

研究报告

青藏高原垫状点地梅叶际及内生可培养微生物多样性

朱攀¹, 薛文凯¹, 李小燕^{*2}, 刘星^{*1,2}

1 西藏大学理学院 生态学研究中心极端环境生物资源与适应性进化实验室, 西藏 拉萨 850000

2 武汉大学生命科学学院, 湖北 武汉 430072

朱攀, 薛文凯, 李小燕, 刘星. 青藏高原垫状点地梅叶际及内生可培养微生物多样性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 13-34.

ZHU Pan, XUE Wenkai, LI Xiaoyan, LIU Xing. Diversity of phyllospheric and endophytic culturable microorganisms in *Androsace tapete* of the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 13-34.

摘要:【背景】垫状点地梅作为青藏高原最具代表性的垫状植物, 其叶际和内生微生物对适应极端环境有重要意义, 同时也是一种独特的资源。【目的】探究垫状点地梅叶际和叶内可培养微生物多样性, 以及不同生存状态个体之间的微生物差异。【方法】采用纯培养方法分离和纯化 3 个不同地区垫状点地梅叶际和叶内的细菌、酵母菌和丝状真菌, 并用 16S rRNA 基因和 ITS 区域序列进行分析鉴定。【结果】最终得到叶际微生物 350 株, 鉴定为 22 属 49 种, 优势种为 *Penicillium sajarovii*; 内生微生物 274 株, 鉴定为 19 属 45 种, 优势种为 *Bacillus mycoides*; 两者的优势属均为 *Penicillium*。垫状点地梅叶际和叶内之间及不同生存状态个体之间微生物的 α 多样性大多无显著差异, 各群落间的成员也有重叠, 但物种组成存在显著的空间异质性。【结论】垫状点地梅叶际和叶内有着丰富的可培养微生物资源, 来源于不同生存状态的个体或不同部位的微生物物种组成差别较大, 微生物对不同环境的选择偏好形成了不同的群落模式。但这些不同来源的微生物群落之间同样存在高比例的共有菌株, 这些共有菌株的异养方式和生态位并不固定, 可兼共生和

资助项目: 西藏大学 2020 级硕士研究生“高水平人才培养计划”(2020-GSP-S047); 西藏自治区科技计划中央引导地方项目(XZ202001YD0028C); 资源与水电工程科学国家重点实验室开放课题(2018NSG02); 国家民委生物技术综合实验室开放课题(BTEC201903); 西藏自治区科技计划项目重点研发及转化计划(XZ202001ZY0016N); 西藏特色生物种质资源保护与基因技术开发研究(XZ202001ZY0016N)

This work was supported by the High-Level Talents Training Program for 2020 Postgraduate Student of Tibet University (2020-GSP-S047), the Central Leading Local Project of Science and Technology Plan of Tibet Autonomous Region (XZ202001YD0028C), the Open Project of State Key Laboratory of Water Resources and Hydropower Engineering Science (2018NSG02), the Open Project of Integrated Laboratory of Biotechnology of State People's Committee (BTEC201903), the Key Research and Development and Transformation Program of Science and Technology Plan of Tibet Autonomous Region (XZ202001ZY0016N), and the Research on the Conservation of Biological Germplasm Resources and Gene Technology Development of Tibetan Specialties (XZ202001ZY0016N).

*Corresponding authors. E-mail: LI Xiaoyan, xiaoyanlx@sina.com; LIU Xing, xingliu@whu.edu.cn

Received: 2022-04-21; Accepted: 2022-05-18; Published online: 2022-07-04

腐生生存, 生存空间也无明确的界限。纯化的菌株可为日后功能菌株的开发利用提供材料。

关键词: 青藏高原; 垫状点地梅; 叶际可培养微生物; 内生可培养微生物

Diversity of phyllospheric and endophytic culturable microorganisms in *Androsace tapete* of the Qinghai-Tibetan Plateau

ZHU Pan¹, XUE Wenkai¹, LI Xiaoyan^{*2}, LIU Xing^{*1,2}

1 Laboratory of Extreme Environment Biological Resources and Adaptive Evolution, Research Center for Ecology, College of Science, Tibet University, Lhasa 850000, Tibet, China

2 College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China

Abstract: [Background] *Androsace tapete* is the representative cushion plant species on the Qinghai-Tibetan Plateau, and the phyllospheric and intrafoliar microorganisms are important for this species to adapt to the extreme environment and are also a unique resource. [Objective] To investigate the diversity of phyllospheric and endophytic culturable microorganisms in *A. tapete* and the differences in the microorganisms between living and dead individuals. [Methods] Phyllospheric and intrafoliar bacteria, yeasts, and filamentous fungi were isolated from *A. tapete* in three different regions by pure culture, purified, and identified based on 16S rRNA and ITS sequence analysis. [Results] A total of 350 phyllospheric strains (49 species in 22 genera) were identified, with the dominant species of *Penicillium sajarovii*, and 274 endophytic culturable strains (45 species in 19 genera) were screened out, with the dominant species of *Bacillus mycoides*. The two shared the dominant *Penicillium*. The difference in alpha diversity between phyllospheric and intrafoliar microorganisms of *A. tapete* and between the living and dead individuals was mostly not significant. The communities shared some members, but there was significant spatial heterogeneity in species composition. [Conclusion] There are abundant culturable phyllospheric and intrafoliar microbial resources in *A. tapete*, and the species composition was remarkably different between living and dead individuals and between different parts of the leaf, and the selection preferences of microorganisms for different environments result in different community patterns. However, the microbial communities from different sources shared a high proportion of strains, and the heterotrophic mode and ecological niche of these shared strains are not fixed. The heterotrophic pattern and the niches of the shared strains are not fixed. They can survive by both symbiosis and saprophytism, and the living space has no clear boundary. The purified strains can be used for the development and utilization of functional strains.

Keywords: Qinghai-Tibetan Plateau; *Androsace tapete*; phyllospheric culturable microorganism; endophytic culturable microorganism

作为世界“第三极”的青藏高原是全球最大、最高的高原^[1], 其特殊的自然地理环境孕育了丰富而独特的生物多样性^[2], 这里脆弱的生态系统对气候变化和人类活动高度敏感, 气温变暖、冰川融化等问题日益加剧^[3-4]。青藏高原植物种类繁多, 有着紧凑叶片、低矮莲座型的垫状植物是分布于高山地区的一类代表性植物^[5]。其中, 垫状点地梅 (*Androsace tapete*) 是报春花科 (*Primulaceae*) 点地梅属 (*Androsace* L.) 的垫状植物代表物种, 所属的垫状点地梅群系是青藏高原垫状植被中分布最广、最重要的群系^[6-7]。

在植物的叶部存在着多样的微生物群落, 其中附生在叶片表面的微生物称为叶际微生物, 生活在植株内部的称为内生菌或内生微生物^[8-9]。相较于已深入研究的植物根系和根际微生物, 叶际和叶内的内生微生物对植物健康的影响和互作关系等方面的研究较少^[10-11]。与植物互作的微生物被认为对植物的生长、抵御生物和非生物胁迫等方面具有重要意义, 如叶际微生物群可以通过产生抗菌化合物、与病原菌竞争或介导激活植物防御来增强对病原体的抗性^[12-14], 还可以影响植物对养分的获取(如固氮作用)^[15-16], 以及对干旱、紫外线和抗冻性等非生物胁迫的适应^[17-19]。叶片内生菌可通过特定代谢途径降解叶片表面吸收的污染物^[20-21], 改善受污染环境中的植物修复, 以及提高在这些条件下的适应性(如抗旱能力)^[22-24]。因此, 叶际和内生微生物是一类特殊的菌种资源, 在修复污染、推动植物宿主适应干旱和气候变暖, 以及抵御病虫害等方面的应用有着巨大的潜力^[25]。目前关于垫状点地梅的研究主要集中在其区系类型和分布格局^[26-27]、形态适应性和生态系统工程师^[28-30]、空间遗传结构^[31]等方面。垫状点地梅微生物方面, 已有研究表明垫状点地梅根际土壤细菌的主要菌门为厚壁菌门、变

形菌门和放线菌门, 环境因子中的大气温度与菌群相对丰度呈极显著正相关^[32], 但关于其地上部分的叶际和内生微生物方面还未见报道。垫状点地梅的叶片是其适应性垫状结构的重要组成部分, 其极端的生境为分离出一些独特菌种提供了可能。本研究以青藏高原垫状点地梅的存活个体和死亡个体为材料, 探究垫状点地梅叶际和内生可培养微生物的物种多样性(死亡个体叶片内的微生物严格意义上应称之为腐生菌, 本文为与活体中内生菌对应, 统一称为内生微生物), 并比较其存活个体与死亡个体微生物物种组成的相似性和差异, 以及叶际和内生可培养微生物物种组成的相似性和差异。实验纯化的菌株可进一步充实青藏高原种质资源库, 并为日后功能菌株的开发利用提供材料。研究结果将为探明垫状点地梅非自然死亡的原因和对高原极端环境的适应性机制提供可培养微生物方面的数据信息。

1 材料与方法

1.1 材料

垫状点地梅样本采自西藏米拉山(编号为MLS)、恰拉山(编号为QLS)和卡若拉冰川(编号为KRL), 3个样点的信息如表1所示。每个样点采集垫状点地梅存活个体与死亡个体各3株, 共18株。戴无菌手套和口罩将垫状点地梅整株挖起, 抖落根部附着的土后, 放入大号无菌均质袋中, 置于4℃车载冰箱中暂存, 最后带回实验室放入4℃冰箱备用, 开始菌株的分离实验。

细菌基因组DNA抽提试剂盒和*Taq* Master Mix, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 16S rRNA基因通用引物1492R和27F、真菌核糖体rDNA区通用引物ITS1和ITS4, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。PCR仪和电泳仪, 艾本德公司。

表 1 采样点信息

Table 1 Information of sampling sites

Site	Longitude and latitude	Altitude (m)	Air temperature (°C)	Air humidity (%)	Light intensity (lx)
Mila Mountain (MLS)	E 92.365 032° N 29.817 694°	4 900	15.4	46.4	42 956
Qiala Mountain (QLS)	E 91.275 797° N 30.113 067°	4 767	13.3	28.3	12 008
Karola Glacier (KRL)	E 90.224 676° N 28.898 962°	4 789	16.7	9.1	19 478

1.2 菌株的分离、纯化及鉴定

1.2.1 材料的处理

将 3 个样点的 18 个垫状点地梅样本各取 5 g 叶片组织,放入盛有 50 mL 无菌水的无菌 EP 管中,摇床室温 200 r/min 振荡水洗 30 min^[33-34],得到的菌悬液用稀释梯度法稀释 10^1 – 10^6 倍,用于叶际微生物的分离和纯化。另取各垫状点地梅叶片 5 g,在超净工作台内用 75%酒精浸泡 30 s 后漂洗、3%次氯酸钠浸泡 60 s 后漂洗,循环 3 次,对叶片的表面杀菌,再用无菌水洗涤 3 次(取最后一次漂洗液 0.1 mL 涂布到牛肉膏蛋白胨培养基平板上,28 °C 恒温培养 72 h,检测表面消毒效果),最后将材料剪碎研磨稀释 10 倍备用。

1.2.2 培养基

细菌使用牛肉膏蛋白胨培养基(g/L):牛肉膏 3.0,蛋白胨 10.0,NaCl 5.0,琼脂 20.0,pH 7.0,98 kPa 灭菌 30 min。真菌使用酸性 PDA、酸性 YM 及 RBCH 固体常规培养基,参照文献[35]配制。

1.2.3 菌株的分离与纯化

取各样本稀释液 0.1 mL 分别涂布到 4 种培养基平板上,分别做 3 个重复,于 28 °C 恒温培养 3–5 d。待平板长出菌落后,挑取单菌落四区划线至相同配方的平板中纯化。通过菌落形态初步将其分为细菌、酵母菌和丝状真菌 3 类,再用显微镜镜检进一步区分三者。在试管斜面上纯化菌株(若平板上出现杂菌污染,则需多次

四区划线纯化,直至得到单一菌落),最后用 20%甘油保藏于–80 °C 冰箱中。

1.2.4 菌株的鉴定

细菌 DNA 的提取和扩增使用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,引物为 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGCTT-3')。PCR 反应体系:2×PCR Taq Master Mix 25 μL,正、反向引物(10 μmol/L)各 2 μL,细菌 DNA 5 μL,超纯水 21 μL。PCR 反应条件:94 °C 4 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s,35 个循环;72 °C 10 min。真菌 DNA 的提取及扩增采用 CTAB 法^[36],引物采用 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[37]。PCR 反应体系:2×PCR Taq Master Mix 25 μL,ITS1 和 ITS4 引物(10 μmol/L)各 2.5 μL,真菌 DNA 5 μL,超纯水 20 μL。PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 60 s,35 个循环;72 °C 7 min。经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,将浓度和大小合格的扩增目标产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果经 BioEdit 人工校对去除引物及双峰序列后,在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列搜索,BLAST 结果相似度为 99%以上的确定为同一种^[38],丝状真菌的鉴定需结合显微形态判断。供试菌株的序列提交到国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC),

细菌 DOI 为 NMDCN00010M9 和 NMDCN00010MA–NMDCN00010MV, 真菌 DOI 为 NMDCN00010N0–NMDCN00010N9、NMDCN00010NA–NMDCN00010NV 和 NMDCN00010O0–NMDCN00010O3。

1.3 数据的处理及分析

使用 Excel 2016、R 4.0.2、Origin 2018 等软件分析数据及绘图。非度量多维尺度(non-metric multidimensional scaling, NMDS)分析、相似性(analysis of similarities, ANOSIM)分析、 α 多样性 Richness 物种丰富度、Shannon-Wiener 多样性指数、Simpson 多样性指数、Pielou 均匀度指数、invsimpson 指数、Chao1 菌种丰富度

指数、ACE 指数、goods_coverage 指数用 R 4.0.2 中的 vegan 包进行计算,ggplot2 包绘图。Pearson 相关系数用 psych 包计算, pheatmap 包绘图。相对丰度是指某样本中某种菌的菌株数占该样本总菌株数的百分比。

2 结果与分析

2.1 垫状点地梅叶际可培养微生物多样性

2.1.1 垫状点地梅叶际可培养微生物的物种组成和分布

如图 1 所示,从 18 个垫状点地梅样本中共分离、纯化出叶际微生物 350 株,22 属 49 种,其中,细菌 100 株,10 属 18 种;酵母菌 50 株,

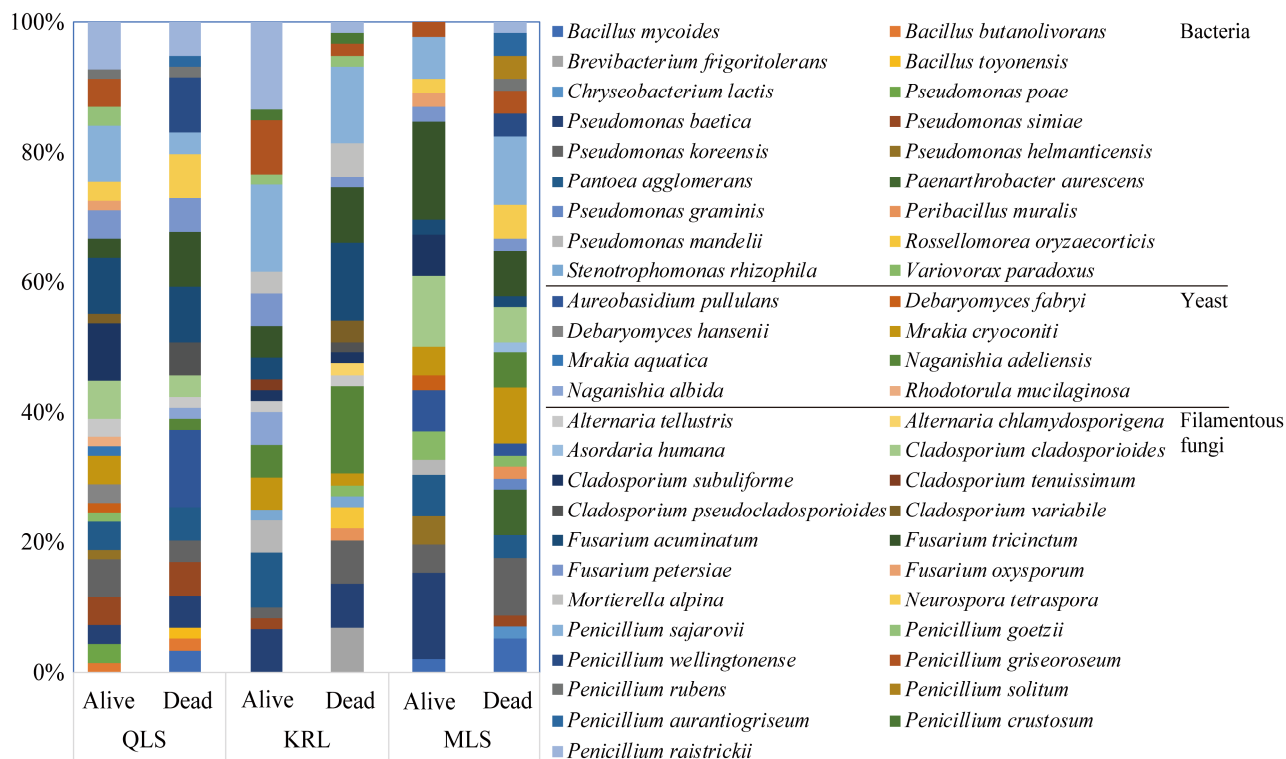


图1 垫状点地梅叶际可培养微生物在各样点的组成和分布 Alive代表垫状点地梅的存活个体;Dead代表垫状点地梅的死亡个体;QLS、KRL、MLS 分别代表采样点恰拉山、卡若拉和米拉山

Figure 1 Composition and distribution of phyllospheric culturable microorganisms of *Androsace tapete* at each site. Alive: The surviving individuals of *Androsace tapete*; Dead: The dead individuals of *Androsace tapete*; QLS, KRL and MLS: Sampling sites Qiala Mountain, Karuola and Mila Mountain, respectively.

5 属 8 种；丝状真菌 200 株，7 属 23 种。各样点的叶际微生物物种组成比较丰富，其中恰拉山的物种组成最复杂，有 128 株，35 种；其次是米拉山 103 株，31 种；最后为卡若拉 119 株，28 种。

为进一步探究垫状点地梅叶际微生物的优势类群，对各样本的所有菌株丰度进行分析。如图 2 所示，在种水平上相对丰度前 5 的菌株依次为 *Penicillium sajarovii* (9.14%)、*Fusarium tricinctum* (7.43%)、*Fusarium acuminatum* (6.29%)、*Pseudomonas baetica* (5.43%) 和 *Pseudomonas koreensis* (5.14%)，其中前 3 种均为丝状真菌，后 2 种为细菌，*Penicillium sajarovii* 丰度最高，为优势种。如图 3 所示，在属水平上相对丰度前 5 的属依次为 *Penicillium* (23.71%)、*Fusarium* (17.71%)、*Pseudomonas* (15.71%)、*Cladosporium* (9.43%) 和 *Naganishia* (5.43%)，共

计丰度为 72.00%，*Penicillium* 丰度最高，为优势属。

2.1.2 垫状点地梅存活与死亡个体叶际可培养微生物间 α 多样性的比较

为探究垫状点地梅存活与死亡个体间叶际可培养微生物多样性的差异，以 α 多样性指数对存活与死亡个体的叶际微生物进行比较。结果如图 4 所示，垫状点地梅死亡个体除 goods_coverage 指数外，其余 7 种多样性指数的均值都高于存活个体，但二者间的差异并不显著 ($P>0.05$)。表明垫状点地梅死亡和存活个体叶际微生物的多样性都较高，但并无显著差异。

2.1.3 垫状点地梅存活与死亡个体间叶际可培养微生物的优势类群和独有菌株分析

如表 2 所示，垫状点地梅存活个体叶际可培养微生物独有的菌株共 9 种，其中细菌 3 种，相对丰度共计 5.14%；酵母菌 4 种，相对丰度

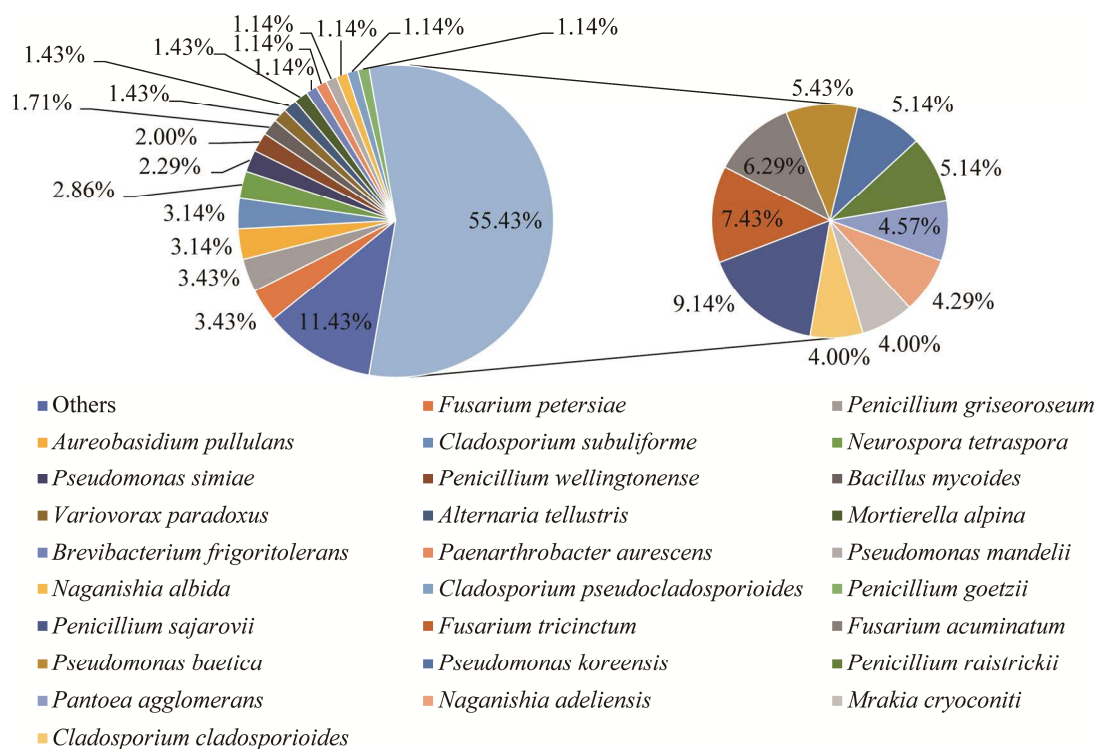


图 2 垫状点地梅叶际可培养微生物种水平的相对丰度 Others 为相对丰度低于 1% 的菌种

Figure 2 Relative abundance of phyllospheric culturable microorganisms at the species level in the *Androsace tapete*. Others are species with relative abundance less than 1%.

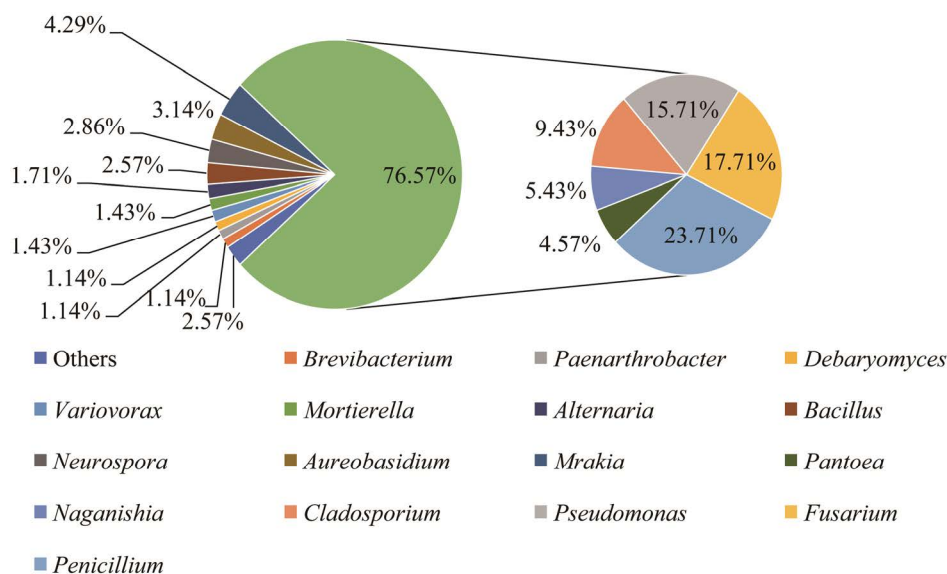


图3 垫状点地梅叶际可培养微生物属水平的相对丰度 Others 为相对丰度低于 1%的属

Figure 3 Relative abundance of phyllospheric culturable microorganisms at the genus level in the *Androsace tapete*. Others are genera with relative abundance less than 1%.

共计 3.42%；丝状真菌 2 种，相对丰度共计 1.71%。选存活个体中相对丰度前 10 的菌株为优势类群，其中细菌 2 种，相对丰度共计 13.15%；酵母菌 1 种，相对丰度共计 4.57%；丝状真菌 7 种，相对丰度共计 45.13%。死亡个体独有的菌株共 13 种，其中细菌 7 种，相对丰度共计 8.57%；丝状真菌 6 种，相对丰度共计 10.28%。选死亡个体中相对丰度前 10 的菌株为优势类群，其中细菌 2 种，相对丰度共计 10.29%；酵母菌 3 种，相对丰度共计 14.86%；丝状真菌 5 种，相对丰度共计 32.00%。

此外，垫状点地梅存活与死亡个体叶际可培养微生物共有菌株 27 种，相对丰度之和分别占 89.73%和 81.15%。因此，垫状点地梅存活与死亡个体的叶际可培养微生物在物种组成方面较为相似，独有菌株分别占 10.27%和 18.85%；而且在独有菌株中，除 *Penicillium wellingtonense* 是死亡个体优势类群外，其余独有菌株均无优势性。

2.2 垫状点地梅内生可培养微生物多样性

2.2.1 垫状点地梅内生可培养微生物的物种组成和分布

如图 5 所示，垫状点地梅样本中共分离、纯化出内生微生物 274 株，鉴定为 19 属 45 种，其中，细菌 139 株，9 属 18 种；酵母菌 22 株，4 属 7 种；丝状真菌 113 株，6 属 20 种。各样点的内生微生物物种组成比较丰富，其中恰拉山 84 株，29 种；卡若拉 105 株，28 种；米拉山 85 株，23 种。

图 6 为垫状点地梅内生可培养微生物在种水平的丰度情况，相对丰度前 5 的菌株依次为 *Bacillus mycoides* (7.30%)、*Fusarium tricinctum* (6.93%)、*Pantoea agglomerans* (6.93%)、*Fusarium acuminatum* (5.11%)和 *Pseudomonas baetica* (5.11%)，其中，*Fusarium tricinctum* 和 *Fusarium acuminatum* 为丝状真菌，其余 3 种为细菌，*Bacillus mycoides* 丰度最高为优势种。如图 7 所示，在属水平上相对丰度前 5 的属依次为 *Penicillium* (17.52%)、*Fusarium* (16.79%)、*Pseudomonas* (15.33%)、*Bacillus* (14.23%)和 *Pantoea* (6.93%)，共计丰度为 70.80%，*Penicillium* 丰度最高，为优势属。

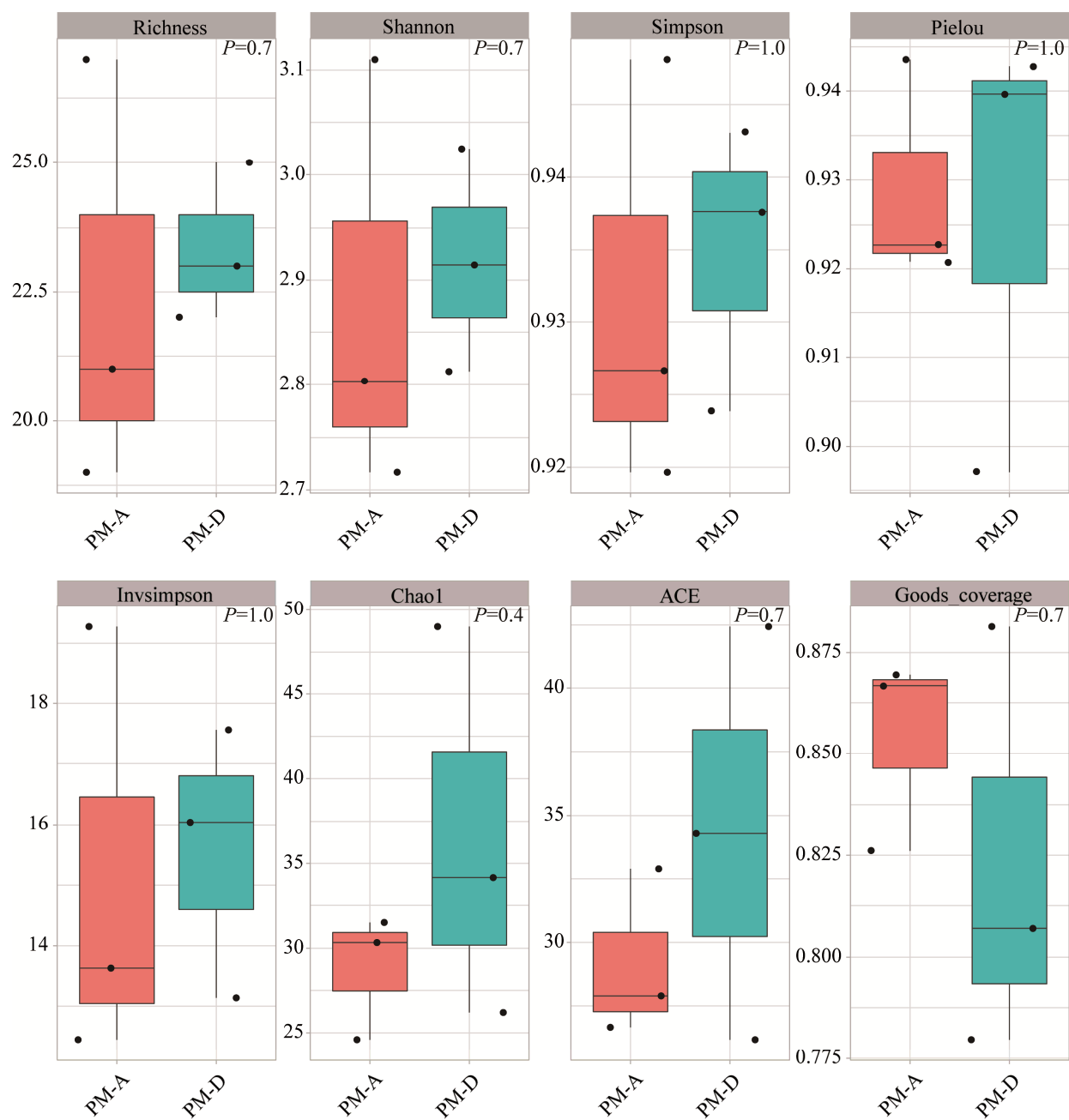


图 4 垫状点地梅存活与死亡个体叶际微生物间 α 多样性指数比较 PM-A (phyllospheric microorganism-alive): 垫状点地梅存活个体的叶际微生物; PM-D (phyllospheric microorganism-dead): 垫状点地梅死亡个体的叶际微生物

Figure 4 Comparison of phyllospheric microorganisms alpha diversity index between alive and dead individuals of *Androsace tapete*. PM-A (phyllospheric microorganism-alive): The phyllospheric microorganisms of surviving individuals in *Androsace tapete*; PM-D (phyllospheric microorganism-dead): The phyllospheric microorganisms of dead individuals in *Androsace tapete*.

表 2 垫状点地梅存活与死亡个体间叶际可培养微生物的优势类群和独有菌株比较

Table 2 Comparison of dominant groups and unique strains of phyllospheric culturable microorganisms between alive and dead individuals of *Androsace tapete*

Strains unique to the alive individuals	Dominant group of alive individuals	Dominant group of dead individuals	Strain unique to the dead individuals
<i>Pseudomonas mandelii</i> (2.29%) ^a	<i>Penicillium sajarovii</i> (9.71%) ^c	<i>Penicillium sajarovii</i> (8.57%) ^c	<i>Penicillium wellingtonense</i> (4.00%) ^c
<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (1.71%) ^a	<i>Penicillium raistrickii</i> (7.43%) ^c	<i>Fusarium tricinctum</i> (8.00%) ^c	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (2.29%) ^a
<i>Pseudomonas poae</i> (1.14%) ^a	<i>Pseudomonas baetica</i> (6.86%) ^a	<i>Fusarium acuminatum</i> (7.43%) ^c	<i>Paenarthrobacter aureus</i> (2.29%) ^a
<i>Debaryomyces fabryi</i> (1.14%) ^b	<i>Fusarium tricinctum</i> (6.86%) ^c	<i>Naganishia adeliensis</i> (6.86%) ^b	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> (2.29%) ^c
<i>Debaryomyces hansenii</i> (1.14%) ^b	<i>Pantoea agglomerans</i> (6.29%) ^a	<i>Pseudomonas koreensis</i> (6.29%) ^a	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> (1.71%) ^c
<i>Fusarium oxysporum</i> (1.14%) ^c	<i>Cladosporium subuliforme</i> (5.71%) ^c	<i>Aureobasidium pullulans</i> (4.57%) ^b	<i>Penicillium solitum</i> (1.14%) ^c
<i>Mrakia aquatica</i> (0.57%) ^b	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (5.14%) ^c	<i>Pseudomonas baetica</i> (4.00%) ^a	<i>Peribacillus muralis</i> (1.14%) ^a
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (0.57%) ^b	<i>Fusarium acuminatum</i> (5.14%) ^c	<i>Neurospora tetraspora</i> (4.00%) ^c	<i>Rossellomorea oryzaecorticis</i> (1.14%) ^a
<i>Cladosporium tenuissimum</i> (0.57%) ^c	<i>Penicillium griseoroseum</i> (5.14%) ^c	<i>Penicillium wellingtonense</i> (4.00%) ^c	<i>Bacillus toyonensis</i> (0.57%) ^a
—	<i>Mrakia cryoconiti</i> (4.57%) ^b	<i>Mrakia cryoconiti</i> (3.43%) ^b	<i>Chryseobacterium lactis</i> (0.57%) ^a
—	—	—	<i>Pseudomonas graminis</i> (0.57%) ^a
—	—	—	<i>Alternaria chlamydosporigena</i> (0.57%) ^c
—	—	—	<i>Asordaria humana</i> (0.57%) ^c

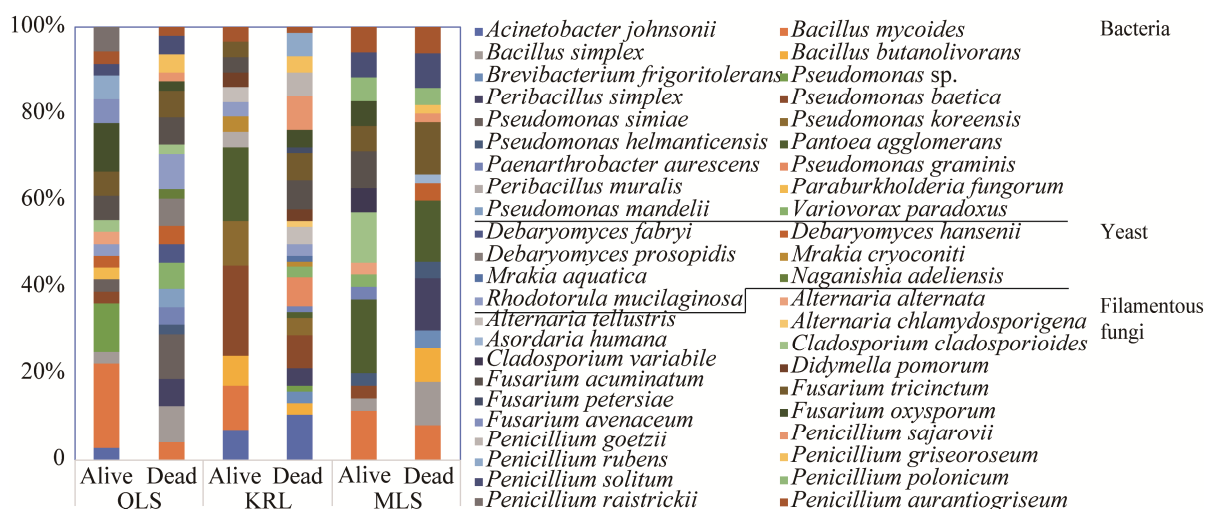
^a, ^b, ^c 分别表示细菌、酵母菌和丝状真菌; 括号中的数为各菌株的相对丰度; —: 无数据^a, ^b, ^c indicate bacteria, yeast and filamentous fungi respectively; The number in parentheses is the relative abundance of each strain; —: No data.

图 5 垫状点地梅内生可培养微生物在各样点的组成和分布 Alive 代表垫状点地梅的存活个体; Dead 代表垫状点地梅的死亡个体; QLS、KRL、MLS 分别代表采样点恰拉山、卡若拉和米拉山

Figure 5 Composition and distribution of endophytic culturable microorganisms of *Androsace tapete* at each site. Alive: The surviving individuals of *Androsace tapete*; Dead: The dead individuals of *Androsace tapete*; QLS, KRL and MLS: Sampling sites Qiala Mountain, Karuola and Mila Mountain, respectively.

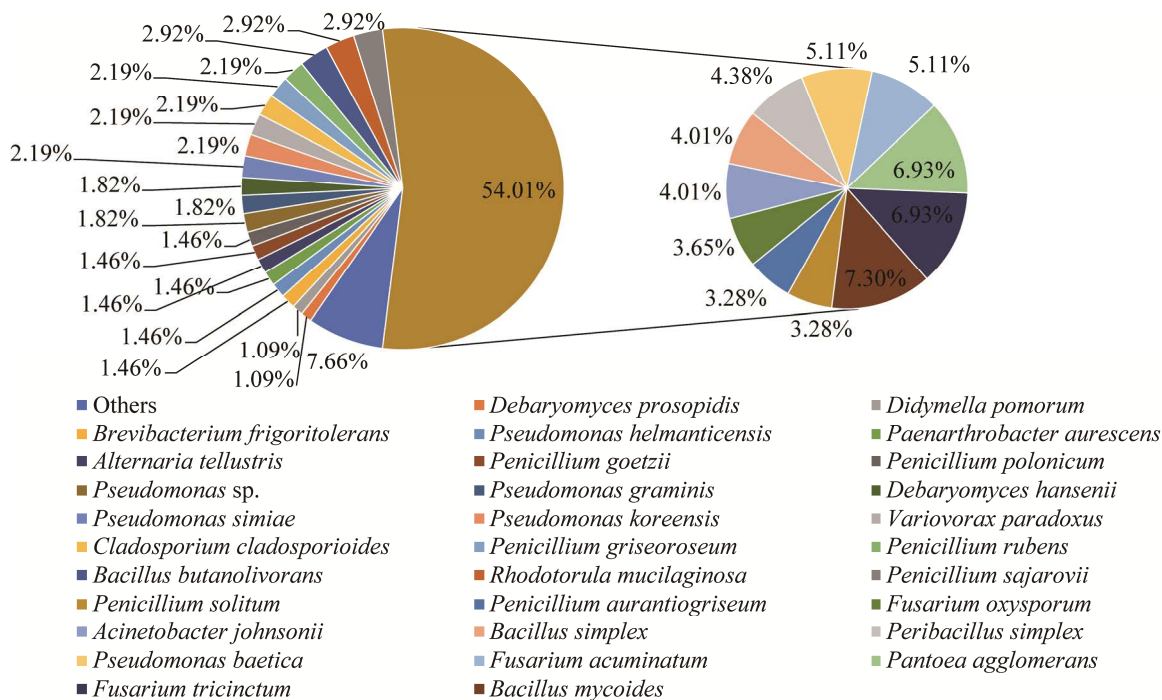


图 6 垫状点地梅内生可培养微生物种水平的相对丰度 Others 为相对丰度低于 1%的菌种

Figure 6 Relative abundance of endophytic culturable microorganisms at the species level in the *Androsace tapete*. Others are species with relative abundance less than 1%.

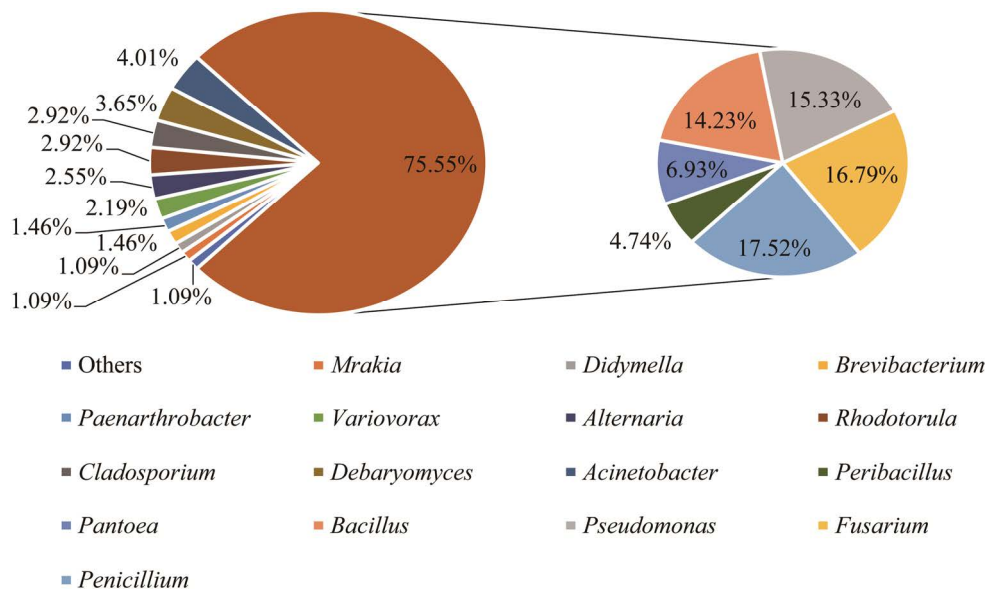


图 7 垫状点地梅可培养内生微生物属水平的相对丰度 Others 为相对丰度低于 1%的属

Figure 7 Relative abundance of endophytic culturable microorganisms at the genus level in the *Androsace tapete*. Others are genera with relative abundance less than 1%.

2.2.2 垫状点地梅存活与死亡个体内生可培养微生物间 α 多样性比较

比较垫状点地梅存活与死亡个体间内生可

培养微生物的 α 多样性指数, 结果显示(图 8), 垫状点地梅死亡个体除 Chao1 指数和 ACE 指数外, 其他多样性指数的均值均高于存活个体,

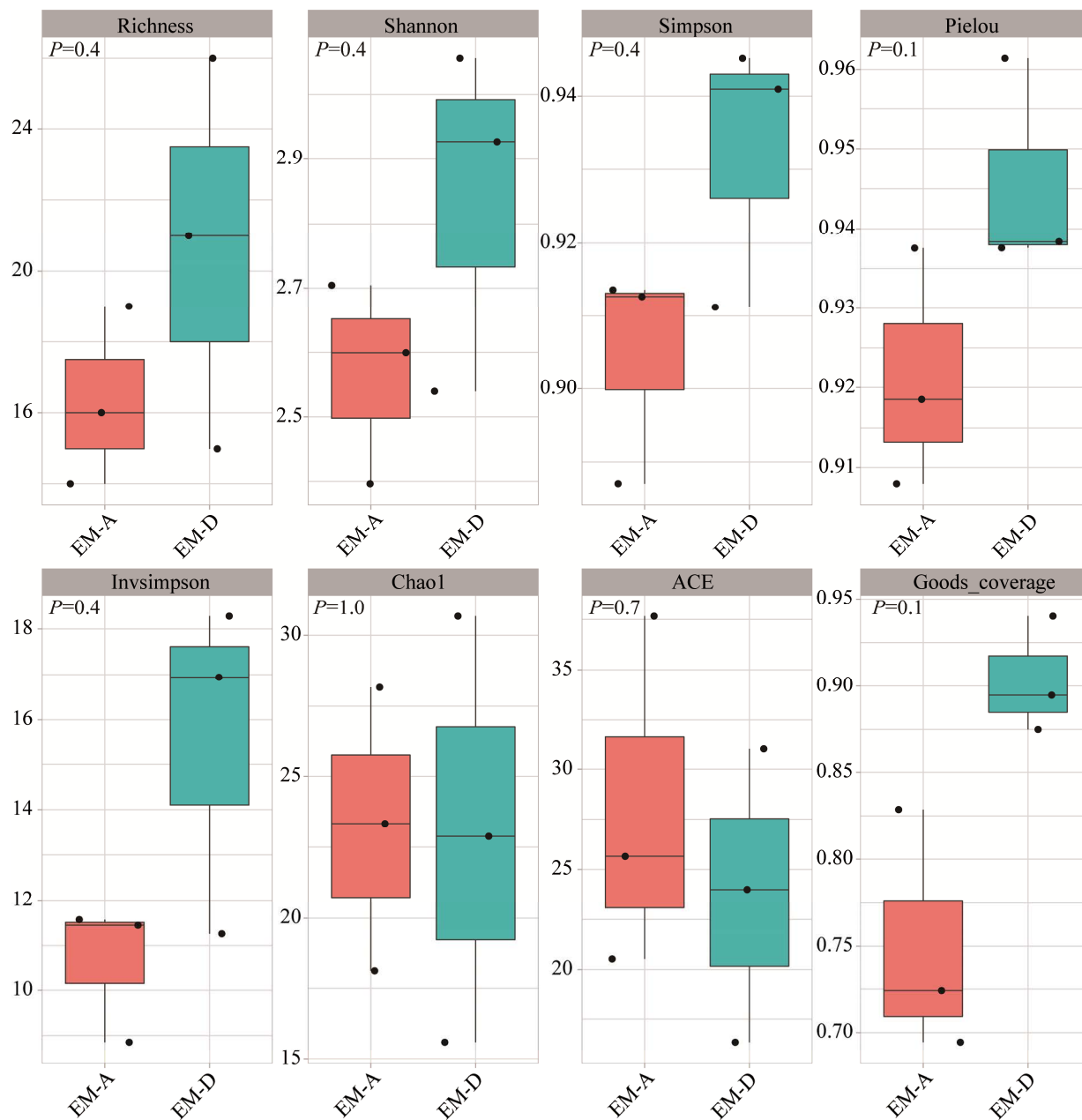


图 8 垫状点地梅存活与死亡个体内生微生物间 α 多样性指数比较 EM-A (endophytic microorganism-alive): 垫状点地梅存活个体的内生微生物; EM-D (endophytic microorganism-dead): 垫状点地梅死亡个体的内生微生物

Figure 8 Comparison of endophytic microorganisms alpha diversity index between alive and dead individuals of *Androsace tapete*. EM-A (endophytic microorganism-alive): The endophytic microorganisms of surviving individuals in *Androsace tapete*; EM-D (endophytic microorganism-dead): The endophytic microorganisms of dead individuals in *Androsace tapete*.

但二者的差异并不显著($P>0.05$)。

2.2.3 垫状点地梅存活与死亡个体间内生可培养微生物的优势类群和独有菌株分析

如表 3 所示, 垫状点地梅存活个体内生可培养微生物独有的菌株共 6 种, 均为细菌, 相对丰度共计 10.00%。选存活个体中相对丰度前 10 的菌株为优势类群, 其中细菌 5 种, 相对丰度共计 40.00%; 丝状真菌 5 种, 相对丰度共计 26.00%。死亡个体独有的菌株共 14 种, 其中细菌 4 种, 相对丰度共计 13.22%; 酵母菌 4 种, 相对丰度共计 4.01%; 丝状真菌 6 种, 相对丰度共计 12.06%。选死亡个体中相对丰度前

10 的菌株为优势类群, 其中细菌 7 种, 相对丰度共计 31.62%; 丝状真菌 3 种, 相对丰度共计 17.25%。

此外, 垫状点地梅存活与死亡个体内生可培养微生物共有菌株 25 种, 相对丰度之和分别占 90.00%和 70.71%。因此, 垫状点地梅存活与死亡个体的内生可培养微生物大部分较为相似, 独有菌株分别只占 10.00%和 29.29%。在死亡个体独有的菌株中, *Peribacillus simplex* (6.90%)、*Penicillium sajarovii* (4.60%)、*Penicillium griseoroseum* (3.45%)属于死亡个体优势类群, 存活个体独有菌株均无优势性。

表 3 垫状点地梅存活与死亡个体间内生可培养微生物的优势类群和独有菌株比较

Table 3 Comparison of dominant groups and unique strains of endophytic culturable microorganisms between alive and dead individuals of *Androsace tapete*

Strains unique to the alive individuals	Dominant group of alive individuals	Dominant group of dead individuals	Strain unique to the dead individuals
<i>Alternaria alternata</i> (2.00%) ^a	<i>Bacillus mycoides</i> (14.00%) ^a	<i>Fusarium tricinctum</i> (8.05%) ^c	<i>Peribacillus simplex</i> (6.90%) ^a
<i>Cladosporium variabile</i> (2.00%) ^a	<i>Pantoea agglomerans</i> (11.00%) ^a	<i>Peribacillus simplex</i> (6.90%) ^a	<i>Penicillium sajarovii</i> (4.60%) ^c
<i>Fusarium avenaceum</i> (2.00%) ^a	<i>Pseudomonas baetica</i> (8.00%) ^a	<i>Bacillus simplex</i> (5.17%) ^a	<i>Penicillium griseoroseum</i> (3.45%) ^c
<i>Penicillium raistrickii</i> (2.00%) ^a	<i>Fusarium acuminatum</i> (6.00%) ^c	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (4.60%) ^a	<i>Pseudomonas graminis</i> (2.87%) ^a
<i>Peribacillus muralis</i> (1.00%) ^a	<i>Fusarium oxysporum</i> (6.00%) ^c	<i>Pantoea agglomerans</i> (4.60%) ^a	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (2.30%) ^a
<i>Paraburkholderia fungorum</i> (1.00%) ^a	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (5.00%) ^c	<i>Fusarium acuminatum</i> (4.60%) ^c	<i>Penicillium goetzii</i> (2.30%) ^c
—	<i>Fusarium tricinctum</i> (5.00%) ^c	<i>Penicillium sajarovii</i> (4.60%) ^c	<i>Debaryomyces prosopidis</i> (1.72%) ^b
—	<i>Pseudomonas</i> sp. (4.00%) ^a	<i>Bacillus mycoides</i> (3.45%) ^a	<i>Pseudomonas mandelii</i> (1.15%) ^a
—	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> (4.00%) ^c	<i>Bacillus butanolivorans</i> (3.45%) ^a	<i>Debaryomyces fabryi</i> (1.15%) ^b
—	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (3.00%) ^a	<i>Pseudomonas baetica</i> (3.45%) ^a	<i>Mrakia aquatic</i> (0.57%) ^b
—	—	—	<i>Naganishia adeliensis</i> (0.57%) ^b
—	—	—	<i>Alternaria chlamydosporigena</i> (0.57%) ^c
—	—	—	<i>Asordaria humana</i> (0.57%) ^c
—	—	—	<i>Fusarium petersiae</i> (0.57%) ^c

^a: 细菌; ^b: 酵母菌; ^c: 丝状真菌; 括号中的数为各菌株的相对丰度; —: 无数据

^a: Bacteria; ^b: Yeast; ^c: Filamentous fungi; The number in parentheses is the relative abundance of each strain; —: No data.

2.3 垫状点地梅叶际与内生可培养微生物

2.3.1 垫状点地梅叶际与内生可培养微生物间的物种组成相关性

将各垫状点地梅样本的物种组成特征进行相关性分析并绘制聚类热图, 结果如图 9 所示, 各样本间的 Pearson 相关性系数均为正相关。聚类

可培养微生物, 其存活和死亡个体间物种组成的差异并不显著。而内生微生物和叶际微生物分别聚类在一起, 显著性标记同样表明二者内部的物种组成相关性更为显著。综上可知, 垫状点地梅的存活与否对其物种组成特征而言并无显著影响, 而不同的生存空间造就了垫状点地梅叶际与内生可培养微生物的组成差异。

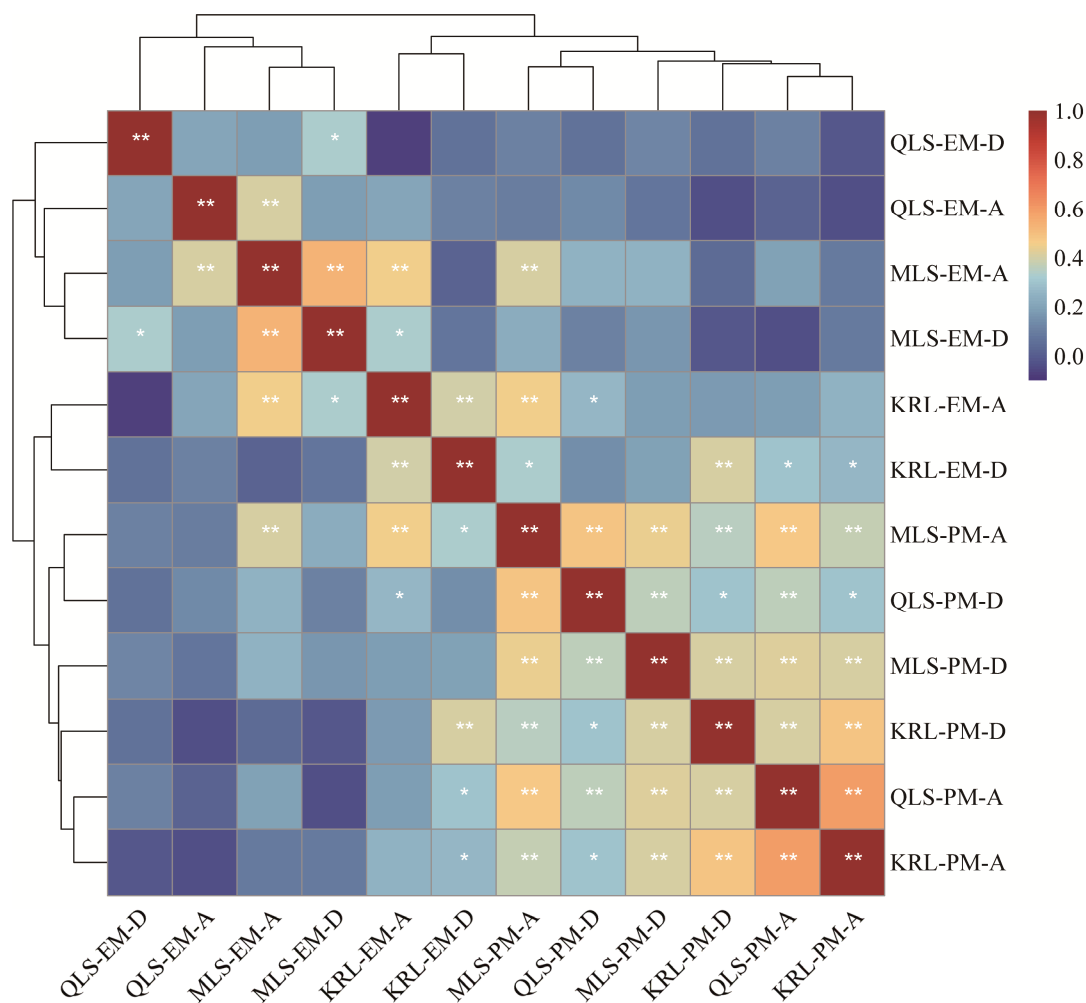


图 9 垫状点地梅各样点菌种组成的 Pearson 相关性聚类热图 QLS、KRL、MLS 分别代表采样点恰拉山、卡若拉和米拉山; PM: 垫状点地梅叶际微生物(phyllospheric microganism); EM: 垫状点地梅内生微生物(endophytic microganism); A: 垫状点地梅存活个体(alive); D: 垫状点地梅死亡个体(dead)

Figure 9 Pearson correlation clustering heat map of species composition in *Androsace tapete* at each site. QLS, KRL, MLS: Sampling sites Qiala Mountain, Karuola and Mila Mountain respectively; PM: The interleaf microorganisms of the *Androsace tapete* (phyllospheric microganism); EM: The endophytic microorganisms of the *Androsace tapete* respectively (endophytic microganism); A: The surviving individuals of the *Androsace tapete* (alive); D: The dead individuals of the *Androsace tapete* (dead).

2.3.2 垫状点地梅叶际与内生可培养微生物 α 多样性比较和物种组成空间变异分析

比较垫状点地梅叶际与内生可培养微生物的 α 多样性指数, 结果如图 10 所示, 垫状点地梅叶际可培养微生物除 Pielou 均匀度指数和 goods_coverage 指数外, 其余多样性指数的均

值均高于内生可培养微生物, 其中叶际可培养微生物的 Chao1 指数显著高于内生可培养微生物 ($P=0.041$), 其余多样性指数差异并不显著 ($P>0.05$)。

虽然垫状点地梅叶际与内生可培养微生物 α 多样性间的差异并不显著, 但聚类热图结果显示, 两者在物种组成上存在差异, 将两者分

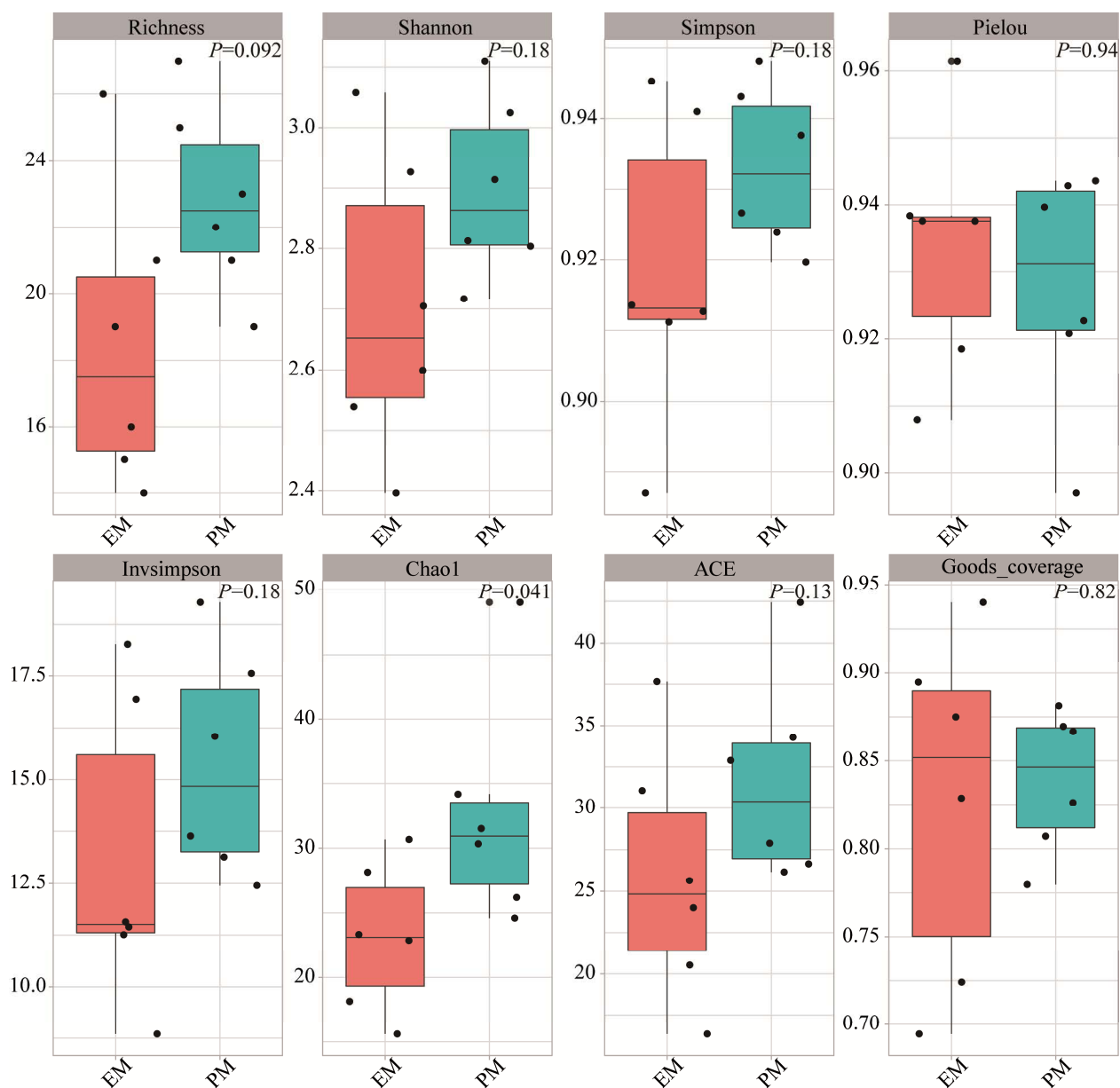


图 10 垫状点地梅叶际与内生可培养微生物 α 多样性指数的比较

Figure 10 Comparison of phyllospheric and endophytic culturable microorganisms alpha diversity index in *Androsace tapete*.

组, 用基于 Bray-Curtis 距离做非度量多维尺度 (NMDS) 和 ANOSIM 分析。结果表明(图 11A), 垫状点地梅叶际与内生可培养微生物的物种组成存在差异, 响应压力值 $\text{Stress}=0.1281$, 置信椭圆有一定的重合但仍能较好地对二者进行区分。ANOSIM 分析(图 11B)表明组内差异显著小于组间差异($R=0.562$, $P<0.01$), 即垫状点地梅叶际和叶内微生物的群落结构存在显著的空间异质性。

2.3.3 垫状点地梅叶际与内生可培养微生物物种组成分析

多集合韦恩图显示(图 12), 垫状点地梅叶际与内生可培养微生物间共有物种有 35 种(13 种细菌、6 种酵母菌、16 种丝状真菌), 叶际与内生独有的菌株分别有 14 种(5 种细菌、2 种酵母菌、7 种丝状真菌)和 10 种(5 种细菌、1 种酵母菌、4 种丝状真菌)。在 3 个样点中, *Pseudomonas baetica*、*Variovorax paradoxus*、

Fusarium acuminatum、*Fusarium tricinctum*、*Penicillium sajarovii*、*Penicillium griseoroseum* (前 2 种为细菌, 后 4 种为丝状真菌)在叶际和内生均有出现; *Cladosporium subuliforme* 在 3 个样点的叶际中均有出现而内生中无; *Peribacillus simplex* 在 3 个样点的内生中均有出现而叶际中无。在米拉山-内生、卡若拉-叶际、卡若拉-内生、恰拉山-内生、米拉山-叶际、恰拉山-叶际中独有菌株分别有 1、5、1、3、1 和 2 种。虽然叶际与内生独有菌株分别有 14 种(相对丰度共计 18.00%)和 10 种(相对丰度共计 19.71%), 但这些独有菌株大部分只分布在 1 个或 2 个样点中, 不同样点间的微生物组成同样存在较大差异。总体而言, 垫状点地梅叶际与内生可培养微生物间的物种组成特征差异显著, 主要体现在两者微生物的种群结构和各菌株相对丰度的差异上。

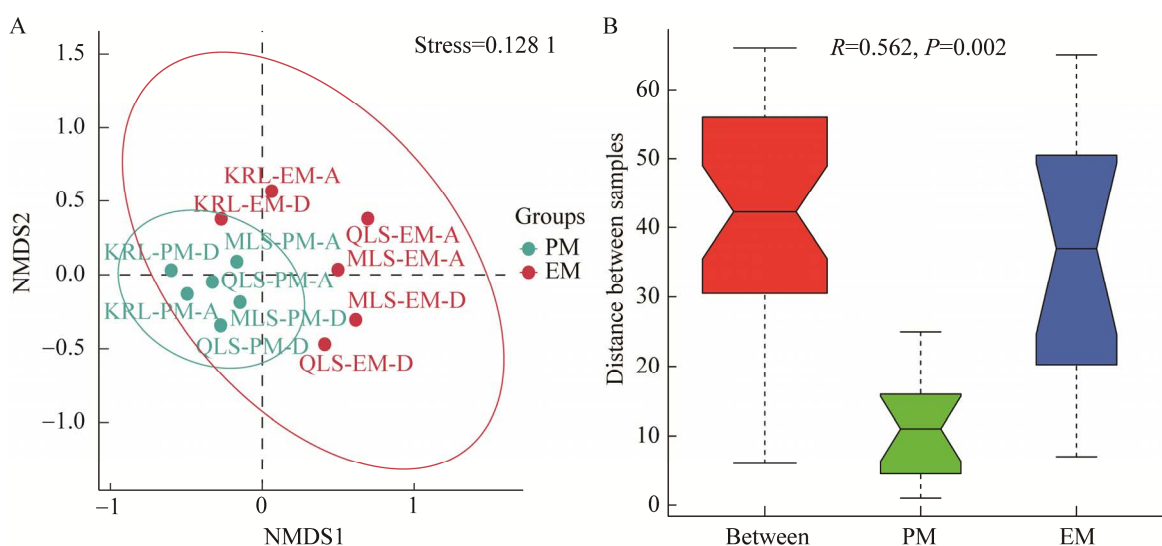


图 11 垫状点地梅叶际和内生微生物物种组成的空间变异分析 A: NMDS 分析. B: ANOSIM 分析. Between 为垫状点地梅叶际和内生微生物组间的差异

Figure 11 Analysis of spatial variation of phyllospheric and endophytic microbial species composition in *Androsace tapete*. A: NMDS analysis. B: ANOSIM analysis. Between is the difference between the phyllospheric and endophytic microorganism of *Androsace tapete*.

质 BmJ 抑制某些真菌病原体, 其分离产物已被用作植物病害防治的叶面喷雾制剂^[43], 推测这是其成为内生微生物优势种的原因。

通过对比垫状点地梅存活与死亡个体的叶际和内生可培养微生物, 两者微生物的 α 多样性并无显著差异, 但在物种组成上有所差别。在叶际微生物中, 存活个体独有菌株有 9 种, 优势菌群中以 *Penicillium sajarovii* (9.71%)、*Penicillium raistrickii* (7.43%) 和 *Pseudomonas baetica* (6.86%) 为主, 包括 2 种细菌(13.15%)、1 种酵母菌(4.57%)和 7 种丝状真菌(45.13%); 而死亡个体独有菌株有 13 种, 优势类群中以 *Penicillium sajarovii* (8.57%)、*Fusarium tricinctum* (8.00%) 和 *Fusarium acuminatum* (7.43%) 为主, 包括 2 种细菌(10.29%)、3 种酵母菌(14.86%)和 5 种丝状真菌(32.00%)。内生可培养微生物中, 存活个体独有菌株有 6 种, 优势类群中以 *Bacillus mycoides* (14.00%)、*Pantoea agglomerans* (11.00%) 和 *Pseudomonas baetica* (8.00%) 为主, 其中细菌 5 种(40.00%)、丝状真菌 5 种(26.00%)。死亡个体独有菌株有 14 种, 优势类群中以 *Fusarium tricinctum* (8.05%)、*Peribacillus simplex* (6.90%) 和 *Bacillus simplex* (5.17%) 为主, 其中细菌 7 种(31.62%)、丝状真菌 3 种(17.25%)。

组成微生物群落的各物种彼此之间存在广泛的相互作用, 包括通过产生抗生素或刺激植物防御来竞争营养物或生存空间^[44-45]。来源于不同生存状态个体的叶际和内生微生物, 其种类和各菌株所占比例差异较大, 若环境发生变化(如宿主植物死亡), 原叶际微生物组的稳态被打破, 群落结构也随之改变, 因此, 存活与死亡个体不同的生存环境造就了各异的微生物群落。例如缺失免疫相关通路的拟南芥突变体在高湿度的环境中, 细菌多样性下降, 叶际微生

物组失衡^[11]。这种改变可能是新环境中原菌群里的某些菌株竞争力发生变化或空缺出新的生态位“招募”了新的菌株定殖造成的。在死亡个体独有菌株中 *Cladosporium pseudocladosporioides* 是红树莓果实腐烂的病原体^[46]、*Penicillium solitum* 能够引起藏红花球茎的腐烂^[47]、*Alternaria chlamydosporigena* 能导致番茄的叶斑病^[48], 正常情况下垫状点地梅存活年限有上百年^[49], 这些致病菌可能是造成垫状点地梅非自然死亡的原因之一。当然垫状点地梅存活与死亡个体的叶际和叶内可培养微生物的物种组成差异, 可能是垫状点地梅死亡后营养条件等因素发生改变所造成的。若要明确垫状点地梅的死亡具体是由哪种菌株造成, 还需进行侵染实验。

虽然垫状点地梅存活与死亡个体的叶际和叶内可培养微生物的物种组成上存在差异, 并且各菌株所占比例不同, 但二者群落中物种的相似度很高。在叶际可培养微生物中, 共有菌株的相对丰度之和分别占存活与死亡个体的 89.73% 和 81.15%。在内生可培养微生物中, 共有菌株的相对丰度之和分别占存活与死亡个体的 90.00% 和 70.71%。表明叶际或内生可培养微生物异养方式大多并不固定, 在垫状点地梅的存活和死亡个体中均能存活, 即这些共有的微生物可以兼共生和腐生生存。

3.2 垫状点地梅叶际与内生可培养微生物的比较

叶际可培养微生物较内生可培养微生物多样性更高, 这与 Agler 等的研究结果“与内生微生物群相比, 叶际微生物群似乎更加多样和丰富”一致^[50]。比较垫状点地梅叶际与内生可培养微生物的多样性和物种组成, 发现二者的各项 α 多样性指数都比较高, 大多无显著差异, 但在物种组成上存在显著的空间异质性。二者的优势属均为青霉属(*Penicillium*), 独有菌株分别

有 14 种和 10 种, 叶际微生物的优势类群中以 *Penicillium sajarovii* (9.14%)、*Fusarium tricinctum* (7.43%)、*Fusarium acuminatum* (6.29%) 等菌株为主, 而内生微生物的优势类群中以 *Bacillus mycoides* (7.30%)、*Fusarium tricinctum* (6.93%) 和 *Pantoea agglomerans* (6.93%) 为主。此外, 聚类热图(图 9)的分析结果显示, 内生微生物在同一居群的物种组成更加相似, 而叶际微生物则无此现象, 相较于能直接与外部环境接触、来源更广泛的叶际微生物, 内生微生物所处的环境更加稳定, 同一居群的叶内环境更为相似, 而微生物群落对环境有选择偏好^[51], 同一居群的叶际环境差异更大可能是造成这一结果的主要因素。

有研究表明, 植物叶表面通过气孔释放的水分可以被一层非常薄的层流层隔离, 从而减轻叶际微生物所面临的水分胁迫^[52]; 大多数植物叶片表面在显微范围内有许多褶皱, 这些褶皱的低洼区域影响水滴扩散为叶际微生物提供生存空间^[53]; 叶表面能分泌少量的葡萄糖、果

糖和蔗糖等营养物质, 这为叶际微生物提供了相对充足的碳源^[52,54]。相较于叶际, 叶内有着更丰富而稳定的营养和水分条件^[55], 但内生微生物的定殖也需面临来自植物免疫的压力^[56]。可能是这些独有菌株更适宜生存在叶际或叶内提供的独特微环境中, 这种生存环境上的差别造成了这部分菌株的空间异质性。此外, 叶际和内生可培养微生物中, 共有菌株 35 种, 相对丰度之和分别占 82.00% 和 80.29%。其他一些研究也表明, 在植物叶和根的微生物群中, 尽管整体上二者的群落结构和组成有所不同, 但在关键群落成员中可以大量重叠^[57-59]。这表明所谓的叶际、根际和内生微生物, 只是对其生存部位不同而区别定义, 实际上它们大多生态位并不固定, 生存空间没有确定的界限。

3.3 垫状点地梅与其他植物叶际和内生可培养微生物的比较

比较垫状点地梅与其他植物叶际或内生可培养微生物, 结果如表 4 所示。从垫状点地梅

表 4 垫状点地梅与其他植物的叶际或内生可培养微生物的比较

Table 4 Comparison of phyllospheric or endophytic culturable microorganisms of *Androsace tapete* and other plants

The plants studied	Part	Species of strain	Dominant genera	Dominant species	Number of genus and species
<i>Androsace tapete</i>	Phyllosphere	Bacteria and fungi	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium sajarovii</i>	22 genus, 49 species
Maize ^[60]	Phyllosphere	Nitrogen-fixing bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	16 genus, 24 species
Banana ^[61]	Phyllosphere	Antagonistic bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	—
Rape ^[62]	Phyllosphere	Bacteria	<i>Bacillus</i>	—	—
<i>Androsace tapete</i>	Intrafoliar	Bacteria and fungi	<i>Penicillium</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	19 genus, 45 species
Medicinal plants ^[63]	Intrafoliar	Bacteria and fungi	<i>Bacillus</i>	—	—
<i>Kobresia capillifolia</i> ^[64]	Intra-root, intra-stem, intra-flower	Bacteria	<i>Bacillus</i>	—	11 genus, 43 species
<i>Cannabis sativa</i> L. ^[65]	Intrafoliar, intra-petiole, intra-seed	Bacteria and fungi	<i>Pseudomonas</i> <i>Aureobasidium</i>	—	Bacteria 18 genus, fungus 13 genus
<i>Oryza sativa</i> ^[66]	intra-seed	Bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	—
<i>Leontopodium nanum</i> ^[67]	Intra-root, intra-stem, intrafoliar, intra-seed	Bacteria	<i>Pseudomonas</i> <i>Bacillus</i>	—	18 genus, 52 species

—: 无数据

—: No data.

分离出的叶际和内生可培养微生物的属种数均较高, 这可能与本文研究的微生物种类及使用的培养基较多有关。大多植物的叶际和内生可培养微生物优势属均为芽孢杆菌属(*Bacillus*), 本文的优势属是青霉菌属(*Penicillium*), 但在细菌类群中 *Bacillus* 同样占有优势。国内外有关叶际可培养微生物的研究较少, 叶际和内生可培养微生物的研究对象大多集中在农作物和药用植物上, 而且研究的菌株主要以细菌或其他功能菌株为主, 对得到菌株的功能应用方面取得了许多成果。关于高原植物的叶际和内生可培养微生物的研究和应用还较为缺乏, 这些在极端环境下与植物共生的微生物有着巨大的开发潜力, 仍需进一步探索。

4 结论

垫状点地梅叶际和内生可培养微生物的物种组成均较为丰富。在叶际微生物中, 有细菌 10 属 18 种、酵母菌 5 属 8 种、丝状真菌 7 属 23 种, 其中 *Penicillium* 和 *Penicillium sajarovii* 分别为优势属和优势种。在内生微生物中, 有细菌 9 属 18 种、酵母菌 4 属 7 种、丝状真菌 6 属 20 种, *Penicillium* 和 *Bacillus mycoides* 分别为优势属和优势种。

垫状点地梅存活与死亡个体的叶际和内生可培养微生物 α 多样性并无显著差异, 在物种组成上, 二者各菌株所占比例差异较大, 但各群落中物种的相似度很高, 表明这些共有微生物的异养方式并不固定, 可以兼共生和腐生生存。在死亡个体独有菌株中, *Cladosporium pseudocladosporioides*、*Penicillium solitum* 和 *Alternaria chlamydosporigena* 已被证实为植物的病原体。

垫状点地梅叶际与内生可培养微生物在 α 多样性指数上大多无显著差异, 但在物种组

成上, 二者存在显著的空间异质性。此外二者共有菌株的比例较高。表明二者中大多微生物的生态位并不固定, 生存空间没有明确的界限。

与其他植物的叶际或内生可培养微生物相比, 垫状点地梅叶际和内生可培养微生物的多样性较高, 优势属与大多植物的叶际或内生可培养微生物优势属存在差异, 但在本文的细菌类群中, *Bacillus* 同样占有优势。

REFERENCES

- [1] QIU J. China: the third pole[J]. Nature, 2008, 454(7203): 393-396.
- [2] ZHANG BP, CHEN XD, LI BL, YAO YH. Biodiversity and conservation in the Tibetan Plateau[J]. Journal of Geographical Sciences, 2002, 12(2): 135-143.
- [3] JIN X, JIN YX, MAO XF. Ecological risk assessment of cities on the Tibetan Plateau based on land use/land cover changes - case study of Delingha City[J]. Ecological Indicators, 2019, 101: 185-191.
- [4] YAO TD, XUE YK, CHEN DL, CHEN FH, THOMPSON L, CUI P, KOIKE T, LAU WKM, LETTENMAIER D, MOSBRUGGER V, ZHANG RH, XU BQ, DOZIER J, GILLESPIE T, GU Y, KANG SC, PIAO SL, SUGIMOTO S, UENO K, WANG L, et al. Recent third pole's rapid warming accompanies cryospheric melt and water cycle intensification and interactions between monsoon and environment: multidisciplinary approach with observations, modeling, and analysis[J]. Bulletin of the American Meteorological Society, 2019, 100(3): 423-444.
- [5] 何永涛, 石培礼, 闫巍. 高山垫状植物的生态系统工程师效应研究进展[J]. 生态学杂志, 2010, 29(6): 1221-1227.
HE YT, SHI PL, YAN W. Ecosystem engineering of cushion plants in alpine plant community: a review[J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(6): 1221-1227 (in Chinese).
- [6] 王玉金, 李小娟, 郝刚, 刘建全. 点地梅属的分子系统学、生物地理学和垫状形态的趋同进化[J]. 植物分类学报, 2004, 42(6): 481-499.
WANG YJ, LI XJ, HAO G, LIU JQ. Molecular phylogeny and biogeography of *Androsace* (Primulaceae) and the convergent evolution of cushion morphology[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 2004, 42(6): 481-499 (in Chinese).
- [7] 何永涛, 石培礼, 张宪洲, 杜明远, 闫巍, 孙维. 当雄

- 念青唐古拉山脉南坡不同海拔垫状点地梅分布特征[J]. 山地学报, 2013, 31(6): 641-646.
- HE YT, SHI PL, ZHANG XZ, DU MY, YAN W, SUN W. Elevational distribution of cushion plant *Androsace tapete* in the southern slope of Nyainqentanglha Mountains, Tibetan Plateau[J]. Journal of Mountain Science, 2013, 31(6): 641-646 (in Chinese).
- [8] BEATTIE GA, LINDOW SE. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies[J]. Phytopathology, 1999, 89(5): 353-359.
- [9] LINDOW SE, BRANDL MT. Microbiology of the phyllosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 1875-1883.
- [10] BERENDSEN RL, PIETERSE CMJ, BAKKER PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(8): 478-486.
- [11] CHEN T, NOMURA K, WANG XL, SOHRABI R, XU J, YAO LY, PAASCH BC, MA L, KREMER J, CHENG YT, ZHANG L, WANG N, WANG ET, XIN XF, HE SY. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere[J]. Nature, 2020, 580(7805): 653-657.
- [12] LINDOW SE, SUSLOW TV. Temporal dynamics of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in flowers in inoculated pear trees[J]. Phytopathology®, 2003, 93(6): 727-737.
- [13] VOGEL C, BODENHAUSEN N, GRUISSEM W, VORHOLT JA. The *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health[J]. The New Phytologist, 2016, 212(1): 192-207.
- [14] PREININGER C, SAUER U, BEJARANO A, BERNINGER T. Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(17): 7265-7282.
- [15] MATTOS KA, PÁDUA VLM, ROMEIRO A, HALLACK LF, NEVES BC, ULISSES TMU, BARROS CF, TODESCHINI AR, PREVIATO JO, MENDONÇA-PREVIATO L. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth[J]. Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, 2008, 80(3): 477-493.
- [16] MIYAUCHI MYH, LIMA DS, NOGUEIRA MA, LOVATO GM, MURATE LS, CRUZ MF, FERREIRA JM, ZANGARO W, ANDRADE G. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes[J]. Scientia Agricola, 2008, 65(5): 525-531.
- [17] LINDOW SE. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by *Ice⁻Pseudomonas syringae* mutants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(10): 2520-2527.
- [18] KUMAR J, BABELE PK, SINGH D, KUMAR A. UV-B radiation stress causes alterations in whole cell protein profile and expression of certain genes in the rice phyllospheric bacterium *Enterobacter cloacae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1440.
- [19] ARUN KD, SABARINATHAN KG, GOMATHY M, KANNAN R, BALACHANDAR D. Mitigation of drought stress in rice crop with plant growth-promoting abiotic stress-tolerant rice phyllosphere bacteria[J]. Journal of Basic Microbiology, 2020, 60(9): 768-786.
- [20] SANDHU A, HALVERSON LJ, BEATTIE GA. Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(2): 383-392.
- [21] WEYENS N, THIJS S, POPEK R, WITTERS N, PRZYBYSZ A, ESPENSHADE J, GAWRONSKA H, VANGRONSVELD J, GAWRONSKI SW. The role of plant-microbe interactions and their exploitation for phytoremediation of air pollutants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(10): 25576-25604.
- [22] WEYENS N, van der LELIE D, TAGHAVI S, VANGRONSVELD J. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(2): 248-254.
- [23] AFZAL M, KHAN QM, SESSITSCH A. Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants[J]. Chemosphere, 2014, 117: 232-242.
- [24] LI F, DENG J, NZABANITA C, LI YZ, DUAN TY. Growth and physiological responses of perennial ryegrass to an AMF and an *Epichloë* endophyte under different soil water contents[J]. Symbiosis, 2019, 79(2): 151-161.
- [25] PERREAULT R, LAFOREST-LAPOINTE I. Plant-microbe interactions in the phyllosphere: facing challenges of the anthropocene[J]. The ISME Journal, 2022, 16(2): 339-345.
- [26] 李渤生, 王金亭, 李世英. 西藏座垫植物的区系特点及地理分布[J]. 山地研究, 1987, 5(1): 14-20.
- LI BS, WANG JT, LI SY. The floristic features and geographic distribution of the cushion plant in Xizang[J]. Journal of Mountain Research, 1987, 5(1): 14-20 (in Chinese).
- [27] 黄荣福, 王为义. 青藏高原垫状植物区系及垫状植物群落演替[A]//中国科学院西北高原生物研究所. 高原生物学集刊[M]. 第10集. 北京: 科学出版社, 1991: 15-26.
- HUANG RF, WANG WY. The flora and community succession of cushion plant in Qinghai-Xizang plateau[A]//Northwest Institute of Plateau Biology,

- Chinese Academy of Sciences. Acta Biologica Plateau Sinica[M]. Collection 10. Beijing: Science Press, 1991: 15-26 (in Chinese).
- [28] 秦志业, 谢文忠. 藏北土门地区垫状植物的形态与生态观察[J]. 植物学报, 1980, 22(2): 177-181.
- QIN ZY, XIE WZ. Observations on the morphology and ecology of the cushion plants in Togme region of northern Xizang[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1980, 22(2): 177-181 (in Chinese).
- [29] HE YT, KUEFFER C, SHI PL, ZHANG XZ, DU MY, YAN W, SUN W. Variation of biomass and morphology of the cushion plant *Androsace tapete* along an elevational gradient in the Tibetan Plateau[J]. Plant Species Biology, 2014, 29(3): E64-E71.
- [30] HE YT, WANG F, NIU B, WANG ZP, LI M, SHI PL, ZHANG XZ. The facilitation of restoration by cushion plant *Androsace tapete* in a degraded alpine grassland[J]. Journal of Resources and Ecology, 2022, 13(1): 107-112.
- [31] ZENG LY, XU LL, TANG SQ, TERSING T, GENG YP, ZHONG Y. Effect of sampling strategy on estimation of fine-scale spatial genetic structure in *Androsace tapete* (Primulaceae), an alpine plant endemic to Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2010, 48(4): 257-264.
- [32] 曹鹏熙, 刘怡萱, 许国琪, 陈飞飞, 郑恒, 刘星. 西藏那曲地区垫状点地梅根际土壤细菌多样性研究[J]. 环境生态学, 2019, 1(5): 1-9.
- CAO PX, LIU YX, XU GQ, CHEN FF, ZHENG H, LIU X. Study on bacterial diversity rhizosphere soil of *Androsace tapete*[J]. Environmental Ecology, 2019, 1(5): 1-9 (in Chinese).
- [33] JACQUES MA, MORRIS CE. A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995, 18(1): 1-14.
- [34] 周育, 乔雄梧, 王静, 崔中利, 李顺鹏. 植物叶际微生物提取方法研究[J]. 植物研究, 2006, 26(2): 2233-2237.
- ZHOU Y, QIAO XW, WANG J, CUI ZL, LI SP. Extraction methods of microorganisms from phyllosphere[J]. Bulletin of Botanical Research, 2006, 26(2): 2233-2237 (in Chinese).
- [35] 严亚萍, 李治滢, 董明华, 周巧, 晋方佑, 杨丽源, 李绍兰. 云南阳宗海酵母菌种群结构及产胞外酶测试[J]. 微生物学报, 2013, 53(11): 1205-1212.
- YAN YP, LI ZY, DONG MH, ZHOU Q, JIN FY, YANG LY, LI SL. Yeasts from Yangzonghai Lake in Yunnan (China): diversity and extracellular enzymes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(11): 1205-1212 (in Chinese).
- [36] 孙立夫, 张艳华, 裴克全. 一种高效提取真菌总 DNA 的方法[J]. 菌物学报, 2009, 28(2): 299-302.
- SUN LF, ZHANG YH, PEI KQ. A rapid extraction of genomic DNA from fungi[J]. Mycosystema, 2009, 28(2): 299-302 (in Chinese).
- [37] WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//PCR Protocols[M]. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [38] LANDEWEERT R, LEEFLANG P, KUYPER TW, HOFFLAND E, ROSLING A, WERNARS K, SMIT E. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 327-333.
- [39] STEEN AD, CRITS-CHRISTOPH A, CARINI P, DEANGELIS KM, FIERER N, LLOYD KG, CAMERON THRASH J. High proportions of bacteria and Archaea across most biomes remain uncultured[J]. The ISME Journal, 2019, 13(12): 3126-3130.
- [40] VISAGIE CM, HOUBRAKEN J, FRISVAD JC, HONG SB, KLAASSEN CHW, PERRONE G, SEIFERT KA, VARGA J, YAGUCHI T, SAMSON RA. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*[J]. Studies in Mycology, 2014, 78: 343-371.
- [41] FRISVAD JC, SAMSON RA. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins[J]. Studies in Mycology, 2004, 49: 1-173.
- [42] FRISVAD J, SMEDSGAARD J, LARSEN T. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*[J]. Studies in Mycology, 2004, 49: 201-241.
- [43] NEHER OT, JOHNSTON MR, ZIDACK NK, JACOBSEN BJ. Evaluation of *Bacillus mycoides* isolate BmJ and *B. mojavensis* isolate 203-7 for the control of anthracnose of cucurbits caused by *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*[J]. Biological Control, 2009, 48(2): 140-146.
- [44] ESSER DS, LEVEAU JHJ, MEYER KM, WIEGAND K. Spatial scales of interactions among bacteria and between bacteria and the leaf surface[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2015, 91(3): fii034.
- [45] HASSANI MA, DURÁN P, HACQUARD S. Microbial interactions within the plant holobiont[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 58.
- [46] SWETT CL, HAMBY KA, HELLMAN EM, CARIGNAN C, BOURRET TB, KOIVUNEN EE. Characterizing members of the *Cladosporium cladosporioides* species complex as fruit rot pathogens of red raspberries in the mid-Atlantic and co-occurrence with *Drosophila suzukii* (spotted wing *Drosophila*)[J]. Phytoparasitica, 2019, 47(3): 415-428.
- [47] ZHANG T, HUANG C, DENG CP, ZHANG Y, FENG Y,

- HU JN, WANG RW, ZHAO LM, WANG Y, KAI GY. First report of corm rot on saffron caused by *Penicillium solitum* in China[J]. Plant Disease, 2020, 104(2): 579.
- [48] SADEGHI B, MIRZAEI S. First report of *Alternaria* leaf spot caused by *Alternaria chlamydosporigena* on tomato in Iran[J]. Plant Disease, 2018, 102(6): 1175.
- [49] 赵海卫, 郭柯, 杨瑶, 乔鲜果. 青藏高原垫状点地梅个体年龄判定方法及其生长规律[J]. 山地学报, 2015, 33(4): 473-479.
- ZHAO HW, GUO K, YANG Y, QIAO XG. Age determination and growing patterns of the cushion plant *Androsace tapete* in the Tibetan Plateau[J]. Mountain Research, 2015, 33(4): 473-479 (in Chinese).
- [50] AGLER MT, RUHE J, KROLL S, MORHENN C, KIM ST, WEIGEL D, KEMEN EM. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation[J]. PLoS Biology, 2016, 14(1): e1002352.
- [51] WILLIAMS HTP, LENTON TM. Environmental regulation in a network of simulated microbial ecosystems[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(30): 10432-10437.
- [52] MERCIER J, LINDOW SE. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 369-374.
- [53] MECHABER WL, MARSHALL DB, MECHABER RA, JOBE RT, CHEW FS. Mapping leaf surface landscapes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(10): 4600-4603.
- [54] TUKEY HB Jr. The leaching of substances from plants[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1970, 21: 305-324.
- [55] KHARE E, MISHRA J, ARORA NK. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2732.
- [56] NEWMAN MA, SUNDELIN T, NIELSEN JT, ERBS G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 139.
- [57] BAI Y, MÜLLER DB, SRINIVAS G, GARRIDO-OTER R, POTTHOFF E, ROTT M, DOMBROWSKI N, MÜNCH PC, SPAEPEN S, REMUS-EMSERMANN M, HÜTTEL B, MCHARDY AC, VORHOLT JA, SCHULZE-LEFERT P. Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota[J]. Nature, 2015, 528(7582): 364-369.
- [58] ZARRAONAINDIA I, OWENS SM, WEISENHORN P, WEST K, HAMPTON-MARCELL J, LAX S, BOKULICH NA, MILLS DA, MARTIN G, TAGHAVI S, van der LELIE D, GILBERT JA. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota[J]. mBio, 2015, 6(2): e02527-e02514.
- [59] WAGNER MR, LUNDBERG DS, del RIO TG, TRINGE SG, DANGL JL, MITCHELL-OLDS T. Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12151.
- [60] ABADI VAJM, SEPEHRI M, RAHMANI HA, DOLATABAD HK, SHAMSHIRIPOUR M, KHATABI B. Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(2): 898-912.
- [61] CEBALLOS I, MOSQUERA S, ANGULO M, MIRA JJ, ARGEL LE, URIBE-VELEZ D, ROMERO-TABAREZ M, ORDUZ-PERALTA S, VILLEGAS V. Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*[J]. Microbial Ecology, 2012, 64(3): 641-653.
- [62] 姜丹. 油菜叶际微生物多样性及其对敌敌畏的降解[D]. 石家庄: 河北科技大学硕士学位论文, 2009.
- JIANG D. Microbial diversity in the phyllosphere of rape and degradation of dichlorvos by the microbes[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei University of Science and Technology, 2009 (in Chinese).
- [63] MILLER KI, QING C, SZE DMY, ROUFOGALIS BD, NEILAN BA. Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity[J]. Microbial Ecology, 2012, 64(2): 431-449.
- [64] WANG Y, YANG CD, YAO YL, WANG YQ, ZHANG ZF, XUE L. The diversity and potential function of endophytic bacteria isolated from *Kobresia capillifolia* at alpine grasslands on the Tibetan Plateau, China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(9): 2153-2162.
- [65] SCOTT M, RANI M, SAMSATLY J, CHARRON JB, JABAJI S. Endophytes of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars: identification of culturable bacteria and fungi in leaves, petioles, and seeds[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2018, 64(10): 664-680.
- [66] MANO H, TANAKA F, WATANABE A, KAGA H, OKUNISHI S, MORISAKI H. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field[J]. Microbes and Environments, 2006, 21(2): 86-100.
- [67] 程亮. 青藏高原矮火绒草内生细菌多样性及生物功能分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2222-2233.
- CHENG L. Diversity and biological function of endophytic bacteria in *Leontopodium nanum* of Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(10): 2222-2233 (in Chinese).