

# 东祁连山高寒灌丛草甸小叶金露梅根部内生真菌多样性对季节的响应

邓秀霞<sup>1</sup>, 曹文侠<sup>1\*</sup>, 王世林<sup>1</sup>, 王文虎<sup>1</sup>, 刘婉婷<sup>1</sup>, 李文<sup>2</sup>

(1. 甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070; 2. 青海省畜牧兽医科学院(青海大学畜牧兽医科学院), 青海 西宁 810016)

**摘要:**【目的】明确高寒地区灌木小叶金露梅(*Potentilla parvifolia*)根部可培养内生真菌的多样性和季节变化。【方法】以东祁连山的优势灌木小叶金露梅为试验材料, 利用组织培养法分离根部的内生真菌, 用形态鉴定和 ITS 分子测序相结合进行真菌鉴定并分析其季节多样性。【结果】春季、夏季和秋季在小叶金露梅根段组织中分离得到 71 株真菌纯培养物, 归属于 5 纲 5 目 5 科 6 属 8 个分类单元; 不同季节的小叶金露梅根部内生真菌种类和数量存在一定差异, 从多样性指数来看, Shannon—Wiener 指数和 Simpson's diversity 指数表现为春季(1.57, 0.75) > 夏季(1.26, 0.69) > 秋季(1.08, 0.62)。春季根部内生真菌多样性高于夏季和秋季, 但优势属均为脉孢菌属(*Neurospora*)和曲霉属(*Aspergillus*); 春季特有属为青霉属(*Penicillium*)和色串孢属(*Torula*); 赭霉属(*Ochroconis*)为夏季特有属, 葡萄孢属(*Botrytis*)为秋季特有属。【结论】不同季节小叶金露梅根部均分离得到了内生真菌, 且内生真菌在小叶金露梅根部的定殖存在季节差异性, 春季根部内生真菌多样性较高。

**关键词:**小叶金露梅; 内生真菌; 分子鉴定; 季节多样性

**中图分类号:**S812 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)02-0088-08

**DOI:**10.13817/j.cnki.cyycp.2024.02.009



内生真菌是一种存在于健康植物组织中的微生物, 不会对植物造成明显的负面影响, 但可能会在宿主衰老过程中表现出致病性<sup>[1]</sup>。自然界中所有健康的植物体内都有内生真菌, 其被认为是植物的互惠主义者。内生真菌从宿主植物那里获得营养和保护, 它本身又能产生包括植物生长激素在内的多种化学物质, 在促进植物生长发育, 提高植物抗寒、抗旱、抗病虫害等方面发挥着不可或缺的作用<sup>[2-4]</sup>。1886年, 内生真菌作为一种科学现象第一次被 Barry 提出, 近年来才

受到广泛关注<sup>[5]</sup>。对灌木植物中内生真菌的研究发现, 单个物种甚至单个植物通常含有大量的真菌种类<sup>[2]</sup>。尽管灌木植物中内生真菌的多样性和丰富度很高, 但人们对于这些内生真菌及其与宿主植物的相互作用的重视远不如草本植物<sup>[2]</sup>。

金露梅(*Potentilla fruticosa*)灌丛草甸是高山冷湿气候的产物, 是青藏高原高寒地区主要的植被类型之一, 是祁连山地区主要的夏季牧场<sup>[6-7]</sup>。小叶金露梅(*P. parvifolia*)属于蔷薇科委陵菜属(*Potentilla*)灌木, 广泛分布在祁连山脉及青藏高原广大高海拔地区, 是金露梅灌丛的主要组成植被, 喜凉爽、湿润环境<sup>[8]</sup>。其总根量相对较深, 无明显主根, 和高山绣线菊(*Spiraea alpina*)等植物同处于伴生地位, 一起参与群落第二片层的构建<sup>[9]</sup>。作为东祁连山的优势灌木, 小叶金露梅虽植株矮小, 但枝叶繁茂、根系开阔, 具有耐盐碱、耐瘠薄、耐旱、耐寒等特性, 为中等饲用植物<sup>[10]</sup>; 能够防

**收稿日期:**2022-03-26; **修回日期:**2022-04-20

**基金项目:**国家自然科学基金项目(32060269); 草地农业生态系统国家重点实验室开放基金课题

**作者简介:**邓秀霞(1996-), 女, 甘肃庆阳人, 硕士研究生。

E-mail:1002722731@qq.com

\*通信作者。E-mail:caowx@gsau.edu.cn

风固沙、涵养水源、净化空气和保护环境<sup>[11]</sup>。在生态保护方面也有一定价值。

现阶段,对于金露梅灌丛的研究主要集中在植物群落特征、土壤理化性质、碳汇能力等方面<sup>[6,12]</sup>。其内生真菌的多样性及其对宿主的生物功能相关研究仍属空白,鉴于金露梅特殊的生长特性和生态服务功能,本试验以东祁连山小叶金露梅为研究对象,分离并鉴定春季、夏季和秋季小叶金露梅根部内生真菌,了解小叶金露梅根系内生真菌的季节动态,明确其内生真菌种质资源,并为进一步探讨内生真菌对小叶金露梅生长的影响提供实体菌株和理论依据,有助于高寒灌丛草甸植被保护,对于认识祁连山灌丛植被的生态功能和资源的有效保护有重要的现实意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验地概况

试验地位于东祁连山天祝藏族自治县抓喜秀龙乡八刺沟下端(37°09'~37°12' N, 102°37'~102°47' E),海拔3 000~3 400 m,年平均气温0.13℃,年均降水量为414.98 mm,昼夜温差大,日照强,雨热同步,该区无绝对无霜期。高寒灌丛草甸是该地区主要的植被类型之一,主要有小叶金露梅灌丛和杜鹃灌丛。主要灌木有头花杜鹃(*Rhododendron capitatum*)、千里香杜鹃(*R. thymifolium*)、小叶金露梅、鬼箭锦鸡儿(*Caragana jubata*)、绣线菊(*Spiraea chinensis*)、山生柳(*Salix oritrepha*)。灌下草本植物主要有珠芽蓼(*Polygonum viviparum*)、垂穗披碱草(*Elymus nutans*)、问荆(*Equisetum arvense*)和苔草(*Carex* spp.)等<sup>[13-14]</sup>。

### 1.2 样品采集

2020年10月、2021年4月和2021年7月分别在试验地对小叶金露梅根部组织进行采样,随机选取间隔大于5 m长势良好的植株各3株,先清除灌下的枯枝落叶及杂物,用消毒过的工具小心挖取全株根系,抖掉多余的土壤,剪取直径1 mm左右的侧根和须根,连同少许根际土装入无菌塑料袋中放在冰盒内带回实验室保存在4℃冰箱中,2 d内完成样品处理<sup>[15]</sup>。

### 1.3 试验方法

1.3.1 根系内生真菌分离纯化 选取小叶金露梅健康的细根(直径约1 mm),用刷子刷净根表面的泥土,再用流水冲洗干净,后在超净工作台上处理,用无菌

水冲洗6次后进行消毒<sup>[15]</sup>。具体消毒程序参照王晓国等<sup>[16]</sup>对带叶兜兰根部的消毒方式并进行一定改进:先用75%的酒精浸泡5 min,再用5%的NaClO浸泡10 min,后用无菌水冲洗6次,用无菌滤纸吸干表面水分,将消毒过的细根剪成0.5 cm长的小段置于马丁孟加拉红(MA)(MA培养基配方为:葡萄糖10 g、胰蛋白胍5 g、磷酸氢二钾1 g、硫酸镁0.5 g、孟加拉红0.033 g、琼脂20 g,蒸馏水定容至1 000 mL,调节pH值至5.0,然后121℃高压灭菌20 min,冷却至60℃以下时加入0.03 g链霉素混合均匀)<sup>[17]</sup>。培养基上,每皿均匀放置5个根段,试验过程严格在无菌环境进行,在25℃培养箱中黑暗培养。把最后一次漂洗材料的无菌水涂布于MA培养基平板上,25℃黑暗培养7 d,进行表面消毒效果的检验<sup>[18]</sup>。在工作中的超净工作台和培养箱中分别放置开盖的不接任何材料的器皿,以此检测工作台环境和生化培养箱环境的污染菌,排除对分离内生真菌的影响。待根段切口处长出真菌菌落,即时用接种针挑取菌丝进行纯化培养,若菌落形态有差异,进行二次纯化,如此反复直至获得单一菌株<sup>[18]</sup>。

1.3.2 根系内生真菌初步鉴定 把纯化后的菌株接种至马铃薯琼脂培养基(PDA培养基,配制:将马铃薯去皮切成细丝,称量200 g,加入适量蒸馏水,微波炉中煮沸并保持20 min,过滤得滤液。加入葡萄糖20 g,加蒸馏水至1 000 mL,调整pH值为5.0,然后加入琼脂20 g,搅拌直至琼脂溶解,121℃高压灭菌20 min,冷却至45℃左右时加入0.03 g链霉素)<sup>[17]</sup>,置于25℃的培养箱中黑暗培养21 d<sup>[15]</sup>。观察并记录菌落的颜色、质地、形状、产孢等特征,用棉兰染色法对分离得到的内生真菌进行染色,在显微镜下观察其显微特征。根据菌种特征,综合分析对比相关特征的异同,参考《真菌鉴定手册》和《中国真菌志》<sup>[19-20]</sup>,对分离得到的菌株进行初步鉴定。

1.3.3 菌株分子鉴定 在PDA培养基上活化目的菌株,待菌株长满培养基,挑取分离菌株的新鲜菌丝0.5~1.0 g,经液氮研磨后,用Omega真菌基因组试剂盒提取菌株DNA。利用真菌通用引物ITS1和ITS4进行扩增。其中PCR反应体系为30 μL:Super Mix15 μL, Primer F(10p) 1 μL, Primer R(10p) 1 μL, 模板

1  $\mu\text{L}$ , 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 30  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为:96  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;96  $^{\circ}\text{C}$  变性 200 s,56  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,35 个循环;16  $^{\circ}\text{C}$  延伸至反应完成后,用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测和紫外凝胶成像仪观察,然后送样至北京六合华大科技有限公司测序,通过 NCBI 的 BLAST 检索系统进行相似性分析,用 Mega 7.0 软件中的邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统发育树<sup>[15]</sup>。

#### 1.4 统计分析

内生真菌的分离率可以反映宿主植物受内生真菌侵染的程度,而相对频率可以衡量植物组织中某种内生真菌的优势度,分别按以下方法计算<sup>[21-22]</sup>:

分离率=受内生真菌侵染的组织块数 / 全部供试样本组织块数  $\times 100\%$ ;

相对频率=分到的某种内生真菌的菌株数 / 分离到的总菌株数  $\times 100\%$ 。

采用 Shannon—Wiener 多样性指数反映不同季节内生真菌的物种多样性程度,计算公式为:

$$H' = -\sum P_i \ln P_i$$

式中: $P_i$ 为第  $i$  种的个体数占总个体数  $N$  的比例, $S$  为物种数。

$$\text{Simpson 多样性指数 } (1-D)1 - D = 1 - \sum P_i^2$$

式中: $P_i$ 为第  $i$  种的个体数占总个体数  $N$  的比例。

均匀度分析采用 Pielou 指数,反应每种个体间的差异,计算公式为:

$$J = H' / H_{\max}$$

式中: $H_{\max} = \ln(S)$ ,  $S$  为物种数。

采用 Margalef 丰富度指数( $R$ )测定一定空间范围内的物种数目,以表达生物的丰富程度。

$$R = (S - 1) / \log_2(N)$$

式中: $S$  是真菌物种数, $N$  是真菌个体总数。

不同季节下各种真菌种类分布以群落系数进行相似性比较,计算公式为:

$$CS = 2a / b + c$$

式中: $a$  为两组样本共有的种类数, $b$  和  $c$  分别为两组样本中的种类数。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同季节根部内生真菌形态鉴定

将分离获得植物的内生真菌菌株在 PDA 培养基上培养,发现大部分菌株生长速度较快。大多数菌株的菌落为圆形、近圆形,边缘平整,气生菌丝发达,部分菌落中心隆起或有辐射状裂纹。菌落颜色为白色、灰绿色、黄色、灰黑色至黑色。菌落外形大部分为圆形,少数形状不规则。未见明显液体分泌物,个别菌株有香味。分离菌丝在显微镜下观察,发现不同菌株菌丝特征差异较大,小叶金露梅根部内生真菌主要特征描述和鉴定结果如下(表 1)。

### 2.2 不同季节内生真菌分子鉴定

挑选 5 种通过形态鉴定难以准确确定其种属的菌株进行 ITS rDNA 序列分析,每个类型 2 个代表菌株,把所获得的序列提交至 NCBI 数据库进行 Blast 比对,选取相似度较高的数据库序列(表 2),并以亲缘关系

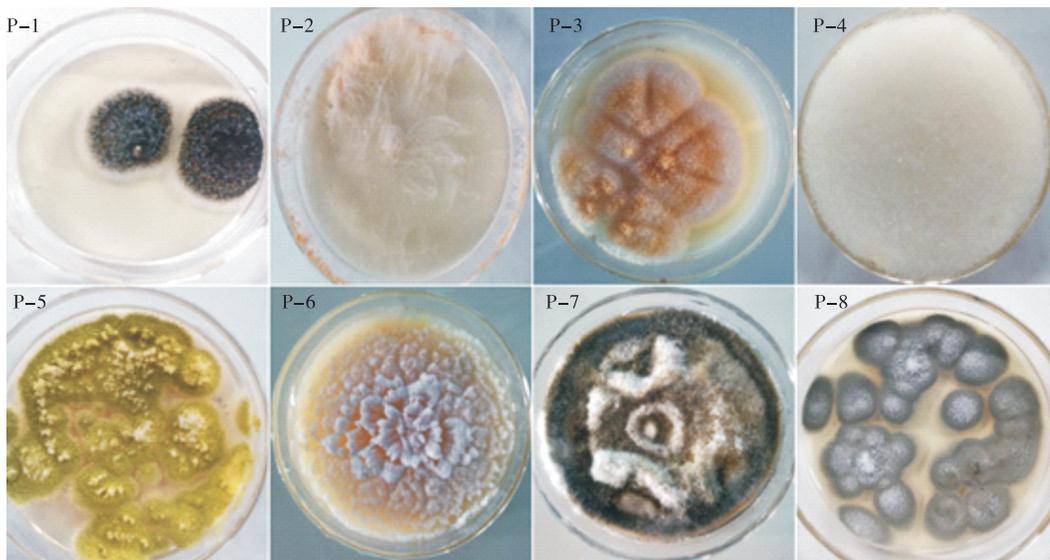


图 1 分离真菌菌落形态

Fig. 1 Characters of isolated fungus

表 1 小叶金露梅根部内生真菌的形态学特征

Table 1 Morphological characteristics of endophytical fungi in roots fungi from *Potentilla parvifolia*

| 菌株  | 季节             | 菌落形状             | 颜色                 | 质地  | 菌丝结构                        | 分生孢子                                | 菌丝分支  | 菌丝隔 | 分类推断                      |
|-----|----------------|------------------|--------------------|-----|-----------------------------|-------------------------------------|-------|-----|---------------------------|
| P-1 | 春季<br>夏季<br>秋季 | 圆形,有同心<br>轮纹,有裂纹 | 黑色,背面白色或淡<br>黄色    | 绒毛状 | 壁光滑,菌丝顶端<br>棕褐色             | 分生孢子头球形至辐射<br>菊花形,边缘产生小孢子           | 无     | 无   | 曲霉属<br><i>Aspergillus</i> |
| P-2 | 春季<br>夏季<br>秋季 | 形状不规则,<br>有攀壁性   | 初为白色,后为黄<br>色,背面黄色 | 绒毛状 | 菌丝如竹节状                      | 隔分裂生出短柱状、桶状<br>节孢子                  | 有     | 有   | 脉孢菌属<br><i>Neurospora</i> |
| P-3 | 春季<br>夏季<br>秋季 | 圆形,有裂纹,<br>中心凸起  | 白色,顶部黄色颗粒<br>背面黄色  | 绒毛状 | 壁光滑,菌丝顶端<br>分生              | 孢子头球形至辐射性菊<br>花形,边缘产生小孢子            | 有     | 无   | 曲霉属<br><i>Aspergillus</i> |
| P-4 | 秋季             | 菌丝分布疏<br>松,蛛丝质感  | 菌落初白色至灰色,<br>后为深褐色 | 绒毡状 | 壁光滑,顶端膨大<br>着生分生孢子          | 分生孢子黄褐色,圆形或<br>椭圆形,着生小梗上聚集<br>成葡萄穗状 | 有     | 少隔  | 葡萄孢属<br><i>Botrytis</i>   |
| P-5 | 春季             | 圆形               | 中间绿色,边缘白色          | 绒毡状 | 顶端产生球形或烧<br>瓶形顶囊,顶囊顶<br>部产生 | 圆形或卵形分生孢子                           | 有     | 有   | 曲霉属<br><i>Aspergillus</i> |
| P-6 | 春季             | 花纹状              | 白色                 | 蜡质  | 部分菌丝较短,顶<br>端圆形孢子           | 圆形小孢子                               | 树状分支  | 无   | 青霉属<br><i>Penicillium</i> |
| P-7 | 春季             | 圆形               | 黑色,背面黑褐色           | 棉絮状 | 壁光滑,无色透明                    | 圆形小孢子                               | 近直角分支 | 有   | 碳团菌属<br><i>Hypoxyton</i>  |
| P-8 | 夏季             | 圆形               | 灰绿色,背面黄褐色          | 蜡质  | 菌丝较稀疏,壁旁<br>有串状孢子           | 分生孢子圆形或椭圆形,<br>串生                   | 有     | 无   | 未定                        |

相对较远的高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) (MT366045.1) 为外源菌,构建系统发育树(图 2)。

经比对,三个季节共有的 P-2 菌株与 *Neurospora tetrasperma* (MN511320.1) 出现在同一分支上,支持率为 100%,且与 *N. tetrasperma* (MN511320.1) 具有较高的同源性且序列相似率达 100%,表明 P-2 为 *N. tetrasperma* 同源或同种菌株。春季分离出的 P-5 菌株与 *A. fumigatus* (MN473284.1) 和 *A. spergillus* (MK439477.1) 出现在同一分支上,支持率为 100%,所得菌株与 2 种真菌具有较高的同源性,且与 2 种真菌序列相似率均达 100%,表明 P-5 为曲霉属菌株; P-6 菌株与 *Penicillium citrinum* (MT597828.1) 和 *P. citrinum* (MT558921.1) 出现在同一分支上,支持率为 100%,所得菌株与两种真菌具有较高的同源性,且与 2 种真菌序列相似率均达 100%,表明 P-6 均为青霉属菌株; P-7 菌株与 *Torula herbarum* (HQ703422.1) 和 *Humicola grisea* (AB625590.1) 出现在同一分支上,支持率为 100%,所得菌株与两种真菌具有较高的同源性,且与 *T. herbarum* (HQ703422.1) 序列相似率达 100%,表明 P-7 为 *T. herbarum* 的同源

或同种真菌。

夏季分离出的 P-8 菌株与 *Fungal endophyte* (KR016787.1) 出现在同一分支上,支持率为 67%,序列相似率为 82.09%,覆盖比率为 76%,P-8 菌株、*Fungal endophyte* (KR016787.1) 又和 *Ochroconis olivacea* (NR\_164568.1) 出现在另一级分支上,支持率为 100%,与 *O. olivacea* (NR\_164568.1) 序列相似率为 90.98%,覆盖比率为 48%,P-8 可能是 *O. olivacea* 的近源种 (NR\_164568.1)。

### 2.3 根部内生真菌多样性

春季、夏季、秋季三个季节共在小叶金露梅 45 个根段组织中分离得到 71 株真菌纯培养物,归属于 5 纲 5 目 5 科 6 属 8 个分类单元,结果显示,38 株菌株属于散囊菌纲 (Eurotiomycetes),25 株菌株属于子囊菌纲 (Ascomycetes),2 株菌株属于半知菌纲 (Deuteromyces),5 株属于座囊菌纲 (Dothideomycetes),1 株菌株属于锤舌菌纲 (Leotiomycetes)。

如图 3-4 所示,在属的水平上讨论小叶金露梅根部内生真菌的分离率和多样性。发现春季共分离得

表2 内生真菌 rDNA ITS 序列 BLAST 结果

Table 2 BLAST results of endophytical fungi in roots rDNA internal transcribed spacer sequences

| 菌株编号 | 亲缘关系最近的菌种                     | 亲缘关系最近种的 GenBank 登录号 | 覆盖比率/% | 序列相似率/% |
|------|-------------------------------|----------------------|--------|---------|
| P-2  | <i>Neurospora tetrasperma</i> | MN511320.1           | 100    | 100     |
| P-5  | <i>Aspergillus fumigatus</i>  | MN473284.1           | 100    | 100     |
| P-6  | <i>Penicillium citrinum</i>   | MT597828.1           | 100    | 100     |
| P-7  | <i>Torula herbarum</i>        | HQ703422.1           | 100    | 100     |
| P-8  | <i>Ochroconis olivacea</i>    | NR_164568.1          | 48     | 90.98   |

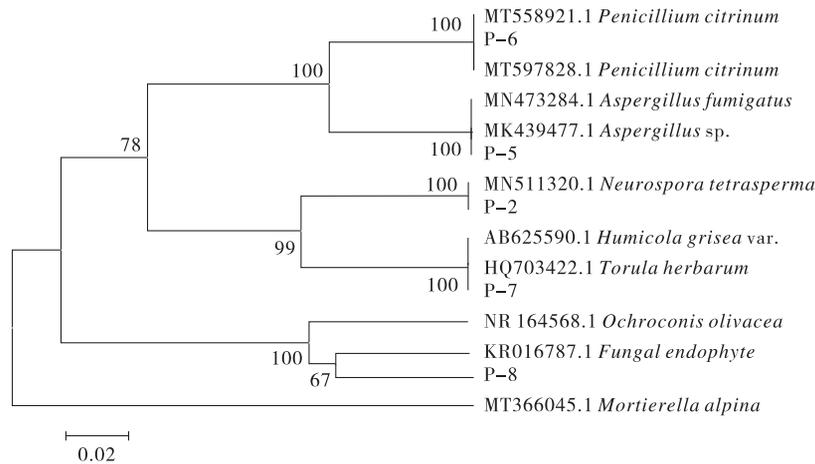


图2 由邻接法构建的 ITS 序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees generated from NJ analyses of the ITS genes of fungal endophytes

表3 不同季节小叶金露梅根部内生真菌的菌群组成

Table 3 Composition of endophytical fungi in roots of *P. parvifolia* in different seasons

| 纲                       | 目                  | 科                       | 属                      | 真菌种数 | 代表菌株        | 菌株数 |
|-------------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|------|-------------|-----|
| 散囊菌纲<br>Eurotiomycetes  | 散囊菌目<br>Eurotiales | 曲霉科<br>Aspergillaceae   | 曲霉属 <i>Aspergillus</i> | 3    | P-1、P-3、P-5 | 36  |
|                         |                    |                         | 青霉属 <i>Penicillium</i> | 1    | P-6         | 2   |
| 子囊菌纲<br>Ascomycetes     | 粪壳目<br>Sordariales | 粪壳科<br>Sordariaceae     | 脉孢菌属 <i>Neurospora</i> | 1    | P-2         | 25  |
| 半知菌纲<br>Deuteromycetes  | 丛梗孢目<br>Moniliales | 暗梗孢科<br>Dematiaceae     | 色串孢属 <i>Torula</i>     | 1    | P-7         | 2   |
| 座囊菌纲<br>Dothideomycetes | Venturiales        | Sympoventuri            | 赭霉属 <i>Ochroconis</i>  | 1    | P-8         | 5   |
| 锤舌菌纲<br>Leotiomycetes   | 柔膜菌目<br>Helotiales | 核盘菌科<br>Sclerotiniaceae | 葡萄孢属 <i>Botrytis</i>   | 1    | P-4         | 1   |

到4个属,分别是曲霉属、青霉属、脉孢菌属和色串孢属。其中曲霉属在分离得到的根部内生真菌中占优势地位,其相对频率为53.8%,分离率为60.0%,其次为脉孢菌属,相对频率为30.8%,分离率为33.3%,其余各菌所占相对频度和分离率较低,均在10.0%以下。夏季共分离出3个属,分别是曲霉属、脉孢菌属、赭霉属。其中曲霉属在分离得到的根部内生真菌中也占优势地位,其相对频率为50.0%,分离率为

60.0%,脉孢菌属和赭霉属次之,相对频率分别为29.2%和20.8%,分离率分别为33.3%和26.7%。秋季共分离出3个属,分别为曲霉属、脉孢菌属、葡萄孢属,其中脉孢菌属和曲霉属占比较高,相对频率均为47.6%,分离率为46.7%。

曲霉属和脉孢菌属为3个季节的共有属,且为优势属。此外,青霉属和色串孢属为春季特有属,赭霉属为夏季特有属,葡萄孢属为秋季特有属。

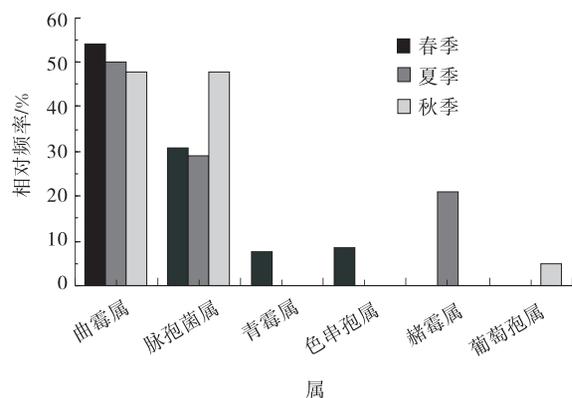


图3 不同季节小叶金露梅根部内生真菌的相对频率

Fig. 3 Relative frequency of endophytic fungi in roots of *Potentilla parvifolia* in different seasons

不同季节小叶金露梅根部内生真菌多样性呈现一定的差异,从丰富度指数来看,Margalef丰富度指数(R)表现为春季(1.06)最高、秋季(0.68)次之,夏季最低(0.65)。从物种多样性指数来看,Shannon—Wiener指数(H')和Simpson's diversity指数春季最高(1.57,0.75),其次是夏季(1.26,0.69)和秋季(1.08,0.62)。同时可以看出,3个季节的均匀度指数相差不大,因此可以认为小叶金露梅根部内生真菌均匀度指

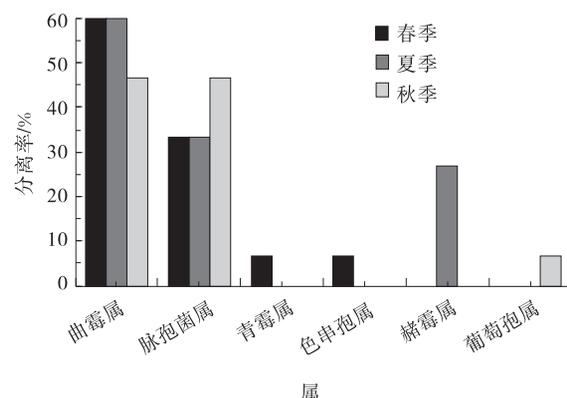


图4 不同季节小叶金露梅根部内生真菌的分离率

Fig. 4 Isolation rate of endophytic fungi in roots of *P. parvifolia* in different seasons

数受季节影响较小(表4)。

春季与夏秋两季的相似性系数都为0.6,而夏季与秋季的相似性系数为0.75,均表现出了较高的相似性,说明不同季节根部内生真菌种类有一定的差异,但差异不大,随着季节的变化,根部内生真菌种类和数量具有一定差异,春季根部内生真菌种类与数量均高于夏季和秋季,夏季和秋季根部内生真菌数量接近、种类差异小。

表4 不同季节小叶金露梅根部内生真菌多样性和丰富度指数

Table 4 Diversity and richness indexes of endophytic fungi in roots of *P. parvifolia* different seasons

| 指标 | 香农—威纳指数(H') | 辛普森多样性指数(1-D) | 均匀度指数(J) | 马加利夫多样性指数(R) | 物种数 | 菌株总数 |
|----|-------------|---------------|----------|--------------|-----|------|
| 春季 | 1.57        | 0.75          | 0.88     | 1.06         | 6   | 26   |
| 夏季 | 1.26        | 0.69          | 0.91     | 0.65         | 4   | 24   |
| 秋季 | 1.08        | 0.62          | 0.78     | 0.68         | 4   | 21   |

### 3 讨论

内生真菌是植物根系微生物群的主要组成成分,但是部分内生真菌的多样性和丰富度随环境的变化而变化,这些内生真菌在植物体内是季节性存在的,它们的多样性随着宿主的生理参数的变化而变化<sup>[23-24]</sup>。内生真菌的季节更替能够让宿主植物更好的适应不同生长发育阶段对营养的需求<sup>[25]</sup>。一般来说,真菌种类的多样性和丰富度在春夏较高,秋季略少,冬季最低<sup>[26]</sup>。本文对小叶金露梅根部内生真菌多样性指数、均匀度指数、丰富度指数和相似性指数在不同季节的分析比较表明,随着季节的变化,根部内生真菌种类和数量具有一定差异,春季根部内生真菌

多样性和丰富度指数高于夏季和秋季,该结果与大多数植物内生真菌的季节动态变化相同,张培良等人<sup>[21]</sup>对不同生长时期风丹的内生真菌进行分离鉴定,发现花期内生真菌的种类和数量均高于枯萎期;相延英等<sup>[27]</sup>对不同季节药用植物三尖杉的内生真菌进行分离鉴定,发现春季获得了较多种类的内生真菌。小叶金露梅根部内生真菌动态变化的原因可能是春季气候变暖,植物开始生长,越冬孢子开始萌发,真菌数量增多,为植被提供营养;夏季植株生长旺盛,对真菌依赖变小,优势菌种生长抑制其他菌株;秋季气温降低,土壤冷冻,植株停止生长,对真菌的需求变弱<sup>[22]</sup>。

本研究从不同季节小叶金露梅的细根中共分离得到了71株根部内生真菌,各个季节真菌种类有差

异,但优势属一致,均为脉孢菌属和曲霉属,说明这两个属的真菌在小叶金露梅根部的存在具有稳定性。*N. tetrasperma*具有高产酶、耐低温、耐碱的特性,能够高效降解纤维素;且其杀虫活性达到了化学农药水平<sup>[28-29]</sup>。除去共有属,各个季节还有其特有真菌,例如,青霉属和色串孢属是春季特有属,青霉属只在春季分离得到,且春季曲霉属真菌数量高于夏季和秋季,可能是因为春季植物开始返青,生长力强,需要大量能量,因此,需要更多的腐生真菌分解枯枝落叶,为植物提供营养。曲霉属和青霉属做为腐生真菌,可以分泌大量激素,维持植株大量正常的生理活动,具有腐生能力,能够分解枯枝落叶等凋落物,对生态系统养分循环具有促进作用<sup>[30-32]</sup>。*T. herbarum*属于色串孢属真菌,在陆地植物中对于色串孢属的研究较少,李明<sup>[33]</sup>曾在莲瓣兰中分离到色串孢属真菌,并对其氮源和碳源利用进行了研究,发现色串孢属对于氮源和碳源的利用能力均一般<sup>[34-35]</sup>。其在高寒灌木植物中的作用有待进一步研究。P-8是*O. olivacea*的近源种,可能是赭霉属真菌,赭霉属真菌在国内外文献中报道较少,它首次被发现于1973年,常引起煤污病,煤污病是一类发生在高温高湿地区的病害<sup>[36]</sup>。小叶金露梅中的赭霉属仅在夏季分离得到,而该地区夏季湿度和温度都高于其他季节。但是,所采样本为健康植株的根系,未见明显病害,赭霉属可能对小叶金露梅有潜在的危害或者在与小叶金露梅植株长期的协同进化中丧失了其致病性。因此,该菌株对小叶金露梅生长产生的具体作用亟需进一步研究。

传统内生真菌分离方法能分离到实体菌株,是许多试验和生产的基础,最大限度地分离出更多的菌株,能为后续试验提供更多的实体菌资源,为植物生长发育提供更多、更有价值的方案,并且能丰富我国实体菌株的种类<sup>[37]</sup>。本试验分离到的内生真菌种类总体较少,可能是分离方法的影响,包括培养基的选择,宿主植物组织碎片的大小,组织采样后处理的时间和培养条件极大地影响了内生真菌的分离<sup>[38]</sup>。后期可以改良分离方法,最大限度地分离出小叶金露梅根部可分离内生真菌。

## 4 结论

(1)春、夏、秋3个季节在小叶金露梅根段组织中

共分离得到5纲5目5科6属71株真菌;(2)不同季节的小叶金露梅根部内生真菌种类和数量存在一定差异,春季根部内生真菌多样性高于夏季和秋季,夏季和秋季内生真菌数量接近、种类差异小,优势属均为脉孢菌属和曲霉属。

### 参考文献:

- [1] Amo A A, Abdessamad D, Chaidir C, *et al.* Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(6): 1829-45.
- [2] Saikkonen K, Faeth S H, Helander M, *et al.* FUNGAL ENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants [J]. *Annual Review of Ecology & Systematics*, 1998, 29(1): 319-343.
- [3] 刘增亮,周双云,梁桂东,等. 量天尺根部内生真菌的多样性[J]. *菌物学报*, 2020, 39(4): 723-730.
- [4] 陈艳露,谢玲,刘斌,等. 广西香蕉根系内生真菌的群落组成与多样性[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(2): 385-398.
- [5] Wani Z A, Ashraf N, Mohiuddin T, *et al.* Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(7): 2955-2965.
- [6] 王云英,裴薇薇,辛莹,等. 青藏高原金露梅灌丛草甸水分利用效率长期变化特征[J]. *草业科学*, 2021, 38(9): 1671-1682.
- [7] 何俊龄. 金露梅对青藏高原高寒草甸植被特征和土壤性质的影响[D]. 兰州:兰州大学, 2017.
- [8] 马熙华,方金福. 高寒草地不同坡向金露梅种群空间分布格局研究[J]. *畜牧与饲料科学*, 2016, 37(Z1): 49-52.
- [9] 曹文侠. 祁连山高寒杜鹃灌丛草地地下生态及对干扰的响应[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2007.
- [10] 贺翔,白梅梅,徐长林,等. 东祁连山小叶金露梅+杯腺柳灌丛草地植被和土壤对其自然恢复演替的响应[J]. *草业学报*, 2021, 30(8): 12-24.
- [11] 王启基,周兴民,张堰青,等. 青藏高原金露梅灌丛的结构特征及其生物量[J]. *西北植物学报*, 1991, 11(4): 333-340.
- [12] 李红琴,李英年,张法伟,等. 基于静态箱式法和生物量评估海北金露梅灌丛草甸碳收支[J]. *生态学报*, 2014, 34(4): 925-932.
- [13] 曹文侠,张德罡,洪绂曾. 祁连山高寒灌丛草地杜鹃属植物的水分动态及生态适应[J]. *草地学报*, 2006, 14(1):

- 67-71.
- [14] 王金兰,曹文侠,张德罡,等. 东祁连山高寒杜鹃灌丛群落结构和物种多样性对海拔梯度的响应[J]. 草原与草坪,2019,39(5):1-9.
- [15] 刘仁阳,欧静,李冠楠,等. 梵净山雷山杜鹃根部真菌分离与鉴定[J]. 西北农业学报,2014,23(4):178-185.
- [16] 王晓国,卢家仕,周主贵,等. 带叶兜兰菌根真菌分离和初步鉴定[J]. 西南农业学报,2016,29(2):316-320.
- [17] 唐燕,李敏,马焕成,等. 云南轿子山腋花杜鹃菌根多样性研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),2019,41(5):1062-1072.
- [18] 袁继鑫. 野生蓝莓菌根真菌的分离、鉴定及接种效应[D]. 北京:北京林业大学,2013
- [19] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科技出版社,1979:1-55
- [20] 沈亚恒,叶东海. 中国真菌志[M]. 北京:科学出版社,2006.
- [21] 张培良,王国凯,郁阳,等. 不同生长时期凤丹内生真菌的分离鉴定及多样性研究[J]. 安徽中医药大学学报,2016,35(5):78-82.
- [22] 吕立新,王宏伟,梁雪飞,等. 不同化学型和季节变化对茅苍术内生真菌群落多样性的影响[J]. 生态学报,2014,34(24):7300-7310.
- [23] Aly A H,Debbab A,Kje J, *et al.* Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity*, 2010, 41:1-16.
- [24] Muhmmod U, Tania H, Hannzh E R F, *et al.* Mycorrhizal Symbiosis for Better Adaptation of Trees to Abiotic Stress Caused by Climate Change in Temperate and Boreal Forests[J]. *Frontiers in Forests and Global Change*, 2021(4):1-9.
- [25] 张俊忠. 东祁连山高寒草地土壤真菌多样性研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2010.
- [26] Christopher W S, Andrew P M, David A L, L, *et al.* Seasonal Dynamics of Previously Unknown Fungal Lineages in Tundra Soils[J]. *Science*, 2003, 301(5638):1359-1361.
- [27] 相延英,明乾良,李文超,等. 三尖杉内生真菌的季节动态和组织分布研究[J]. 药学实践杂志,2013,31(4):267-270.
- [28] 李健. 三株耐低温纤维素降解菌的筛选及性能研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2018.
- [29] 李昉,杜方鹏. 一株牛蒡共生真菌杀虫活性的研究[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(9):1357-1360+1397.
- [30] Abd-Elaah Gamalat A, Soliman A Samya. Occurrence of Fungal Species and Mycotoxins from Decayed Sugar-cane (*Saccharum officinarum*) in Egypt. [J]. *Mycobiology*, 2005, 33(2):76-83.
- [31] Yang Fangqing, Yang Dan, Liu Sujuan, *et al.* Use of High-Throughput Sequencing to Identify Fungal Communities on the Surface of Citri Reticulatae Pericarpium During the 3-Year Aging Process[J]. *Current microbiology*, 2021, 78(8):3142-3151.
- [32] Berch S M, Allen T R, Berbee M L. Molecular detection, community structure and phylogeny of ericoid mycorrhizal fungi[J]. *Plant & Soil*, 2002, 244(1-2):55-66.
- [33] 李明. 莲瓣兰菌根研究[J]. 云南师范大学学报(自然科学版),2004,24(1):55-57.
- [34] 李明,周斌,施继惠,等. 莲瓣兰内生真菌利用碳源的生理学特性研究[J]. 大理学院学报(自然科学),2006,5(4):1-3.
- [35] 李明,周斌,施继惠,等. 莲瓣兰内生真菌对氮源利用的研究[J]. 楚雄师范学院学报,2006,21(6):50-53.
- [36] 高柳. 接瓶霉属、链丝孢属、杯梗孢属等煤污病相关属系统学及多样性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2016.
- [37] 董梅,田友文,董坤,等. 矮丛越橘“美登”根系共生真菌的分离与鉴定[J]. 吉林农业大学学报,2019,41(4):419-425.
- [38] Vega F E, Simpkins A, Aima M C, *et al.* Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico[J]. *Fungal Ecology*, 2010, 3(3):122-138

by affecting soil physical and chemical properties and nutrient content, Therefore, by improving grazing management, the organic carbon storage and the stability of soil organic carbon can be maintained or further increased, and the prohibition of grazing in healthy grassland is not conducive to the accumulation of soil organic carbon.

**Key words:** alpine meadow; different land use methods; soil organic carbon; inert carbon

(责任编辑 康宇坤)

(上接95页)

## Seasonal response of endophytic fungal diversity in roots of *Potentilla parvifolia* in alpine scrub meadow of eastern Qilian Mountains

DENG Xiu-xia<sup>1</sup>, CAO Wen-xia<sup>1\*</sup>, WANG Shi-lin<sup>1</sup>, WANG Wen-hu<sup>1</sup>,  
LIU Wan-ting<sup>1</sup>, LI Wen<sup>2</sup>

(1. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Grassland Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China; 2. Qinghai Academy of Animal and Veterinary Sciences (Academy of Animal and Veterinary Sciences, Qinghai University), Xining 810016, China)

**Abstract:** 【Objective】 To determine the diversity and seasonal variation of culturable endophytic fungi in the roots of *Potentilla parvifolia* in alpine region. 【Method】 *Potentilla parvifolia*, a dominant shrub in the eastern Qilian Mountains was used as the test material. The endophytic fungi in root were isolated by tissue culture, and their seasonal diversity was analyzed by morphological identification combined with ITS molecular sequencing. 【Result】 71 pure fungi were isolated from the tissue of the golden dew rhizome in spring, summer and autumn, belonging to 8 taxa of 5 classes, 5 orders, 5 families, 6 genera. There were some differences in the species and quantity of endophytic fungi in the roots of *Potentilla parvifolia* in different seasons. From the diversity index, Shannon-Wiener index and Simpson's diversity index showed as spring (1.57, 0.75) > summer (1.26, 0.69) > autumn (1.08, 0.62). The diversity of endophytic fungi in the roots in spring was higher than that in summer and autumn, but the dominant genera were *Neurospora* and *Aspergillus*. The endemic genera in spring were *Penicillium* and *Torula*; *Ochroconis* was endemic in summer, and *Botrytis* was endemic in autumn. 【Conclusion】 The endophytic fungi were isolated from the roots of *Potentilla parvifolia* in different seasons, and the endophytic fungi colonization in the roots of *Potentilla parvifolia* had seasonal differences, The diversity of endophytic fungi in the roots in spring was higher.

**Key words:** *Potentilla parvifolia*; endophytic fungi; molecular identification; seasonal diversity

(责任编辑 康宇坤)