌实验,指示菌株为金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和大肠杆菌。取供试样品 20 mg 溶解于 1 mL 甲醇溶液中,配制浓度为 20 mg/mL 待测样品备用。在无菌 50 mL 离心管中倒入 10 mL LB 液体培养基,挑取菌落大小 1 mm 左右的病原菌混悬于培养基中,37 °C、200 r/min 培养 16–18 h,于 50 °C LB 固体培养基加入 1%菌液,摇匀倒平板,平板冷凝后置于 4 °C 备用。在每个直径为 0.6 cm 圆形无菌滤纸片上加入 5 μ L 待测样品,空白对照为甲醇溶液,待滤纸片干燥后均匀铺在平板上^[15]。将培养基于 4 °C 放置 2 h 后,置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h,观察并测量抑菌圈的直径^[18]。

1.2.3 rDNA ITS 序列鉴定

用接种针切取约 1 cm² 菌体于离心管中,加入 800 μ L DNA 提取试剂,加入一颗细胞破碎珠,将离心管对称置于 SCIENTZ-48 高通量组织研磨器中,破碎菌体细胞,获得待测菌株基因组 DNA。采用真菌通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3')和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA CAAGG-3')扩增 rDNA ITS 序列^[19–20]。

PCR 反应体系^[21] (50 μ L): 10 \times Buffer 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μ L, MgCl₂ (2.5 mmol/L) 5 μ L,模板 DNA 5 μ L,引物 ITS4 和 ITS5 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O

表 1 HPLC 分析洗脱条件

Table 1 Elution conditions for HPLC analysis

时间 Time (min)	乙腈 Acetonitrile (%)	纯水 Pure water (%)	三氟乙酸 Trifluoroacetic acid (%)	流速 Flow rate (mL/min)
0	10	90	0.01	1.0
15	100	0	0.01	1.0
20	100	0	0.01	1.0
21	10	90	0.01	1.0
25	10	90	0.01	1.0

25.5 μL 。PCR 反应条件^[21]: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 共 37 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

采用 DNAMAN 软件分析 PCR 产物测序结果, 确定 rDNA ITS 序列范围, 除去两端非 rDNA ITS 序列部分, 在 NCBI 数据库中进行 rDNA ITS 序列相似性比对。采用 MEGA 软件分析个体间遗传距离, 并通过自展分析做置信度检测, 自展数据集为 1 000 次, 基于 rDNA ITS 之间的同源性, 采用邻接法构建系统发育树^[22]。

2 结果与讨论

2.1 菌株分离

如图 1 所示, 共分离出 71 株真菌。其中, 从海水样品 HS1 中分离得到 1 株真菌, 从 7 个海泥样品中分离到 70 株真菌。说明海泥中营养相对丰富, 有利于真菌生长, 提示海洋真菌的分离应选择营养相对丰富的样品进行研究。

2.2 活性分析

真菌代谢产物抗菌活性实验结果如表 2 所示, 菌株 HS1-PDA-1、HS2-PDA-5、HS2-MEA-8、HS4-Martin-3 等 49 株真菌的发酵产物对 *S. aureus* 具有抗性。其中, 菌株 HS4-GPY-1、HS6-MEA-10、HS8-MEA-2、HS8-MEA-7、HS8-GPY-8、HS8-GPY-10、HS8-GPY-13 对 *S. aureus* 抗性较强; 菌株 HS2-GPY-2、HS3-Martin-1、HS4-GPY-1、HS5-Martin-5、HS7-GPY-1、HS8-PDA-5 对 *C. albicans* 具有抗性, 而且后二者抗性较强; 菌株 HS5-GPY-7、HS6-GPY-7 对 *E. coli* 具有抗性且前者比后者略强。

对上述真菌的发酵产物进行 HPLC 分析, 检测波长为 254 nm, 菌株 HS5-MEA-4、HS5-GPY-7、HS6-MEA-10 和 HS6-GPY-15 等的活性较好, 而且菌株 HS5-MEA-4、HS6-MEA-10 和 HS6-GPY-15 的 HPLC 分析色谱峰非常丰富, HS5-GPY-7 色谱峰简单明确, 有潜力进行进一步的化合物分离, 其 HPLC 分析结果如图 2 所示。

2.3 菌株初步鉴定

对分离获得的 4 株真菌 HS5-MEA-4、HS5-GPY-7、HS6-MEA-10、HS6-GPY-15 的 rDNA ITS 序列进行 PCR 扩增并测序。与 NCBI 数据库中已知菌的 rDNA ITS 序列进行相似性比对, 序列相似性结果如图 3 所示。

结合菌落形态和 rDNA ITS 序列分析, 将菌株 HS5-MEA-4 和 HS6-MEA-10 初步鉴定为土曲霉 (*Aspergillus terreus*), 菌株 HS5-GPY-7 初步鉴定为棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*), 菌株 HS6-GPY-15 初步鉴定为 *Aspergillus templicola*。

3 结论

在本次实验中首先对厦门杏林湾 1 个海水样品和 7 个海泥样品中的可培养真菌进行研究, 分离过程中考虑到不同培养基的适用性, 采用葡萄糖蛋白胨酵母膏培养基(GPY)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马丁培养基(Martin Medium)、麦芽提取物琼脂培养基(MEA)这 4 种培养基, 共分离出了 71 株真菌。其中, 1 株来源于海水, 70 株来源于海泥, 8 号样品中分离到 12 株真菌, 真菌多样性最为丰富。真菌代谢产物对病原菌的抗性实验显示, HS1-PDA-1、HS2-PDA-5、HS2-MEA-8、HS4-Martin-3 等 49 株真菌的发酵产物对 *S. aureus* 具有抗性; 菌株 HS2-GPY-2、HS3-Martin-1、HS4-GPY-1、HS5-Martin-5、HS7-GPY-1、HS8-PDA-5 对 *C. albicans* 具有抗性; 菌株 HS5-GPY-7、HS6-GPY-7 对 *E. coli* 具有抗性。利用高效液相色谱对活性较好的发酵产物的化学多样性进行分析, 其中 HS5-MEA-4、HS6-MEA-10 和 HS6-GPY-15 具有很好的化学多样性。此外, 对活性较好且色谱峰较为明确的 4 株真菌 HS5-MEA-4、HS5-GPY-7、HS6-MEA-10、HS6-GPY-15 进行分类学鉴定, 结合其菌落形态和 rDNA ITS 序列分析, 菌株 HS5-MEA-4 和 HS6-MEA-10 初步鉴定为土曲霉(*A. terreus*), 菌株

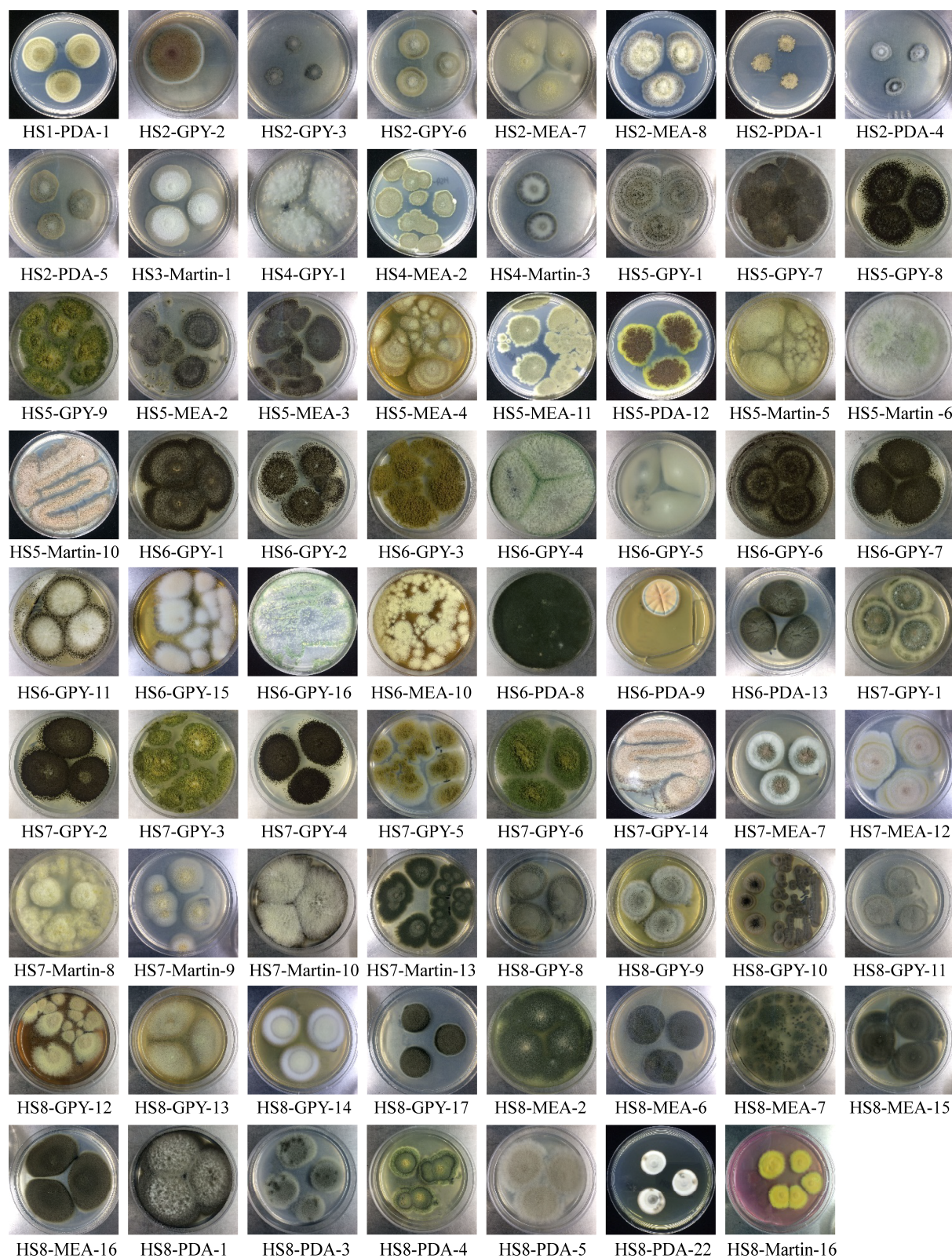


图 1 分离出菌株的菌落形态

Figure 1 Morphology of the isolated strains

表 2 真菌代谢产物抗菌活性实验结果

Table 2 Antibacter activity of metabolites of fungi

菌株	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	大肠杆菌
Fungal strains	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>
HS1-PDA-1	0.7	—	—
HS2-GPY-2	—	0.8	—
HS2-PDA-5	1.0	—	—
HS2-MEA-8	0.9	—	—
HS3-Martin-1	1.3	0.7	—
HS4-GPY-1	1.5	1.2	—
HS4-Martin-3	0.8	—	—
HS5-GPY-1	0.8	—	—
HS5-MEA-2	0.8	—	—
HS5-MEA-3	0.9	—	—
HS5-MEA-4	1.3	—	—
HS5-Martin-5	1.2	0.7	—
HS5-Martin-6	0.9	—	—
HS5-GPY-7	0.7	—	1.1
HS5-GPY-9	0.7	—	—
HS5-Martin-10	1.0	—	—
HS5-MEA-11	0.7	—	—
HS6-GPY-1	0.7	—	—
HS6-GPY-2	0.8	—	—
HS6-GPY-3	0.8	—	—
HS6-GPY-4	1.0	—	—
HS6-GPY-6	0.8	—	—
HS6-GPY-7	0.8	—	0.6
HS6-MEA-10	1.6	—	—
HS6-GPY-11	0.7	—	—
HS6-PDA-13	0.7	—	—
HS6-GPY-15	1.0	—	—
HS6-GPY-16	0.8	—	—
HS7-GPY-1	1.3	1.5	—
HS7-GPY-3	0.8	—	—
HS7-GPY-4	1.0	—	—
HS7-GPY-5	0.7	—	—
HS7-MEA-7	0.7	—	—
HS7-Martin-8	0.7	—	—
HS7-Martin-9	0.7	—	—
HS7-Martin-10	0.7	—	—
HS7-Martin-13	0.7	—	—
HS7-GPY-14	0.7	—	—
HS8-MEA-2	3.0	—	—
HS8-PDA-3	0.8	—	—
HS8-PDA-4	1.2	—	—
HS8-PDA-5	0.8	2.2	—
HS8-MEA-6	0.8	—	—
HS8-MEA-7	2.0	—	—
HS8-GPY-8	3.0	—	—
HS8-GPY-10	2.7	—	—
HS8-GPY-11	0.7	—	—
HS8-GPY-13	2.0	—	—
HS8-Martin-16	0.9	—	—
HS8-PDA-22	0.9	—	—

注：抑菌圈单位为 cm；—：没有产生抑菌圈
Note: The unit of inhibition zone diameter is cm; —: No inhibition zone

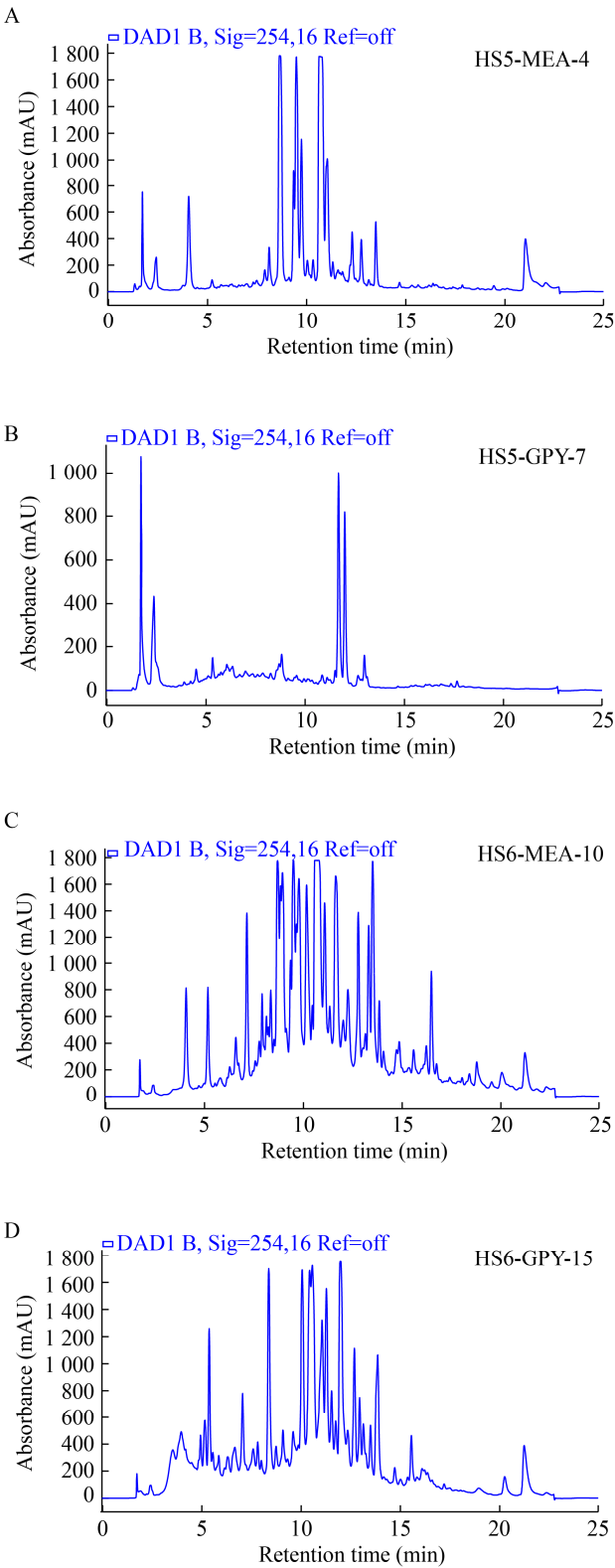


图 2 4 株真菌 HPLC 分析结果图
Figure 2 HPLC analysis results of 4 fungi

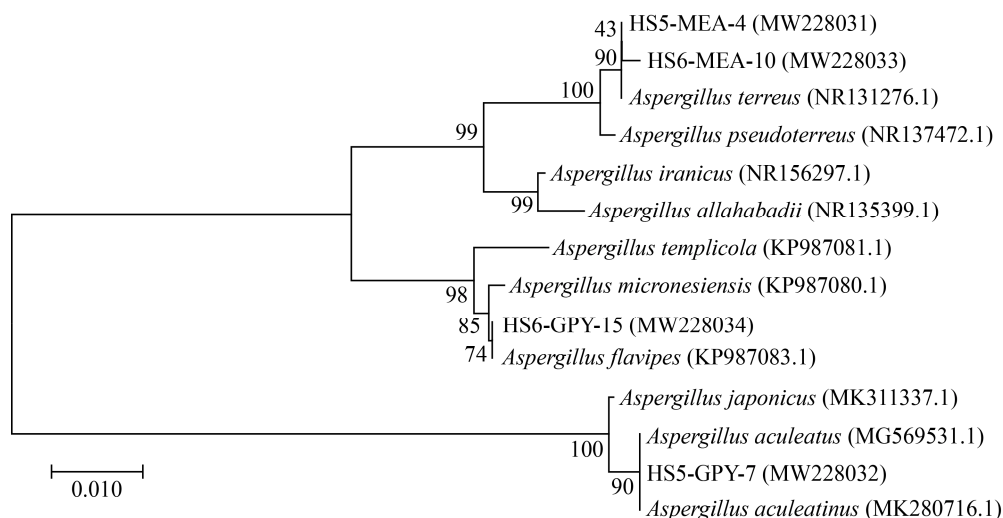


图3 4株真菌基于rDNA ITS序列建立的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of 4 fungi based on rDNA ITS sequences

注：括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号；分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的概率；刻度 0.010 表示序列偏差值
Note: GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets; The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 bootstrap trees; Bar 0.010 means the nucleotide substitution rate of 0.010

HS5-GPY-7 初步鉴定为棘孢曲霉(*A. aculeatus*)，菌株 HS6-GPY-15 鉴定为 *A. templicola*，研究结果为后续研究活性次级代谢产物和发现药物先导化合物提供了菌株资源。

REFERENCES

- [1] Bai FY, Ni MX. Research progress on antimicrobial bioactive substances from marine microorganisms[J]. Chemistry & Bioengineering, 2016, 33(5): 15-19,25 (in Chinese)
柏凤月, 倪孟祥. 海洋微生物来源的抗菌活性物质研究进展[J]. 化学与生物工程, 2016, 33(5): 15-19,25
- [2] Pang JY, Liu L, She ZG, Cai XL, Lin YC. Recent progress in synthesis of three classes of secondary metabolites obtained from marine fungi from the South China Sea coast[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2009, 29(3): 341-349 (in Chinese)
庞冀燕, 刘岚, 余志刚, 蔡小玲, 林永成. 三类南海海洋真菌次级代谢产物的合成研究进展[J]. 有机化学, 2009, 29(3): 341-349
- [3] Yang KL, Cheng WS, Hou F, Zheng CJ, Shao CL, Wang CY. Study progress review of secondary metabolites from marine microorganisms and their antimicrobial activity[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2013, 32(3): 71-81 (in Chinese)
杨凯琳, 程文胜, 侯峰, 郑彩娟, 邵长伦, 王长云. 海洋微生物次级代谢产物及其抑菌活性研究进展[J]. 中国海洋药物, 2013, 32(3): 71-81
- [4] Tang HF, Yi YH, Yao XS. Progress in the study of marine steroids[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2002, 21(2): 42-43 (in Chinese)
汤海峰, 易杨华, 姚新生. 海洋甾体化合物的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2002, 21(2): 42-43
- [5] Duarte K, Rocha-Santos TAP, Freitas AC, Duarte AC. Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2012, 34: 97-110
- [6] Wang C, Zhang GJ, Liu WD, Yang XY, Zhu N, Shen JM, Wang ZC, Liu Y, Cheng S, Yu GL, et al. Recent progress in research and development of marine drugs[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2019, 38(6): 35-69 (in Chinese)
王成, 张国建, 刘文典, 杨新雨, 朱妮, 申静敏, 王志成, 刘杨, 程珊, 于广利, 等. 海洋药物研究开发进展[J]. 中国海洋药物, 2019, 38(6): 35-69
- [7] Lin M, Ning XB. Screening of marine bacteria with antimicrobial activity[J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(5): 23-25 (in Chinese)
林敏, 宁喜斌. 具抑菌活性海洋微生物的筛选[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(5): 23-25
- [8] Liu W, Song JM, Yuan HM, Li XG, Li N, Duan LQ, Zuo JL. Pathway and flux of inputting chemical substances from the kuroshio to the East China Sea[J]. Advances in Earth Science, 2015, 30(8): 904-914 (in Chinese)

- 刘伟, 宋金明, 袁华茂, 李学刚, 李宁, 段丽琴, 左九龙. 黑潮化学物质输入东海的途径与通量[J]. 地球科学进展, 2015, 30(8): 904-914
- [9] Hu Y, Chen J, Xu J. Progress in the marine sedimentary environment research for the Taiwan Strait[J]. Marine Science Bulletin, 2011, 30(5): 595-600 (in Chinese)
- 胡毅, 陈坚, 许江. 台湾海峡的海洋沉积环境研究进展[J]. 海洋通报, 2011, 30(5): 595-600
- [10] Guo NY, Lian LX, Huang YJ, Xu QY, Zheng ZH. Diversity and bioactivities of marine actinobacteria from marine sediments of Fujian coast[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2017, 42(1): 20-27, 51 (in Chinese)
- 郭娜燕, 连莲香, 黄耀坚, 徐庆妍, 郑忠辉. 福建沿海沉积物放线菌的多样性及生物活性[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(1): 20-27, 51
- [11] Zhang ZH. Advances of chemical constituents of mangrove fungi[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2016, 41(4): 309-315 (in Chinese)
- 张志华. 红树林真菌化学成分研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(4): 309-315
- [12] Zheng YL, Tong YC, Sun YY, Pang JY. Secondary metabolites from mangrove fungus *Aspergillus* sp. and their biological activities[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2020, 59(1): 133-143 (in Chinese)
- 郑颖琳, 佟奕辰, 孙英英, 庞冀燕. 红树林真菌 *Aspergillus* sp. 次级代谢产物及其生物活性[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2020, 59(1): 133-143
- [13] Xu DQ, Wang YM, Zhou DQ. Microbiology Experiment[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2019: 286-289 (in Chinese)
- 徐德强, 王英明, 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2019: 286-289
- [14] Ran XL, Liu Y, Tian CK, Zhu TT, Song YN, Mo YX. Isolation of fungal strains in soil of selenium mining area and screening for their anti-tumor activity[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 2017, 53(6): 1161-1164 (in Chinese)
- 冉喜玲, 刘雨, 田从魁, 朱婷婷, 宋雅楠, 莫月贤. 硒矿区土壤中真菌的分离培养及抗肿瘤活性筛选[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2017, 53(6): 1161-1164
- [15] Zeng Q, Zhong WM, Xiang Y, Chen XY, Tian XP, Zhang S, Wang FZ. Isolation, identification and evaluation of 52 fungi from the deep-sea sediments of South China Sea[J]. Microbiology China, 2018, 45(9): 1904-1915 (in Chinese)
- 曾奇, 仲伟茂, 向瑶, 陈夏雨, 田新朋, 张偲, 王发左. 南海深海沉积物中 52 株真菌的初步分离鉴定及其代谢产物活性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(9): 1904-1915
- [16] Ma JP, Kang YX, Guo T, Li SJ, Jin L. Studies on isolation and antioxidant activities of endophytic fungi from *Thalictrum baicalense* Turcz[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2017, 28(10): 2378-2380 (in Chinese)
- 马建苹, 康银霞, 郭涛, 李善家, 晋玲. 贝加尔唐松草内生真菌的分离及抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2378-2380
- [17] Yang HR, Tian SY, Zhao DY, Hu P, Wang J, Wang J, Lü B. Determination of whey protein in sow milk by HPLC and application of the method[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 50(6): 19-24 (in Chinese)
- 杨怀荣, 田时祎, 赵道远, 胡平, 王珏, 汪晶, 吕波. 利用高效液相色谱仪测定猪乳中乳清蛋白含量的方法及其应用[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(6): 19-24
- [18] Xiong F, Zheng ZH, Huang YJ, Song SY, Xu QY, Su WJ. Antimicrobial and antitumor activities of marine fungi isolated from sediment in deep sea[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(3): 419-423 (in Chinese)
- 熊枫, 郑忠辉, 黄耀坚, 宋思扬, 徐庆妍, 苏文金. 从深海沉积物中筛选具有抗菌、抗肿瘤活性的海洋真菌[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(3): 419-423
- [19] Zhang YX, Liu XJ, Feng ZG, Huang JY, Yang JK, Wang GY, Yang HF. Pathogen detection and ITS identification of *Lonicera japonica* brown spot[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2016, 39(4): 73-77 (in Chinese)
- 张永信, 刘晓杰, 冯争光, 黄娟英, 杨金库, 王桂英, 杨鸿飞. 金银花褐斑病原检测和 ITS 鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2016, 39(4): 73-77
- [20] Yang XL, Han Y, Yin DS, Zhang RY, Zhang YH, Zhang S. ITS identification and biological characterization of the pathogens of rice spikelet rot disease in Hubei Rice Region[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2019, 48(4): 82-87 (in Chinese)
- 杨小林, 韩烨, 殷得所, 张瑞洋, 张佑宏, 张舒. 湖北稻区穗腐病病原 ITS 鉴定及其生物学特性分析[J]. 河南农业科学, 2019, 48(4): 82-87
- [21] Wang JL, Wen XH. Modern Environmental Biotechnology[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2001: 522-523 (in Chinese)
- 王建龙, 文湘华. 现代环境生物技术[M]. 北京: 清华大学出版社, 2001: 522-523
- [22] Long XY, He B, Wang C, Hu YS, Qin YX, Fang YJ, Tang CR. Genetic diversity and phylogenetic evolution among 1981 IRRDB wild germplasm and cultivars using ITS markers in rubber tree[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(12): 2113-2119 (in Chinese)
- 龙翔宇, 何斌, 王闯, 胡彦师, 秦云霞, 方永军, 唐朝荣. 橡胶树 1981 IRRDB 野生种质及栽培品系 ITS 序列多态性及其进化分析[J]. 热带作物学报, 2015, 36(12): 2113-2119