

研究报告

基于高通量解析和可培养技术的白藜内生真菌类群分析及分离菌株的抗痤疮致病菌活性

李鉴滨^{1,2}, 张增峰³, 谭绮雯³, 陈美琪¹, 姚华雄¹, 邓祖军^{*1}

1 广东药科大学生命科学与生物制药学院 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广东 广州 510006

2 广东药科大学医药化工学院, 广东 中山 528458

3 广州市微生物研究所, 广东 广州 510663

李鉴滨, 张增峰, 谭绮雯, 陈美琪, 姚华雄, 邓祖军. 基于高通量解析和可培养技术的白藜内生真菌类群分析及分离菌株的抗痤疮致病菌活性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1902-1916.

LI Jianbin, ZHANG Zengfeng, TAN Qiwen, CHEN Meiqi, YAO Huaxiong, DENG Zujun. Taxonomic analysis of fungal endophytes from *Ampelopsis japonica* by high-throughput sequencing and culture-dependent methods and the activity of the isolated strains against acne-associated pathogens[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1902-1916.

摘要: 【背景】药用植物蕴含丰富的内生真菌类群资源, 而且内生真菌可产生与宿主相关的次级代谢产物, 具有多种生物活性, 是活性化合物生产的潜在经济来源。【目的】分析药用植物白藜根部内生真菌的物种多样性, 并筛选出具有抗痤疮致病菌活性的目标菌株。【方法】基于高通量和组织分离法分析白藜内生真菌的类群结构多样性; 通过琼脂扩散法对内生真菌代谢产物的抗痤疮致病菌活性进行筛选; 以微量肉汤稀释法测定代谢产物的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。【结果】高通量测序结果显示, 白藜根部内生真菌可注释到 8 门 22 纲 45 目 73 科 93 属, 根部的优势属为 *Tainosphaeria* (20.86%) 和 *Fusarium* (15.38%)。基于组织分离法共从白藜根部分离获得 83 株内生真菌, 隶属于 12 个属, 其中青霉属(*Penicillium*, 24.10%)、木霉属(*Trichoderma*, 14.46%)、背芽突霉属(*Cadophora*, 13.25%)、镰刀菌属(*Fusarium*, 12.05%)为主要类群。17 株代表性菌株的抗痤疮致病菌活性检测结果显示对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌具拮抗活性的菌株分别占总数的 11.76% 和 23.53%, 其中内生真菌 *Fusarium oxysporum* BLR17 的发酵液对 2 种病原菌均具有明显的抑菌效果, 其发酵液的乙酸乙酯粗提物对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 值和 MBC 值均分别为 7.81 μg/mL 和 62.5 μg/mL。【结论】白藜内生真菌具有较为丰富的多样性, 也蕴含着一定比例的抗痤疮活性菌种资源, 其中 *Fusarium oxysporum* BLR17 有望成为抗痤疮先导化合物筛选的资源菌株, 值得进一步研究。

关键词: 白藜; 内生真菌; 多样性; 抗菌活性; 痤疮丙酸杆菌

资助项目: 国家自然科学基金(31971384)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31971384).

*Corresponding author. E-mail: dengzujun66@163.com

Received: 2022-09-25; Accepted: 2022-10-23; Published online: 2022-11-24

Taxonomic analysis of fungal endophytes from *Ampelopsis japonica* by high-throughput sequencing and culture-dependent methods and the activity of the isolated strains against acne-associated pathogens

LI Jianbin^{1,2}, ZHANG Zengfeng³, TAN Qiwen³, CHEN Meiqi¹, YAO Huaxiong¹,
DENG Zujun^{*1}

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2 School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, Guangdong, China

3 Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou 510663, Guangdong, China

Abstract: [Background] Medicinal plants harbor abundant fungal endophytes, producing host-related secondary metabolites with a variety of biological activities. [Objective] To analyze the diversity of endophytic fungi in the roots of medicinal species *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino and isolate strains producing chemicals with anti-acne activity. [Methods] The taxonomic diversity of fungal endophytes was analyzed based on high-throughput sequencing and tissue isolation. The activity of metabolites of the endophytes against acne-associated pathogens was tested with agar diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by broth microdilution. [Results] The endophytic fungi from the roots of *A. japonica* belonged to 93 genera, 73 families, 45 orders, 22 classes, and 8 phyla. The dominant genera were *Tainosphaeria* (20.86%) and *Fusarium* (15.38%). With the tissue isolation method, 83 fungal strains (12 genera) were isolated, among which *Penicillium* (24.10%), *Trichoderma* (14.46%), *Cadophora* (13.25%), and *Fusarium* (12.05%) dominated. The results of anti-acne bacteria activities of 17 representative strains showed that the strains with activities against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus* accounted for 11.76% and 23.53%, respectively. The fermentation broth of the endophytic *Fusarium oxysporum* BLR17 displayed obvious inhibitory effect on both pathogens. The MIC of its crude ethyl acetate extract against *P. acnes* and *S. aureus* was 7.81 µg/mL and 62.5 µg/mL, respectively, and the MBC was 7.81 µg/mL and 62.5 µg/mL, separately. [Conclusion] The endophytic fungi of *A. japonica* had high diversity and contained a certain proportion of anti-acne species resources. *F. oxysporum* BLR17 is expected to be a resource strain for screening the anti-acne bioactive compounds, which is worthy of further study.

Keywords: *Ampelopsis japonica*; fungal endophytes; diversity analysis; antimicrobial activities; *Propionibacterium acnes*

痤疮是一种临床常见的慢性毛囊皮脂腺炎 等为主要临床特征, 是全球第二大皮肤病^[1-2]。
症性皮肤病, 以丘疹、粉刺、脓疱、囊肿、疤痕 痤疮的发病机制比较复杂, 现有研究普遍认为痤疮

疮多因雄性激素分泌增多,使得皮脂腺分泌亢进及皮脂腺导管角化堵塞毛囊,从而引发毛囊内痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌等痤疮致病菌的增殖感染,进一步诱发炎症所致^[3-4]。因此,针对痤疮致病菌的抗菌治疗已成为临床治疗痤疮的重要手段,并取得了明显的疗效^[5]。目前,临床上通过口服或局部使用抗生素类药物治疗痤疮,但随着痤疮致病菌耐药能力的不断提高,现有药物治疗效果明显下降,治疗周期延迟,不良反应也日趋严重^[6]。因此,寻找新的对痤疮致病菌具有抗菌活性的药物显得尤为迫切。

白蔹[*Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino]属于葡萄科蛇葡萄属植物,又名山地瓜、猫儿卵、白根等,主要产于东北、华北、华东、西南及陕西、河南、湖北、湖南等地^[7]。白蔹的干燥块根属于传统中药,入药历史悠久,早在《名医别录》中就有记载,其味苦,性微寒,归心、胃经,有清热解毒、消痈散结、敛疮生肌的功效,主要用于治疗痈疽发背、疔疮、瘰疬、烧烫伤^[8]。现有研究发现白蔹含多酚类、萜醌类、黄酮类、甾醇类、有机酸类、三萜类、挥发油类等化学成分^[8],具有抗菌、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、免疫调节等多种药理活性^[9]。白蔹提取物对金黄色葡萄球菌具有一定的抗菌活性,同时对白色念珠菌(*Candida albicans*)、同心性毛癣菌(*Trichophyton concentricum*)、奥杜盎氏小芽胞癣菌(*Microsporum audouinii*)和红色表皮癣菌(*Epidermophyton rubrum*)等皮肤真菌也有不同程度的抑制作用^[10-11]。白蔹是目前治痤疮外用方剂中使用频数较高的单味药^[12],具有较好的抗痤疮活性,因此其在临床痤疮治疗中有着重要的用途^[13]。由于长期的过度开采和生存环境的破坏,野生白蔹资源面临枯竭^[14],因此,寻找白蔹药用资源的替代物,对于白蔹中药资源的可持续利用具有重要意义。植物内生真菌是一类生长

在健康植物组织内部但不引起宿主植物明显病症的微生物,其在长期的协同进化过程中与宿主植物形成了紧密的共生关系^[15]。已有大量研究表明,药用植物内生真菌具有产生与宿主相同或相似生物活性次级代谢产物的能力^[16-17],而且蕴含着丰富的结构或活性新颖的天然活性物质^[18-19]。同时,对药用植物内生真菌资源进行开发利用可缓解药用植物资源匮乏的现状,保护野生药用植物资源,提高药物生产的效率。因此,药用植物内生真菌已成为药物开发的重要资源库,引起研究者的广泛关注。目前尚无白蔹内生真菌多样性及其抗痤疮活性的相关研究。本研究结合高通量测序与可培养技术对白蔹根部内生真菌的多样性及其类群结构进行系统分析,并对其内生真菌抗痤疮致病菌活性进行研究,以期筛选到具有抗痤疮致病菌活性的菌株,从而为抗痤疮新药开发提供新的菌种资源库,为白蔹药用资源的深度挖掘、利用与保护提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药用植物材料

外表健康的多年生野生白蔹[*Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino]采集于河南省南阳市内乡县山区(33°15'44.3"N, 111°55'56.0"E),株高约55 cm,由华南植物园陈贻竹研究员鉴定。采样地区属于温带季风气候——亚热带季风气候,年平均气温13.6℃,年均降水量700 mm,土壤类型为黄棕壤。将整株白蔹植株(含土壤)置于无菌袋(33 cm×40 cm)中,4℃密封运输至实验室,36 h内进行后续实验。

1.1.2 受试病原菌株

痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*) CICC10312由广州市微生物研究所提供,厌氧培养于哥伦比亚培养基备用。金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*) CMCC26003 保藏于本校微生物学与免疫学研究室, 4 °C 保存于 LB 斜面备用。

1.1.3 主要试剂和仪器

高效植物基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer, 纽英伦生物技术(北京)有限公司; Premix Taq, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 次氯酸钠、乙酸乙酯均为分析纯, 上海易恩化学技术有限公司。恒温振荡培养箱, 常州国宇仪器制造有限公司; PCR 扩增仪, 北京东胜创新生物科技有限公司。

1.1.4 培养基

哥伦比亚血平板培养基和液体硫乙醇酸盐培养基干粉^[6], 广东环凯微生物科技有限公司。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0。

PDA 培养基(g/L): 马铃薯粉 300.0, 葡萄糖 20.0, 氯霉素 0.1, 琼脂 15.0 (不添加则为 PDB 培养基)。

硫乙醇酸盐固体培养基(g/L): 液体硫乙醇酸盐培养基干粉 29.3, 琼脂 25.0。

1.2 方法

1.2.1 样品表面消毒处理

将整株植株用流动水轻柔清洗 30 min, 去除表面土壤颗粒等杂质。将根切成 2 cm 左右的小段, 依次于 75% 乙醇中浸泡 1 min, 5% 有效氯的次氯酸钠中漂洗 5 min, 再用 75% 乙醇清洗 30 s, 最后用无菌蒸馏水漂洗 3 次。取 100 μL 最后一次漂洗水样涂布于 PDA 培养基, 28 °C 培养 3–7 d, 进行表面消毒效果的检查, 并辅以组织印记法检验: 夹取组织样品, 使其表面充分与 PDA 平板接触 3–5 min 后取出, 置于相同条件下培养, 观

察 PDA 平板中有无菌落产生^[20–21]。

1.2.2 DNA 提取、扩增与测序

根据高效植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取白藜根部基因组 DNA, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。采用带 barcode 的正向引物 ITS1-1F-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和反向引物 ITS1-1F-R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 进行 ITS1-1F 区域扩增。PCR 反应体系(25 μL): 2× High-Fidelity PCR Master Mix 12.5 μL, 正向引物(10 μmol/L) 1.25 μL, 反向引物(10 μmol/L) 1.25 μL, DNA 模板(10 ng/μL) 2.5 μL, nuclease-free water 7.5 μL。PCR 反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经电泳检测并回收后送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行建库测序, 测序深度为 5W tags。本研究中所产生的高通量测序数据已上传至 NCBI SRA (sequence read archive) 数据库, 登录号为 PRJNA860148。

1.2.3 高通量数据分析

采用 QIIME (V1.9.1, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html) 和 VSEARCH (V2.21.1, <https://github.com/torognes/vsearch>) 对高通量测序数据进行质控, 过滤嵌合体, 获得有效数据 (effective tags)。使用 UPARSE (V7.0.1001, <http://www.drive5.com/uparse/>) 对有效序列进行聚类, 以 97% 的一致性(identity) 将序列聚类成为一个分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU), 然后利用 QIIME 软件基于 Unite 数据库(V8.2, <https://unite.ut.ee/>) 对 OTU 进行物种注释, 获得分类学信息和基于物种的相对丰度数据, 并计算 α 多样性指数(Shannon, Simpson, Chao1, ACE, Goods coverage)。使用 MUSCLE (V3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>) 软件进行快速多序列比对, 得到所有 OTU 的系统进化信息。

利用 FUNGuild 真菌环境功能数据库 (<http://www.stbates.org/guilds/app.php>) 进行分析, 根据数据库注释结果, 统计 trophic mode (营养方式) 和 guild (功能分组) 两个方面功能丰度结果。

1.2.4 白藜根部内生真菌的分离、培养与鉴定

取表面消毒后的组织块去掉首尾部分, 剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小片, 将各组织块切口一端置于 PDA 培养基上 28 °C 培养, 每天观察, 若在组织块切口处周围有菌丝长出, 挑取尖端菌丝于新的 PDA 培养基上纯化培养。定期观察真菌的菌丝生长速率、产孢子情况, 结合《真菌鉴定手册》^[22] 和《中国真菌志》^[23] 中的分类指标, 初步判断菌株可能所属的分类群。纯培养物于 -80 °C 保藏。

利用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取菌丝体总 DNA, 以真菌核糖体 rDNA ITS 区通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增菌株 18S rRNA 基因部分序列、ITS1-5.8S-ITS2 全部序列和 28S rRNA 基因部分序列的片段。PCR 反应体系 (25 μ L): Premix Taq 12.5 μ L, ITS1 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, ITS4 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, DNA 模板 (20 ng/ μ L) 1 μ L, RNase-free 水 10.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 60 s, 56 °C 60 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确认产物条带清晰, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。得到的内生真菌 rDNA ITS 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 记录检索到与上传序列相似度最高的种属信息, 利用 MEGA 7.0.26 以邻接法 (neighbor-joining method) 构建系统发育树, 对菌株进行鉴定。

1.2.5 分离菌株发酵液及乙酸乙酯提取物的制备

于 100 mL PDB 液体培养基中接入 3 个内生真菌菌饼 ($d=6$ mm), 28 °C、120 r/min 培养 9 d, 发酵液依次用灭菌纱布、0.22 μ m 过滤器过滤除菌得到内生真菌发酵液。将发酵液和乙酸乙酯以 1:1 比例混合、萃取, 上层有机相经 40 °C 旋转蒸发得到浸膏, 即为发酵液乙酸乙酯粗提物 (ethyl acetate extract, EA)。样品用 DMSO 超声溶解, 配制成 100 mg/mL 母液。

1.2.6 分离菌株发酵液抗痤疮致病菌活性及提取物对痤疮致病菌的 MIC 和 MBC 测定

将痤疮丙酸杆菌接种于硫乙醇酸盐固体培养基, 快速放入厌氧培养袋中, 同时迅速放入厌氧产生袋和指示剂, 排除培养袋中空气, 密封后于 37 °C 培养箱培养 3 d。将金黄色葡萄球菌接种到 LB 固体培养基, 37 °C 培养 24 h。

刮取活化后的痤疮丙酸杆菌于硫乙醇酸盐液体培养基 (金黄色葡萄球菌使用 PBS) 中, 通过麦氏比浊法制备 10^6 CFU/mL 菌悬液。取 100 μ L 菌液涂布于硫乙醇酸盐固体培养基 (金黄色葡萄球菌使用 LB 固体培养基), 待干。用打孔器打直径 6 mm 的孔, 每孔加入 50 μ L 内生真菌发酵液, 以 100 μ g/mL 硫酸庆大霉素为阳性对照, 迅速放置于厌氧培养盒中, 放入厌氧产气袋密封, 置于 37 °C 恒温生化培养箱内培养 72 h (金黄色葡萄球菌需氧培养 20 h), 观察并用游标卡尺测量抑菌圈大小。

参照文献^[24]用微量肉汤稀释法测定 EA 的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。将 EA 母液用硫乙醇酸盐/LB 液体培养基稀释为 2 000.00、1 000.00、500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.63、7.81 μ g/mL, 各取 100 μ L 依次加入 96 孔板中, 第 10 孔为阳性对照 (100 μ g/mL), 第 11 孔为阴性对照。然后于 1–11 孔中加入 100 μ L 10^6 CFU/mL 菌液, 第 12 孔

加入 200 μL 培养基作为空白对照, 置于厌氧袋内 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h (金黄色葡萄球菌需氧培养 20 h), 观察并测量 OD_{600} , 判断抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC, 实验设置 3 组重复。选择 MIC 孔及高浓度孔, 分别吸取 10 μL 孔内液体涂布于硫乙醇酸盐/LB 固体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 72 h (金黄色葡萄球菌需氧培养 20 h), 以无菌落生长的最低浓度为最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC)。

2 结果与分析

2.1 南阳白藜根部内生真菌多样性及类群结构

对 3 个样本白藜根部内生真菌 ITS1-1F 区域的高通量测序结果共 249 505 条下机数据进行处理、质控后, 共获得有效序列 195 452 条, 占比 78%, 平均长度为 228 bp, 平均注释序列 64 694 条, 获得 118 个 OTU (图 1)。随着测序数量的增加,

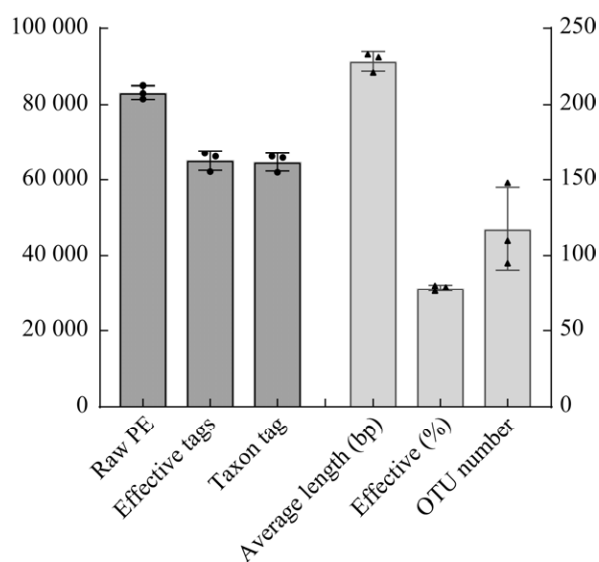


图1 白藜根部内生真菌 ITS1-1F 区域扩增子测序数据统计

Figure 1 Sequencing data statistics of the ITS1-1F region amplicons of fungal endophytes from *Ampelopsis japonica* root.

稀释曲线(图 2)趋于平坦, 表明测序策略合理, 可以基本反映测序样品中绝大多数的微生物信息。对白藜根部内生真菌 OTU 多样性指数进行分析发现其 Goods coverage 指数为 1.00 (图 3), 表明本次测序数据合理, 能够代表样本中微生物多样性的真实情况。白藜根部内生真菌 Shannon 指数为 2.70, Simpson 指数为 0.71, Chao1 指数为 107.77, ACE 指数为 109.03 (图 3)。

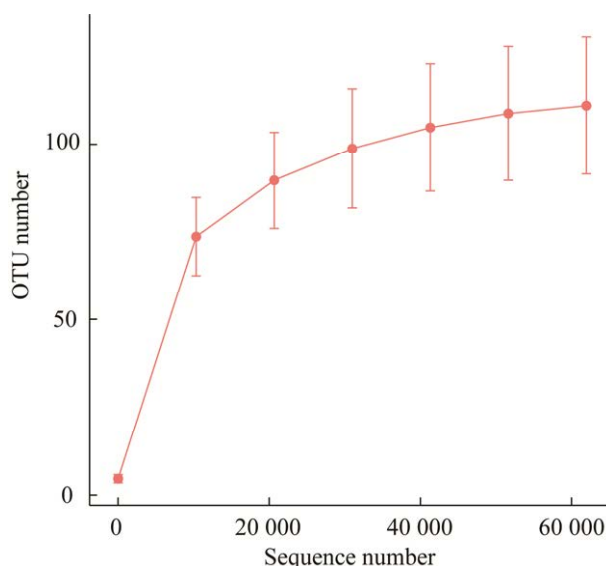


图2 白藜根部内生真菌稀释曲线

Figure 2 Rarefaction curves of fungal endophytes from *Ampelopsis japonica* root.

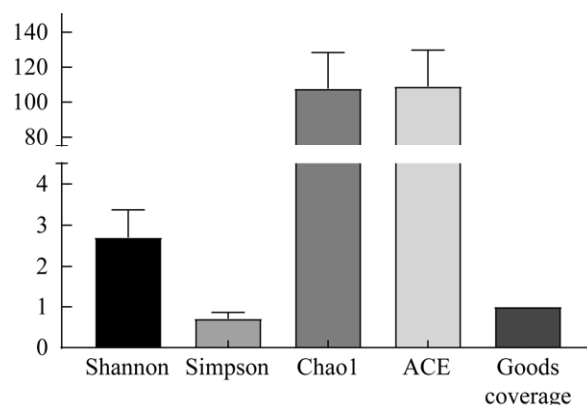


图3 白藜根部内生真菌多样性指数

Figure 3 The index of diversity of the fungal endophytes from *Ampelopsis japonica* root.

本研究基于 OTU 的代表性序列注释分析了白藜内生真菌的类群信息, 118 个 OTU 可归为 8 门 22 纲 45 目 73 科 93 属。子囊菌门(*Ascomycota*)为白藜根部内生真菌的优势菌门, 相对丰度达 92.79% (图 4), 其次为担子菌门(*Basidiomycota*,

2.99%), 还检测到罗兹菌门(*Rozellomycota*, 0.07%)、被孢霉门(*Mortierellomycota*, 0.03%)和球囊菌门(*Glomeromycota*, 0.01%)等。在纲分类水平上, 子囊菌纲(*Sordariomycetes*)相对丰度占 79.82%, 丰度较高的还有座囊菌纲(*Dothideomycetes*, 8.84%) 和 伞 菌 纲(*Agaricomycetes*, 2.97%)。科水平上, 相对丰度前三的优势科为丛赤壳科(*Nectriaceae*)、*Chaetosphaeriaceae* 和炭角菌科(*Xylariaceae*), 占比分别为 45.14%、20.87%和 6.05% (图 4)。属水平上, *Tainosphaeria* 丰度最高, 占 20.86%; 其次为镰刀菌属(*Fusarium*, 15.38%)、炭角菌属(*Xylaria*, 6.05%); 此外, 还检测到乳突赤壳属(*Thelonectria*, 0.82%)、*Phaeoacremonium* (0.99%)、硬孔菌属(*Rigidoporus*, 0.44%)、节丛孢属(*Arthrobotrys*, 0.58%)、孢子丝菌属(*Sporothrix*, 0.33%)、青霉属(*Penicillium*, 0.07%)和木霉属(*Trichoderma*, 0.06%)等(图 5)。

2.2 内生真菌功能预测

基于 FUNGuild 数据库分析, 白藜根部内生真菌功能共预测为 7 种营养类型(图 6), 其中腐生营养型(saprotroph)相对丰度最高, 达 52.13%, 其次为病理-腐生营养型(pathotroph-saprotroph, 占 15.46%)、腐生-共生营养型(saprotroph-symbiotroph, 占 6.06%)、病理营养型(pathotroph, 占 1.07%)、病理-腐生-共生营养型(pathotroph-saprotroph-symbiotroph, 占 0.52%)、病理-共生营养型(pathotroph-symbiotroph, 占 0.05%)、共生型(symbiotroph, 占 0.05%)。

白藜内生真菌的主要功能类群有未定义腐生菌(undefined saprotroph, 占 50.78%)、植物病原-土壤腐生-木材腐生菌(plant pathogen-soil saprotroph-wood saprotroph, 占 15.38%)、内生-未定义腐生-木材腐生菌(endophyte-undefined saprotroph-wood saprotroph, 占 6.05%), 其次为

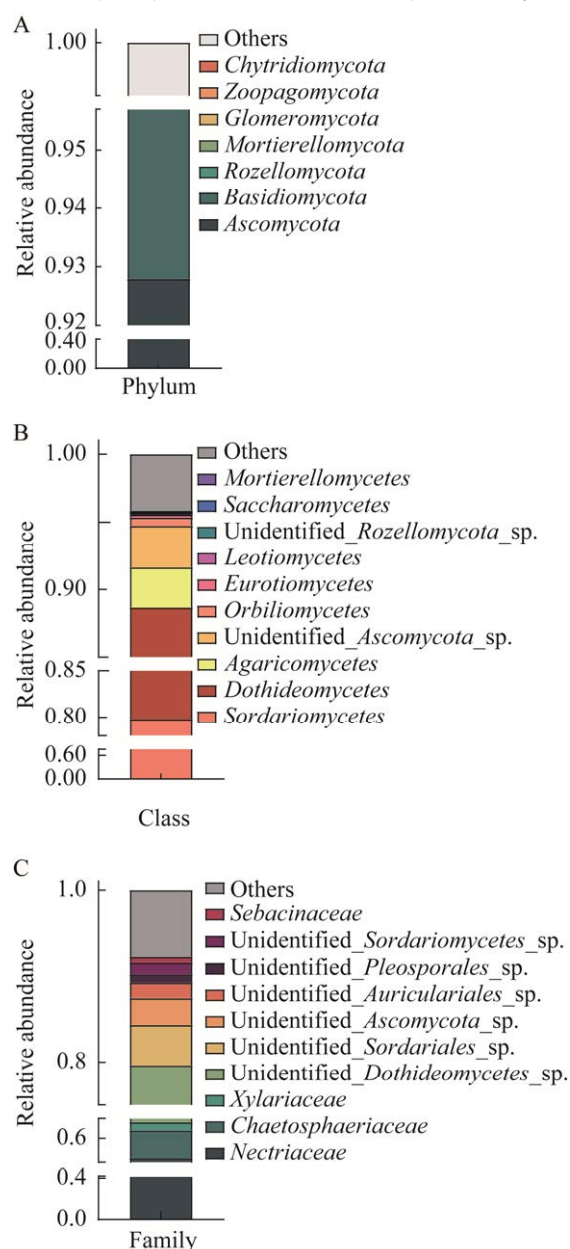


图 4 白藜根部内生真菌在门(A)、纲(B)、科(C)水平上的物种相对丰度

Figure 4 The relative abundance of fungal endophytes in roots of *Ampelopsis japonica* at phylum (A), class (B), and family (C) level.

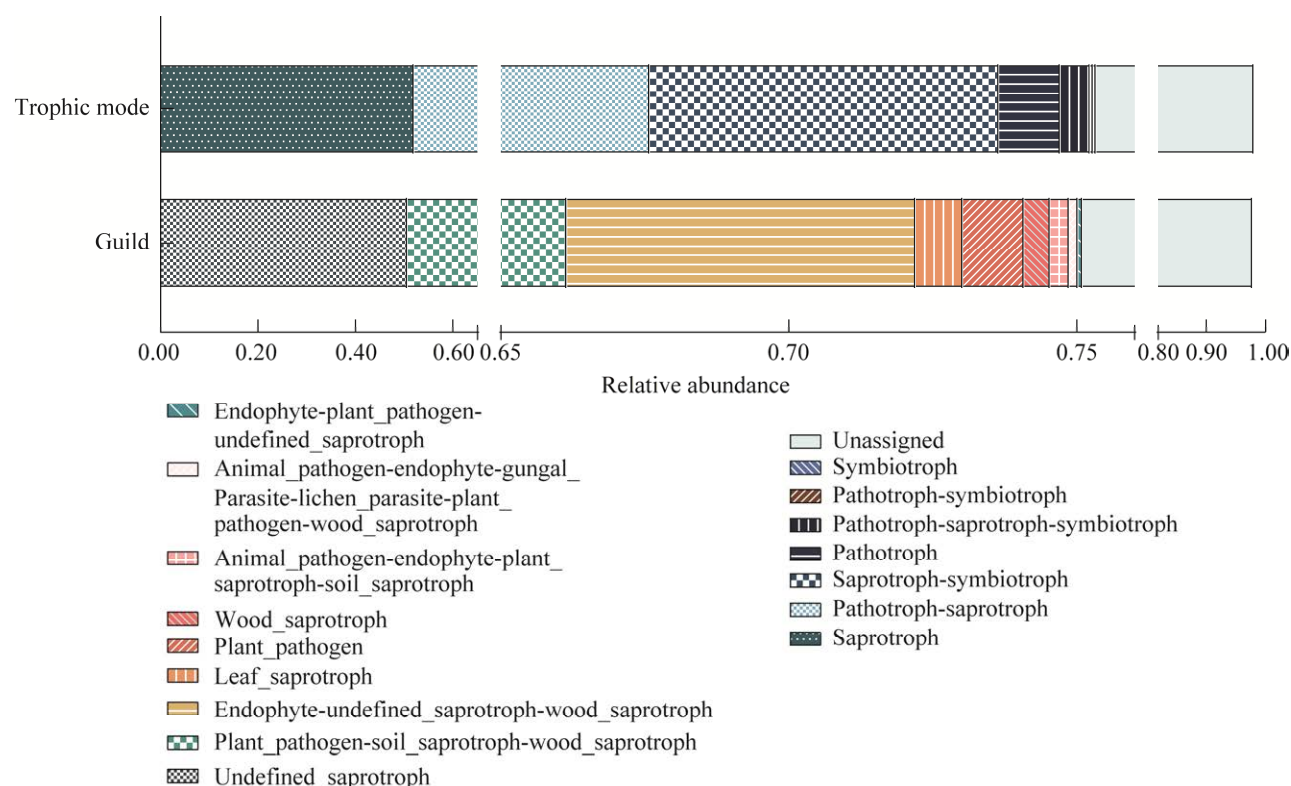


图 6 白藜根部内生真菌功能预测

Figure 6 FUNGuild of the fungal endophytes from *Ampelopsis japonica* root.

2.3 基于可培养方法的白藜根部内生真菌多样性研究

最后一次漂洗液和组织印记均未发现有微生物生长,这表明本研究采取的表面消毒方法可靠,所分离的菌株来源于植株内部,属于内生真菌。本研究利用 PDA 培养基从 150 块白藜根组织块中共分离得到 83 株内生真菌,其内生真菌的分离率和定殖率分别为 55.33%和 52.67%。对分离到的内生真菌进行形态学与分子生物学鉴定后归为 12 个属,其中优势类群为青霉属(*Penicillium*, 占 24.10%)、木霉属(*Trichoderma*, 占 14.46%)、背芽突霉属(*Cadophora*, 占 13.25%)、镰刀菌属(*Fusarium*, 占 12.05%),另外还分离到扁孔腔菌属(*Lophiostoma*)、链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)等(表 1)。白藜根部内生真菌的 Shannon-Wiener 多样性指数(H')为 2.23,均匀度指数(E)为 0.90。

2.4 抗疮疮致病菌活性白藜内生真菌的筛选

从白藜根部内生真菌中挑选出 17 株代表性菌株,对其发酵液的抗疮疮致病菌活性进行测定,结果显示对疮疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌具有抑制活性的菌株分别占总数的 11.76%和 23.53% (表 2),其中菌株 BLR17 对疮疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌均具有较好的抑制活性,其对疮疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈分别达到 10.82 mm 和 11.10 mm (图 7A、7B)。BLR17 发酵液的乙酸乙酯粗提物(EA)对疮疮丙酸杆菌的 MIC 和 MBC 值分别是 7.81 $\mu\text{g/mL}$ 和 7.81 $\mu\text{g/mL}$,其对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 分别为 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 62.5 $\mu\text{g/mL}$ (图 7C)。内生真菌 BLR17 的菌落形态和孢子结构与尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)相符(图 8),气生菌丝白色,瓶梗式产孢,顶端分生孢子聚集成簇。其 rDNA ITS 序列与 *Fusarium oxysporum* strain

LG-1-2 (OM658377.1)的相似性为 99.80%, 经系统发育树分析发现其可与 9 个 *Fusarium* 的序列很好地聚类在一起, 并能与 3 个 *Fusarium*

oxysporum 参考序列形成一个支持度为 100%的分支(图 9), 结合以上形态学与分子生物学鉴定结果, BLR17 可被鉴定为 *Fusarium oxysporum*。

表 1 白藜根部内生真菌的类群

Table 1 The taxa of the culturable fungal endophytes in *Ampelopsis japonica* root

菌属	数量	相对分离频率
Genus	Number	Relative frequency (%)
青霉属 <i>Penicillium</i>	20	24.10
木霉属 <i>Trichoderma</i>	12	14.46
背芽突霉属 <i>Cadophora</i>	11	13.25
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	10	12.05
扁孔腔菌属 <i>Lophiostoma</i>	6	7.23
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	5	6.02
束状孢霉属 <i>Stilbospora</i>	5	6.02
链格孢属 <i>Alternaria</i>	4	4.82
间座壳属 <i>Diaporthe</i>	3	3.61
拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	3	3.61
<i>Pseudodactylaria</i>	3	3.61
毛霉属 <i>Mucor</i>	1	1.20
总计 Total	83	100.00

表 2 白藜根部内生真菌 BLR17 菌株发酵液抗菌活性

Table 2 Inhibitory activity of the fermentation supernatant of endophytic fungal isolate BLR17 from *Ampelopsis japonica* root

代表性菌株	痤疮丙酸杆菌	金黄色葡萄球菌
Representative strain	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
BLR04	+	+
BLR08	—	—
BLR11	—	—
BLR13	—	—
BLR16	—	—
BLR17	++	++
BLR20	—	—
BLR21	—	—
BLR22	—	—
BLR26	—	—
BLR27	—	—
BLR28	—	+
BLR29	—	—
BLR30	—	+++
BLR31	—	—
BLR38	—	—
BLR40	—	—
100 μ g/mL Gentamicin sulfate	+++	+++

—: 无抑菌活性; +: 抑菌圈直径 $d \leq 10$ mm, 轻度敏感; ++: $10 \text{ mm} < d \leq 15$ mm, 中度敏感; +++: $d > 15$ mm, 高度敏感

—: No antibacterial activity; +: Inhibition zone diameter (d) ≤ 10 mm, mildly sensitive; ++: $10 \text{ mm} < d \leq 15$ mm, moderately sensitive; +++: $d > 15$ mm, highly sensitive.

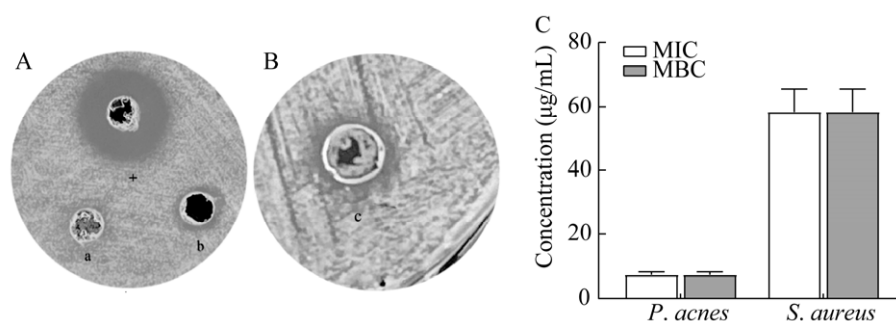


图 7 内生真菌 BLR17 的抗痤疮致病菌的活性 A: 痤疮丙酸杆菌, a: 阴性对照; b: 发酵液; +: 阳性对照. B: 金黄色葡萄球菌, c: 发酵液. C: 粗提物对痤疮致病菌的 MIC、MBC 值

Figure 7 Inhibition of acne pathogens *in vitro* of fungal endophyte strain BLR17. A: *Propionibacterium acnes* (a: Negative control; b: Fermentation supernatant; +: Positive control). B: *Staphylococcus aureus* (c: Fermentation supernatant). C: The MIC and MBC of crude ethyl acetate extract against acne-associated pathogens.

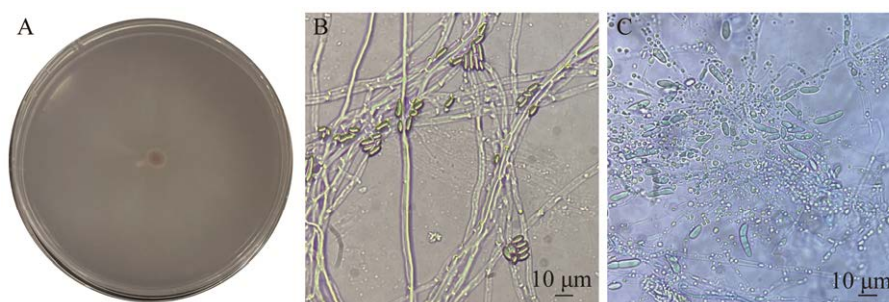


图 8 内生真菌 BLR17 形态学鉴定 A: 菌丝形态. B: 分生孢子梗. C: 分生孢子

Figure 8 Morphological identification of endophytic fungal strain BLR17. A: Hypha morphology. B: Conidiophore. C: Conidia.

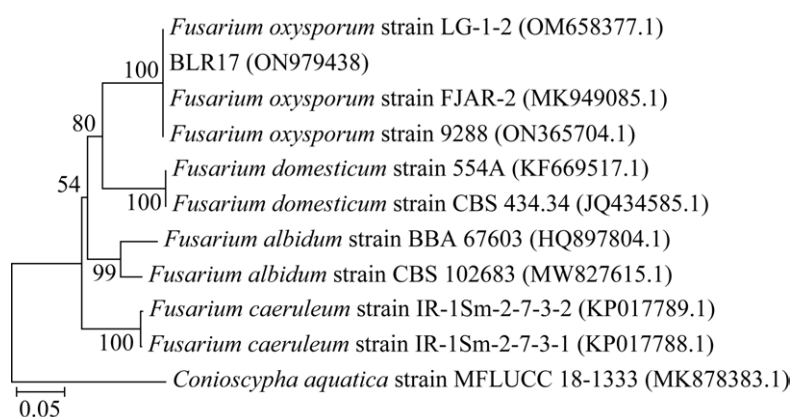


图 9 内生真菌 BLR17 基于 rDNA ITS 基因序列构建的系统发育树 以邻接法建树, *Conioscypha aquatica* strain MFLUCC 18-1333 (MK878383.1) 为外类群; 括号中的序号为菌株 GenBank 登录号; 分支点处的数字表示支持度; 标尺长度代表遗传距离

Figure 9 Phylogenetic tree of endophytic fungal strain BLR17 based on the rDNA ITS sequence. The phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method, *Conioscypha aquatica* strain MFLUCC 18-1333 (MK878383.1) was used as the out-group; The serial number in bracket was the GenBank accession number of the strain; Values at branch nodes represented support value; Scale length represented the evolutionary distance.

3 讨论与结论

已有研究表明, 环境中约 99% 的微生物至今尚不可培养, 因此依赖传统分离培养方法研究环境微生物群落结构和多样性, 具有选择性, 分辨水平低, 不能完全反映植物内生菌的真实情况^[25]。高通量测序技术由于其通量大、敏感性和准确度高的优势可以检测到不可培养的微生物, 与分离培养方法相比能够更全面、真实地反映样品中的微生物类群, 因此被广泛应用于医学、环境、工业、农业等多种领域中的微生物研究^[26]。本研究基于 Illumina MiSeq 高通量测序技术从白藜根部一共检测到 93 属的内生真菌, 明显高于基于组织分离法获得的 12 个属, 这表明高通量测序技术可获得更加全面的内生真菌类群信息。高通量测序结果的 OTU 数较低于其他植物内生真菌研究, 这可能与植物所处生境相关, 也可能与植物本身生理条件和结构特征等因素有关, 影响了内生真菌的侵染和定殖过程; 采样、前处理和高通量数据分析方法也可能影响分析结果^[27-28]。白藜根部内生真菌的优势类群是子囊菌门, 这与蛇足石杉、桃儿七、知母、黄精等药用植物相同^[29-30]。属水平上, *Tainosphaeria*、镰刀菌属和炭角菌属是白藜根部的主要类群, 其中镰刀菌属和炭角菌属在其他植物中属于较为常见的内生类群^[31], 但 *Tainosphaeria* 很少在其他植物内生真菌检测到, 这表明药用植物内生菌的类群分布可能具有一定的宿主特异性^[27]。白藜内生真菌基于高通量分析的 α 多样性 Shannon 指数(2.70)与基于可培养方法分析的 Shannon-Wiener 指数(2.23)高于多数已报道的其他药用植物^[32-33], 表明白藜根部蕴含较为丰富的内生真菌资源。可培养分离出的相对丰度较高的属, 如 *Alternaria*、*Aspergillus*、*Fusarium*、*Penicillium*、*Trichoderma*、*Lophiostoma* 在高通量测序中均能

检测到, 但也有一些类群 (*Cadophora*、*Stilbospora*、*Diaporthe*、*Pestalotiopsis*、*Pseudodactylaria*、*Mucor*) 未检测到, 这可能与高通量测序中的引物扩增偏好性有关^[34]。高通量测序分析真菌多样性也存在一定的局限因素, 如测序质量、数据库物种代表的元编码标志物(参考序列)有限等^[35]。本研究中高通量测序结果中丰度最高的淡水真菌 *Tainosphaeria* 未能通过可培养法分离到, 该属目前研究较少, 可能由于离开宿主环境, 不依赖特殊基质难以培养。高通量测序检测到的内生真菌种类多数都不能用广谱的培养基分离培养, 这可能与分离培养基不能完全模拟其实际的生存环境和营养条件有关^[36]。

植物内生真菌不但蕴含着丰富的生物活性物质, 而且还能促进宿主植物的生长, 提高其抗逆性和抗病性, 在药用植物快速栽培、生物防治、药材品质改善等方面具有重要的应用。本研究通过真菌 FUNGuild 预测发现白藜内生真菌存在“外生菌根”和“丛枝菌根”生态功能类群, 它们具有促进宿主植物吸收养分、提高宿主抗逆性的作用^[37], 有望为构建高效、安全的白藜-内生真菌快速栽培系统提供菌株资源。基于 Illumina MiSeq 高通量测序技术可以提供较全面的药用植物内生真菌类群信息, 在此基础上优化分离策略, 通过定向分离的方法可以显著提高植物内生菌的分离率^[38], 从而为深入挖掘和利用药用植物内生菌资源奠定基础。

痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌是痤疮发病过程中重要的病原菌, 因此, 寻找对它们具有抑菌活性的先导化合物是开发痤疮新药的一个重要途径。虽然白藜作为中药在痤疮临床治疗有着较好的应用, 但关于白藜内生真菌的抗痤疮活性研究尚未见报道。自首次从太平洋红豆杉中分离到产紫杉醇类化合物的内生真菌开始, 研究人员开始致力于产药用活性成分内生菌的研究, 已有

大量研究者从药用植物中分离到产生与宿主相同活性物质的内生真菌^[39]。例如,张玲琪等^[40]从长春花中分离到产长春新碱内生镰刀菌97CG3;Thi Minh le 等^[29]从蛇足石杉分离到产石杉碱甲内生真菌 *Penicillium* sp. LDL4.4 等,这表明内生真菌可产生与宿主植物具有相同或相似活性的代谢产物。*Fusarium oxysporum* 定殖于植物根部,已有研究证明从植物分离的内生真菌 *F. oxysporum* 具有植物促生作用、生物防治功能、杀线虫活性、抗癌、抗菌等多种活性,可产生多糖类、吡啶衍生物、萜类、黄酮类、甾体类、木脂素类、脂肽类、丙酸类和生物碱类等多种活性物质^[41]。本研究发现白藜内生真菌对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌具有抑制活性的菌株分别占试验菌株总数的 11.76%和 23.53%,这说明白藜内生真菌蕴含着一定比例的抗痤疮活性菌株,为抗痤疮新药开发及功效化妆品的研制提供了重要的菌株资源库,其中内生真菌 *Fusarium* sp. BLR17 粗提物对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌均具有良好的抗性,该菌株有望成为抗痤疮活性先导化合物筛选的重要资源菌株,后续将对其活性物质的分离纯化、活性验证及抗菌机制进行深入研究。

REFERENCES

- [1] 张怡,赵鑫,周梦楠,商利娜,赵海宁,王亚静. 黄芩与葡萄糖酸锌联用对痤疮致病菌的抑菌实验研究[J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(2): 215-220.
ZHANG Y, ZHAO X, ZHOU MN, SHANG LN, ZHAO HN, WANG YJ. Study on antibacterial activity of combined application of *Scutellaria baicalensis* and zinc gluconate against pathogenic bacteria of acne[J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2020, 39(2): 215-220 (in Chinese).
- [2] TALEB MH, ABDELTAWAB NF, SHAMMA RN, ABDELGAYED SS, MOHAMED SS, FARAG MA, RAMADAN MA. *Origanum vulgare* L. essential oil as a potential anti-acne topical nanoemulsion-*in vitro* and *in vivo* study[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2018, 23(9): 2164.
- [3] 汪玉梅,范倩,刘柏汝,胡金珊,张翠仙. 重楼不同皂苷成分对痤疮相关致病菌的体外抑菌作用研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2022, 21(3): 225-227.
WANG YM, FAN Q, LIU BR, HU JS, ZHANG CX. Antibacterial effects of different saponins from *Paris polyphylla* on acne-associated pathogens *in vitro*[J]. Chinese Journal of Dermatovenereology of Integrated Traditional and Western Medicine, 2022, 21(3): 225-227 (in Chinese).
- [4] 马英,项蕾红. 痤疮发病机制及治疗目标的新认识[J]. 临床皮肤科杂志, 2015, 44(1): 66-69.
MA Y, XIANG LH. The new understanding of the pathogenesis of acne and treatment goals[J]. Journal of Clinical Dermatology, 2015, 44(1): 66-69 (in Chinese).
- [5] 李巧玲,熊梓汀,杨虹,黄蓉,王寒冰,罗超,刘剑. 川白芷提取物对痤疮相关致病菌的抑制作用[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2021, 35(1): 26-29.
LI QL, XIONG ZT, YANG H, HUANG R, WANG HB, LUO C, LIU J. Antimicrobial activity of extract from *angelicae dahuricae* on acne-associated bacteria[J]. The Chinese Journal of Dermatovenereology, 2021, 35(1): 26-29 (in Chinese).
- [6] 单孔荣,王红丽,姚乃捷,宋燕平,余瑾,陈林珍,梁有连. 薰衣草精油与罗勒精油对痤疮致病菌的体外抑菌作用研究[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(5): 677-680.
SHAN KR, WANG HL, YAO NJ, SONG YP, YU J, CHEN LZ, LIANG YL. Antibacterial activity of lavender essential oil and basil essential oil against pathogenic bacteria of acne *in vitro*[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2017, 33(5): 677-680 (in Chinese).
- [7] 张倩. 白藜多糖的提取及分离纯化工艺研究[J]. 广东化工, 2021, 48(12): 294-296.
ZHANG Q. Study on extraction and purification of polysaccharides from *Ampelopsis japonica*[J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(12): 294-296 (in Chinese).
- [8] 李媛媛,宫小勇,晁旭,周智辉,白杨. 白藜的化学成分、质量控制及药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2020, 37(10): 956-960.
LI YY, GONG XY, CHAO X, ZHOU ZH, BAI Y. Research progress of the isolations, quality control, pharmacological effect of *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2020, 37(10): 956-960 (in Chinese).
- [9] NIU C, WANG H, ZHANG ZZ, YANG LP, ZHAI YY,

- LIU ZQ, LIU ZZ, ZHANG BB, ZHOU JC, WANG ZH. Bioactive pentacyclic triterpenes from the root extract of *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino[J]. Phytochemistry Letters, 2021, 45: 68-71.
- [10] 朱长俊, 朱红薇. 白藜正丁醇提取物抗菌作用研究[J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(1): 67-68.
- ZHU CJ, ZHU HW. Antibacterial activity of n-BuOH extract of *Ampelopsis japonica*[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2011, 20(1): 67-68 (in Chinese).
- [11] 李钰乐, 方毅, 李亚婷, 郝小康, 郭瑞林. 秦皮等 10 种中药对白色念珠菌抑制作用的体外实验研究[J]. 延安大学学报(医学科学版), 2017, 15(2): 53-55.
- LI YL, FANG Y, LI YT, HAO XK, GUO RL. *In vitro* experimental study on the *Candida Albicans* inhibitory effect of *Cortex Fraxini* and other 10 kinds of TCM[J]. Journal of Yan'an University (Medical Science), 2017, 15(2): 53-55 (in Chinese).
- [12] 李萌, 刘方舟, 杜昱, 张一颖, 杨阳, 王静, 李园白. 运用数据挖掘技术分析中医美容外用方剂配伍规律[J]. 新中医, 2022, 54(12): 16-22.
- LI M, LIU FZ, DU Y, ZHANG YY, YANG Y, WANG J, LI YB. Analysis of compatibility rules of Chinese medicine cosmetic external prescriptions by data mining technology[J]. New Chinese Medicine, 2022, 54(12): 16-22 (in Chinese).
- [13] 刘百祥, 肖跃群, 符逢春, 彭学著, 杨述之, 陈卫平. 黄白散治疗青春期寻常性痤疮 99 例疗效观察[J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 31-32.
- LIU BX, XIAO YQ, FU FC, PENG XZ, YANG SZ, CHEN WP. Observation on therapeutic effect of Huangsan on 99 cases of adolescent acne vulgaris[J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2007, 23(1): 31-32 (in Chinese).
- [14] 毕宝宝. 白藜资源可持续利用的初步研究[D]. 开封: 河南大学硕士学位论文, 2015.
- BI BB. A preliminary study on the sustainable utilization of *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino resources[D]. Kaifeng: Master's Thesis of Henan University, 2015 (in Chinese).
- [15] JIA M, CHEN L, XIN HL, ZHENG CJ, RAHMAN K, HAN T, QIN LP. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 906.
- [16] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.
- [17] 张春燕. 构树内生真菌及其抗肿瘤次级代谢产物研究[D]. 上海: 第二军医大学硕士学位论文, 2013.
- ZHANG CY. Endophytic fungi from *Broussonetia papyrifera* and their anti-tumor secondary metabolites[D]. Shanghai: Master's Thesis of Second Military Medical University, 2013 (in Chinese).
- [18] 夏文静, 曹兴琴, 刘琴, 王莎莎, 申丽. 白茅内生菌 *Chaetomium globosum* WQ 产生的一个新细胞松弛素化合物[J]. 药学学报, 2020, 55(5): 967-970.
- XIA WJ, CAO XQ, LIU Q, WANG SS, SHEN L. A new cytochalasan compound from endophyte *Chaetomium globosum* WQ in *Imperata cylindrical*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2020, 55(5): 967-970 (in Chinese).
- [19] SHEN L, WANG JS, SHEN HJ, SONG YC, TAN RX. A new cytotoxic trichothecene macrolide from the endophyte *Myrothecium roridum*[J]. Planta Medica, 2010, 76(10): 1004-1006.
- [20] CAO LX, YOU JL, ZHOU SN. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18(2): 169-171.
- [21] 王新宇. 三种禾草根部分内生真菌分离、鉴定及促生作用初探[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2020.
- WANG XY. Isolation and identification of endophytic fungi from roots of three grasses and preliminary study on their growth promoting effects[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia University, 2020 (in Chinese).
- [22] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- WEI JC. Fungal Identification Handbook[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979 (in Chinese).
- [23] 中国科学院中国孢子植物志编辑委员会编辑. 中国真菌志 第 47 卷 丛赤壳科 生赤壳科[M]. 北京: 科学出版社, 2017.
- Consilio Florarum Cryptogamarum Sinicarum Academiae Sinicae Edita. Flora Fungorum Sinicorum Vol. 47. Nectriaceae et Bionectriaceae[M]. Beijing: Science Press, 2017 (in Chinese).
- [24] 徐婷婷. 皮寒药对金黄色葡萄球菌的抑制作用及其抑菌机制研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2017.
- XU TT. Antibacterial effects and mechanism of a traditional Chinese herb drug *Gueldenstaedtia delavayi* franch on *Staphylococcus aureus*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2017 (in Chinese).
- [25] 刘雪. 石斛内生菌的研究进展[J]. 食品安全导刊,

- 2022(14): 166-168.
- LIU X. Research progress of endophytic bacteria in *Dendrobium*[J]. China Food Safety Magazine, 2022(14): 166-168 (in Chinese).
- [26] WIJAYAWARDENE NN, BAHAM M, SÁNCHEZ-CASTRO I, DAI DQ, ARIYAWANSA KGSU, JAYALAL U, SUWANNARACH N, TEDERSOO L. Current insight into culture-dependent and culture-independent methods in discovering ascomycetous taxa[J]. Journal of Fungi: Basel, Switzerland, 2021, 7(9): 703.
- [27] LI JL, SUN X, ZHENG Y, LÜ PP, WANG YL, GUO LD. Diversity and community of culturable endophytic fungi from stems and roots of desert halophytes in northwest China[J]. MycoKeys, 2020, 62: 75-95.
- [28] PEARMAN JK, KEELEY NB, WOOD SA, LAROCHE O, ZAIKO A, THOMSON-LAING G, BIESSY L, ATALAH J, POCHON X. Comparing sediment DNA extraction methods for assessing organic enrichment associated with marine aquaculture[J]. PeerJ, 2020, 8: e10231.
- [29] THI MINH le T, THI HONG HOANG A, THI BICH le T, THI BICH VO T, van QUYEN D, CHU HH. Isolation of endophytic fungi and screening of huperzine A-producing fungus from *Huperzia serrata* in Vietnam[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 16152.
- [30] 樊锐锋, 王若凡, 杜艳秋, 刘艳, 黄庆阳. 黄精根际及药用部位内生真菌群落组成和生态功能分析[J]. 广西植物, 2021, 41(5): 799-807.
- FAN RF, WANG RF, DU YQ, LIU Y, HUANG QY. Community composition and ecological function of rhizosphere fungi and medicinal parts endophytic fungi in *Polygonatum sibiricum*[J]. Guihaia, 2021, 41(5): 799-807 (in Chinese).
- [31] AZUDDIN NF, MOHD MH, ROSELY NFN, MANSOR A, ZAKARIA L. Molecular phylogeny of endophytic fungi from rattan (*Calamus castaneus* Griff.) spines and their antagonistic activities against plant pathogenic fungi[J]. Journal of Fungi: Basel, Switzerland, 2021, 7(4): 301.
- [32] 冯晓晓, 陈家杰, 刘峰, 胡卫珍, 林福呈, 章初龙. 西双版纳 5 种附生兰非菌根内生真菌多样性研究[J]. 菌物学报, 2019, 38(11): 1876-1885.
- FENG XX, CHEN JJ, LIU F, HU WZ, LIN FC, ZHANG CL. Diversity of non-mycorrhizal endophytic fungi from five epiphytic orchids from Xishuangbanna, China[J]. Mycosystema, 2019, 38(11): 1876-1885 (in Chinese).
- [33] CHEN J, ZHANG LC, XING YM, WANG YQ, XING XK, ZHANG DW, LIANG HQ, GUO SX. Diversity and taxonomy of endophytic xylariaceous fungi from medicinal plants of *Dendrobium* (Orchidaceae)[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58268.
- [34] de FILIPPIS F, LAIOLA M, BLAIOTTA G, ERCOLINI D. Different amplicon targets for sequencing-based studies of fungal diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(17): e00905-e00917.
- [35] BALDRIAN P, VĚTROVSKÝ T, LEPINAY C, KOHOUT P. High-throughput sequencing view on the magnitude of global fungal diversity[J]. Fungal Diversity, 2022, 114(1): 539-547.
- [36] 王红阳, 康传志, 王升, 蒋待泉, 彭政, 徐扬, 杜用玺, 张燕, 刘大会, 郭兰萍. 基于高通量测序和传统培养分离方法的药用植物内生菌资源研究策略[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(8): 1910-1919.
- WANG HY, KANG CZ, WANG S, JIANG DQ, PENG Z, XU Y, DU YX, ZHANG Y, LIU DH, GUO LP. Research strategies for endophytes in medicinal plants based on high-throughput sequencing and traditional culture and isolation methods[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(8): 1910-1919 (in Chinese).
- [37] KÖHLER J, YANG N, PENA R, RAGHAVAN V, POLLE A, MEIER IC. Ectomycorrhizal fungal diversity increases phosphorus uptake efficiency of European beech[J]. The New Phytologist, 2018, 220(4): 1200-1210.
- [38] LIU SJ, MOON CD, ZHENG N, HUWS S, ZHAO SG, WANG JQ. Opportunities and challenges of using metagenomic data to bring uncultured microbes into cultivation[J]. Microbiome, 2022, 10(1): 76.
- [39] SINGH A, SINGH DK, KHARWAR RN, WHITE JF, GOND SK. Fungal endophytes as efficient sources of plant-derived bioactive compounds and their prospective applications in natural product drug discovery: insights, avenues, and challenges[J]. Microorganisms, 2021, 9(1): 197.
- [40] 张玲琪, 郭波, 李海燕, 曾松荣, 邵华谷苏, 魏蓉城. 长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究[J]. 中草药, 2000, 31(11): 805-807.
- ZHANG LQ, GUO B, LI HY, ZENG SR, SHAO HUA GS, WEI RC. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000, 31(11): 805-807 (in Chinese).
- [41] TIWARI P, BAE HH. Endophytic fungi: key insights, emerging prospects, and challenges in natural product drug discovery[J]. Microorganisms, 2022, 10(2): 360.