

基于 Illumina MiSeq 高通量测序分析黄芪内生真菌的多样性

刘蓬蓬, 陈江宁, 贾天柱*

(辽宁中医药大学药学院, 国家中医药管理局中药炮制原理解析重点实验室,
辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:分析黄芪内生真菌群落多样性,为筛选菌种进行发酵炮制转化黄芪中活性成分的定向炮制工艺研究提供参考依据。方法:应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术测定黄芪内生真菌的 18S rDNA NS1-Fung 区域序列并进行物种丰度等生物信息分析。结果:获得有效序列 29 677 条,操作分类单元 188 个,测序数量接近于饱和,测序数据量合理。黄芪内生真菌主要分布于驼孢锈菌属 (*Hemileia*), 赤霉菌属 (*Gibberella*), 粪盘菌属 (*Ascobolus*), 假裸囊菌属 (*Pseudogymnoascus*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 共 5 个属。结论:黄芪内生真菌群落多样性较低,*Hemileia* 和 *Gibberella* 是黄芪内生真菌的优势种群。

[关键词] 黄芪; 内生真菌; 高通量测序; 多样性; 定向炮制工艺; 补气升阳; 操作分类单元

[中图分类号] R22;F124.5;R282;R284;R931 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0034-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181105

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.0946.017.html>

[网络出版时间] 2018-03-15 14:38

Analysis of Diversity of Endophytic Fungi in Astragali Radix by Illumina MiSeq High-throughput Sequencing Technology

LIU Peng-peng, CHEN Jiang-ning, JIA Tian-zhu*

(Research Center of Processing Engineering of Traditional Chinese Medicine (TCM) in Liaoning Province, Key Laboratory of Processing Theory Analysis, State Administration of TCM, School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** This study aimed to analysis the diversity of endophytic fungal communities in Astragali Radix, and provide a reference for study on the directional processing technology of active ingredients in this herb. **Method:** The 18S rDNA NS1-Fung region of endophytic fungal communities in Astragali Radix was sequenced by Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology, abundance of species and other bioinformation were analyzed. **Result:** The numbers of effective sequences and operational taxonomic units for samples were 29 677 and 188, respectively. The number of sequencing was close to saturation, and the sequencing data volume was reasonable. The main endophytic fungi of Astragali Radix belonged to 5 genera, such as *Hemileia*, *Gibberella*, *Ascobolus*, *Pseudogymnoascus* and *Aspergillus*. **Conclusion:** By and large, the diversity of endophytic fungi in Astragali Radix is low. *Hemileia* and *Gibberella* are the dominant endophytic fungi in Astragali Radix.

[Key words] Astragali Radix; endophytic fungi; high-throughput sequencing; diversity; directional processing technology; tonifying Qi and lifting Yang; operational taxonomic unit

黄芪常用于治疗气虚乏力、食少便溏、中气下陷 等^[1]。黄芪中以苷类(皂苷、黄酮苷)和多糖类成分

[收稿日期] 20171026(006)

[基金项目] 国家中医药管理局“中药炮制技术传承基地建设”项目(2015132)

[第一作者] 刘蓬蓬,在读博士,从事中药炮制研究,Tel:0411-85890154,E-mail:liupengpeng0411@163.com

[通信作者] *贾天柱,硕士,教授,从事中药炮制研究,Tel:0411-85890135,E-mail:jiatzh@126.com

为主要活性成分^[2]。日本学者在 1980 年代已证实中药的苷类成分需经肠道内的微生物代谢转化为次级苷或苷元方能产生药效作用^[3-4]。即中药经口服进入肠道后,肠道微生物通过消化、分解和转化作用,使不易吸收的大分子物质转化为活性较高且易于肠黏膜吸收的小分子物质,从而较好地发挥应有的临床疗效。而中药经发酵炮制具有与上述相类似的转化过程,即利用微生物的酶系转化功能将其中的大分子物质在发酵过程中直接转化为易于机体吸收和利用的小分子物质。从而促进机体对有效成分的吸收,进而产生更好的临床疗效。

真菌在微生物中由于具有种类多、酶系丰富、次生代谢产物多、培养条件较简单等特点,常作为发酵中药的主要功能菌。此外,植物中内生真菌可参与合成和宿主植物相同或相似的活性成分。故本课题组欲通过采用内生真菌发酵的方式促进黄芪中苷类成分向次级苷或苷元的转化,提高活性成分的生物利用度和吸收强度,以便更好地发挥相应的药理作用。在上述过程中依据饮片中的化学成分的分类或其机体的代谢、转化、吸收过程而进行有目的的炮制,本课题组将这一类炮制称之为定向炮制。

本实验拟对黄芪内生真菌的多样性进行研究。植物中内生菌主要包括细菌、真菌、放线菌等^[5],其中内生真菌主要指生活于健康植物组织的内部,而不会使宿主植物表现出明显感染症状的一类真菌。目前有关黄芪内生真菌多样性的研究均采用培养法^[6-7],通过培养法获得的实验结果不能对植物内生真菌的群落组成进行真实的反映。故本实验基于 Illumina MiSeq 平台的第二代测序技术^[8]对传统培养法和非培养法未检测到的以及痕量内生真菌的种类进行高通量测序分析,从而更全面地探析黄芪中内生真菌的多样性,为通过采用纯菌种或混合菌种发酵炮制的方式将黄芪中苷类成分转化为次级苷或苷元的定向炮制工艺研究提供参考。

1 材料

Pico-21 型台式离心机(美国 Thermo 公司),GL-88B 型漩涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),TND03-H-H 型混匀型干式恒温器(深圳拓能达科技有限公司),DYY-6C 型电泳仪电源和 DYCZ-21 型电泳槽(北京市六一仪器厂),BioDoc-It 220 型凝胶成像系统(美国 UVP 公司),MiSeq System 型高通量测序仪(美国 Illumina 公司),Q32866 Qubit® 2.0 型荧光计(美国 Invitrogen 公司),T100™ Thermal Cycler 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美

国 Bio-Rad 公司)。

黄芪购自辽宁省朝阳市黄芪 GAP(中药材生产质量管理规范)种植基地,经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根;DNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司),DNA 检测试剂盒(美国 Life 公司),高效高保真酶(美国 Thermo 公司),核酸纯化试剂盒(美国 Beckman Coulter 公司),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2 方法与结果

2.1 总 DNA 的提取 取鲜黄芪的根部用清水去除表面泥土后置于 75% 乙醇中浸泡 10 min,于超净台内用无菌的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2~7.4)进行清洗并置紫外灯下照射 15 min 以获得表面洁净无菌的黄芪。将该黄芪切成两半,从中间掏取黄芪块,以保证无菌,切成小块并用 PBS 反复冲洗,取冲洗液置离心机中于 8 000 r·min⁻¹离心 5 min,倒掉上清液,合并沉淀于 -80 ℃ 冰箱中冻存后取出,立即用组织研磨棒进行研磨提取 DNA。使用 DNA 提取试剂盒并参照说明书进行总 DNA 的提取。采用琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的纯度和浓度。

2.2 18S rDNA NS1-Fung 区的 PCR 扩增 利用 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 精确定量,以确定 PCR 反应应加入的 DNA 量。PCR 所用的引物已经融合了 MiSeq 测序平台的 NS1-Fung 通用引物。NS1 引物为 CCTACACGACGCTCTTCCGATCTN(barcode)GTAGTCATATGCTTGCTC;Fung 引物为 GACTGGAGTTCCTTGGACCCGAGAATTCCAATCCCCGTTA CCCGTTG,使用高效高保真酶进行 PCR 扩增,确保扩增效率和准确性。第一轮 PCR 扩增反应体系为 2 × Taq master mix 15 μL, Bar-PCR primer F (10 μmol·L⁻¹)1 μL, primer R (10 μmol·L⁻¹)1 μL, Genomic DNA 20 ng;补双蒸水至 30 μL。PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,45 ℃ 退火 20 s,65 ℃ 延伸 30 s,5 个循环;94 ℃ 变性 20 s,55 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 30 s,20 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。第二轮 PCR 扩增反应体系为 2 × Taq master mix 15 μL, primer F (10 μmol·L⁻¹)1 μL, primer R (10 μmol·L⁻¹)1 μL, Genomic DNA 20 ng;补双蒸水至 30 μL。PCR 反应程序为 95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 15 s,55 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 30 s,5 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。

2.3 PCR 产物的纯化和混样 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测,利用核酸纯化试剂盒对 PCR 产物进

行纯化回收。采用 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量,按等量比例 1:1 进行混合后测序。

2.4 上机测序 将样品 DNA 浓度调至 $20 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后进行上机测序^[9-14]。测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2.5 生物信息学和数据分析 测序得到的原始数据存在一定比例的干扰数据,为了保证信息分析质量,使得结果更加准确、可靠,使用 Cutadapt 软件去除引物接头序列, Pear 软件进行序列拼接, Prinseq 软件质控过滤去除标签序列和引物序列以及部分低质量序列, Usearch 软件去除非扩增区域序列、嵌合体及靶区域外序列,得到有效数据^[15]。采用 Usearch 软件对有效数据在 97% 相似水平上的进行操作分类单元(OTU)聚类,采用 RDP Classifier 方式对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并在各水平上统计样品的群落组成。利用 Mothur 软件进行稀释曲线和多样性分析,其中以香农-稀释曲线反映群落中 OTU 丰度,以辛普森分析指数, Chao1 分析指数, ACE 分析指数和 Coverage 分析指数反映 α 多样性。使用 GraPhlAn 软件制作物种进化分类树图。综上生物信息统计分析,得到黄芪内生真菌群落结构组成^[16-17]。

2.6 序列长度分布 黄芪样品所测得的 29 693 条 PE Reads 的长度分布在 200 ~ 350 bp,其中长度为 314 bp 的序列最多。从序列长度的分布来看,与 18S rDNA NS1-Fung 区序列长度大致吻合。

2.7 样品复杂度分析 从香农-稀释曲线来看,随着测序数量的增加,稀释曲线斜率逐渐降低,趋向平坦但未进入平台期,说明再增加测序数量也只会产生少量新的 OTUs,见图 1。结合 α 多样性分析中的辛普森指数结果 0.98, Chao1 指数结果 1 315, ACE 指数结果 3 108 和 Coverage 指数结果 0.99,表明测序数据量合理,可以反映样品中绝大多数的微生物信息;从排列分布-丰度曲线来看,曲线快速陡然下降表明样品中的优势菌群所占比例较高,黄芪内生真菌的多样性较低,见图 2。

2.8 OTUs 数目统计及物种注释分析 黄芪样品共获得 29 677 条经过滤后的拼接序列,可分为 188 个 OTUs(97% 的序列相似性,下同),主要被注释到 16 个属,其中依据相对丰度大小排名前 5 的依次为驼孢锈菌属(*Hemileia*),赤霉菌属(*Gibberella*),粪盘菌属(*Ascobolus*),假裸囊菌属(*Pseudogymnoascus*)和曲霉属(*Aspergillus*),见图 3。

2.9 样品中内生真菌物种分类 从门的分类水平

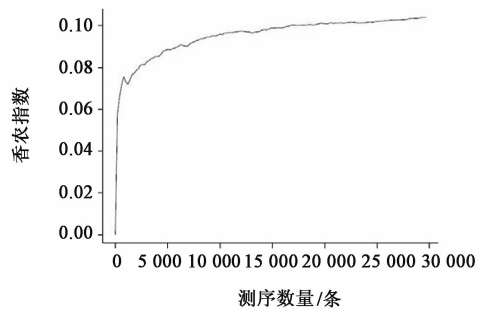


图 1 黄芪内生真菌的香农-稀释曲线

Fig. 1 Shannon-dilution curve of endophytic fungi in Astragali Radix

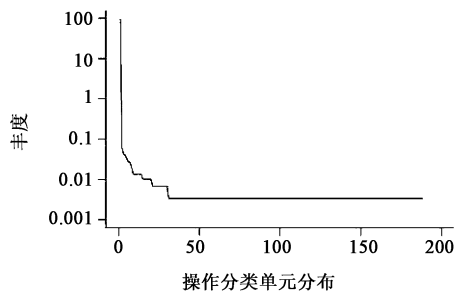


图 2 黄芪内生真菌的排列分布-丰度曲线

Fig. 2 Rank-abundance curve of endophytic fungi in Astragali Radix

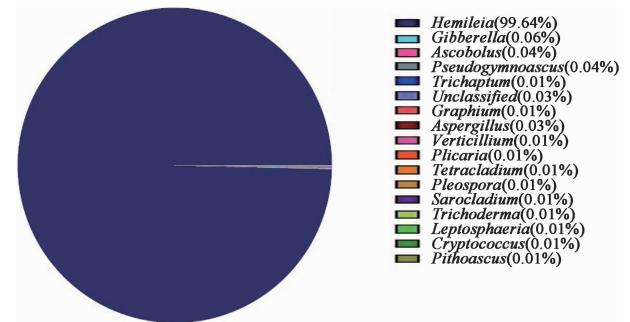


图 3 黄芪内生真菌属水平的相对丰度分布

Fig. 3 Relative abundance distribution of genera of endophytic fungi in Astragali Radix

看,黄芪内生真菌主要分布在担子菌门(Basidiomycota, 99.68%)和子囊菌门(Ascomycota, 0.29%)。从纲的分类水平看,黄芪内生真菌在柄锈菌纲(Pucciniomycetes, 99.64%),子囊菌纲(Sordariomycetes, 0.11%),盘菌纲(Pezizomycetes, 0.06%),锤舌菌纲(Leotiomycetes, 0.05%),散囊菌纲(Eurotiomycetes, 0.04%),座囊菌纲(Dothideomycetes, 0.02%),伞菌纲(Agaricomycetes, 0.02%),银耳纲(Tremellomycetes, 0.01%)中均有分布。

从目的分类水平看,黄芪内生真菌主要分布在

柄锈菌目 (Pucciniales, 99.64%), 肉座菌目 (Hypocreales, 0.09%), 盘菌目 (Pezizales, 0.06%), 散囊菌目 (Eurotiales, 0.03%), 腔菌目 (Pleosporales, 0.02%), 囊菌目 (Microascales, 0.02%), 银耳目 (Tremellales, 0.01%), 柔膜菌目 (Helotiales, 0.01%), 伞菌目 (Agaricales, 0.01%), 小丛壳目 (Glomerellales, 0.01%), 多孔菌目 (Polyporales, 0.01%) 等。从科的分类水平看, 黄芪内生真菌在 Incertae Sedis (99.67%), 丛赤壳科 (Nectriaceae, 0.06%), 粪盘菌科 (Ascobolaceae, 0.04%), Myxotrichaceae (0.04%), 发菌科 (Trichocomaceae, 0.03%), 小囊菌科 (Microascaceae, 0.02%), 盘菌科 (Pezizaceae, 0.01%), 格孢腔菌科 (Pleosporaceae, 0.01%), 肉座菌科 (Hypocreaceae, 0.01%), 银耳科 (Tremellaceae, 0.01%), 小球腔菌科 (Leptosphaeriaceae, 0.01%), Plectosphaerellaceae (0.01%), 多孔菌科 (Polyporaceae, 0.01%), 蘑菇科 (Agaricaceae, 0.01%) 中均有分布。

从属的分类水平看, 黄芪内生真菌在驼孢锈菌属 (*Hemileia*, 99.64%), 赤霉菌属 (*Gibberella*, 0.06%), 粪盘菌属 (*Ascobolus*, 0.04%), 假裸囊菌属 (*Pseudogymnoascus*, 0.04%), 曲霉属 (*Aspergillus*, 0.03%), *Plicaria* (0.01%), 格孢腔菌属 (*Pleospora*, 0.01%), 木霉属 (*Trichoderma*, 0.01%), 隐球菌属 (*Cryptococcus*, 0.01%), *Pithoascus* (0.01%), 小球腔菌属 (*Leptosphaeria*, 0.01%), 帚枝霉属 (*Sarocladium*, 0.01%), *Tetracladium* (0.01%), 轮枝孢属 (*Verticillium*, 0.01%), 青凤蝶属 (*Graphium*, 0.01%), *Trichaptum* (0.01%) 中均有分布。从种的分类水平看, 黄芪内生真菌主要分布在咖啡驼孢锈菌 (*Hemileia vastatrix*, 99.65%), 禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum* PH-1, 0.06%), 粪盘菌属 *crenulatus* 菌 (*Ascobolus crenulatus*, 0.04%), 假裸囊菌属 *destructans* 菌 (*Pseudogymnoascus destructans*, 0.04%), 色曲霉菌 (*Aspergillus versicolor*, 0.03%), *Plicaria* 属 *leiocarpa* 菌 (0.01%), 枯叶格孢腔菌 (*Pleospora herbarum*, 0.01%), 绿木霉菌 (*Trichoderma virens* Gv29-8, 0.01%), *Pithoascus* 属 *langeronii* 菌 (0.01%), 帚枝霉属 *bacillisporum* 菌 (0.01%), *Tetracladium* 属 *marchalianum* 菌 (0.01%), 轮枝孢属 *alfalfae* VaMs. 102 菌 (0.01%), *Parascenedosporium* 属 *putredinis* 菌 (0.01%), 罗伦特隐球菌 (*Cryptococcus laurentii*, 0.01%), *Trichaptum* 属 *abietinum* 菌 (0.01%),

Asterotremella 属腐质霉菌 (*Asterotremella humicola*, 0.01%) 等。

丰度前 100 个物种进化分类树见图 4, 并将丰度前 21 个物种 (以字母标出) 所对应的门按不同的颜色标出, 圈和星号的大小代表丰度大小, 外围样本环中颜色深浅随物种丰度变化^[18]。由此可见, 黄芪的内生真菌在属水平上驼孢锈菌属 (E) 和赤霉菌属 (S) 为优势种群, 在种水平上咖啡驼孢锈菌和禾谷镰刀菌为优势种群。

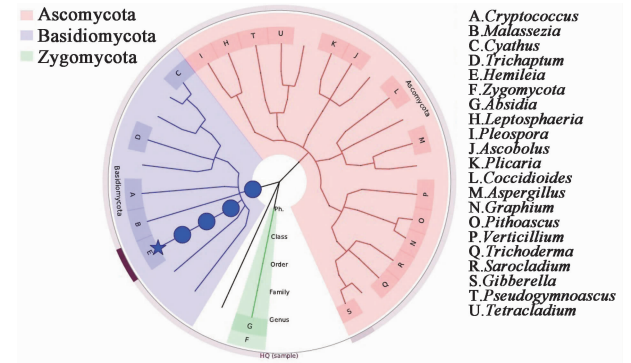


图 4 黄芪内生真菌的分类树
Fig. 4 Taxonomic tree of endophytic fungi in Astragali Radix

3 讨论

图 4 中较 2.9 项下门的分类多了 Zygomycota, 属的分类多了 *Malassezia*, *Cyathus*, *Zygomycota*, *Absidia* 和 *Coccidioides*, 这是由于在 2.9 项下门的分类是以读长 (Reads) 所占百分比表示的, 而 Zygomycota 所占百分比过低, 统计软件系统将其认定为 0 所致。而在图 4 中门的分类是以读长丰度进行分类树的划分, 虽然 Zygomycota 的读长丰度较小, 但最终依然出现在分类树图中。同理, 属的分类树的划分与 2.9 项下真菌属的个数有差异, 亦同上述原因所述。这一结果再次印证了黄芪内生真菌群落多样性较低这一结论。

驼孢锈菌属咖啡驼孢锈菌是咖啡叶锈病的致病菌, 赤霉菌属禾谷镰刀菌是小麦穗腐的致病菌, 但有文献报道上述两菌亦参与和应用于植物次生代谢产物的微生物转化^[19-22]。曲霉属内生真菌可产生 α -L-鼠李糖苷酶, 该酶能够专一、高效地水解如柚皮苷、芦丁和橘皮苷等末端为 α -L-鼠李糖基的苷类成分^[23]。故在接下来的研究中将能对能产生水解糖苷酶的内生真菌进行提取和分离, 以获得更多使大分子苷类成分转化为次级苷或苷元等易吸收的小分子物质的内生真菌。

本实验基于 Illumina 公司开发的 MiSeq 平台,

通过采用第二代测序(高通量测序)技术对黄芪具有的内生真菌群落进行全面的分析与鉴定,探索了黄芪内生真菌的多样性信息,解决了不可培养及低丰度真菌在传统方法中无法检出的局限。为接下来通过利用黄芪中内生真菌进行纯种发酵或混合菌种发酵来转化黄芪中的苷类成分,即为依据药材中化学成分自身的性质而进行有目的的定向炮制研究提供参考依据。此外, MiSeq 平台操作简便、通量高、速度快,可同时进行多样品、多可变区的测序分析,实验结果可信度较高^[24-26]。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:302-303.

[2] 蔡金坊,代云桃,肖永庆,等. 系统评价蜜炙对黄芪药效物质基础的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8):47-52.

[3] Hattori M, Kim G, Motoike S, et al. Metabolism of sennosides by intestinal flora [J]. Chem Pharm Bull, 1982, 30(4):1338-1346.

[4] El-Sedawy A I, Hattori M, Kobashi K, et al. Metabolism of gentiopicoside (gentiopicroin) by human intestinal bacteria [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(9):2435-2437.

[5] Flrnn J C, Matthews J G, Benoit R L. Blind pinning of displaced supracondylar fractures of the humerus in children. Sixteen years' experience with long-term follow-up [J]. J Bone Joint Surg Am, 1974, 56(2):263-272.

[6] 马伟,贾艳姝,李娜,等. 植物黄芪根内生真菌的分离[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(4):114-116.

[7] 龚贺,张雷鸣,任伟超,等. 膜荚黄芪内生真菌的分离与鉴定[J]. 东北林业大学学报, 2014, 42(3):141-143.

[8] Claesson M J, O'Sullivan O, Wang Q, et al. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine [J]. PLoS One, 2009, 4(8):e6669.

[9] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(Suppl 1):4516-4522.

[10] Youssef N, Sheik C S, Krumholz R, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(16):5227-5236.

[11] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from

cow rumen [J]. Science, 2011, 331(6016):463-467.

[12] LUO C, Tsementzi D, Kyrpidis N, et al. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample [J]. PLoS One, 2012, 7(2):e30087.

[13] Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets [J]. Bioinformatics, 2011, 27(6):863-864.

[14] Magoc T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21):2957-2963.

[15] ZHANG J, Kobert K, Flouri T, et al. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End read mergeR [J]. Bioinformatics, 2014, 30(5):614-620.

[16] Schloss P D, Westcott S L, 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(23):7537-7541.

[17] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. Bioinformatics, 2010, 26(19):2460-2461.

[18] Asnicar F, Weingart G, Tickle T L, et al. Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn [J]. Peer J, 2015, doi: 10.7717/peerj.1029.

[19] 汪涵,吴伟怀,李乐,等. 咖啡驼孢锈菌 PCR 分子检测体系的建立 [J]. 热带作物学报, 2017, 38(9):1677-1681.

[20] 王裕中,米勒 J D. 中国小麦赤霉病菌优势种——禾谷镰刀菌产毒素能力的研究 [J]. 真菌学报, 1994, 13(3):229-234.

[21] 杜晓昱. 禾谷镰刀菌产毒分析及其毒素检测方法的研究 [D]. 福州:福建农林大学, 2005.

[22] 刘向红. 三株刺松藻内生真菌次生代谢产物及其生物活性研究 [D]. 泰安:山东农业大学, 2012.

[23] 巩建业,吴喆瑜,李利君,等. GH78 家族真菌 α -L-鼠李糖苷酶分子系统进化关系分析 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(10):13-20.

[24] Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing [J]. J Microbiol Methods, 2009, 79(3):266-271.

[25] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. Nature, 2009, 457(7228):480-484.

[26] JIANG B, LIANG X, CHEN Y, et al. Integrating next-generation sequencing and traditional tongue diagnosis to determine tongue coating microbiome [J]. Sci Rep, 2012, doi:10.1038/srep00936.

[责任编辑 刘德文]