

青海上北山林场野生桃儿七根部内生真菌群落组成及多样性研究

宁祎^{1,2}, 李艳玲^{1,4}, 周国英^{1,3}, 杨路存^{1,3}, 徐文华^{1,3*}

- (1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 中国科学院藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810001;
4. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

[摘要] 该研究通过应用第二代测序技术(NGS)即高通量测序方法测序青海野生桃儿七根内真菌宏基因组 ITS 1 区,并依据 RDP 中设置的分类阈值对处理后的序列进行物种分类,鉴定内生真菌的群落组成。研究结果显示,测序结果经过质量控制共获得有效条带 22 565 条,依据 97% 的序列相似性做聚类相似性分析,获得全部样品的可分类操作单元(OTUs)共 517 个, RDP 分类依据 0.8 的分类阈值鉴定出的全部真菌可归类为 13 纲、35 目、44 科、55 属。3 个样品 LD1、LD2、LD3 中共同的优势属真菌为 *Tetracladium* 属(所占比例分别为 35.49%、68.55%、12.96%)。样品的香浓多样性指数和辛普森多样性指数分别在 1.75~2.92、0.11~0.32。研究结果表明,青海上北山林场野生桃儿七根内生真菌具有较高的多样性和较复杂的群落组成,蕴含着丰富的内生真菌资源,且高通量测序技术对于研究植物内生真菌群落组成及多样性具有显著的优势。

[关键词] 桃儿七; 内生真菌; 高通量测序; 群落组成; 多样性

Community composition and diversity of endophytic fungi from roots of *Sinopodophyllum hexandrum* in forest of Upper-north mountain of Qinghai province

NING Yi^{1,2}, LI Yan-ling^{1,4}, ZHOU Guo-ying^{1,3}, YANG Lu-cun^{1,3}, XU Wen-hua^{1,3*}

- (1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;
4. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

[Abstract] High throughput sequencing technology is also called Next Generation Sequencing (NGS), which can sequence hundreds and thousands sequences in different samples at the same time. In the present study, the culture-independent high throughput sequencing technology was applied to sequence the fungi metagenomic DNA of the fungal internal transcribed spacer 1(ITS 1) in the root of *Sinopodophyllum hexandrum*. Sequencing data suggested that after the quality control, 22 565 reads were remained. Cluster similarity analysis was done based on 97% sequence similarity, which obtained 517 OTUs for the three samples (LD1, LD2 and LD3). All the fungi which identified from all the reads of OTUs based on 0.8 classification thresholds using the software of RDP classifier were classified as 13 classes, 35 orders, 44 family, 55 genera. Among these genera, the genus of *Tetracladium* was the dominant genera in all samples (35.49%, 68.55% and 12.96%). The Shannon's diversity indices and the Simpson indices of the endophytic fungi in the samples ranged from 1.75~2.92, 0.11~0.32, respectively. This is the first time for applying high through put sequencing technol-

[收稿日期] 2015-10-28

[基金项目] 2015 年国家星火计划重点项目(2015GA870007); 中国科学院“西部之光”人才培养计划重点项目后续择优支持项目

[通信作者] * 徐文华, 副研究员, 主要从事生物技术与药用植物资源培育研究, E-mail: whxu@nwipb.cas.cn

[作者简介] 宁祎, 硕士研究生, 主要从事微生物生态学研究, E-mail: no.120082008@163.com

ogyto analyze the community composition and diversity of endophytic fungi in the medicinal plant, and the results showed that there were hyper diversity and high community composition complexity of endophytic fungi in the root of *S. hexandrum*. It is also proved that the high throughput sequencing technology has great advantage for analyzing ecommunity composition and diversity of endophyte in the plant.

[Key words] *Sinopodophyllum hexandrum*; endophytic fungi; high throughput sequencing; community composition; diversity

doi: 10.4268/cjcm20160712

桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* 又名鬼臼、小叶莲等,属小檗科 Berberidaceae 桃儿七属 *Sinopodophyllum* 多年生草本植物,我国珍稀濒危物种,属国家三级保护植物。桃儿七分布在海拔 2 700 ~ 4 300 m 的林下或灌丛中,在我国主产于青海、甘肃、四川西部、西藏、云南西北部、陕西等地,此外尼泊尔、不丹、印度北部、巴基斯坦、阿富汗东部和印控克什米尔等地也有分布^[1]。桃儿七作为中国传统中药具有悠久的用药历史。藏医以桃儿七果实入药,可调节活血、保胎、消肿、止痛。中医以其根及根状茎入药,具有祛痰止咳,抗肿瘤,抗免疫等作用^[2]。近年来国内外学者对其深入研究发现,桃儿七根茎内含有较高的抗肿瘤活性物质——木脂素类化合物,如鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素等。植物中获取天然活性化合物治疗人类疾病,在现代医学史上占据着重要的地位,但随着现代社会的高速发展,带来的一系列问题导致某些包括野生植物资源在内的自然资源日益枯竭。因此,许多的科研工作者将生产天然活性化合物的视角转向了微生物方向,桃儿七内生真菌即为当今的研究热点之一。

内生真菌是指其生活史的一定阶段或全部阶段定殖在宿主植物体内,而不引起植物发生明显病变的一类真菌总称^[3]。目前认为,地球上生存的所有高等植物都有内生真菌的定殖,纯培养研究结果显示,定殖的内生真菌种类少则十几种多则上百种。内生真菌与宿主植物之间的相互作用也多种多样,如抗逆促生、抗虫害、抗病害、环境修复及产活性产物等等^[4],因此研究宿主植物体内的内生真菌群落组成和多样性对研究内生真菌与宿主间的相互作用具有重要的生态学意义。

高通量测序技术(HTS)起始于2005年,又被称为第二代测序技术^[5],此技术能够一次并行对几百万到上千万条的DNA序列分别进行测序,对于研究环境样品中微生物群落组成具有巨大的应用价值。目前高通量测序技术在水环境及土壤微生物群落研究领域已得到广泛应用。但此技术应用在植物内生

真菌群落组成中的研究却少有报道^[6-8],尤其在民族药用植物宿主内的内生真菌群落组成的研究中尚未见报道。目前对于桃儿七植株内生真菌群落组成的研究仅局限于纯培养模式开展,取得了一些现有的结论^[9-11],但此方法具有一定的局限性,据统计利用培养基分离的内生真菌种类总数不超过全部真菌总数的1%,甚至更低,因此利用纯培养模式研究宿主植物内生真菌的群落组成,其结果将会低估不能培养分离的内生真菌对宿主植物的贡献^[12]。本文通过第二代测序技术——高通量测序对桃儿七根内内生真菌的群落组成及多样性进行了研究,主要的目的有以下3个方面:①运用高通量测序技术掌握青海上北山林场桃儿七内生真菌的群落组成及多样性;②比较免培养测序结果与前人研究的纯培养分离结果之间的关联差异;③探讨桃儿七优势种内生真菌的生态学功能。基于以上研究目的,期许发现青海野生桃儿七宿主内新的有价值真菌资源,为抗肿瘤药物的获取开辟一条新途径,以期为其工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 采样

于2014年9月初,样品采挖自青海省乐都区境内的引胜沟上北山林场(102°23'54.0",36°42'17.2"),海拔2 835 m。采样时选取成年健康植株3株,根据随机取样原则,取样的株距在30~50 m。样品采挖后连带根际土一并装入干净塑料袋,置入便携式保温箱中,编号标记后带回实验室备用。

1.2 样品预处理

新鲜样品采回后,洗净桃儿七根部表面泥土,自来水下冲洗30 min,取出样品置于无菌烧杯中用大量无菌水漂洗,待样品干燥后置于无菌操作台中。无菌操作台上的样品表面灭菌处理操作参照纯培养模式下^[13]的灭菌过程,具体方法如下:将样品浸入70%乙醇1 min,再浸入5%的次氯酸钠5 min,无菌水漂洗3次,待样品干燥后剪切成小段置于无菌2 mL离心管中保存在冰盒中送样。样品送至生工生

物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.3 DNA 提取及引物筛选

样品中真菌总 DNA 的提取采用 OMEGA 公司生产的真菌提取试剂盒,依据生产商的说明提取。提取的 DNA 用 Qubit 2.0 DNA 检测试剂盒检测 DNA 浓度,琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性。实验选取 3 对真菌特异性引物 2F/2R^[14], 3F/3R^[15], ITS1/ITS2^[16], 分别对应扩增 ITS 区域的 5.8S, ITS2, ITS1 区。随机挑选一个样品 LD1 进行扩增,每对引物设置 4 个生物学重复,筛选出最佳引物。

1.4 高通量平台测序

PCR 扩增引物为真菌特异性引物扩增真菌的 ITS1 区,扩增时引物融合测序平台的通用标签序列以区分样品,引物序列为:前置引物 5'-CCCTACAC-GACGCTCTCCGATCTNCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3', 后置引物 5'-GTGACTGGAGTTCCTTGGCAC-CCGAGAATTCCAGCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'。其中斜体序列为特异性引物序列,其他序列为添加的测序标签序列。PCR 扩增产物用 Illumina Miseq 2 × 300 测序平台进行双端测序分析。

1.5 数据处理

1.5.1 序列质量控制 对测序所得的序列进行质量控制,质量控制包括 3 个部分,首先根据标签序列区分样本后,将样本中所得的标签序列去掉;其次,去除较短的片段序列,短片段的定义为小于 50 bp;最后,应用 Prinseq 软件去除低复杂度的序列。最终得到的各样本序列长度均在 200 bp 以上。

1.5.2 OTU 聚类及 RDP 分类 根据质量控制所得的优质序列,将多条序列按其序列间的距离根据聚类软件 Uclust 对它们进行聚类,序列间的距离相似性阈值设置为 0.97,聚类为不同的操作分类单元(OTUs)。随后应用 RDP classifier 软件基于 Naïve Bayesian assignment 算法,对 OTU 聚类结果中的全部序列计算每条序列在属水平上的 RDP 分类阈值,一般设置阈值为 0.8 归类为一个属,依此对各样品中的菌群进行分类。

1.5.3 群落组成分析 在形成的 OTU 聚类结果基础上,对样品进行 Alpha 多样性分析,通过计算样本的丰富度指数、辛普森指数、香浓指数、Chao1 指数、ACE 指数来衡量样本的物种多样性。根据分类学分析结果,绘制样品菌群分布条形图,比较样品间的菌群组成差异。

2 结果

2.1 引物筛选

3 对引物扩增结果见图 1, 1~4, 5~8, 9~12 对应的引物分别为 2F/2R, 3F/3R, ITS1/ITS2(每对引物设置 4 个生物学重复)。比对 Marker 可知,引物 2F/2R 扩增出的条带均大于 600 bp,引物 3F/3R 扩增出的条带均小于 200 bp,引物 ITS1/ITS2 扩增出的条带有 2 条分别对应 300, 400 bp。根据 Illumina Miseq 2 × 300 测序平台自身特点,引物 2F/2R 扩增出的条带过大,不能上机测序,引物 3F/3R 扩增的条带较短,测序结果可信度较差。引物 ITS1/ITS2 扩增区域为 ITS1 区,条带范围在 300~400 bp,符合 Illumina Miseq 2 × 300 测序平台的测序条件。因此,确定 ITS1/ITS2 引物为本研究的最佳引物,具体见 1.4。

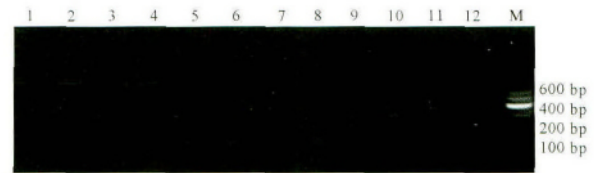


图 1 引物 2F/2R, 3F/3R, ITS1/ITS2 对样品 LD1 的扩增
Fig.1 The amplified results of primers 2F/2R, 3F/3R and ITS1/ITS2 for the sample of LD1

2.2 质量控制

质量控制前共获得序列 54 856 条,质量控制后共获得优质序列 22 565 条,其中 LD1, LD2, LD3 分别为 7 194, 6 629, 8 742 条,全部序列长度均大于 200 bp(\bar{x} = 257 bp)。

2.3 OTU 聚类及 RDP 分类

质控后获得的序列,依据 97% 的序列相似性获得的可分类操作单元(OTUs) 517 个。其中样品 LD1, LD2, LD3 获得的 OTUs 数目分别为 305, 253, 138 个。RDP 分类全部 OTUs 可划分为 13 纲, 35 目, 44 科, 55 属。样品 LD1 可划分为 10 纲, 20 目, 26 科, 31 属, LD2 可被划分为 11 纲, 22 目, 25 科, 31 属, LD3 可被划分为 9 纲, 17 目, 21 科, 27 属。

2.4 物种分布

在门和属 2 个层次上对 3 个样品进行群落组成分析。除去未鉴定出的真菌外, 3 个样品均为子囊菌门和担子菌门 2 个门,其中 LD1, LD2 样品中子囊

表1 属水平上各样品的菌种组成及测序条带所占比例

Table 1 The ratio of sequence reads and identification of endophytic fungi at all samples in genera

属名	LD1_reads	LD1_ratio	LD2_reads	LD2_ratio	LD3_reads	LD3_ratio
<i>Tetracladium</i>	2 553	35.49	4 544	68.55	1 133	12.96
unclassified_fungi	1 670	23.21	1 541	23.25	156	1.78
<i>Hymenoscyphus</i>	1 399	19.45	0	0	0	0
<i>Pseudogymnoascus</i>	1 031	14.33	18	0.27	239	2.73
unclassified_Ascomycota	276	3.84	43	0.65	0	0
<i>Truncatella</i>	93	1.29	11	0.17	0	0
unclassified	38	0.53	79	1.19	13	0.15
<i>Exophiala</i>	22	0.31	14	0.21	22	0.25
<i>Capronia</i>	13	0.18	46	0.69	1	0.01
<i>Lecythophora</i>	12	0.17	0	0	0	0
<i>Trichoderma</i>	12	0.17	0	0	4	0.05
<i>Talaromyces</i>	12	0.17	4	0.06	41	0.47
<i>Dactylaria</i>	10	0.14	0	0	0	0
<i>Hypocrea</i>	10	0.14	0	0	0	0
<i>Flagelloscypha</i>	8	0.11	23	0.35	0	0
<i>Cadophora</i>	7	0.1	4	0.06	1	0.01
unclassified_Leotiomyces	7	0.1	0	0	0	0
unclassified_Sordariales	3	0.04	0	0	0	0
<i>Botryotinia</i>	3	0.04	0	0	37	0.42
<i>Clavulinopsis</i>	2	0.03	0	0	0	0
<i>Acicuseptoria</i>	2	0.03	1	0.02	0	0
unclassified_Magnaporthaceae	2	0.03	1	0.02	1	0.01
<i>Bisporella</i>	1	0.01	0	0	0	0
<i>Eucasphaeria</i>	1	0.01	0	0	0	0
<i>Blumeria</i>	1	0.01	0	0	0	0
unclassified_Helotiales	1	0.01	2	0.03	5	0.06
<i>Mrakia</i>	1	0.01	0	0	0	0
<i>Paraleptosphaeria</i>	1	0.01	0	0	0	0
<i>Bjerkandera</i>	1	0.01	0	0	0	0
unclassified_Ceratobasidiaceae	1	0.01	5	0.08	0	0
unclassified_Dothideomycetes	1	0.01	35	0.53	0	0
unclassified_Sebacinaceae	0	0	129	1.95	7 006	80.14
<i>Aspergillus</i>	0	0	81	1.22	16	0.18
unclassified_Auriculariales	0	0	9	0.14	0	0
<i>Seimatosporium</i>	0	0	8	0.12	0	0
<i>Cladophialophora</i>	0	0	4	0.06	4	0.05
<i>Golovinomyces</i>	0	0	4	0.06	0	0
<i>Selenophoma</i>	0	0	4	0.06	1	0.01
<i>Strelitziana</i>	0	0	4	0.06	0	0
<i>Zygosaccharomyces</i>	0	0	3	0.05	2	0.02
unclassified_Tremellomycetes	0	0	3	0.05	0	0
unclassified_Trechisporales	0	0	2	0.03	0	0
unclassified_Chaetothyriales	0	0	2	0.03	13	0.15
unclassified_Xylariales	0	0	2	0.03	0	0
<i>Malassezia</i>	0	0	2	0.03	0	0
<i>Inonotus</i>	0	0	1	0.02	0	0
<i>Geomyces</i>	0	0	0	0	16	0.18
<i>Russula</i>	0	0	0	0	11	0.13
<i>Lopharia</i>	0	0	0	0	8	0.09
<i>Cryptosporiopsis</i>	0	0	0	0	5	0.06
unclassified_Basidiomycota	0	0	0	0	2	0.02
<i>Aureobasidium</i>	0	0	0	0	2	0.02
<i>Penicillium</i>	0	0	0	0	1	0.01
<i>Podosphaera</i>	0	0	0	0	1	0.01
unclassified_Hygrophoraceae	0	0	0	0	1	0.01

菌门占绝对优势分别为 76.08%、72.94%。样品 LD3 中担子菌门占绝对优势为 80.39%。在属水平上进行分析,除去未鉴定出的真菌群落,所示样品中,见图 2。排名前 3 的优势属真菌(所占比例之和超过全部的 60%) LD1 为 *Tetracladium*, *Hymenoscyphus*, *Pseudogymnoascus* (35.49%, 19.45%, 14.33%)。样品 LD2 中优势属真菌为 *Tetracladium*, *unclassified_Sebacinaceae*, *Aspergillus* (68.55%, 1.95%, 1.22%)。样品 LD3 中优势属真菌为 *unclassified_Sebacinaceae*, *Tetracladium*, *Pseudogymnoascus* (80.14%, 12.96%, 2.73%)。3 个样品 LD1, LD2, LD3 中共同的优势属真菌为 *Tetracladium* 属,所占比例分别为 35.49%, 68.55%, 12.96% ($\bar{x} = 36.47\%$)。

2.5 α 多样性

3 个样品 Alpha 多样性分析指数见表 2。样品的香浓多样性指数在 1.75 ~ 2.92, 辛普森指数在 0.11 ~ 0.32。其中样品 LD3 的辛普森指数高于样品 LD1, LD2。样品 LD1, LD2 的香浓多样性指数高于样品 LD3, 各样品测序文库的覆盖率均达到 98% 以上。

3 讨论

3.1 青海野生桃儿七内生真菌群落组成及多样性

目前,高通量测序技术研究宿主植物和环境内生真菌的群落结构及多样性趋势,呈现逐渐上升的势头^[6]。本研究 OTUs 聚类多样性研究结果与前人的研究结果类似^[6-8],例如通过 454 测序仪高通量测序研究夏威夷地区的铁心木叶内生真菌,不同生长环境类型下的大果砾叶内生真菌及美国西海岸不同品系和生长类型的杜鹃属叶内生真菌,结果显示,分别获得 OTUs 单元 4 253, 689, 488 个。本研究通过应用 Illumina Miseq 2 × 300 测序平台共发现 OTUs 单元 517 个,表明青海上北山林场的野生桃儿七根内具有较高的真菌 OTU 丰度。

一般认为不同气候区域内的宿主植物内生真菌群落多样性存在差异。如 Arnold A E 等^[16]认为热带地区的宿主植物内生真菌的丰富度及系统发育多样性均高于温带和寒带地区。但 Zimmerman N B 等^[6]对夏威夷处于不同海拔高度(100 ~ 2 400 m)同一宿主植物铁心木内生真菌 454 测序研究,结果表明低海拔地区与高海拔地区的内生真菌多样性并没有显著差异。李海燕等^[17]通过对云南白马雪山 5 种优势种植物内生真菌进行研究,得出内生真菌的

香浓多样性指数在 1.25 ~ 2.70,表明在高海拔严寒地区植物内生真菌同样具有较高的多样性分布。青海上北山林场位于青藏高原东北部,属于高海拔、高辐射、年均温较低的高寒地区。研究结果显示,桃儿七根内生真菌的香浓指数在 1.75 ~ 2.92,与上述研究结果相类似,表明位于高海拔高寒地区的桃儿七植物内同样含有较高的内生真菌多样性丰度。有研究表明,传统的纯培养方法分离出的真菌类群低估了内生真菌群落的多样性^[12]。本研究通过免培养高通量测序技术手段共获得 OTUs 单元 517 个,全部真菌可归类为 13 纲、35 目、44 科、55 属。前人通过传统的培养基分离方法对桃儿七内生真菌的群落组成进行研究,取得了一定的结果,但分离到的真菌群落多样性普遍较低,如毕江涛等^[9]对宁夏泾源县境内的野生桃儿七内生真菌纯培养分离,共得到可培养真菌 49 株,归属于 2 目、3 科、9 属。张琨等^[10]对陕西太白山境内的野生桃儿七内生真菌分离培养,获得内生真菌 26 株归属于 2 目、3 属。李海燕等^[11]对云南中甸地区的野生桃儿七内生真菌分离培养,获得菌株 28 株可归属为 5 目、6 科、9 属。据目前所知,全部区域隶属于青藏高原的青海地区野生桃儿七内生真菌纯培养分离研究虽然未见相关报道,但本研究应用免培养高通量测序技术手段所得结果与前人纯培养分离其他地域的桃儿七内生真菌结果相比,免培养高通量测序技术得出的内生真菌类群无论种属和数量均远高于纯培养研究模式。这表明应用纯培养分离模式研究植物内生真菌的群落组成确实具有一定的局限性,桃儿七根内蕴含着丰富的内生真菌资源可供开发利用,免培养高通量测序手段对于研究植物内生真菌的群落结构组成具有显著的优势。

3.2 优势属内生真菌生态学功能探讨

在属水平上,所有的真菌类群可以被分成 4 大类:3 个样品中均出现、只在 2 个样品中出现、只出现在 1 个样品中及未鉴定出的类群。由表 1 可知,3 个样品中所有真菌可被划分为 55 个类群。其中 3 个样品中均出现的有 8 个属,丰度为 45.7%,只在两个样品中出现的有 14 个属,丰度为 30.6%,只出现在一个样品中的有 31 个属,丰度为 7.0% (其中 *Hymenoscyphus* 属真菌只出现在样品 LD1 中,单个样品中丰度 19.45%,占总体丰度 6.45%,另外 30 个属,总体丰度为 0.55%),未鉴别出的有 2 个属,丰

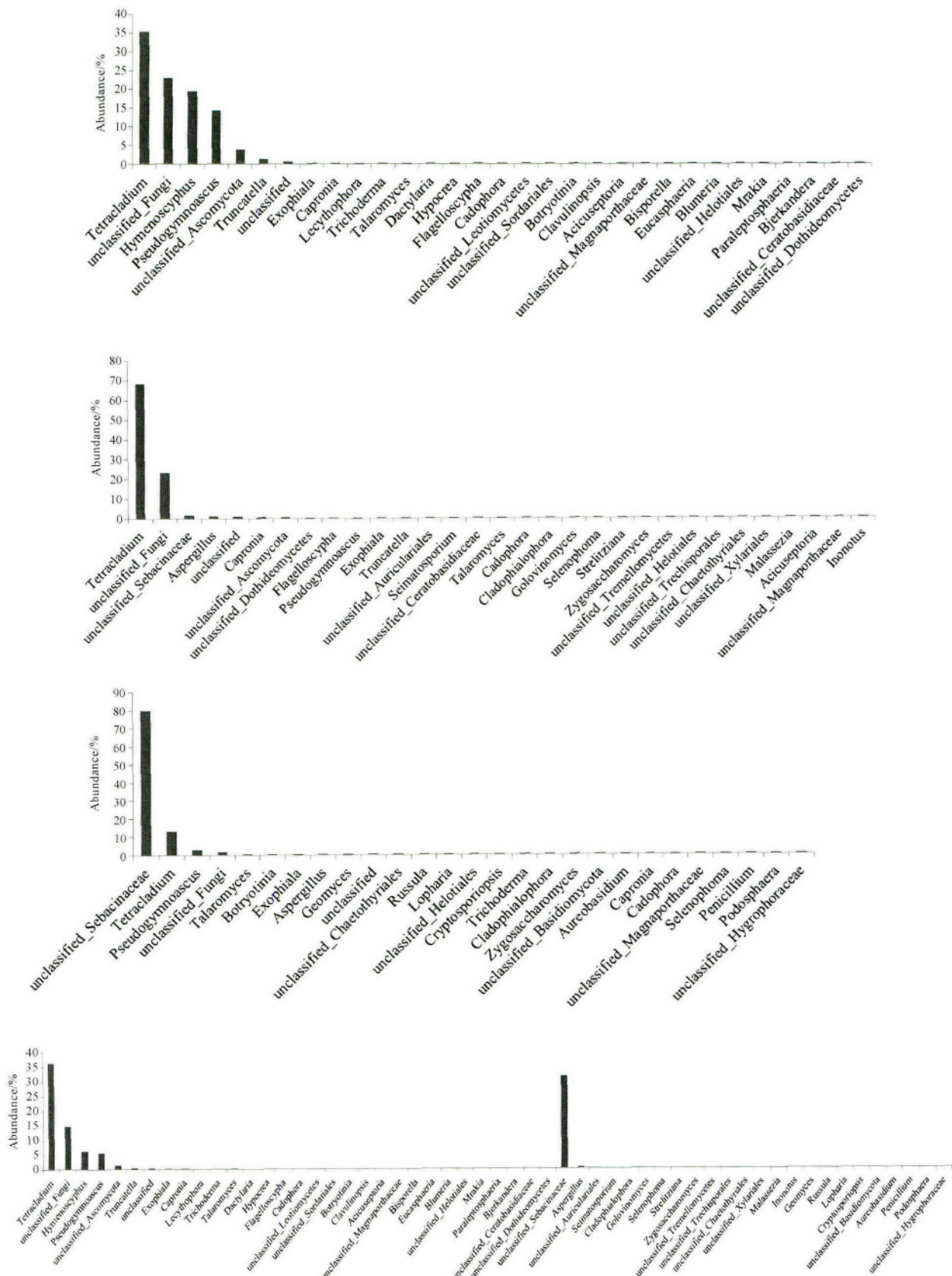


图2 各属真菌在各样品及采样地中的分布

Fig. 2 The barplot of endophytic fungi genus in the samples and sample plot

表 2 各样品的 α 多样性

Table 2 Alpha diversity index of all samples

样品名称	序列数目	OTU 数目	Shannon 指数	ACE 指数	Chao1 指数	Coverage 指数	Simpson 指数
LD1	7 194	305	2.92	731.47	508.18	0.98	0.11
LD2	6 629	253	2.78	398.93	399.22	0.98	0.18
LD3	8 742	138	1.75	338.45	250.00	0.99	0.32

度为 16.7%。研究结果显示,在所有样品中均出现的 8 个属真菌类群却贡献了样品中接近一半的丰度值(45.7%)。前人研究表明,宿主植物能够显著影响内生菌的群落结构^[18-19]。宿主植物通过组织内的微环境与内生真菌发生相互作用,其能够通过分泌合成一些代谢产物来间接调控内生真菌的群落组成。同样,内生真菌群落中各真菌共处于同一生态位空间中,其相互竞争也是导致群落结构发生变化的内在因素^[20]。本研究结果显示,8 个优势属真菌占据群落中将近一半的丰度值,这种群落结构组成必然是真菌群落与宿主植物相互作用及菌群间相互竞争的结果,丰度值较大的优势种真菌可能在与宿主植物相互作用中扮演者重要的角色。只存在于一个样品中的 30 个稀有种真菌(0.55%)可能是偶然定殖到宿主植物体内的伴生种,它们的定殖可能具有一定的随机性。

本研究 3 个样品中共同的优势属真菌为 *Tetracladium*。*Tetracladium* 属真菌的记录多以水生丝孢菌居多^[21-22],大多来源分离自水中的凋落叶及泡沫中,具有分解凋落物的功能^[23]。也有一些学者从不同的宿主植物根部纯培养分离到 *Tetracladium* 属的内生真菌类群^[23-26]。如 Nemeč 等^[24]首次从草莓属的根部分离到一株 *Tetracladium* 属内生真菌 *T. marchalianum*。Watanabe T 等^[25]也从龙胆属植物和草莓属植物的根部分离到 *Tetracladium* 属的内生真菌新种 *T. setigerum*。此后, Sati S C 等^[23, 26]陆续从不同的宿主植物根部分离到 *Tetracladium* 属的内生真菌。本研究通过高通量测序首次在桃儿七根部检测到 *Tetracladium* 属内生真菌,并且是作为优势属类群存在。目前关于此类内生真菌定殖在宿主植物内发挥的生态学功能尚不清楚。桃儿七生境喜阴,多分布在溪边沟渠的林下或稀疏灌木中,林下枯枝凋落物丰富,土壤水分含量大。有学者认为植物根部可能充当一个 *Tetracladium* 属真菌季节性周转的容器,当叶等凋落物不宜被分解利用时发挥降解功

能^[27]。本研究的采样时间为 9 月初,此时采样地包括桃儿七在内的各植物物种均处于生长末期,枝叶即将枯落。因此桃儿七根部可能季节性存储了此类具有降解功能的内生真菌类群,土壤微生物分解凋落物不力时,菌体进入环境分解腐殖质供次年生长循环利用,关于此点推论若条件允许将对桃儿七根内菌群的季节动态加以研究验证。

此外,研究中还发现了一些常见的内生真菌类群。如青霉属、木霉属、曲霉属等均为常见的内生真菌类群,曾被报道为不同环境群落中的优势属内生真菌^[17]。油瓶霉属、外瓶霉属、短梗霉属、肉座菌属、*Cadophora* sp. 真菌以及一些粪壳菌目、柔膜菌目、炭角菌目、锤舌菌纲、座囊菌纲的真菌也作为不同地区不同宿主的内生真菌被广泛报道^[20, 28-33]。研究中还发现一些可能是作为植物病原菌的一些真菌类群如白粉菌属和高氏白粉菌属等,这些类群真菌可能为桃儿七的病原性真菌被检测出来。值得注意的是,截盘多毛孢属真菌在应用纯培养分离时也被分离培养出来,对其初步的研究表明,其能够合成宿主桃儿七根部提取物抗肿瘤药物鬼臼毒素类化合物。

[参考文献]

- [1] 杨永昌. 藏药志[M]. 青海: 青海人民出版社, 1991: 319.
- [2] 李艳玲, 宁祎, 徐文华, 等. 桃儿七不同部位 2 种木脂素含量的动态研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1837.
- [3] Stone J K, Bacon C E, White J F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. Microbial endophytes[M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 3.
- [4] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148.
- [5] Schuster S C. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. Nat Methods, 2008, 5(1): 16.
- [6] Zimmerman N B, Vitousek P M. Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109: 13022.
- [7] Jumpponen A, Jones K L. Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere[J]. New Phytol, 2009, 184: 438.
- [8] Nathaniel L Raizen. Fungal endophyte diversity in foliage of

- native and cultivated *Rhododendron* species determined by culturing, ITS sequencing, and pyrosequencing [D]. Corvallis: Oregon State University, 2013.
- [9] 毕江涛, 何萍, 吕雯, 等. 桃儿七内生真菌分离及其抑菌活性初步研究 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1667.
- [10] 张琨, 黄建新, 曹莉, 等. 桃儿七内生菌及产鬼臼类物质菌株的筛选 [J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2008, 38(3): 431.
- [11] 李海燕, 曾松仁, 张玲琪. 云南桃儿七植株地下茎内生真菌多样性及有价值菌株的筛选 [J]. 西南农业学报, 1999, 12(4): 123.
- [12] Arnold A E, Henk D A, Eells R L, et al. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR [J]. *Mycologia*, 2007, 99: 185.
- [13] S C Puri, Asiya Nazir, Raman Chawla, et al. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralinlignans [J]. *J Biotechnol*, 2006, 122: 494.
- [14] Kendall J Martin, Paul T Rygielwicz. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts [J]. *BMC Microbiol*, 2005, 5: 28.
- [15] Satoshi Yamamoto I, Hirotohi Sato I, Akifumi S Tanabe, et al. Spatial segregation and aggregation of ectomycorrhizal and root-endophytic fungi in the seedlings of two *Quercus* species [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e96363.
- [16] Arnold A E, Maynard Z, Gilbert G S, et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? [J]. *Ecol Lett*, 2000, 3: 267.
- [17] Li H Y, Shen M, Zhou Z P, et al. Diversity and cold adaptation of endophytic fungi from five dominant plant species collected from the Baima Snow Mountain, Southwest China [J]. *Fungal Divers*, 2012, 54(1): 79.
- [18] Sun J Q, Guo L D, Zang W, et al. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants [J]. *Sci China Ser C*, 2008, 51: 751.
- [19] Sun X, Ding Q, Guo L D, et al. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest [J]. *Fungal Ecol*, 2012, 5: 624.
- [20] Flor N, Roberto A, Zoila R, et al. Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew) [J]. *Fungal Divers*, 2011, 47: 65.
- [21] R C Sinclair, A Eicker. *Tetracladium apiense*, a new aquatic species from South Africa [J]. *Br Mycol Soc*, 1981, 76(3): 515.
- [22] 余永年, 李金亮, 余锦勤. 四川水生丝孢菌 [J]. *真菌学报*, 1988, 7(3): 138.
- [23] S C Sati, P Arya, M Belwal. *Tetracladium nainitalense* sp. nov. a root endophyte from Kumaun Himalaya, India [J]. *Mycologia*, 2009, 101(5): 692.
- [24] Nemeč S. Sporulation and identification of fungi isolated from root rot diseased strawberry plants [J]. *Phytopathology*, 1969, 59: 1552.
- [25] Watanabe T. *Tetracladium setigerum*, an aquatic hyphomycetes associated with gentian and strawberry roots [J]. *Trans Mycol Soc Jpn*, 1975, 16: 348.
- [26] Sati S C, Belwal M. Aquatic hyphomycetes as endophytes of riparian plant roots [J]. *Mycologia*, 2005, 97: 45.
- [27] Fisher P J, Petrini O, Webster J. Aquatic Hyphomycetes and other fungi in living aquatic and terrestrial roots of *Alnus glutinosa* [J]. *Mycol Res*, 1991, 95: 543.
- [28] J D Zijlstra, P V Hof, J Baar, et al. Diversity of symbiotic root endophytes of the *Helotiales* in ericaceous plants and the grass, *Deschampsia flexuosa* [J]. *Mycology*, 2005, 53: 147.
- [29] 王育菁, 王秋红, 陈璐, 等. 龙眼内生菌的分离与脂肪酸鉴定 [J]. *亚热带植物科学*, 2008, 37(4): 22.
- [30] Zhao J, Li C, Wang W, et al. *Hypocrealexii*, novel endophytic fungi producing anticancer agent cajanol, isolated from pigeon pea (*Cajanus cajan* [L.] Millsp.) [J]. *J Appl Microbiol*, 2013, 115(1): 102.
- [31] 邓祖军, 曹理想, Vrijmoed Lilian L P, 等. 红树林植物桐花树内生真菌群落分布的研究 [J]. *热带海洋学报*, 2010, 29(3): 77.
- [32] Giorgio Gnani, Enrico Ercole, Luigi Panno, et al. Dothideomycetes and Leotiomycetes sterile mycelia isolated from the Italian seagrass *Posidonia oceanica* based on rDNA data [J]. *Springer Plus*, 2014, 3: 508.
- [33] R O Khastini, Takashi Ogawara, Yoshinori Sato, et al. Control of *Fusarium wilt* in melon by the fungal endophyte, *Cadophora* sp. [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2014, 139: 339.

[责任编辑 吕冬梅]