

雪莲花根冷适应内生真菌多样性及生物学特性

邱先丹¹, 陈晓梅¹, 朱军², 曾旭¹, 周丽思^{*1}, 郭顺星^{*1}

1 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2 新疆中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

邱先丹, 陈晓梅, 朱军, 曾旭, 周丽思, 郭顺星. 雪莲花根冷适应内生真菌多样性及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1659-1675.

QIU Xiandan, CHEN Xiaomei, ZHU Jun, ZENG Xu, ZHOU Lisi, GUO Shunxing. Diversity and biological characteristics of cold-adaptable endophytic fungi isolated from *Saussurea involucrata* roots[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1659-1675.

摘要: 【背景】雪莲花(*Saussurea involucrata*)是一种生长在高原的珍稀濒危药用植物。对雪莲花内生真菌冷适应性的研究尚未见报道。【目的】加深对雪莲花根内生真菌多样性及生物学特性的认识。【方法】采用组织块分离法在 4 °C 和 15 °C 分离雪莲花根内生真菌; 通过内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列初步鉴定菌株; 根据 ITS 序列相似性划分可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 进行物种多样性分析; 挑选各个 OTU 的代表菌株, 观察代表菌株形态, 考察代表菌株在不同温度的生长速度和对雪莲花幼苗生长的影响。【结果】共获得 142 株内生真菌, 4 °C 和 15 °C 分别获得 68 株和 74 株。142 株真菌隶属于 2 门 4 纲 5 目 7 科 9 属, 聚类为 14 个 OTU。4 °C 和 15 °C 分离分别获得了 10 个和 11 个 OTU, 2 个群落的组成有极显著差异($P < 0.01$)。4 °C 分离获得 3 个特有 OTU, 优势属是链格孢属(*Alternaria*)。15 °C 分离获得 4 个特有 OTU, 优势属是 *Rhexocercosporidium*。14 株代表菌株中发现 10 株深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSEs), 9 株具备耐冷菌或嗜冷菌特性。6 株代表菌株有促进雪莲花幼苗生长的作用, 其中 5 株是 DSEs, 3 株是耐冷菌, 2 株是嗜冷菌。菌株 S11 和 S12 在 15 °C 和 20 °C 都有促生作用, 菌株 S01、S13 和 S14 只在 15 °C 有促生作用。菌株 S13 和 S14 是优势属 *Rhexocercosporidium* 的代表菌株, 它们兼具 DSEs、耐冷菌和促生菌的特性。菌株 S01 和 S12 在 15 °C 时的促生作用更强。与 20 °C 相比, 菌株 S01 和 S12 在 15 °C 共生时幼苗的根总长度提高 2.17–2.27 倍($P < 0.05$)。【结论】4 °C 和 15 °C 分离获得的雪莲花根内生真菌具有丰富的物种多样性。分离温度对所获内生真菌群落的组成和结构有影响。低温分离有利于获得冷适应性 DSEs。

关键词: 雪莲花; 内生真菌; 冷适应性; 深色有隔内生真菌; 促进植物生长

资助项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-031); 国家自然科学基金(81903749, 81973426)

This work was supported by the Chinese Academy of Medical Sciences Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (2021-I2M-1-031) and the National Natural Science Foundation of China (81903749, 81973426)

*Corresponding authors. E-mail: ZHOU Lisi, zls921203@163.com; GUO Shunxing, sxguo1986@163.com

Received: 2023-09-11; Accepted: 2023-12-18; Published online: 2024-02-02

Diversity and biological characteristics of cold-adaptable endophytic fungi isolated from *Saussurea involucrata* roots

QIU Xiandan¹, CHEN Xiaomei¹, ZHU Jun², ZENG Xu¹, ZHOU Lisi^{*1}, GUO Shunxing^{*1}

1 Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

2 Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethnical Materia Medica, Urumqi 830002, Xinjiang, China

Abstract: **[Background]** *Saussurea involucrata* is a rare and endangered medicinal plant growing in the alpine region. However, little is known about the cold adaptation of endophytic fungi (EFs) isolated from *S. involucrata*. **[Objective]** To well understand the diversity and biological characteristics of EFs isolated from *S. involucrata* roots. **[Methods]** EFs were isolated by tissue block culture at 4 °C and 15 °C, respectively. All the strains were preliminarily identified based on the ITS sequences. According to the ITS sequence similarity, strains were clustered into OTU for the diversity analysis. The representative strain (RS) of each OTU was selected, and the morphology of RSs was observed. The growth rates of RSs and the effects of RSs on *S. involucrata* seedling growth were investigated at different temperatures. **[Results]** A total of 142 strains of EFs were isolated, including 68 and 74 strains obtained at 4 °C and 15 °C, respectively. The 142 strains were clustered into 14 OTUs, which belonged to 9 genera, 7 families, 5 orders, and 4 classes of 2 phyla. At 4 °C and 15 °C, respectively, 10 and 11 OTUs were obtained and indicated different taxa ($P < 0.01$). The community at 4 °C included 3 unique OTUs, in which *Alternaria* was the dominant genus. The community at 15 °C included 4 unique OTUs, in which *Rhexocercosporidium* was the dominant genus. Ten strains of dark septate endophytes (DSEs) were identified from 14 RSs, and 9 of them were psychrophiles or psychrotrophs. There were 6 RSs that could promote the growth of *S. involucrata* seedlings, 5 of which were DSEs, including 3 psychrotrophs and 2 psychrophiles. S11 and S12 promoted the growth of seedlings at both 15 °C and 20 °C, while S01, S13, and S14 promoted the seedling growth only at 15 °C. S13 and S14, the RSs of dominant *Rhexocercosporidium*, were DSEs and psychrotrophs capable of promoting plant growth. The plant growth-promoting effects of S01 and S12 at 15 °C were stronger than those at 20 °C. Compared with those at 20 °C, S01 and S12 increased the total root length of seedlings cultured at 15 °C by 2.17–2.27 times ($P < 0.05$). **[Conclusion]** The EFs isolated at 4 °C and 15 °C showed rich diversity. The isolation temperature affected the composition and structure of fungal communities. Lower temperatures were beneficial to the isolation of cold-adaptable DSEs.

Keywords: *Saussurea involucrata*; endophytic fungi; cold adaptation; dark septate endophytes; plant growth promotion

雪莲花(*Saussurea involucrata*)是一种菊科(*Compositae*)多年生一次性开花结实的药用植物。在《中国药典》(2020版)^[1]中, *S. involucrata*

对应的植物中文名为“天山雪莲”,同时,“天山雪莲”也是药材名,来自该植物的干燥地上部分是维吾尔族习用药材,用于治疗风湿性关节炎、

关节疼痛、肺寒咳嗽、肾与小腹冷痛等。雪莲花含有黄酮类、苯丙素类、香豆素、倍半萜类、挥发油和多糖类成分，具有抗炎、抗癌、抗肿瘤、抗肥胖、抗氧化和抗衰老等药理作用，在药品、保健品和化妆品等的研发方面有良好的前景^[2-4]。其分布于我国新疆的乌鲁木齐、博克达山、和硕等地，2021年被列为国家二级保护野生植物。雪莲花生长在海拔 2 400–4 100 m 的悬崖峭壁，以及流石滩和冰渍岩等的石隙中，生长环境的最热月平均气温仅 4 °C 左右，生活周期一般是 5–6 年^[5-6]。由于长期过度采挖，雪莲花的野生资源已极度匮乏，加之其目前还不能规模化人工种植。因此，天山雪莲药材资源短缺的问题十分突出，是制约相关产业发展的关键因素之一。

内生真菌(endophytic fungi, EFs)是指生活在植物细胞中或在其生活史中的某一段时期生活在植物组织内，不引起植物组织明显病害的一类真菌^[7-9]。植物与内生真菌共生能促进宿主植物的生长，提高其抗逆性^[10-12]。深色有隔内生真菌(dark septate endophyte, DSE)是一类定殖在植物根组织中的内生真菌，其典型形态特征是菌丝颜色深、壁较厚、有明显的横隔；在根细胞内或细胞间隙形成“微菌核”^[13]。DSE 的宿主植物及生态分布广泛，在高山植物、荒漠植物及重金属污染土壤生长植物的根有很高的分离频率^[11,14]，提示 DSE 可能有利于植物在逆境条件下的生存。本文作者分析不同研究者的报道后发现，雪莲花根内生真菌数量多于其他组织^[15-16]，且 DSE 是根部内生真菌的主要类群；DSE 的分离频率随分离温度的降低而有较大幅度提高，目前报道的最低分离温度为 15 °C^[15-17]。

能在低温环境中生活的微生物具有冷适应性(cold-adaptation)，其中最适生长温度约为 15 °C、最高生长温度低于 20 °C、在 0 °C 可以生长繁殖的一类被称为嗜冷菌；最适生长温度

高于 15 °C、最高生长温度高于 20 °C、在 0–5 °C 可以生长繁殖的一类被称为耐冷菌^[18-19]。对冷适应细菌的报道较多，研究主要集中在群落多样性及促生长特性^[19-22]。冷适应真菌主要从土壤中分离获得，种群分布具有多样性^[23]；偶见寒冷生境植物内生真菌多样性及物种分布等报道。冷适应微生物有适应极端低温的进化策略，能抵御季节性的气候变化，并在寒冷生境中保持生态功能^[20-21]。雪莲花是寒冷生境的植物，对雪莲花内生真菌的冷适应性缺乏系统研究。雪莲花 DSE 菌株 EF-37 (*Mycocentrospora* sp.) 在 5–30 °C 均可以生长，最佳生长温度为 20 °C^[24]，表明菌株 EF-37 有冷适应性。菌株 EF-37 在 25 °C 能显著促进雪莲花幼苗生长^[15,25]。尚未见雪莲花内生真菌在更低温度下影响宿主植物生长的报道。因此，本研究使用低温培养的方法从雪莲花根组织中获得内生真菌，考察它们的冷适应性；将内生真菌与雪莲花幼苗在低温下共生培养，初步探讨它们对雪莲花幼苗生长的作用及其作用特点，为揭示低温环境中内生真菌对宿主植物的作用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 样品

雪莲花根部样品采集自新疆天山山脉，采样地点位于巴音郭楞蒙古自治州和静县(42°35' N, 85°07' E, 3 134–3 171 m)和乌鲁木齐市乌鲁木齐县(43°09' N, 87°07' E, 2 620–2 661 m)。每地采集雪莲花根部样品 3 份，冷藏保存。

1.2 培养基

真菌分离及培养用马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基^[15,24]，品氏基质、蛭石和锯末体积比为 2:1:1，加入适量去离子水均匀混合，为共生基质。用 270 mL PC 塑料组培瓶(Φ 70 mm×110 mm)分装基质，装量高

度 30–35 mm。基质经过 101 kPa 灭菌 180 min 后使用。

1.3 主要试剂和仪器

Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix 试剂盒, 赛默飞世尔科技上海有限公司; 真菌 rDNA ITS 基因扩增引物, 苏州金唯智生物科技有限公司; 品式基质, 品氏托普园艺(上海)有限公司。

恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; PCR 仪和凝胶电泳仪, Bio-Rad 公司; Leica 正置显微镜, 青岛中徠科技有限公司; 台式高速离心机和高压蒸汽灭菌锅, 北京义博科技有限公司; 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; 电子天平, 赛多利斯(上海)贸易有限公司。

1.4 内生真菌分离与纯化

雪莲花内生真菌的分离采用组织块分离法^[17], 每个含 PDA 培养基的培养皿中放 5 个根段。每份样品接种 20 皿, 共 100 个根段。将培养皿平均分成 2 组, 分别置于 4 °C 和 15 °C 暗培养。定期观察, 发现组织块边缘有菌丝生长时, 及时挑取菌丝并转接到新培养皿, 置于 15 °C 培养。多次重复转接, 直至获得纯培养菌株。纯培养菌株在 PDA 培养基上 15 °C 培养 10–30 d, 用于鉴定。

1.5 内生真菌的初步鉴定

通过核糖体内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列分析, 对内生真菌进行初步分子鉴定^[26–28]。按照 Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix 试剂盒说明书提取真菌 DNA。利用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS 序列^[29]。PCR 反应体系 (20 μL): 2×Master Mix 10 μL, ITS1 (10 μmol/L) 0.5 μL, ITS4 (10 μmol/L) 0.5 μL, 5×GC Enhancer 4 μL, ddH₂O 4 μL, 模板 DNA (50–100 ng/μL) 1 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min;

94 °C 45 s, 53 °C 45 s, 72 °C 45 s, 40 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 送至中国农业科学院作物科学研究所测序。测序片段使用 CodonCode Aligner 11.0 软件去除低质量序列后, 经 BLASTn 工具依次与 NCBI 数据库中已使用 ITSx script 校正的真菌 ITS 数据库^[30] 或 nt 数据库进行序列比对, 优先使用真菌 ITS 数据库比对结果。综合覆盖度、相似性及 E 值对样品序列进行初步鉴定^[26–28]。测序的所有样品序列提交 GenBank 获取序列登录号 (OR286649–OR286790)。用相对丰度 (relative abundance, RA) 评价各分类水平的真菌类群的优势度^[31]。RA = 某个类群菌株数量 / 总菌株数量 × 100%。

1.6 内生真菌的物种多样性分析

根据菌株 ITS 序列, 将相似性大于 97% 的序列归为一个可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)^[27,32–33]。以 OTU 为运算分类单位, 分析内生真菌的丰富度和多样性。用香农-维纳 (Shannon-Wiener) 多样性指数 (H')^[31,34]、辛普森 (Simpson) 多样性指数 (D)^[35] 和物种均匀度 (species evenness, J) 分析在 4 °C 和 15 °C 分离获得内生真菌的物种多样性和均匀性^[31,34–35]。

香农-维纳指数 (H'):
$$H' = -\sum_{i=1}^S (P_i) \ln(P_i)$$

辛普森指数 (D):
$$D = 1 - \sum_{i=1}^S (P_i)^2$$

物种均匀度 (J): $J = H' / \ln S$

式中: P_i 为频度, 是第 i 个分类单元的个体数 (N_i) 与所有分类单元个体总数 (N) 的比率, 即 $P_i = N_i / N$; $i = 1, 2, 3, \dots, S$; S 为分类单元数目。

数据用 Excel 2016 整理, 用 IBM SPSS Statistics 26 进行统计分析。使用 Fisher 确切概率法对 2 种分离温度所获真菌序列类群对应株数差异显著性进行检验^[36–37]。用 GraphPad Prism

9 软件作图。

用 Cluster X 软件进行多序列比较,利用 MEGA X 软件^[38]应用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树^[39-42], kimura 2-parameter model 计算进化距离, 1 000 次重复检验发育树的可靠性^[42]。

1.7 代表菌株的形态观察

根据 1.6 的结果从每个 OTU 中选出一株分离频数最高、菌落形态具有代表性的菌株作为该 OTU 的代表菌株。观察代表菌株的菌落形态和颜色等特征;显微镜观察菌丝、孢子及产孢结构等的形态特征,初步确定 DSE 菌株。

1.8 代表菌株的温度适应性

用 5 mm 打孔器在代表菌株的菌落边缘打出菌片,接种在 PDA 培养基上。每个菌株接种 18 个培养皿。培养皿平均分成 3 组,分别置于 4、15 和 25 °C 恒温培养箱中培养 30 d。期间定期用十字交叉法测量各个培养皿中的菌落直径,计算平均菌落直径。培养结束后计算培养期间的菌落平均生长速率。

1.9 代表菌株与雪莲花幼苗的共生培养

用 10 mm 打孔器在代表菌株的菌落边缘打出菌片。先将有 2 片叶、根长 0.8–1.2 cm、苗龄 10–15 d 的雪莲花无菌实生苗接种在共生基质上,每瓶接种 4 株苗;再向其中接入 1 片供试菌株的菌片。每个供试菌株接种 4 瓶苗。用不接种真菌、单纯培养的苗作为对照(CK)。

将培养瓶平均分成 2 份,分别置于 15 °C 和 20 °C 的恒温培养箱中,光照强度 2 000 lx,光周期 12 h/12 h。培养 40 d,培养结束仍可见绿叶的苗视为存活苗。计数存活苗数量。对于存活苗数量大于 3 的实验组,获取每株存活苗的以下指标:测量根总长度;将叶和根分别于 60 °C 烘干,称量干重;计算根冠比^[43]。*t* 检验比较各指标在共生培养与纯培养之间,以及在 15 °C 与 20 °C 培养之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 雪莲花根内生真菌的分离及鉴定

共获得内生真菌菌株 142 株,其中 4 °C 分离获得 68 株,分离率 22.7%; 15 °C 分离获得 74 株,分离率 24.7%, 2 个分离温度下获得的菌株数量基本一致。经 ITS 序列分析,初步鉴定 142 个菌株隶属于 2 门 4 纲 5 目 7 科 9 属。141 株为子囊菌门(*Ascomycota*)真菌,1 株为担子菌门(*Basidiomycota*)真菌。3 株仅鉴定到门水平,为子囊菌门物种。子囊菌门是雪莲花根内生真菌的优势门。锤舌菌纲(*Leotiomycetes*)是优势纲,菌株相对丰度 58.45%,其次是座囊菌纲(*Dothideomycetes*) (38.03%)。柔膜菌目(*Helotiales*)是优势目(58.45%),其次是格孢腔菌目(*Pleosporales*) (35.92%)。链格孢属(*Alternaria*)和 *Rhexocercosporidium* 是优势属,菌株相对丰度均为 31.69%,其次是背芽突霉属(*Cadophora*) (26.76%) (图 1A)。

2.2 雪莲花根内生真菌物种多样性

142 株真菌聚类为 14 个 OTU (表 1)。4 °C 和 15 °C 分离分别获得 10 个和 11 个 OTU, 2 个群落的物种丰富度基本一致。与 4 °C 获得的群落相比, 15 °C 获得群落的香农-维纳指数(*H'*)和辛普森指数(*D*)较高,表明该群落中物种的均衡性和多样性更好,但 2 个群落之间多样性指数无显著差异($P>0.05$) (表 2)。4 °C 和 15 °C 获得群落的物种均匀度(*J*)均趋近于 1,表明 2 个群落中物种数量分布均匀,群落稳定性较高。

分离温度对内生真菌的群落组成有影响。4 °C 和 15 °C 的群落组成有极显著差异($P<0.01$)。OTU08、OTU10 和 OTU11 只在 4 °C 获得; OTU03、OTU09、OTU12 和 OTU13 只在 15 °C 获得(表 1)。4 °C 和 15 °C 获得的群落中有 7 个共有 OTU, 合计相对丰度分别为 91.18% 和 87.84%,说明在 2 个分离温度下内生真菌群落

中的主要物种是一致的。OTU02 在 4 °C群落中的相对丰度有明显提高, OTU06 和 OTU14 在 15 °C群落中的相对丰度有明显提高, 提示内生真菌的分离频率受分离温度影响。在本研究中, 不同分离温度获得的 2 个内生真菌群落有不同

的优势类群(图 1B)。4 °C群落中座囊菌纲是优势纲(51.35%), 格孢腔菌目是优势目(51.47%), 链格孢属是优势属(45.59%)。15 °C群落中锤舌菌纲是优势纲(74.32%), 柔膜菌目是优势目(74.32%), *Rhexocercosporidium* 是优势属(41.89%)。

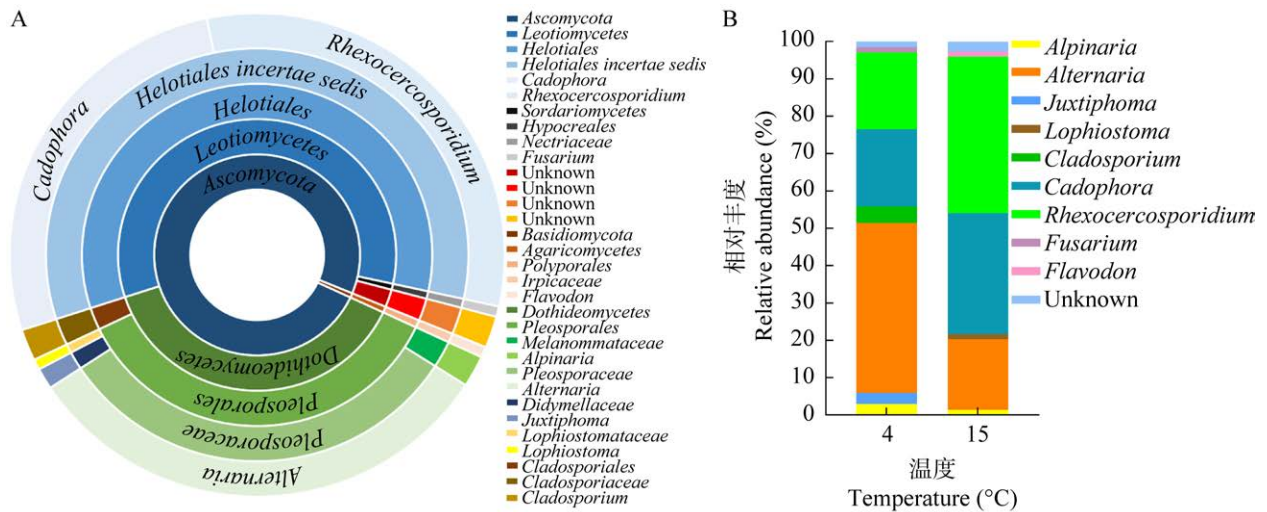


图 1 雪莲花根内生真菌的相对丰度 A: 142 株内生真菌的相对丰度(从里到外依次为门、纲、目、科、属). B: 2 个分离温度获得的内生真菌在属水平的相对丰度

Figure 1 Relative abundance of endophytic fungi isolated from *Saussurea involucreta* roots. A: RA of 142 EFs (from inner ring to outer ring means: phylum, class, order, family, and genus). B: RA at the genus level of EFs isolated under two temperature conditions.

表 1 雪莲花根内生真菌可操作分类单元及其分离频率

Table 1 Operational taxonomic units and their frequencies of EFs isolated from *Saussurea involucreta* roots

可操作分类单元 OTUs	分类群 Taxa	频数 Frequency			代表菌株 Representative strains
		4 °C	15 °C	合计 Total	
OTU01	<i>Alpinaria</i> sp.	2	1	3	S01
OTU02	<i>Alternaria</i> sp.1	31	12	43	S02
OTU03	<i>Alternaria</i> sp.2	0	2	2	S03
OTU04	<i>Ascomycota</i> sp.	1	2	3	S04
OTU05	<i>Cadophora</i> sp.1	6	8	14	S05
OTU06	<i>Cadophora</i> sp.2	7	15	22	S06
OTU07	<i>Cadophora</i> sp.3	1	1	2	S07
OTU08	<i>Cladosporium</i> sp.	3	0	3	S08
OTU09	<i>Flavodon</i> sp.	0	1	1	S09
OTU10	<i>Fusarium</i> sp.	1	0	1	S10
OTU11	<i>Juxtiphoma</i> sp.	2	0	2	S11
OTU12	<i>Lophiostoma</i> sp.	0	1	1	S12
OTU13	<i>Rhexocercosporidium</i> sp.1	0	5	5	S13
OTU14	<i>Rhexocercosporidium</i> sp.2	14	26	40	S14
Total			68	74	142

表 2 雪莲花根内生真菌的物种多样性
Table 2 Species diversity of EFs isolated from *Saussurea involucreta* roots

Item	4 °C	15 °C
OTU 数量	10	11
Number of OTUs		
分离株数量	68	74
Number of isolated strains		
香农-威纳指数	2.40	2.65
Shannon-Wiener index		
辛普森指数	0.74	0.80
Simpson's index		
物种均匀度	1.04	1.10
Species evenness index		

由于聚类为同一 OTU 的菌株处在系统发育树的同一分支上,本研究仅显示采用 14 株代表菌株的 ITS 序列与参考序列构建的系统发育树(图 2 和图 3)。雪莲花根内生真菌主要与柔膜菌目的 *Rhexocercosporidium* 和背芽突霉属真菌系统关系较近,分支支持率均为 97%,与格孢菌目真菌形成一个支持率较高的分支(100%)。此外,OTU04 与不可培养的子囊菌门真菌聚为一类,分支支持率为 100%,其分类学地位有待进一步研究。

2.3 代表菌株中的 DSEs

对 14 株雪莲花根内生真菌代表菌株的形态观察结果显示,有 10 株(菌株 S01、S02、S03、S05、S07、S08、S11、S12、S13 和 S14)符合 DSEs 的形态特征(占 71.43%):菌落深色,暗灰色、褐色至深褐色;菌丝颜色深,棕色、灰褐色、褐色、棕褐色至黑色,菌丝分隔明显(图 4)。10 株 DSEs 中仅 4 株产孢。产孢菌株的分生孢子特征如下:菌株 S02 分生孢子褐色,倒棒状。菌株 S03 分生孢子褐色,卵圆形。菌株 S08 分生孢子浅棕色,短圆柱状成团。菌株 S11 分生孢子棕色,圆形。10 株 DSEs 中背芽突霉属、链格孢属和 *Rhexocercosporidium* 各有 2 株。链格孢属菌株 S02 和 S03 对应 OTU02 和 OTU03 的相对丰度分

别为 30.28%和 1.41%。*Rhexocercosporidium* 属菌株 S13 和 S14 对应 OTU13 和 OTU14 的相对丰度分别为 3.52%和 28.17%。背芽突霉属菌株 S05 和 S07 对应 OTU05 和 OTU07 的相对丰度分别为 9.86%和 1.41%。可见,雪莲花根内 DSEs 中柔膜菌目为优势目,链格孢属和 *Rhexocercosporidium* 为优势属。

2.4 代表菌株的温度适应性

在 4、15 和 25 °C 条件下,分别有 4、10 和 4 株真菌的平均生长速率大于 1.5 mm/d,有 2、0 和 7 株真菌的平均生长速率小于 0.5 mm/d(图 5)。4 °C 时菌株 S09 和 S12 平均生长速率 0.00–0.01 mm/d,几乎未生长。25 °C 时菌株 S01、S04 和 S07 平均生长速率 0.00–0.03 mm/d,几乎未生长。10 株真菌(菌株 S01、S04–S08 和 S11–S14)在 15 °C 培养时的平均生长速率最快,说明 15 °C 是最适生长温度;除菌株 S12 外,其他 9 个菌株在 4 °C 培养的平均生长速率比在 25 °C 培养得更快。

九个菌株中菌株 S01、S04 和 S07 几乎不能在 25 °C 生长,符合嗜冷菌的特征(表 3);菌株 S01 和 S07 分属格孢腔菌目和柔膜菌目。菌株 S05、S06、S08、S11、S13 和 S14 在 25 °C 时能够生长,平均生长速率 0.17–0.96 mm/d,符合耐冷菌的特征;菌株 S08 和 S11 分属于 *Cladosporiales* 和格孢腔菌目,其他 4 株属于柔膜菌目。3 株嗜冷菌对应 OTU01、OTU04 和 OTU07 的相对丰度分别为 2.11%、2.11%和 1.41%,均为稀有类群。6 株耐冷菌中,菌株 S13 和 S14 对应 OTU13 和 OTU14 的合计相对丰度最高,为 31.69%,归属于 *Rhexocercosporidium*;其次是背芽突霉属,菌株 S05 和 S06 对应 OTU05 和 OTU06 的合计相对丰度 25.35%;耐冷菌主要集中在柔膜菌目。此外,3 株嗜冷菌中菌株 S01 和 S07 是 DSEs,分别属于 *Alpinaria* 和背芽突霉属;6 株耐冷菌中除菌株 S06 外的 5 个菌株都是 DSEs,分别属

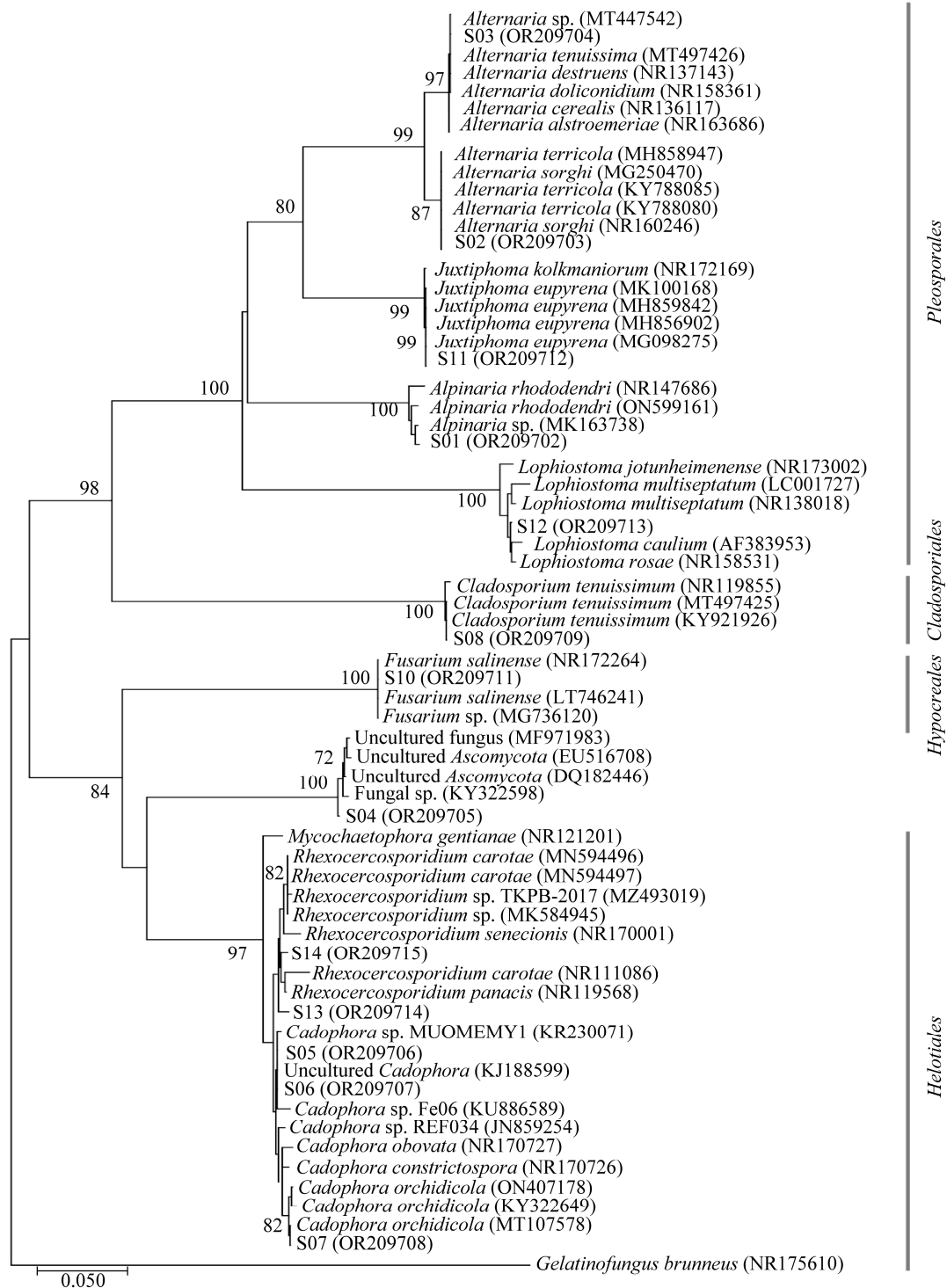


图 2 基于 ITS 序列构建的雪莲花根内生真菌(子囊菌门)系统发育树(邻接法) 分支上的数字代表该分支支持度. 分支长度代表遗传距离, 遗传距离标尺为 0.050. GenBank 登录号标注在括号中

Figure 2 The phylogenetic tree of EFs belonging to the *Ascomycota* isolated from *Saussurea involucreta* roots by ITS sequences using neighbor-joining method. Numbers on branches represent bootstrap values. Branch length reflects genetic distance, with scale bar indicating 5% genetic distance. GenBank accession numbers are shown in parentheses.

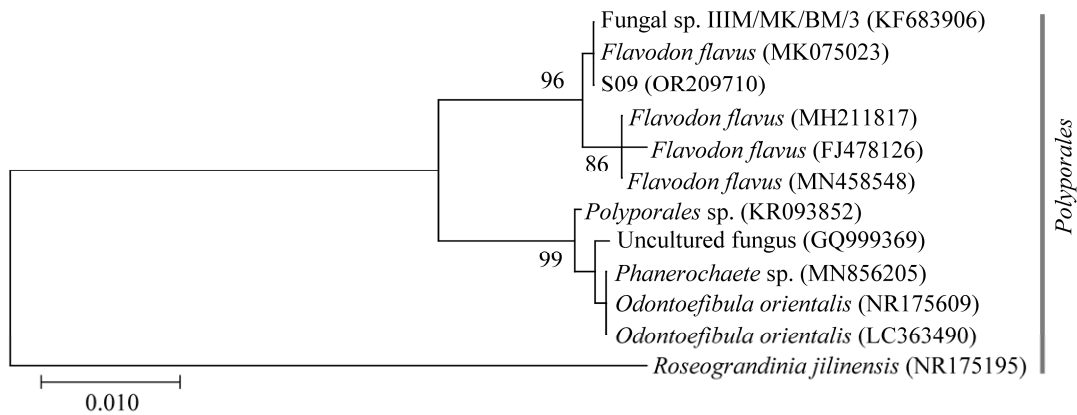


图 3 基于 ITS 序列构建的雪莲花根内生真菌(担子菌门)系统发育树(邻接法) 分支上的数字代表该分支支持度. 分支长度代表遗传距离. 遗传距离标尺为 0.010. GenBank 登录号标注在括号中

Figure 3 The phylogenetic tree of EFs belonging to the *Basidiomycota* isolated from *Saussurea involucrata* roots by ITS sequences using neighbor-joining method. Numbers on branches represent bootstrap values. Branch length reflects genetic distance, with scale bar indicating 1% genetic distance. GenBank accession numbers are shown in parentheses.

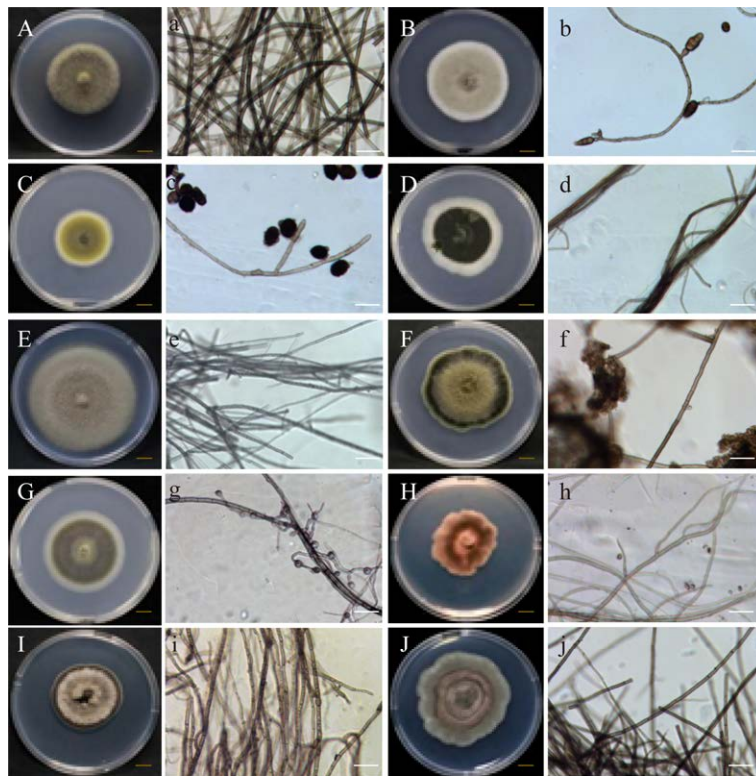


图 4 代表菌株的菌落形态和菌丝形态 A-J: 菌落形态. A: S01; B: S02; C: S03; D: S05; E: S07; F: S08; G: S11; H: S12; I: S13; J: S14. 标尺为 1 cm. a-j: 菌丝形态. a: S01; b: S02; c: S03; d: S05; e: S07; f: S08; g: S11; h: S12; i: S13; j: S14. 标尺为 25 μm

Figure 4 The colony morphology and hyphal morphology of the representative strains. A-J: Colony morphology. A: S01. B: S02. C: S03. D: S05. E: S07. F: S08. G: S11. H: S12. I: S13. J: S14. Scale bar: 1 cm. a-j: Hyphal morphology. a: S01. b: S02. c: S03. d: S05. e: S07. f: S08. g: S11. h: S12. i: S13. j: S14. Scale bar: 25 μm .

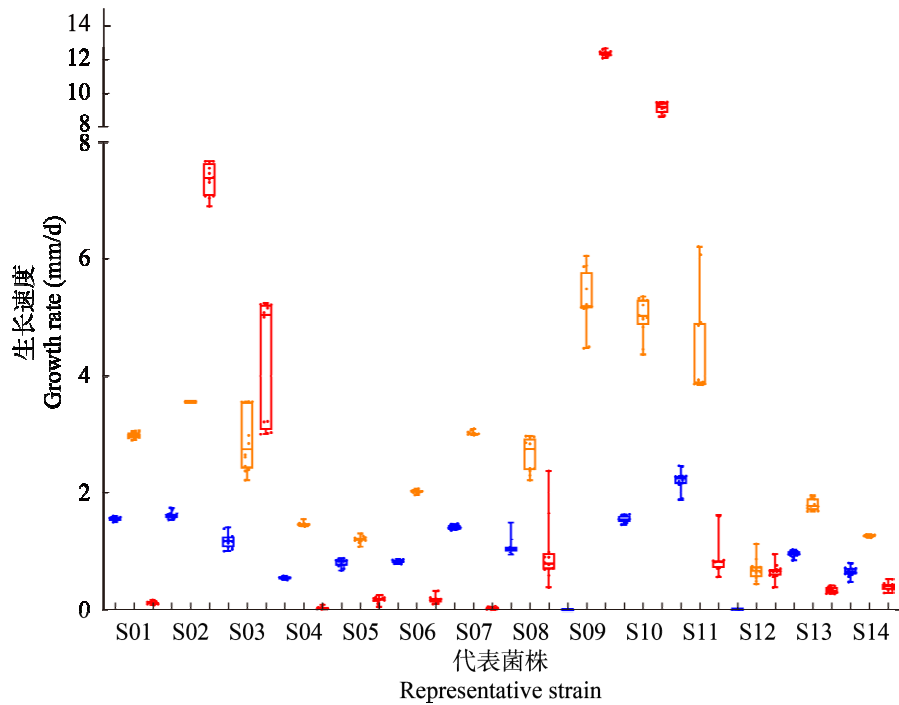


图 5 代表菌株的生长速度 蓝色: 4 °C; 橙色: 15 °C; 红色: 25 °C

Figure 5 The growth rate of representative strains. Blue: 4 °C; Orange: 15 °C; Red: 25 °C.

表 3 代表菌株在不同培养温度的生长特性

Table 3 The growth characteristics of representative strains under different culture temperatures

代表菌株 Representative strains	分离温度 Isolation temperature (°C)	是否 DSE DSE identification	最适生长温度 Optimum growth temperature (°C)	在 4 °C 生长情况 Growth at 4 °C	在 25 °C 生长情况 Growth at 25 °C
S01	15	√	15	+	-
S02	15	√	25	+	+
S03	15	√	25	+	+
S04	15	×	15	+	-
S05	15	√	15	+	+
S06	4	×	15	+	+
S07	15	√	15	+	-
S08	4	√	15	+	+
S09	15	×	25	-	+
S10	4	×	25	+	+
S11	4	√	15	+	+
S12	15	√	15	-	+
S13	15	√	15	+	+
S14	4	√	15	+	+

√: 菌株是深色有隔内生真菌; ×: 菌株不是深色有隔内生真菌. +: 菌株生长, 菌落平均生长速率大于 0.10 mm/d; -: 菌株不生长, 菌落平均生长速率小于 0.10 mm/d

√: The strain is a dark septate endophytic fungus; ×: The strain is not a dark septate endophytic fungus. +: The strain grows and the average colony growth rate is greater than 0.10 mm/d; -: The strain does not grow and the average colony growth rate is less than 0.10 mm/d.

于 *Rhexocercosporidium*、背芽突霉属、枝孢属和 *Juxtiphoma*。综上所述,雪莲花根内生真菌的代表菌种中,具有嗜冷或耐冷特性的菌株主要集中于柔膜菌目,其中耐冷 DSE 主要集中在 *Rhexocercosporidium*。

2.5 代表菌株对雪莲花幼苗生长的影响

雪莲花幼苗与菌株 S02、S03、S06、S09 和 S10 在 15 °C 和 20 °C 共生培养,与菌株 S05 在 15 °C 共生培养,以及与菌株 S07 和 S08 在 20 °C 共生培养,培养 40 d 存活苗数量小于 3 株,表明上述处理条件不利于雪莲花幼苗存活。培养 40 d 存活苗数量大于 3 株的处理组的结果见表 4。

15 °C 培养 40 d, CK 存活 3 株苗,与菌株 S01 和 S12 共生培养的苗全部存活。CK 苗的根

总长度(16.07±9.69) mm, 叶干重(2.1±1.0) mg, 根干重(0.6±0.1) mg, 根冠比 0.30±0.08。与 CK 相比,与菌株 S01 共生苗的叶干重和根干重分别提高 1.76 倍和 5.33 倍($P<0.05$); 与菌株 S12 共生苗的根总长度、叶干重和根干重分别提高 1.79、2.24 和 5.00 倍($P<0.05$)。此外,与 CK 相比,与菌株 S11 和 S14 共生的苗根干重有显著提高,与菌株 S13 共生的苗叶干重和根总长度有显著提高($P<0.05$)。

20 °C 培养 40 d, CK 存活 5 株苗,与菌株 S04 和 S12 共生培养的苗全部存活。CK 苗的根总长度(17.15±3.13) mm, 叶干重(5.0±0.4) mg, 根干重(0.6±0.1) mg, 根冠比 0.17±0.10。与 CK 相比,与菌株 S04 共生苗的根总长度、根干重

表 4 代表菌株对雪莲花幼苗生长的影响

Table 4 The effects of representative strains on *Saussurea involucreta* seedling growth

对照/处理组 Control/Treatment group	培养温度 Culture temperature (°C)	苗存活数 Seedling's survival number	根总长度 Total root length (mm)	叶干重 Dry weight of leaf (mg)	根干重 Dry weight of root (mg)	根冠比 Root shoot ratio
CK	15	3	16.07±9.69	2.1±1.0	0.6±0.1	0.30±0.08
	20	5	17.15±3.13	5.0±0.4	0.6±0.1	0.17±0.10
S01	15	8	53.65±17.49	5.8±0.5*	3.8±1.1*†	0.66±0.14*†
	20	4	26.92±17.91	4.5±1.4	1.2±0.4	0.30±0.14
S04	15	5	34.33±5.19†	5.7±2.1	1.2±0.3	0.21±0.05†
	20	8	24.71±3.35#	4.0±0.4#	1.8±0.4#	0.43±0.05#
S05	20	4	17.06±5.98	4.0±1.4	0.8±0.5	0.20±0.07
S07	15	3	20.60±2.05	2.3±0.7	0.8±0.3	0.32±0.06
S08	15	4	77.57±33.95	5.4±3.3	2.9±1.5	0.56±0.12
S11	15	6	32.86±6.88	5.1±1.9	2.4±0.9*	0.52±0.09*†
	20	6	43.14±14.70#	5.2±0.9	1.3±0.2#	0.23±0.04
S12	15	8	44.85±5.64*†	6.8±0.4*	3.6±1.3*†	0.55±0.22†
	20	8	25.18±3.39#	5.2±1.1	1.1±0.2#	0.21±0.05
S13	15	6	49.89±14.54*	5.2±0.8*	2.0±1.0	0.45±0.14
	20	6	27.12±15.25	4.4±0.8	1.7±1.1	0.42±0.24
S14	15	5	27.33±4.87	5.3±1.2	1.5±0.1*	0.30±0.18
	20	3	21.07±6.58	3.3±0.1#	0.9±0.2	0.26±0.08

*: 15 °C 培养, 与 CK 相比有显著差异($P<0.05$); #: 20 °C 培养, 与 CK 相比有显著差异($P<0.05$); †: 与 20 °C 相比有显著差异($P<0.05$)

*: Compared with CK, there is a significant difference under 15 °C ($P<0.05$); #: Compared with CK, there is a significant difference under 20 °C ($P<0.05$); †: Compared with 20 °C, there is a significant difference ($P<0.05$).

和根冠比分别提高 44.1%、2.00 倍和 1.53 倍 ($P<0.05$); 与菌株 S12 共生苗的根总长度和根干重分别提高了 46.8%和 83.3% ($P<0.05$)。此外, 与 CK 相比, 与菌株 S11 共生的苗根总长度和根干重有显著提高($P<0.05$)。

比较相同处理在不同温度下的作用差异。单独培养的幼苗(CK) 15 °C和 20 °C时的各项生长指标之间无显著差异($P>0.05$)。与菌株 S13 和 S14 共生培养的苗也是如此。与菌株 S12 共生, 15 °C培养苗的根总长度和根干重分别比 20 °C培养提高 78.11%和 2.27 倍($P<0.05$)。与菌株 S01 共生, 15 °C培养苗的根干重比 20 °C培养提高 2.17 倍($P<0.05$)。可见 15 °C培养更有利于菌株 S01 和 S12 发挥作用。

3 讨论与结论

3.1 雪莲花内生真菌多样性

雪莲花是一种珍稀濒危的高山药用植物, 从其根中分离获得内生真菌的数量常多于其他组织。武利勤报道雪莲花根和叶组织中的内生真菌时分别获得 31 株和 9 株^[15]。Lv 等^[16]从雪莲花根、茎、叶和花中分别获得内生真菌 29 株、11 株、7 株和 2 株。雪莲花根内生真菌多样性十分丰富。由于研究方法的差异, 不同研究者报道的真菌群落组成和结构差别较大^[16]。陈娟等利用直接克隆测序的方法分析雪莲花根不可培养内生真菌多样性, 报道了格孢腔菌目(26.9%)和柔膜菌目(11.0%)是优势目^[17]。本研究雪莲花根可培养内生真菌多样性, 取得了与之相似的结果, 两个类群的优势更突出, 相对丰度分别是 58.5%和 35.9%。本研究和陈娟等均报道了链格孢属是雪莲花根内生真菌的优势属。陈娟等报道的优势属还包括小球壳孢属(*Microsphaeropsis*)和小球腔菌属(*Leptosphaeria*)^[17]。Lv 等在 25 °C分离雪莲花根可培养内生真菌, 报道了柱孢属

(*Cylindrocarpon*) (24.1%)和茎点霉属(*Phoma*) (20.7%)是优势属, 它们分属于肉座菌目(*Hypocreales*)和格孢腔菌目; 有 1 株链格孢属真菌^[16]。本研究在 4 °C和 15 °C分离可培养内生真菌, 报道的优势属还包括 *Rhexocercosporidium* (31.7%)和背芽突霉属(26.8%)。综合上述报道, 雪莲花根中普遍存在格孢腔菌目和柔膜菌目真菌; 格孢腔菌目链格孢属和柔膜菌目 *Rhexocercosporidium* 有可能是雪莲花根内生真菌的优势类群。

DSEs 是一类多样且普遍存在的内生真菌类群。目前发现的 DSEs 都是子囊菌, 绝大多数被划分在柔膜菌目和格孢腔菌目, 煤炱目(*Capnodiales*)、肉座菌目(*Hypocreales*)、散囊菌目(*Eurotiales*)等目也有报道^[11,13]。文献报道以及本研究结果都表明了 DSEs 在雪莲花根内生真菌群落中普遍存在^[15-16]。Wu 等鉴定雪莲花根 DSEs 菌株 MF-37 和 MF-M 分别为 *Mycocentrospora* sp. (属格孢腔菌目)和 *Leptodontidium* sp. (属柔膜菌目), 它们与雪莲花幼苗共生培养都有促进植物生长的作用^[25,44]。本研究从代表雪莲花根内生真菌群落组成的 14 个菌株中发现 10 株 DSEs, 柔膜菌目为 DSE 优势目, 链格孢属和 *Rhexocercosporidium* 是 DSE 优势属; 5 株 DSEs 有促进幼苗生长的作用, 其中 3 株为耐冷菌、1 株为嗜冷菌。同时, *Rhexocercosporidium* 代表菌株 S13 和 S14 均有促进幼苗生长作用。因此, 本研究发现柔膜菌目 *Rhexocercosporidium* 在雪莲花根内具有较高丰度, 其代表菌株兼具 DSE、耐冷菌和促生菌的特性, 推测该属菌株具有较好的低温适应性, 并能在低温下发挥促进植物生长的作用, 丰富了对于雪莲花根内 DSEs 多样性的认识。虽然本文未能检测所有 142 个菌株的温度适应性、菌丝形态及促生长活性, 但结合所筛选出的代表菌株生物学特性及各 OTU 相对丰度, 可

以对低温分离雪莲花根部内生真菌的群落组成及其潜在生物学特性有一个较系统的考察,并有效聚焦于特定生态功能的真菌种类。

3.2 冷适应性真菌多样性

地球表面分布的低温生境包括南北两极地区以及高山、冰川和冻土区域。4–15 °C是目前常用的分离低温生境微生物时使用的温度,低温分离能获得更多的冷适应真菌^[45-47]。本文研究结果显示了分离温度对冷适应内生真菌的多样性有较大影响。Hagh 等报道了类似结果,从栎属植物 *Quercus brantii* 分离的内生真菌包括 59 个 OTU, 其中 8 个只能在 4 °C 分离获得, 7 个能同时在 4 °C 和 25 °C 获得, 44 个只能在 25 °C 获得^[45]。从低温沉积物中获得的真菌包括酵母菌或丝状子囊菌, 绝大多数子囊菌属于柔膜菌目和格孢腔菌目^[48]。对瑞士中部达玛冰川冰缘带形成时间与微生物群落组成的研究发现, 冰缘带形成时间与土壤的盐基饱和度、酸碱度、碳含量、氮含量及植物覆盖度密切相关, 直接影响冰缘带微生物群落组成; 子囊菌的丰度会随着冰缘带形成时间增加而减少^[49]。Wang 等对青藏高原冰川冷适应真菌多样性进行了研究, 分离出 1 428 种真菌, 其中鉴定出 150 个物种, 柔膜菌目是最常见的类群^[50]。丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)和 DSE 同时定殖在青藏高原扎当冰川冰缘带 2 种优势植物根内, AMF 在喜马拉雅蝇子草(*Melandrium apetalum*)根内占优势, DSE 则在中亚早熟禾(*Poa litwinowiana*)根内占优势^[51]。大量研究表明, DSE 能提高宿主植物的抗逆性, 这与 DSE 具有细胞壁富集黑色素, 细胞内积累海藻糖等渗透物质的生物学特性相关^[11]。本研究获得内生真菌的主要类群同样是子囊菌门柔膜菌目和格孢腔菌目, 且 DSE 为优势类群, 与已报道低温生境及其植物根内的优势真菌类群相吻合。表明柔膜菌目和格孢腔菌目可在

全球低温生境广泛分布,是具有代表性的冷适应类群。

3.3 冷适应性真菌对植物生长的影响

低温生境中与植物密切联系的冷适应性真菌,可以在植物适应环境、耐受低温胁迫的过程中发挥作用^[52], 其中内生菌能通过养分交换促进宿主植物生长^[53]。许多研究发现, 真菌为主的地衣共生体促进了寒冷生态系统中初级生物量的积累^[54]。通过与植物共生, 真菌能帮助植物面对非生物(温度、pH 值、渗透压)和生物(细菌、真菌、线虫和昆虫)压力^[55]。金孢霉属(*Geomyce*)和背芽突霉属真菌广泛存在于南极洲^[56], 在腐烂和养分循环中发挥着重要作用^[57]。分离自冰川的多种细菌、放线菌、酵母等微生物均通过增加磷酸盐溶解, 促进植物生长^[58-60]。Tapia-Vázquez 等^[61]发现具有无机磷酸盐增溶作用的嗜冷或耐冷菌株, 可促进番茄种子萌发、并在 15 °C 发挥促进幼苗生长的作用。真菌通过产生有机酸增加磷酸盐溶解, 其增磷效率高于细菌^[58]。Singh 等首次在北极土壤中报道了耐冷磷酸盐增溶真菌^[62]。Gawas-Sakhalkar 等从北极土壤中获得青霉属菌株 PG162, 可用于酸性磷酸酶的工业生产^[63]。同样, 具有冷适应性的外生菌根真菌能产生冷活性酸性磷酸酶^[64]。此外, Jain 等从生长在喜马拉雅的药用植物软紫草(*Arnebia euchroma*)根中分离获得一株内生真菌 *Penicillium* sp. ARF9, 该内生真菌在 20 °C 条件下, 具有增加磷和钾的水溶性、分泌植物激素吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, ACCD)和铁载体, 可有效促进宿主植物生长^[65]。本研究发现 9 株内生真菌有冷适应性, 能在 15 °C 快速生长; 其中有 4 株能在 15 °C 促进雪莲花幼苗生长, 推测冷适应性真菌帮助幼苗更好地适应低温条件, 预示它们在

雪莲花育苗阶段有良好的应用前景。由于时间所限,本研究未开展这方面的工作。后续将从多个方面研究菌株 S01 等冷适应菌株的冷适应机制,以及它们促进雪莲花幼苗生长的作用机理。

REFERENCES

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 55-56.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Edition 1[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 55-56 (in Chinese).
- [2] 范文霞, 杨伟鹏, 刘汉石. 天山雪莲细胞培养技术、化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3522-3528.
FAN WX, YANG WP, LIU HS. Research progress on culture technologies, chemical components, and pharmacological activities of *Saussurea involucrata* cells[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(14): 3522-3528 (in Chinese).
- [3] CHIK WI, ZHU L, FAN LL, YI T, ZHU GY, GOU XJ, TANG YN, XU J, YEUNG WP, ZHAO ZZ, YU ZL, CHEN HB. *Saussurea involucrata*: a review of the botany, phytochemistry and ethnopharmacology of a rare traditional herbal medicine[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 172: 44-60.
- [4] GONG GW, HUANG J, YANG Y, QI BH, HAN GY, ZHENG YZ, HE H, CHAN K, TSIM KW, DONG TT. *Saussureae Involucratae* Herba (snow lotus): review of chemical compositions and pharmacological properties[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 10: 1549.
- [5] 谭敦炎, 朱建雯. 雪莲的生殖生态学研究[J]. 新疆农业大学学报, 1998, 21(1): 1-5.
TAN DY, ZHU JW. Studies on reproduction ecology in *Saussurea involucrata*[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 1998, 21(1): 1-5 (in Chinese).
- [6] 贾晓光, 顾政一. 天山雪莲[M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2013: 1-213.
JIA XG, GU ZY. *Saussurea tianshanica*[M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Press, 2013:1-213 (in Chinese).
- [7] 郭顺星. 药用植物内生真菌研究现状和发展趋势[J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 1-13.
GUO SX. The recent progress and prospects of research on endophytic fungi in medicinal plants[J]. Mycosystema, 2018, 37(1): 1-13 (in Chinese).
- [8] WEN J, OKYERE SK, WANG JC, HUANG RY, WANG Y, LIU L, NONG X, HU YC. Endophytic fungi isolated from *Ageratina adenophora* exhibits potential antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Plants, 2023, 12(3): 650.
- [9] 郭顺星. 药用植物内生真菌生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 1-9.
GUO SX. Biology of Endophytic Fungi in Medicinal Plants[M]. Beijing: Science Press, 2016: 1-9 (in Chinese).
- [10] GOVINDASAMY V, GEORGE P, RAINA SK, KUMAR M, RANE J, ANNAPURNA K. Plant-associated microbial interactions in the soil environment: role of endophytes in imparting abiotic stress tolerance to crops[M]//Advances in Crop Environment Interaction. Singapore: Springer Singapore, 2018: 245-284.
- [11] MALICKA M, MAGURNO F, PIOTROWSKA-SEGET Z. Plant association with dark septate endophytes: when the going gets tough (and stressful), the tough fungi get going[J]. Chemosphere, 2022, 302: 134830.
- [12] GENRE A, LANFRANCO L, PEROTTO S, BONFANTE P. Unique and common traits in mycorrhizal symbioses[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(11): 649-660.
- [13] RUOTSALAINEN AL, KAUPPINEN M, WÄLI PR, SAIKKONEN K, HELANDER M, TUOMI JH. Dark septate endophytes: mutualism from by-products?[J]. Trends in Plant Science, 2022, 27(3): 247-254.
- [14] 代梦雪, 张光群, 范旭杪, 李博, 湛方栋, 何永美. 胁迫生境深色有隔内生真菌生态分布与功能研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(3): 722-729.
DAI MX, ZHANG GQ, FAN XM, LI B, ZHAN FD, HE YM. Research progress regarding the ecological distribution and function of dark septate endophytes in stressful environments[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(3): 722-729 (in Chinese).
- [15] 武利勤. 天山雪莲与其内生真菌相互作用的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学博士学位论文, 2005.
WU LQ. Study on the interaction between the endophytic fungi and *Saussurea involucrata* Kar. et Kir[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Peking Union Medical College, 2005 (in Chinese).
- [16] LV YL, ZHANG FS, CHEN J, CUI JL, XING YM, LI XD, GUO SX. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with the alpine plant

- Saussurea involucrata*[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2010, 33(8): 1300-1306.
- [17] 陈娟, 朱军, 阎波, 李佳梅, 郭顺星. 新疆药用植物天山雪莲及红景天内生真菌的分离与初步鉴定[J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 110-119.
- CHEN J, ZHU J, YAN B, LI JM, GUO SX. Preliminary identification of endophytic fungi colonized in the root of *Saussurea involucrata* and *Rhodiola rosea* from Xinjiang region[J]. Mycosystema, 2018, 37(1): 110-119 (in Chinese).
- [18] HASSAN N, RAFIQ M, HAYAT M, ALI SHAH A, HASAN F. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review[J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2016, 15(2): 147-172.
- [19] 张国华, 罗会颖, 丁建南, 姚斌. 新疆天山雪莲根际冻土微生物富集培养的初步研究[J]. 江西科学, 2010, 28(4): 453-457.
- ZHANG GH, LUO HY, DING JN, YAO B. Pilot studies on microflora by enrichment culture in frozen soil at the root of *Saussurea involucratae* Kar.et Kir.et maxim from Tianshan, Xinjiang autonomous region[J]. Jiangxi Science, 2010, 28(4): 453-457 (in Chinese).
- [20] YARZÁBAL LA. Perspectives for using glacial and periglacial microorganisms for plant growth promotion at low temperatures[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(8): 3267-3278.
- [21] SINGH H, SINHA N, BHARGAVA P. Understanding cold-adapted plant growth-promoting microorganisms from high-altitude ecosystems[M]//Microbiological Advancements for Higher Altitude Agro-Ecosystems & Sustainability. Singapore: Springer Singapore, 2020: 247-268.
- [22] SHI YL, YUAN Y, FENG YY, ZHANG YH, FAN YH. Bacterial diversity analysis and screening for ACC deaminase-producing strains in moss-covered soil at different altitudes in Tianshan Mountains-a case study of glacier No. 1[J]. Microorganisms, 2023, 11(6): 1521.
- [23] 孙璐, 周方元, 黄筱芸, 徐媛, 杨丽娇, 吕国忠, 苏丹. 长白山北坡森林土壤低温真菌的种群分布[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(17): 157-158.
- SUN L, ZHOU FY, HUANG YY, XU Y, YANG LJ, LV GZ, SU D. Population diversities of low temperature fungi in northern slope of Changbai Mountain[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(17): 157-158 (in Chinese).
- [24] LV YL, SUN LH, ZHANG FS, ZHAO Y, GUO SX. The effect of cultivation conditions on the mycelial growth of a dark-septate endophytic isolate[J]. African Journal of Microbiology Research, 2010, 4: 602-607.
- [25] WU LQ, LV YL, MENG ZX, CHEN J, GUO SX. The promoting role of an isolate of dark-septate fungus on its host plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir[J]. Mycorrhiza, 2010, 20(2): 127-135.
- [26] KÖLJALG U, NILSSON RH, ABARENKOV K, TEDERSOO L, TAYLOR AFS, BAHRAM M, BATES ST, BRUNS TD, BENGTTSSON-PALME J, CALLAGHAN TM, DOUGLAS B, DRENKHAN T, EBERHARDT U, DUEÑAS M, GREBENC T, GRIFFITH GW, HARTMANN M, KIRK PM, KOHOUT P, LARSSON E, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. Molecular Ecology, 2013, 22(21): 5271-5277.
- [27] KIA SH, GLYNOU K, NAU T, THINES M, PIEPENBRING M, MACIÁ-VICENTE JG. Influence of phylogenetic conservatism and trait convergence on the interactions between fungal root endophytes and plants[J]. The ISME Journal, 2017, 11(3): 777-790.
- [28] ZHANG BQ, LI XG, LI GJ, WANG QM, WANG MM. *Cadophora* species from marine glaciers in the Qinghai-Tibet Plateau: an example of unsuspected hidden biodiversity[J]. IMA Fungus, 2022, 13(1): 1-29.
- [29] WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [30] BENGTTSSON-PALME J, RYBERG M, HARTMANN M, BRANCO S, WANG Z, GODHE A, de WIT P, SÁNCHEZ-GARCÍA M, EBERSBERGER I, de SOUSA F, AMEND A, JUMPPONEN A, UNTERSEHER M, KRISTIANSOON E, ABARENKOV K, BERTRAND YJK, SANLI K, ERIKSSON KM, VIK U, VELDRE V, et al. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data[J]. Methods in Ecology and Evolution, 2013, 4(10): 914-919.
- [31] SARMA P. Diversity of endophytic fungi associated with the medicinally important aromatic plant *Gaultheria fragrantissima*[J]. Studies in Fungi, 2018, 3(1): 309-320.
- [32] GLYNOU K, ALI T, BUCH AK, HAGHI KIA S, PLOCH S, XIA XJ, ÇELIK A, THINES M, MACIÁ-VICENTE JG. The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(8): 2418-2434.
- [33] LEE TAYLOR D, HOLLINGSWORTH TN,

- McFARLAND JW, LENNON NJ, NUSBAUM C, RUESS RW. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning[J]. *Ecological Monographs*, 2014, 84(1): 3-20.
- [34] 张青青, 董醇波, 梁宗琦, 韩燕峰. 不同产地杜仲树皮可培养内生真菌群落组成和多样性[J]. *菌物学报*, 2021, 40(10): 2685-2699.
- ZHANG QQ, DONG CB, LIANG ZQ, HAN YF. Community composition and diversity of culturable endophytic fungi in bark of *Eucommia ulmoides* from different regions of China[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(10): 2685-2699 (in Chinese).
- [35] 魏苗. 西北荒漠地区黑果枸杞深色有隔内生真菌资源的耐盐性研究[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2022.
- WEI M. Resources distribution and salt tolerance of dark septate endophytes in *Lycium ruthenicum* in northwest desert region[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei University, 2022 (in Chinese).
- [36] TOLJANDER JF, SANTOS-GONZÁLEZ JC, TEHLER A, FINLAY RD. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(2): 323-338.
- [37] HEUER H, SMALLA K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30(1): 49-61.
- [38] HALL BG. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(5): 1229-1235.
- [39] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [40] TAMURA K, NEI M, KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(30): 11030-11035.
- [41] 周丽思, 曾旭, 郭顺星. 云南白木香根内丛枝菌根真菌群落组成[J]. *中国药学杂志*, 2019, 54(11): 867-873.
- ZHOU LS, ZENG X, GUO SX. Characterization of arbuscular mycorrhizal fungus communities of *Aquilaria sinensis* roots from Yunnan Province[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2019, 54(11): 867-873 (in Chinese).
- [42] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [43] MOKANY K, RAISON RJ, PROKUSHKIN AS. Critical analysis of root: shoot ratios in terrestrial biomes[J]. *Global change Biology*, 2006, 12(1): 84-96.
- [44] WU LQ, GUO SX. Interaction between an isolate of dark-septate fungi and its host plant *Saussurea involucreata*[J]. *Mycorrhiza*, 2008, 18(2): 79-85.
- [45] HAGH DOUST N, SAFAIE N, SCHMITT I, OTTE J, BÁLINT M. Culture-based methods using low-temperature incubation revealed cold-adapted fungal endophytes from semiarid forests[J]. *Forest Pathology*, 2019, 49(3): e12515.
- [46] 张梦君, 邱晨浩, 柴立伟, 黄木柯, 赵嫣然, 黄艺. 高效降解纤维素低温真菌的筛选、鉴定及发酵优化[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2494-2503.
- ZHANG MJ, QIU HC, CHAI LW, HUANG MK, ZHAO YR, HUANG Y. Screening, identification and fermentation optimization of cold-adapted fungi with high efficiency of cellulose degradation[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2494-2503 (in Chinese).
- [47] Da C COELHO L, de CARVALHO CR, ROSA CA, ROSA LH. Diversity, distribution, and xerophilic tolerance of cultivable fungi associated with the Antarctic angiosperms[J]. *Polar Biology*, 2021, 44(2): 379-388.
- [48] EDWARDS A, DOUGLAS B, ANESIO AM, RASSNER SM, IRVINE-FYNN TDL, SATTTLER B, GRIFFITH GW. A distinctive fungal community inhabiting cryoconite holes on glaciers in Svalbard[J]. *Fungal Ecology*, 2013, 6(2): 168-176.
- [49] ZUMSTEG A, LUSTER J, GÖRANSSON H, SMITTENBERG RH, BRUNNER I, BERNASCONI SM, ZEYER J, FREY B. Bacterial, archaeal and fungal succession in the forefield of a receding glacier[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(3): 552-564.
- [50] WANG M, JIANG X, WU W, HAO Y, SU Y, CAI L, XIANG M, LIU X. Psychrophilic fungi from the world's roof[J]. *Persoonia*, 2015, 34: 100-112.
- [51] PAN JB, LIU YJ, HE XH, KANG SC, HOU YH, AN LZ, FENG HY. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi at 5 500 m on a glacier forefront in the Qinghai-Tibet Plateau, China[J]. *Symbiosis*, 2013, 60(2): 101-105.
- [52] ACUÑA-RODRÍGUEZ IS, NEWSHAM KK, GUNDEL PE, TORRES-DÍAZ C, MOLINA-MONTENEGRO MA.

- Functional roles of microbial symbionts in plant cold tolerance[J]. *Ecology Letters*, 2020, 23(6): 1034-1048.
- [53] EL-DIN HASSAN S. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L.[J]. *Journal of Advanced Research*, 2017, 8(6): 687-695.
- [54] ROSA LH, VAZ ABM, CALIGIORNE RB, CAMPOLINA S, ROSA CA. Endophytic fungi associated with the antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*)[J]. *Polar Biology*, 2009, 32(2): 161-167.
- [55] RODRIGUEZ A, DOUGALL T, DODD JC, CLAPP JP. The large subunit ribosomal RNA genes of *Entrophospora infrequens* comprise sequences related to two different glomalean families[J]. *New Phytologist*, 2001, 152(1): 159-167.
- [56] BLANCHETTE RA, HELD BW, ARENZ BE, JURGENS JA, BALTES NJ, DUNCAN SM, FARRELL RL. An antarctic hot spot for fungi at Shackleton's historic hut on cape royds[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(1): 29-38.
- [57] ARENZ BE, BLANCHETTE RA. Investigations of fungal diversity in wooden structures and soils at historic sites on the antarctic peninsula this article is one of a selection of papers in the special issue on polar and alpine microbiology[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(1): 46-56.
- [58] NENWANI V, DOSHI P, SAHA T, RAJKUMAR S. Isolation and characterization of a fungal isolate for phosphate solubilization and plant growth promoting activity[J]. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 2010, 1(1): 9-14.
- [59] STIBAL M, ANESIO AM, BLUES CJD, TRANTER M. Phosphatase activity and organic phosphorus turnover on a high arctic glacier[J]. *Biogeosciences*, 2009, 6(5): 913-922.
- [60] NOPPARAT C, JATUPORNPIPAT M, RITTIBOON A. Isolation of phosphate solubilizing fungi in soil from kanchanaburi, Thailand[J]. *Current Applied Science and Technology*, 2007, 7(2-1): 137-146.
- [61] TAPIA-VÁZQUEZ I, SÁNCHEZ-CRUZ R, ARROYO-DOMÍNGUEZ M, LIRA-RUAN V, SÁNCHEZ-REYES A, del RAYO SÁNCHEZ-CARBENTE M, PADILLA-CHACÓN D, ALBERTO BATISTA-GARCÍA R, FOLCH-MALLOL JL. Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in Mexico[J]. *Microbiological Research*, 2020, 232: 126394.
- [62] SINGH AS, PALNI UT. Diversity and distribution of rust fungi in central Himalayan region[J]. *Journal of Phytology*, 2011, 3(2): 49-59.
- [63] GAWAS-SAKHALKAR P, SINGH S, NAIK S, RAVINDRA R. High-temperature optima phosphatases from the cold-tolerant Arctic fungus *Penicillium citrinum*[J]. *Polar Research*, 2012, 31(1): 11105.
- [64] TIBBETT M, SANDERS FE, CAIRNEY JWG. The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in Arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. in axenic culture[J]. *Mycological Research*, 1998, 102(2): 129-135.
- [65] JAIN R, BHARDWAJ P, PANDEY SS, KUMAR S. *Arnebia euchroma*, a plant species of cold desert in the Himalayas, harbors beneficial cultivable endophytes in roots and leaves[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 696667.