

转化白藜芦醇苷虎杖内生真菌的分离和鉴定

刘华金^{1,2}, 易有金^{1,2,*}, 杨建奎³, 钟英丽⁴, 陈雪^{1,2}

(1.湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128; 2.食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128; 3.湖南农业大学理学院, 湖南长沙 410128; 4.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要:为提高虎杖中白藜芦醇得率, 采用虎杖内生真菌直接发酵虎杖转化白藜芦醇苷为白藜芦醇, 通过从虎杖根、茎中初筛得到6株内生真菌, 复筛以虎杖煮提液为底物发酵, 采用高效液相色谱法定量检测发酵液中白藜芦醇苷和白藜芦醇含量。结果表明: 6株内生真菌均具有转化白藜芦醇苷为白藜芦醇能力, 其中分离于茎内的J1转化率最高为25.6%。J1经形态学观察及ITS-5.8S rDNA序列分析, 鉴定为草酸青霉 *Penicillium oxalicum*, Genbank 登录号为HQ732137。

关键词:虎杖; 白藜芦醇苷; 白藜芦醇; 内生真菌; 分离; 鉴定

Isolation and Identification of Endophytic Fungi Capable of Transforming Polydatin from *Polygonum cuspidatum*

LIU Hua-jin^{1,2}, YI You-jin^{1,2,*}, YANG Jian-kui³, ZHONG Ying-li⁴, CHEN Xue^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Province Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128, China; 3. College of Sciences, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 4. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to improve the yield of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* through endophytic fungi transformation, endophytic fungal strains capable of transforming polydatin from *Polygonum cuspidatum* were screened. The contents of resveratrol and polydatin were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The results indicated that 6 endophytic fungal strains capable of transforming polydatin from *Polygonum cuspidatum* were identified. Strain J1 had the highest transformation rate, 25.6%. The strain J1 was identified as *Penicillium oxalicum* with Genbank accession number of HQ732137 through morphologic observation and ITS-5.8S rDNA sequence analysis.

Key words: *Polygonum cuspidatum*; polydatin; resveratrol; endophytic fungi; isolation; identification

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0172-05

虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)中白藜芦醇(resveratrol, RES)是一种天然活性多酚化合物, 具有抑制肿瘤^[1]、保护心血管^[2]、抗氧化、抗自由基等作用, 它已被列为抗心血管病、抗癌最有前途的药物之一^[3-4], 是继紫杉醇之后又一绿色抗癌物质。虎杖中白藜芦醇往往以白藜芦醇苷(polydatin, PD)的形式存在, 干燥虎杖根茎中白藜芦醇含量仅为0.2%左右, 而白藜芦醇苷含量可达2%^[5]。

目前采取化学方法直接从虎杖中提取白藜芦醇费时、费力且浪费资源, 而有机合成白藜芦醇反应产率

低, 合成中所用催化剂和反应剂均有一定环境危害性, 微生物转化法能克服以上方法不足, 且反应条件温和、无污染, 微生物转化虎杖已成为生产天然白藜芦醇研究趋势之一, 如龚云杰等^[6]报道从发酵食品分离一株黑曲霉菌固体堆积发酵虎杖根茎, 袁润蕾等^[7]报道从自然界分离一株根霉菌对白藜芦醇苷粗提物进行液态发酵, 虽均可提高虎杖白藜芦醇得率, 但菌种筛选过程有一定盲目性。植物内生真菌因其生境独特, 相对于其他微生物资源在微生物转化领域更具目的性和选择性^[8-9], 至今国内外关于虎杖内生真菌对白藜芦醇苷进行转化未见报

收稿日期: 2011-07-31

基金项目: 湖南省博士后科研资助专项计划项目(2010RS4003); 长沙市科技局一般项目(K1005013-31);

湖南省中医药科研计划项目(2010079)

作者简介: 刘华金(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源开发与利用。E-mail: lhjdyx117@163.com

*通信作者: 易有金(1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为微生物资源开发与利用及食品营养。E-mail: yiyoujin@163.com

道;国内有关于从虎杖组织中分离内生真菌 B-39^[10]、*Fusarium verticillioides*^[11],因其不以虎杖为发酵底物,直接生产白藜芦醇,故白藜芦醇产量较低。本研究拟从新鲜虎杖组织中分离内生真菌,筛选直接以虎杖煮提液为底物,转化其白藜芦醇苷为白藜芦醇的优良内生真菌,为今后内生真菌直接转化生产白藜芦醇提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生虎杖采自湖南省涟源市田心坪村;虎杖饮片购自长沙药材市场。

白藜芦醇苷、白藜芦醇标准品 中国食品药品检定研究所;甲醇(色谱级) 国药集团化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 培养基

菌种筛选培养基^[12]:初筛培养基: MgSO_4 0.5g、 NaNO_3 5g、 FeSO_4 0.01g、 KH_2PO_4 1g、琼脂 18g,加 10g/100mL 虎杖煮提液至 1L, pH 值自然;复筛培养基: 10g/100mL 虎杖煮提液, pH 值自然。

菌落培养基^[13]:查氏酵母膏琼脂培养基(CYA)、麦芽汁琼脂培养基(MEA)、甘油硝酸盐琼脂培养基(G25N)、察氏培养基(CA)和马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。

1.3 仪器与设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪(四元泵、在线脱气机、柱温箱、VWD 检测器、Chemstation System 工作站) 美国 Agilent 公司;生化培养箱 北京中兴伟业仪器有限公司;高速冷冻离心机 长沙英泰仪器有限公司;PCR 仪 杭州博日科技有限公司;电泳仪 北京六一仪器厂;Gel Logic 212 型凝胶成像系统 美国柯达公司。

1.4 具有转化能力虎杖内生真菌初筛

采集野生虎杖植株取根、茎杆,表面消毒方法参照文献[14],去除根、茎杆韧皮部,取木质部用无菌剪刀剪成 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 小块,无菌水冲洗 3~4 次,于无菌研钵中研磨成浆液。研磨液以无菌水稀释 10 倍后,取 0.1mL 于初筛培养基上常规涂布, 28°C 培养 72~120h,挑选不同形态菌落于 PDA 平板划线纯化后,保存备用。

1.5 内生真菌转化白藜芦醇苷 HPLC 检测

将初筛菌种接入复筛培养基(10g/100mL 虎杖煮提液)中进行发酵, 28°C 、180r/min 培养 96h,发酵液 10000r/min 离心 10min 后,取上清液 100 μL 甲醇稀释至 1mL,混匀, $0.45\mu\text{m}$ 微膜过滤后,即为供试品溶液, HPLC 检测发酵液中白藜芦醇苷和白藜芦醇含量,按下式计算白藜芦醇苷转化率,筛选转化力最强菌株进行鉴定。

$$\text{转化率} / \% = \frac{\text{白藜芦醇增加量}}{\text{白藜芦醇苷初始量}} \times \frac{390}{228} \times 100$$

1.5.1 色谱条件

色谱柱 ODS- C_{18} 柱(150mm \times 4.6mm, $5\mu\text{m}$),流动相为甲醇-水(体积比 40:60),流速 0.6mL/min,检测波长 306nm,柱温 25°C ,进样量 10 μL 。

1.5.2 标准曲线绘制

分别称取白藜芦醇苷和白藜芦醇标准品各 5mg,甲醇溶解定容至 25mL,配制成 0.2mg/mL 白藜芦醇苷、白藜芦醇储备液,备用。分别取储备液 0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0mL,用甲醇稀释至 10mL,配制成不同质量浓度标准溶液。按色谱条件进样,绘制标准曲线。

1.5.3 方法学考察

重复性考察:称取发酵液分别制备 5 份供试品溶液,测定峰面积,计算相对标准偏差(RSD);精密度考察:称取质量浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液,重复进样 5 次,测定峰面积,计算 RSD;稳定性考察:称取同一供试品溶液于 0、2、4、6、8、10、12、14、16h 内进样测定峰面积,计算 RSD;加样回收率考察:称取已知白藜芦醇苷、白藜芦醇含量发酵液 5 份,按其含量 30%、60%、90%、120%、150% 分别加入白藜芦醇苷、白藜芦醇标准品,按供试品方法制备,测定白藜芦醇苷、白藜芦醇峰面积,计算加样回收率。

1.6 转化力最强菌株鉴定

1.6.1 形态学鉴定

采用点植法^[15]分别接种于 CYA、MEA、G25N、CA、PDA 培养基平板中心, 25°C 培养,观察记录各培养基中菌落形态与生长情况。采用插片培养法^[15],经乳酸-棉兰染液染色后,于光学显微镜下观察记录菌丝体及孢子形态特征。

1.6.2 分子生物学鉴定

1.6.2.1 菌株基因组 DNA 提取

随机取 2 管菌丝体,参照 Weiland^[16]所述方法提取基因组 DNA,等量混合组成菌株基因组 DNA 样品,备用。

1.6.2.2 ITS-5.8S rDNA 序列 PCR 扩增

引物 ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'(由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。PCR 反应体系(50 μL): 10 \times 扩增缓冲液 5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ dNTP 2 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 ITS 1 2 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ ITS 4 2 μL 、1U/ μL Taq 酶 1 μL 、ddH₂O 28 μL 、模板 DNA 4 μL 。循环条件:

94℃预变性 5min, 94℃变性 40s, 55℃复性 35s, 72℃延伸 40s, 以上参数循环 30 次; 最后以 72℃终延伸 10min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.6.2.3 PCR 产物序列分析

将序列提交 GenBank 数据库, 通过 Blast(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)进行同源搜索, 寻找与目的序列同源性最高的已知分类地位的菌种。

1.6.2.4 系统发育分析和系统发育树构建

从 GenBank 中索取与内生菌株 J1 同源性高的相似菌株的 ITS-5.8S rDNA 序列, 用 MEGA4 软件进行序列分析比对, 绘制系统发育树。

2 结果与分析

2.1 具有转化白藜芦醇苷能力虎杖内生真菌初筛

从新鲜虎杖初筛得到 6 株内生真菌, 依次命名为 J1、J2、J3、J4、J5、J6, 其中 J1~J3 分离于茎内, J4~J6 分离于根内。

2.2 内生真菌转化白藜芦醇苷 HPLC 检测

2.2.1 标准曲线绘制

质量浓度为 40 μg/mL 的白藜芦醇苷、白藜芦醇标样 HPLC 色谱图见图 1、2, 白藜芦醇苷、白藜芦醇线性回归方程分别为 $Y = 133.4412X + 35.6686 (r = 0.9996)$ 、 $Y = 224.1187X + 138.2686 (r = 0.9995)$, 其中, X 为质量浓度/(μg/mL), Y 为峰面积, 两者均在 20~100 μg/mL 范围内呈良好线性关系。

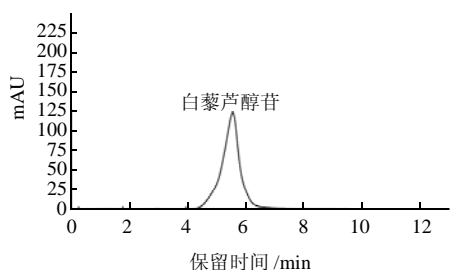


图1 白藜芦醇苷标样 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatogram of standard polydatin sample

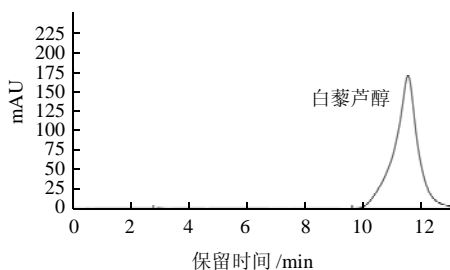


图2 白藜芦醇标样 HPLC 图

Fig.2 HPLC chromatogram of standard resveratrol sample

2.2.2 方法学考察

重复性: 白藜芦醇苷、白藜芦醇的 RSD 值分别为 0.92%、0.68%, 表明该方法重复性好; 精密度: 白藜芦醇苷、白藜芦醇的 RSD 值分别为 0.85%、0.75%, 表明该方法精密度高; 稳定性: 白藜芦醇苷、白藜芦醇的 RSD 值分别为 1.15%、1.21%, 表明供试品溶液在 16h 内稳定; 加样回收: 白藜芦醇苷、白藜芦醇的平均加样回收率分别为 95.2%、98.9%, RSD 分别为 1.03%、1.42%, 表明该方法回收率较高, 偏差较小, 准确度较高。

2.2.3 白藜芦醇苷、白藜芦醇含量检测

取初筛内生真菌 J1、J2、J3、J4、J5、J6 发酵液按上述供试品制备方法制备供试品溶液, 按上述 HPLC 色谱条件进样平行 3 次。根据峰面积计算发酵液中白藜芦醇苷转化率, 结果见表 1, 内生真菌 J1、J2、J3、J4、J5、J6 菌株对白藜芦醇苷的转化率分别为 25.6%、3.5%、15.5%、2.1%、5.6%、8.4%, 表明 6 株初筛菌株均对白藜芦醇苷有不同程度转化能力, 其中 J1 转化率最高。

表1 内生真菌 J1、J2、J3、J4、J5、J6 对白藜芦醇苷转化能力 HPLC 检测结果

Table 1 Transformation rates of polydatin by endophytic fungi J1, J2, J3, J4, J5, J6 as determined by HPLC

内生真菌	白藜芦醇苷质量浓度/(μg/mL)	白藜芦醇质量浓度/(μg/mL)	转化率/%
空白对照	58.4096	5.3146	
J1	27.1617	14.0675	25.6
J2	36.4152	6.5033	3.5
J3	30.6673	10.6052	15.5
J4	41.4551	6.0153	2.1
J5	35.4532	7.2332	5.6
J6	31.5148	8.1634	8.4

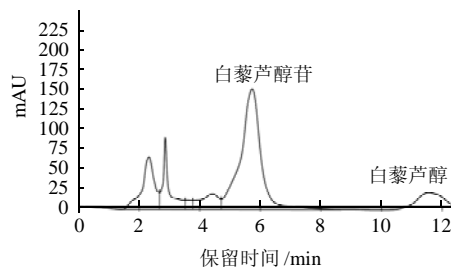


图3 J1 发酵前培养液 HPLC 图

Fig.3 HPLC chromatogram of hot water extract from *Rhizoma Polygoni cuspidati*

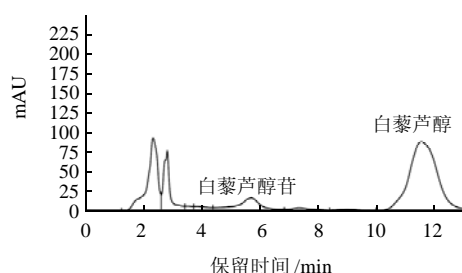


图4 内生真菌J1发酵96h后发酵液HPLC图

Fig.4 HPLC chromatogram of hot water extract from *Rhizoma Polygoni cuspidati* fermented by strain J1 for 96 h

由图3、4可知,虎杖煮提液经内生真菌J1发酵后,白藜芦醇苷(保留时间5.07min)的吸收峰面积明显减小,白藜芦醇(保留时间11.094min)的吸收峰面积明显增加,说明内生真菌J1能有效转化虎杖煮提液中白藜芦醇苷为目标物白藜芦醇。

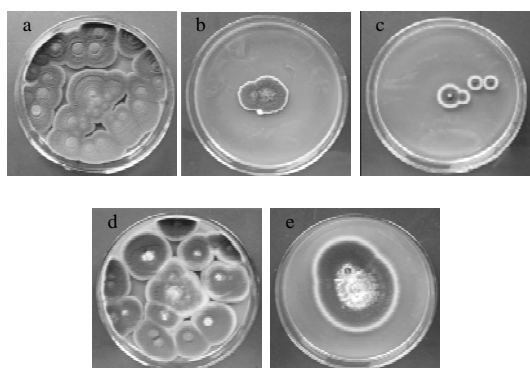
2.3 内生真菌J1的形态学鉴定

内生真菌J1在CYA、MEA、G25N、CA、PDA培养基上培养7d后菌落形态见表2。

表2 内生真菌J1在CYA、MEA、G25N、CA、PDA培养基上培养7d后菌落形态特征

Table 2 Morphological characteristics of strain J1 colonies after incubation on CYA, MEA, G25N, CA, PDA culture media for 7 days

培养基	直径	边缘	外观	颜色		渗出物	生长速度
				正面	背面		
CYA	约35mm	丝状	同心环, 扁平致密	灰绿色	黄色	无	正常
MEA	15~20mm	不规则	绒毡状, 扁平致密	绿色	黄色	无	正常
G25N	7~10mm	丝状	绒毡状, 扁平致密	绿色	浅黄色	无	缓慢
CA	28~35mm	丝状	绒毡状, 扁平致密	绿色	黄色	少量黄色溢出物	正常
PDA	40~50mm	丝状	绒毡状, 扁平致密	绿色	暗黄色	无	迅速



a. CYA培养基; b. MEA培养基; c. G25N培养基; d. CA培养基; e. PDA培养基。
图5 内生真菌J1在CYA、MEA、G25N、CA、PDA培养基上的菌落形态

Fig.5 Morphological observations of strain J1 on CYA, MEA, G25N, CA, PDA culture media



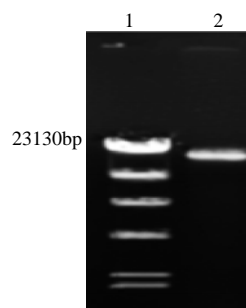
图6 内生真菌J1菌丝的显微形态(×100)

Fig.6 Mycelium microstructure of strain J1 (×100)

由图5~6可知,光学显微镜下观察J1菌丝细长、交织分布,有隔膜,分生孢子梗光滑,帚状枝单轮生或双轮生,小梗4~6个轮生,分生孢子链状分布,圆形。鉴定表明内生真菌J1菌落、菌丝和分生孢子形态特征与《常用及常见真菌》及《真菌鉴定手册》青霉属草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)基本相符,初步鉴定内生真菌J1为青霉属草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。

2.4 内生真菌J1分子生物学鉴定

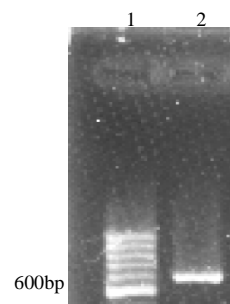
2.4.1 内生真菌J1基因组DNA提取与ITS-5.8S rDNA扩增



1. Marker; 2. J1基因组DNA。

图7 内生真菌J1 DNA电泳图

Fig.7 Electrophoresis of genomic DNA of strain J1



1. Marker; 2. PCR扩增产物。

图8 内生真菌J1 ITS-5.8S rDNA PCR扩增产物电泳图

Fig.8 Electrophoresis of PCR amplified products from ITS-5.8S rDNA of strain J1

提取 J1 菌株基因组 DNA, 经电泳检测得到特异性条带, 如图 7 所示, 表明内生真菌 J1 基因组 DNA 提取成功。以提取的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 得到约 600bp 的 PCR 扩增产物, 电泳图谱见图 8, 这与以往 ITS-5.8S rDNA 在所有真菌中都高度保守且长度恒定(约 600bp)的报道相吻合^[17], 表明内生真菌 J1 ITS-5.8S rDNA 片段成功扩增。

2.4.2 内生真菌 J1 ITS-5.8S rDNA 序列分析

实验测得内生真菌 J1 ITS-5.8S rDNA 序列全长 571bp, 该序列在 GenBank 数据库登录号为 HQ732137。将序列输入生物技术信息网(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行同源性比对, 结果表明: 内生真菌 J1 与草酸青霉 *Penicillium oxalicum* (FJ977097.1) 同源性最高, 相似性为 99%。

2.4.3 系统发育分析和系统发育树的构建

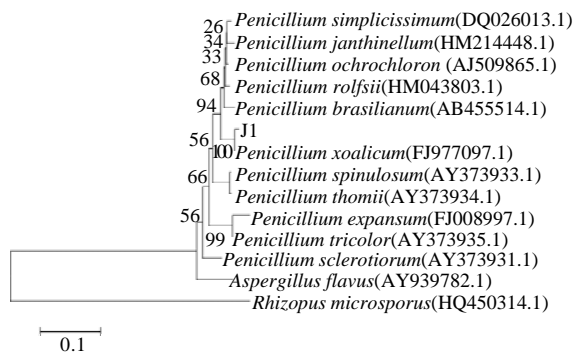


图9 内生真菌 J1 和相关菌株的系统发育树

Fig. 9 Phylogenetic tree of strain J1 and other related strains

在 GenBank 中索取与内生真菌 J1 ITS-5.8S rDNA 序列同源性高的相似菌株 13 株, 用 MEGA4 软件进行序列分析, 采用 N-J 法绘制系统发育树。由图 9 可知, 内生菌株 J1 与 *Penicillium* 属的青霉菌处于一个大的分支内, 与草酸青霉 *Penicillium oxalicum* (FJ977097.1) 处于同一分支, 进化距离最近。结合菌落形态和个体显微形态特征结果, 确定内生菌株 J1 为草酸青霉 *Penicillium oxalicum*。

3 讨论

本研究从野生虎杖茎中初筛得到 6 株内生真菌, HPLC 法检测表明: 6 株内生真菌均具有转化白藜芦醇苷能力, 其中 J1 转化力最强, 转化后发酵液中白藜芦醇含量达 14.0675 $\mu\text{g/mL}$, 为未发酵前的 2.65 倍。刘芸等^[11]报道不以虎杖为发酵底物, 直接采用内生真菌拟轮枝镰孢霉 *Fusarium verticillioides* 生产白藜芦醇, 发酵液白藜芦醇含量(1.528 $\mu\text{g/mL}$)远低于本研究结果。通过对内生真菌 J1 在上述 5 种不同培养基上菌落形态观察和菌丝、分生孢子等显微观察, 并结合对 ITS-5.8S rDNA 序

列与 Genbank 中的 rDNA 同源序列的比对分析, 鉴定内生真菌 J1 为草酸青霉 *Penicillium oxalicum*, GenBank 登录号为 HQ732137。具有特定生活史的植物内生真菌与宿主互惠共利协同进化, 选择内生真菌对中草药进行发酵转化有其天然协调性, 但目前, 关于虎杖内生真菌的微生物转化未见报道。本研究从新鲜虎杖茎中分离内生真菌 J1 直接作用于虎杖煮提液, 不需添加其他成分, 有效转化虎杖中白藜芦醇苷为白藜芦醇, 这与邓志汇等^[9]从茶树根际分离内生毛霉菌转化简单儿茶素为酯型儿茶素的研究方法相似, 充分证明利用植物内生真菌发酵转化与植物所产相同或相似的生理活性物质可行, 比直接化学提取法^[18]原材料利用率高, 与有机合成法^[19]相比, 反应条件温和, 发酵条件简单、易控制, 环境污染小。但分离得到的内生真菌 J1 为野生型菌株, 目前转化率最高为 25.6%, 需要通过诱变育种、发酵条件优化等提高其转化率, 为进一步微生物发酵提高虎杖中白藜芦醇得率提供技术支持。

参考文献:

- [1] MEISHIANG J, LING C, UDEANIG O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derive from grapes[J]. Science, 1997, 275(1): 218-220.
- [2] BURKNHARD S, REITER R J, TAN D X, et al. DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-L-N(2)-fomyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33(8): 775-783.
- [3] LUCIE F. Biological effects of resveratrol[J]. Life Sci, 2000, 66(8): 663-673.
- [4] CHRISTIAN I, MARKUS K, STEFAN B. Occurrence and activity of natural antioxidants in herbal spirits[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2001, 1(4): 239-243.
- [5] ZHAO Ruizhi, LIU Shaojun, ZHOU Lilin, et al. Rapid quantitative HPLC analysis, on one plate, of emodin, resveratrol, and polydatin in the Chinese herb *Polygonum cusidatum*[J]. Chromatographia, 2005, 61(5/6): 311-314.
- [6] 龚云杰, 王卫, 曾柏全, 等. 产纤维素酶微生物发酵转化虎杖提高白藜芦醇收率的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(9): 190-193.
- [7] 袁润蕾, 徐萌萌, 孙艳娟, 等. 微生物转化虎杖苷粗提物生成白藜芦醇的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 712-714.
- [8] 王宇, 戴传超. 内生真菌对生物活性物质代谢转化作用的研究进展[J]. 中草药, 2009, 29(4): 1496-1499.
- [9] 邓志汇, 崔莹兵. 利用活性真菌转化简单儿茶素为酯型儿茶素[J]. 食品工业科学: 生物工程, 2011, 32(2): 169-171.
- [10] 曹庸, 唐永红, 卢成英, 等. 一株产白藜芦醇真菌的培养和调控研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 245-248.
- [11] 刘芸, 殷红, 仇农学. 一株产白藜芦醇虎杖内生真菌的分离和鉴定[J]. 菌物学报, 2010, 29(4): 502-207.
- [12] 田天丽, 沈竟, 徐萌萌, 等. 虎杖中虎杖苷的微生物发酵转化研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2008, 45(2): 437-440.
- [13] 张琪, 污玉久, 张磊磊, 等. 两株具有将人参皂苷 Rg1 转化为人参皂苷 F1 活性的真菌鉴定[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(5): 395-398.
- [14] 何佳, 刘笑洁, 赵启美, 等. 植物内生真菌分离方法的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(15): 180-183.
- [15] 高宁. 盘龙参内生真菌的分离鉴定及其化学成分相关性的研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2009.
- [16] WEILAND J J. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia[J]. Fungal Genetics Newsletter, 1997, 44: 60-63.
- [17] 段春芳, 李枝林, 方飞, 等. 云南几种兰花菌根真菌的分离鉴定[J]. 西南农业学报, 2010, 23(3): 756-759.
- [18] 周军, 黄琼, 李志光, 等. 虎杖中白藜芦醇的提取方法比较与优化研究[J]. 云南化工, 2007, 34(5): 34-27.
- [19] 黄卫文, 李忠海, 黎继烈, 等. 白藜芦醇的合成研究进展[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(10): 72-76.