



研究报告

宁夏枸杞深色有隔内生真菌的侵染特征及多样性

胡丽杰 闫思远 孙牧笛 李文学 顾沛雯*

宁夏大学农学院 宁夏 银川 750021

摘要:【背景】枸杞是享誉中外的名贵药材, 深色有隔内生真菌(Dark septate endophytes, DSE)是枸杞内生真菌的重要组成部分。【目的】从宁夏枸杞栽培品种和野生品种的根系分离获得 DSE 菌株, 研究枸杞 DSE 的群落组成、物种多样性及在宿主植物内的侵染定殖情况。【方法】从宁夏枸杞栽培园采集栽培品种宁杞 1 号、宁杞 3 号、宁杞 5 号、宁杞 6 号、宁杞 7 号、宁杞 8 号以及野生品种黄果枸杞和黑果枸杞共 8 个枸杞品种的根系, 分离 DSE 菌株, 运用形态学特征、rDNA-ITS 序列分析进行菌株鉴定, 采用回接试验方法确定 DSE 真菌。【结果】DSE 在枸杞根系能形成大量“微菌核”典型结构。从 8 个枸杞品种根系中共分离获得 DSE 菌株 279 株, 分属于 18 个属, 具有丰富的物种多样性。镰刀菌属(*Fusarium*)为各品种的共有属和优势属, 相对频率最高达 85%。*Monosporascus*、蓝状菌属(*Talaromyces*)和俄氏孔菌属(*Earliella*)为枸杞内首次报道的 DSE。枸杞不同品种中 DSE 群落物种多样性指数、均匀度指数和 Simpson 指数差异显著。【结论】DSE 在枸杞栽培品种及野生品种中具有丰富的生物多样性, 能够与枸杞根系形成良好的共生关系, 增强了枸杞对生态环境的适应性。

关键词: 深色有隔内生真菌, 侵染特征, 群落组成, 物种多样性

Infection characteristics and diversity of dark septate endophytic fungi isolated from *Lycium barbarum* in Ningxia

HU Li-Jie YAN Si-Yuan SUN Mu-Di LI Wen-Xue GU Pei-Wen*

School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China

Abstract: [Background] *Lycium barbarum* is a traditional edible herb, and dark septate endophytes (DSE) is an important component of endophytic fungi in *L. barbarum*. [Objective] DSE strains were isolated from the roots of cultivated and wild varieties of *L. barbarum* in Ningxia. In order to analyze the diversity and the community constitution of DSE associated with *L. barbarum* and understand the colonization and distribution of DSE in *L. barbarum*. [Methods] The roots of Ningqi-1, Ningqi-3, Ningqi-5, Ningqi-6, Ningqi-7, Ningqi-8, *L. barbarum* var. *auranticarpum* and *L. ruthenicum* were collected from Ningxia wolfberry cultivation garden. Strains were identified by morphological characteristic and rDNA-ITS sequence, and DSE of roots from *L. barbarum* were validated by Koch's Rule. [Results] DSE live as microsclerotia in the roots of *L. barbarum*. In this paper, 279 DSE were isolated from roots of eight kinds of *L. barbarum*, belonging to 18 genera, which are rich in species diversity. *Fusarium* were a common and

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31460484)

*Corresponding author: E-mail: gupeiwen2013@126.com

Received: 13-11-2018; **Accepted:** 09-04-2019; **Published online:** 24-04-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31460484)

*通信作者: E-mail: gupeiwen2013@126.com

收稿日期: 2018-11-13; **接受日期:** 2019-04-09; **网络首发日期:** 2019-04-24

dominant genus in various breeds. The relative frequency was up to 85%. *Monosporascus*, *Talaromyces* and *Earliella* were firstly reported in *L. barbarum*. There were significant differences in biodiversity index, evenness index and Simpson's index of DSE community among different varieties of *L. barbarum*. **[Conclusion]** DSE of *L. barbarum* were rich in resources of cultivated and wild varieties of *L. barbarum*, DSE could form a symbiotic relationship with *L. barbarum* and enhance the adaptability of wolfberry to the ecological environment.

Keywords: Dark septate endophytic fungi, Infection characteristics, Community composition, Species diversity

植物内生菌被认为普遍存在于陆生植物中,在所调查过的陆生植物组织中均发现有植物内生菌的定殖^[1]。植物内生菌种类繁多,主要包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌三大类,植物内生真菌因其丰富的真菌资源及其多样的生态学功能尤为人们所关注^[2]。近年来探讨和挖掘内生真菌作为生防菌逐渐成为该领域的一个研究热点^[3]。

深色有隔内生真菌(Dark septate endophytes, DSE)是指一群定殖于植物根表皮、皮层和维管组织细胞内或细胞间隙的一类内生真菌,其主要特征是菌丝深色,具有明显横隔膜,能够在植物组织内形成菌丝网络、胞间菌丝和“微菌核”等结构,但不会在根组织内形成病原真菌所引起的病理学特征^[4]。与菌根真菌植物共生体相似,DSE与植物共生体的作用也多种多样,不仅能提高宿主植物对N、P、K等营养元素的吸收,而且能提高宿主植物的抗逆性^[5]。国内外有关DSE的报道较少,Addy等^[6]认为在极端温度和干旱的胁迫条件下,DSE能够产生大量深色菌丝和“微菌核”来增强宿主植物的抗旱性。Diene等^[7]从日本的森林树木中分离出一株DSE菌株*Pseudosigmoidea*,该菌能使大白菜在低pH下生长。国内对DSE的研究起步较晚,主要集中在特殊生境和特色植物中。2010年张杰^[8]从云南两个重金属矿区分离出的DSE菌株Z113在重金属胁迫下能提高玉米的生物量。2017年蓝桃菊等^[9]从广西大石围天坑群原始森林分离的DSE菌株中获得了能提高任豆(*Zenia insignis*)和苏木(*Zenia insignis*)抗旱能力的菌株。有研究发现,DSE不仅能分泌黑色素吸附土壤中的重金属离子,还能产生次级代谢产物抑制病原菌、昆虫及食草动物的危害,增强宿主植

物在胁迫环境中的抗逆性^[10]。

枸杞(*Lycium barbarum*)属茄科枸杞属,多年生落叶灌木,在宁夏、青海、甘肃等地大面积种植,是享誉中外的名贵药材。目前广泛栽植的枸杞栽培品种主要是宁杞系列1-8号,野生品种主要为黄果枸杞和黑果枸杞。目前国内外对枸杞的研究主要集中在其抗逆性、抗氧化性和化学成分等方面^[11],对枸杞中DSE真菌的研究有少量的报道。2012年Zhang等^[12]从宁夏枸杞根系中分离得到一株菌LBF-2,分子鉴定发现与菊异茎点霉(*Paraphoma chrysanthemicola*)的相似度达到96%,能够诱导宿主根系生理活性的改变,增强根系活力,促进枸杞生长。2015年石志刚等^[13]发现DSE菌株LBF-2和LBF-27对枸杞的侵染率都在65.81%以上,能提高枸杞叶片中游离脯氨酸的含量,提高枸杞抗逆性;2017年,徐全智^[11]从宁夏枸杞根部分离的NQ3GF₁菌株使枸杞苗净生长量达到1.87 g,是对照的1.7倍,根条数是对照的2.3倍。枸杞DSE是枸杞内生真菌的重要组成部分,本研究在前期初步探究枸杞内生真菌多样性及抑菌活性的基础上,通过调查6个宁夏枸杞栽培品种和2种野生枸杞根内DSE侵染特征和多样性,了解枸杞根际DSE的分布规律,以便利用枸杞DSE资源,为功能菌株的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2017年11月从宁夏农科院枸杞品种园和宁夏银川市森森枸杞园采集宁杞1号、宁杞3号、宁杞5号、宁杞6号、宁杞7号、宁杞8号等6个栽培品种和黄果枸杞、黑果枸杞2个野生枸杞品种的根

样。具体采集方法是: 每品种随机选取健康植株 3 株, 每株随机按东西南北 4 个方位取枸杞根样, 除去 5 cm 厚的表层土和枯枝落叶后, 采集 5 cm–20 cm 深的与主根相连的须根, 筛除土样, 将新鲜根段编号放入保鲜袋, 用 4 °C 冰盒带回实验室。在室内迅速将根样剪成 2 cm–5 cm 的小段, 分成 2 份, 一份固定于 FAA 的固定液(福尔马林 5 mL, 冰醋酸 5 mL, 70%乙醇 90 mL)中, 另一份随即用于 DSE 分离。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

马铃薯琼脂培养基、氢氧化钾、过氧化氢、酸性品红, 国药集团化学试剂有限公司; 2×EcoTaq PCR SuperMix (+dye), 北京全式金生物公司; 真菌 DNA 提取试剂盒, BioFlux 公司。正置荧光显微镜, Olympus 有限公司; 凝胶成像系统, Azure Biosystems 公司; Simpli Nano 超微量分光光度计, GE Healthcare 公司; 梯度 PCR 仪, Bio-Rad 公司; DYY-C6 电泳仪, 北京市六一仪器厂。

1.3 枸杞 DSE 侵染特征的观察

参照 Phillips 等^[14]的染色方法, 具体做法如下: 将根段从 FAA 固定液中取出, 无菌水冲洗 5 次, 用剪刀将根段剪成 5 mm 长的小段, 选取直径小于 2 mm 的细根加入到装有 10% KOH 溶液的指形管中, 90 °C 水浴 1 h。将 KOH 溶液倒掉, 在指形管

中加 10%碱性 H₂O₂ 于室温下放置 30 min。将碱性 H₂O₂ 倒掉, 加入 1% HCl 溶液浸泡 5 min, 倒去 HCl 溶液后加入 0.5%酸性品红染色, 室温过夜。之后将根样放到乳酸甘油混合液中脱色 12 h, 随机选取根段放在载玻片上, 盖上盖玻片, 轻轻敲打盖玻片, 使根段组织均匀地分散在载玻片上, 挑选典型标本于显微镜下观察拍照。

1.4 枸杞 DSE 菌株的分离培养与纯化

DSE 的分离依据常规的内生真菌分离法^[14]。具体方法如下: 用自来水将采集的枸杞根样表面的土冲洗干净, 用无菌水冲洗 3 次。使用无菌刀片将根系切割成 2 cm 长的根段, 放置于 75% (体积比) 的酒精内 1 min, 消除表面气泡, 用 5% (质量体积比) 的次氯酸钠溶液消毒 5 min, 用无菌水清洗 3 次, 之后用无菌吸水滤纸将根样表面水分吸干, 用已灭菌的剪刀将根段剪成 5 mm 左右的小根段, 用灭菌的镊子将根转移到 PDA 培养基上, 每皿放置 9 个根段, 3 次重复, 最后一遍无菌水洗涤液涂板检测有无杂菌污染。在 28 °C 培养 7 d 后, 选取菌落边缘颜色较深的菌株, 切取菌丝到新的 PDA 培养基上进行纯化。4 °C 保存菌种。

根据李宝库^[4]对 DSE 的判别标准(表 1 及表 2)对所分离的枸杞内生真菌进行分类, 确定 DSE 菌株。

表 1 DSE 菌落形态学观察要点

Table 1 The observation points of DSE colonial morphology

观察要点 Observation points	特点 Characteristics
菌落大小 Colony size	直径 Diameter (mm)
菌落颜色 Colony color	表面颜色和背面颜色; 色素是否渗入培养基 Surface and back colors; whether pigments penetrate the medium
菌落表面纹饰 Colony surface decoration	同心环、辐射沟纹、皱纹、菌落疏松或致密 Concentric rings, radiation grooves, wrinkles, loose or dense colonies
渗出物 Exudate	菌落表面有无液滴以及液滴的颜色 Colony surface with or without droplets and colour of droplets
菌落高度 Colony height	隆起、凸起、扁平、菌落中心部分状况等 Apophysis, bulge, flat, status of the central part of the colony, etc
菌落质地 Colony texture	毡状、绒毛状、毯状、粉粒状、棉絮状、有无成束状或绳状气生菌丝等 Panniform, villiform, carpet like, powdery granular, flocculence, whether there are bundles or ropes of aerial hyphae, etc
菌落边缘 Colony edge	全缘、树枝状、辐射状、锯齿状等 Whole edge, arborization, radial, zigzag, etc

表 2 DSE 微观形态观察要点
Table 2 The observation points of DSE microstructure

观察要点 Observation points	特点 Characteristics
菌丝特征 Hyphae characteristics	表面性状光滑或粗糙，宽度等 Surface properties are smooth or rough, width, etc
分生孢子形态 Conidia morphology	形状、大小、样式；聚集方式链状或聚集成簇；表面状况 Shape, size and style; the aggregation pattern is chained or clustered; surface condition
产孢结构的形态特征 Morphological characteristics of sporulation structure	形状、大小、样式；孢子着生位置、轮生、单生或互生 Shape, size and style; spore position, whorl, solitary or alternate
分生孢子梗 Conidia peduncle	分枝情况复杂或简单，轮生或单生；长短；基部光滑或粗糙 The branching situation is complex or simple, whorl or solitary; long or short; base smooth or rough

1.5 枸杞 DSE 菌株回接试验与形态观察

参考孟庆果^[15]内生真菌在根部的回接方法进行。操作步骤如下：选择枸杞组培苗作为回接宿主，将冷藏于 4℃ 的枸杞 DSE 菌株接种到 PDA 培养基上进行活化，3 d 后用无菌打孔器打 6 mm 菌饼，在距生长于 MS 培养基上的无菌枸杞组培苗 2 cm 处接种菌饼，3 d 后取枸杞根部，观察 DSE 菌株在枸杞根部的侵染定殖情况。观察方法参照 1.3。

1.6 枸杞 DSE 菌株形态与分子系统学特征

用直径为 6 mm 的打孔器挑取纯化菌株接种到直径为 9 cm 的 PDA 平板上，28℃ 黑暗培养，每 2–3 d 观察并记录菌落表面形态、大小、颜色、质地、生长速率等形态特征。

利用真菌 rDNA-ITS 序列通用引物 ITS1 (5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGC-3')和 ITS4 (5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3')对菌株进行分子鉴定。根据形态学特征，合并形态相同的 DSE 菌株作为一个菌种，每个菌种在 PDA 平板上 28℃ 黑暗培养 7 d 后，刮取新鲜菌丝 10 mg 置于 Eppendorf 管中，加液氮研磨充分后，采用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌丝 DNA 进行 PCR 扩增，将所得 PCR 原液进行测序。登录 NCBI，将测序结果进行 BLAST 比对，将所有菌种的 DNA 都进行测序，之后依据测序结果合并序列相同的菌株，将分子生物学与形态学特征都相同的菌种作为一个参考菌株，采用邻接 (Neighbor-Joining)法，用 DNAMAN 6.0.3.48 软件构建系统发育树，确定菌株的分类地位。

1.7 枸杞 DSE 多样性测度

定殖率(%)=(定殖根段数/总根段数)×100%；
分离率(IR%)=(分离 DSE 菌株数/分离总根段数)×100%；
分离频率(IF%)或相对频率(RF%)=(某种真菌菌株数/分离所得总菌株数)×100%；
多样性指数 (Shannon-Weiner index)： $H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$ ，式中 $P_i = N_i/N$ ，即第 i 种真菌菌株数占样地分离所得总菌株数 N 的比例； S 是品种物种数目；
均匀度指数(Pielou)： $J = H' / \ln S$ ；
优势度(Simpson)： $D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2$ ；
相似性系数(Sorenson's similarity coefficient, 简称 C_s)： $C_s = 2j/(a+b)$ ，式中 j 是 2 个品种共同分离到的 DSE 属数， a 为一品种内分离的 DSE 属数， b 为另一品种内分离的 DSE 属数。

2 结果与分析

2.1 枸杞 DSE 侵染定殖的形态特征

利用碱解离酸性品红染色法对枸杞根系进行染色，结果表明 DSE 菌丝能够侵染枸杞的根系，主要在胞间或胞内定殖，形成多种侵染结构。“微菌核”可充满单个皮层细胞(图 1A)或分布在多个细胞中(图 1B 和 1C)，同时有大量深色有隔菌丝平行分布在根皮层细胞(图 1D 和 1E)，并存在一些菌丝特化结构，如在植物细胞内形成的透明“微菌核”圈结构(图 1F)或深色的“微菌核”结构(图 1G)，颗粒状(图 1H)、

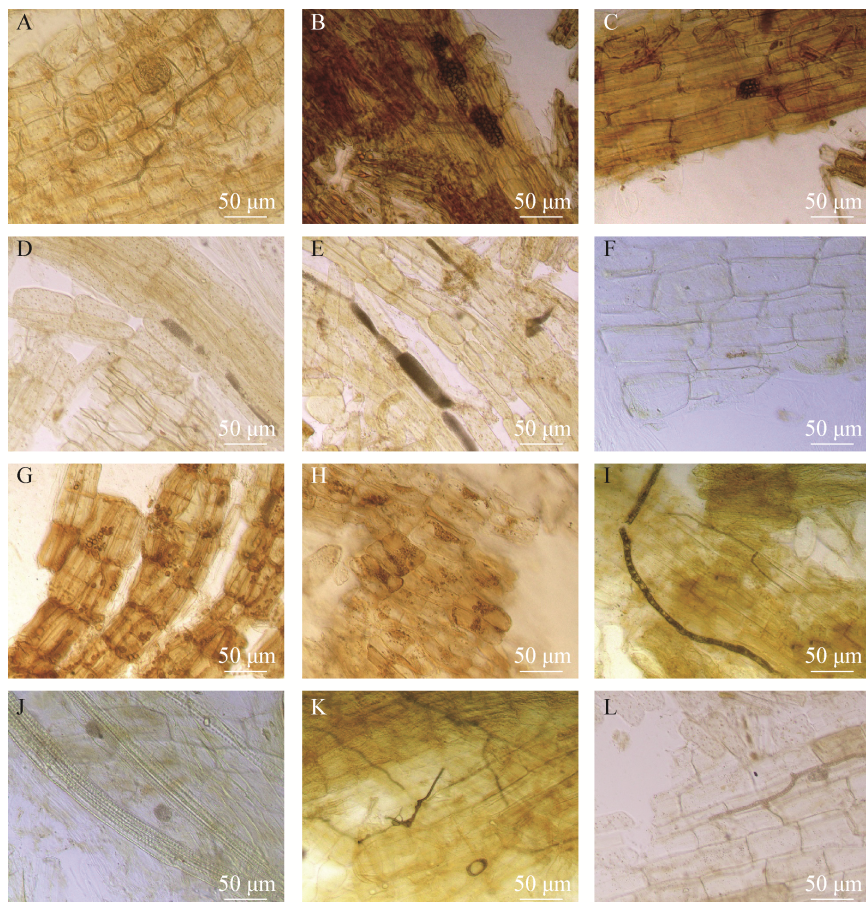


图1 枸杞根系 DSE 定殖形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of DSE colonization in *L. barbarum* roots

注: A: “微菌核”可充满单个皮层细胞; B 和 C: DSE 叶状“微菌核”; D 和 E: 深色有隔菌丝平行分布在根皮层细胞; F: 浅色及透明的“微菌核”圈; G: 深色的“微菌核”; H: 深色的颗粒状“微菌核”; I: 深色的带状“微菌核”; J: 深色的球状“微菌核”; K: 根系皮层细胞中分布的类似附着胞的结构; L: 类似厚垣孢子结构在表皮细胞中的分布。

Note: A: Microsclerotia can be filled with a single cortical cell; B and C: DSE leafy Microsclerotia; D and E: Dark septate mycelia parallel distributed in the root cortex cells; F: Light and transparent Microsclerotia circle; G: Dark Microsclerotia; H: Dark granular Microsclerotia; I: Dark banded Microsclerotia; J: Dark globular Microsclerotia; K: Appressorial-like structure in root cortex cells; L: Chlamydospore-like structure in epidermal cells.

带状(图 1I)、脑状(图 1J)和叶状等“微菌核”(图 1B 和 1C)。有些菌丝顶端细胞膨大、突起, 形成不规则类似附着胞的结构(图 1K), 此外还能观察到类似厚垣孢子的聚集(图 1L)。

2.2 枸杞 DSE 的分离数量

根据李宝库^[4]对 DSE 的判断标准, 8 个枸杞品种中共分离 DSE 菌株 279 株。由表 3 可知, 宁杞 1 号 34 株, 宁杞 3 号 68 株, 宁杞 5 号 20 株, 宁杞 6 号 32 株, 宁杞 7 号 39 株, 宁杞 8 号 20 株, 黄果枸杞 35 株, 黑果枸杞 31 株, DSE 平均总定殖率分别为 25.18%、48.89%、14.81%、23.70%、28.89%、

14.81%、25.93%和 22.96%。定殖率和分离率大致相同。其中, 各品种 DSE 菌株分离率各不相同, 其中宁杞 3 号最高, 为 50.37%; 宁杞 5 号和宁杞 8 号最低, 均为 14.81%。品种间 DSE 分离率和定殖率都表现为宁杞 3 号>宁杞 7 号>黄果枸杞>宁杞 1 号>宁杞 6 号>黑果枸杞>宁杞 5 号=宁杞 8 号。

2.3 枸杞 DSE 群落组成

利用形态学特征、回接试验和分子生物学鉴定, 将形态相同的菌株进行归类, 共获得不同种的 DSE 菌株 22 株。这 22 株 DSE 菌株纯培养菌落颜色以灰白色(图 2A、2B 和 2C)、黑色(图 2D)、灰褐色

表 3 枸杞不同品种 DSE 的侵染情况

Table 3 Infection of dark septate endophytic fungi in different varieties of *L. barbarum*

品种 Varieties	总根段数 Total root number	DSE 定殖率 DSE colonization rate (%)	DSE 分离率 DSE isolation rate (%)
宁杞 1 号 Ningqi-1	135	25.18	25.18
宁杞 3 号 Ningqi-3	135	48.89	50.37
宁杞 5 号 Ningqi-5	135	14.81	14.81
宁杞 6 号 Ningqi-6	135	23.70	23.70
宁杞 7 号 Ningqi-7	135	28.89	28.89
宁杞 8 号 Ningqi-8	135	14.81	14.81
黄果枸杞 <i>L. barbarum</i> var. <i>auranticarpum</i>	135	25.93	25.93
黑果枸杞 <i>L. ruthenicummurr</i>	135	22.96	22.96

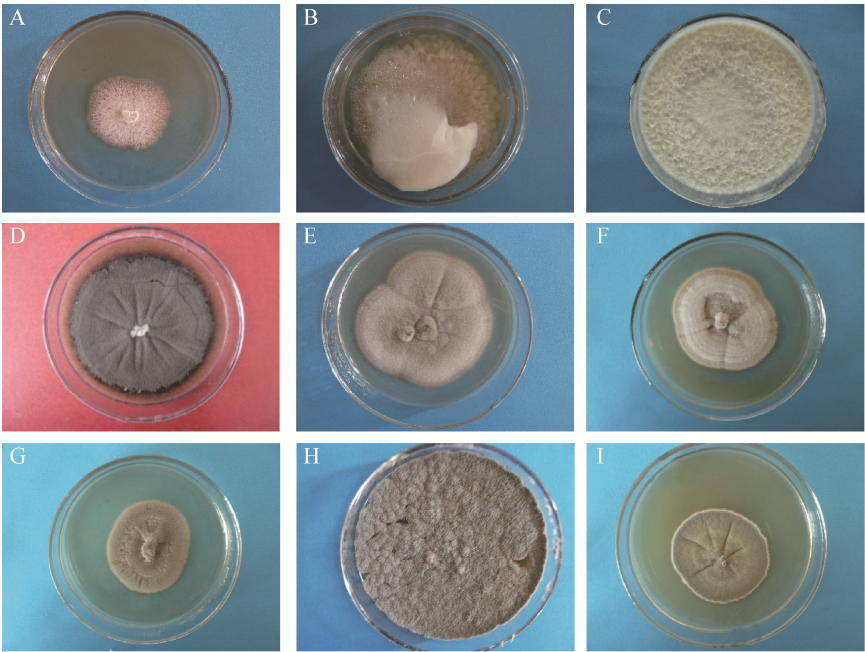


图 2 深色有隔内生真菌的形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of endophytic fungi in dark

注：A-I：宁杞 7 号、宁杞 5 号、宁杞 3 号、黄果枸杞、黑果枸杞、宁杞 1 号、黑果枸杞、宁杞 7 号和宁杞 6 号的 DSE 菌落形态。培养条件：28 °C 在 PDA 上暗培养。

Note: A-I: Fungal morphology of DSE of Ningqi-7, Ningqi-5, Ningqi-3, *L. barbarum* var. *auranticarpum*, *L. ruthenicummurr*, Ningqi-1, *L. ruthenicummurr*, Ningqi-7 and Ningqi-6. Condition of growth: 28 °C, dark culture on PDA.

(图 2E、2F 和 2G)和暗绿色(图 2H 和 2I)为主，形状呈圆形或近圆形，表面隆起或褶皱(图 2D、2F 和 2I)，常被覆绒毛(图 2A 和 2C)或絮状绒毛(图 2B)。回接试验进一步证实所分离的菌株为 DSE 菌株，根系中存在多种 DSE 菌株侵染结构(图 3)，“微菌核”(图 3A、3B、3C 和 3D)和深色有隔菌丝(图 3E)广泛分布在 8 个枸杞品种的细胞中，其中根皮层细胞内分

布最多且形态各异，有透明零散状(图 3F)、脑状(图 3G)、纺锤状(图 3H)和棒状(图 3I)等微菌核。

所分离的 DSE 菌株主要由镰刀菌属(*Fusarium*)、小不整球壳属(*Plectosphaerella*)、毛葡萄属(*Botryotrichum*)、蓝状菌属(*Talaromyces*)和附球菌属(*Epicoccum*)等 18 个属组成(图 4)，其中镰刀菌属(*Fusarium*)为优势属，分离率达到了 70.15%；

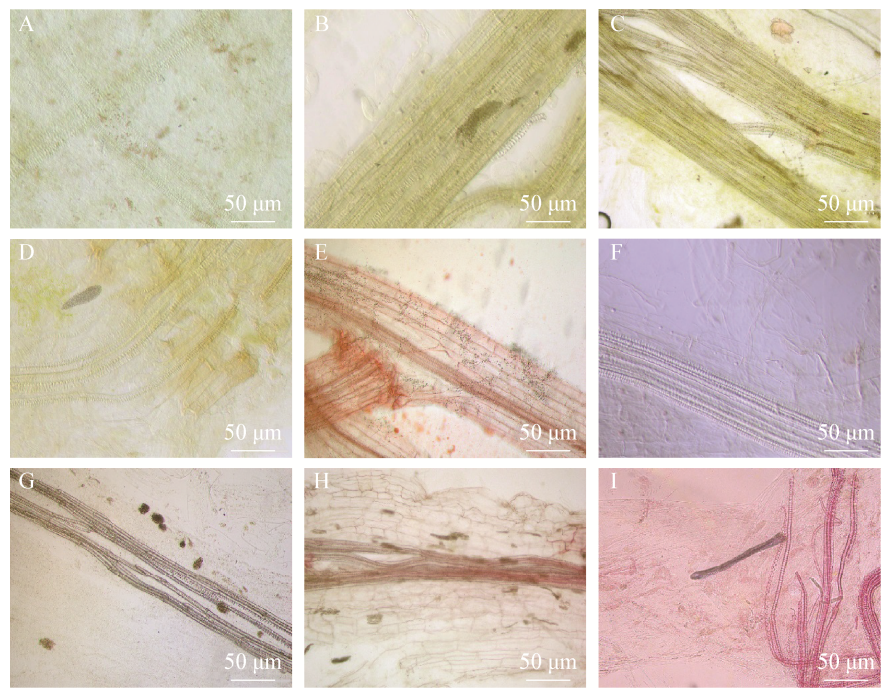


图 3 回接试验枸杞根系深色有隔内生真菌结构特征

Figure 3 Structural characteristics of dark septate endophytic in root of *L. barbarum* in return test

注: A、B、C 和 D: 深色“微菌核”在局部根系皮层细胞中的侵染; E: 深色菌丝分布在根系细胞中; F: 透明的零散状“微菌核”; G: 深色的脑状“微菌核”; H: 深色的纺锤状“微菌核”; I: 深色的棒状“微菌核”。

Note: A, B, C and D: Infection of dark Microsclerotia in local root cortical cells; E: Distribution of dark mycelia in root cells; F: Transparent scattered Microsclerotia; G: Dark brain-like Microsclerotia; H: Dark spindle-like Microsclerotia; I: Dark rod-like Microsclerotia.

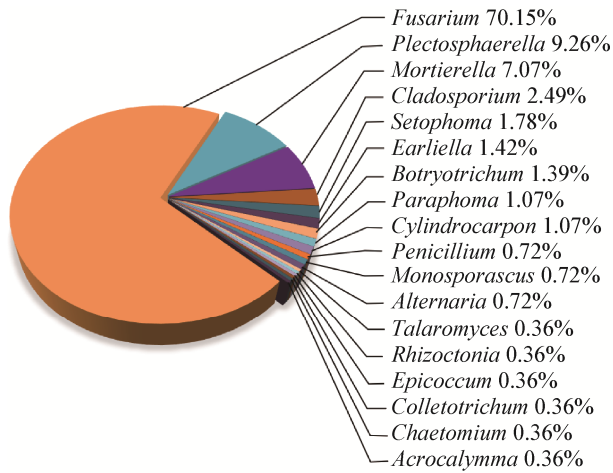


图 4 枸杞根内 DSE 的组成分布

Figure 4 Composition and distribution of DSE in *L. barbarum* roots

小不整球壳属(*Plectosphaerella*)为常见属, 分离率为 9.26%; 附球菌属(*Epicoccum*)、丝核菌属(*Rhizoctonia*)、蓝状菌属(*Talaromyces*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)、炭疽菌属(*Colletotrichum*)和 *Acrocalymma* 均为稀有

属, 分离率仅为 0.36%。说明枸杞根系 DSE 菌株具有丰富的多样性。

将 22 株 DSE 菌株的 PCR 产物进行测序, 从 GenBank 下载与这些菌株序列相似性高的 rDNA-ITS 序列, 用于系统发育分析, 构建系统发育树(图 5)。

按 rDNA-ITS 基因序列相似性大于 97%的菌株归于同一个种, 相似率 70%以上的归为一簇的规则^[4], 从系统发育树上可见(图 5), 22 株 DSE 代表菌株分为 7 簇。菌株 NQ1GI8、NQ3GI18、NQ7GIII1 和 NQ6GIII20 分别与 *Paraphoma chlamydocopiosa*、交链格孢菌(*Alternaria alternata*)、*Setophoma terrestris* 和 *Acrocalymma vagum* 在同一发育分支 A 簇上, 亲缘关系最近, rDNA-ITS 序列相似性在 97.8%–100% 之间。菌株 NQ1GI4、NQ8GIII4、NQ1GIII16、NQ3GIII5、NQ3GIII19、NQ8GI6、HUGI11、NQ7GIII3、HUGI19、NQ5GI3 和 HUGI17 分别与腐皮镰孢菌(*Fusarium*

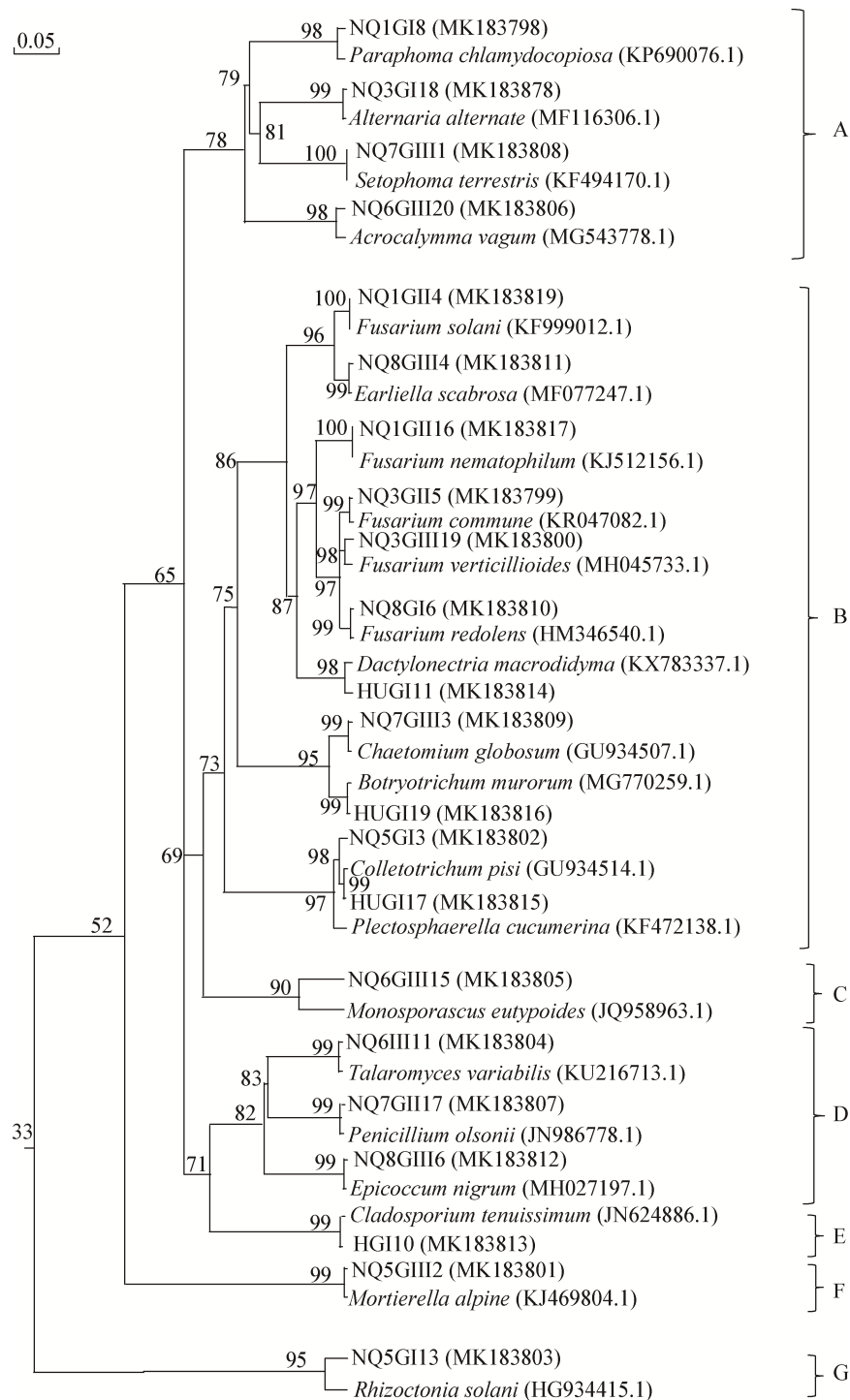


图 5 基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic analysis tree constructed based on rDNA-ITS sequence

注: 建树方法为邻接法; 系统树分支点处的数字为系统树的自展值(1 000 次重复); 标尺长度代表遗传距离; 括号中编号为所用菌株在 GenBank 中的登录号。

Note: The phylogenetic tree was constructed by Neighbour-Joining method; The number in each branch point indicates the number of trees from 1 000 bootstrap replications in which the branch occurs; Scale length represented genetic distance; GenBank accession numbers were shown in the parentheses.

solani)、红贝俄氏孔菌(*Earliella scabrosa*)、*Fusarium nematophilum*、普通镰刀菌(*Fusarium commune*)、串珠镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)、芬芳镰刀菌(*Fusarium redolens*)、*Dactylonectria macrodidyma*、球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)、*Botryotrichum murorum*、刺盘孢菌(*Colletotrichum pisi*)和小不整球壳菌(*Plectosphaerella cucumerina*)在同一发育分支 B 簇上, 亲缘关系最近, rDNA-ITS 序列相似性在 94.7%–100%之间。菌株 NQ6GIII15 和 *Monosporascus eutypoide* 在同一发育分支 C 簇上, 亲缘关系最近, rDNA-ITS 序列相似性为 89.9%。菌株 NQ6GIII11、NQ7GIII17 和 NQ8GIII6 分别与 *Talaromyces variabilis*、奥尔森青霉 (*Penicillium olsonii*) 和黑附球菌 (*Epicoccum nigrum*)在同一发育分支 D 簇上, 亲缘

关系最近, rDNA-ITS 序列相似性在 98.8%–99.5% 之间。菌株 HGI10、NQ5GIII2 和 NQ5GIII3 分属于 E、F 和 G 簇, 分别与正极细枝孢(*Cladosporium tenuissimum*)、高山被孢霉(*Mortierella alpina*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)在同一进化分支上, rDNA-ITS 序列相似性分别为 99.2%、98.8% 和 94.8%。

2.4 不同枸杞品种 DSE 多样性分析

2.4.1 不同枸杞品种 DSE 的相对频率

由表 4 可知, 8 个枸杞品种的共有属和优势属均为镰刀菌属(*Fusarium*), 但不同品种间 DSE 相对频率差异显著, 其中宁杞 3 号最高, 为 24.37%; 宁杞 5 号和宁杞 8 号最低, 为 7.17%; 品种间表现为宁杞 3 号>宁杞 7 号>黄果枸杞>宁杞 1 号>

表 4 不同枸杞品种中深色有隔内生真菌的相对频率

Table 4 The relative frequency of dark septate endophytic of different separated variety from *L. barbarum* (%)

属名 Genus	野生枸杞品种 Varieties of wild medlar		栽培枸杞品种 Varieties of cultivated medlar					
	黄果枸杞 <i>L. barbarum</i> var. <i>auranticarpum</i>	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i> murr	宁杞 1 号 Ningqi-1	宁杞 3 号 Ningqi-3	宁杞 5 号 Ningqi-5	宁杞 6 号 Ningqi-6	宁杞 7 号 Ningqi-7	宁杞 8 号 Ningqi-8
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	51.43	54.84	82.35	69.10	60.00	84.38	79.49	85.00
毛葡孢属 <i>Botryotrichum</i>	2.86	0.00	2.86	0.00	0.00	3.13	2.56	0.00
<i>Monosporascus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.25	0.00	0.00
异茎点霉属 <i>Paraphoma</i>	0.00	0.00	5.93	0.00	0.00	0.00	2.56	0.00
附球菌属 <i>Epicoccum</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00
枝孢属 <i>Cladosporium</i>	5.72	12.90	2.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
青霉属 <i>Penicillium</i>	0.00	0.00	2.94	0.00	0.00	0.00	2.56	0.00
蓝状菌属 <i>Talaromyces</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.13	0.00	0.00
柱孢属 <i>Cylindrocarpon</i>	2.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
俄氏孔菌属 <i>Earliella</i>	0.00	3.23	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	10.00
小不整球壳属 <i>Plectosphaerella</i>	28.57	12.90	2.94	7.35	25.00	0.00	5.13	0.00
<i>Setophoma</i>	5.71	3.23	0.00	1.47	0.00	0.00	2.56	0.00
被孢霉属 <i>Mortierella</i>	2.85	3.23	0.00	20.59	5.00	0.00	2.56	0.00
链格孢属 <i>Alternaria</i>	0.00	6.45	0.00	1.47	0.00	0.00	0.00	0.00
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.56	0.00
炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>	2.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Acrocalymma</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.13	0.00	0.00
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	12.50	0.00	0.00	0.00
合计 Total	12.54	11.11	12.19	24.37	7.17	11.47	13.98	7.17

宁杞 6 号>黑果枸杞>宁杞 5 号=宁杞 8 号。品种间分离种类宁杞 7 号和黄果枸杞 DSE 种类最多,黑果枸杞次之。*Monosporascus*、蓝状菌属(*Talaromyces*)及 *Acrocalymma* 仅存在于宁杞 6 号中,相对频率为 3.13%。此外,附球菌属(*Epicoccum*)仅存在于宁杞 8 号中,相对频率为 5.00%;柱孢属(*Cylindrocarpon*)及炭疽菌属(*Colletotrichum*)仅存在于黄果枸杞中,相对频率均为 2.94%;毛壳菌属(*Chaetomium*)仅存在于宁杞 7 号中,相对频率为 2.56%;丝核菌属(*Rhizoctonia*)仅存在于宁杞 5 号中,相对频率为 12.50%。说明 DSE 具有一定的寄主专化性。

2.4.2 枸杞 DSE 属水平多样性测度

多样性指数反映了枸杞 DSE 数量和种类的丰富程度;均匀度指数指一个群落中全部物种个体数目分配的均匀程度;优势度指数反映优势种集中的程度。由表 5 可知,不同品种枸杞 DSE 多样性指数

差异显著,在一定程度上反映出枸杞品种间 DSE 群落总数及分布数量的不同。其中,多样性指数最大值出现在黄果枸杞中,为 1.37;最小值出现在宁杞 8 号中,为 0.52,说明了黄果枸杞 DSE 种群数量具有丰富的多样性。宁杞 5 号的均匀度指数和优势度指数均最大,分别为 0.42 和 1.00,说明宁杞 5 号 DSE 种群中各属的数量和种类分布均匀,且优势种群集中。

相似性系数能反映品种间遗传变异程度的高低或亲缘关系的远近^[16]。由表 6 可知,8 个枸杞品种间 DSE 相似性系数介于 0.17–0.83。其中,黑果枸杞和宁杞 3 号相似性系数最高,可能两品种在生存生境或遗传背景方面具有一定的相似性;宁杞 8 号和黄果枸杞、黑果枸杞和宁杞 6 号的相似性系数最低,为 0.17,可能来源于不同的遗传背景。

表 5 不同枸杞品种中 DSE 的多样性测度

Table 5 The diversity measure of dark septate endophytic of different separated variety from *L. barbarum* (%)

指数 Index	野生枸杞品种 Varieties of wild medlar		栽培枸杞品种 Varieties of cultivated medlar					
	黄果枸杞 <i>L. barbarum</i> var. <i>auranticarpum</i>	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i> murr	宁杞 1 号 Ningqi-1	宁杞 3 号 Ningqi-3	宁杞 5 号 Ningqi-5	宁杞 6 号 Ningqi-6	宁杞 7 号 Ningqi-7	宁杞 8 号 Ningqi-8
多样性指数	1.37	1.35	0.74	0.90	1.25	0.64	0.90	0.52
Shannon-Wiener index (<i>H'</i>)								
均匀度指数 Pielou	0.38	0.39	0.21	0.22	0.42	0.18	0.25	0.17
优势度 Simpson	0.99	1.00	0.99	0.97	1.00	0.99	0.99	1.00

表 6 枸杞不同品种间 DSE 的相似性系数

Table 6 The similarity coefficient of dark septate endophytic of different separated variety from *L. barbarum*

	宁杞 1 号 Ningqi-1	宁杞 3 号 Ningqi-3	宁杞 5 号 Ningqi-5	宁杞 6 号 Ningqi-6	宁杞 7 号 Ningqi-7	宁杞 8 号 Ningqi-8	黄果枸杞 <i>L. barbarum</i> var. <i>auranticarpum</i>
宁杞 3 号 Ningqi-3	0.36						
宁杞 5 号 Ningqi-5	0.40	0.67					
宁杞 6 号 Ningqi-6	0.36	0.20	0.22				
宁杞 7 号 Ningqi-7	0.71	0.62	0.50	0.31			
宁杞 8 号 Ningqi-8	0.22	0.25	0.57	0.25	0.18		
黄果枸杞 <i>L. barbarum</i> var. <i>auranticarpum</i>	0.57	0.62	0.46	0.29	0.59	0.17	
黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i> murr	0.46	0.83	0.55	0.17	0.53	0.40	0.67

3 讨论与结论

3.1 DSE 的侵染特征、群落组成和物种多样性

DSE 广泛分布于枸杞栽培品种及野生品种中, 目前全世界已发现 600 余种植物根内都有 DSE 的定殖^[17]。虽然 DSE 能被分离纯培养, 但体外培养条件无法还原 DSE 在植物体内的生境, 导致 DSE 菌株不产孢, 使得仅通过形态学特征难以鉴定其分类地位^[18], 分子生物学技术已应用于 DSE 的分类研究。按照 Sieber 等^[19]对 DSE 的定义, 本研究分离的 279 株菌均有 DSE 典型黑化结构。

对 8 个枸杞品种的 1 080 个根段进行 DSE 分离培养, 能够反映 8 个品种中 DSE 群落组成情况, 对分离得到的 279 株菌进行形态学及分子生物学的鉴定, 初步确定其是 DSE 菌株, 后在回接试验中发现菌株在枸杞根部形成了“游走菌丝”和“微菌核”等结构, 进一步证实了上述结果。在分离到的菌株中, 俄氏孔菌属(*Earliella*)、毛葡萄属(*Botryotrichum*)、*Setophoma* 和 *Acrocalymma* 等均是未发现报道的 DSE 菌株, 其中 *M. eutypoides* 和 *T. variabilis* 仅在宁杞 6 号中发现, *E. nigrum* 仅在宁杞 8 号中存在, 柱孢属(*Cylindrocarpon*)仅在黄果枸杞中发现, 表明枸杞 DSE 在不同品种中具有丰富的多样性, 不同品种 DSE 多样性指数为黄果枸杞>黑果枸杞>宁杞 5 号>宁杞 7 号=宁杞 3 号>宁杞 1 号>宁杞 6 号>宁杞 8 号。研究还发现, 宁杞 3 号与黑果枸杞中的 DSE 相似性系数达到了 0.83, 二者可能具有相似的遗传背景。此外, DSE 在枸杞不同品种之间具有一定的偏好性, 野生品种分离的 DSE 菌株属数量大于栽培品种, 这可能由于野生枸杞品种内所含的营养成分相对较丰富, 从而间接影响了 DSE 的分布^[12]。

3.2 DSE 与植物生态适应性的关系

有研究表明, DSE 能够促进植物对营养物质的吸收, 提高植物自身的抗病性及在胁迫环境中的抗逆性^[20], 与 Zhang 等^[12]的研究结果对比, 本试验的 DSE 平均定殖率普遍较高。Mandyam 等^[20]研究发现, 与植物有良好共生关系的内生真菌可以促进植

物对生存环境的适应能力, 而且宿主植物进化与 DSE 丰富度协同一致。本试验从枸杞不同品种中分离得到高山被孢霉(*M. alpina*)、红贝俄氏孔菌(*E. scabrosa*)、*B. murorum* 及黑附球菌(*E. nigrum*)等一些重要的 DSE 资源, 具有重要的应用价值, 如高山被孢霉(*M. alpina*)能够产生花生四烯酸^[21]; 红贝俄氏孔菌(*E. scabrosa*)的发酵液对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌均有明显的抑制作用^[22]; 黑附球菌(*E. nigrum*)对马铃薯晚疫病具有明显的防治作用^[23]; *B. murorum* 菌株为耐盐菌株, 能在高盐环境中稳定定殖于植物^[24]。由此可见, 枸杞根内蕴藏的丰富的 DSE 资源有待开发和利用。此外, 枸杞 DSE 菌株在与宿主协同进化的过程中产生的次生代谢产物尚不明确, 有待于进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Song WW, Zhu H, Yu FY, et al. Plant endophytes and their control effects on plant disease review[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(6): 12-16 (in Chinese)
宋薇薇, 朱辉, 余凤玉, 等. 植物内生菌及其对植物病害的防治作用综述[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(6): 12-16
- [2] Li HY, Liu L. Recent advances on bioactive compounds producing endophytes[J]. Natural Product Research and Development, 2005, 16(5): 482-485 (in Chinese)
李海燕, 刘丽. 产生物活性物质植物内生菌的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 16(5): 482-485
- [3] Xing XK. Endophytic fungal resource of medicinal plants-a treasure need to be developed urgently[J]. Mycosystema, 2018, 37(1): 14-21 (in Chinese)
邢晓科. 药用植物内生真菌资源——一个亟待开发的宝库[J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 14-21
- [4] Li BK. The species diversity of Dark Septate Endophytes of *Ammopiptanthus mongolicus*[D]. Baoding: Doctoral Dissertation of Hebei University, 2016 (in Chinese)
李宝库. 蒙古沙冬青深色有隔内生真菌(DSE)多样性研究[D]. 保定: 河北大学博士学位论文, 2016
- [5] Gu PW, Hao L, Xu R, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi in *Sophora alopecuroides* L. from Baijitan National Nature Reserve of Ningxia[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2012, 40(5): 209-216 (in Chinese)
顾沛雯, 郝丽, 徐润, 等. 宁夏白芨滩自然保护区苦豆子内生真菌的区系组成及其抑菌活性[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(5): 209-216
- [6] Addy HD, Piercey MM, Currah RS. Microfungal endophytes in

- roots[J]. Canadian Journal of Botany, 2005, 83(1): 1-13
- [7] Diene O, Wang W, Narisawa K. *Pseudosigmoidea ibarakensis* sp. nov., a dark septate endophytic fungus from a cedar forest in Ibaraki, Japan[J]. Microbes and Environments, 2013, 28(3): 381-387
- [8] Zhang J. Studies on dark septate endophytes (DSE) in Munai and Gejiu Mine Area in Yunnan[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2010 (in Chinese)
张杰. 云南两个重金属矿区(暮乃、个旧)深色有隔内生真菌(DSE)的研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2010
- [9] Lan TJ, Chen YL, Huang CM, et al. Community constituent of dark septate endophytic fungi in Dashiwei Doline Group and their effects on pioneer plants' drought resistance capability[J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(2): 26-34 (in Chinese)
蓝桃菊, 陈艳露, 黄诚梅, 等. 大石围天坑群深色有隔内生真菌(DSE)群落组成及其对先锋植物抗旱能力的影响[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(2): 26-34
- [10] Liang CC, Xiao YP, Zhao ZW. Arbuscular mycorrhiza and dark septate endophytes in an abandoned lead-zinc mine in Huize, Yunnan, China[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2007, 13(6): 811-817 (in Chinese)
梁昌聪, 肖艳萍, 赵之伟. 云南会泽废弃铅锌矿区植物丛枝菌根和深色有隔内生真菌研究[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(6): 811-817
- [11] Xu QZ. Endophytic fungi resources from *Lycium barbarum* L. in Ning Xia and its evaluation of biocontrol effect[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2017 (in Chinese)
徐全智. 宁夏枸杞内生真菌多样性及其生防作用评价[D]. 银川: 宁夏大学硕士学位论文, 2017
- [12] Zhang HH, Tang M, Chen H, et al. Effects of a dark-septate endophytic isolate LBF-2 on the medicinal plant *Lycium barbarum* L.[J]. The Journal of Microbiology, 2012, 50(1): 91-96
- [13] Shi ZG, Wang YJ, An W, et al. Inoculating effect of dark septate endophytes fungi on wolfberry[J]. Northern Horticulture, 2015(19): 136-139 (in Chinese)
石志刚, 王亚军, 安巍, 等. 深色有隔内生真菌对枸杞的接种效应[J]. 北方园艺, 2015(19): 136-139
- [14] Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1970, 55(1): 158-161
- [15] Meng QG. Infection process and the influence of endophytic *Chaetomium globosum* ND35 on host plant and its molecular detection[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2009 (in Chinese)
孟庆果. 内生菌球毛壳 ND35 在寄主植物中的侵染过程及其定殖后对植物的影响与分子检测[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2009
- [16] Lu SQ, Kuang GQ, Liu Z, et al. Application of high resolution microsatellite markers to species identification of *Siniperca*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2007, 38(4): 379-384 (in Chinese)
鲁双庆, 匡刚桥, 刘臻, 等. 高识别力的微卫星标记系统在鳊属(*Siniperca*)物种鉴定中的应用[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(4): 379-384
- [17] Schmidt SK, Sobieniak-Wiseman LC, Kageyama SA, et al. Mycorrhizal and dark-septate fungi in plant roots above 4270 meters elevation in the Andes and Rocky Mountains[J]. Arctic Antarctic, and Alpine Research, 2008, 40(3): 576-583
- [18] Sun Q, Xue ZK, Xie LL, et al. Diversity of dark septate endophyte in the roots of *Ammopiptanthus mongolicus* and its companion plants[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2017, 41(7): 729-737 (in Chinese)
孙茜, 薛子可, 解琳琳, 等. 沙冬青及其伴生植物深色有隔内生真菌物种多样性[J]. 植物生态学报, 2017, 41(7): 729-737
- [19] Sieber TN, Grünig CR. Biodiversity of fungal root-endophyte communities and populations, in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii* s. l.[A]/Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN. Microbial Root Endophytes[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006
- [20] Mandyam K, Loughin T, Jumpponen A. Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie[J]. Mycologia, 2010, 102(4): 813-821
- [21] Tang X, Chen HQ, Yao QW, et al. Mutation breeding of high arachidonic acid-producing strain in *Mortierella alpina*[J]. China Oils and Fats, 2018, 43(8): 104-108 (in Chinese)
唐鑫, 陈海琴, 姚青蔚, 等. 高产花生四烯酸高山被孢霉的诱变育种研究[J]. 中国油脂, 2018, 43(8): 104-108
- [22] Lu WH, Zhu F, Wu SY, et al. Chemical components and antibacterial activity of wild and artificially cultured *Earliella scabrosa* (Pers.) Gilb. & Ryvarden[J]. Journal of Southern Agriculture, 2017, 48(9): 1676-1682 (in Chinese)
卢卫红, 朱峰, 吴善莹, 等. 野生和人工培养红贝氏孔菌化学成分及抑菌活性测定[J]. 南方农业学报, 2017, 48(9): 1676-1682
- [23] Xia LQ. Study about control efficacy of the *Epicoccum purpurascens* strain XF1 against potato late blight[D]. Baoding: Master's Thesis of Agricultural University of Hebei, 2012 (in Chinese)
夏丽琴. 黑附球菌 XF1 菌株对马铃薯晚疫病的防治作用研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2012
- [24] Yang LY, Li ZY, Li SL, et al. Study on halophilic fungi population of Yipinglang[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2002, 24(6): 465-468 (in Chinese)
杨丽源, 李治滢, 李绍兰, 等. 一平浪盐矿耐盐真菌的种群调查[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2002, 24(6): 465-468