

热带苹果榕雌雄隐头果内生真菌物种多样性及其对比研究*

张建春¹, 杨大荣², 陈吉岳^{2**}, 李 玉^{1**}

(1. 吉林农业大学, 食药菌教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118;

2. 中国科学院 热带森林生态学重点实验室, 中国科学院 西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223)

摘要: 2009~2010 年对西双版纳热带植物园内的苹果榕 (*Ficus oligodon*) 雄树和雌树分别在小蜂侵入前后进行内生真菌的分离与鉴定。初步鉴定结果表明, 小蜂侵入前后, 苹果榕雌雄树上分离到的内生真菌种类基本相同, 有 10 属 565 株。优势菌株变化很小, 均属于镰刀菌属 (*Fusarium*)、青霉菌属 (*Penicillium*)、小丛壳属 (*Glomerella*) 和刺盘孢属 (*Colletotrichum*)。4 属真菌在雄树和雌树中分别占总真菌数的 37.55% 和 33.55%, 18.39% 和 19.74%, 13.03% 和 12.50%, 10.34% 和 12.50%, 其它真菌所占比例均未超过 10%, 属于偶见类群。此外, *Aspergillus* sp. 只在雄果里分离到, 而 *Cephalosporium* sp. 和 *Trametes* sp. 仅在雌果中分离到。这可能是由于环境不同或者进入榕果内不同小蜂的身上所带菌株不同, 小蜂侵入榕果后, 携带真菌在榕果内发育并在榕果内定植, 从而导致真菌种类的不同。

关键词: 苹果榕; 隐头果; 内生真菌; 物种多样性

中图分类号: S 718.81 文献标识码: A 文章编号: 1004–390X (2011) 03–0298–05

Studies on the Species Diversity and Their Comparison of Endophytic Fungi from Female and Male Syconia of Tropical *Ficus oligodon*

ZHANG Jian-chun¹, YANG Da-rong², CHEN Ji-yue², LI Yu¹

(1. Engineering Research Center of Chinese Minister of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: A study on the isolation and identification of the endophytic fungi in the male and female trees of *Ficus oligodon* was carried on before and after the fig wasps invaded the figs at XTBG during 2009~2010. The preliminary results indicated that: the endophytic fungous species separated from the male and female trees were almost the same taxa, with 10 genus 565 species. The dominant fungi were *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Glomerella* sp. and *Colletotrichum* sp.. The proportion of the four genera of fungi were 37.55% and 33.55%, 18.39% and 19.74%, 13.03% and 12.50%, 10.34% and 12.50% in the male and female trees respectively. Other fungi did not exceed 10%. In

收稿日期: 2010–12–12 修回日期: 2011–03–14 网络出版时间: 2011–05–13 10:25

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000243); 云南省自然科学基金项目 (2007C105M); 中国科学院“西部之光”西部博士项目。

作者简介: 张建春 (1985–), 男, 云南省红河州人, 在读硕士研究生, 主要从事内生真菌方面研究。
E-mail: zjcyn@hotmail.com

** 通讯作者 Corresponding authors: 陈吉岳 (1975–), 男, 甘肃古浪人, 副研究员, 主要从事热带植物内生真菌、虫生真菌及大型真菌研究。E-mail: chenjiy@xtbg.ac.cn; 李玉 (1944–), 男, 山东济南人, 中国工程院院士, 教授, 博士生导师, 主要从事真菌学及植物病理学研究。E-mail: yuli966@126.com

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20110513.1025.201103.298_164.html

addition, *Aspergillus* sp. was only found in male figs and *Cephalosporium* sp. and *Trametes* sp only in female figs. This probably resulted from different environments or different spores carried by different fig wasps. The spores carried by fig wasps developed into distinctive fungi in the figs after the fig wasps invaded the figs.

Key words: *Ficus oligodon*; syconium; endophytic fungi; species diversity

内生真菌是一类生活于健康植物组织内, 不引起明显植物病害症状的真菌^[1-4]。内生真菌在植物中普遍存在, 几乎所有的高等植物中都能分离到内生真菌^[5-7]。在叶、叶柄、果实、刺、种子、树皮和枝条中均有分布, 并具有丰富的生物多样性^[3,8]。内生真菌的研究虽已有 100 多年的历史, 但是在 20 世纪 80 年代初才被重视起来, 且大多数研究工作集中于温带地区和亚热带地区的一些具有重要经济价值的植物体上, 近 10 年才有少数研究工作在热带地区植物展开^[9]。

国内外有关榕树内生真菌的研究目前还处于起步阶段, 仅见有对无花果 (*Ficus carica*) 根、茎、叶内生真菌进行分离与鉴定的研究报道^[10-11]; 也有对无花果叶内生真菌的分离鉴定和抗菌活性的研究^[12]; 曾有对泰国北部无花果落叶真菌的多样性研究的报道及对孟加拉榕 (*Ficus benghalensis*) 根际内生真菌的研究^[13-15], 对于榕树隐头果内生真菌的研究尚属空白。苹果榕 (*Ficus oligodon*) 隶属于荨麻目 (Urticales), 桑科 (Moraceae), 榕属 (*Ficus*) 大果榕亚组 (*Neomorphe*), 是一种生于热带比较阴暗生境的高大乔木, 为雌雄异株植物, 是热带雨林常见的先锋建群树种, 在西双版纳地区具有广泛分布^[16]。本研究选取苹果榕隐头果作为研究对象, 通过分离、培养蜂侵前和蜂侵后两个不同发育阶段对榕树隐头果内生真菌, 并利用形态学的方法进行真菌种类鉴定, 对不产孢类群和个别形态方法无法鉴定的菌株采用分子生物学方法鉴定, 同时, 探讨了寄生在榕树隐头果内的内生真菌是否具有寄主专一性及其物种多样性。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料取自中国科学院西双版纳热带植物园 (21°08' ~ 22°35' N, 99°56' ~ 101°50' E) 内, 选择苹果榕 (*Ficus oligodon*) 雌树和雄树各 2 ~ 3 棵作为样树, 目测都较为健康的叶片和果实, 于

2009 年 12 月 4 日, 2010 年 1 月 7 日和 2010 年 3 月 13 日分别在榕树园和热带雨林采集试验用果, 每批次试验所用雄树和雌树果实均健康果实, 且试验用果数量均大于 50 个, 榕树园苹果榕树龄为 20 年左右, 热带雨林苹果榕树龄为 60 年左右。

1.2 培养基

分离用培养基为 PDA 培养基和查氏培养基。

PDA 培养基 (1 000 mL): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

查氏培养基 (1 000 mL): 硝酸钠 2 g, 磷酸氢二钾 1 g, 氯化钾 0.5 g, 硫酸镁 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

1.3 方法

在选择好的样树上采集小蜂侵入前侵入后的健康自然榕果带回实验室, 供试榕果在 4 h 内处理完毕。先对样品进行预处理, 用肥皂水刷洗榕果, 再用流水冲洗去覆在表面的肥皂水, 无菌水洗 3 ~ 4 次。然后用棉球蘸 75% 乙醇溶液擦拭榕果表面, 进行预先表面消毒^[17]。再对榕果进行彻底的表面杀菌消毒: 75% 乙醇溶液浸泡 1 min, 用无菌水冲洗 2 ~ 3 次, 用 2.5% 次氯酸钠浸泡 4 ~ 5 min, 再用 75% 乙醇溶液浸泡 1 min, 无菌水冲洗 2 ~ 3 次, 晾干后水备用。

接着进行内生真菌的分离, 在超净工作台上用灭菌解剖刀剖开榕果, 用灭菌解剖刀去除榕果内壁, 取榕果的果肉接种于 PDA 和查氏培养基上平板上, 每个组织块大小为 0.5 cm × 0.5 cm。每个培养皿 (直径 90 mm) 分离 4 ~ 5 块组织块, 接种完后用封口膜进行封口。用冲洗榕果的水均匀地涂在培养基上面, 并且封口保存培养, 作为对照, 如果对照无真菌长出则认为榕果表面消毒彻底。把培养组织块的培养皿和对照的培养皿置于 28 °C 恒温培养箱内培养 3 ~ 4 d 后, 观察培养皿中组织块切口处是否长出菌丝 (菌落), 用无菌解剖刀或者接种针挑取组织块周围菌落转接到 PDA 和查氏平面培养基上进行多次纯化, 并且对

纯化的各个菌株进行记录, 拍照, 转接到试管中进行编号, 冷藏保存。

1.4 菌株的鉴定

首先仔细观察记载菌落的形态、颜色等宏观特征, 比对研究记载鉴别特征; 之后从纯化数天的菌落上挑取菌丝并连同孢子制成玻片, 置于光学显微镜下观察菌丝的形态、孢子梗形态、孢子形态以及孢子与营养体之间的着生方式, 参照相关资料进行鉴定^[18-19], 对不产孢菌落进行人工诱导产孢。对诱导仍不产孢的菌落进行分子技术鉴定。

1.4.1 DNA 提取方法

采用 CTAB 法进行 DNA 的提取^[17-20]。

1.4.2 rDNA ITS 区段的 PCR 扩增

ITS 区的扩增和测序采用 ITS4 和 ITS5, 为真菌通用引物。采用 PCR 仪扩增 ITS 基因时, 循环参数为: 94 ℃ 预变性 5 min 之后 94 ℃ 30 s → 52 ℃ 40 s → 72 ℃ 60 s, 72 ℃ 下延伸补齐 7 min, 30 ~ 35 个循环, 反应液总体积为 50 μL。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 0.5 × TBE 的电泳缓冲液, GoldView (GV) 染色后, 紫外成像系统观察并照相。^[17-21-22]

经电泳检测后, 将条带清晰的 PCR 产物进行序列测定, 采用引物 ITS4 和 ITS5 双向测定, 序列长度为 600 bp 左右^[23], 用 BioEdit 软件拼接成完整的序列。然后将拼接好的序列片段输入美国国立生物技术信息中心网 (NCBI) 中, 与 Genebank 中已经登录的序列进行 Blast 比对, 按相似性的高低初步鉴定供试菌株 (表 1)。

表 1 苹果榕不同内生真菌的 Genbank number 和 Genbank ID

Tab. 1 The Genbank number and Genbank ID of endophytic fungi in *Ficus oligodon*

菌株 fungi	Genbank number	Genbank ID
<i>Fusarium</i> sp.	EF488403.1	134305005
<i>Penicillium</i> sp.	HM366545.1	306021758
<i>Glomerella</i> sp.	EF488442.1	134305045
<i>Colletotrichum</i> sp.	GU066703.1	283856821
<i>Paecilomyces</i> sp.	hm242264.1	300498390
<i>Sporothrix</i> sp.	EU363038.1	164665017
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	HM855219.1	304334047
<i>Aspergillus</i> sp.	HM535366.1	312205539
<i>Cephalosporium</i> sp.	AJ292405.1	13160376
<i>Trametes</i> sp.	DQ979682.1	117573948

2 结果与分析

(1) 苹果榕雄树小蜂侵入前共分离得到 123 株真菌, 归属于 8 个属, 其中镰刀菌属 (*Fusarium*) (48 株), 青霉属 (*Penicillium*) (21 株), 小丛壳属 (*Glomerella*) (17 株), 刺盘孢属 (*Colletotrichum*) (13 株), 分别占分离真菌数的 39.02%, 17.07%, 13.83 和 10.57%。苹果榕雄树小蜂侵入后共分离获得 138 株真菌, 归属于 8 个属, 其中 4 属为常见类群, 它们是镰刀菌属 (*Fusarium*) (50 株), 青霉属 (*Penicillium*) (27 株), 小丛壳属 (*Glomerella*) (17 株), 刺盘孢属 (*Colletotrichum*) (14 株), 分别占分离真菌数的 36.23%, 19.57%, 12.32 和 10.14% (表 2)。

表 2 不同时期苹果榕雄树隐头果内生真菌的比较

Tab. 2 Comparison of the endophytic fungi from the male trees of *F. oligodon* at different stages

菌株 fungi	蜂侵前 数量	所占比 例/ %	蜂侵后 数量	所占比 例/ %
	before invasion	percentage	after invasion	percentage
<i>Fusarium</i> sp.	48	39.02	50	36.23
<i>Penicillium</i> sp.	21	17.07	27	19.57
<i>Glomerella</i> sp.	17	13.82	17	12.32
<i>Colletotrichum</i> sp.	13	10.57	14	10.14
<i>Paecilomyces</i> sp.	8	6.50	8	5.80
<i>Sporothrix</i> sp.	7	5.69	12	8.70
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	5	4.07	5	3.62
<i>Aspergillus</i> sp.	4	3.25	5	3.62

苹果榕雄树隐头果小蜂侵入前后内生真菌类群均主要是镰刀菌属 (*Fusarium* sp.)、青霉菌属 (*Penicillium* sp.)、小丛壳属 (*Glomerella* sp.) 和刺盘孢属 (*Colletotrichum* sp.), 所占比例均在 10% 以上。小蜂侵入后青霉菌属 (*Penicillium* sp.)、孢子丝菌属 (*Sporothrix* sp.)、和子囊菌纲 (*Ascomycetes*) 比小蜂侵入前所占比例有所增加, 其他种类菌株所占比例变化较小。

(2) 苹果榕雌树小蜂侵入前分离到 152 株真菌, 归属于 8 个属, 其中镰刀菌属 (*Fusarium*)、青霉菌属 (*Penicillium*) 和小丛壳属 (*Glomerella*) 为优势菌, 分别占总真菌总数量的 34.87%, 17.76% 和 13.16%。小蜂侵入后共分离到 152 株真菌, 归属于 9 个属, 镰刀菌属 (*Fusarium*)、青霉菌属 (*Penicillium*) 和刺盘孢属 (*Colletotri-*

chum) 真菌为优势种群, 分别占总真菌总数的 32.24%, 21.71% 和 13.16% (表 3)。

表 3 不同时期苹果榕雌树隐头果内生真菌的比较

Tab. 3 Comparison of the endophytic fungi from the female trees of *F. oligodon* at different stages

菌株 fungi	蜂侵前 数量 before invasion	所占比 例/ % percentage	蜂侵后 数量 after invasion	所占比 例/ % percentage
<i>Fusarium</i> sp.	53	34.87	49	32.24
<i>Penicillium</i> sp.	27	17.76	33	21.71
<i>Glomerella</i> sp.	20	13.16	18	11.84
<i>Colletotrichum</i> sp.	18	11.84	20	13.16
<i>Paecilomyces</i> sp.	11	7.24	14	9.21
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	9	5.92	8	5.26
<i>Sporothrix</i> sp.	7	4.61	6	3.95
<i>Cephalosporium</i> sp.	7	4.61	3	1.97
<i>Trametes</i> sp.	0	0.00	1	0.66

苹果榕雌树隐头果小蜂侵前后镰刀菌属和青霉属种类总是占优势之外, 稍有变化, 小蜂侵入前小丛壳属 (*Glomerella* sp.) 居多, 小蜂侵入后刺盘孢属 (*Colletotrichum* sp.) 居多; 但是总体上, 镰刀菌属 (*Fusarium* sp.)、青霉菌属 (*Penicillium* sp.)、小丛壳属 (*Glomerella* sp.) 和刺盘孢属 (*Colletotrichum* sp.) 依然是优势种类。小蜂侵入后头孢霉属 (*Cephalosporium* sp.) 所占比例下降明显, 并且分离得到一株形态和分子手段目前尚无法鉴定的真菌。其他菌株变化不大。

2.3 雄树和雌树分离到内生真菌的比较

对苹果榕雄树和雌树所分离获得内生真菌进行分析, 所得结果和单个的雄树或者雌树分析的结果无明显差异, 镰刀菌属 (*Fusarium* sp.)、青霉菌属 (*Penicillium* sp.)、小丛壳属 (*Glomerella* sp.) 和刺盘孢属 (*Colletotrichum* sp.), 仍然为优势种群。两者的差别在于: 从雄树中分离到 9 株子囊菌菌株, 而雌树中没有分离得到; 在雌树中分离得到 10 株头孢霉属 (*Cephalosporium* sp.) 菌株和一株目前尚无法鉴定的菌株, 而雄树中没有获得 (表 4)。

3 讨论

在苹果榕隐头果内, 共分离得到 565 株真菌, 经鉴定为 10 个属, 表明榕树隐头果内生真菌具有较丰富的物种多样性, 其中镰刀菌属 (*Fusarium*

sp.)、青霉菌属 (*Penicillium* sp.)、小丛壳属 (*Glomerella* sp.) 和刺盘孢属 (*Colletotrichum* sp.) 为优势菌群, 且普遍存在于苹果榕隐头果内。此外, *Aspergillus* sp. 只分布于雄果; *Cephalosporium* sp. 和 *Trametes* sp. 仅在雌果中分离到。

表 4 苹果榕雄树和雌树内生真菌的比较

Tab. 4 Comparison of the endophytic fungi between the male and female trees of *F. oligodon*

菌株 fungi	雄树 male		雌树 female	
	菌株数 umber	所占比 例/ %	菌株数 number	所占比 例/ %
		percentage		percentage
<i>Fusarium</i> sp.	98	37.55	102	33.55
<i>Penicillium</i> sp.	48	18.39	60	19.74
<i>Glomerella</i> sp.	34	13.03	38	12.50
<i>Colletotrichum</i> sp.	27	10.34	38	12.50
<i>Paecilomyces</i> sp.	16	6.13	25	8.22
<i>Sporothrix</i> sp.	19	7.28	13	4.28
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	10	3.83	17	5.59
<i>Aspergillus</i> sp.	9	3.45	—	—
<i>Cephalosporium</i> sp.	—	—	10	3.29
<i>Trametes</i> sp.	—	—	1	0.33

小蜂侵入前后雄树和雌树的真菌群落基本上相同, 所占比例有一定的变动, 但变化不大, 且优势菌群的变化更小, 说明榕小蜂的侵入对苹果榕隐头果中内生真菌的群落影响不大, 没有引起内生真菌质的变化。可见在植物体内环境中, 不同的微生物相互作用, 并建立一种平衡, 在植物体内形成一种相对稳定的真菌群落, 其中一部分属于优势种群, 分离频率高, 相对稳定; 而另一部分则属于稀有种群, 当样本数量不够大的时候有可能会遗漏部分分离频率小的稀有真菌^[24-25]。

雄树和雌树分离得到的真菌群落基本相同, 表明在一定地理范围内, 雌雄异株宿主在其各自生长过程中, 它的内生真菌群落的多样性是相对不变的, 基本稳定的^[26]。

在小蜂侵入后的苹果榕雄果和雌果中分离得到不同属的内生真菌, 这可能是由于环境不同或者进入榕果内小蜂的种类不同所致, 因为进入榕树雄果和雌果的小蜂种类不同。不同的小蜂身上所带菌株可能不同, 小蜂进入榕果后, 携带真菌在榕果内发育并在榕果内定植。

内生真菌在植物体内普遍存在, 但其研究在

近年来才相继开展,尚有许多真菌种类未被研究报道,GenBank 数据库中没有对应的基因序列被收录,因此,随着研究的深入,必将会发现一些新的真菌物种,为热带地区的真菌多样性提供基础数据。

[参考文献]

- [1] CARROLL G C, CARROLL F E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest [J]. Canadian Journal of Botany, 1978, 56 (24): 3034–3043.
- [2] WHITE J F, COLE G T. Endophyte host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca* [J]. Mycologia, 1985, 77: 323–327.
- [3] PETRINI O. Fungal endophytes of tree leaves [M] // Microbial ecology of leaves [M]. New York: Springer-Verlag, 1991: 179–197.
- [4] WILSON A D. Resources and testing of endophyte-infected germplasm in national grass repository collections [M] // Endophytic fungi in grasses and woody plants: Systematics, ecology, and evolution [M] // St. Paul. Minnesota: APS Press, 1996: 179–195.
- [5] PETRINI O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues [M] // Microbiology of the phyllosphere. Cambridge: Cambridge University Press, 1986: 175–187.
- [6] SCHULZ B, WANKE U, DRAEGER S, et al. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods [J]. Mycological Research, 1993, 97 (12): 1447–1450.
- [7] CARROLL G C. Fungal associates of woody plants as insect antagonists in leaves and stems [M] // Microbial mediation of plant-herbivore interactions. New York: Wiley, 1991: 253–271.
- [8] STONE J K, BACON C W, JR WHITE J F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined [M] // Microbial endophytes. New York: Marcel Dekker, 2000: 3–29.
- [9] 郭良栋. 内生真菌研究进展 [J]. 菌物系统, 2001, 20 (1): 148–152.
- [10] 苏印泉, 孙奎, 马养民, 等. 无花果内生真菌的分离及其鉴定 [J]. 西北植物学报, 2004, 24 (7): 1281–1285.
- [11] 张弘弛, 马养民, 刘瑞, 等. 无花果内生真菌的研究 I. 抗植物病原真菌活性的筛选 [J]. 西北农业学报, 2007, 16 (2): 232–236.
- [12] 刘瑞, 马养民, 张弘弛. 5 株无花果叶内生真菌的分离鉴定和抗菌活性的研究 [J]. 陕西科技大学学报: 自然科学版, 2010, 28 (2): 68–72.
- [13] WANG H K, HYED K D, SOYTONG K, et al. Fungal diversity on fallen leaves of *Ficus* in northern Thailand [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2008, 9 (10): 835–841.
- [14] SURYANARAYANAN T S, VIJAYKRISHNA D. Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis* [J]. Fungal Diversity, 2001, 8: 155–161.
- [15] MURALI T S, SURYANARAYANAN T S, VENKATESAN G. Fungal endophyte communities in two tropical forests of southern India: diversity and host affiliation [J]. Mycological Progress, 2007, 6 (3): 191–199.
- [16] 张秀实, 吴征镒. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1998, 23 (1): 170–172.
- [17] 席义翠, 陈吉岳, 杨大荣. 对叶榕隐头果内寄生真菌的来源 [J]. 动物学研究, 2009, 30 (增): 154–157.
- [18] 戴芳澜. 真菌的形态和分类 [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [19] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 405–649.
- [20] 陈锋菊, 李百元, 杨冰, 等. 一种经济快速提取丝状真菌基因组 DNA 的方法 [J]. 生命科学研究, 2010, 14 (2): 122–124, 149.
- [21] 李长田, 李玉, 方浙明, 等. 东北红豆杉内生真菌的多样性 [J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26 (6): 612–614, 623.
- [22] SOKOLSKI S, PICHÉ Y, CHAUVET É, et al. A fungal endophyte of black spruce (*Picea mariana*) needles is also an aquatic hyphomycete [J]. Molecular Ecology, 2006, 15 (7): 1955–1962.
- [23] WANG Y T, LO H S, WANG P H. Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei* [J]. Botanical Studies, 2008, 49 (1): 39–43.
- [24] 李雪玲. 八角莲植株地下茎内生真菌的分离 [J]. 云南师范大学学报: 自然科学版, 2005, 25 (2): 49–52.
- [25] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题 [J]. 生态学杂志, 2004, 23 (2): 86–91.
- [26] 王利娟, 贺新生. 植物内生真菌分离培养的研究方法 [J]. 微生物学杂志, 2006, 26 (4): 55–60.