

研究报告

不同生境银柴胡根内生菌群落特征及其与药材主要有效成分、产量的相关性分析

刘王锁^{*1}, 李振凯², 高敏³, 高学花¹, 韩新宁⁴, 杨智明⁴, 张芳¹, 董文飞⁴

1 宁夏葡萄酒与防沙治沙职业技术学院水利工程系, 宁夏 银川 750199

2 宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021

3 宁夏森林病虫害防治检疫总站, 宁夏 银川 750001

4 宁夏师范学院资源环境与生命科学学院, 宁夏 固原 756000

刘王锁, 李振凯, 高敏, 高学花, 韩新宁, 杨智明, 张芳, 董文飞. 不同生境银柴胡根内生菌群落特征及其与药材主要有效成分、产量的相关性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 262-278.

LIU Wangsuo, LI Zhenkai, GAO Min, GAO Xuehua, HAN Xinning, YANG Zhiming, ZHANG Fang, DONG Wenfei. Correlations of endophytic microbial community with main active components and yield of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* in different habitats[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 262-278.

摘要: 【背景】银柴胡(*Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*)具有重要的临床药用价值, 其总甾醇和总黄酮含量是评价药材的关键。【目的】探究药用植物银柴胡在不同生境下根内生菌群落特征及其与药材主要成分、产量之间的关系。【方法】采用高通量测序技术和药材常规测定方法, 分析了风沙土(semi-fixed aeolian sandy soil, SFA)生境、石砾质土(lithosol, LI)生境和黄绵土(loessal, LO)生境银柴胡根内生菌群落特征及其与药材性状响应关系。【结果】各生境银柴胡内生优势细菌门为放线菌门(*Actinobacteriota*)和变形菌门(*Proteobacteria*), 优势真菌门为子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*), 而内生优势菌属因生境不同各不相同; 银柴胡药材主要有效成分总甾醇和总黄酮含量在 LI 生境中较高, 而单株干重和干鲜比在 SFA 生境中较高。Spearman 相关性分析表明, 与银柴胡药材有效成分及产量显著正相关的内生菌相对较多。综合比较, 内生细菌如 metagenome_g_norank_f_67-14 和内生真菌如 unclassified_p_Ascomycota 等更为显著。【结论】与银柴胡药材关键活性成分相关的内生菌群落在种类鉴定和提取、菌种培养和次生代谢物分析等方面具有广阔的研究价值。本研究为银柴胡道地产区药材高质量产业发展提供理论参考。

关键词: 银柴胡; 生境; 内生菌群落; 有效成分; 产量; 相关性分析

资助项目: 宁夏回族自治区自然科学基金(2022AAC03641)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (2022AAC03641).

*Corresponding author. E-mail: liuwangsuo@sina.com

Received: 2023-06-15; Accepted: 2023-07-18; Published online: 2023-08-23

Correlations of endophytic microbial community with main active components and yield of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* in different habitats

LIU Wangsuo^{*1}, LI Zhenkai², GAO Min³, GAO Xuehua¹, HAN Xinning⁴, YANG Zhiming⁴, ZHANG Fang¹, DONG Wenfei⁴

1 Department of Hydraulic Engineering, Ningxia Technical College of Wine and Desertification Prevention, Yinchuan 750199, Ningxia, China

2 School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

3 Ningxia Forest Pest Control and Quarantine Station, Yinchuan 750001, Ningxia, China

4 School of Resources Environment and Life Sciences, Ningxia Normal University, Guyuan 756000, Ningxia, China

Abstract: [Background] *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* has an important medicinal value, and its quality can be evaluated based on the total sterols and total flavonoids. [Objective] To explore the endophytic microbial community characteristics in the root of *S. dichotoma* var. *lanceolata* growing in different habitats and the relationship of the microbial community structure with the main components and yield of the medicinal herb. [Methods] We employed the high-throughput sequencing and conventional determination methods of medicinal materials to analyze the characteristics of the endophytic microbial community in the roots of *S. dichotoma* var. *lanceolata* in different habitats of semi-fixed aeolian sandy soil (SFA), lithosol (LI), and loessal (LO). [Results] The dominant endophytic bacteria were *Actinobacteriota* and *Proteobacteria*, and the dominant fungi were *Ascomycota* and *Basidiomycota*. The dominant endophytic microbial genera varied depending on the habitats. The content of total sterols and total flavonoids was higher in the LI habitat, while the dry weight per plant and the dry weight-to-fresh weight ratio were higher in the SFA habitat. Spearman correlation analysis suggested that there were rich endophytes represented by metagenome_g_norank_f_67-14 (endophytic bacteria) and unclassified_p_Ascomycota (endophytic fungi) showing significantly positive correlations with the main medicinal components and yield of *S. dichotoma* var. *lanceolata*. [Conclusion] The endophytic microbial taxa associating with the key active components of *S. dichotoma* var. *lanceolata* have a broad research value in species identification and extraction, strain culture, and secondary metabolite analysis. This study provides a theoretical reference for the development of high-quality medicinal materials in the suitable producing areas of *S. dichotoma* var. *lanceolata*.

Keywords: *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*; habitats; endophytic microbial community; active components; yield; correlation analysis

生长环境是药用植物活性成分积累的重要因子，也是评价药材道地性的主要指标之一^[1]。因地理空间隔离和气候差异导致的土壤异质性，是中药微生物生态类群差异的关键，也是道地药

材产地属性和品质优良的主要成因，土壤环境因子的差异和药材道地性密切相关^[2]。近年来，探索内生菌(endophyte)与药用植物药材次生代谢之间的关系成为中药微生态学领域的研究热点^[3-4]，

尤其是内生菌对药材活性成分生成的诱导起到了关键作用^[5-7]。

植物内生菌是一定阶段或长期定殖于健康植物组织或器官内的细菌、真菌及放线菌等类群^[8]，通常与植物形成了共生体，起到了增强宿主免疫、抵御病原体及环境胁迫、协助吸收养分、促使生成次生代谢产物及提高生产力等作用，并在植物根际土壤养分循环与宿主健康生长过程中起着至关重要的角色^[9-10]。如果将生长环境定义为药用植物的外环境，那么内生菌一般被定义为药用植物的内环境^[11]，其菌群特征必然和药材有效成分密切相关。

银柴胡(*Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* Bge.)是石竹科繁缕属叉歧繁缕(*S. dichotoma* L.)的变种，其干燥根入药，具有清虚热、除疳热的功效，用于阴虚发热、骨蒸劳热和小儿疳热等症^[12]。银柴胡是宁夏重要的道地药材之一，其中同心县是宁夏县域栽培主产区，“同心银柴胡”已列为全国农产品地理标志，也是宁夏中药材产业发展规划的重点药材之一^[13]。野生银柴胡生境多样化，在宁夏中北部干旱区均有分布，范围较广，其中在大武口区石炭井和灵武市白芨滩自然保护区分布的野生银柴胡相对连片而集中。近年来，银柴胡的市场需求量逐年增加，尤其是无公害银柴胡^[14]，而无公害药材对土壤、施肥、水分和病虫害防治等要求较高。前人对银柴胡的研究主要集中在药用活性成分^[15]、临床应用^[16]及环境胁迫^[17]等方面，而关于不同生境银柴胡根内生菌群落特征及其与药材主要成分、产量之间的关系，目前尚无研究报道。本研究选择宁夏 2 个主要野生银柴胡分布区(宁夏回族自治区灵武市和大武口区)和 1 个主要栽培区(同心县)，以土壤类型为不同生境类型，旨在研究不

同生境条件下银柴胡根内生菌群落特征，同时分析不同生境银柴胡根内生菌与药材主要成分及单株产量的关系，以期为银柴胡根内生菌纯化与鉴定奠定研究基础，同时为黄河流域银柴胡产业高质量发展提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计与样品采集

供试样品采集于宁夏的 2 个野生分布区和 1 个栽培分布区，均属于不同土壤生境，即宁夏回族自治区灵武市白芨滩半固定流动沙丘的风沙土(semi-fixed aeolian sandy soil, SFA)和大武口区石炭井低山的石砾质土(lithosol, LI)野生生境和同心县预旺镇台地的黄绵土(loessal, LO)栽培生境，每种生境的基源药材均由宁夏大学李振凯博士鉴定为石竹科繁缕属的银柴胡(*S. dichotoma* var. *lanceolata*)。在每种生境银柴胡分布较集中的区域，布设 8 个 5 m×5 m 的样方，每个样方银柴胡分布数量均不低于 5 株，在每种生境取 8 个样方，每个样方内分别选取健康无病害、珍珠盘头数量尽可能接近的单株进行测定，重复 8 次。为了区别不同生境银柴胡生长年限，外业调查组统计了不同生境每株待测银柴胡珍珠盘头数量，经统计(表 1)，在 SFA 和 LI 生境中，银柴胡珍珠盘头数量最高，平均分别达到 20.5 个和 18.9 个，显著高于 LO 生境($P<0.05$)。

用已消过毒的铁锹或洋镐，选取每种生境 8 株健康，且珍珠盘头数据接近的银柴胡整株根系，用无菌毛刷刷去根系的土壤，用已消毒的枝剪剪取 1 cm 无病害的健康银柴胡根段，放入无菌管中，贴标签并迅速装入干冰桶内，带回实验室-80 °C 储存。同时将整株称鲜重后装入无菌袋带回。

表 1 不同生境银柴胡珍珠盘头数量统计

Table 1 Statistics on the number of a pearl plate heads of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* from different habitats

株号 Individual No.	珍珠盘头数量(个) Number of the pearl plate heads (individuals)		
	SFA	LI	LO
1	24	21	4
2	22	18	6
3	17	17	7
4	21	24	6
5	19	19	4
6	20	19	5
7	21	17	4
8	20	16	5
Average value	20.5a	18.9a	5.1b

不同小写字母表示差异显著

Different lowercase letters indicate significant difference.

1.2 主要试剂和仪器

磷酸钾缓冲液, 北京华科盛精细化工公司; α -菠甾醇对照品, 四川省天然药物分离纯化工程技术研究中心; 芦丁对照品, 西安泽邦生物科技有限公司; DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit, Qiagen 公司。Honda 本多超声波清洗机振荡器, 郑州平山贸易有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; NanoDrop2000 超微量分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司; MiSeq PE300 高通量测序平台, Illumina 公司。

1.3 样品表面消毒

取出储存的根段加入 10 mL 0.1 mol K_3PO_4 缓冲液(pH 8.0), 振荡洗涤, 重复 2 次, 将洗涤后的根段取出放入 50 mL 的锥形瓶中, 再加入 20 mL K_3PO_4 缓冲液, 超声波洗涤 10 min (参数: 160 W, 30 s/30 s), 洗涤后的根段再用 70%乙醇冲洗 2 次, 将根段储存于 $-80^{\circ}C$ 冰箱待测^[18]。

1.4 指标测定

将带回的整株银柴胡自然干燥后称重, 即单

株药材干重, 加权平均后求得平均单株药材干重 (dry weight of the root biomass, RBs), 核算干鲜比(dry-fresh ratio, D:F)。将风干药材粉碎至过 40 目的粉末状供试品, 参考张学良等^[19]的方法, 称取银柴胡粉末干品 0.5 g 置于容量瓶中, 加氯仿 20 mL, 超声提取 20 min, 冷却后再用氯仿稀释定容, 制备成试品溶液, 将 α -菠甾醇设置为对照品, 用分光光度计在波长 546 nm 处测定吸光值, 计算不同生境银柴胡总甾醇(total sterols, TSs)含量。参考李振凯等^[20]的方法, 称取银柴胡粉末干品 2.0 g 置于离心管中, 加入 95%的乙醇 25 mL, 常温下 250 W 超声提取 0.5 h 后取上清液, 试管沉积物再加入 95%的乙醇 25 mL, 超声提取 15 min 后将上清液与前一次混合, 静置得供试液, 精密度和稳定性验证参考周丽等^[21]的方法, 以芦丁为对照品, 用分光光度计在波长 496 nm 处测定吸光值, 计算不同生境银柴胡总黄酮(total flavonoids, TFs)含量。

1.5 高通量测序

称取 1.0 g 待测样品, 采用 DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit 提取微生物 DNA, 采用 NanoDrop2000 超微量分光光度计进行样本 DNA 的纯度和浓度检测, 再利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提 DNA 的完整度, 按样品检测区合成带有 barcode 的特异引物进行 PCR 扩增。内生细菌 16S rRNA 基因扩增选择 V5-V7 区域的两轮引物, 第一轮引物 799F (5'-AACMGGATTAG ATACCCKG-3')和 1392R (5'-ACGGGCGGTGTG TRC-3'), 第二轮引物 799F (5'-AACMGGATTAG ATACCCKG-3')和 1193R (5'-ACGTCATCCCCA CCTTCC-3'); 内生真菌 ITS 扩增选择 ITS1-ITS2 区的引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAA GTAA-3') 和 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATC GATGC-3')^[22], 由上海美吉生物医药科技有限公司提供技术支持。

1.6 数据分析

内生菌群落特征及相关性分析等微生物多样性数据分析在上海美吉生物科技有限公司交互式云平台(<https://cloud.majorbio.com/>)完成;药材主要成分、产量及干鲜比差异箱式图采用 GraphPad Prism 9 软件;门水平内生菌相关性分析采用 Origin 9.8.0 (2021 版本)软件;分析图的组合处理采用 Adobe Illustrator CS6 完成。

2 结果与分析

2.1 不同生境银柴胡根内生菌群落特征

不同生境形成了不同的银柴胡根内生菌群

落,通过优化提取,去除低质量序列后,将 97% 相似度的 OTU 序列进行聚类,在各生境样地中,银柴胡根内共获得了 1 139 条细菌 OTU 有效序列和 695 条真菌 OTU 有效序列,按照样本的测序量和测序深度,细菌(图 1A)和真菌(图 1B)的稀释曲线逐渐趋于平坦,表明测序样本量达到要求,代表了银柴胡根内菌群基本特征。银柴胡根内细菌特有 OTU 序列在 SFA 生境中最高,达到 326 个,LI 生境次之,为 183 个,LO 生境最少,仅有 51 个,共有 OTU 序列数较高,为 300 个(图 1C);根内真菌特有 OTU 序列也在 SFA 生境中最高,为 300 个,其次是 LI 生境,为 151 个,

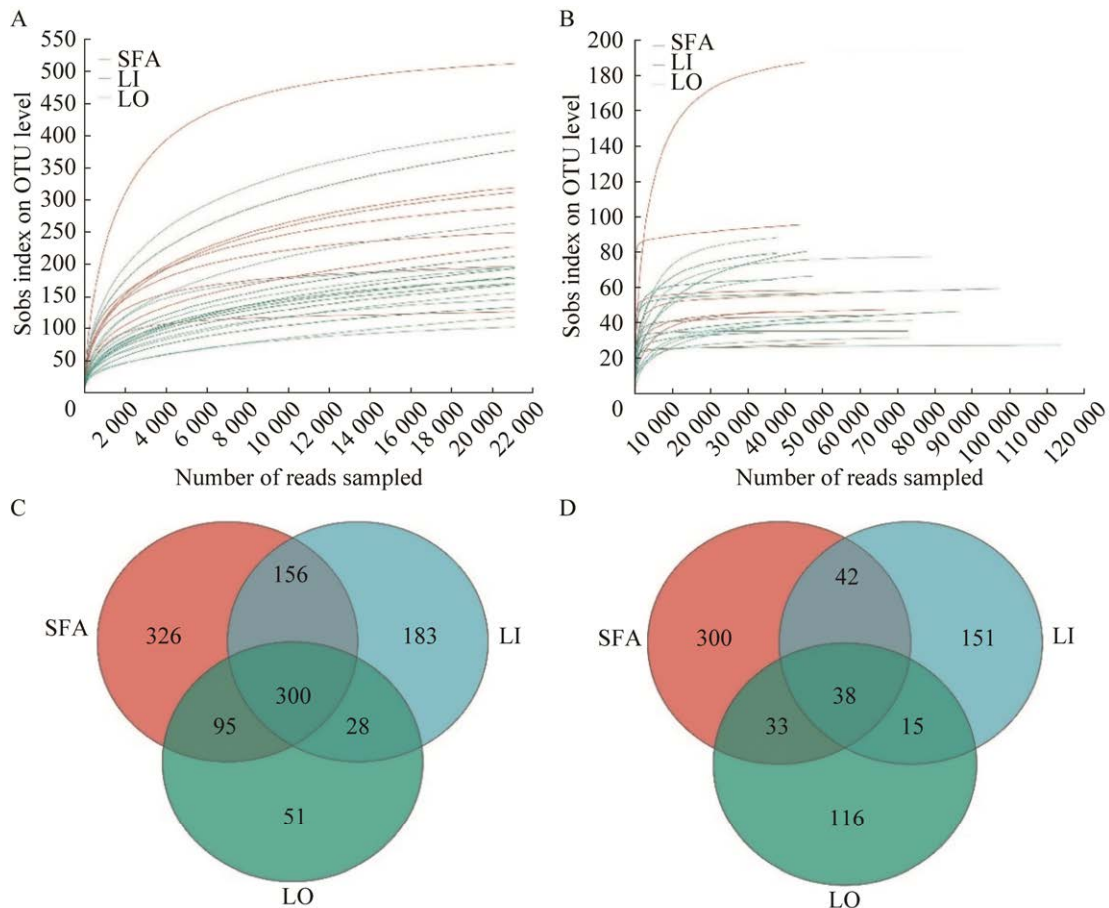


图 1 不同生境银柴胡根内细菌和真菌稀释曲线、韦恩图 A: 细菌群落稀释曲线. B: 真菌群落稀释曲线. C: 细菌 OTU 韦恩图. D: 真菌 OTU 韦恩图

Figure 1 Rarefaction curve and venn diagram of endophytic bacteria and fungi in the roots of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* from different habitats. A: Rarefaction curve of bacterial community. B: Rarefaction curve of fungal community. C: Venn diagram of bacterial OTU. D: Venn diagram of fungal OTU.

LO 生境最低, 为 116 个, 共有 OTU 序列数仅为 38 个(图 1D)。

在 SFA、LI 和 LO 这 3 种生境中, 银柴胡根内生菌群落组成各不相同。在门水平, 共检测到 25 个根内细菌门, 优势细菌门有放线菌门 (*Actinobacteriota*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 和酸杆菌门 (*Acidobacteriota*) 等, 其中以放线菌门和变形菌

门为主, 分别占序列总数的 52.36% 和 41.15% (图 2A); 在属水平, 共检测到 451 个根内细菌属类群, 优势细菌属有假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、贪食菌属 (*Variovorax*)、*Promicromonospora*、产碱菌科未分类属 (*unclassified_f_Alcaligenaceae*) 及 *Lechevalieria* 等, 其中以假诺卡氏菌属为主, 占序列总数的 36.33%, 不同生境表现出不同的根内优势细菌属类群(图 2B)。

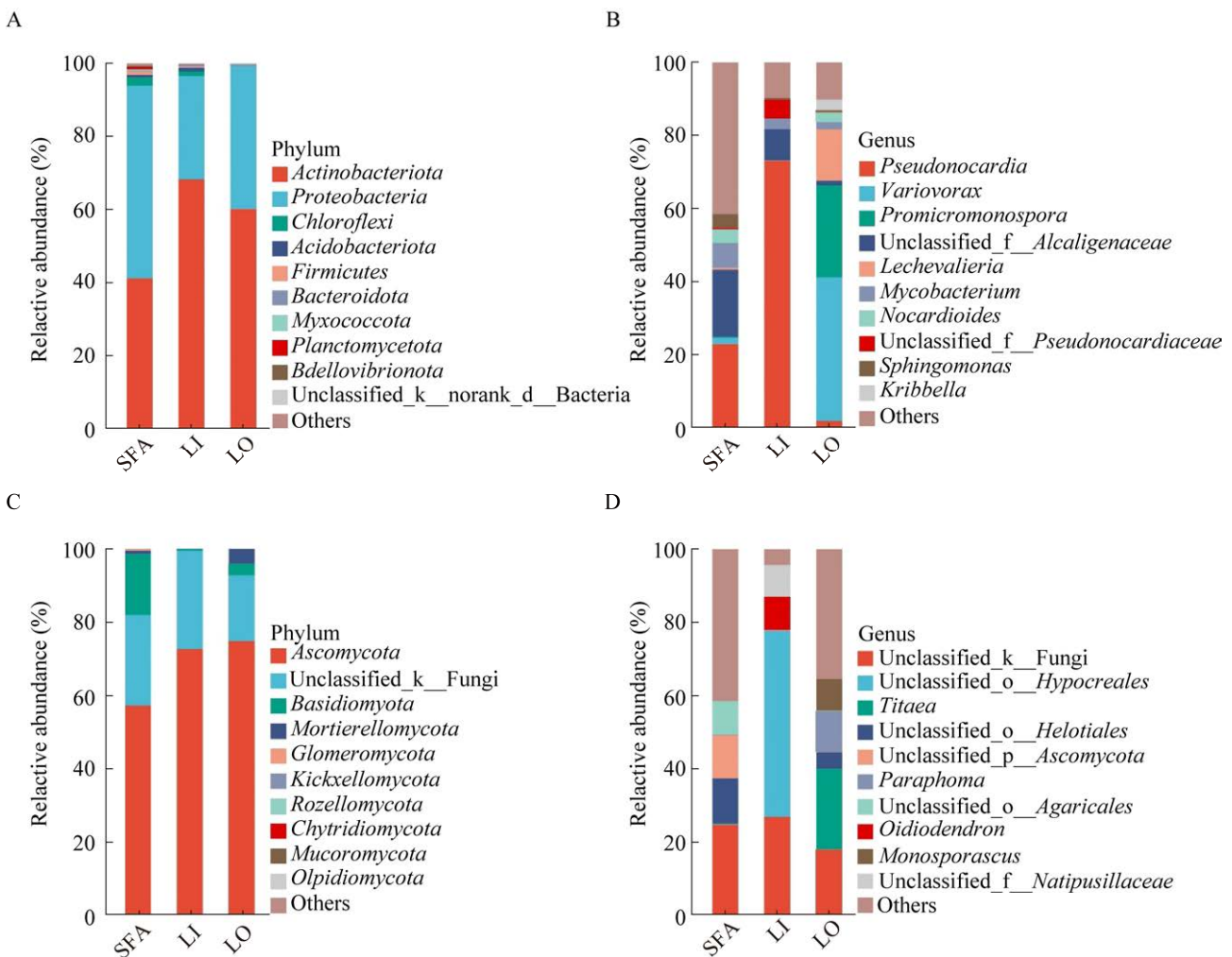


图 2 不同生境银柴胡根生细菌与真菌门水平和属水平的物种组成 A: 门水平细菌相对丰度. B: 属水平细菌相对丰度. C: 门水平真菌相对丰度. D: 属水平真菌相对丰度

Figure 2 Community composition of endophytic bacteria and fungi at phylum and genus levels in the root of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* from different habitats. A: Relative abundance of bacteria at phylum level. B: Relative abundance of bacteria at genus level. C: Relative abundance of fungi at phylum level. D: Relative abundance of fungi at genus level.

在 3 种生境中共获得 11 个银柴胡根内真菌门水平类群, 优势真菌门有子囊菌门(*Ascomycota*)、未分类真菌门(*unclassified_k_Fungi*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、被毛霉菌门(*Mortierellomycota*)和球囊菌门(*Glomeromycota*), 其中子囊菌门和担子菌门为主, 分别占序列总数的 68.14%和 23.22% (图 2C); 在属水平, 共获得根内真菌属类群 289 个, 除了 *Titaea*、树粉孢属(*Oidiodendron*)及 *Monosporascus* 外, 优势真菌属多以未分类真菌类群为主, 如未分类真菌属(*unclassified_k_Fungi*)、肉座菌目的未分类属(*unclassified_o_Hypocreales*)、柔膜菌目的未分类属(*unclassified_o_Helotiales*)、异茎点霉属(*Paraphoma*)和子囊菌门的未分类属(*unclassified_p_Ascomycota*)等, 其中以 *unclassified_k_Fungi* 为主, 占序列总数的 23.22%, 不同生境也形成了不同的根内真菌属类群(图 2D)。

在 3 种不同生境中, 共获得 685 株银柴胡根内细菌种水平物种, 在不同生境其丰度各有差异。在 SFA 和 LI 生境, 种水平共有优势物种均来自假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)和产碱杆菌科(*Alcaligenaceae*), 如假诺卡氏菌属的未分类种(*unclassified_g_Pseudonocardia*)、产碱杆菌科的未分类种(*unclassified_f_Alcaligenaceae*)和假诺卡氏菌属的未培养菌 (*uncultured_bacterium_g_Pseudonocardia*), 而在 LO 生境中, 优势物种为 *Variovorax paradoxus*、*Promicromonospora umidemergens* 及白丝伦茨氏菌 (*Lentzea albidocapillata*), 完全不同于 SFA 和 LI 生境(图 3A)。各生境共获得 412 株银柴胡根内真菌种水平物种, 物种丰度也随生境不同而各有差异。在 SFA 生境, 优势真菌多以未分类物种为主; 在 LI 生境, 以肉座菌目的未分类种(*unclassified_o_Hypocreales*)、未分类新种(*unclassified_k_Fungi*)和 *Oidiodendron maius* 为主; 而在 LO 生

境, 以 *Titaea maxilliformis* 等为主(图 3B)。

2.2 不同生境银柴胡药材主要有效成分及产量

通过测定 SFA、LI 和 LO 这 3 种生境银柴胡入药根的平均单株药材干重、干鲜比、总甾醇和总黄酮含量(图 4)。平均总甾醇(TSs)含量在 LI 生境为 3.85 mg/g, 较显著高于 LO 生境($P<0.01$), 在 SFA 生境为 3.57 mg/g, 显著高于 LO 生境($P<0.05$); 平均总黄酮(TFs)含量在 LI 中为 2.39 mg/g, 显著高于 LO 生境($P<0.05$); 平均单株药材干重(RBs)在 SFA 和 LI 生境中, 均极显著高于 LO 生境($P<0.001$), 分别为 205 g 和 184 g; 在 SFA 和 LI 生境中, 银柴胡药材根的干鲜比(D:F)均极显著高于 LO 生境($P<0.001$), 而 SFA 生境又显著高于 LI 生境($P<0.05$)。综合比较得出, LI 生境药材 TSs 和 TFs 相对较高, 而在 SFA 生境药材平均 RBs 和 D:F 相对较高。

2.3 不同生境银柴胡根内生菌与药材主要有效成分及产量的关系

银柴胡根内生菌门水平类群与药材主要有效成分及产量的相关性见图 5。总甾醇含量(TSs)与酸杆菌门(*Acidobacteriota*)显著正相关($P<0.05$), 而总黄酮(TFs)含量与变形菌门(*Proteobacteria*)显著负相关($P<0.05$)。单株药材干重(RBs)和干鲜比(D:F)分别与根内生菌类群显著相关, 细菌门主要有绿弯菌门(*Chloroflexi*) ($P<0.001$)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*) ($P<0.01$, $P<0.001$)、厚壁菌门(*Firmicutes*) ($P<0.05$, $P<0.01$)、浮霉菌门(*Planctomycetota*) ($P<0.001$)、蛭弧菌门(*Bdellovibrionota*) ($P<0.01$, $P<0.05$)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadota*) ($P<0.05$)、疣微菌门(*Verrucomicrobiota*) ($P<0.05$, $P<0.01$)和硝化螺旋菌门(*Nitrospirota*) ($P<0.01$, ns), 而真菌门有球囊菌门(*Glomeromycota*) ($P<0.05$)。同时, 根据内生真菌与细菌之间的关系, 子囊菌门与放线菌门、担子菌门与变形菌门、被孢霉门与拟

杆菌门、球囊菌门真菌与大多数细菌门存在协同关系。

基于 Spearman 分析了 3 种生境所有样本银柴胡根内细菌种水平类群与药材主要有效成分及干重的相关性(图 6)。与药材干重(RBs)和干鲜比(D:F)均极显著正相关($P<0.001$), 且与药材总甾醇(TSs)含量较显著正相关($P<0.01$)的内生细菌是

metagenome_g_norank_f_67-14; 分别与 RBs、D:F 显著正相关的内生细菌有红色杆菌科的未分类种(*unclassified_f_Solirubrobacteraceae*) ($P<0.05$, $P<0.01$)、芽孢杆菌属的未分类种 *unclassified_g_Bacillus* ($P<0.05$, $P<0.01$)、*Nocardioides jensenii* ($P<0.05$, $P<0.01$)、小单孢菌科的未分类种(*unclassified_f_Micromonosporaceae*)

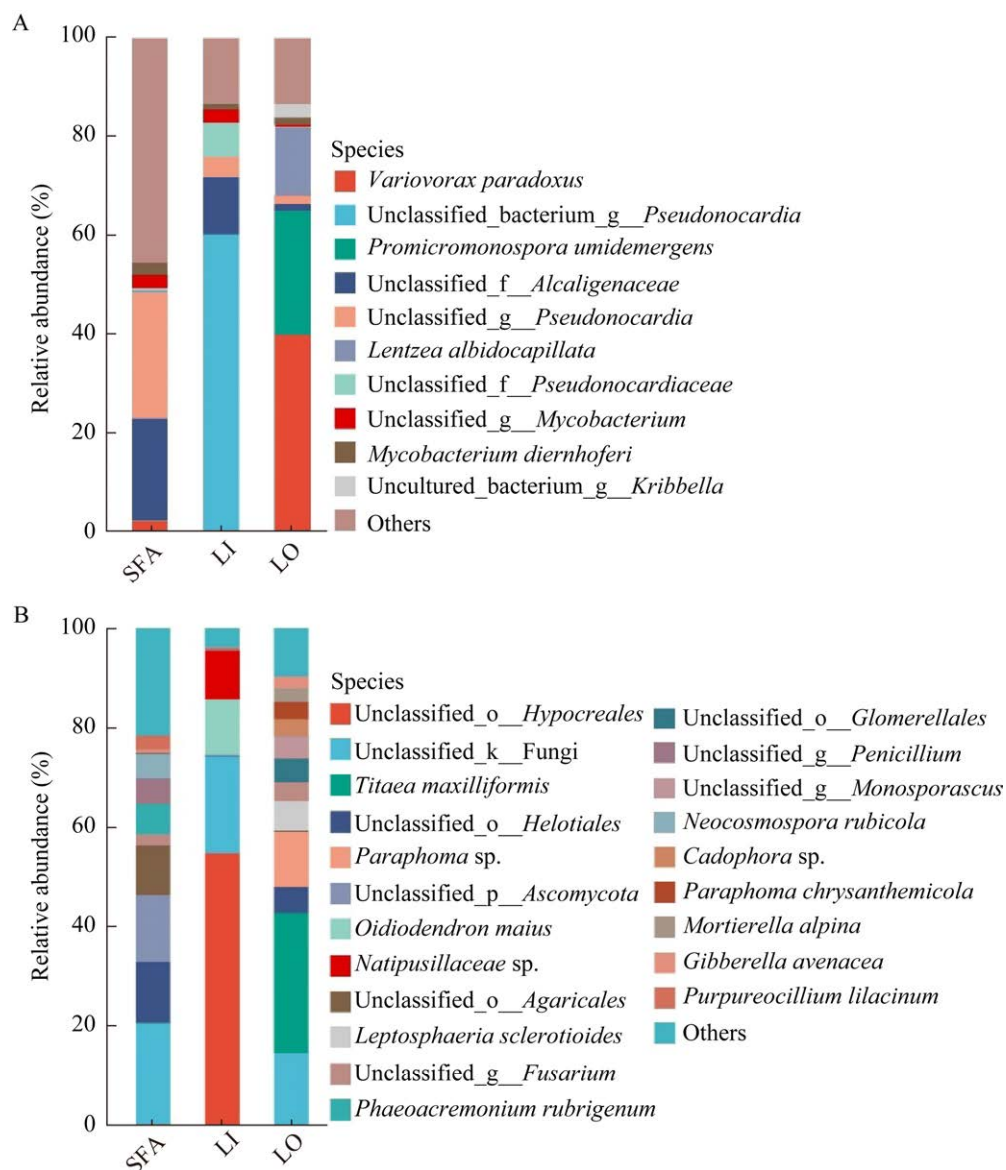


图 3 不同生境银柴胡根生细菌(A)与真菌(B)种水平物种组成

Figure 3 Community composition of endophytic bacteria (A) and fungi (B) at species levels in the root of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* from different habitats.

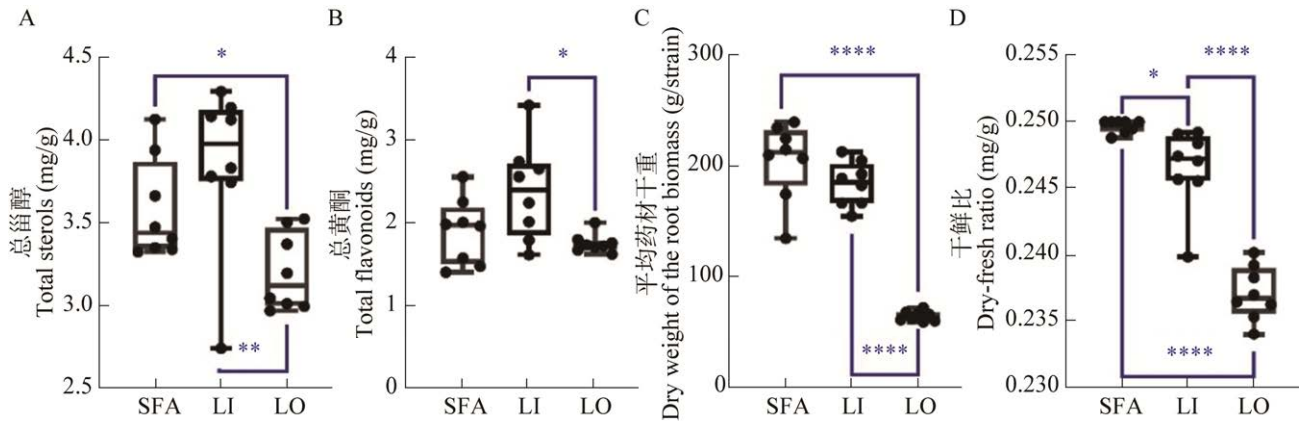


图 4 不同生境银柴胡药材主要有效成分与产量

Figure 4 Main active components and yield of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* from different habitats. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ****: $P < 0.001$.

($P < 0.01$)、产碱杆菌科的未分类种(unclassified_f_Alcaligenaceae) ($P < 0.05$, $P < 0.001$)及刺状鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas echinoides*) ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 RBs 和 TFs 均显著正相关的细菌有分枝杆菌属的未分类种(unclassified_g_Mycobacterium) ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 而与 TSs 和 TFs 均显著正相关的细菌有 *Amycolatopsis nigrescens* CSC17Ta-90 ($P < 0.01$) 和诺卡氏菌属的未分类种(unclassified_g_Nocardia) ($P < 0.05$); 与 TFs 极显著正相关的内生细菌是 *Pseudonocardia kunmingensis* ($P < 0.001$), 显著正相关的有伪诺卡氏菌科的未分类种(unclassified_f_Pseudonocardiaceae) ($P < 0.05$)、嗜酸杆菌属的未分类种(unclassified_g_Acidibacter) ($P < 0.05$)及 *Kibdelosporangium phytohabitans* ($P < 0.05$)。同时, 也有与药材主要成分及产量负相关的有 uncultured_bacterium_g_Kribbella 等。综合分析, metagenome_g_norank_f_67-14、分枝杆菌属的未分类种(unclassified_g_Mycobacterium)、*Pseudonocardia kunmingensis* 及芽孢杆菌属的未分类种(unclassified_g_Bacillus)等银柴胡根内细菌很可能是影响药材有效成分及产量等品质的重要类群。

银柴胡根内真菌种水平类群与药材主要有效成分及干重的相关性见图 7。结果表明, 与 TSs 和 TFs 均显著正相关的真菌类群有

Oidiiodendron maius ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 仅与 TSs 显著正相关的内生真菌有拜赖青霉菌(*Penicillium bilaiae*) ($P < 0.01$)、*P. nodositatum* ($P < 0.05$) 及肉座菌目的未分类种(unclassified_o_Hypocreales) ($P < 0.05$), 而仅与 TSs 显著正相关的内生真菌是 *Pochonia* sp. ($P < 0.05$); 与药材 RBs 显著正相关的真菌有土曲霉(*Aspergillus terreus*) ($P < 0.01$)、青霉菌属的未分类种(unclassified_g_Penicillium) ($P < 0.01$)、*Phaeoacremonium rubrigenum* ($P < 0.05$)及子囊菌门的未分类种(unclassified_p_Ascomycota) ($P < 0.05$)。综合分析, 拜赖青霉菌与 *O. maius* 很可能是促进银柴胡药材有效成分的重要根内真菌, 而土曲霉与霉菌属的未分类种(unclassified_g_Penicillium)很可能是促进银柴胡药材产量的重要根内真菌。

综上所述, 影响药材 TSs、TFs、RBs 和 D:F 的细菌类群主要为未鉴定和未培养的类群, 表明今后在银柴胡根内细菌的鉴定、培养和提取方面具有重要的研究价值, 而 *Penicillium* 与 *Aspergillus* 等内生真菌类群对药材品质与产量具有重要作用, 尤其是 unclassified_k_Fungi 及其新种等, 是未来研究银柴胡内生真菌的关键类群。

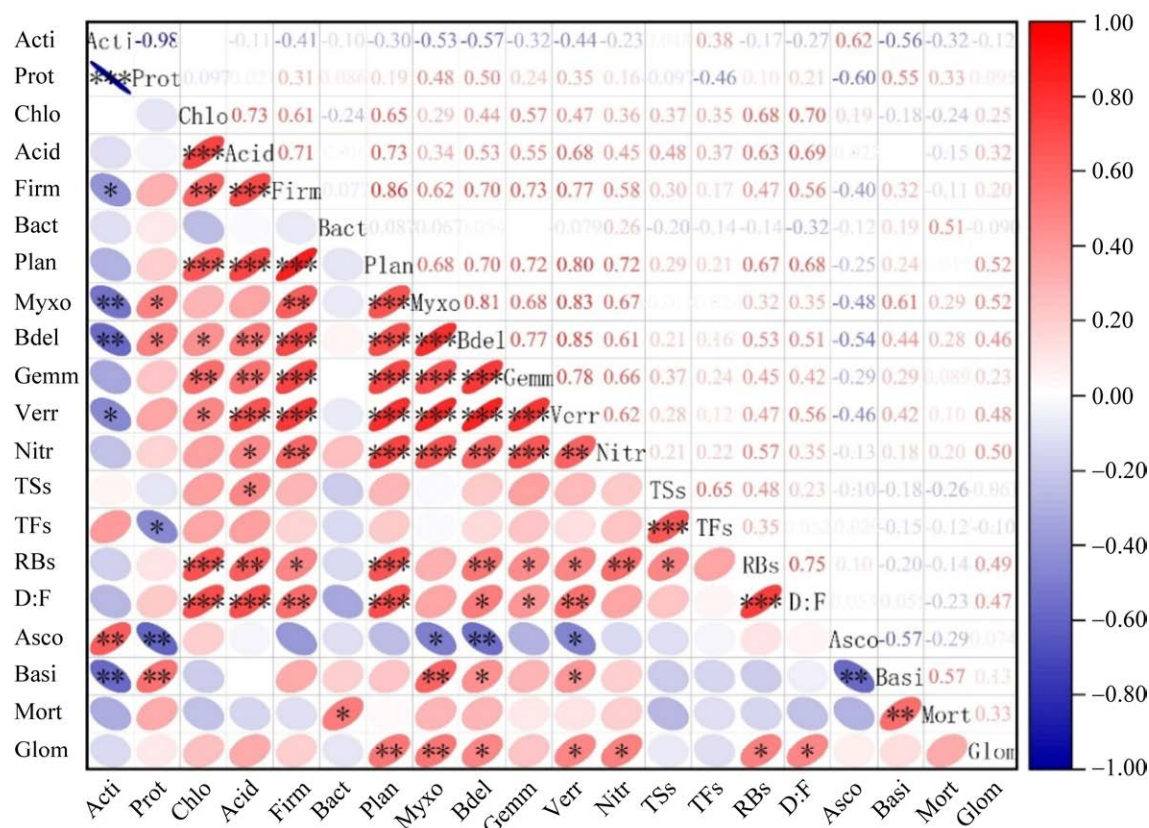


图 5 银柴胡门水平根内生菌与药材主要有效成分及产量的相关性 Acti: 放线菌门; Prot: 变形菌门; Chlo: 绿弯菌门; Acid: 酸杆菌门; Firm: 厚壁菌门; Bact: 拟杆菌门; Plan: 浮霉菌门; Myxo: 黏菌门; Bdel: 蛭弧菌门; Gemm: 芽单胞菌门; Verr: 疣微菌门; Nitr: 硝化螺旋菌门; TSs: 总甾醇; TFs: 总黄酮; RBs: 根生物量; D:F: 干鲜比; Asco: 子囊菌门; Basi: 担子菌门; Mort: 被孢霉门; Glom: 球囊菌门

Figure 5 Correlation of endophytic microorganisms in phylum-level of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* with main active components and yield of medicinal materials. Acti: *Actinobacteriota*; Prot: *Proteobacteria*; Chlo: *Chloroflexi*; Acid: *Acidobacteriota*; Firm: *Firmicutes*; Bact: *Bacteroidota*; Plan: *Planctomycetota*; Myxo: *Myxococcota*; Bdel: *Bdellovibrionota*; Gemm: *Gemmatimonadota*; Verr: *Verrucomicrobiota*; Nitr: *Nitrospirota*; TSs: Total sterols; TFs: Total flavonoids; RBs: Root biomass; D:F: Dry-fresh ratio; Asco: *Ascomycota*; Basi: *Basidiomycota*; Mort: *Mortierellomycota*; Glom: *Glomeromycota*. *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$.

3 讨论与结论

以根入药的药用植物,其部分内生菌对药材有效成分的合成与积累具有重要的促进作用^[23]。药材生长年限和生境异质性对植物内生菌群落组成及药用有效成分的调节起到了关键作用^[24-25]。根据笔者统计的银柴胡珍珠盘头数(表 1),不同

生境土壤因子和生长年限可能是引起银柴胡根内生菌群落组成差异的主要因素^[26]。本研究发现,不同生境条件和生长时期,银柴胡根内生菌群落组成各不相同,内生细菌以放线菌门和变形菌门的成员为主,如假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、产碱菌科未分类种(*unclassified_f_Alcaligenaceae*)等内生细菌。植

物内生放线菌具有重要的生防和养分迁移作用,如飞扬草(*Euphorbia hirta*)根内分离出46株内生放线菌,这些栖息在飞扬草根内的放线菌是抗菌代谢物生物合成的关键^[27]。粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*) BHU12是促进抗菌代谢物合成的一类重要产碱菌科内生细菌,能有效地抵御有害病原菌^[28],本研究在SFA和LI生境中,

银柴胡根内产生大量的未分类的产碱菌科类群,起到了关键的生防作用。假诺卡氏菌属的内生菌类群与纤维素降解、抗生素和酶类合成密切相关,被誉为“稀有放线菌”^[29],在酶制剂和抗生素提取方面前景广阔,本研究在LI和SFA生境银柴胡根内发现丰度较高的未分类假诺卡氏菌属物种,今后可作为特定环境中银柴胡功能类内生

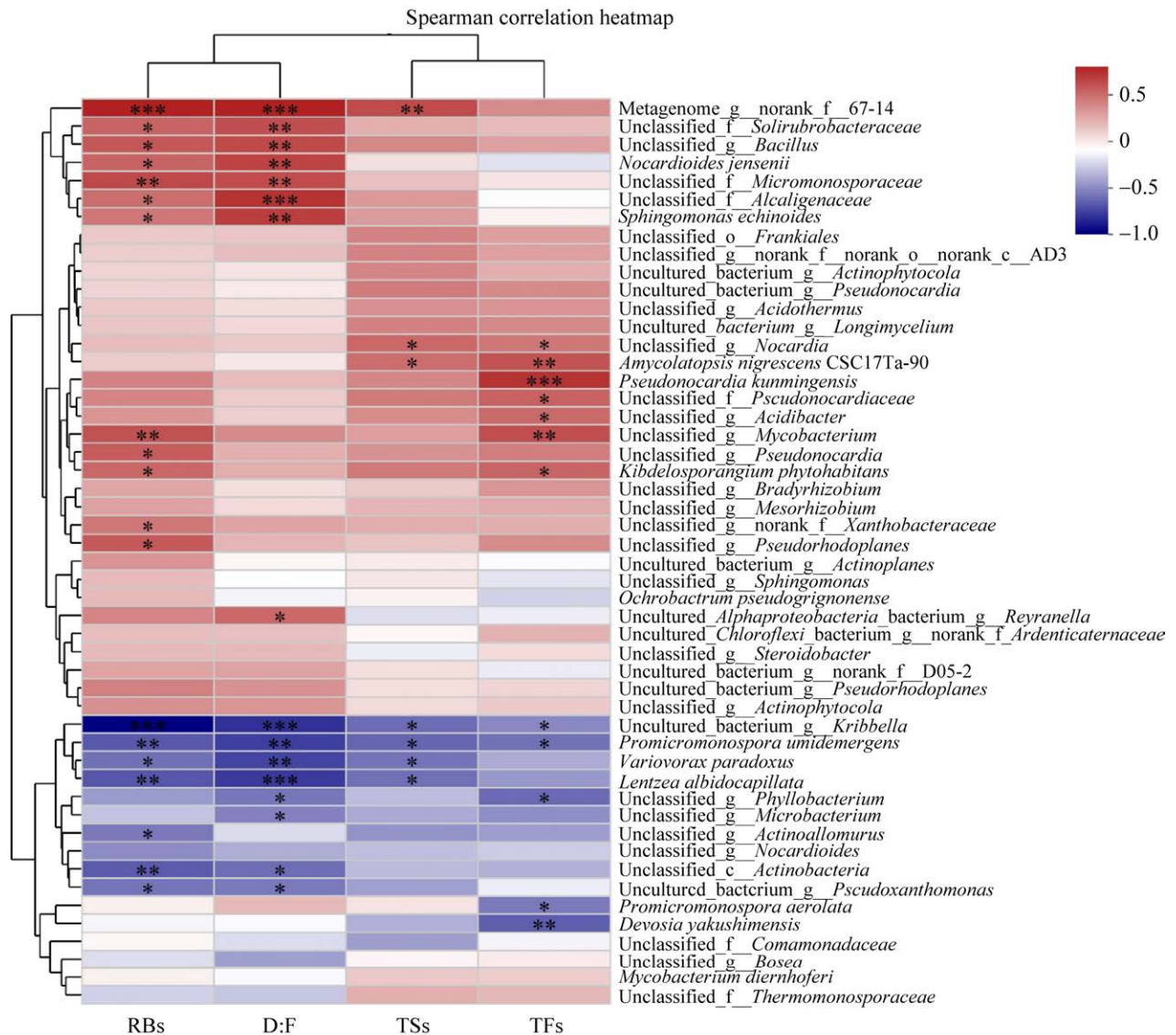


图6 种水平银柴胡根内细菌与药材主要有效成分及产量的相关性 RBs: 根生物量; D:F: 干鲜比; TSs: 总甾醇; TFs: 总黄酮

Figure 6 Correlation of endophytic bacteria in species-level of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* with main active components and yield of medicinal materials. RBs: Root biomass; D:F: Dry-fresh ratio; TSs: Total sterols; TFs: Total flavonoids. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

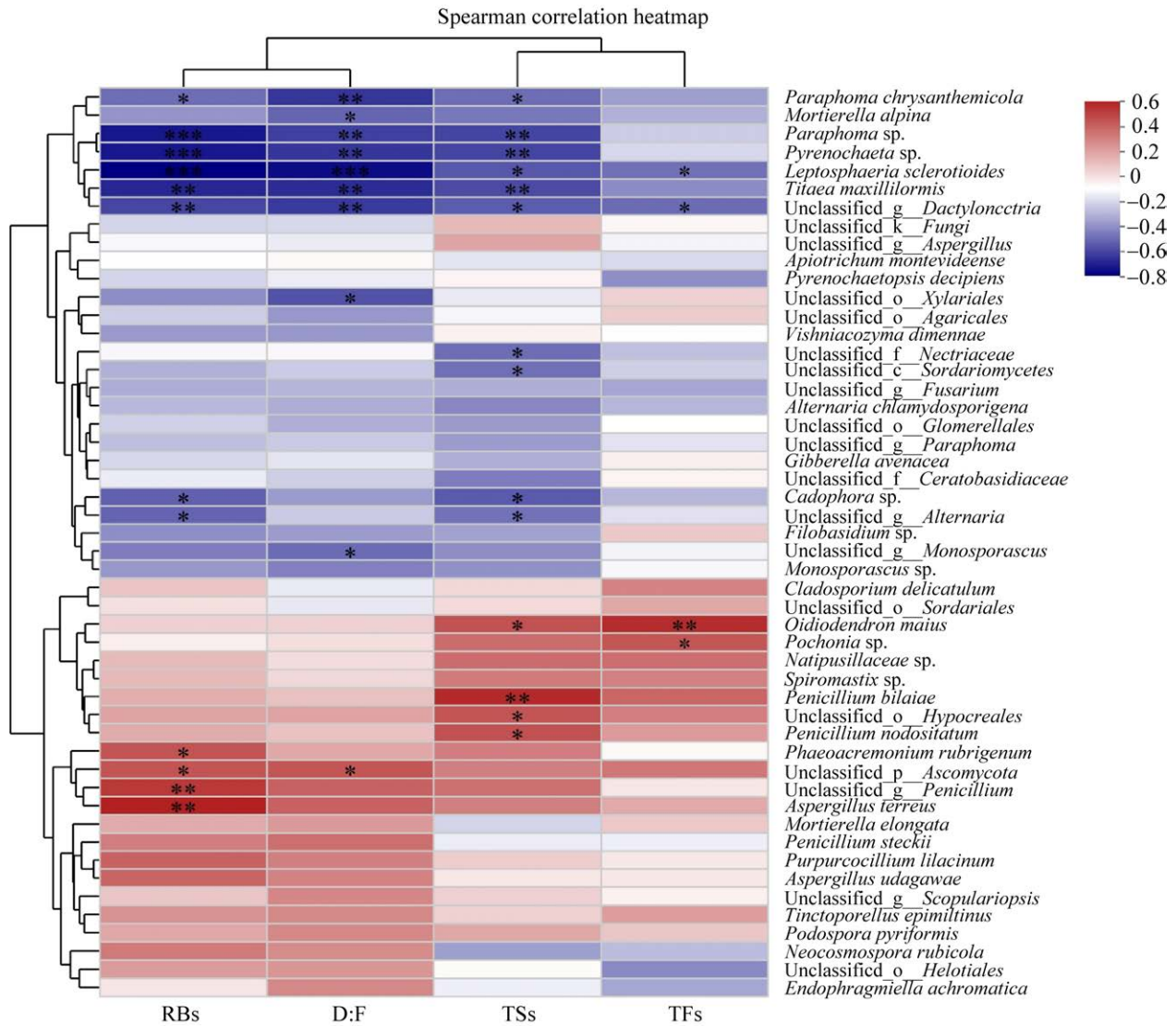


图 7 种水平银柴胡根内生真菌与药材主要有效成分及产量的相关性 RBs: 根生物量; D:F: 干鲜比; TSs: 总甾醇; TFs: 总黄酮
 Figure 7 Correlation of endophytic fungi in species-level of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* with main active components and yield of medicinal materials. RBs: Root biomass; D:F: Dry-fresh ratio; TSs: Total sterols; TFs: Total flavonoids; Difference significance: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

细菌, 通过分离、鉴定和提取, 应用于生产实践。本研究发现, 在 LO 生境银柴胡根内富集了丰富的 *Variovorax paradoxus*, 根据该生境银柴胡珍珠盘头的数量, *Variovorax* 细菌可能在根系生长和发育方面具有重要的调节作用, 已有研究证实, *Variovorax* 细菌是操纵植物激素水平的专有类群, 在抑制、塑造根系生长和发育方面至关重要^[30]。

本研究银柴胡根内生真菌以子囊菌门和担子菌门的成员为主, 优势类群包括肉座菌目 (*Hypocreales*)、*Titaea* 和柔膜菌目 (*Helotiales*) 等内生真菌属类群, 种水平物种丰度随生境而变化, 如在 SFA 生境以未分类的柔膜菌目、伞菌目 (*Agaricales*) 真菌目及未分类类群为主, 而 LI 生境以肉座菌目未分类物种及 *O. maius* 等为主, LO 生境以 *Titaea maxilliformis* 等为主。这些变

化可能是银柴胡不同生境胁迫及生长年限等引起的,如兰科植物五唇兰(*Doritis pulcherrima*),与附生于岩石生境相比,附生于灌木生境的根内真菌群落丰度较高^[31]。在我国特有植物蒜头果(*Malania oleifera*)根内共获得了112株内生真菌,生境对蒜头果内生真菌群落及多样性具有显著的影响,表现出林地高于非林地^[32]。不同的地理环境和土壤类型塑造了兰科药用植物白及(*Bletilla striata*)不同的内生真菌群落^[33],肉座菌目成为优势真菌目,这与本研究LI生境相同,该目产生的内生菌素代谢物是常见天然生防菌剂^[34],有效地预防了有害病原菌的入侵。有研究学者从药用植物舌岩白菜(*Bergenia pacumbis*)中分离出柔膜菌目的一株内生真菌(*Helotiales* sp. BL73),具有生物合成的潜力,经培养该菌株能产生具有生物活性的次生代谢物,如聚酮、非核糖体合成肽、萜类、核糖体合成翻译后修饰肽等天然产物^[35]。

研究发现,银柴胡根内的 metagenome_g_norank_f_67-14、unclassified_g_Mycobacterium、*Pseudonocardia kunmingensis* 及 unclassified_g_Bacillus 等内生细菌与银柴胡药材总甾醇、总黄酮含量及产量正相关。Metagenome_g_norank_f_67-14 隶属放线菌门土壤红杆菌目(*Solirubrobacterales*)下的 f_67-14,研究发现 norank_f_67-14 在风化的碳酸盐岩中相对丰富,尤其在重金属污染区丰度较高,如在卡斯特矿区被列为主要指示物种^[36],本研究LI生境是大武口典型的煤矿区,SFA生境距离宁夏回族自治区宁东镇煤炭加工区也较近,该内生细菌在银柴胡根内定殖很可能是周围煤矿因子诱导的结果,今后将开展有关 norank_f_67-14 诱导银柴胡产量和总甾醇含量的验证试验。分枝杆菌属(*Mycobacterium*)也是来自放线菌门的一类细菌,该属的部分种是常见的病原性细菌,但也有学者

认为,分枝杆菌属与芽孢杆菌属(*Bacillus*)、固氮菌属(*Azotobacter*)和伯克氏菌属(*Burkholderia*)等类群是促进药用植物生长的重要根际细菌,它们通过产生酶和抗生素等代谢物,保护宿主免受病原体的侵害,同时还起到协助植物吸收养分等作用^[37]。

本研究发现,银柴胡根内假诺卡氏菌属的细菌 *Pseudonocardia kunmingensis* 对药材总黄酮积累有显著的促进作用。研究表明,黄花蒿(*Artemisia annua*)内生的一株假诺卡氏菌(*Pseudonocardia* sp.) YIM63111 能够诱导产生青蒿素^[38],而该属内生细菌对药用植物黄酮类物质的诱导作用暂无研究报道。因此,今后可提取该菌株在银柴胡根际接种进行验证研究。本研究中,unclassified_g_Bacillus 显著提高了银柴胡药材干重及干物质比,该未分类种属于厚壁菌门(*Firmicutes*)芽孢杆菌属(*Bacillus*)的一类功能细菌,许多芽孢杆菌种类能够分泌大量的酶,具有溶磷、固氮及解钾的功能,也是药材白术(*Atractylodes macrocephala*)的关键内生细菌^[39]。本研究发现,放线菌门小单孢菌科(*Micromonosporaceae*)的细菌也显著提高了银柴胡药材干重及干物质比,该科细菌分布较为广泛,能产生各种氨基糖苷类抗生素,尤其在极端环境中也能探测到它的踪迹^[40],结合银柴胡的3种生境较干旱,尤其是SFA生境是在极度干旱的沙丘,LI生境在干旱缺水的石砾质山坡,很可能这种内生细菌在极端环境中,为银柴胡的生长起到了关键的作用。刺状鞘氨醇单胞菌属于 α 变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)的鞘脂单胞菌属,该属物种因其较强的生物合成和降解能力,目前广泛应用于生物技术领域^[41],今后将尝试分离、提取该株内生细菌进行培养,观察和研究其代谢及生物合成等特征。

本研究发现,银柴胡根内真菌 *O. maius* 显

著提高了药材总甾醇和总黄酮含量,青霉菌属的拜赖青霉(*P. bilaiae*)和 *P. nodositatum* 及肉座菌目未分类种(unclassified_o__*Hypocreales*)也显著提高了药材总甾醇含量,而 *Pochonia*_sp.显著提高了药材总黄酮含量。*O. maius* 属于典型的杜鹃花类菌根(ericoid mycorrhizal, ERM)真菌,该菌根真菌仅出现在杜鹃花科(*Ericaceae*)和岩梅科(*Diapensiaceae*)植物中^[42],而本研究该内生菌根也仅分布在银柴胡 LI 生境,因此,*O. maius* 是否属于银柴胡菌根真菌,尚需进一步验证。有研究发现,拜赖青霉 47M-1 菌株的活性产物对芝麻有较强的抗病原菌能力,其培养液也显著促进了芝麻的生长^[43],并且,青霉菌是产生纤维素酶类的重要群体,纤维素酶可将纤维素分子中的 β -1,4 糖苷键水解为如葡萄糖等更简单的分子,而拜赖青霉 InaCC F16 菌株在特定环境下,能够形成较强的纤维素酶活性^[44]。目前关于青霉菌的研究大多数集中在抗菌活性及代谢物等领域,而关于青霉菌与总甾醇的关系,有待于进一步探索。利用子囊菌门肉座菌目真菌的代谢产物,能有效开发环境友好型生物资源,付德来等^[45]报道了肉座菌目座壳孢及其有性型的代谢物,包括黄酮类、甾醇类、萜类、醌类和环肽等多种化合物,具有抗疟疾、抗肿瘤和抗菌等生物活性,可广泛应用到医疗保健、农林业及工业方面,说明银柴胡根内肉座菌目真菌很可能对甾醇、黄酮等活性物质的积累有一定的作用。

本研究发现,与银柴胡药材干重较显著正相关的真菌是土曲霉和青霉菌属未分类真菌, *P. rubrigenum* 和其他未分类的子囊菌真菌也对药材干重有促进作用。曲霉属和青霉菌属是化学检测最多的真菌类群,有上百种具生物活性的次生代谢物,如萜烯、甾醇、生物碱、丁烯内酯和多肽等^[46]。其中土曲霉是植物密切相关的主要内生菌之一,也是次生代谢物的最大生产者^[47],

它也是发酵生产天然洛伐他汀的一类重要真菌,用于开发降低血清胆固醇类药物,不同环境诱导和促进其生物合成能力及新次生代谢物生成等课题,具有广阔的研究前景^[46]。内生青霉菌是药用植物极其重要的一类内生真菌,多样化的物种不仅能产生生物碱、苷类、萜酮类和萜类等药理活性物质^[48-49],而且也是促进植物生长的耐旱内生真菌^[50]。研究发现,内生真菌 *P. rubrigenum* 是从白木香(*Aquilaria sinensis*)分离提取的内生真菌,能产生多种抗菌活性成分,可通过诱导磷酸化而促进白木香沉香倍半萜的积累^[51]。然而,这些内生真菌是否和银柴胡药材产量之间存在联系,尚需进一步探索验证。

REFERENCES

- [1] 黄璐琦, 郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 277-280.
HUANG LQ, GUO LP. Secondary metabolites accumulating and geoherb formation under environmental stress[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007, 32(4): 277-280 (in Chinese).
- [2] 何冬梅, 王海, 陈金龙, 赖长江生, 严铸云, 黄璐琦. 中药微生态与中药道地性[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2): 290-302.
HE DM, WANG H, CHEN JL, LAICHANG JS, YAN ZY, HUANG LQ. Microecology and geoherbism of traditional Chinese medicine[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(2): 290-302 (in Chinese).
- [3] TEIMOORI-BOGHSANI Y, GANJEALI A, CERNAVA T, MÜLLER H, ASILI J, BERG G. Endophytic fungi of native *Salvia abrotanoides* plants reveal high taxonomic diversity and unique profiles of secondary metabolites[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 10: 3013.
- [4] MAGGINI V, MENGONI A, BOGANI P, FIRENZUOLI F, FANI R. Promoting model systems of microbiota-medicinal plant interactions[J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(3): 223-225.
- [5] 王红阳, 蒋待泉, 康传志, 王升, 吕朝耕, 张燕, 刘大会, 郭兰萍. 药用植物苍术内生菌的研究进展及展望[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19): 4930-4935.
WANG HY, JIANG DQ, KANG CZ, WANG S, LV CG,

- ZHANG Y, LIU DH, GUO LP. Research progress and prospect of endophytes from medicinal plant *Atractylodes lancea*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(19): 4930-4935 (in Chinese).
- [6] PANDEY SS, JAIN R, BHARDWAJ P, THAKUR A, KUMARI M, BHUSHAN S, KUMAR S. Plant probiotics—endophytes pivotal to plant health[J]. Microbiological Research, 2022, 263: 127148.
- [7] OBERHOFER M, HESS J, LEUTGEB M, GÖSSNITZER F, RATTEI T, WAWROSCHE C, ZOTCHEV SB. Exploring *Actinobacteria* associated with rhizosphere and endosphere of the native alpine medicinal plant *Leontopodium nivale* subspecies *alpinum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2531.
- [8] WILSON D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition[J]. Oikos, 1995, 73(2): 274.
- [9] UROZ S, COURTY PE, OGER P. Plant symbionts are engineers of the plant-associated microbiome[J]. Trends in Plant Science, 2019, 24(10): 905-916.
- [10] POOLE P, RAMACHANDRAN V, TERPOLILLI J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(5): 291-303.
- [11] 马昭, 唐承晨, 张纯, 胡之璧, 王莉莉, 黎万奎. 内生菌与宿主植物关系对中药材道地性研究的启示[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(6): 4-11.
- MA Z, TANG CC, ZHANG C, HU ZB, WANG LL, LI WK. The relationship between endophytes and host plants: implications for research on geoherbism[J]. China Industrial Economics, 2015, 29(6): 4-11 (in Chinese).
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-三部: 2015年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China (PRC). Pharmacopoeia-part III: 2015 Edition[M]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2015 (in Chinese).
- [13] 秦宇龙. 《宁夏回族自治区中医药条例》公布[J]. 中医药管理杂志, 2020, 28(23): 124.
- QIN YL. Announcement of the regulations on traditional Chinese medicine in Ningxia Hui Autonomous Region[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine Management, 2020, 28(23): 124 (in Chinese).
- [14] 黄旗凯, 沈亮, 刘志香, 开国银. 无公害银柴胡栽培技术[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 120-127.
- HUANG QK, SHEN L, LIU ZX, KAI GY. Pollution-free cultivation of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*[J]. China Industrial Economics, 2019, 25(16): 120-127 (in Chinese).
- [15] 李静, 敖亮. 银柴胡的生物碱成分及其抗炎活性研究[J]. 中草药, 2018, 49(22): 5259-5263.
- LI J, AO L. Study on anti-inflammatory activities of alkaloids from *Stellaria dichotoma*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(22): 5259-5263 (in Chinese).
- [16] 王秀芬, 由会玲. 银柴胡的药理作用与临床应用研究[J]. 河北中医药学报, 2012, 27(3): 43-44.
- WANG XF, YOU HL. Study on pharmacological action and clinical application of *Bupleurum chinense* DC[J]. Journal of Hebei Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, 2012, 27(3): 43-44 (in Chinese).
- [17] ZHANG WJ, CAO Z, XIE ZC, LANG DY, ZHOU L, CHU YK, ZHAO QP, ZHANG XH, ZHAO YS. Effect of water stress on roots biomass and secondary metabolites in the medicinal plant *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bge[J]. Scientia Horticulturae, 2017, 224: 280-285.
- [18] REN F, DONG W, YAN DH. Organs, cultivars, soil, and fruit properties affect structure of endophytic mycobiota of Pinggu peach trees[J]. Microorganisms, 2019, 7(9): 322.
- [19] 张学良, 赵德华, 张文懿, 王英华. 银柴胡中总甾醇含量测定的方法学研究[J]. 宁夏医学杂志, 2012, 34(2): 126-127.
- ZHANG XL, ZHAO DH, ZHANG WY, WANG YH. Methodology study on qualification of total sterol in *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bge by ultraviolet spectrophotometry[J]. Ningxia Medical Journal, 2012, 34(2): 126-127 (in Chinese).
- [20] 李振凯, 王红, 宋乐, 冯璐, 李彦青, 杨燕, 彭励. 基于无机元素、有效成分银柴胡产地特征及关联分析[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(7): 894-902.
- LI ZK, WANG H, SONG L, FENG L, LI YQ, YANG Y, PENG L. Origin characteristics and correlation analysis of *Stellariae* Radix based on inorganic elements and effective components[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2023, 40(7): 894-902 (in Chinese).
- [21] 周丽, 王永明, 周达, 罗延丽, 张新慧. 干旱胁迫对银柴胡药材活性成分含量的影响研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6): 1463-1465.
- ZHOU L, WANG YM, ZHOU D, LUO YL, ZHANG XH. Effect of drought stress on effective components of Radix *Stellaria dichotoma*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2015, 26(6): 1463-1465 (in Chinese).
- [22] WANG L, LIN H, DONG YB, LI B, HE YH. Effects of

- endophytes inoculation on rhizosphere and endosphere microecology of Indian mustard (*Brassica juncea*) grown in vanadium-contaminated soil and its enhancement on phytoremediation[J]. *Chemosphere*, 2020, 240: 124891.
- [23] SINGH S, PANDEY SS, SHANKER K, KALRA A. Endophytes enhance the production of root alkaloids ajmalicine and serpentine by modulating the terpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus* roots[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(4): 1128-1142.
- [24] BRIGHAM LM, de MESQUITA CPB, SPASOJEVIC MJ, FARRER EC, PORAZINSKA DL, SMITH JG, SCHMIDT SK, SUDING KN. Drivers of bacterial and fungal root endophyte communities: understanding the relative influence of host plant, environment, and space[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2023, 99(5): fiad034.
- [25] 张亚光, 陈丹青, 朱国琴. 不同参龄及栽培方式的人参内生细菌多样性研究[J]. *人参研究*, 2020, 32(6): 10-16.
- ZHANG YG, CHEN DQ, ZHU GQ. Diversity of endophyte communities from Ginseng under the effect of plant development and different cultivation patterns[J]. *Renshen Yanjiu*, 2020, 32(6): 10-16 (in Chinese).
- [26] 崔晋龙, 郭顺星, 肖培根. 内生菌与植物的互作关系及对药用植物的影响[J]. *药学学报*, 2017, 52(2): 214-221.
- CUI JL, GUO SX, XIAO PG. Interaction between endophytes and host plant and the role of endophytes in genuineness analysis of medicinal plant[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2017, 52(2): 214-221 (in Chinese).
- [27] SYED B, PRASAD MNN, RAO HCY, RAKSHITH D, MAITHRI B, KAVITHA KS, AZMATH P, KAVITHA HU, HARINI BP, KUMAR K, ZAREI M, SATISH S. Actinomycetic symbionts inhabiting *Euphorbia hirta* L. with antimicrobial potentials[J]. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2015, 5(6): 419-426.
- [28] RAY S, SINGH P, SINGH J, SINGH S, SARMA BK, SINGH HB. Killed fungal pathogen triggers antifungal metabolites in *Alcaligenes faecalis* for plant defense[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2023, 125: 101996.
- [29] 吕志堂, 齐伟红, 刘志恒. 一种从土壤样品中选择性分离假诺卡氏菌的方法[J]. *微生物学报*, 2000, 40(4): 406-414.
- LYU ZT, QI WH, LIU ZH. A procedure for developing selective isolation of *Pseudonocardiacetes* from soil samples[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(4): 406-414 (in Chinese).
- [30] FINKEL OM, SALAS-GONZÁLEZ I, CASTRILLO G, CONWAY JM, LAW TF, TEIXEIRA PJPL, WILSON ED, FITZPATRICK CR, JONES CD, DANGL JL. A single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome[J]. *Nature*, 2020, 587(7832): 103-108.
- [31] 柯海丽, 宋希强, 谭志琼, 刘红霞, 罗毅波. 野生五唇兰根部内生真菌多样性研究[J]. *生物多样性*, 2007, 15(5): 456-462.
- KE HL, SONG XQ, TAN ZQ, LIU HX, LUO YB. Endophytic fungi diversity in root of *Doritis pulcherrima* (*Orchidaceae*)[J]. *Biodiversity Science*, 2007, 15(5): 51 (in Chinese).
- [32] 王毅, 王娟, 王四海, 李云琴, 原晓龙, 陈中华. 蒜头果的内生真菌多样性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(9): 3859-3866.
- WANG Y, WANG J, WANG SH, LI YQ, YUAN XL, CHEN ZH. Diversity of endophytic fungi of *Malania oleifera* Chun et Lee[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(9): 3859-3866 (in Chinese).
- [33] 邓文祥, 赵漫丽, 李永梅, 王自林, 张坤, 湛方栋. 白及根部内生真菌多样性研究[J]. *菌物学报*, 2019, 38(11): 1907-1917.
- DENG WX, ZHAO ML, LI YM, WANG ZL, ZHANG K, ZHAN FD. Diversity of endophytic fungi associated with *Bletilla striata* roots[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(11): 1907-1917 (in Chinese).
- [34] MANTZOUKAS S, DASKALAKI E, KITSIOU F, PAPANTZIKOS V, SERVIS D, BITIVANOS S, PATAKIOUTAS G, ELIOPOULOS PA. Dual action of *Beauveria bassiana* (*Hypocreales*; *Cordycipitaceae*) endophytic stains as biocontrol agents against sucking pests and plant growth biostimulants on melon and strawberry field plants[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(11): 2306.
- [35] OBERHOFER M, MALFENT F, ZEHL M, URBAN E, WACKERLIG J, REZNICEK G, VIGNOLLE GA, RÜCKERT C, BUSCHE T, WIBBERG D, ZOTCHEV SB. Biosynthetic potential of the endophytic fungus *Helotiales* sp. BL73 revealed via compound identification and genome mining[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(6): e0251021.
- [36] HUANG XF, WU XL, TANG XC, ZHANG ZM, MA JR, ZHANG JC, LIU HJ. Distribution characteristics and risk of heavy metals and microbial community composition around the Wanshan mercury mine in Southwest China[J]. *Ecotoxicology and Environmental*

- Safety, 2021, 227: 112897.
- [37] VAGHELA N, GOHEL S. Medicinal plant-associated rhizobacteria enhance the production of pharmaceutically important bioactive compounds under abiotic stress conditions[J]. Journal of Basic Microbiology, 2023, 63(3/4): 308-325.
- [38] LI J, ZHAO GZ, VARMA A, QIN S, XIONG Z, HUANG HY, ZHU WY, ZHAO LX, XU LH, ZHANG S, LI WJ. An endophytic *Pseudonocardia* species induces the production of artemisinin in *Artemisia annua*[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51410.
- [39] 阳湖荣, 陈飘雪, 戴传超. 白术内生细菌分离与促生活性[J]. 生态学杂志, 2019, 38(12): 3680-3688.
YANG HR, CHEN PX, DAI CC. Isolation and plant-growth-promoting ability of endophytic bacteria in *Atractylodes macrocephala* Koidz[J]. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(12): 3680-3688 (in Chinese).
- [40] 邓阳, 余利岩, 张玉琴. 小单孢菌科放线菌的研究进展[J]. 生物资源, 2021, 43(6): 583-596.
DENG Y, YU LY, ZHANG YQ. Research progress on the family *Micromonosporaceae*[J]. Amino Acids and Biotic Resources, 2021, 43(6): 583-596 (in Chinese).
- [41] YABUUCHI E, KOSAKO Y. "Sphingomonas"-Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria[M]. Colorado, U.S.: John Wiley & Sons, 2015.
- [42] 张艳华, 孙立夫. 杜鹃花科植物菌根的研究进展[J]. 菌物学报, 2021, 40(6): 1299-1316.
ZHANG YH, SUN LF. Research advances on the mycorrhizas of *Ericaceae* plants[J]. Mycosystema, 2021, 40(6): 1299-1316 (in Chinese).
- [43] ZHAO XB, LIU XT, ZHAO H, NI YX, LIAN QG, QIAN HM, HE BP, LIU HY, MA Q. Biological control of *Fusarium* wilt of sesame by *Penicillium bilaiae* 47M-1[J]. Biological Control, 2021, 158: 104601.
- [44] SOEKA YS, ILYAS M. Production and characterization of cellulases derived from saprophytic fungi *Penicillium bilaiae* InaCC F16[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020, 591(1): 012015.
- [45] 付德来, 陈宇熹, 郭庆丰, 毛丽慧, 费姣, 邱君志. 座壳孢及其有性型(子囊菌门)代谢产物研究进展[J]. 菌物学报, 2018, 37(5): 541-554.
FU DL, CHEN YX, GUO QF, MAO LH, FEI J, QIU JZ. Research progress on metabolites from *Aschersonia* and its teleomorph (*Ascomycota*) [J]. Mycosystema, 2018, 37(5): 541-554 (in Chinese).
- [46] AMR K, IBRAHIM N, ELISSAWY AM, SINGAB ANB. Unearthing the fungal endophyte *Aspergillus terreus* for chemodiversity and medicinal prospects: a comprehensive review[J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2023, 10(1): 1-33.
- [47] EL-HAWARY SS, MOAWAD AS, BAHR HS, ABDELMOHSEN UR, MOHAMMED R. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*[J]. RSC Advances, 2020, 10(37): 22058-22079.
- [48] 蒋圆婷, 刘杨, 陈德力, 梁寒峭. 半红树植物黄槿内生菌及其代谢产物的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(2): 331-341.
JIANG YT, LIU Y, CHEN DL, LIANG HQ. Research progress on endophytes from semi-mangrove plant *Hibiscus tiliaceus* and its metabolites[J]. Natural Product Research and Development, 2021, 33(2): 331-341 (in Chinese).
- [49] 谭小明, 周雅琴, 陈娟, 郭顺星. 药用植物内生真菌多样性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(18): 1563-1580.
TAN XM, ZHOU YQ, CHEN J, GUO SX. Advances in research on diversity of endophytic fungi from medicinal plants[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2015, 50(18): 1563-1580 (in Chinese).
- [50] KAUR R, SAXENA S. *Penicillium citrinum*, a drought-tolerant endophytic fungus isolated from wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves with plant growth-promoting abilities[J]. Current Microbiology, 2023, 80(5): 184.
- [51] LIU J, LI TX, CHEN T, GAO JQ, ZHANG X, JIANG C, YANG J, ZHOU JH, WANG TL, CHI XL, CHENG M, HUANG LQ. Integrating multiple omics identifies *Phaeoacremonium rubrigenum* acting as *Aquilaria sinensis* marker fungus to promote agarwood sesquiterpene accumulation by inducing plant host phosphorylation[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): e0272221.