

不同产地阳春砂内生真菌的分子鉴定研究

肖晶晶¹, 王利国¹, 崔业旋², 陈煜扬¹, 廖志鹏¹, 李键洋¹

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006; 2. 广东省阳春市中医院药剂科, 广东阳春 529600)

摘要:【目的】观察广东阳春砂与云南阳春砂内生真菌的种类, 比较两地阳春砂内生真菌组成的差异。【方法】采用PDA培养基分离培养广东阳春砂与云南阳春砂茎叶内生真菌, 分析两地阳春砂内生真菌的定殖率、相对分离频率。对所获菌株, 通过形态特征鉴定归类后, 提取菌株的DNA并测序, 鉴定菌株的分类地位。【结果】广东阳春砂内生真菌定殖率: 茎26.67%, 叶54.44%; 云南阳春砂内生真菌定殖率: 茎15.56%, 叶43.33%, 与广东阳春砂比较, 卡方检验呈显著性差异($P < 0.05$)。广东阳春砂优势内生真菌是刺盘孢菌, 其次还分离到链格孢菌、曲霉菌、葡萄孢菌、棒孢菌、镰刀菌、大茎点霉菌、木霉菌; 云南阳春砂优势内生真菌是链格孢菌, 其次还有木霉菌、镰刀菌、裂盾菌、小丛壳菌和刺盘孢菌。其中, 刺盘孢菌、镰刀菌、链格孢菌和木霉菌是广东和云南阳春砂的共有内生真菌。【结论】广东阳春砂和云南阳春砂内生真菌种类较多, 内生真菌组成差异明显, 各自有不同的优势内生真菌。

关键词: 阳春砂; 内生真菌; 分子鉴定; 广东; 云南

中图分类号: R282.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)03-0590-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.03.027

Study on Molecular Identification of Endophytic Fungi in *Amomum villosum* Lour. from Different Habitats

XIAO Jing-Jing¹, WANG Li-Guo¹, CUI Ye-Xuan²,
CHEN Yu-Yang¹, LIAO Zhi-Peng¹, LI Jian-Feng¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China;

2. Dept. of Pharmacy, Yangchun Traditional Chinese Medicine Hospital, Yangchun 529600 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the species of endophytic fungi in Guangdong *Amomum villosum* Lour. and Yunnan *Amomum villosum* Lour., and to compare the difference in composition of endophytic fungi in *Amomum villosum* Lour. from the two habitats of Guangdong and Yunnan. **Methods** The PDA culture media was used to isolate and cultivate endophytic fungi from the stems and leaves of Guangdong *Amomum villosum* Lour. and Yunnan *Amomum villosum* Lour., and then the colonization rate and relative separation frequency of endophytic fungi in Guangdong *Amomum villosum* Lour. and Yunnan *Amomum villosum* Lour. were analyzed. For the achieved strains, after identification and classification were carried out for morphological characteristics, DNA was extracted and sequenced to confirm the taxonomic status of strains. **Results** The colonization rates of endophytic fungi in Guangdong *Amomum villosum* Lour. were 26.67% in stems and 54.44% in leaves, and colonization rates of endophytic fungi in Yunnan *Amomum villosum* Lour. were 15.56% in stems and 43.33% in leaves, Chi-square test showing that the difference was significant ($P < 0.05$ compared with Guangdong *Amomum villosum* Lour.). The predominant endophytic fungi in Guangdong *Amomum villosum* Lour. was *Colletotrichum*, moreover, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Corynespora*, *Fusarium*, *Macrophoma*, *Trichoderma* were also isolated. The predominant endophytic fungi of Yunnan *Amomum villosum* Lour. was *Alternaria*, moreover, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Schizothyrium*, *Glomerella*, *Colletotrichum* were also isolated, of which *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Alternaria*

收稿日期: 2020-04-15

作者简介: 肖晶晶(1997-), 女, 药师; E-mail: 15602210339@163.com

通讯作者: 王利国(1966-), 男, 博士, 讲师; E-mail: xiaosi20044@163.com

基金项目: 国家中医药管理局全国中药资源普查项目(编号: GZY-KJS-2018-004, GZY-KJS-2019-004)

and *Trichoderma* were common strains in Guangdong *Amomum villosum* Lour. and Yunnan *Amomum villosum* Lour..

Conclusion Guangdong *Amomum villosum* Lour. and Yunnan *Amomum villosum* Lour. have more species of endophytic fungi with significantly different composition, and are of different predominant endophytic fungi.

Keywords: *Amomum villosum* Lour.; endophytic fungi; molecular identification; Guangdong; Yunnan

砂仁是我国“四大南药”之一,主要来源于阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的干燥果实,性温,味辛,具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎等功效^[1]。砂仁属常用中药材,年需求量较大,传统上,广东省阳春市是砂仁的道地产区,但由于产量少,无法满足市场需求。从20世纪60年代开始,云南省西双版纳引种种植阳春砂获得成功,目前,经过几十年的发展已扩大栽培到云南省的西双版纳、德宏、文山、临沧、红河、保山和怒江等地,成为我国最大的阳春砂种植基地,年产量占全国的60%以上^[2]。此外,在广西、福建部分山区也有栽培。

植物内生真菌因长期定殖于植物组织内部,与宿主植物协同进化,二者形成了一种非常复杂的共生关系,影响着宿主植物各种成分的积累和对胁迫的应激反应^[3]。有研究发现,内生真菌可以产生与宿主相同或类似的化学成分。卢梦梦等^[4]从广藿香内生真菌中筛选出一株光炭轮菌 *Daldinia eschscholtzii* A616,从其代谢产物中鉴定出7种活性化合物,其中2种具有较好的抑制肿瘤细胞分裂的能力。李馨蕊等^[5]也从川芎内生真菌链格孢菌 *Alternaria* sp.IS275 菌株中获得1个新的内酯类化合物,鉴定为(+)-4,11-二羟基-2-十二烯-5-内酯。目前,国内阳春砂研究多集中在种植模式^[6-7]、活性成分^[8]和传粉受精^[9]等方面。最近,曹冠华等^[10]对云南产阳春砂根部内生真菌进行了分离鉴定,获得24株内生真菌菌株,其中8株具有解磷能力,但并未对茎叶中内生真菌进行分离鉴定,而根部分离的内生真菌应属于菌根真菌(mycorrhizal fungi, MF)。除了广东省是阳春砂的传统种植区,云南省阳春砂种植也已经有几十年的历史,为了观察广东和云南产阳春砂内生真菌种类,比较两地内生真菌的差异,本研究对广东与云南产阳春砂茎叶内生真菌进行分离和分子鉴定,为进一步筛选活性内生真菌菌株奠定基础,现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 广东阳春砂,采自广东省阳春市合水镇春东砂仁种植专业合作社,编号:GDYC;云南昌春砂,采自云南省怒江傈僳族自治州泸水市上江乡付坝村,编号:YNNJ。采样时间分别是2017年4月7日和2017年4月25日。采样方式按照5点取样法随机挖取健康植株,各挖取分株繁殖3年的阳春砂30株保湿带回,栽入广州中医药大学药圃遮阴处。经广州中医药大学中药学院李薇教授鉴定为阳春砂。待成活后进行内生真菌分离,最后移栽成活47株。

1.2 分离与纯化 分离培养基选用PDA。从样品中随机选取8片健康完整的带叶茎段,洗去泥土,将茎段和叶片剪成3~4 cm²组织块,先以体积分数75%乙醇冲洗5 min,后用体积分数为0.1%升汞消毒3 min,无菌水冲洗3次,取最后1次冲洗液滴于PDA平板上涂匀,作为对照。组织块用无菌滤纸吸干水分后,再次切成0.5~1 cm²组织块,平铺于PDA平板上。平板置于25℃恒温恒湿培养箱暗培养,隔天观察。当组织块周围有菌丝长出时,将其挑出培养,并进行单孢分离纯化,纯化后的菌株接种保存于斜面PDA培养基上并编号。于2~5℃冷藏保存,用于菌株的分类鉴定。每次处理30个组织块,各重复处理3次。

1.3 形态学鉴定 应用德国ZEISS Axio Scope A1光学显微镜进行形态学观察,形态学特征主要包括菌落形态、菌丝特征、分生孢子梗形态、孢子形态、产孢结构以及产孢方式等。不产孢的菌株首先进行促孢培养,产孢后按上述方法进行鉴定。对于促孢培养超过1个月(通常45 d)仍然不产孢的菌株,则依据菌落形态特征、菌丝生长速率和菌丝颜色等分为不同的无孢类群组。

1.4 分子鉴定 参考Ellis^[11]和Sutton^[12]的鉴定方法,用形态学特征归类,结合DNA分子鉴定结果对所获菌株进行种属分类鉴定。根据分离菌株的形态学特征,将所获菌株分为不同的形态类群,

并从每个类群中随机选取菌株3~7株提取DNA。DNA提取采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[13]。聚合酶链反应(PCR)扩增引物为ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),扩增5.8S的全序列。PCR扩增采用25 μL反应体系,反应液包括10×PCR Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1 μL, 5U Taq酶0.2 μL, 25 μmol/L的引物各1 μL,模板DNA 50 ng, ddH₂O补足25 μL,在美国Bio-Rad公司的mycycler@PCR扩增仪上扩增。

PCR反应程序:第1步,95℃预变性2 min;第2步,94℃变性20 s,68℃退火20 s,72℃延伸30 s,共30个循环;第3步,72℃延伸10 min。取5 μL PCR产物于2%的琼脂糖凝胶中电泳,电压5 V/cm,通过Bio-Rad凝胶成像仪观察结果,PCR扩增产物带在标准物500~600 bp位置上确定有无。扩增产物送广州擎科生物有限公司完成测序。

登陆NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),利用Blast将测序获得的菌株在5.8S rDNA区域序列与GenBank数据库中已知序列的进行比对,查找相似性最高的菌株,确定分离菌株的分类地位。

1.5 数据处理 定殖率常用来衡量植物中内生真菌的丰度,而相对分离频率则用来衡量植物中某一类内生真菌的优势度,分别参考下列公式计算:定殖率(%)=内生真菌感染的组织块数/总组织块数;相对分离频率(%)=分离到的某属或种的菌株数/分离到的总菌株数。

2 结果与分析

2.1 内生真菌分离与定殖率 从表1可以看出,

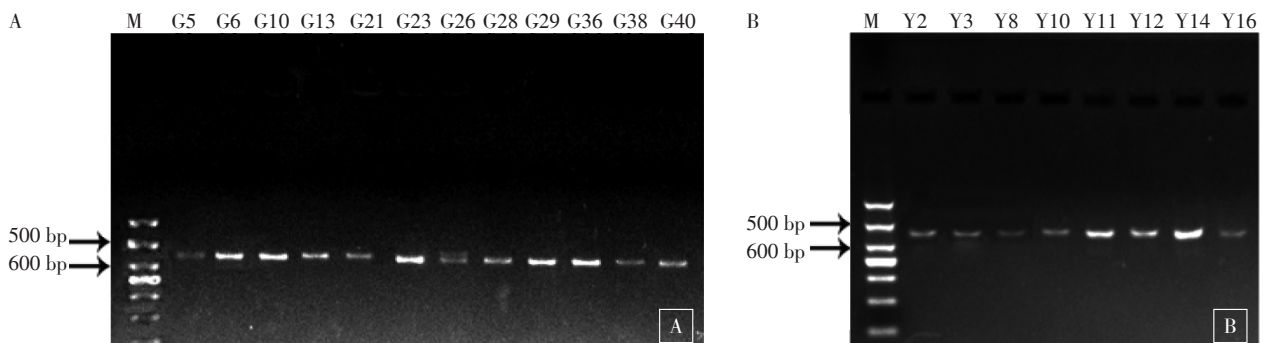
广东阳春砂(GDYC)和云南阳春砂(YNNJ)茎叶各90个组织块。广东阳春砂茎分离出24株内生真菌,定殖率为26.67%;叶分离出49株,定殖率为54.44%,共分离76株内生真菌。云南阳春砂(YNNJ)茎分离出14株,定殖率15.56%;叶分离出39株,定殖率43.33%。阳春砂内生真菌定殖率表现为广东阳春砂叶>云南阳春砂叶>广东阳春砂茎>云南阳春砂茎,卡方检验呈显著性差异($P < 0.05$)。通过形态学特征鉴定归类,归类后的菌株DNA通过PCR扩增,广东阳春砂有12株菌株在550~600 bp获得条带,云南阳春砂有8株菌株获得条带,见图1。

2.2 优势内生真菌形态学描述 广东阳春砂优势内生真菌为刺盘孢菌 *Colletotrichum* sp., 相对分离频率为62.66%;云南阳春砂优势内生真菌为链格孢菌 *Alternaria* sp., 相对分离频率为52.47%。刺盘孢菌在PDA培养基上培养7 d的表现:菌落乳白色,气生菌丝发达,生长快,接种后8 d菌丝布满整个平板,菌落呈棉絮状,边缘整齐,生长后期在培养基背面可观察到淡红色次生代谢产物,菌落表面布满黑点,为刺盘孢菌分生孢子。刺盘孢

表1 广东阳春砂和云南阳春砂内生真菌定殖率比较
Table 1 Comparison of colonization rates of endophytic fungi in Guangdong *Amomum villosum* and Yunnan *Amomum villosum* ($\bar{x} \pm s$)

组织	块数 (个)	定殖率(%)	
		茎	叶
广东阳春砂(GDYC)	90	26.67 ± 1.69 ^①	54.44 ± 10.44 ^①
云南阳春砂(YNNJ)	90	15.56 ± 1.04	43.33 ± 8.21

① $P < 0.05$, 与云南阳春砂(YNNJ)比较



A. 广东阳春砂分离菌株; B. 云南阳春砂分离菌株

图1 广东阳春砂和云南阳春砂内生真菌菌株PCR产物电泳图

Figure 1 PCR electrophoretogram for endophytic fungi strains isolated from Guangdong *Amomum villosum* and Yunnan *Amomum villosum*

菌丝是有隔菌丝, 分生孢子梗无色或基部淡褐色, 0~2隔, 筒状, 产孢细胞安瓶装至圆筒状, 10~18×3~4 μm。链格孢菌在PDA培养基上的表现: 菌落绒毛状或带絮状, 生长稍缓慢, 气生菌丝不发达, 菌落呈暗绿色, 后变成褐绿以至黑色。营养菌丝匍匐, 有隔, 呈暗色。分生孢子梗自菌丝发出, 单生或丛生, 暗色大多数不分枝, 较短, 与营养菌丝几乎无区别。分生孢子椭圆形或卵圆形, 顶端多具短而明显的喙, 或尖端突起。孢子淡褐色, 常数个孢子连接成链。见图2。

2.3 内生真菌的分类地位 通过测序获得的20株菌株DNA序列, 输入Blast进行比对, 结果发现: 广东阳春砂内生真菌属于9种不同分类单元的内生真菌。其中, 优势内生真菌为刺盘孢菌, 包含4个复合种, 分别为博宁刺盘孢菌 *C. boninense*、尖孢刺盘孢菌 *C. acutatum*、束状刺盘孢菌 *C. dematium* 和毁灭刺盘孢菌 *C. destructivum*。除此之外, 还分离到链格孢菌、曲霉菌 *Aspergillus*、葡萄孢菌 *Botrytis*、棒孢菌 *Corynespora*、镰刀菌 *Fusarium*、大茎点霉菌 *Macrophoma* 及木霉菌 *Trichoderma* 等内生真菌。云南昌春砂分属于6种不同分类单元内生真

菌, 其中, 优势内生真菌为链格孢菌, 包括雪叶莲链格孢复合种和大链格孢复合种, 其次分离到木霉菌、镰刀菌、裂盾菌 *Schizothyrium* sp.、小丛壳菌 *Glomerella* sp. 和刺盘孢菌。见表2。

3 讨论

越来越多的研究证实, 植物体内存在丰富的内生真菌, 其分布广、种类多, 具有丰富的生物多样性。同时, 内生真菌也存在寄主偏好或专一性, 不同的寄主、不同的生长环境对内生真菌种群结构组成和定殖有明显的影响。有研究发现, 宿主植物的不同发育时期和宿主所在地区的土壤成分、气候等条件影响着内生真菌种群群落数量和种类。吕立新等^[14]研究发现, 茅苍术 *Atractylodes lancea* 的内生真菌群落随着季节的变化而显示出一定的演替规律, 夏季内生真菌的多样性高于春季和秋季。Gao等^[15]研究也指出, 拐枣 *Hovenia acerba* 春季内生真菌的种类多于夏季。梁雪娟等^[16]从杜仲 *Eucommia ulmoides* 共分离得到152株内生真菌, 分属于8个属, 其中拟茎点霉菌 *Phomopsis*、间座壳菌 *Diaporthe* 和链格孢菌为3个不同产地内生真菌共有属, 且各产地的优势种群不同。陈静等^[17]从乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 中分离出438株内生真菌, 归属于5目7属11种, 其中有4个分类单元首次在甘草中被分离出来, 不同产地的乌拉尔甘草内生真菌的组成结构存在明显差异, 以甘肃的乌拉尔甘草内生真菌多样性最高。我们的研究结果也证明, 来自广东和云南的阳春砂内生真菌的多样性和复杂性, 两地的优势内生真菌并不相同, 其中: 广东阳春砂分离到内生真菌分属于9属, 5株鉴定到种, 优势内生真菌是刺盘孢菌, 其相对分离频率为62.66%; 云南昌春砂分属于6属, 3株鉴定到种, 优势内生真菌是链格孢菌, 其相对分离频率是52.47%。

虽然环境对植物内生真菌的定殖有重要影响, 但内生真菌对定殖宿主仍具有明显的选择性和偏好性, 即宿主在一定程度上决定了内生真菌种群结构的构成。Arnold^[18]对壳斗科 *Fagaceae*、柏科 *Cupressaceae* 和松科 *Pinaceae* 不同宿主植物的内生真菌种群结构和整体分布格局的研究表明, 内生真菌与宿主的共生关系具有很强的选择性。大量研究证实, 座囊菌纲 *Dothideomycetes* 的格孢菌

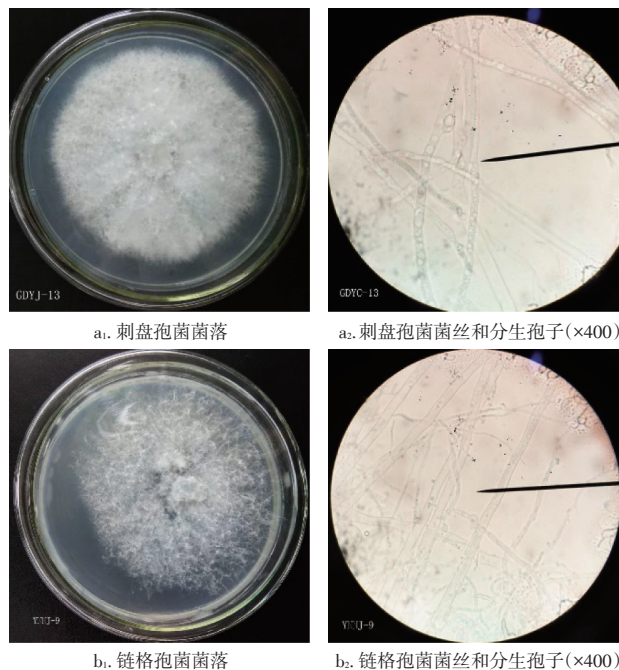


图2 广东阳春砂刺盘孢菌与云南昌春砂链格孢菌的培养形态

Figure 2 Morphological features of cultured *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. in Guangdong *Amomum villosum* and Yunnan *Amomum villosum*

表2 阳春砂内生真菌分子鉴定结果

Table 2 Molecular identification results of endophytic fungi in Guangdong *Amomum villosum* and Yunnan *Amomum villosum*

产地	相对分离频率(%)	菌株编号	序列号	最相似菌株	一致性(%)	
广东	20.45	G5	KM513611.1	博宁刺盘孢复合种 <i>C.boninense</i> strain JS6	99	
	15.21	G6	KX347456.1	尖孢刺盘孢复合种 <i>C.acutatum</i> strain KGL6	100	
	14.24	G10	KJ676455.1	束状刺盘孢复合种 <i>C.dematium</i> isolate CgloTIN10	100	
	12.76	G13	KP900300.1	毁灭刺盘孢复合种 <i>C.destructivum</i> strain JS1-SAS12	100	
	4.43	G21	KP900262.1	链格孢属 <i>Alternaria</i> sp. strain HE2740	98	
	6.21	G23	KP900277.1	曲霉属 <i>Aspergillus</i> sp. strain SS1-CJS5	99	
	7.89	G26	KP900235.1	葡萄孢属 <i>Botrytis</i> sp. strain FL1-CJL1	99	
	5.23	G28	KY053482.1	棒孢菌属 <i>Corynespora</i> sp. strain QD-LS	99	
	4.78	G29	KP900280.1	镰刀菌属 <i>Fusarium</i> sp. strain SS1-MS8	99	
	4.96	G36	HM535385.1	浆果赤霉 <i>Gibberella baccata</i> . isolate J-4	100	
	2.23	G38	KX655595.1	大茎点霉属 <i>Macrophoma</i> sp. isolate AC47	99	
	1.61	G40	KF923863.1	木霉属 <i>Trichoderma</i> sp. isolate UOMX	99	
	云南	22.35	Y2	KC505579.1	链格孢属 <i>Alternaria</i> sp. strain HE2740	99
		15.23	Y3	MF061788.1	雪叶莲链格孢复合种 <i>A.cinerariae</i> strain SCAU126	99
14.89		Y8	MF135524.1	大孢链格孢复合种 <i>A.macrospora</i> strain SCAU161	100	
7.23		Y10	MG132075.1	木霉属 <i>Trichoderma</i> sp. isolate UOMX	99	
15.14		Y11	KC505580.1	镰刀菌属 <i>Fusarium</i> sp. strain SS1-MS8	99	
8.98		Y12	KJ608191.1	裂盾菌属 <i>Schizothyrium</i> sp. isolate UTARA1	99	
9.78		Y14	MG132075.1	小丛壳属 <i>Glomerella</i> sp. strain EF-261	99	
6.40		Y16	KP033159.1	刺盘孢属 <i>Colletotrichum</i> sp. isolate GBJ8	99	

目 Pleosporales 是草本植物中较为普遍的内生真菌^[19-21]。另外,一些常见内生真菌,如链格孢菌、刺盘孢菌、茎点霉菌 *Phoma*、拟茎点霉菌 *Phomopsis* 和炭角菌目 *Xylariales* 在植物茎叶内均能分离到,但叶点霉菌 *Phyllosticta* 只分布在叶中,镰刀菌不能从叶中分离得到^[22],可见有些内生真菌具有组织的特异性。同属或同种植物不同产地往往可以分离到共同的内生真菌。沈湛云等^[23]研究了6个产地的玄参 *Scrophularia ningpoensis* 内生真菌,分属于25个属,其中,间座壳菌 *Diaporthe*、镰刀菌、黑孢菌 *Nigrospora*、链格孢菌、茎点霉菌 *Phoma*、棒孢菌、附球菌 *Epicoccum*、枝孢菌 *Cladosporium* 是6个产地内生真菌共有属。周仁超等^[24]从南药高良姜 *Alpinia officinarum* 分离到糙孢孔菌 *Trechispora*、镰刀菌、刺盘孢菌、青霉菌 *Penicillium*、拟盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis*、小皮伞菌 *Marasmius*。本研究从阳春砂种也分离到了镰刀菌和刺盘孢菌,而且刺盘孢菌还是广东阳春砂的优势内生真菌。同时,刺盘孢菌、镰刀菌、链格孢菌和木霉菌是广东和云南昌春砂的共有内生真

菌,但是相对分离频率不相同。内生真菌由于长期生长于植物组织内部,可获得宿主直接合成这些代谢产物的能力,或其代谢产物促进宿主生物转化的能力,为此,筛选阳春砂中有活性的内生真菌菌株将变得更加有实际意义。

参考文献:

- [1] 徐鸿华,刘军民.阳春砂规范化栽培技术[M].广州:广东科技出版社,2010:54.
- [2] 彭建明,张丽霞,马洁,等.西双版纳引种栽培阳春砂仁的研究概况[J].中国中药杂志,2006,31(2):97-101.
- [3] CLAY K, SCHARDL C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses [J]. *Am Nat*, 2002, 160(4): S99-S127.
- [4] 卢梦梦,陈玉婵,刘洪新,等.广藿香内生真菌 *Daldinia eschscholtzii* A630次级代谢产物及其细胞毒活性研究[J].天然产物研究与开发,2018,30(7):1176-1180.
- [5] 李馨蕊,马川,郭力,等.川芎内生真菌次级代谢产物中1个新的内酯化合物[J].中草药,2019,50(20):4859-4862.
- [6] 徐杰,李明晓,苏景,等.阳春砂-龙眼生态立体种植模式的研究[J].中国中药杂志,2018,43(2):288-298.
- [7] 彭建明,张丽霞,彭朝忠,等.阳春砂繁殖生物学及种群更新

- 的初步研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3297-3298.
- [8] 陆山红, 赵荣华, 么晨, 等. 砂仁的化学及药理研究进展[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 227-230.
- [9] 何国振, 高伟, 苏景, 等. 药用植物阳春砂花器形态特征[J]. 植物学报, 2014, 49(3): 313-321.
- [10] 曹冠华, 张雪, 马诗婷, 等. 阳春砂仁根内生真菌解磷功能评价及分类学鉴定[J]. 中草药, 2020, 51(5): 1316-1323.
- [11] ELLIS M B. Dematiaceous hyphomycetes [M]. London: International Mycological Institute, 1988: 246.
- [12] SUTTON B C. The Coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata [M]. London: Commonwealth Mycological Institute, 1980: 342.
- [13] 王桂娥, 晁群芳, 梁建芳, 等. 改良CTAB法提取新疆一枝蒿干叶基因组DNA[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 19-22.
- [14] 吕立新, 王宏伟, 梁雪飞, 等. 不同化学型和季节变化对茅苍术内生真菌群落多样性的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(24): 7300-7310.
- [15] GAO X X, ZHOU H, XU D Y, et al. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 249(2): 255-266.
- [16] 梁雪娟, 张水寒, 张平, 等. 不同产地杜仲皮内生真菌种群结构的比较分析[J]. 中草药, 2014, 39(2): 204-208.
- [17] 陈静, 许贞, 张雪, 等. 不同产地甘草内生真菌多样性及分离条件研究[J]. 药学学报, 2019, 54(2): 373-379.
- [18] ARNOLD A E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers [J]. Fungal Biol Rev, 2007, 21: 51-66.
- [19] ROSA L H, VAZ A B M, CALIGORNE R B, et al. Endophytic fungi associated with the antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) [J]. Polar Biol, 2009, 32: 161-167.
- [20] HERRERA J, KHIDIR H H, EUDY D M, et al. Shifting fungal endophyte communities colonize *Bouteloua gracilis*: effect of host tissue and geographical distribution [J]. Mycologia, 2010, 102(5): 1012-1026.
- [21] MÃRQUEZ S S, BILLS G F, ACUÑA L D, et al. Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus* [J]. Fungal Divers, 2010, 41: 115-123.
- [22] HUANG W Y, CAI Y Z, HYDE K D, et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants [J]. Fungal Divers, 2008, 33: 61-75.
- [23] 沈湛云, 朱波, 张泉龙, 等. 不同产地玄参内生真菌种群结构的比较分析[J]. 中草药, 2019, 50(4): 957-962.
- [24] 周仁超, 黄娟, 李泽恩, 等. 南药植物高良姜内生真菌群体多样性及其组织分布[J]. 中国中药杂志, 2014(16): 3013-3029.

【责任编辑：侯丽颖】

欢迎关注《广州中医药大学学报》“微信公众号”



本刊微信公众平台已开通, 通过手机个人微信“扫一扫”本刊“微信公众号”二维码并关注, 即可进入本刊微信公众平台。通过此手机微信平台, 可及时、准确地了解本刊的最新资讯、动态, 并能及时查询已投稿件处理状况, 检索论文、浏览下载过刊。快来关注我们的公众号吧!