

霍山石斛菌根真菌多样性及差异性的研究

刘丽^{1,2},陈绍通³,张腾²,李琳²,刘旭宇²,韩邦兴^{2,4*}

¹安徽中医药大学药学院,合肥 230031;²皖西学院生物与制药工程学院,六安 237012;

³华南农业大学,广州 510000;⁴安徽省中药资源保护与持续利用工程实验室,六安 237012

摘要:运用 Illumina MiSeq 高通量测序方法对霍山石斛菌根真菌 ITS1-2 区进行测序,采用 Mothur 分析三种类型的一年生霍山石斛菌根真菌的菌群多样性、差异性及群落结构组成。结果显示,霍山石斛样品中共得到 898 663 条 ITS rRNA 序列,1 928 个 OTUs;三种类型的一年生霍山石斛(I R1、II R1、III R1)菌根真菌的平均 Shannon 指数分别为 2.42、2.79、2.74;菌根真菌多样性丰富,主要包括子囊菌门、担子菌门、毛霉门三个门,其中 5 月份霍山石斛中子囊菌门的丰度最大,担子菌门的丰度最小;LEFSe 分析发现三种类型的一年生霍山石斛菌根真菌有 44 个差异丰富的分类学分支($\alpha = 0.01$,LDA Score ≥ 2.0)。

关键词:霍山石斛;菌根真菌;高通量测序;多样性

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)11-1894-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.11.012

Diversity and difference of mycorrhizal fungi in *Dendrobium huoshanense*

LIU Li^{1,2}, CHEN Shao-tong³, ZHANG Teng², LI Lin², LIU Xu-yu², HAN Bang-xing^{2,4*}

¹College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China;

²College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, China;

³South China Agricultural University, Guangzhou 510000, China; ⁴Anhui Engineering Laboratory of Conservation and Sustainable Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Lu'an 237012, China

Abstract: In order to analyze the diversity and structure of mycorrhizal fungi in three types of *Dendrobium huoshanense*, the ITS 1-2 region of *D. huoshanense* mycorrhizal fungi was sequenced by Illumina MiSeq high-throughput sequencing method and analyzed by mothur. The results showed that 898 663 ITS rRNAs and 1 928 OTUs were obtained from three types of annual *D. huoshanense*. The average Shannon index of mycorrhizal fungi of three types (I R1, II R1 and III R1) were 2.42, 2.79 and 2.74, respectively. Investigations on *D. huoshanense* revealed high richness and diversity of mycorrhizal fungi, mainly including Ascomycota, Basidiomycota and Mucoromycota phylum, among which the abundance of Ascomycota was the highest in May, and that of Basidiomycota was the lowest. LEFSe analysis showed that there were 44 different branches ($\alpha = 0.01$, LDA score ≥ 2.0) among the three types of annual *D. huoshanense* mycorrhizal fungi.

Key words: *Dendrobium huoshanense*; mycorrhizal fungi; high-throughput sequencing; diversity

霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)来源于兰科石斛属,为多年生草本植物,具有增强人体免疫力、抗氧化、修复肝损伤、制止心血管疾病发生等功效^[1-3]。霍山石斛不仅有着极大

的保健医疗价值,而且食用历史悠久;近几年,随着越来越多的人开始关注保健产品,其市场需求量不断增加^[4]。霍山石斛常以三年生入药,不同生长年限的霍山石斛,其药材质量也有所差异。石斛属植物的生长形式是合轴式生长,主轴生长到一定阶段就会停止生长,开始发出侧芽形成新轴,同样到一定阶段后,新轴上继续发出侧芽又形成新轴,依此往复,植物得以不断生长。按照发芽时间的前后将霍山石斛分为三年茎(III Y3)、二年茎(III Y2)、一年茎(III Y1),分别对应根 III R3、III R2 和 III R1;同理,二

收稿日期:2021-04-12 接受日期:2021-09-06

基金项目:国家“十三五”重点研发计划(2017YFC1700701);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系项目(CARS-21);安徽省科技重大专项(202003a07020003);安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术项目(gxbjZD2020083)

*通信作者 Tel:86-5643307060;E-mail:hanbx1978@sina.com

年生的霍山石斛可分为一年茎(ⅡY1),二年茎(ⅡY2),各自对应根ⅡR1和ⅡR2,一年生的霍山石斛为ⅠY1,对应根ⅠR1^[5]。研究发现,微生物对兰科植物的影响不仅关乎种子萌发^[6],还能促进生长发育^[7]及成分积累等^[8]。

迄今为止对石斛菌根真菌的研究一般采用传统培养分离法,已报道的有半知菌门(Deuteromycotina)的丝核菌属(*Rhizoctonia*)、链格孢属(*Alternaria*)^[9,10],子囊菌门(Ascomycota)的毛壳菌属(*Chaetomium*)、炭角菌属(*Xylaria*)、刺盘孢属(*Collenotrichum*)、镰刀菌属(*Fusarium*)^[9,11],担子菌门(Basidiomycota)的胶膜菌属(*Tulasnella*)^[9,12]、小菇属(*Mycena*)、蜡壳菌属(*Sebacina*)和角担菌属(*Ceratobasidium*)^[9,13]等。向石斛属植物接种菌根真菌不仅能够促进植株生长,还具有不同程度的抗旱、抗病以及促进石斛碱和多糖的积累等作用^[14-16]。虽然近几年利用传统培养分离方法对石斛属植物内生

菌的研究较多,但因为微生物培养具有很大的随机性和盲目性,99%的微生物无法分离得到^[17],目前关于一年生霍山石斛菌根真菌的研究尚未见报道。本文运用高通量测序技术以三种类型一年生霍山石斛菌根真菌为研究对象,目的是能够系统了解其群落多样性、差异性及结构组成,为指导霍山石斛合理采收及应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

每隔两个月于皖西学院药用植物园设施栽培基地采集三种一年生类型(ⅠR1、ⅡR1和ⅢR1)霍山石斛样品,方法为五点随机取样法,样品经皖西学院韩邦兴教授鉴定。本实验以1年生霍山石斛的根为研究对象(从不同生长年限的植物丛中分得),ⅢR1取自ⅢY1茎下对应的根,ⅡR1取自ⅡY1茎下对应的根,ⅠR1取自ⅠY1茎下对应的根。具体测序样品信息见表1。

表1 三种类型一年生霍山石斛样品

Table 1 Three types of annual *D. huoshanense* samples

生长年限 Growth year	采集时间 Acquisition time				
	2017.9.28	2017.11.27	2018.1.26	2018.3.29	2018.5.28
I R1	A2-g	A3-g	A4-g	A5-g	A6-g
II R1	B2-g	B3-g	B4-g	B5-g	B6-g
III R1	C2-g	C3-g	C4-g	C5-g	C6-g

1.2 方法

1.2.1 样品消毒处理

将采集的霍山石斛植株用无菌剪刀剪取根,用自来水冲洗干净,置于超净工作台内晾干,样品消毒:置于0.1%升汞中浸泡2~3 min,无菌水漂洗3~4次,再置于75%的乙醇中浸泡3 min,无菌水漂洗5~6次,最后用干燥无菌滤纸擦去表面附着的水分,并将须根两端用无菌剪刀除去,保留中间段。将最后一次冲洗的无菌水均匀涂布于PDA培养基上,28 °C黑暗培养3~7天,观察是否有菌长出,以此验证表面消毒的有效性。

1.2.2 DNA提取、PCR扩增及测序分析

将上述消毒完全的样品,按照OMEGA试剂盒E.Z.N. ATM Mag-Bind Soil DNA Kit说明书的步骤进行DNA提取,并用琼脂糖凝胶检查DNA的提取效果。真菌ITS1-2扩增区域采用通用引物ITS1F和ITS2R进行扩增。反应体系见表2,扩增程序见表3。霍山石斛样品DNA检测合格之后,由上海生

工生物工程股份有限公司利用 Illumina MiSeq™ 平台进行测序。

1.2.3 数据处理及分析

利用QIIME1.8.1对所得到的基因序列进行拼接、过滤、去除嵌合体及非特异性扩增序列,得到各样本高质量序列^[18]。将高质量的序列与数据库中代表性序列进行比对。通过Usearch将所有样本序列根据序列间的距离进行聚类,然后按照97%的相

表2 反应体系

Table 2 Reaction system

试剂 Reagent	体积 Volume
DNA template	10~20 ng
2 * Taq Master Mix	15 μL
ITS1F	1 μL
ITS2R	1 μL
ddH ₂ O	补足至30 μL

表3 扩增程序

Table 3 Amplification procedure

反应阶段 Reaction stage	反应温度 Reaction temperature(℃)	反应时间 Reaction time
预变性 Predegradation	94	3 min
变性 Denaturation	94	30 s(5个循环)
退火 Annealing	45	20 s(5个循环)
延伸 Extend	65	30 s(5个循环)
变性 Denaturation	94	20 s(20个循环)
退火 Annealing	55	20 s(20个循环)
延伸 Extend	72	30 s(20个循环)
延伸 Extend	72	5 min

似性将序列分成不同的操作分类单元(OTU),在此基础上,选择丰度最高的序列作为 OTU 的代表性序列,而后进行各类分析^[19]。使用 R 的 Venn Diagram 包做出 Venn 图,以此统计样本中共有及特有 OTU 的数量;通过 Mothur 计算 Alpha 多样性指数,如 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数及覆盖率(coverage)^[20];采用 Mothur 对相似水平是 97% 的 OTU 进行稀释性分析,检测样品的取样深度。采用 R 对物种分类学统计结果作图,计算样品中所含何种微生物以及各微生物的相对丰度。采用统计学方法进行差异特征发现和显著性检验,LEfSe(linear discriminant analysis effect size,线性判别分析及影响因子)通过将统计显著性的标准检验与编码生物一致性和效应相关性的附加检验相结合,确定最能解释组间差异的基因^[21]。

2 结果

2.1 物种组成(OTU)分析

对真菌 ITS1-2 区域进行高通量测序,共得到 898 663 条高质量序列,基于≥97% 的相似度水平,通过聚类分析共获得 1 928 个有效 OTUs(见图 1),

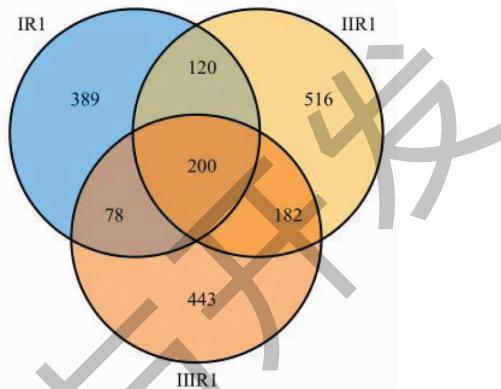


图 1 霍山石斛菌根真菌物种(OTUs)组成 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of species composition of mycorrhizal fungi (OTUs) of *D. huoshanense*

其中 I R1 中有 787 个 OTUs, II R1 中有 1 018 个 OTUs, III R1 中有 903 个 OTUs, 200 个 OTUs 共同存在于三组。I R1 中特有 389 个 OTUs, II R1 特有 516 个 OTUs, III R1 中特有 443 个 OTUs。随着 15 个霍山石斛根部样品的序列数不断增加,其稀释性曲线越来越趋于平缓,说明即使继续增加取样量也只能产生极少量新的 OTU(见图 2),说明取样量合理,能够比较准确地反映霍山石斛菌根真菌群落。

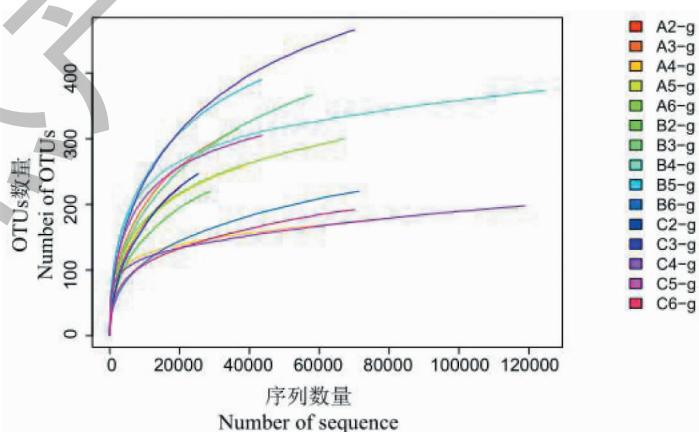


图 2 样品真菌测序的稀释曲线

Fig. 2 Dilution curve of fungal sequencing

2.2 多样性指数分析

三组样品的 Alpha 多样性指数如表 4 所示。用 Shannon 指数量化微生物群落多样性。II R1、III R1、

I R1 组的平均 Shannon 指数分别为 2.79、2.74、2.42, II R1 > III R1 > I R1。用 Chao1 算法评估物种丰富度大小。I R1、II R1、III R1 三组群落分布丰度

的 Chao1 指数分别为 320.7、394.27、365.81; 同样, II R1 的菌根真菌丰富度最大, I R1 最小。霍山石斛各样品的 coverage 值达到 1.00, 表明该测序结果能够代表样本的真实情况。Alpha 多样性评价箱式图评估了三组样本的离散及分布情况(见图 3), Shannon 指数的箱式图表明三组样品的菌落的均匀度基本一致($P > 0.05$), Chao1 指数的箱式图表明三

组样品的物种丰富度基本一致($P > 0.05$)。

2.3 群落组分分析

基于 OTUs 聚类分析得到 9 个门, 30 个纲, 71 个目, 149 个科, 244 个属。在门水平, 霍山石斛根真菌主要集中在子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和毛霉门(Mucoromycota)三个门, 占霍山石斛菌根真菌总量的 90% 左右(见表 5); 同

表 4 菌根真菌的 Alpha 多样性指数表
Table 4 Alpha diversity index of mycorrhizal fungi

生长年限 Growth year	样品 Sample	Shannon	ACE	Chao1	Simpson	覆盖率 Coverage
I R1	A2-g	1.97	324.99	324.68	0.34	1.00
	A3-g	2.79	407.38	378.16	0.18	1.00
	A4-g	1.56	257.73	211.06	0.54	1.00
	A5-g	2.76	305.95	288.20	0.13	1.00
	A6-g	3.02	370.36	398.28	0.09	1.00
II R1	B2-g	2.35	296.29	291.09	0.18	1.00
	B3-g	2.74	495.77	460.06	0.14	1.00
	B4-g	3.35	430.85	450.54	0.08	1.00
	B5-g	3.54	484.10	469.52	0.06	1.00
	B6-g	1.99	304.64	300.16	0.24	1.00
III R1	C2-g	2.51	418.16	342.23	0.14	1.00
	C3-g	2.89	585.51	599.10	0.14	1.00
	C4-g	3.28	371.39	304.07	0.10	1.00
	C5-g	2.85	344.37	349.68	0.13	1.00
	C6-g	2.16	248.32	234.00	0.20	1.00

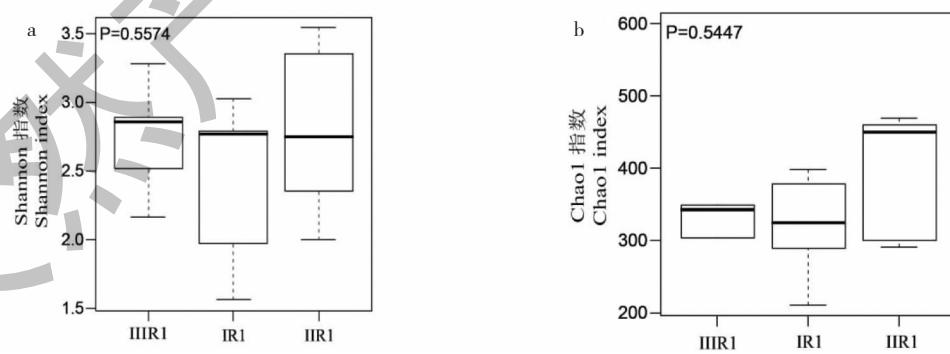


图 3 Alpha 多样性评价菌根真菌群

Fig. 3 Alpha diversity evaluation of mycorrhizal fungi flora

注:a:Shannon 指数多样性;b:Chao1 指数多样性。Note:a:Shannon index diversity;b:Chao1 index diversity

时 5 月份的三个样品 A6、B6、C6 中子囊菌门的丰度最大, 担子菌门的丰度最小; 9 月份的两个样品 A2、C2 中担子菌门的丰度最大, 子囊菌门的丰度最小。在属水平, unclassified Serendipitaceae、unclassified

Auriculariales、Zymoseptoria、unclassified Pleosporales、Fusarium、unclassified Agaricomycetes 在三种类型一年生霍山石斛菌根真菌中占优势(见表 6)。unclassified Serendipitaceae 在 I R1 中丰度最大($>45\%$),

在Ⅲ R1 中丰度最小(<5%), 相反 *Fusarium* 在 I R1 中丰度最小(<5%), 在Ⅲ R1 中丰度最大(>20%); *Zymoseptoria* 在Ⅱ R1 中丰度最大(>10%), 而在 I R1、Ⅲ R1 上均小于5%。

表5 门水平各样品菌群丰度

Table 5 Abundance of fungus in each sample at phylum level (%)

门水平 Phylum level	A2-g	A3-g	A4-g	A5-g	A6-g	B2-g	B3-g	B4-g	B5-g	B6-g	C2-g	C3-g	C4-g	C5-g	C6-g
Ascomycota	18.20	34.40	17.20	63.21	71.92	62.38	54.97	58.55	54.02	92.44	32.14	41.68	76.99	55.69	97.07
Basidiomycota	78.41	54.28	80.88	34.83	22.65	33.24	41.68	36.83	38.31	5.55	66.31	54.00	14.65	36.89	1.98
Chytridiomycota	0	0.01	0.03	0.01	0.01	0	0	0.02	0.01	0.01	0	0.10	0	0.08	0
Mortierellomycota	0.03	0.03	0	0.03	0	0.01	0	0	0.37	0	0	0.01	0	0.10	0
Mucoromycota	0.02	0.01	0	0	0.01	0.14	0.01	0.07	0.39	0	0.06	0.04	0.01	0.01	0
Other	3.33	11.26	1.87	1.87	5.40	4.23	3.31	3.81	6.32	1.94	1.39	4.11	8.35	7.12	0.94

表6 属水平各组样品菌群丰度

Table 6 Abundance of fungus in each group of the genus level (%)

属水平 Genus level	I R1	II R1	III R1
Unclassified Agaricomycetes	2.11	6.98	1.71
Unclassified Auriculariales	0.53	4.65	6.67
<i>Fusarium</i>	4.06	16.42	21.59
Unclassified Pleosporales	4.93	7.70	7.62
Unclassified Serendipitaceae	47.90	10.91	3.57
<i>Zymoseptoria</i>	0.63	12.08	4.06%
其他 Other	39.84	41.26	54.78

2.4 菌群差异分析

应用 LEfSe 对三种类型一年生的霍山石斛样品的菌根真菌进行分析,发现44个差异丰富的分类学分支($\alpha = 0.01$, LDA score ≥ 2.0) (见图4)。在属水平(见图4a), I R1 组的拟棘壳孢属(*Pyrenopeziza*)、青霉菌属(*Penicillium*)与其他两组存在显著差异,且在该组丰度最高; II R1 组刺球菌属(*Chaetosphaeria*)、柱霉属(*Scytalidium*)、鞘孢属(*Chalara*)、*Zymoseptoria*、红酵母属(*Rhodotorula*)、*Kockovaella* 与其他两组存在明显丰度差异; III R1 组 *Zasmidium*、unclassified Stachybotryaceae、阿太菌属(*Athelia*)、糙孢菌属(*Trechispora*)与其他两组存在明显丰度差异。

3 讨论与结论

植物根系微生物不仅能够通过调控基因表达来促进化学成分合成^[22],还可以增加次生代谢产物的积累^[23]。近年来对石斛属植物根系微生物研究普

遍,如石斛属植物菌根真菌的特异性与寄主植物系统发育的关系^[24],研究发现石斛属植物铁皮石斛的根中广泛分布子囊菌门、担子菌门真菌^[25,26]等。由于微生物培养的方法研究内生菌存在局限性,本文采用高通量测序技术发现霍山石斛根部内生真菌丰富多样,子囊菌门、担子菌门为霍山石斛根部内生真菌的主要真菌门,I R1、II R1、III R1 有各自的优势菌,与子囊菌门、担子菌门在丹参、石斛属等药用植物内生真菌中也占主导地位报道基本一致^[27,28]。通过 Alpha 多样性分析发现三组样品不管是在物种丰富度还是群落多样性比较上均无显著差异。而 LEfSe 进行组间内生真菌菌群差异分析发现, I R1 组有3个科与其他两组存在显著差异,且在该组丰度最高; II R1 组有5个科与其他两组存在明显丰度差异; III R1 组有4个科与其他两组存在明显丰度差异。

已有研究表明,中药茅苍术夏季的菌根内生真

菌多样性高于春季和秋季^[29]。本研究也对不同季节的霍山石斛根部内生真菌进行了考察,发现5月份霍山石斛根中子囊菌门的丰度最大,担子菌门的丰度最小,9月份担子菌门的丰度最大,子囊菌门的丰度最小,说明季节可能是影响霍山石斛菌根真菌

群落结构的重要因素。在后续研究中,拟将石斛根际微生物结合化学成分,重点研究根系微生物对霍山石斛有效成分的影响,为提高霍山石斛品质、开发菌肥提供科学依据等。

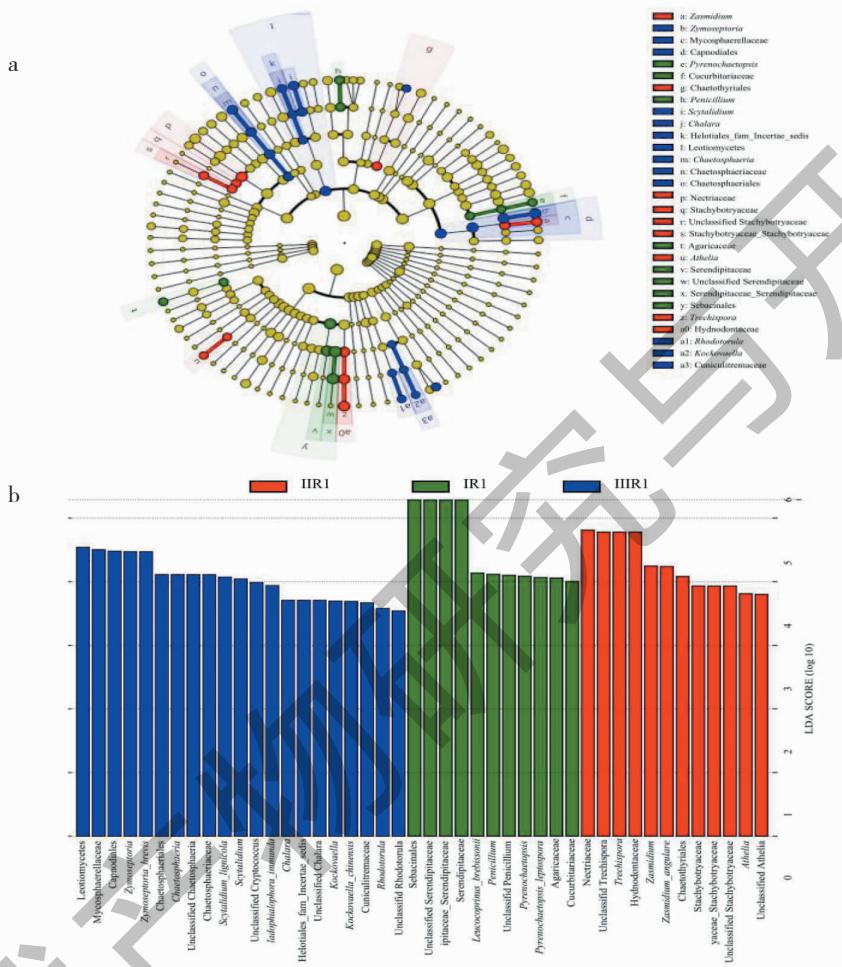


图4 三种类型一年生霍山石斛菌根真菌的LEfSe结果

Fig. 4 LEfSe results of three types of mycorrhizal fungi of *D. huoshanensis*

综上所述,本研究应用 Illumina MiSeq 高通量测序方法对霍山石斛菌根真菌 ITS1-2 区进行测序,得到 898 663 条 ITS rRNA 序列,1 928 个 OTUs,基于 OTU 聚类分析得到 9 个门,30 个纲,71 个目,149 个科,244 个属,其中子囊菌门、担子菌门和毛霉门为霍山石斛根部内生真菌的主要真菌门,在 5 月份子囊菌门的丰度最大,担子菌门的丰度最小;LEfSe 分析发现三种类型一年生霍山石斛菌根真菌有 44 个差异丰富的分类学分支($\alpha = 0.01$, LDA score ≥ 2.0);通过 Alpha 多样性分析发现无论是物种组成还是多样性方面,均是 II R1 > III R1 > I R1,但是 Al-

pha 多样性评价箱式图反映了三组并无显著差异。

参考文献

- Chen ND, Jia XY, Cheng QB, et al. Comparative pharmacognostical investigation of *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium henanense* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28: 1060-1065.
- Wang CS, Wang K, Meng X, et al. Effects of *Dendrobium huoshanense* on expressions and activities of hepatic microsomal cytochrome P450s in mice [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2018, 43: 4323-4329.
- Xu HJ, Fang Y, Wang JT, et al. Bidirectional immune adjust-

- ment of *Dendrobium huoshanense* polysaccharides in mice [J]. *Immunol J*(免疫学杂志), 2018, 34:731-736.
- 4 Jin YY, Fang CW, Yang QQ, et al. Investigation on wild resources of *Dendrobium officinale* distribution and ecological environment in Anhui[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2013, 3:4024-4027.
- 5 Chen ST, Dai J, Jiang XP, et al. Diversity and difference of endophytes in *Dendrobium huoshanense* with different growth years[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44:1145-1150.
- 6 Selosse M, Boullard B, Richardson D, Noël Bernard: Orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago[J]. *Symbiosis*, 2011, 54(2):61-68.
- 7 Logares R, Sunagawa S, Salazar G, et al. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities[J]. *Environ Microbiol*, 2014, 16:2659-2671.
- 8 Zhu B, Liu JJ, Si JP, et al. Effects of endophytic fungi from *Dendrobium officinale* on host growth and components metabolism of tissue culture seedlings[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2016, 41:1602-1607.
- 9 Wei JC. *Handbook of fungal identification(真菌鉴定手册)* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979:101-645.
- 10 Yang HT. Screening and functional characterization of endophytic mycorrhizal fungus in *Dendrobium officinale*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (南京农业大学), 2015.
- 11 Hu KX. Studies on the diversity of endophytic fungi from medicinal plants in *Dendrobium* [D]. Beijing: Peking Union Medical College (中国协和医科大学), 2008.
- 12 Wang YN, Wang LK, Miao ZB, et al. Endophytic fungi diversity in root of *Dendrobium fimbiratum* (Orchidaceae) [J]. *Ecol Sci(生态科学)*, 2014, 33:672-679.
- 13 Guo SX, Fan L, Cao X. *Mycena dendrobii*, a new mycorrhizal fungus[J]. *Mycosistema*, 1999, 18:141-144.
- 14 Xu C, Zhang HY, Yang HT, et al. Screening of excellent mycorrhizal fungi from *Dendrobium candidum* [J]. *Jiangsu Agr Sci(江苏农业科学)*, 2017, 45(24):108-110.
- 15 Xu C, Zhang HY, Liu GH, et al. The effect and disease-resistant mechanism of mycorrhizal fungus on *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. *J West China For Sci(西部林业科学)*, 2017, 46(3):1-5.
- 16 Yan HL, Chen XM, Liao FH, et al. Effects of mycorrhizal fungi on the growth and dendrobine and polysaccharide accumulation of *Dendrobium nobile* Lindl seedlings[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2016, 51:1450-1454.
- 17 Wang HY, Kang CZ, Wang S, et al. Research strategies for endophytes in medicinal plants based on high-throughput sequencing and traditional culture and isolation methods[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2021, 46:1910-1919.
- 18 Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nat Methods*, 2010, 7:335-336.
- 19 Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75:7537-7541.
- 20 Pielou EC. The measurement of diversity in different types of biological collection[J]. *J Theor Biol*, 1967, 15(1):177.
- 21 Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome Biol*, 2011, 12(6):R60.
- 22 Pandey SS, Singh S, Babu CSV, et al. Fungal endophytes of *Catharanthus roseus* enhance vindoline content by modulating structural and regulatory genes related to terpenoid indole alkaloid biosynthesis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:26583-26596.
- 23 Dupont PY, Eaton CJ, Wargent JJ, et al. Fungal endophyte infection of ryegrass reprograms host metabolism and alters development[J]. *New Phytol*, 2015, 208:1227-1240.
- 24 Xing XK, Ma XT, Men JX, et al. Phylogenetic constrains on mycorrhizal specificity in eight *Dendrobium* (Orchidaceae) species[J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60:536-544.
- 25 Guo SX, Cao WQ, Gao WW. Isolation and biological activity of mycorrhizal fungi from *Dendrobium candidum* and *D. nobile*[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2000, 25(6):18-21.
- 26 Chen J, Meng ZX, Xing YM, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from five medicinal plants species of Orchidaceae[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2017, 52(4):267-271.
- 27 Chen H, Wu H, Yan B, et al. Core microbiome of medicinal plant salvia miltiorrhiza seed: a rich reservoir of beneficial microbes for secondary metabolism[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19:672-686.
- 28 Xing XK, Ma XT, Deng ZH, et al. Specificity and preference of mycorrhizal associations in two species of the genus *Dendrobium* (Orchidaceae)[J]. *Mycorrhiza*, 2013, 23:317-324.
- 29 Lv LX, Wang HW, Liang XF, et al. Effects of different chemotypes and seasonal dynamic variation on the species diversity of endophytic fungal communities harbored in *Atractylodes lancea*[J]. *Acta Ecol Sin(生态学报)*, 2014, 34:7300-7310.