

不同重楼变种间内生真菌群落多样性差异及生物标记物初探

王艳¹, 王汉屏², 程虎印^{3*}, 赵乐⁴, 万一¹, 杨琳³

1. 陕西省微生物研究所, 陕西 西安 710043

2. 西安外事学院医学院, 陕西 西安 710077

3. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

4. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001

摘要: **目的** 通过对不同变种重楼内生真菌群落多样性研究及生物标记物分析, 为中药材重楼多基源质量等同性及鉴别溯源技术的开发研究奠定基础。**方法** 采用 Illumina HiSeq 高通量测序技术对 3 个变种的重楼内生真菌群落基因进行扩增子序列测定, 同时对菌群多样性、真菌群落差异进行生物信息学分析。**结果** 对不同变种重楼内生真菌进行多样性分析结果显示, 七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara、长药隔重楼 *Paris polyphylla* Sm. var. *thibetica* (Franch.) Hara、具柄重楼 *Paris fargesii* Franch. var. *petiolata* (Baker ex C. H. Wright) Wang et Tang 三者的内生真菌的 α 多样性存在差异, 但 β 多样性无显著性差异, 具柄重楼中特有的 OTU 仅为 0.27%。真菌群落注释结果表明, 3 个变种分别注释到 6 个相同的门, 但组成比率不同。另外, 通过 LEfSe 分析, 初步探索了 3 个变种的生物标记物差异, 七叶一枝花中 *Rhizophagus irregularis* 与其他 2 变种有显著性差异。**结论** 3 个变种重楼内生真菌群落 β 多样性变化不显著, 但组成比率有很大的差异性。该研究结果中药材重楼多基源质量等同性及鉴别溯源技术的开发研究提供研究基础。

关键词: 重楼; 内生真菌; 高通量测序; 多样性; 生物标记物

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)17-4531-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.022

Diversity and biomarker exploration of endophytic fungi communities in different varieties of *Paridis Rhizoma*

WANG Yan¹, WANG Han-ping², CHENG Hu-yin³, ZHAO Le⁴, WAN Yi¹, YANG Lin³

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

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

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

4. School of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China

Abstract: Objective The analysis of endophytic fungi diversity and the biomarkers in different varieties of *Paridis Rhizoma* were used to lay a foundation for the development of quality equivalence and identification and traceability technology. **Methods** The amplicons of endophytic fungal community genes from three varieties of *Paridis Rhizoma* were sequenced by using Illumina HiSeq high-throughput sequencing. Bioinformatic analysis was performed to study the diversity of flora and the difference of fungal community. **Results** The α diversity of endophytic fungi from different varieties was different, but there was no significant difference in β diversity. The OTU of *Paris fargesii* var. *petiolata* (Baker ex C. H. Wright) in endophytic fungi was only 0.27%. The results of fungal community annotation showed that the three varieties were annotated to six identical phyla, but the composition ratios were different. Moreover, we explored the biomarker differences in three variants, and the *Rhizophagus irregularis* of *Paris polyphylla* through LEfSe analysis. is a biomarker with significant difference. **Conclusion** The diversity change of endophytic fungi community of the three varieties was not significant, but the composition ratio was different. The results of this study provided the research basis for the development of quality equivalence and identification and traceability technology.

Key words: *Paridis Rhizoma*; endophytic fungi; high-throughput sequencing; diversity; biomarker

收稿日期: 2020-02-08

基金项目: 国家重点研发项目 (2018YFD1001000); 陕西省重点研发计划项目 (2019SF-291); 陕西省科学院科技计划项目 (2018nk-01)

作者简介: 王艳 (1985—), 女, 助理研究员, 博士, 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 程虎印, 男, 教授, 主要从事药用植物资源开发及利用。Tel: (029)38184828 E-mail: Huyin_Cheng@126.com

重楼是百合科重楼属 *Paris* L. 植物的统称, 根据中国药典收录, 中药材重楼为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. 或七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎^[1], 主要化学成分分为皂苷类、黄酮类、三萜类、脂肪酸类等^[2], 其中以重楼皂苷 I、II、VI、VII 为《中国药典》2015 年版所规定的质量标志物^[1]。其药用价值具有镇痛、止血、抗炎抑菌、缩宫和抗癌等活性^[3-4], 常用于治疗跌打损伤、惊风抽搐、毒蛇咬伤、咽喉肿痛等症^[5-6]。其用途广泛、疗效确切、但种植技术不成熟。由于近年来野生重楼被过度挖掘, 野生资源面临枯竭, 中药材市场需求持续增长, 价格也在不断走高^[7], 人们在积极探索重楼中药材的多基源质量等同性^[8], 以及中药材的可追溯性^[9]。

植物内生菌 (endophyte) 是指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, 但不使宿主植物表现出外在病害症状的微生物^[10-12]。许多微生物与药用植物结合并形成植物-微生物的正面相互作用, 可能对植物寄主的生长、生理和次生代谢产物的合成产生影响。植物微生物能够参与宿主植物的次生代谢产物的合成与转化^[13], 药用植物的微生物群可能直接影响寄主的代谢, 从而影响中草药的代谢活性^[14-15]。研究表明, 同一种药用植物的次生代谢物含量可能因栽培地点、气候环境、植物基因型等因素相关^[16-17]。

本实验利用高通量测序技术对药用植物重楼 3 个不同变种的内生菌群进行研究, 并对其特有的生物标记物进行了研究, 以期为中药材的仿野生种植中品种的选择及品质的改善提供理论依据, 为中药材鉴别溯源技术的开发研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

实验样品 2019 年 5 月初采自陕西省宝鸡市太白县鹦鸽镇南源村 2 组, 海拔 1 027 m, 经纬度 E107°39'2 390", N34°03'4 836", 样品采集地为种植时间超过 3 年的药园, 由陕西中医药大学药学院程虎印教授鉴定为七叶一枝花 *P. polyphylla* Sm.var. *chinensis* (Franch.) Hara、长药隔重楼 *P. polyphylla* Sm. var. *thibetica* (Franch.) Hara、具柄重楼 *P. fargesii* Franch. var. *petiolata* (Baker ex C. H. Wright) Wang et Tang, 分别编号为 Qy、Cy、Jb。分别采集生长健康、无病虫害的植株 (根、根茎、叶), 每个样本取

3 个生物学重复。样品采集后, 连同部分生长地土壤一同放置于冷链箱中, 尽快带回实验室, 用于下一步实验。

1.2 主要试剂与仪器

Mobio 强力土壤 DNA 提取试剂盒 12888-50; Axyprep DNA 凝胶提取试剂盒 (Axygen Bioscience, United City, CA, 美国); 天根植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP342; Illumina HiSeq 高通量测序平台, 北京诺禾致源生物信息科技有限公司。

2 方法

2.1 样品前处理

将带回实验室的实验样品, 抖落根部土壤, 并用流动的水冲去植株表面的根际土和灰尘, 用柔软的刷子轻轻刷去根茎褶皱处的浮土, 将清洗后的植株分为根、根茎、叶, 分别置于 75% 酒精中清洗, 时间依次为 1.5、2.0、1.0 min, 酒精处理完毕后用 5% 次氯酸处理 3 min, 最后再用无菌水清洗消毒液 3 次, 最终获得表面无菌的重楼根、根茎及叶样本, 消毒后的样本用液氮处理 30 s, 待液氮蒸发完毕, 将样品置于 -80 °C 超低温冰箱中, 待下一步的 DNA 提取。

2.2 DNA 提取

分别取 0.5 g 前期处理的根、根茎及叶样本进行 DNA 提取, 采用磁珠法对植物进行处理, 处理后的样本用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP342 进行提取; 提取步骤严格按照试剂盒的说明书进行。

2.3 PCR 扩增与测序

从植物样本中提取微生物 DNA。使用两对引物 ITS1-1F-FCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA, ITS1-1F-RGCTGCGTTCTTCATCGATGC, ITS5-1737F-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 和 ITS2-2043R-GCTGCGTTTCATCGATGC, 对真菌核糖体 RNA 的 ITS 区进行扩增。用 3 份 20 μL 混合物进行 PCR 反应, 其中含有 4 μL 5×FastPfu 缓冲液、2 μL 2.5 mm dNTPs、0.8 μL 引物 (5 μmol/L)、0.4 μL FastPfu 聚合酶和 10 ng 模板 DNA。从 2% 琼脂糖凝胶中提取扩增产物。用 Axyprep DNA 凝胶提取试剂盒, 根据试剂盒的操作要求进行纯化, 用 QuantiFluor™-St (Promega, 美国) 进行定量。

根据 Illumina 基因组 DNA 文库的制备过程, 构建 Illumina 对端文库, 然后根据协议在 Illumina HiSeq 平台对以上扩增文库进行配对测序。

2.4 数据统计与分析

对原始数据进行数据质控, 使用的软件为

Fast QC, 使用 Usearch 进行生物信息学分析, 使用 Fastq Mergepairs 方法合并双端序列, Cutadapt 1.18 切除引物, Fastx Uniques 去除数据冗余, Usearch fastq filter 对序列进行质控, Unoise3 算法进行 OTU (operational taxonomic unit) 无参聚类; 用 Otutab 生成 OTU 表格。聚类后的序列利用 Unite 数据库进行注释, Sintax 方法剪切值为 0.8, 利用分组中最少序列进行抽平, 抽平后得到 OTU 表格。

数据分析, 利用 Usearch 进行 α 多样性、 β 多样性的参数统计分析。多样性分析, 用 R3.5.1 对所得测序数据进行统计分析^[18]。并在 α 多样性分析中, 利用 Anova 法进行整体差异分析、利用 t 检验方法对植物根、根茎、叶等不同生态位的内生真菌群落物种多样性指数之间的差异性进行研究。在 β 多样性研究中, 使用 Binary Jaccard 算法

进行主坐标分析 (PCoA), 对 3 个变种之间的多样性距离进行度量。使用真菌数据库 Release 6.0^[19], 对菌群群落结构进行门水平和属水平的分类学统计分析^[3], 利用 Venn 分析^[20]对不同变种间共有、特有的真菌 OTU 数目, 直观地表现出样品间 OTU 的重合或相异情况。用 LEfSe [Line Discriminant Analysis (LDA) Effect Size] 分析寻找不同变种间的差异微生物。

3 结果与分析

3.1 数据质量分析

在测序的 27 个样品中, 共获得 4 916 431 条原始序列 (Raw tags), 质控过滤后共产生 4 916 411 条有效序列 (Clean tags), 每个样本平均产生 182 089 条 Clean tags。各部位的测序结果如表 1 所示, 不同变种各部位的平均读长在 210~259 bp, 且序列的有效率均在 99% 以上。说明测序结果正常, 可进行下一步的分析。

表 1 测序数据质量评估

Table 1 Quality assessment of sequencing data

编号	部位	原始序列	有效序列	平均读长/bp	有效率/%
Qy	叶	72 287	72 256	210	99.96
	根茎	88 443	88 318	236	99.89
	根	466 780	466 693	211	99.98
Cy	叶	103 410	103 393	225	99.98
	根茎	55 580	55 578	239	99.99
	根	189 375	188 580	259	99.57
Jb	叶	107 474	107 433	216	99.94
	根茎	101 468	101 430	247	99.91
	根	453 994	453 796	256	99.96

3.2 不同变种内生真菌菌落落的多样性分析

使用 Usearch 软件对样品中内生菌的 Alpha 多样性指数进行评估。用箱线图显示重楼 3 个变种的 ACE 指数、Shannon 指数 (图 1)。从图 1 可以看出, 3 个变种的真菌群落丰度及多样性均存在一定差异, ACE 指数表明, 三者的 OTU 丰度依次为长药隔重楼>七叶一枝花>具柄重楼, Shannon 指数表明, 这三者的内生真菌多样性依次为长药隔重楼>具柄重楼>七叶一枝花, 其中, 七叶一枝花与长药隔重楼微生物多样性有显著性差异 ($P<0.05$)。

另外, 对不同变种的不同部位进行 t 检验, *表示 $0.01<P<0.05$, **表示 $0.01<P<0.001$ 。结果如表 2 所示, 七叶一枝花根中 OTU 的丰度与长药隔及具柄重楼有显著性差异, 七叶一枝花叶中的微生物多样性与长药隔及具柄重楼也有着显著性差异, 但根茎、根中无显著性差异。

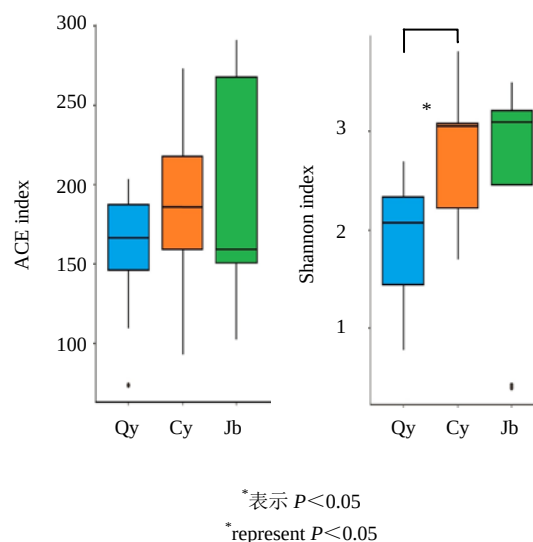


图 1 不同重楼变种中真菌群落的 α 多样性分析

Fig. 1 Alpha diversity of fungal communities in different varieties of *Paridis Rhizoma*

表 2 组间差异分析
Table 2 Analysis of inter-group differences

指数	组别比较	P 值		
		叶	根茎	根
ACE	Qy vs Cy	0.45	0.55	0.05*
	Cy vs Jb	0.08	0.91	0.24
	Qy vs Jb	0.99	0.56	0.01**
Shannon	Qy vs Cy	0.05*	0.84	0.05*
	Cy vs Jb	0.66	0.53	0.18
	Qy vs Jb	0.05*	0.59	0.06

*0.01 < P < 0.05; **0.01 < P < 0.001

3.3 不同变种的重楼内生菌 β 多样性分析

在 OTU 水平评估 3 个重楼变种内生真菌群落的 β 多样性, 对不同变种重楼各部位的真菌群落结构组成进行比较, 使用 Binary Jaccard 相异矩阵算法, 对各样本进行主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA) 分析, 样本间真菌群落结构的整体性关系由图 2 所显示。其中横坐标解释了关系值的 22.71%, 纵坐标上解释了关系值的 16.96%, 总解释度为 39.67%。PCoA 分析结果显示, 3 个变种不同样本的 β 多样性并无明显差异。

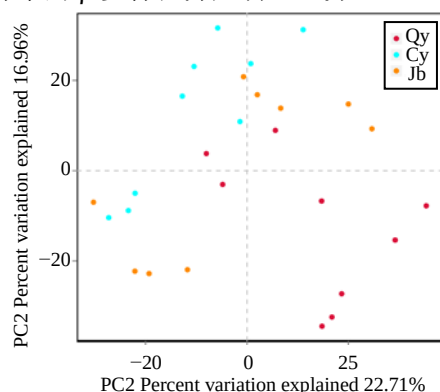


图 2 重楼不同变种真菌群落组成 PCoA 图

Fig. 2 PCoA map of fungal community composition at OTU level in different varieties of *Paridis Rhizoma*

3.4 不同变种重楼真菌群落组成多样性分析

分别对不同变种重楼内生真菌群落的组成在水平和属水平上进行统计, 从门水平注释结果所示(图 3), 被注释到的内生菌群主要主要有子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、球囊菌门 (Glomeromycota)、被孢霉门 (Mortierellomycota)、罗兹菌门 (Rozellomycota) 以及 Neocallimastigomycota。在门水平, 七叶一枝花、长药隔重楼、具柄重楼的最大注释率别为 97.14%、

82.54%、97.56% (图 3-B)。值得注意的是, 七叶一枝花在根中内生真菌的群落组成比率与长药隔重楼及具柄重楼有显著性差异, 在根茎中和叶中虽有差异, 但差异并不显著 (图 3-A)。

属水平注释结果所示, 3 个变种在属水平的真菌群落注释有较大差异性, 七叶一枝花、长药隔重楼、具柄重楼的最大注释率别为 68.47%、54.19%、64.09%, 为清晰显示不同品种中微生物群落的相对丰度, 图 3-C、D 只显示丰度前 10 的属, 相对丰度前 10 的属分别为四枝孢属 *Tetracladium*、根内球囊霉属 *Rhizophagus*、管柄囊霉属 *Funneliformis*、球囊霉属 *Glomus*、*Septoglomus*、链格孢属 *Alternaria*、芽枝霉属 *Cladosporium*、蚁巢伞属 *Termitomyces*、球腔菌属 *Mycosphaerella*、*Knufia*。另外, 从图 3-D 可看出, 3 个变种在属水平上, 内生微生物的群落组成有较大差异。

3.5 不同变种间 OTU 分布 Venn 分析

对不同变种的 OTU 数目进行 Venn 分析, 分析结果如图 4 所示, 3 个变种间共有的 OTU 为 288, 占有 OTU 数的 76.6%, 仅具柄重楼具有 0.27% 的特有 OTU, 七叶一枝花与长药隔重楼均没有特有的 OTU, 这也说明了这三者的具有很高的 OTU 相似性, 这种较高的 OTU 相似性是否也印证了宿主植物的代谢性, 需对它们的代谢物进行进一步的研究。

3.6 重楼不同变种间菌群差异显著性分析

通过 LEfSe^[21]分析, 对不同变种具有统计学差异的生物标记物 (biomarker) 进行初步分析, LEfSe 分析的结果如图 5 所示, 图 5 显示了 3 个样品具有显著性差异的生物标记物。*Rhizophagus irregularis* 为在该实验中七叶一枝花与其他 2 变种相区分的生物标记物; *Pezizaceae*、*Trichomeriaceae*、*Knufia*、

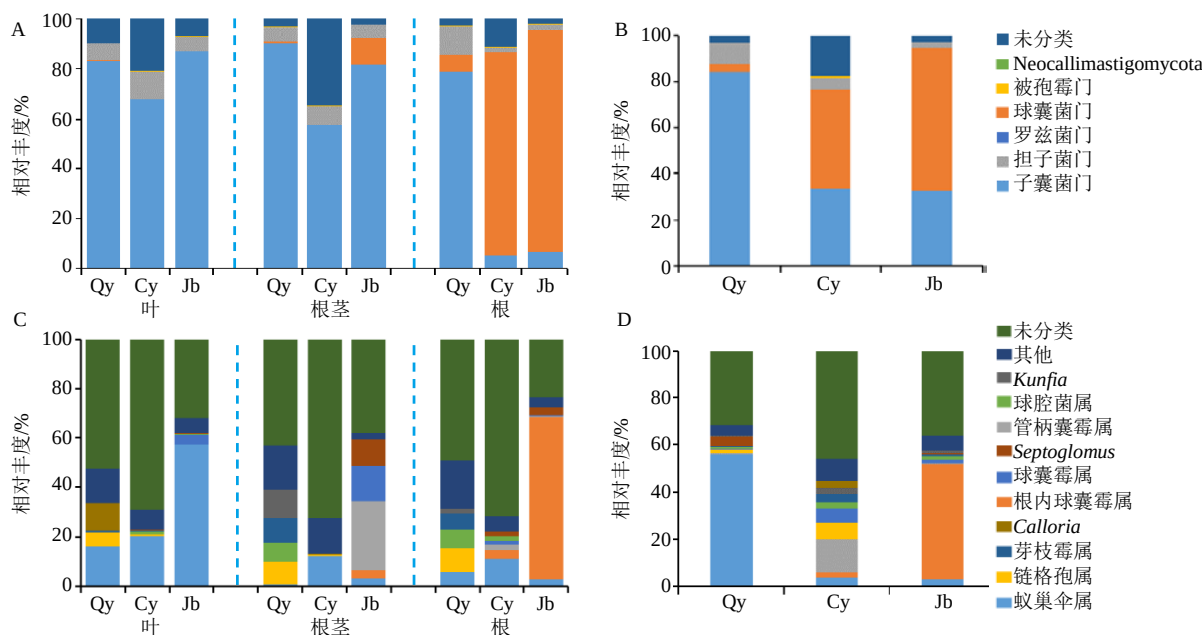


图 3 不同变种在门水平 (A、B) 及属水平 (C、D) 物种的组成差异

Fig. 3 Distribution of OTUs at phylum (A, B) and genus levels (C, D) at different varieties of *Paridis Rhizoma*

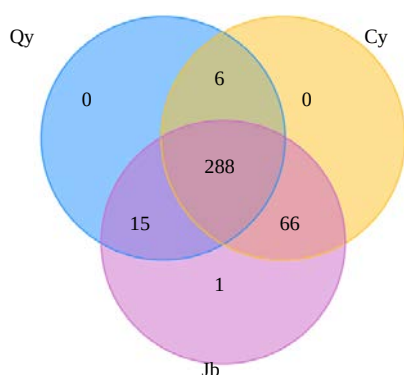


图 4 不同变种重楼内生真菌 OTU 分布 Venn 图

Fig. 4 OTU Venn analysis of OTUs distribution of endophytic fungi in different varieties of *Paridis Rhizoma*

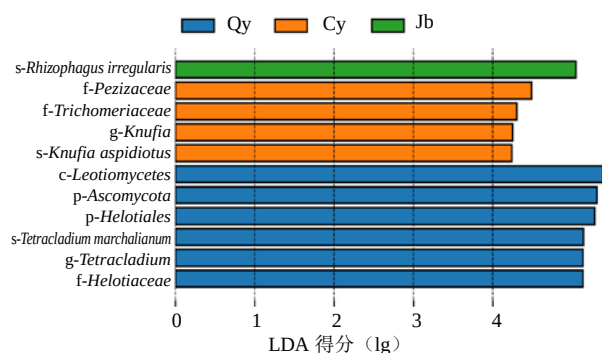


图 5 不同变种 LefSe 分析结果

Fig. 5 Results of LefSe analysis for different varieties of *Paridis Rhizoma*

Knufia aspidiotus 为长药隔重楼在该实验中与其他 2 变种相区分的生物标记物；*Leotiomycetes*、*Helotiales*、*Tetradium marchalianum*、*Tetradium*、*Helotiaceae* 为具柄重楼在该实验中与其他 2 变种相区分的生物标记物。

4 讨论

微生物类群对自身定殖的环境都有一定的适应性，并且也会选择适合自身生长的环境^[22-23]，因此，本课题组在重楼属植物的研究中，分别对七叶一枝花、长药隔重楼、具柄重楼的内生真菌群落进行研究， α 多样性研究结果表明，内生真菌的多样性和组成都存在显著差异。对这三者的 β 多样性研究发现，它们的空间矩阵距离并没有发生分离现象，这说明它们在 β 多样性上并无显著差异，另外，对其 OTU 分布进行了 Venn 分析，同样也可以看出，三者之间的 OTU 分布无太大差异，具柄重楼仅有 0.27% 的 OTU 是特有的，根据《中国植物志》^[24] 记载，具柄重楼为重楼属球药隔重楼 *P. fargesii* Franch. 的变种，而长药隔重楼为七叶一枝花 *Paris polyphylla* Sm. 的变种，因此这 2 个变种可能存在着相对较近的亲缘关系，这也可能是长药隔重楼与七叶一枝花具有更高微生物群落相似度的原因之一，但从整体上来讲，这三者的 β 多样性差异并不大。

在对不同变种的重楼进行内生真菌注释中,分别注释到 6 个门,门水平的注释率在 82.54%~97.56%,可以得知在门水平对内生真菌的注释有较高覆盖,其中子囊菌门、担子菌门、球囊菌门为相对丰度最高的 3 个门,这一结果与程虎印等^[3]的研究结果一致。植物在与微生物相互作用的过程中,微生物为植物的生长、发育、以及抗逆性提供支持,而植物则为微生物提供相对稳定的生存环境。本研究结果同样也证明了重楼内生真菌群落在门水平种类组成的相对稳定性。

在属水平上,对菌群的注释结果发现,4 枝孢属为七叶一枝花的优势属,管柄囊霉属为长药隔重楼的优势属,根内球囊霉属则为具柄重楼的优势属,由此可以看出重楼内生真菌在属水平上的种群分布与宿主的基因型关系密切,同时也说明了植物的基因型对微生物的组成的影响。Cregger 等^[25]的研究证实了微生物相互作用在微生物群落组成中的潜在重要性,杨树微生物组的改变可能改变杨树对真菌病原体的抗病能力。吴燕燕等^[26]的研究发现了不同桑树品种内生菌菌体对宿主的选择偏好性可能与宿主自身的生理结构、营养代谢途径以及其分泌的次生代谢产物有关。Sessitsch 等^[27]对水稻根部的内生群落的功能特征研究中表明,内生植物可能参与水稻的代谢过程。诸多研究表明,植物微生物的组成影响着宿主植物的生长、发育以及代谢产物的产生,对重楼相关菌群的进一步研究,将有助于优化药用植物的次生代谢,以生产有针对性的生物活性化合物,并提高其对中药生产的质量控制。

此外,这 3 个重楼变种的内生菌存在着大量的未被注释到的菌群,在属水平上有 31.53%~45.81% 的分类单元未被注释到,这些未被注释到的分类单元对药用植物的生长、代谢物的产生起到哪些新的作用,值得进一步深入研究。另外,这些新的分类单元也将给微生物的资源挖掘提供新的线索。本课题组通过 LEfSe 分析,初步探明不同变种间内生菌定植的偏好性,这些内生真菌的差异化定植在植物的生长发育、调节生物活性、植物代谢物的产生、仿野生种植后的质效变迁所起到的作用将是本课题组探索、研究的内容。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] 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.

[3] 程虎印, 王 艳, 赵 乐, 等. 基于高通量测序揭示重楼根际土及不同部位真菌群落差异 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(3): 455-461.

[4] 管 鑫, 李若诗, 段宝忠, 等. 重楼属植物化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4838-4852.

[5] 蒋 露, 康利平, 刘大会, 等. 历代本草重楼基原考 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3469.

[6] 张亚茹, 彭献娜. 王彩虹. 等. 重楼活性化学成分与药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(2): 39-44.

[7] 程虎印, 颜永刚, 刘亮亮, 等. 陕产重楼属南重楼组药用植物类群及资源调查 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(3): 1-6.

[8] 杨德全, 杨 勤, 周 浓. 多基源重楼的质量等同性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 91-98.

[9] 过立农, 刘 杰, 朱 玲, 等. 基于 DNA 条形码技术的重楼栽培品基原鉴定 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 857-866.

[10] Petrini O. *Fungal Endophytes of Tree Leaves* [M]. New York: Springer-Verlag, 1991.

[11] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349-363.

[12] 王 艳, 常 帆, 程虎印, 等. 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 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1232-1237.

[13] Köberl M, Ruth S, Elshahat M R, et al. The microbiome of medicinal plants: Diversity and importance for plant growth, quality and health [J]. *Front Microbiol*, 2013, 4: 400-406.

[14] Huang W J, Long C L, Lam E. Roles of plant associated microbiota in traditional herbal medicine [J]. *Trends Plant Sci*, 2018, 7: 559-562.

[15] Chen H M, Chen H M, Wu H X, et al. Core microbiome of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* seed: A rich reservoir of beneficial microbes for secondary metabolism? [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 672-687.

[16] 王 萌. 道地产区丹参内生真菌组成及其功能的初步研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.

[17] 仇有文. 土壤微生物对药材白术生物学产量和品质影响的研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2007.

[18] Development R. Core team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical [J]. *Computing*, 2016, Retrieved from <http://www.R-project.org>.

[19] Urmas K, Nilsson R H, Kessy A, et al. Towards a unified

- paradigm for sequence-based identification of fungi [J]. *Molecu Ecol*, 2013, 22(21): 5271-5279.
- [20] Chen H, Paul C B. Venn Diagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 35-39.
- [21] Segata N, Izard J, Waldron L, *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. *Genome Biol*, 2011, 12: 60-70.
- [22] Whipps J M, Hand P, Pink D, *et al.* Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype [J]. *J Applied Microb*, 2008, 105: 1744-1755.
- [23] Paloma D, Thorsten T, Ruben G O, *et al.* Microbial interkingdom interactions in roots promote *Arabidopsis* *Survival* [J]. *Cell*, 2018, 175(4): 973-983.
- [24] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (15) [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [25] Cregger M A, Veach A M, Yang Z K, *et al.* The populus holobiont dissecting the effects of plant niches and genotype on the microbiome [J]. *Microbiome*, 2018, 6: 31-45.
- [26] 吴燕燕, 徐伟芳, 罗 琴, 等. Illumina MiSeq 高通量测序分析不同品种桑树内生细菌多样性 [J]. 蚕学通讯, 2018, 38(3): 1-10.
- [27] Sessitsch A, Hardoim P, Ring J. *et al.* Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis [J]. *Mol Plant MicrInter*, 2012, 25(1): 28-36.