



研究报告

两种不同白粉病抗性野生蔷薇内生真菌群落结构

白维晓^{Δ1} 孙玮宏^{Δ1} 肖瑞桐² 朱政清¹ 高咏涵¹ 吴光丽¹ 李海燕^{*1}

1 昆明理工大学医学院 云南 昆明 650500

2 云南师范大学附属中学 云南 昆明 650500

摘要:【背景】白粉病是蔷薇、月季等观赏植物的主要病害,提高其白粉病抗性是花卉产业亟待解决的难题。内生菌在增强植物抗病性能方面的益处已经得到证实。大理紫花是一种白粉病高抗野生蔷薇,而七姐妹是一种高感野生蔷薇,目前对两者在内生菌群落结构及功能方面的异同尚不清楚。

【目的】对比研究白粉病高抗和高感两种野生蔷薇内生菌群落组成的异同,探索内生菌在宿主植物白粉病抗性中可能发挥的生态学功能,为蔷薇白粉病防治提供新思路。【方法】通过传统的内生真菌分离培养方法,结合形态学特征和分子生物学分析确定所获菌株的分类地位,对白粉病高抗和高感两种野生蔷薇内生真菌群落组成进行对比分析。【结果】从两种不同白粉病抗性野生蔷薇的2880个组织块中,共分离得到2003株内生真菌,其中从大理紫花得到1333株,从七姐妹得到670株。它们分属于链格孢属(*Alternaria*)、炭角菌属(*Xylaria*)和拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)等30个分类单元。其中链格孢(*A. alternata*)、平头刺盘孢(*C. truncatum*)和拟茎点霉(*Phomopsis amygdali*)为两种蔷薇在白粉病暴发各时期的共有优势菌,而盘毛孢(*Seimatosporium* sp.)、鬼伞(*Coprinellus* sp.)和球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)等则只存在于大理紫花或七姐妹一种植物中。【结论】在白粉病暴发进程中,白粉病高抗野生蔷薇大理紫花与高感蔷薇七姐妹的内生真菌多样性及群落结构明显不同。且随着时间的推移,七姐妹的内生真菌多样性逐渐增加,而大理紫花的却逐渐减少。但在各采样时间点,高抗蔷薇内生真菌的数量和平均定殖率均明显高于高感蔷薇($P<0.05$,卡方检验)。大理紫花中存在一些特有和优势内生真菌,它们在大理紫花白粉病抗性中的功能有待进一步深入研究。

关键词: 野生蔷薇, 内生真菌, 白粉病抗性, 内生菌群落, 多样性

Fungal endophytic communities of two wild *Rosa* species with different powdery mildew susceptibilityBAI Wei-Xiao^{Δ1} SUN Wei-Hong^{Δ1} XIAO Rui-Tong² ZHU Zheng-Qing¹
GAO Yong-Han¹ WU Guang-Li¹ LI Hai-Yan^{*1}

1 Medical School of Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China

2 The High School Affiliated to Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China

Abstract: [Background] Powdery mildew (PM) is one of the most devastating diseases in rose and other

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31560566)

^ΔThese authors equally contributed to this work

***Corresponding author:** E-mail: lhyxn@163.com

Received: 04-07-2018; **Accepted:** 09-11-2018; **Published online:** 29-01-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31560566)

^Δ对本文贡献相同

***通信作者:** E-mail: lhyxn@163.com

收稿日期: 2018-07-04; **接受日期:** 2018-11-09; **网络首发日期:** 2019-01-29

ornamental plants, however, there is no better way to control it until now. Previous studies have demonstrated that endophytes are beneficial to host plant's disease resistance. *Rosa multiflora* and *R. multiflora* var. *carnea* is a PM resistant and susceptible rose species, respectively. It's not clear about the difference of their fungal endophytic communities and their function. **[Objective]** To study the difference of the fungal endophytic communities between two rose species and to understand the possible role of endophytes on PM resistance. **[Methods]** The culturable endophytic fungi (EF) were isolated from two rose species at different developing stage of PM by traditional EF isolation methods. **[Results]** A total of 2 003 endophytic fungi were isolated from 2 880 tissue segments of 24 samples of two rose species, of which 1 333 from *R. multiflora* and 670 from *R. multiflora* var. *carnea*. The isolates were identified to 30 taxa according to the morphological characteristics and the rDNA internal transcribed spacer (ITS) analysis, of which *Alternaria alternata*, *C. truncatum* and *Phomopsis amygdali* were the dominant genera of two rose species at different developing stage of PM. Contrary to this, *Seimatosporium* sp., *Coprinellus* sp. and *Chaetomium globosum* etc. were only found in *R. multiflora* or *R. multiflora* var. *carnea*. **[Conclusion]** The fungal endophytic community of *R. multiflora* showed significantly difference from that of *R. multiflora* var. *carnea*. The average colonization rate (CR) of EF from *R. multiflora* was significantly higher than that of *R. multiflora* var. *carnea* at each developing stage of PW ($P < 0.05$, Chi-square test). The role of the specific and dominant EF of *R. multiflora* in PM resistance were further studied in the future.

Keywords: Wild *Rosa* species, Endophytic fungi, Powdery mildew resistance, Endophytic community, Diversity

作为被子植物第五大科, 蔷薇科(Rosaceae)植物在世界范围内广泛分布, 共有 120 多属, 3 300 多种, 其中大部分具有较高的观赏价值。蔷薇白粉病(Powdery mildew)是蔷薇、月季、玫瑰等花卉普遍发生的病害。白粉病菌(*Podosphaera pannosa*)一般以菌丝体在休眠芽内、病叶、病梢上越冬, 翌年条件适宜时形成分生孢子, 借风力传播^[1]。白粉病严重时, 受害植株的幼嫩器官满布白粉, 致植株失去观赏价值^[2]。目前蔷薇白粉病的主要防治措施是喷洒化学药剂。然而, 长期使用化学药剂不仅造成环境污染、增加生产成本和农药残留, 同时还会增强植株的抗药性^[3]。因此, 绿色环保的生物防治方法越来越受到人们的青睐。

植物内生菌因长期定殖于植物组织内部, 与宿主植物协同进化, 二者形成了一种非常复杂的共生关系^[4], 并能显著提高宿主植物对各种生物胁迫(病虫害、病原体等)和非生物胁迫(干旱、高盐、高温、低温、重金属等)的抵抗能力^[5-6], 因此成为植物病害防治的首选生物制剂之一^[7]。我国蔷薇科植物资源丰富, 占世界蔷薇科植物总数的 1/3, 其内

生菌有着巨大的开发应用潜力。已有研究表明, 蔷薇科植物内生菌在抑菌方面展现出优良活性, 例如国政对蔷薇科植物内生菌进行抑菌活性研究发现, 部分内生菌具有优良的抗真菌和抗细菌活性^[8]。大理紫花(*Rosa multiflora*)是一种白粉病高抗野生蔷薇, 而七姐妹(*R. multiflora* var. *carnea*)是一种高感野生蔷薇, 目前对两者在内生菌群落结构及功能方面的异同尚不清楚。因此, 本研究对生长于云南省大理市下关镇境内的两种不同白粉病抗性野生蔷薇在白粉病暴发不同时期的内生真菌多样性及群落结构进行比较研究, 拟发现可能在蔷薇白粉病抗性中发挥关键作用的内生菌株(群), 为植物-微生物协同进化研究奠定基础, 同时为蔷薇白粉病生防提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

葡萄糖、琼脂、青霉素、硫酸链霉素, 北京鼎国昌盛生物科技有限公司; 磷酸氢二钠、二氧化硅, 天津市人船化学试剂科技有限公司; β -巯基乙醇、异丙醇, 昆明中云美生物技术有限公司; Trisbase,

NOVON 公司; 聚乙烯吡咯烷酮, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 低温高速离心机, LaboGene 公司。

1.2 植物样品采集

野生蔷薇样品分别于 2015 年 5、6、7、8 月份的 15 号采自大理市下关镇(5-8 月份基本覆盖了白粉病暴发的前、中、后期)。其中白粉病高抗野生蔷薇大理紫花采自大理紫光园艺合作社种植基地(100°10'58"E, 25°40'59"N)和感通索道附近(100°10'13"E, 25°38'51"N), 而白粉病高感野生蔷薇七姐妹采自大理紫光园艺合作社种植基地。样品采集按 S 形方法进行, 每个样品 3 个重复。采集时, 随机选取 20 个约 50 cm 长的带叶枝段, 用无菌剪刀剪下并立即放入无菌牛皮纸袋中, 冷藏条件下带回实验室并于 24 h 内处理完毕。

1.3 分离纯化内生真菌

从每个样品中随机选取 15 个枝段, 分为茎和叶后于自来水下洗净, 茎剪成大约 5 cm 的片段, 叶保持完整, 然后置于体积分数 75% 的乙醇中漂洗 3 min、无菌水冲洗 3 次后, 再置于 5% 的 NaClO 溶液中漂洗 2 min、无菌水冲洗 3 次, 用无菌滤纸吸干水分。无菌条件下将样品剪成大小约 0.5 cm×0.5 cm 的片段, 并从每个样品中随机选取 60 个贴于 PDA 平板中, 25 °C 恒温培养 3-45 d, 隔天观察, 当植物片段周围有真菌长出时, 将其挑出、分离纯化后用于菌株的分类鉴定和保藏^[9]。利用组织印迹法和漂洗液检验法来检验组织块表面消毒是否彻底。

1.4 内生真菌的鉴定

结合形态学特征和分子生物学分析结果对所获菌株进行鉴定^[10-12]。

形态学特征主要包括菌落形态、孢子形态、产孢结构以及产孢方式等。不产孢的菌株首先进行促孢培养, 产孢后按上述方法进行鉴定。对于促孢培养超过一个月(一般 45 d)仍然不产孢的菌株, 则依

据菌落形态特征、菌丝生长速率和菌丝颜色等分为不同的无孢类群组。

分子生物学分析: 根据菌株的形态学特征, 将所获菌株分为不同的形态类群, 并从每个类群中随机选取菌株 3-7 株, 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取总 DNA, 并用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行扩增, 然后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 合格后送昆明硕擎生物科技有限公司进行测序。所获序列与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上的已知序列进行比对, 然后根据序列的相似度和覆盖率, 以及菌株的形态学特征确定其分类地位。

1.5 数据统计分析

定殖率常用来衡量植物中内生菌的丰度, 而相对分离频率则用来衡量植物中某一类内生真菌的优势度, 分别按下列公式计算^[13-14]。

$$\text{定殖率} = \frac{\text{被内生真菌感染的组织块数}}{\text{实验供试的总组织块数}},$$

$$\text{相对分离频率(\%)} =$$

$$\frac{\text{样本中分到的某种内生真菌的菌株数}}{\text{分到的总菌数}}。$$

卡方检验(Chi-square test)被用于不同样品之间内生真菌分离频率的比较, 当 $P < 0.05$ 时, 差异显著。

香浓多样性指数(Shannon index)(H')反映了植物样品中内生真菌的物种多样性, 按下列公式计算:

$$H' = -\sum_{i=1}^k P_i \times \ln P_i$$

式中 P_i 指某一类内生真菌的数量占全部内生真菌数量的百分比。

相似性系数(Sorenson index)(C_s)常用来比较两种植物之间内生真菌组成的相似程度, 按下列公式计算:

$$C_s = 2j/(a+b)$$

式中 j 指两个样品之间共有的内生真菌种类, a 和 b 则指每一种植物所特有的内生真菌种类。

2 结果与分析

2.1 内生真菌的定殖率

从表 1 可以看出,从大理紫花、七姐妹两种植物共 2 880 个组织块中(5、6、7、8 月份采样,每个样品 3 个重复,共 24 个样品),共分离纯化获得内生真菌菌株 2 003 株,其中从大理紫花中获得

1 333 株,从七姐妹中获得 670 株。各月份大理紫花样品中内生真菌的平均定殖率及其高低依次为 7 月份(84.17%)>8 月份(73.06%)>5 月份(54.45%)>6 月份(50.83%),而七姐妹的则为 8 月份(52.50%)>7 月份(45.83%)>6 月份(35.00%)>5 月份(9.72%) (图 1)。可以看出,七姐妹每个月份内生真菌的平均定殖率

表 1 大理紫花和七姐妹供试组织块数及所分离到菌株数
Table 1 Number of tissues and endophytic fungi isolated from *R. multiflora* and *R. multiflora* var. *carnea*

宿主植物 Host plant	采样时间 Sampling time	重复 Replicate	实验组织块数(长内生菌组织块数) Number of tissues tested (Number of tissues colonized by endophytic fungi)			菌株数 Strain number		
			叶 Leaf	茎 Stem	总数 Total	叶 Leaf	茎 Stem	总数 Total
大理紫花 <i>R. multiflora</i>	五月份 May	1	60 (32)	60 (60)	120 (92)	38	92	130
		2	60 (10)	60 (31)	120 (41)	11	31	42
		3	60 (3)	60 (60)	120 (63)	3	99	102
	六月份 June	1	60 (23)	60 (34)	120 (57)	31	44	75
		2	60 (27)	60 (38)	120 (65)	34	47	81
		3	60 (31)	60 (30)	120 (61)	43	37	80
	七月份 July	1	60 (49)	60 (52)	120 (101)	76	72	148
		2	60 (60)	60 (56)	120 (116)	97	83	180
		3	60 (50)	60 (36)	120 (86)	77	39	116
	八月份 August	1	60 (49)	60 (37)	120 (86)	78	53	131
		2	60 (54)	60 (21)	120 (75)	83	33	116
		3	60 (59)	60 (43)	120 (102)	85	47	132
	总数 Total		720 (447)	720 (498)	1 440 (945)	656	677	1 333
七姐妹 <i>R. multiflora</i> var. <i>carnea</i>	五月份 May	1	60 (14)	60 (3)	120 (17)	15	3	18
		2	60 (10)	60 (3)	120 (13)	9	3	12
		3	60 (4)	60 (1)	120 (5)	7	1	8
	六月份 June	1	60 (31)	60 (12)	120 (43)	38	13	51
		2	60 (20)	60 (15)	120 (35)	29	15	44
		3	60 (36)	60 (12)	120 (48)	49	13	62
	七月份 July	1	60 (26)	60 (22)	120 (48)	55	28	83
		2	60 (16)	60 (26)	120 (42)	17	35	52
		3	60 (60)	60 (15)	120 (75)	74	17	91
	八月份 August	1	60 (43)	60 (37)	120 (80)	56	46	102
		2	60 (29)	60 (23)	120 (52)	37	30	67
		3	60 (33)	60 (24)	120 (57)	48	32	80
	总数 Total		720 (322)	720 (193)	1 440 (515)	434	236	670

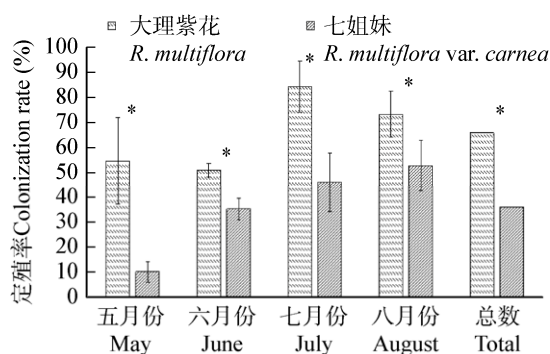


图 1 不同采样时间大理紫花和七姐妹内生真菌的平均定殖率

Figure 1 The average colonization rate of endophytic fungi from *R. multiflora* and *R. multiflora* var. *carnea* at different sampling times

注: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=3$. *: 大理紫花组与七姐妹组有显著差异 ($P < 0.05$, 卡方检验).

Note: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=3$. *: Significant difference between *R. multiflora* and *R. multiflora* var. *carnea* at $P < 0.05$ (Chi-square test).

均低于大理紫花, 且达到差异显著 ($P < 0.05$, 卡方检验)。从内生真菌在各组织部位的定殖来看, 除大理紫花在 5、6 月份其内生真菌平均定殖率为茎高于叶外, 其余所有样品均为茎内生真菌平均定殖率低于叶。

2.2 内生真菌的组成

所有进行过分子鉴定菌株的 ITS 序列已提交到 GenBank (表 2)。结合形态学特征, 来自大理紫花的 1 333 株内生真菌被鉴定为葡萄座腔菌属 (*Botryosphaeria*)、叶点霉 (*Phyllosticta capitalensis*) 和暗孢节菱孢菌 (*Arthrinium phaeospermum*) 等 27 个分类单元, 其中 23 个已鉴定到属, 部分到种, 但仍然有 4 个不能确定分类地位; 来自七姐妹的 670 株内生真菌则被鉴定为刺盘孢属 (*Colletotrichum*)、炭角菌属 (*Xylaria*) 和拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*) 等 27 个分类单元。同样, 其中 23 个已鉴定到属或种, 仍然有 4 个不能确定分类地位 (表 2)。白粉病高抗和高感两种野生蔷薇不仅内生真菌的种类不同, 其优势内生真菌也各不相同。平头刺盘孢 (*C. truncatum*)、拟茎点霉 (*P. amygdali*) 和盘长孢状刺盘孢 (*C.*

gloeosporioides) 是大理紫花的优势内生真菌, 其相对分离频率分别为 9.60%、15.15% 和 25.28%, 而平头刺盘孢、叶点霉和链格孢 (*A. alternata*) 是七姐妹的优势内生真菌, 其相对分离频率分别为 12.69%、12.69%、18.51%。在 6 月份和 7 月份, 盘长孢状刺盘孢在大理紫花中的优势较突出, 相对分离频率高达 23.09%。相反, 有些种类的内生真菌仅存在于某一种植物或植物的某一阶段, 例如盘毛孢 (*Seimatosporium* sp.) 属真菌仅存在于大理紫花中, 而鬼伞 (*Coprinellus* sp.) 仅存在于七姐妹中。同样, 暗孢节菱孢菌仅存在大理紫花 5 月份和 7 月份的叶中, 而球毛壳菌 (*C. globosum*) 仅存在于大理紫花 7 月份和 8 月份的茎及七姐妹 8 月份的叶中。

对同一采样时间不同白粉病抗性蔷薇样品的内生真菌组成分析 (图 2) 表明, 它们的内生真菌群落结构存在差异, 因此均不聚集在一起。在白粉病暴发的各阶段, 内生真菌的优势情况也有所不同, 如在大理紫花 8 月份样品中, 盘长孢状刺盘孢有很高的相对分离频率, 其在 6 月份和 7 月份样品中也处于极其优势的地位。

2.3 内生真菌的多样性及相似性

在白粉病暴发进程中 (5–8 月份), 七姐妹内生真菌的香浓多样性指数依次为 1.88、2.15、2.31、2.52 (表 2), 而大理紫花的依次为 2.41、2.39、2.38、1.85。可以看出, 在每个采样时间点, 大理紫花和七姐妹的内生真菌多样性不同。且随着时间的推移, 七姐妹内生真菌的多样性逐渐增加, 而大理紫花的却逐渐减少。此外, 大理紫花与七姐妹各采样点之间内生真菌的相似性也不尽相同。大理紫花各样品之间内生真菌的相似性系数介于 0.58–0.88, 七姐妹介于 0.53–0.89, 而大理紫花与七姐妹之间介于 0.43–0.89 (表 3)。其中内生真菌的相似性系数最高的是 6 月份的大理紫花与 6 月份的七姐妹, 以及 6 月份的七姐妹与 7 月份的七姐妹, 均为 0.89; 而内生真菌相似性系数最低的是介于 8 月份的大理紫花与 5 月份的七姐妹, 仅为 0.43。

表 2 不同采样时间大理紫花与七姐妹内生真菌的相对分离频率和多样性

Table 2 Relative frequency (RF) and diversity (H') of endophytic fungi from *R. multiflora* and *R. multiflora* var. *carnea*

种属名 Taxa	NCBI 登录号 Accession No.	内生真菌的数量及相对分离频率(RF)								总数 Total
		Number and relative isolation frequency of endophytic fungi (RF)								
		大理紫花				七姐妹				
		<i>R. multiflora</i>				<i>R. multiflora</i> var. <i>carnea</i>				
		五月份 May	六月份 June	七月份 July	八月份 August	五月份 May	六月份 June	七月份 July	八月份 August	
<i>Alternaria alternata</i>	MH050983	47 (17.15)	25 (10.59)	21 (4.73)	2 (0.53)	16 (42.11)	58 (36.94)	30 (13.27)	20 (8.03)	219 (10.93)
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	MH050994	1 (0.36)	—	2 (0.45)	—	1 (2.63)	—	1 (0.44)	2 (0.80)	7 (0.35)
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MH050975	9 (3.28)	11 (4.66)	29 (6.53)	14 (3.69)	—	2 (1.27)	8 (3.54)	7 (2.81)	80 (3.99)
<i>Botryosphaeria laricina</i>	MH051055	28 (10.22)	9 (3.81)	30 (6.76)	12 (3.17)	2 (5.26)	1 (0.64)	4 (1.77)	5 (2.01)	91 (4.54)
<i>Chaetomium globosum</i>	MH051110	—	—	1 (0.23)	1 (0.26)	—	—	—	1 (0.40)	3 (0.15)
<i>Chrysosporthe</i> sp.	MH050990	3 (1.09)	1 (0.42)	4 (0.90)	—	—	3 (1.91)	42 (18.58)	—	53 (2.65)
<i>Cladosporium</i> sp.	MH051013	4 (1.46)	5 (2.12)	4 (0.90)	6 (1.58)	3 (7.89)	3 (1.91)	1 (0.44)	19 (7.63)	45 (2.25)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	MH050981	17 (6.20)	62 (26.27)	95 (21.40)	163 (43.01)	—	12 (7.64)	6 (2.65)	46 (18.47)	401 (20.02)
<i>Colletotrichum truncatum</i>	MH050987	4 (1.46)	18 (7.63)	35 (7.88)	71 (18.73)	2 (5.26)	27 (17.20)	11 (4.87)	45 (18.07)	213 (10.63)
<i>Coprinellus</i> sp.	MH051015	—	—	—	—	2 (5.26)	—	—	2 (0.80)	4 (0.20)
<i>Didymosphaeria variabile</i>	MH051016	40 (14.60)	2 (0.85)	—	—	4 (10.53)	3 (1.91)	—	1 (0.40)	50 (2.50)
<i>Fusarium oxysporum</i>	MH050977	11 (4.01)	6 (2.54)	3 (0.68)	13 (3.43)	—	2 (1.27)	1 (0.44)	2 (0.80)	38 (1.90)
<i>Parastagonospora avenae</i>	MH050979	—	5 (2.12)	17 (3.83)	1 (0.26)	—	1 (0.64)	3 (1.33)	1 (0.40)	28 (1.40)
<i>Passalora</i> sp.	MH050974	7 (2.55)	22 (9.32)	47 (10.59)	9 (2.37)	5 (13.16)	2 (1.27)	9 (3.98)	3 (1.20)	104 (5.19)
<i>Penicillium</i> sp.	--	7 (2.55)	—	1 (0.23)	—	—	1 (0.64)	12 (5.31)	5 (2.01)	26 (1.30)
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	MH050973	1 (0.36)	—	2 (0.45)	4 (1.06)	—	2 (1.27)	5 (2.21)	8 (3.21)	22 (1.10)
<i>Phoma</i> sp.	MH051043	—	1 (0.42)	—	1 (0.26)	—	—	—	1 (0.40)	3 (0.15)
<i>Phomopsis amygdali</i>	--	56 (20.44)	33 (13.98)	56 (12.61)	57 (15.04)	2 (5.26)	18 (11.46)	38 (16.81)	25 (10.04)	285 (14.23)
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	MH050989	25 (9.12)	7 (3.00)	74 (16.67)	14 (3.69)	—	5 (3.18)	46 (20.35)	34 (13.65)	205 (10.23)
<i>Seimatosporium</i> sp.	MH051045	1 (0.36)	9 (3.81)	7 (1.58)	—	—	—	—	—	17 (0.85)
<i>Stemphylium vesicarium</i>	MH050984	5 (1.82)	16 (6.78)	10 (2.25)	—	1 (2.63)	8 (5.10)	2 (0.88)	—	42 (2.10)
<i>Tilletiopsis</i> sp.	MH050997	6 (2.19)	2 (0.85)	2 (0.45)	—	—	3 (1.91)	4 (1.77)	—	17 (0.85)
<i>Xylaria</i> sp.	MH051126	—	1 (0.42)	1 (0.23)	3 (0.79)	—	3 (1.91)	2 (0.88)	4 (1.61)	14 (0.70)
<i>Zymoseptoria tritici</i>	MH051017	—	—	—	5 (1.32)	—	—	1 (0.44)	5 (2.01)	11 (0.55)
Unidentified 1	--	1 (0.36)	1 (0.42)	1 (0.23)	—	—	3 (1.91)	—	3 (1.20)	9 (0.45)
Unidentified 2	--	—	—	1 (0.23)	2 (0.53)	—	—	—	—	3 (0.15)
Unidentified 3	--	—	—	—	—	—	—	—	2 (0.80)	2 (0.10)
Unidentified 4	--	1 (0.36)	—	1 (0.23)	—	—	—	—	—	2 (0.10)
Unidentified 5	--	—	—	—	—	—	—	—	5 (2.01)	5 (0.25)
Unidentified 6	--	—	—	—	1 (0.26)	—	—	—	3 (1.20)	4 (0.20)
总数 Total		274 (100)	236 (100)	444 (100)	379 (100)	38 (100)	157 (100)	226 (100)	249 (100)	2 003 (100)
多样性 Diversity (<i>H'</i>)		2.41	2.39	2.38	1.85	1.88	2.15	2.31	2.52	2.60

注: —: 未分离到菌株; --: 未进行分子鉴定或分子鉴定后仍不能确定种属。

Note: —: Endophytic fungi were not recovered; --: Didn't performed molecular identification or taxon was not clear even after molecular identification.

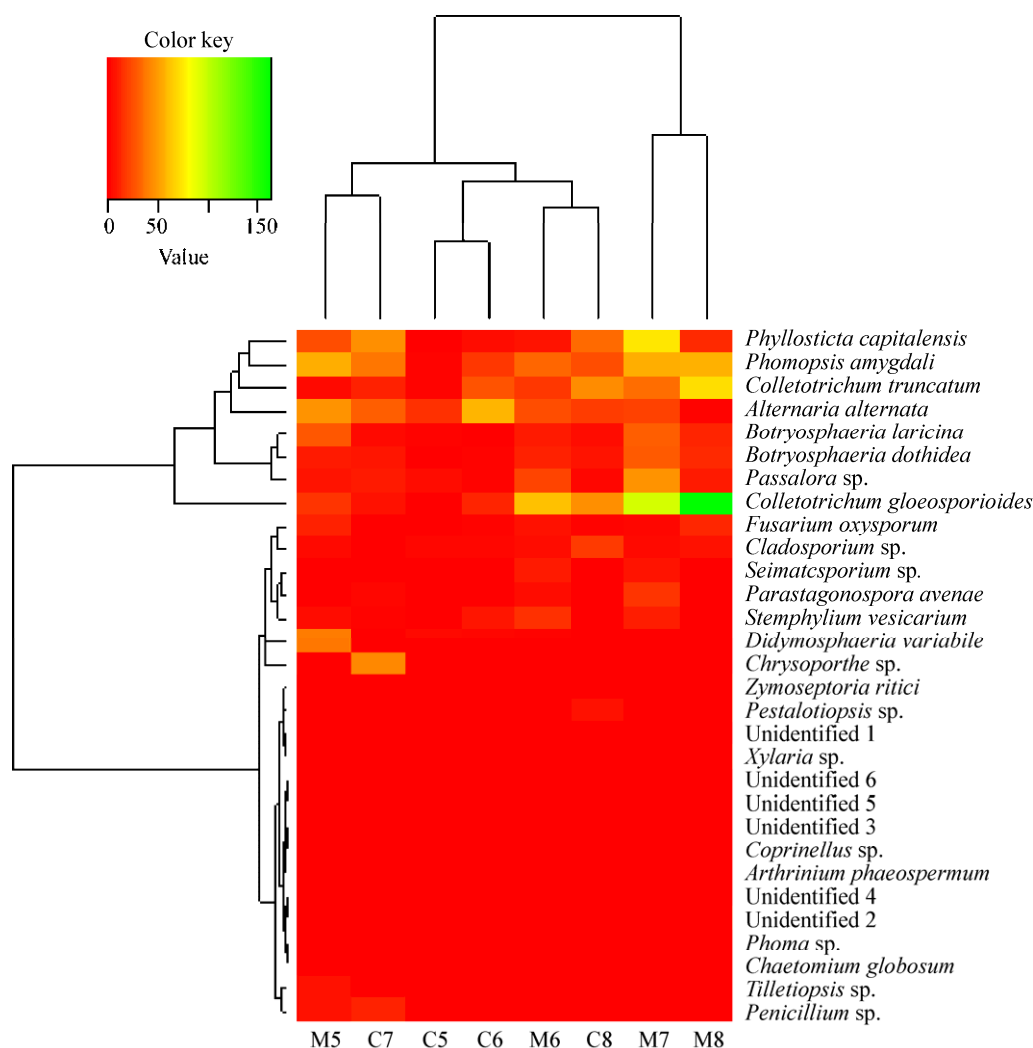


图2 大理紫花与七姐妹不同采样时间内生真菌种水平的相对丰度热图

Figure 2 The heat map of the relative abundance of culturable fungal endophytes of *R. multiflora* and *R. multiflora* var. *carnea* on species level at different sampling times

注：纵坐标为样品中所含物种名称，按照类群的总平均丰度从大到小排列，丰度用不同颜色表征(绿色代表高丰度)，横坐标为样品编号。M：白粉病高抗野生蔷薇大理紫花(*Rosa multiflora*)；C：白粉病高感野生蔷薇七姐妹(*R. multiflora* var. *carnea*)；5、6、7、8：分别代表采样时间5月份、6月份、7月份、8月份。

Note: The ordinate is the name of the species, which is arranged from higher to lower according to the total average abundance of the taxa, and the abundance is characterized by different colors (Green represents higher abundance), and the abscissa is the sample number. M: *R. multiflora*; C: *R. multiflora* var. *carnea*; 5, 6, 7, 8: The sampling times of May, June, July and August.

3 讨论与结论

3.1 不同白粉病抗性野生蔷薇内生真菌的数量和平均定殖率

已有研究表明,内生真菌在植物体内大量繁殖并占据位点,从而与病原微生物竞争营养,是生防菌防治病害的重要途径之一。我们的研究结果表

明,在各采样时间点,大理紫花内生真菌的数量和平均定殖率均高于七姐妹,且差异显著。同样,刘素芳等^[15]研究发现,抗叶枯病小麦品种兰考 906、偃展 4110 和豫农 949,无论苗期、返青拔节期还是灌浆期,其叶部内生真菌的数量均高于感病品种泛麦 5 号、周麦 17 和郑麦 366。李洪连等^[16-17]也

表 3 大理紫花和七姐妹内生真菌的相似性系数
Table 3 Similarity coefficients (C_s) of endophytic fungal from *R. multiflora* and *R. multiflora* var. *carnea*

宿主植物 Host plants	大理紫花 <i>R. multiflora</i>				七姐妹 <i>R. multiflora</i> var. <i>carnea</i>		
	五月份 May (M5)	六月份 June (M6)	七月份 July (M7)	八月份 August (M8)	五月份 May (C5)	六月份 June (C6)	七月份 July (C7)
大理紫花六月份(M6)	0.82						
<i>R. multiflora</i> in June (M6)							
大理紫花七月份(M7)	0.88	0.81					
<i>R. multiflora</i> in July (M7)							
大理紫花八月份(M8)	0.58	0.70	0.73				
<i>R. multiflora</i> in August (M8)							
七姐妹五月份(C5)	0.60	0.55	0.48	0.43			
<i>R. multiflora</i> var in May (C5)							
七姐妹六月份(C6)	0.87	0.89	0.86	0.70	0.55		
<i>R. multiflora</i> var in June (C6)							
七姐妹七月份(C7)	0.82	0.79	0.86	0.76	0.55	0.89	
<i>R. multiflora</i> var in July (C7)							
七姐妹八月份(C8)	0.68	0.70	0.72	0.81	0.53	0.74	0.74
<i>R. multiflora</i> var in August (C8)							

注: M: 白粉病高抗野生蔷薇大理紫花(*Rosa multiflora*); C: 白粉病高感野生蔷薇七姐妹(*R. multiflora* var. *carnea*); 5、6、7、8: 采样时间 5 月份、6 月份、7 月份和 8 月份。
Note: M: *Rosa multiflora*; C: *R. multiflora* var. *carnea*; 5, 6, 7, 8: Collection time of May, June, July and August.

发现,枯萎病不同抗性的棉花品种以及同一品种而处于不同生育期的棉花,其根际真菌的群落结构不同,且枯萎病抗性与根际真菌群落之间有着一定的关系。枯萎病抗性品种冀棉 7 号和豫 86-1 号在苗期和现蕾期的内生真菌数量均明显高于感病品种鲁棉 1 号和河南 69 号。所有这些研究表明,抗病品种有可能通过选择定殖大量内生菌从而抑制病原菌的生长和繁殖,从而达到抗病的目的。当然,这需要进一步的深入研究。

3.2 白粉病高抗蔷薇优势内生真菌

分离自大理紫花和七姐妹的 2 003 株内生真菌分属于刺盘孢属、葡萄座腔菌属和炭角菌属等 30 个分类单元。总体来说,大理紫花的优势内生真菌为盘长孢状刺盘孢。然而,在白粉病暴发的不同时期,其优势程度也存在一定差异。在大理紫花 8 月份样品中,盘长孢状刺盘孢的相对分离频率极高,同样,在 6 月份和 7 月份的大理紫花样品中,其优势也较为突出。已有研究表明,一些刺盘孢属菌株产生的

抑菌活性成分具有生防潜力。例如来自巴西传统药用植物 *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*)的盘长孢状刺盘孢菌株 UFMGCB 1854 和 1856^[18],其代谢产物对大肠杆菌表现出较好的抑菌活性;同样,周开谊等^[19]从健康烟草根茎分离获得的刺盘孢属菌株 Nitaf05,其菌丝和发酵液提取物对 6 种病原菌均表现出较强的抑菌活性;包丽霞等^[20]从 3 种北细辛中分离得到的刺盘孢属内生真菌 E6,具有 FabI 靶点的抗菌活性,而小丛壳属(*Glomerella* sp.)菌株 E7 和叶点霉属(*Phyllosticta* sp.)菌株 E2 具有靶向 ACP 和 FabI 的抗菌活性,且抑制率达到 59%。

本研究表明,在白粉病暴发进程中,白粉病高抗蔷薇大理紫花与白粉病高感蔷薇七姐妹的内生真菌多样性及群落结构明显不同。且随着时间的推移,白粉病高感蔷薇七姐妹的内生真菌多样性逐渐增加,而高抗蔷薇大理紫花的却逐渐减少。大理紫花中存在一些特有和优势内生真菌,它们在大理紫花白粉病抗性中的功能有待进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Hou HJ. Common diseases control of spring flowers[J]. Greening and Life, 2014(1): 22-24 (in Chinese)
侯和菊. 春季花卉常见病害防治[J]. 绿化与生活, 2014(1): 22-24
- [2] Zhang D. A brief report of the investigation on ornamental rosaceous varieties resistance to powdery mildew and its chemical control[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 1995, 10(2): 148 (in Chinese)
侯丹. 蔷薇品种对白粉病抗性调查及药剂防治[J]. 云南农业大学学报, 1995, 10(2): 148
- [3] Zhang B, Li AD. Advances of studies on occurrence and control measures of Chinese Rose powdery mildew[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2009, 37(11): 95-97 (in Chinese)
张斌, 李安答. 月季白粉病的发生及防治研究进展[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(11): 95-97
- [4] Clay K, Schardl C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses[J]. The American Naturalist, 2002, 160(4): S99-S127
- [5] Rodrigues RJ, Henson J, van Volkenburgh E, et al. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis[J]. The ISME Journal, 2008, 2: 404-416
- [6] Li HY, Wei DQ, Shen M, et al. Endophytes and their role in phytoremediation[J]. Fungal Diversity, 2012, 54(1): 11-18
- [7] Backman PA, Sikora RA. Endophytes: an emerging tool for biological control[J]. Biological Control, 2008, 46(1): 1-3
- [8] Guo Z. Studies on antimicrobial activity of three endophytes from *Rosaceae* plants[D]. Xianyang: Master's Thesis of Northwest A & F University, 2015 (in Chinese)
国政. 三株蔷薇科植物内生菌的抑菌活性研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2015
- [9] Li HY, Shen M, Zhou ZP, et al. Diversity and cold adaptation of endophytic fungi from five dominant plant species collected from the Baima Snow Mountain, Southwest China[J]. Fungal Diversity, 2012, 54(1): 79-86
- [10] Barnett HL, Hunter BB. Illustrated Genera of Imperfect Fungi[M]. New York: Macmillan Publishing Company, 1987
- [11] Ellis MB. Dematiaceous Hyphomycetes[M]. UK: International Mycological Institute, 1988
- [12] Sutton BC. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata[M]. England: Commonwealth Mycological Institute, 1980
- [13] Yuan ZL, Rao LB, Chen YC, et al. From pattern to process: species and functional diversity in fungal endophytes of *Abies beshanzuensis*[J]. Fungal Biology, 2011, 115(3): 197-213
- [14] Spellerberg IF, Fedor PJ. A tribute to Claude Shannon (1916–2002) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon-Wiener’ index[J]. Global Ecology and Biogeography, 2003, 12(3): 177-179
- [15] Liu SF, Zhang M, Li HL. Study on the fungiflora in wheat leaf with different resistance to wheat leaf blight[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2008, 42(2): 216-219 (in Chinese)
刘素芳, 张猛, 李洪连. 不同抗性小麦品种叶部真菌区系分析[J]. 河南农业大学学报, 2008, 42(2): 216-219
- [16] Li HL, Wang SZ, Zhang MZ. Cotton varieties resistant and susceptible to wilting and their rhizosphere microorganism quantity[J]. Acta Agriculturae Universitatis Henanensis, 1990, 24(1): 49-56 (in Chinese)
李洪连, 王守正, 张明智. 棉花抗、感枯萎病品种根际微生物数量研究[J]. 河南农业大学学报, 1990, 24(1): 49-56
- [17] Li HL, Yuan HX, Wang Y, et al. Study on the relationship between diversity of microbes in rhizosphere and resistance of cotton cultivars to *Verticillium dahliae*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1998, 28(4): 341-345 (in Chinese)
李洪连, 袁红霞, 王烨, 等. 根际微生物多样性与棉花品种对黄萎病抗性关系研究——I. 根际微生物数量与棉花品种对黄萎病抗性的关系[J]. 植物病理学报, 1998, 28(4): 341-345
- [18] Vieira MLA, Hughes AFS, Gil VB, et al. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*)[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(1): 54-66
- [19] Zhou KY, Wang WX, Peng Y, et al. Endophytic fungi from *Nicotiana tabacum* L. and their antibacterial activity[J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(11): 1847-1852 (in Chinese)
周开谊, 王伟轩, 彭宇, 等. 烟草内生真菌及其提取物的抗菌活性[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(11): 1847-1852
- [20] Bao LX, Yin Y, Yang T, et al. Isolation, identification and metabolite bioactivity of endophytic fungi from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum*[J]. Journal of Microbiology, 2010, 30(5): 1-6 (in Chinese)
包丽霞, 殷瑜, 杨天, 等. 北细辛内生真菌的分离鉴定及代谢产物的生物活性[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(5): 1-6