

重楼根际及药用部位内生真菌多样性与群落结构差异分析

王 艳^{1,2,3}, 常 帆^{1,2}, 程虎印⁴, 贾凤安¹, 程江雪⁴, 王汉屏^{5*}

1. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062

2. 陕西省微生物研究所, 陕西 西安 710043

3. 陕西省科学院 秦岭天然产物中心, 陕西 西安 710043

4. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

5. 西安外事学院医学院, 陕西 西安 710077

摘要:目的 寻找能促进宿主植物活性代谢产物合成的微生物, 为后续功能菌群的建立及功能基因的发掘, 提供理论支持。**方法** 应用 Illumina Miseq PE250 高通量测序技术对重楼根际土壤真菌、根及根茎内生真菌 ITS1 区进行序列测定, 并进行生物信息学分析。**结果** 测序结果共获得 154 228 条序列, 这些序列对应的根际土、根茎、根分别被聚类为 408、119、57 个 OTUs。**结论** 重楼根际及内生真菌多样性的关系为根际土>根茎>根, 在重楼药用部位根茎中发现 *Mucoromycota* 门较非药用部位根中的门为特有门, *Ascomycota* 门为优势门, *Roseodiscus* 属真菌为重楼根茎内生真菌优势菌群, 根茎和根部的特有种群及优势菌群可能与重楼活性产物合成密切相关。

关键词: 重楼; 内生真菌; 高通量测序; 多样性; 群落

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1232-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.030

Fungal diversity and differential analysis of fungi community composition in *Paris polyphylla* var. *chinensis* rhizosphere and endophytic

WANG Yan^{1,2,3}, CHANG Fan^{1,2}, CHENG Hu-yin⁴, JIA Feng-an¹, CHENG Jiang-xue⁴, WANG Han-ping⁵

1. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

2. Microbiology Institute of Shaanxi, Xi'an 710043, China

3. Engineering Center of Qinling Mountains Natural Products, Shaanxi Academy of Sciences, Xi'an 710043, China

4. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

5. College of Medicine, Xi'an International University, Xi'an 710077, China

Abstract: Objective To find the microbes promoting the biosynthesis of active metabolites in host plant, which could provide theoretical support to the establishment of functional flora and discovery of key genes. **Methods** The ITS1 region of rhizosphere fungi and endophytic fungi from *Paris polyphylla* var. *chinensis* was sequenced by Illumina Miseq PE250 high-throughput sequencing technique, and the biological information was also analyzed. **Results** It was shown that the number of effective sequences for sample was 154 228, and these sequences were assigned to 408, 119, and 57 OTUs with rhizosphere soil, rhizome, and root, respectively. **Conclusion** It was indicated that the diversity relationship between rhizosphere fungi and endophytic fungi of *Paris polyphylla* var. *chinensis* was rhizosphere > rhizome > root. It was found that there were more *Mucoromycota* Phylum in the rhizome than root, and the dominant population of endophytic fungi in rhizome of *Paris polyphylla* var. *chinensis* belongs to *Roseodiscus*. *Ascomycota* is the dominant Phylum. It is suggested that the specific fungi may be an important microbial community affecting the biosynthesis of the active products in *Paris polyphylla* var. *chinensis*.

Key words: *Paris polyphylla* Sm. var. *chinensis* (Franch.) Hara; endophytic fungi; high-throughput sequencing; diversity; community

收稿日期: 2018-09-01

基金项目: 国家重点研发项目 (SQ2018YFD100035); 陕西省科学院科技计划项目 (2018nk-01); 陕西省科学院科技计划项目 (2016k-18)

作者简介: 王 艳(1985—), 女, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事药用植物内生菌研究。Tel: (029)85350847 E-mail: wangyan-2012@foxmail.com

*通信作者 王汉屏, 男, 教授, 主要从事植物资源开发及利用。Tel: (029)88751308 E-mail: hanpingwang@126.com

百合科重楼属重楼 *Paris* L. 植物分布于欧亚大陆的热带及温带地区,我国有 19 个种^[1],以西南各省区为多,陕西、湖南、广西均有分布^[2]。作为中药材的一种,以根茎入药,根茎质地坚实,断面平坦,白色至浅棕色,粉性或胶质,气微,味微苦、麻^[3]。重楼是云南白药、宫血宁胶囊、季德胜蛇药、热毒清等的主要原料之一,用于跌打损伤、治疗疮肿痛、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、惊风抽搐等症^[1-2,4]。

重楼主要化学成分为皂苷类、黄酮类、三萜类、脂肪酸类等^[4],其中以重楼皂苷 I、II、VI、VII 为主要活性成分。重楼以根茎入药,疗效确切,具有很高的药用价值,市场需求日益增大,因此出现了重楼野生资源的严重短缺^[5-6],中药材原料供应不足的问题,严重制约了下游产业的可持续发展。已有研究表明,植物内生真菌具有产生与宿主植物相同活性成分及影响植物代谢途径的能力^[7-10],从药用植物内生真菌代谢产物中寻找活性物质,已成为植物内生真菌研究的热点。本课题组长期从事药用植物内生菌代谢产物的研究,拟通过寻找微生物或微生物促进宿主植物合成活性代谢产物的途径来缓解中药材原料短缺问题。

植物内生菌(endophyte)是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织或器官内部,但宿主植物不表现出外在病害症状的微生物^[11-12]。其中包括真菌、细菌和放线菌等。植物内生菌不仅能够合成宿主植物的次生代谢产物^[13-14],而且能够参与宿主植物次生代谢产物的合成及转化^[15-16],目前,自然界中可培养的微生物占微生物总量不足 10%,90%以上的微生物是无法通过人工培养的手段获得的,这些大量的非培养微生物,在宿主中很可能起着功能性作用,本实验通过高通量测序技术对药用植物重楼药用部位内生真菌及根际微生物基因组进行扩增子测序,并对其群落结构进行差异分析,为后续功能菌群的寻找及功能基因的发掘提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

重楼采自陕西省汉中市镇巴县仁村镇东院社区鱼塘村王家山山坪,海拔 1 226 m 处,经陕西中医药大学药学院程虎印副教授鉴定为重楼属南重楼组华重楼 *Paris polyphylla* Sm. var *chinensis* (Franch.) Hara; E. Z. N. A. 土壤 DNA 试剂盒美国 Omega 公司(Omega Bio-Tek, NorCross, GA, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

采集新鲜、无伤病华重楼植

株,根部带土,置于冷链箱内,4 h 带回实验室,将根部土壤抖落,留存无法抖落的为根际土,将根际土收集于无菌 PE 管中,提取 DNA 待用;将重楼根及根茎部位用流动的自来水冲去表面多余的根际土后,置于 75%乙醇中浸泡 2 min,再用 5%次氯酸处理 3 min,最后用无菌水清洗 3 次,最终获得表面无菌的重楼根及根茎,将重楼根际土、根、根茎分别用液氮处理,待液氮处理完毕,分别用相应的 DNA 提取试剂盒对总 DNA 进行提取。

1.2.2 DNA 提取和 PCR 扩增 用 E. Z. N. A. 土壤 DNA 试剂盒根据说明书从处理好的样品中提取微生物 DNA。将提取的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 扩增真菌核糖体 RNA 基因 ITS1 区,引物 ITS1F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'和 ITS2R: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'。采用 Trans Start Fastpfu DNA Polymerase, 20 μ L 反应体系进行 PCR 扩增。

1.2.3 上机测序 样品 DNA 委托上海凌恩生物工程有限公司完成测序,测序平台为美国 Illumina 公司 Illumina Miseq PE250 高通量测序仪。

1.2.4 测序数据处理与分析 样品 Illumina Miseq PE250 测序得到的 PE reads 首先根据 overlap 关系进行拼接,同时对序列质量进行质控和过滤,区分样本后进行 OTU 聚类分析和物种分类学分析,基于 OTU 聚类分析结果,利用 mothur 做 rarefaction 分析^[17],对测序深度进行检测,对 OTU 进行多样性指数分析;基于分类学信息,使用 Release 6.0 (<http://unite.ut.ee/index.php>) 真菌数据库^[18],对微生物群落结构进行属水平上的统计分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

为保证后续数据分析的准确性及可靠性,尽可能使用低循环数扩增;其次保证每个样品扩增的循环数统一。确保在最低的循环数中所有的样品能够扩增出浓度合适的产物,扩增结果如表 1 所示。

根据 PCR 扩增结果可知,当反应温度为 55 $^{\circ}$ C,经 27 个循环,所得 PCR 产物的浓度基本上满足高通量测序要求,以此反应条件进行高通量测序。

2.2 序列长度分布

对重楼根际土及内生真菌的测定,共测得 sequence 201 778 条,读长分布在 1~350 bp,其中 201~250 bp 读长的片段分布最多,片段总量为 150 694 bp,如图 1 所示。

表 1 PCR 扩增结果

Table 1 PCR amplification results

样品名称	温度/℃	循环数	结果	备注
根际土	55	27	优	PCR 产物目的条带大小正确, 浓度合适, 可进行后续实验
根	55	27	良	PCR 产物目的条带大小正确, 浓度合适, 可进行后续实验
根茎	55	27	良	PCR 产物目的条带大小正确, 浓度合适, 可进行后续实验

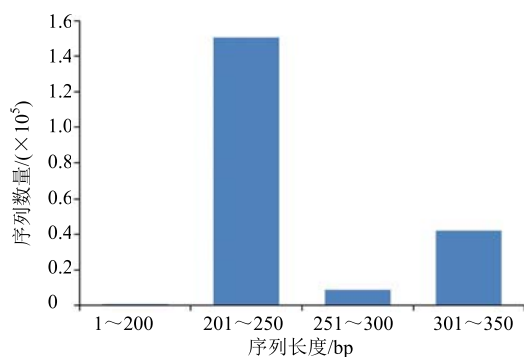


图 1 重楼根际及内生真菌序列长度分布

Fig. 1 Sequence length distribution of rhizosphere and endophytic fungi in *Paris polyphylla* var. *chinensis*

2.3 测序样品置信分析

Shannon 曲线是反映样本中微生物多样性的指数, 利用各样本的测序量在不同测序深度时的微生物多样性指数构建的曲线^[19], 以此反映各样本在不同测序数量中的微生物多样性。由图 2 重楼根际及内生真菌 Shannon 曲线可看出, 根际土、根与根茎 3 个样本随着所得 reads 数的增加, 曲线逐渐趋于平坦, 说明测序数据量合理, 更多的数据量只会产生少量新的 OTU, 在该测序深度下, 可以反映样本中绝大多数的微生物信息。

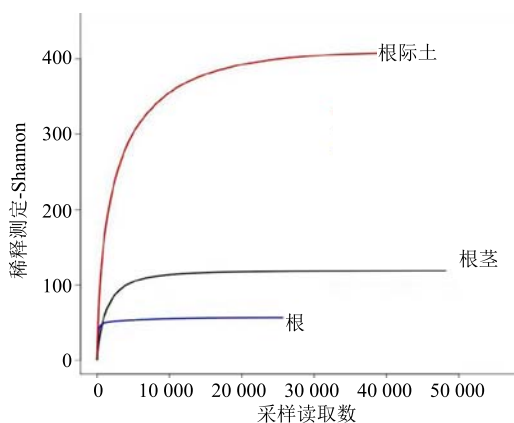


图 2 重楼根际及内生真菌 Shannon 曲线

Fig. 2 Shannon-Rarefaction curves of rhizosphere and endophytic fungi in *Paris polyphylla* var. *chinensis*

Rank-abundance 曲线是分析多样性的一种方式^[20]。构建方法是统计单一样本中, 每一个 OTU 所含的序列数, 将 OTUs 按丰度 (所含有的序列条数) 由大到小等级排序, 再以 OTU 等级为横坐标, 以每个 OTU 中所含的序列数为纵坐标做图。如图 3 所示, 根际土中真菌多样性丰度最高, 其次是重楼的药用部位根茎, 真菌相对丰度最少的为重楼根部, 此结果与以往文献报道的植物内生真菌丰度根中最高, 茎次之, 叶、花、果实依次递减的结论有所不同, 可能是重楼根茎为内生菌的定植提供相对稳定的生境, 同时通过植物次生代谢产物的积累影响内生菌的丰度; 由图 3 曲线的形状可以看出, 重楼根际土中真菌分布的均匀度最高, 优势菌群占比相对较低, 而根与根茎中有明显的优势菌群, 且占比相对较高。

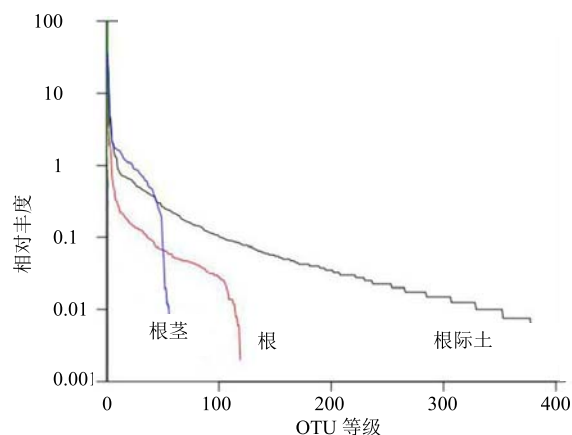


图 3 重楼根际及内生真菌 OTU 丰度曲线

Fig. 3 Rank-abundance curves of rhizosphere and endophytic fungi in *Paris polyphylla* var. *chinensis*

2.4 OTU 聚类与物种注释

对测得数据按照 97% 相似性对非重复序列 (不含单序列) 进行 OTU 聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到 OTU 的代表序列。重楼根际土中共获得 40 752 条 sequence, 根茎中共获得 57 536 条 sequence, 根中共获得 55 940 条 sequence, 分别聚为 408、119、57 个 OTU, 重楼根际土中被注释到

5 门, 15 纲, 35 目, 68 科, 148 属, 根中被注释到 2 门, 8 纲, 15 目, 24 科, 34 属, 根茎中被注释到 3 门, 8 纲, 20 目, 31 科, 51 属。从 OTU 聚类数及物种分类注释量可进一步得知重楼根际及内生真菌多样性的关系, 根际土>根茎>根。

2.5 样品中真菌群落结构差异分析

从门水平的分类看, 重楼根际真菌中主要分布于 Ascomycota 门、Basidiomycota 门、Arthropoda 门、Chytridiomycota 门、Mucoromycota 门等, 重楼根内生菌中主要分布于 Ascomycota 门、Basidiomycota 门等, 重楼根茎内生菌中主要分布于 Ascomycota 门、Basidiomycota 门、Mucoromycota 门等, Ascomycota 为优势门; 从门水平的分类得知, 样本中的真菌主要集中在 5 个门中, 而药用部位较非药用部位存在特有的门, 即 Mucoromycota 门。

从纲水平的分类看, 重楼根际真菌主要分布于 15 个纲, 其中相对百分含量前 5 的有 Glomeromycetes 纲 (占比 37.27%)、Agaricomycetes 纲 (占比 21.13%)、Sordariomycetes 纲 (占比 14.41%)、Tremellomycetes 纲 (占比 5.40%)、Dothideomycetes 纲 (占比 2.58%); 重楼根部内生菌主要分布于 8 个纲, 分别为 Dothideomycetes 纲 (占比 42.15%)、Agaricomycetes 纲 (占比 38.72%)、Saccharomycetes 纲 (占比 15.2%)、Eurotiomycetes 纲 (占比 8.01%)、Leotiomyces 纲 (占比 3.02%)、Chlorophyceae 纲 (占比 2.37%)、Malasseziomycetes 纲 (占比 1.15%)、Tremellomycetes 纲 (占比 0.08%); 重楼根茎内生菌主要分布于 8 个纲, 分别为 Leotiomyces 纲 (占比 87.82%)、Dothideomycetes 纲 (占比 2.94%)、Saccharomycetes 纲 (占比 2.59%)、Eurotiomycetes 纲 (占比 1.50%)、Agaricomycetes 纲 (1.48%) 占比、Chlorophyceae 纲 (占比 0.33%)、Tremellomycetes 纲 (占比 0.12%)、Malasseziomycetes 纲 (占比 0.04%)。

从目水平的分类看, 重楼根际真菌主要分布于 35 个目, 其中相对百分含量前 5 的有 Mortierellales 目 (占比 36.16%)、Auriculariales 目 (占比 18.49%)、Hypocreales 目 (占比 8.22%)、Cystofilobasidiales 目 (占比 2.80%)、Filobasidiales 目 (占比 2.60%); 重楼根部内生菌主要分布于 15 个目, 其中相对百分含量前 5 的有 Auriculariales 目 (占比 36.34%)、

Helotiales 目 (占比 14.49%)、Sebacinales 目 (占比 10.44%)、Capnodiales 目 (占比 7.73%)、Hypocreales 目 (占比 5.18%); 重楼根茎内生菌主要分布于 20 个目, 其中相对百分含量前 5 的有 Helotiales 目 (占比 86.98%)、Capnodiales 目 (占比 2.59%)、Auriculariales 目 (占比 1.40%)、Eurotiales 目 (占比 1.24%)、Hypocreales 目 (占比 1.19%)。

从科水平的分类看, 重楼根际真菌主要分布于 68 个科, 其中相对百分含量前 5 的有 Microdochiaceae 科 (占比 26.28%)、Nectriaceae 科 (占比 3.95%)、Clavicipitaceae 科 (占比 2.82%)、Mrakiaceae 科 (占比 2.80%)、Plectosphaerellaceae 科 (占比 2.59%); 重楼根部内生菌主要分布于 24 个科, 其中相对百分含量前 5 的有 Lasiosphaeriaceae 科 (占比 5.18%)、Mycosphaerellaceae 科 (占比 5.03%)、Serendipitaceae 科 (占比 4.16%)、Aspergillaceae 科 (占比 3.94%)、Pleosporaceae 科 (占比 1.71%); 重楼根茎内生菌主要分布于 31 个科, 其中相对百分含量前 5 的有 Helotiaceae 科 (占比 83.43%)、Cladosporiaceae 科 (占比 2.13%)、Aspergillaceae 科 (占比 1.10%)、Nectriaceae 科 (占比 0.8%)、Hypocreaceae 科 (占比 0.41%)。

从属水平的分类看, 重楼根际真菌主要分布于 148 个属, 其中相对百分含量前 5 的有 *Mortierella* 属 (占比 36.16%)、*Oliveonia* 属 (占比 17.86%)、*Solicoccozyma* 属 (占比 2.58%)、*Plectosphaerella* 属 (占比 2.02%)、*Tausonia* 属 (占比 1.93%); 重楼根部内生菌主要分布于 34 个属, 其中相对百分含量前 5 的有 *Oliveonia* 属 (占比 36.34%)、*Spirosphaera* 属 (占比 12.64%)、*Cercospora* 属 (占比 5.03%)、*Serendipita* 属 (占比 4.16%)、*Schizothecium* 属 (占比 3.09%); 重楼根茎内生菌主要分布于 51 个属, 其中相对百分含量前 5 的有 *Roseodiscus* 属 (占比 83.3%)、*Cadophora* 属 (占比 2.89%)、*Cladosporium* 属 (占比 2.15%)、*Oliveonia* 属 (占比 1.4%)、*Aspergillus* 属 (占比 0.82%)。

从属水平分类的微生物群落结构图 (图 4) 可看出, 重楼根际土、重楼根中, 真菌的均匀度高于根状茎中, 同时也说明了, 重楼根茎中有显著的优势菌群, 即 *Roseodiscus* 属真菌, 而该属真菌在根际土中相对百分含量仅为 0.01%, 而根中并未注释到, 在根茎中的相对百分含量为 83.3%, 重楼根茎

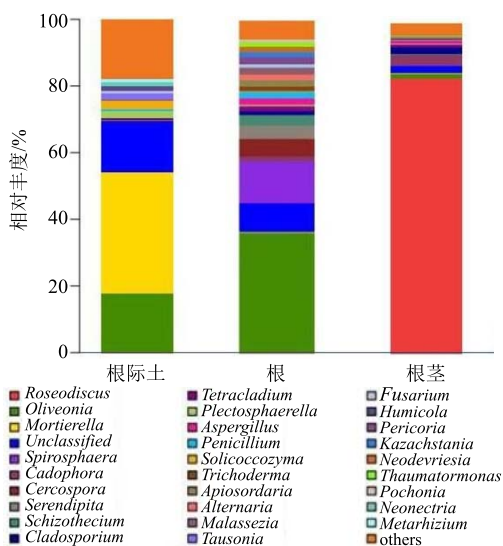


图 4 重楼根际及内生真菌属水平微生物群落结构

Fig. 4 Microbial community barplot of genus of rhizosphere and endophytic fungi in *Paris polyphylla* var. *chinensis*

中 *Roseodiscus* 属真菌的存在,在以往的重楼内生菌分离中鲜有报道,该菌对重楼代谢产物的合成调控的影响,有待进一步探究。

2.6 样品 OTUs Venn 分析

重楼根际土、根及根茎样品间微生物既存在一定的交集,又相互独立,从 Venn 图(图 5)来看,根际土中微生物的 OTU 数与植物中微生物的 OTU 数交叉性较少,仅有 9.8%,植物样本中拥有较多独立的 OTU 数,这可能是由于植物内部有其自身特殊的生境,微生物与植物间通过长期相互选择而造成其偏好性。这也是植物与微生物间协同进化的结果。

3 讨论

目前,有文献报道,植物次生代谢产物的合成与内生真菌的作用有关^[15, 21-22],并且已有研究人员

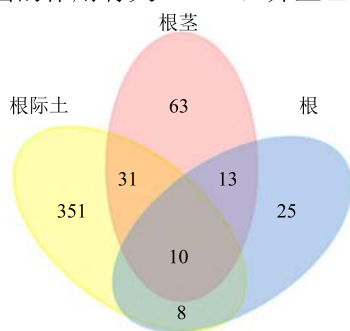


图 5 重楼根际及内生真菌 OTU Venn 图

Fig. 5 OTU Venn analysis of rhizosphere and endophytic fungi in *Paris polyphylla* var. *chinensis*

从重楼中分离出可合成重楼活性成分重楼皂苷的内生菌^[23-24],《中国药典》2015 年版中药材重楼以云南重楼及华重楼根茎入药,本实验以华重楼为样本,对重楼根际土、根及入药部位根茎进行真菌研究,通过高通量测序技术,对重楼内生菌群落多样性及根际菌、内生菌群落差异进行研究,研究结果表明,重楼根际土壤真菌、根内生菌、根茎内生菌中优势菌群分别为 *Mortierella* 属、*Oliveonia* 属和 *Roseodiscus* 属,根茎为重楼的入药部位,其优势菌群为 *Roseodiscus* 属真菌,在根茎内生菌中相对含量占比高达 83.3%,但研究人员鲜有分离到 *Roseodiscus* 属真菌,故暂未见重楼内生 *Roseodiscus* 属真菌的报道,这一点也证明了高通量测序手段较传统的菌落分离更能全面反映内生真菌群落的真实结构组成^[25]。

通过测序结果发现,重楼根际土壤真菌被注释到 148 属,重楼根中被注释到 34 属,根茎中被注释到 51 属。实验结果表明,重楼根际土壤真菌多样性大于植物内生菌的多样性,并且土壤中真菌的均匀度高于内生真菌,重楼根茎中内生真菌中形成了明显优势菌群,尤其是入药部位根茎,在目前现有的研究中,重楼内生菌群对宿主植物合成活性代谢产物的影响仍研究甚少,该课题组也将利用代谢组学的相关研究方法,针对重楼入药部位根茎菌群对有效成分合成的影响做进一步的研究。

参考文献

- [1] 李 恒. 重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 杨远贵, 张 霁, 张金渝, 等. 重楼属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3301-3323.
- [5] 陈美红, 梁梦园, 闻晓东, 等. 重楼地上部分化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2018, 37(1): 44-50.
- [6] 程虎印, 颜永刚, 程江雪, 等. 陕产重楼属南重楼组药用植物分布新记录调查研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(3): 1-6.
- [7] Denise K. Isolation and characterization of endophyticcolonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants, PatLambrecht [J]. *App L Environm Microb*, 2002, 68: 2198-2205.
- [8] Tan R X, Zou W. Endophytes: A rich source of functional metabolites [J]. *Nat Prod Rep*, 2001, 18: 448-456.
- [9] Strobel G A. Endophytes as sources of bioactive products

- microbes and infection [J]. *Microbes Infection*, 2003, 5: 535-540.
- [10] 胡凯, 谈锋, 唐克轩, 等. 南方红豆杉中产紫杉醇内生真菌的分离和筛选 [J]. 西南师范大学学报, 2006, 31(1): 134-137.
- [11] Petrini O. *Fungal Endophytes of Tree Leaves* [M] New York: Springer-Verlag, 1991.
- [12] 王茜, 申仕康, 张爱丽, 等. 滇重楼内生真菌分离与多样性研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(22): 3838-3844.
- [13] Shen L, Li L Y, Zhang X J, *et al.* A new indole derivative from endophyte *myrothecium roridum* IFB-E091 in *Artemisia annua* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2015, 50(10): 1305-1308.
- [14] Tian Y, Amand S, Buisson D, *et al.* The fungal leaf endophyte *paraconiothyrium variabile* specifically metabolizes the host plant metabolome for its own benefit [J]. *Phytochemistry*, 2014, 108: 95-101.
- [15] 宝艳儒, 刘悦, 解生旭, 等. 内生真菌对药用植物活性成分影响研究进展 [J]. 人参研究, 2017, 29(5): 40-45.
- [16] 郑红梅, 叶耀辉, 王婷, 等. 药用植物内生真菌及其代谢产物活性的研究概况 [J]. 江西中医药, 2016, 47(4): 71-73.
- [17] Schloss P D, Gevers D, Westcott S L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-Based studies [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e27310.
- [18] Urmas K, Nilsson H R, Kessy A, *et al.* Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi [J]. *Mol Ecol*, 2013(22): 5271-5277.
- [19] Wang Y, Sheng H F. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags [J]. *Appl Environ Microb*, 2012, 78(23): 8264.
- [20] Scott T B, Jose C C, Gilberto E F, *et al.* Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil [J]. *ISME J*, 2013(7): 652-659.
- [21] 高阳. 金钗石斛内生菌多样性与石斛碱含量的相关性研究 [D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2017.
- [22] 赵妮, 邓毅, 董金香, 等. 药用植物内生菌与其宿主植物相互作用的研究进展 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2016, 33(5): 71-74.
- [23] Zhou L G, Cao X D, Yang C Z, *et al.* Endophytic fungi of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and steroid analysis in the fungus [J]. *Nat Prod Res Devel*, 2004, 16(3): 198-200.
- [24] 曹晓东, 周立刚, 徐利剑, 等. 滇重楼内生真菌的生物学性状及其甾体化合物含量 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(8): 125-128.
- [25] 刘蓬蓬, 陈江宁, 孟莉, 等. 基于 Illumina MiSeq 高通量测序分析黄芩内生细菌多样性 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2640-2646.