

## 研究报告

## 濒危药用植物掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌多样性分析

阿拉坦存布尔<sup>1,2</sup>, 曹乌吉斯古楞<sup>\*1,2</sup>, 包金花<sup>3</sup>, 胡红霞<sup>1,2</sup>, 查苏娜<sup>1,2</sup>, 琪波热<sup>1,2</sup>

1 内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028000

2 内蒙古民族大学蒙医药研发工程教育部重点实验室, 内蒙古 通辽 028000

3 内蒙古民族大学农学院, 内蒙古 通辽 028000

阿拉坦存布尔, 曹乌吉斯古楞, 包金花, 胡红霞, 查苏娜, 琪波热. 濒危药用植物掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 460-470.

Alatancunbuer, Cao wujisiguleng, BAO Jinhua, HU Hongxia, CHA Suna, Qibore. Diversity of fungi in the roots and rhizosphere soil of the endangered medicinal plant *Dactylorhiza hatagirea*[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 460-470.

**摘要:** 【背景】植物内生真菌对宿主植物促生长、抗旱和增强抗病能力等方面有着重大的研究和利用价值, 尤其对兰科植物的生长起到重要的作用。【目的】通过对掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌多样性进行系统分析, 掌握掌裂兰根部内生真菌与根际土真菌群落结构, 为进一步探究掌裂兰植物与真菌共生规律提供参考。【方法】采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌多样性。【结果】掌裂兰根部内生真菌隶属于 7 门 89 属, 优势菌属为瘤菌根菌属(*Epulorhiza*) (16.93%)、头梗霉属(*Cephalophora*) (10.41%)、酵母属(*Saccharomyces*) (5.73%)、角担菌属(*Ceratobasidium*) (5.32%) 和镰刀菌属(*Fusarium*) (5.12%), 其中 *Epulorhiza* 和 *Ceratobasidium* 为兰科植物菌根真菌; 根际土真菌隶属于 11 门 269 属, 优势菌属为镰刀菌属(*Fusarium*) (8.09%)、丛赤壳属(*Neonectria*) (6.79%)、*Plectosphaerella* (3.39%) 和被孢霉属(*Mortierella*) (3.01%)。通过比较可知, 掌裂兰根际土真菌的多样性明显高于根部内生真菌, 存在明显差异。【结论】揭示了内蒙古地区掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌类群组成, 丰富了掌裂兰内生真菌资源, 为推动资源紧缺型药用植物内生微生物研究及野生资源保护与开发发挥了重要作用。

**关键词:** 掌裂兰; 根部内真菌; 根际土真菌; 多样性

资助项目: 内蒙古自治区科技计划(2021GG0003); 内蒙古民族大学博士启动基金(BS509)

This work was supported by the Inner Mongolia Autonomous Region Science and Technology Program (2021GG0003) and the Inner Mongolia Minzu University for Nationalities Doctoral Initiation Fund (BS509).

\*Corresponding author. E-mail: wjs\_inmu@163.com

Received: 2023-07-11; Accepted: 2023-09-26; Published online: 2023-10-26

## Diversity of fungi in the roots and rhizosphere soil of the endangered medicinal plant *Dactylorhiza hatagirea*

Alatancunbuer<sup>1,2</sup>, Caowujisiguleng<sup>\*1,2</sup>, BAO Jinhua<sup>3</sup>, HU Hongxia<sup>1,2</sup>, CHA Suna<sup>1,2</sup>, Qibore<sup>1,2</sup>

1 Mongolian Medical College, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

2 Key Laboratory of Mongolian Medicine Research and Development Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

3 College of Agriculture, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

**Abstract:** [Background] Endophytic fungi capable of promoting plant growth, enhancing plant tolerance to drought, and improving plant resistance to diseases have significant research and utilization values, especially for the growth of orchid plants. [Objective] To systematically analyze the diversity and reveal the community structure of fungi in the roots and rhizosphere soil of *Dactylorhiza hatagirea*, so as to provide a reference for further exploring the associations between *D. hatagirea* and fungi. [Methods] The Illumina Miseq high-throughput sequencing was employed to analyze the diversity of fungi in the roots and rhizosphere soil of *D. hatagirea*. [Results] The endophytic fungi in the roots of *D. hatagirea* belonged to 89 genera of 7 phyla, with the dominant genera being *Epulorhiza* (16.93%), *Cephalophora* (10.41%), *Saccharomyces* (5.73%), *Ceratobasidium* (5.32%), and *Fusarium* (5.12%), among which *Epulorhiza* and *Ceratobasidium* were mycorrhizal fungi in orchid plants. The fungi in the rhizosphere soil belonged to 269 genera of 11 phyla, with the dominant genera being *Fusarium* (8.09%), *Neonectria* (6.79%), *Plectosphaerella* (3.39%), and *Mortierella* (3.01%). The diversity of fungi in the rhizosphere soil of *D. hatagirea* was significantly higher than that in the roots. [Conclusion] This study revealed the fungal composition in the roots and rhizosphere soil of *D. hatagirea* in Inner Mongolia, enriching the endophytic fungi resources of this medicinal plant. The findings help to promote the research on endophytic microorganisms in the medicinal plants with limited resources, alleviate the shortage of Chinese medicinal herb resources, and protect and reasonably develop wild medicinal plant resources.

**Keywords:** *Dactylorhiza hatagirea*; fungi in the roots; fungi in rhizosphere soil; diversity

掌裂兰 *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soó 为兰科(*Orchidaceae*)掌裂兰属(*Dactylorhiza* Neck. ex Nevski)多年生草本植物, 蒙医常替代手参入药, 味甘、性平, 具有补肾益精、生津止咳等功效, 可用于治疗阴虚癆热、烦躁口渴、不思饮食和月经不调等症<sup>[1-2]</sup>。现代研究表明掌裂兰含有糖类、酚类、黄酮类和氨基酸等多种化合物, 具有抗氧化、抗菌、抗癌和增强免疫等药理活性<sup>[3-5]</sup>。

然而, 掌裂兰药材资源主要依赖野生资源, 加之其自然繁殖效率低以及乱采挖和自然生境被破坏等因素导致其野生资源急剧减少, 现被《国际自然保护联盟濒危物种红色名录》收载, 并列为《濒危野生动植物种国际贸易公约》II级珍稀植物<sup>[6]</sup>。

植物内生真菌是指栖息在植物器官中的真菌, 能够与植物相互作用, 并不会对宿主造成明显的伤害。植物内生真菌对宿主植物有促生长、

抗旱和增强抗病能力等作用,并且会产生与宿主植物相同或相似的药理活性<sup>[7-8]</sup>。例如,罗阳兰<sup>[9]</sup>利用高通量测序技术和纯培养方法对蕙兰(*Cymbidium faberi*)内生真菌进行多样性分析,共检测到 8 门 113 属真菌,其中一株真菌木霉属(*Trichoderma* sp.) NZ5 对蕙兰具有显著促生作用。丁锐等<sup>[10]</sup>从羊耳蒜(*Liparis japonica*)根部分离到内生真菌 201 株,分为 5 属 4 个不同形态,发现其中促进兰科植物生长发育的典型兰科菌根真菌 *Tulasnella*。

迄今,对掌裂兰资源分布、化学成分和药理活性等方面已有大量研究,但对掌裂兰内生真菌还鲜有报道,了解掌裂兰内生真菌及根际土真菌群落组成,研究与宿主植物的共生规律等对掌握掌裂兰植物生长规律及后期开展人工繁育工作具有非常重要的意义。本研究通过高通量测序法对掌裂兰的根部内生真菌和根际土真菌多样性进行分析,为该植物资源保护、生态种植和内生真菌资源的开发与利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

于 2021 年 7 月,从内蒙古自治区通辽市科左后旗采集健康供试植物,由内蒙古民族大学蒙医药学院曹乌吉斯古楞副教授鉴定为掌裂兰(*Dactylorhiza hatagirea*)。每株之间最少间隔 100 cm,随机选取 6 株掌裂兰,及时取下根部,将取样的 6 份掌裂兰根部样品均装入无菌袋,放进冰袋,保持新鲜 6 h 内送至实验室保存在 4 °C 冰箱备用。土壤样品采集于取样植株的根际 10–20 cm 处土壤,每株取一份 5–7 g 的土样,除去杂草根系等,共采集 6 份土壤样品均装入无菌袋中,送至实验室低温保存。

Phusion Hot Start Flex 2×Master Mix, 上海仪涛生物仪器有限公司; DL2000 DNA Marker,

TaKaRa 公司; 土壤基因组 DNA 提取试剂盒和高效植物基因组 DNA 提取试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (500 cycles), Illumina 公司。常温离心机, 上海艾本德生物科技有限公司; 冷冻离心机, 上海桑戈生物科技有限公司; 旋涡振荡仪, 太仓市华利达实验设备有限公司; 三温三控恒温水浴锅, 上海博迅实业有限公司; PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; 电泳仪和凝胶成像仪, Tanon 公司; 超低温冷冻储存箱, 中科美菱低温科技股份有限公司。

### 1.2 掌裂兰根部及根际土样处理

将健康掌裂兰抖掉根部泥土,取下待分离的根部器官用水冲洗 3–4 遍,冲去表面泥土和灰尘,然后在清水中浸泡,浸泡时注意 1–2 min 换一次水。无菌滤纸吸干表面水后在 5%次氯酸钠中浸泡 1.5 min,再在 75%乙醇中浸泡 1 min,最后无菌水冲洗 2–3 次后用无菌滤纸吸干表面水分。将根际土过 2 mm 筛去除固形物,装入无菌袋,待用。

### 1.3 掌裂兰样品 DNA 的提取及高通量测序

将处理好的掌裂兰根际土样本(6 份重复样品)和根部样本(6 份重复样品)的 DNA 分别用土壤基因组 DNA 提取试剂盒和高效植物基因组 DNA 提取试剂盒提取,用 1%琼脂糖凝胶电泳对提取的 DNA 纯度及浓度进行检测。利用引物 ITS1F12 (5'-GTGARTCATCGAATCTTTG-3')和 ITS2 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')PCR 扩增 ITS 片段<sup>[11-12]</sup>。PCR 反应体系(25 μL): Phusion Hot Start Flex 2×Master Mix 12.5 μL,正、反向引物(10 μmol/L)各 2.5 μL, DNA 模板(50 ng/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 54 °C 30 s, 72 °C 45 s, 32 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,纯化后的 PCR

产物送至上海百趣生物医学科技有限公司进行检测。

#### 1.4 数据分析

本研究中, 首先使用 QIIME2 平台的 cutadapt 插件去除原始数据中的引物。然后, 利用 QIIME2 平台的 DADA2 插件对所有 reads 进行合并、去噪、过滤嵌合体、去冗余和预测生物序列等操作, 获得特征表和代表性序列<sup>[13-14]</sup>。每个扩增子序列变异(amplicon sequence variant, ASV)定义为序列相似性为 100%的 reads 簇。每个 ASV 都使用 QIIME feature-classifier 插件基于 Unite 数据库进行物种注释并计算  $\alpha$  多样性指数 (Shannon、Simpson、Chao1 和 ACE), 利用 Venn 图揭示不同部位间共有、特有的真菌 ASV 数目, 直观地表现出样品间 ASV 的重合情况; 在  $\beta$  多样性研究中, 使用 Bray-Curtis 距离算法进行 Adonis 分析和 NMDS, 比较两组之间的差异性; 使用真菌数据库 Release v6.0 对菌群群落结构进

行门水平和属水平的分类学统计分析。另外, 根据样品物种丰度表采用 Kruskal-Wallis test 进行物种差异检验寻找不同部位中的差异真菌。

## 2 结果与分析

### 2.1 掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌测序数据统计与 $\alpha$ 多样性分析

从掌裂兰根部和根际土中共得到 931 243 条高质量 reads, 其中根部(R) 465 702 条和根际土(S) 465 541 条。稀释曲线结合测序深度估算表明, 测序深度已经足够大, 可以获得样品中大部分真菌的多样性特征(图 1A)。共检测到 1 975 个真菌 ASV, 使用 Venn 图展示了 2 个样本中共有和独有的 ASV 数目, 其中根际土真菌与根部内生真菌共有 155 个 ASV, 根际土(S)和根部(R)的独有 ASV 为 1 725 个和 95 个(图 1B), 另外, 根际土(S)相关的内生真菌丰富度和多样性均高于根部(R) (表 1)。

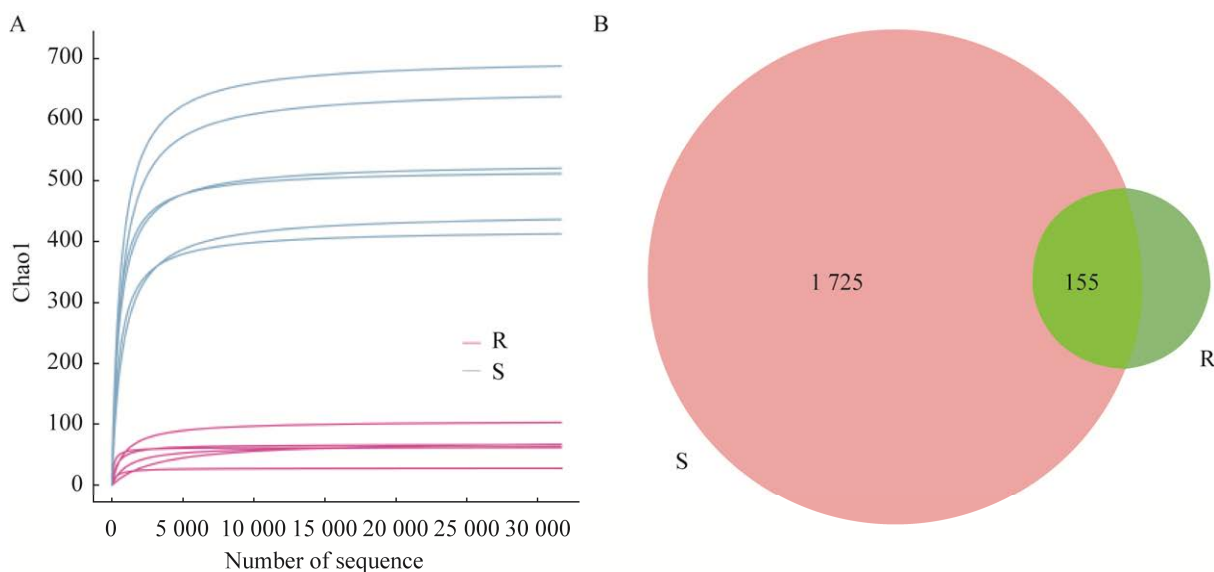


图 1 基于 ASV 的掌裂兰根部及根际土的稀释曲线图(A)与 Venn 图(B) R: 根部. S: 根际土. 下同  
Figure 1 Dilution curve plot (A) and Venn plot (B) of *Dactylorhiza hatagirea* root and rhizosphere soil samples based on ASV. R: The root. S: The rhizosphere soil. The same below.

表 1 掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌的  $\alpha$  多样性分析

Table 1 Alpha diversity analysis of endophytic fungi in the root and rhizosphere soil of *Dactylorhiza hatagirea*

样本	R	S
Sample		
有效序列	61.67	524.50
Valid tags		
Chao1 指数	63.62	528.53
Chao1 index		
Shannon 指数	3.06	6.52
Shannon index		
Simpson 指数	0.70	0.96
Simpson index		
覆盖度 Coverage	1.00	1.00

## 2.2 掌裂兰根部内生真菌及根际土真菌的 $\beta$ 多样性分析

基于 Bray-Curtis 相似性系数对掌裂兰样品群落数据进行 NMDS 分析, 结果如图 2 所示。两组样品主要位于非度量多维尺度分析 (non-metric multidimensional scaling, NMDS) 中心, 根部和根际土类群中各样点间的距离相对比较接近, 两组中既存在特有部分也存在重叠部分, 表明掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌群落组成既有共有菌群又有专属菌群。基于 Bray-Curtis 距离矩阵的 Adonis 分析,  $R^2$  值为 0.17, 表明 2 个分组有显著性差异, 具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

## 2.3 掌裂兰根部内生真菌及根际土真菌群落组成分析

基于高通量测序分析, 掌裂兰根部内生真菌隶属于 7 门 23 纲 43 目 64 科 89 属, 根际土真菌隶属于 11 门 40 纲 88 目 164 科和 269 属 (图 3)。在门水平上, 子囊菌门 (Ascomycota) 是根部内生真菌 (46.6%) 与根际土真菌 (61.94%) 的共有优势菌门, 其次, 担子菌门 (44.8%) 也是根部内生真菌的优势菌门 (图 3A)。在纲水平上, 掌裂兰根部内生真菌主要有伞菌纲 (Agaricomycetes) 和盘菌纲 (Pezizomycetes), 分别占 32.6% 和 10.9%; 掌裂兰根际土真菌主要为 Agaricomycetes, 占 10.19%;

粪壳菌纲 (Sordariomycetes) 在根部 (13.28%) 和根际土 (35.07%) 中相对丰度均较高, 为共有优势纲 (图 3B)。在目水平上, 鸡油菌目 (Cantharellales, 23.23%)、盘菌目 (Pezizales, 10.9%) 和肉座菌目 (Hypocreales, 9.08%) 为掌裂兰根部内生真菌优势类群; Hypocreales 和 Ascomycota\_unclassified 为掌裂兰根际土真菌优势类群 (图 3C)。在科水平上, 赤壳科 (Nectriaceae) 为根部内生真菌 (8.17%) 和根际土真菌 (16.82%) 的共同优势菌科 (图 3D)。在属水平上, 瘤菌根属 (Epulorhiza) (16.93%)、头梗霉属 (Cephalophora) (10.41%)、酵母属 (Saccharomyces) (5.73%)、角担菌属 (Ceratobasidium) (5.32%) 为根部的优势菌属; 镰刀菌属 8.09%、Plectosphaerella (3.39%) 和被孢霉属 (Mortierella) (3.01%) 为根际土真菌的优势菌属 (图 3E)。

## 2.4 掌裂兰根部内生真菌及根际土真菌的物种差异分析

对属水平的物种进行差异分析, 筛选  $P < 0.05$  的前 10 个属绘制柱状图, 结果表明 (图 4), 在掌

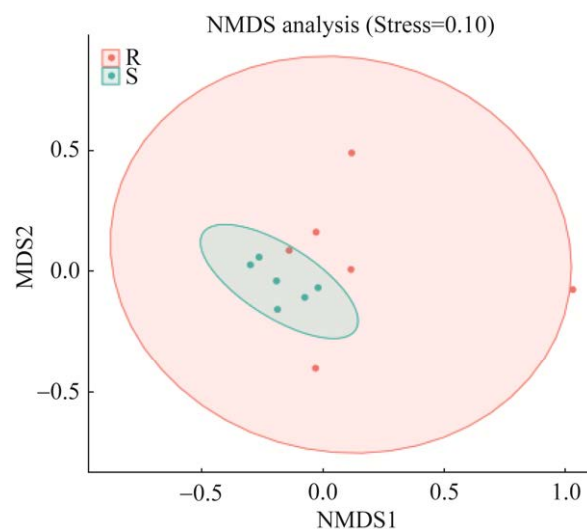
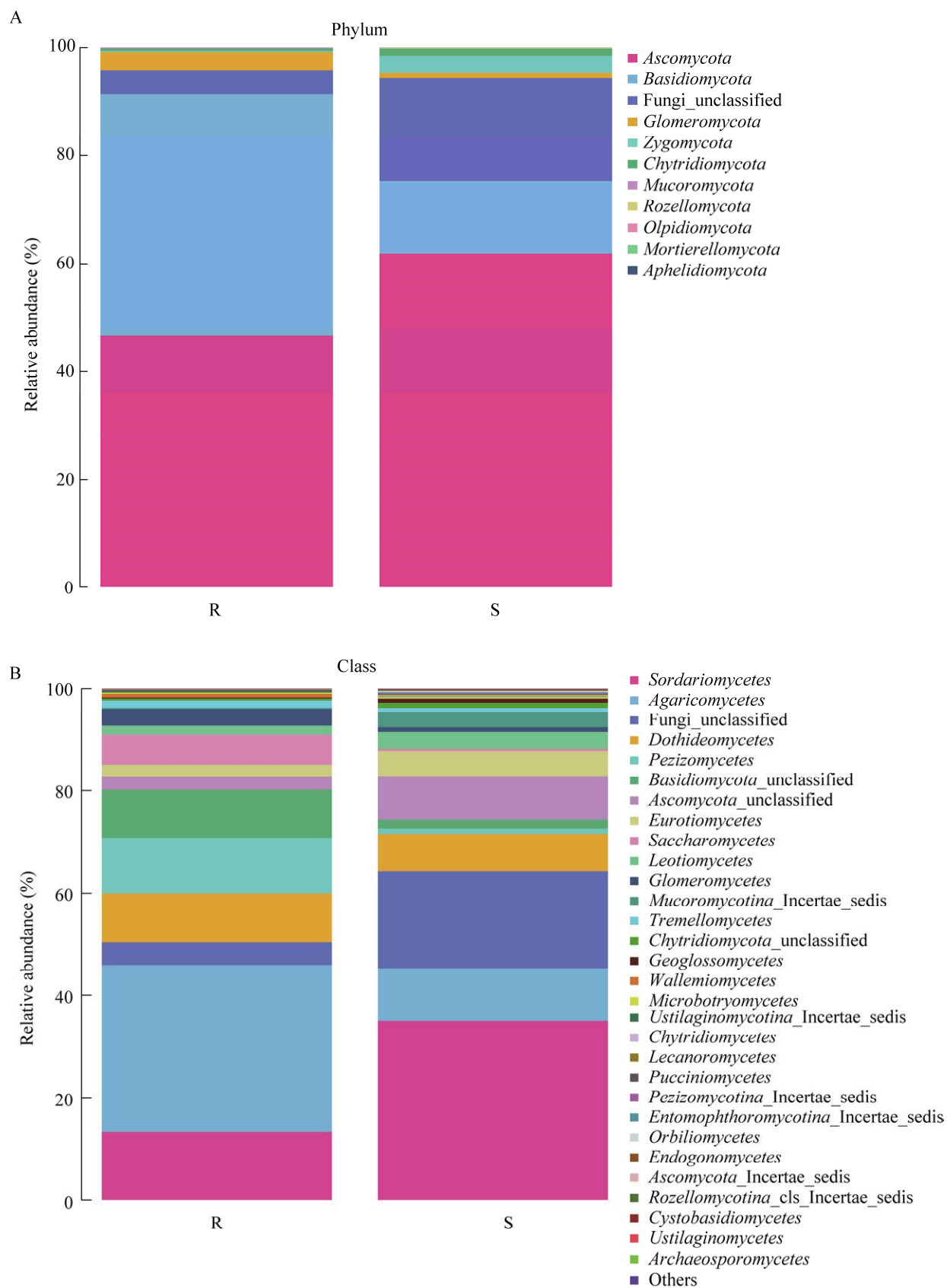
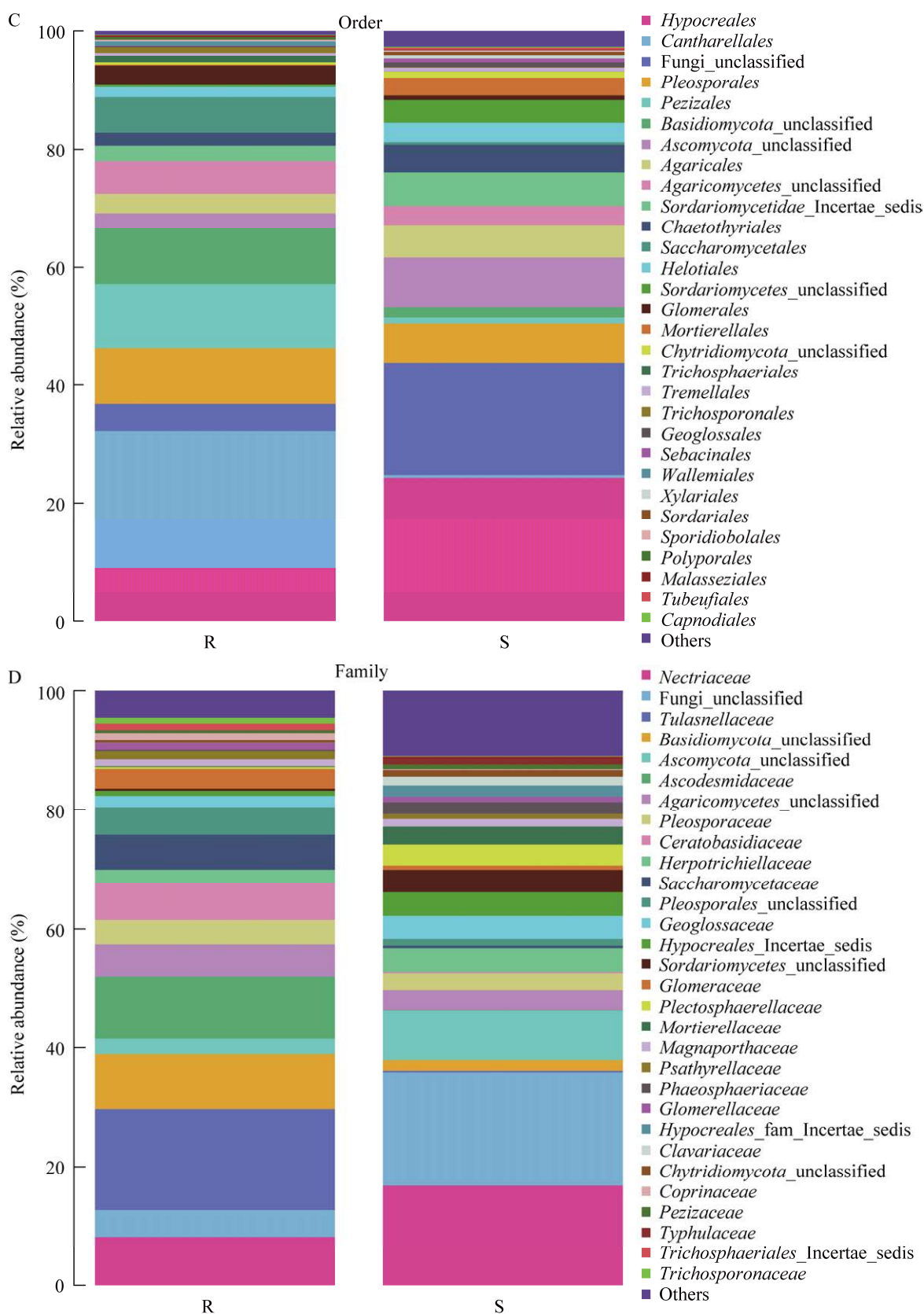


图 2 基于 Bray-Curtis 距离算法下掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌在属水平上的 NMDS 分析

Figure 2 NMDS analysis of endophytic fungi in the root and rhizosphere soil fungi of *Dactylorhiza hatagirea* at genus level based on Bray-Curtis distance algorithm.







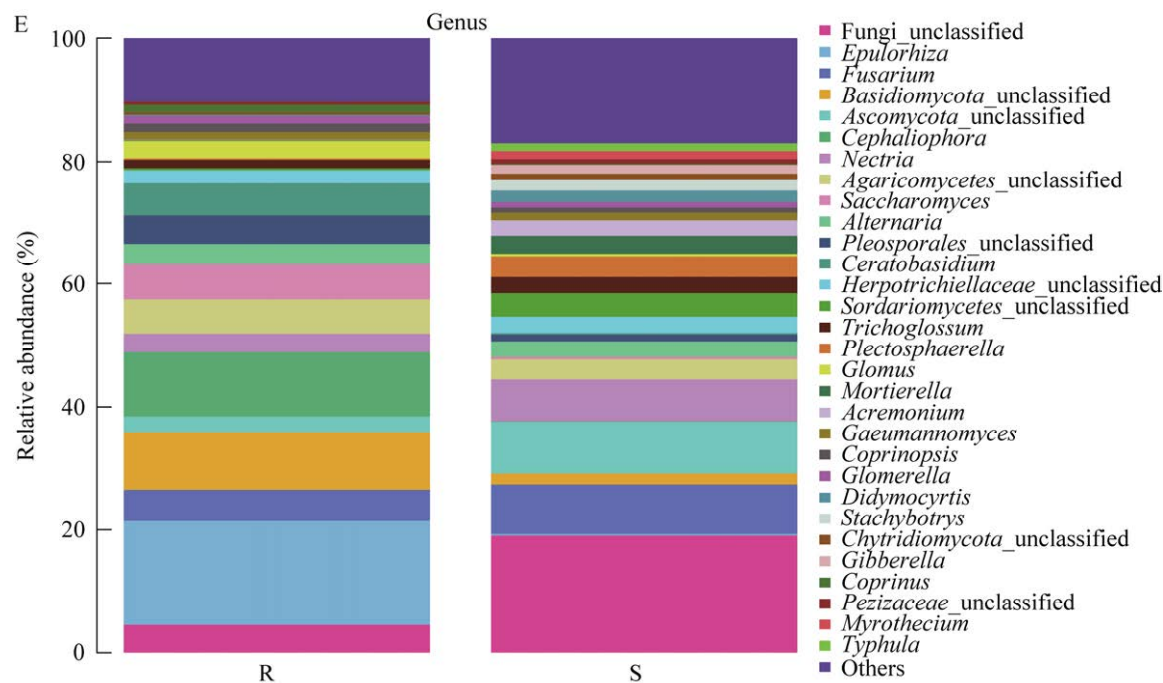


图 3 掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌在不同水平上的柱状图 A: 门水平. B: 纲水平. C: 目水平. D: 科水平. E: 属水平

Figure 3 Relative abundance of endophytic fungi in the root and rhizosphere soil in *Dactylorhiza hatagirea* at different levels. A: Phylum level. B: Class level. C: Order level. D: Family level. E: Genus level.

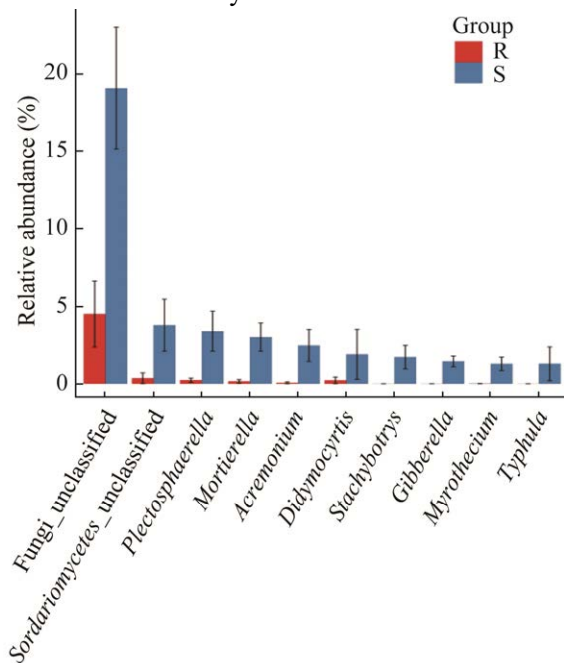


图 4 掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌在属水平上的差异分析图

Figure 4 Analysis of species differences at the genus level between endophytic fungi in the roots and rhizosphere soil of *Dactylorhiza hatagirea*.

裂兰根际土真菌中除了未归的两个物种外，*Plectosphaerella*、被孢霉属(*Mortierella*)、支顶孢属(*Acremonium*)、*Didymocyrtis*、葡萄穗霉属菌(*Stachybotrys*)、赤霉属(*Gibberella*)、漆斑菌属(*Myrothecium*)和核瑚菌属(*Typhula*)等属的丰富度显著高于根部内生真菌中的丰富度。

### 3 讨论与结论

本研究采用高通量测序技术对濒危植物掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌进行了群落结构及多样性分析。结果显示，根际土真菌多样性和丰富度指数均高于根部内生真菌，表明掌裂兰生长的生境需要有极丰富的真菌参与共生。群落组成分析表明掌裂兰根部内生真菌和根际土真菌具有相似性，既有共有菌群又有专属菌群。植物根际土真菌与根在长期的相互作用过程中选择性地进入植物体内成为内生真菌<sup>[14-15]</sup>参与植物生长，表明掌裂兰的生长可能需要特定真菌



类群的参与。本研究中检测到子囊菌门是该植物根部内生真菌和根际土真菌的共有优势菌门,这与兰科其他植物如扇脉杓兰(*Cypripedium japonicum*)、手参(*Gymnadenia conopsea*)等植物的优势菌门一致<sup>[15-17]</sup>。在属水平上,瘤菌根菌属、头梗霉属、酵母属和角担菌属为掌裂兰根部优势菌属。据报道,角担菌属可促进兰科植物种子萌发及原球茎生长<sup>[18-19]</sup>,提示这些优势菌类群对掌裂兰植物生长中可能有重要地位和作用。

药用植物内生真菌是尚未充分利用的微生物资源,具有重大的研究和利用价值<sup>[20]</sup>。对其群落结构及多样性进行分析,进而指导筛选功能性菌株可以更好地实现药用植物资源的可持续利用。兰科植物是典型的菌根植物,在其完整的生活史中都离不开与菌根真菌的密切互作<sup>[21-22]</sup>。本研究在掌裂兰根部样品中检测到角担菌属和瘤菌根菌属等兰科菌根真菌类群。菌根真菌类的分离培养条件尤为重要,例如根部表面消毒剂的浓度、作用时间和培养基的选择等<sup>[23-25]</sup>。高越<sup>[18]</sup>利用单菌丝团法和组织块分离法获得 8 株手参菌根真菌菌株。陈娟等<sup>[26]</sup>将手参样品在 75%乙醇中灭菌 30 s,无菌水冲洗 2 次,再 3%次氯酸钠溶液灭菌 3-5 min 后得到 3 株菌根真菌。田佳妮<sup>[27]</sup>在 70%乙醇中灭菌 30 s,再选用 2% HClO 溶液消毒 7-15 min 后用无菌水冲洗 5 次的条件下分离到 3 株菌根真菌,而王倩<sup>[25]</sup>将样品先 70%酒精消毒 30 s,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 6-8 min,无菌水冲洗 4-6 次,也获得了 2 株不同属的菌根真菌。对植物根部表面进行消毒处理可以提高菌根真菌的分离效率,但消毒剂的作用时间及浓度是菌根真菌分离的重要影响因素;消毒时间短或消毒剂浓度低会导致得到非菌根菌,相反地,消毒时间长或消毒剂浓度高得到的真菌数量会变少。姜喜铃等<sup>[28]</sup>通过 6 种不同培养基对兰科植物原

球茎共生真菌进行分离,发现 MMN 培养基的真菌分离效果最好,其次是 CAM 培养基和 PDA 培养基,表明培养基的选择也是得到适用真菌的重要影响因素。因此,可以从分子手段入手,明确优势菌根真菌,再通过不同分离培养条件获得理想的菌根真菌。

掌裂兰野生资源短缺,加之其自然繁殖率低以及生境被破坏、盗采乱挖等因素导致该植物濒危,因此,利用菌根真菌与植物种子或组织进行人工共培养可能会促进该植物的种子萌发抑或推动兰科濒危植物人工繁育技术的研究,从而为解决资源短缺而遏制中医药发展的瓶颈问题提供重要线索。

## REFERENCES

- [1] 国际中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科技出版社, 1999.  
Editorial Committee of the International Administration of Traditional Chinese Medicine for "Chinese Materia Medica". Chinese Materia Medica[M]. Shanghai: Shanghai Tech University Press, 1999 (in Chinese).
- [2] 吴桂珍, 萨仁格日乐. 简述蒙药材手掌参[J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(15): 7-8.  
WU GZ, SA RGRL. Brief introduction to Mongolian medicinal material *Gymnadenia conopsea*[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2012, 21(15): 7-8 (in Chinese).
- [3] WANI IA, KUMAR V, VERMA S, JAN AT, RATHER IA. *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo: a critically endangered perennial orchid from the North-West Himalayas[J]. Plants (Basel), 2020, 25(12): 1644.
- [4] THAKUR M, THOMPSON D, CONNELLAN P, DESEO MA, MORRIS C, DIXIT VK. Improvement of penile erection, sperm count and seminal fructose levels *in vivo* and nitric oxide release *in vitro* by ayurvedic herbs[J]. Andrologia, 2011, 43(4): 273-277.
- [5] SHRESTHA B, TSIFTSIS S, CHAPAGAIN DJ, KHADKA C, BHATTARAI P, KAYASTHA SHRESTHA N, ALICJA KM, KINDLMANN P. Suitability of habitats in nepal for *Dactylorhiza hatagirea* now and under predicted future changes in climate[J]. Plants (Basel), 2021, 10(3): 467.

- [6] 索南邓登, 陈卫东, 林鹏程. 濒危药用植物掌裂兰 *Dactylorhiza hatagirea* 适宜区划分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(11): 2687-2693.
- SUO NDD, CHEN WD, LIN PC. Analysis of suitable zoning for endangered medicinal plant *Dactylorhiza hatagirea*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(11): 2687-2693 (in Chinese).
- [7] ANCHEEVA E, DALETOS G, PROKSCH P. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi[J]. Current Medicinal Chemistry, 2020, 27(11): 1836-1854.
- [8] CAO D, SUN P, BHOWMICK S, WEI Y, GUO B, WEI Y, MUR LAJ, SUN Z. Secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata*[J]. Fitoterapia, 2021, 155(11): 104970.
- [9] 罗阳兰. 蕙兰内生真菌多样性及其促生能力的研究[D]. 汉中: 陕西理工大学硕士学位论文, 2019.
- LUO YL. Study on the diversity and promoting ability of endophytic fungi in *Cymbidium faberi*[D]. Hanzhong: Master's Thesis of Shaanxi University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [10] 丁锐, 喻芬, 李忠洲, 李萌凯, 陈旭辉, 曲波. 东北地区羊耳蒜根部内生真菌多样性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2016, 47(5): 567-573.
- DING R, YU F, LI ZZ, LI MK, CHEN XH, QU B. Diversity of endophytic fungi in the roots of *Liparis japonica* in Northeast China[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2016, 47(5): 567-573 (in Chinese).
- [11] INNIS MA, DAVID H. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications[M]. New York: American Academic Press, 1990.
- [12] KARLSSON I, FRIBERG H, STEINBERG C, PERSSON P. Fungicide effects on fungal community composition in the wheat phyllosphere[J]. Public Library of Science, 2014, 9(11): e111786.
- [13] CALLAHAN BJ, MCMURDIE PJ, ROSEN MJ, HAN AW, JOHNSON AJA, HOLMES SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature Methods, 2016, 13(7): 581-583.
- [14] BOLDYEN E, RIDEOUT JR, DILLON MR, BOKULICH NA, ABNET CC, AL-GHALITH GA, ALEXANDER H, ALM EJ, ARUMUGAM M, ASNICAR F, BAI Y, BISANZ JE, BITTINGER K, BREJNROD A, BRISLAWN CJ, BROWN CT, CALLAHAN BJ, CARABALLO-RODRÍGUEZ AM, CHASE J, COPE EK, et al. Author correction: reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(9): 1091.
- [15] 郭龙妹. 铁皮石斛内生真菌群落结构的地域性差异及其形成机制研究[D]. 上海: 上海中医药大学硕士学位, 2019.
- GUO LM. Regional differences in the community structure of endophytic fungi in *Dendrobium officinale* and their formation mechanisms[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2019 (in Chinese).
- [16] 尹秀, 禄亚洲, 张二豪, 李连强, 袁芳, 兰小中. 手掌参内生真菌及根际土壤真菌的群落组成[J]. 植物保护学报, 2022, 49(4): 1102-1110.
- YIN X, LU YZ, ZHANG EH, LI LQ, YUAN F, LAN XZ. Community composition of endophytic fungi and rhizosphere soil fungi in *Panax ginseng* *Gymnadenia conopsea*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2022, 49(4): 1102-1110 (in Chinese).
- [17] 周珊. 扇脉杓兰(*Cypripedium japonicum* Thunb.)内生和根际真菌多样性研究[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2020.
- ZHOU S. Diversity of endophytic and rhizosphere fungi in *Cypripedium japonicum* Thunb.[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2020 (in Chinese).
- [18] 高越. 濒危兰科药用植物手参(*Gymnadenia conopsea*)种子的真菌共生萌发研究[D]. 北京: 北京协和医学院硕士学位论文, 2020.
- GAO Y. Fungal symbiotic germination of the endangered orchid medicinal plant *Gymnadenia conopsea* seeds[D]. Beijing: Master's Thesis of Peking Union Medical College, 2020 (in Chinese).
- [19] HERRERA H, VALADARES R, CONTRERAS D, BASHAN Y, ARRIAGADA C. Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal Range and Andes in south central Chile[J]. Mycorrhiza, 2017, 27(3): 175-188.
- [20] 权晨曦, 丁建海. 植物内生真菌二萜活性成分的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(5): 878-891.
- QUAN CX, DING JH. Research progress on diterpenoid active components of endophytic fungi in plants[J]. Natural Product Research and Development, 2021, 33(5): 878-891 (in Chinese).
- [21] BRUNDRETT MC, TEDERSOO L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity[J]. New Phytol, 2018, 220(4): 1108-1115.
- [22] 单婷婷, 陈彤垚, 陈晓梅, 郭顺星, 王爱荣. 菌根真菌与兰科植物氮营养关系的研究进展[J]. 植物生态学报, 2022, 46(5): 516-528.
- SHAN TT, CHEN TY, CHEN XM, GUO SX, WANG AR. Research progress on the relationship between

- mycorrhizal fungi and nitrogen nutrition in orchid plants[J]. Journal of Plant Ecology, 2022, 46(5): 516-528 (in Chinese).
- [23] 张阿伟, 王兰英, 刘诗诗, 骆焱平. 不同分离条件对三叉苦内生真菌的影响[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(7): 101-106.
- ZHANF AW, WANG LY, LIU SS, LUO YP. Effects of different separation conditions on endophytic fungi of *Eudia leptta*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2014, 42(7): 101-106 (in Chinese).
- [24] 陈静, 许贞, 张雪, 李妍芃, 刘春生. 不同产地甘草内生真菌多样性及分离条件研究[J]. 药学报, 2019, 54(2): 373-379.
- CHEN J, XU Z, ZHANG X, LI YP, LIU CS. Diversity and isolation conditions of endophytic fungi of *Glycyrrhiza Urensis* from different regions[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2019, 54(2): 373-379 (in Chinese).
- [25] 王倩. 兰科菌根真菌的分离鉴定及其与中国兰属植物共生关系的研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2010.
- WANG Q. Isolation and identification of orchid mycorrhizal fungi and their symbiotic relationship with Chinese orchid plants[D]. Baoding: Master's Thesis of Agricultural University of Hebei, 2010 (in Chinese).
- [26] 陈娟, 孟志霞, 邢咏梅, 郭顺星. 5 种兰科药用植物可培养内生真菌的鉴定及多样性分析[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(4): 267-271.
- CHEN J, MENG ZX, XING YM, GUO SX. Identification and diversity analysis of cultivable endophytic fungi from five orchid medicinal plants[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2017, 52(4): 267-271 (in Chinese).
- [27] 田佳妮. 几种兰花根际土壤真菌及根内生真菌研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院硕士学位论文, 2016.
- TIAN JN. A Study on several fungi in the rhizosphere soil and endophytic fungi of orchids[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Forestry, 2016 (in Chinese).
- [28] 姜喜铃, 丁万隆, 邢晓科. 不同培养基对兰科药用植物手参原球茎共生真菌的分离效果[J]. 菌物学报, 2022, 41(6): 952-961.
- JIANG XL, DING WL, XING XK. Isolation effect of different media on the protocorm symbiotic fungi of orchid medicinal plant *Gymnadenia conopsea*[J]. Journal of Microbiology, 2022, 41(6): 952-961 (in Chinese).