

DOI: 10.5846/stxb201912032619

陈梦, 陈敬忠, 刘济明, 武梦瑶, 颜强, 李鹏, 黄路婷, 肖雪峰. 小蓬竹根际土壤微生物及内生真菌多样性分析. 生态学报, 2021, 41(10): 4120-4130.
Chen M, Chen J Z, Liu J M, Wu M Y, Yan Q, Li P, Huang L T, Xiao X F. Diversity analysis of rhizosphere soil fungi and endophytic fungi in *Ampelocalamus luodianensis*. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(10): 4120-4130.

小蓬竹根际土壤微生物及内生真菌多样性分析

陈 梦¹, 陈敬忠¹, 刘济明^{1,*}, 武梦瑶¹, 颜 强², 李 鹏³, 黄路婷¹, 肖雪峰¹

1 贵州大学林学院, 贵阳 550025

2 贵州省社会工业研究所, 贵阳 550025

3 贵州省山地资源研究所, 贵阳 550025

摘要: 为了解喀斯特典型物种-小蓬竹根际土壤微生物及不同部位内生真菌多样性, 采用沿等高线等距离取样法采集小蓬竹根际土壤及健康植株, 通过可培养对根际土壤微生物及内生菌进行分离, 利用分子技术对其进行鉴定, 根据鉴定结果构建系统发育树, 并计算小蓬竹根际土壤微生物和根茎叶内生真菌多样性。结果如下: (1) 共从根际土壤、根、茎、叶分离得到 139 个真菌菌株, 隶属于 27 属, 其中根际土壤分离得到 34 个真菌菌株隶属于 12 属, 根部分离得到的 63 个内生真菌菌株隶属于 17 个属, 茎部分离得到的 14 个内生真菌菌株隶属于 8 个属, 叶部分离得到 28 个内生真菌菌株隶属于 9 个属; (2) 根际土壤共分离得到 41 株细菌菌株, 隶属于 7 个属 26 个种, 20 株放线菌菌株, 隶属于 1 属 15 种; 从 Shannon-Wiener 多样性指数、均匀度指数、Simpson 指数排序来看, 真菌主要表现为根>根际土壤>茎>叶, 细菌和放线菌多样性均较低。 (3) 按层次聚类分析可分别将真菌、细菌、放线菌聚为 3 支。小蓬竹根际土壤、根、茎和叶具有丰富的微生物多样性, 不同部位菌群组成存在差异性 ($P < 0.05$), 且存在以假单胞菌属、芽孢杆菌属等为优势属的抗盐耐旱菌群, 这有助于揭示小蓬竹对喀斯特生境的适应性, 以及为微生物-植物群落之间相互关系提供一定基础数据, 为后期寻找小蓬竹相关耐性功能菌奠定基础。

关键词: 微生物; 多样性; 适应能力; 喀斯特

Diversity analysis of rhizosphere soil fungi and endophytic fungi in *Ampelocalamus luodianensis*

CHEN Meng¹, CHEN Jingzhong¹, LIU Jiming^{1,*}, WU Mengyao¹, YAN Qiang², LI Peng³, HUANG Luting¹, XIAO Xuefeng¹

1 College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, China

2 Guizhou Institute of Social Industry, Guiyang 550025, China

3 Guizhou Institute of Mountain Resources, Guiyang 550025, China

Abstract: To understand the diversity of the rhizosphere soil microbial and endophytic fungi from the typical karst species-*A. luodianensis*, rhizosphere soil and healthy plants were collected through Isometric sampling method, then the soil microbial and endophytic fungi were isolated by culturable cultivation, and identified using the molecular technology. Finally, we constructed a phylogenetic tree, and calculated the diversity index according to the results, which reveal the conclusion: (1) Totally, there are 139 fungal isolates was obtained from rhizosphere soil, root, stem and leaf, belonging to 27 genera. Among them, 34 fungi strains were isolated from rhizosphere soil, belonging to 12 genera; 63 endophytic fungi strains were isolated from the roots, belonging to 17 genera; 14 endophytic fungi strains were isolated from the stems, belonging to 8 genera, 28 endophytic fungi strains were isolated from the leaves, belong to 9 genera. (2) There are 41

基金项目: 贵州省科技计划(黔科合支撑[2019]2774号); 国家自然科学基金(31800335); 贵州省科技计划(黔科合SY[2015]3023)

收稿日期: 2019-12-03; 网络出版日期: 2021-03-28

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: Karst0623@163.com

bacteria strains were isolated from rhizosphere soil, belonging to 7 genera and 26 species totally; 20 actinomycetes strains, belonging to 1 genus and 15 species. According to the order of microorganism diversity index, there was a significant difference in fungal diversity: root > rhizosphere soil > stem > leaf, but it was not significant in the diversity of bacteria and actinomycetes. (3) Fungi, bacteria and actinomycetes were divided into 3 branches by hierarchical cluster analysis. We found that the microbial diversity in rhizosphere soil, root, stem and leaf of *A. luodianensis* was abundant, and there was a significant difference in microbial community composition in different parts ($P < 0.05$), salt-tolerant and drought-tolerant bacteria groups with *pseudomonas* and *bacillus* were the dominant genera here. This study laid a foundation for searching for functional bacteria related to *A. luodianensis*, which would help to reveal the adaptability of *A. luodianensis* to karst habitat and provide some basic data for the relationship between microorganism and plant community.

Key Words: microorganism; diversity; adaptability; karst

自然界中,植物常常与特定微生物(细菌、真菌、放线菌等)生活在一起,形成一个紧密的植物-微生物复合群落^[1]。植物-微生物复合群落对于双方的生存和繁衍都具有重要意义,很多丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)、内生真菌(Endophytic fungi)、细菌(Bacteria)对植物生长发育有着不可忽视的作用^[2-4],能够促进植物对土壤中氮、磷和水分利用等方式来促进植物的生长^[5],同时植物体又能够为这些微生物提供寄宿场所和生长所需的能源^[6-7]。而根际作为自然界各种化学营养物质进入植物根部参与植物生长过程中物质循环的枢纽,承载着土壤、植物根系与微生物之间的相互作用^[8-9],因此对植物根际土壤微生物(细菌、真菌、放线菌)和植物内生真菌多样性进行研究,有助于揭示植物对环境的适应性和植物与微生物的相互关系^[10]。

根际土壤微生物(Rhizospheric soil microbe)在植物根部微生态系统中扮演着重要的角色,既要参与和驱动生态系统中植物体必需的营养元素与物质循环,还要促进土壤中有机质的分解、植物根系对养分的吸收转化和植物的生长发育,进而维持生态系统的健康。根际土壤微生物在特定的生境中会产生特定的“根际效应”来提高植物对外界不利环境的适应性,且在根部进行营养选择和富集,从而提高根际微生物多样性,增强植物在特定环境中的适应性^[11],这种作用对植物在高盐、干旱缺水等极端条件下生长良好有重要作用^[12]。植物内生真菌是指以植物体某一组织为宿主,对植物生长发育和健康有显著影响,通过帮助植物抵抗病虫害提高抗逆性的一类微生物^[13]。研究表明,不同种类的内生真菌由于对养分的需求不同,其生活方式与生存环境也有所不同,所以尽管在同一植株不同部位间内生菌多样性也存在较大的差异,这种差异称之为内生真菌的“组织专一性”^[14]。

小蓬竹 *Ampelocalamus luodianensis* T. P. Yi & R. S. Wang 系禾本科 Poaceae 竹亚科悬竹属 (*Ampelocalamus*) 植物^[15],仅分布于贵州省罗甸、平塘、紫云和长顺等喀斯特山地,是典型的喀斯特物种,常成片生长于海拔 600—1000 m 的石灰岩裸露石山^[16]。虽然小蓬竹分布区域十分狭窄,立地条件较差,但在其主要分布区均生长良好^[17-19]。部分研究表明植物根际土壤微生物(细菌、真菌、放线菌)和内生真菌能够增强宿主植物抗逆性和对土壤肥力利用,进而改善其宿主植物生存状况^[20-21]。小蓬竹在土壤条件较差的喀斯特山地依旧能生长良好,是否与其微生物群落功能具有密切联系,是一个值得探索的问题。结合可培养微生物的优点,本文对小蓬竹根际土壤微生物(细菌、真菌、放线菌)和不同器官(根、茎、叶)内生真菌可培养部分多样性进行研究,有助于了解微生物-植物群落紧密的内在关系,同时一定程度上可揭示小蓬竹对喀斯特特殊生境的适应性机理,同时纯化分离得到的菌株也可为后期寻找小蓬竹相关耐性功能微生物奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

采样点位于贵州省罗甸县董架乡打鸟槽,经纬度为 106°45'17"E、25°30'39"N,属于典型南亚热带季风气

候。日照时数约 1300—1500 h, 年降水量约 1000—1400 mm, 海拔 757 m。土壤为石灰土 (pH 7.68), 主要土壤酶活性分别为: 过氧化氢酶 (8.74 ± 0.01) g/min、蔗糖酶 (2.64 ± 0.03) g/d、脲酶 $0.04 \text{ mg (NH}_3\text{-N)}/\text{g/d}$ (实测值)。

1.2 实验材料

于采样点(罗甸县董架乡)沿等高线按一定距离设置 5 个样方 (5 m × 5 m), 每个样方随机选择 10 株母竹, 将竹丛整丛挖出, 采集健康植株根、茎、叶 3 部分样品 (茎部分混合上中下 3 个部位), 使用抖落法采集附着于根系 2 mm 根际土壤。将各样方采集的 10 株植株分别按根、茎、叶均匀混合, 置于 4 °C 冰盒低温保存及时带回实验室处理。所需培养基为: 25% 双抗 PDA 培养基、PDA 培养基、马丁氏-孟加拉红培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、改良高氏 1 号培养基 (所有培养基均购买自上海博微生物科技有限公司)^[22]。

1.3 微生物的分离培养

1.3.1 根、茎、叶内生真菌的分离

将根、茎、叶用无菌水将表面附着的土壤洗净, 用无菌刀切割成 4 mm × 4 mm 大小的组织块。在无菌操作台内将组织块于 75% 酒精浸泡 1 min 后无菌水冲洗 3 次, 随后用 2.5% 次氯酸钠溶液消毒 1 min 后再放入 75% 酒精浸泡 30 s, 使用去离子无菌水冲洗 5 次后无菌滤纸擦干。将组织块两端削后接种在 25% 双抗 PDA 培养基, 在优化后的每个平板上的 6 个琼脂块各接 1 个组织块, 每个处理 10 个重复, 然后置于 26 °C 的生化培养箱内恒温培养 (采用组织印迹法、漂洗液涂布法及空白对照法检测操作环境和组织表面是否消毒干净, 保证分离到的为“内生菌”)^[22-24]。随时观察组织切口是否有菌丝长出, 待菌丝长出后及时转接至 PDA 培养基, 纯化 2—3 次后获得单一菌株^[20-21]。

1.3.2 土壤真菌、细菌、放线菌的分离

使用稀释平板涂抹法, 取 10 g 新鲜土样转入 90 mL 无菌水中, 在摇床上振荡 30 min 充分混匀 (200.0 rpm, 25 °C)。使用移液枪吸取混匀后的土样溶液 1 mL, 转入装有 9 mL 无菌水的试管中, 获得浓度为 10^{-2} 的稀释土样。(1) 真菌: 使用孟加拉红培养基 (加 100 U/mL 青霉素和庆大霉素 160 U/mL 抑制细菌生长), 置于生化培养箱 28 °C 培养 5 d, 每日观察菌落生长情况, 一旦发现菌丝长出立即挑取单菌落边缘菌丝接种至新的 PDA 培养基, 重复 2—3 次直至获得单一菌株。(2) 细菌: 使用牛肉膏蛋白胨培养基, 置于生化培养箱 37 °C 培养 2—7 d, 待菌落长出后立即挑取形态、颜色、质地等不同的单菌落划线于新的平板培养直至获得纯菌株。(3) 放线菌: 使用改良高氏 1 号培养基, 置于生化培养箱 28 °C 培养 7 d; 纯化方法同真菌, 所有处理在纯化 2—3 次后获得单一菌株^[25-26]。

1.4 菌种鉴定

使用 Ezup 柱式 (离心柱型, 50 PREPS) 真菌和细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (生物工程 (上海) 股份有限公司) 提取 DNA, 使用 DNA 纯化试剂盒 Kit Ver.2.0 (TaKaRa) 进行纯化, 用 1% 琼脂糖凝胶 (其中含有 0.5 mg/L 溴化乙锭) 电泳检测 DNA 的质量。PCR 扩增引物和程序如下:

(1) 真菌: 通用引物。序列为: ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'), ITS4-R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[27]。

表 1 真菌扩增体系 (50 μL)

Table 1 fungal amplification system (50 μL)

试剂 Reagent	体积 Volume/μL	试剂 Reagent	体积 Volume/μL
PCR 缓冲液 Taq PCR Master Mix	25	DNA 模板 DNA template	1
上游引物 ITS1	2	双蒸水 Nuclease-free ddH ₂ O	20
下游引物 ITS4	2		

扩增程序: 94 °C 预变性 2 min 后进行 34 个循环, 每个循环包括 94 °C 变性 1 min, 51 °C 退火 1 min, 72 °C 延

伸 1 min,循环结束后 72 °C 延伸 8 min,4 °C 保存。

(2) 细菌、放线菌:通用引物。Bact-F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'), Bact-R (5'-CTACGGCTACCTT GTTALGA-3')^[28]。

表 2 细菌、放线菌扩增体系(50 μL)

Table 2 Amplification system of bacteria and actinomycetes (50 μL)

试剂 Reagent	体积 Volume/μL	试剂 Reagent	体积 Volume/μL
PCR 缓冲液 Taq PCR Master Mix	25	DNA 模板 DNA template	1
上游引物 27F	2	双蒸水 Nuclease-free ddH ₂ O	20
下游引物 1495R	2		

扩增程序:94 °C 预变性 3 min 后进行 30 个循环,每个循环包括 94 °C 变性 3 min,51 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,循环结束后 72 °C 延伸 5 min,4 °C 保存。

扩增产物由英潍捷基(上海)贸易有限公司(Invitrogen)采用 ABI 3730xl 测序,最后登陆 NCBI GenBank 通过 BLAST 比对测序结果,下载最相近的菌株序列(相似性大于 97%),结合分子生物学证据鉴定菌株种类^[25-26]。

1.5 数据处理

(1) 真菌、细菌、放线菌多样性:利用 Shannon-Wiener 多样性指数(H)、均匀度指数(E)、Simpson 指数(D) 评价小蓬竹微生物多样性,计算公式如下^[29]:

$$H = \sum (P_i \ln P_i) \quad (P_i \text{ 为第 } i \text{ 种菌株数占全部菌株数的百分比})$$

$$D = 1 - \sum (P_i)^2 \quad (P_i \text{ 为第 } i \text{ 种菌株数占全部菌株数的百分比})$$

$$E = H / \ln(S) \quad (H \text{ 为 Shannon-Wiener 指数, } S \text{ 为物种总数目})$$

$$\text{相对多度}(\%) = \frac{\text{某属菌株多度}}{\text{所有属菌株多度}} \times 100 (\geq 10\% \text{ 视为优势属})$$

(2) 系统发育树的构建:利用 Clustal X 2.0 软件对下载的菌株序列进行匹配排列,用 MEGA 6(邻接法)和 Figtree 软件进行系统发育树的构建与美化^[29]。

(3) 采用 Origin 2018 对真菌、细菌、放线菌进行层次聚类分析和绘图工作。

2 结果与分析

2.1 根际土壤微生物及不同器官内生真菌的组成

从小蓬竹根际土壤和根茎叶分离得到具有明显形态差异的菌株 200 株,组成情况如下(图 1):(1) 土壤真菌与内生真菌菌株共 139 株,通过 rDNA-ITS 序列比对归属 27 属 54 种。根部分离得到的 63 个内生真菌菌株可归到 17 个属,优势属为漆斑菌属 *Myrothecium* (12.70%)、镰刀菌属 *Fusarium* (12.70%)、稻镰状瓶霉属 *Harpophora* (11.11%)。茎分离得到的 14 个内生真菌菌株可归到 8 个属,优势属依次为弯孢聚壳属 *Eutypella* (14.29%)、肉座菌属 *Hypcrea* (14.29%)、拟茎点霉属 *mitosporic* (14.29%)、脉孢菌属 *Neurospora* (14.29%)、刺盘孢属 *mitosporic* (14.29%)、半壳霉属 *Rhytismataceae* (14.29%)。叶分离得到的 28 个内生真菌菌株可归到 9 个属,优势属节菱孢霉属 *Arthrinium* (28.57%)、炭角菌属 *Xylaria* (21.42%)、毛壳菌属 *Chaetomium* (10.71%)。根际土分离得到的 34 个内生真菌菌株可归到 12 个属,优势属依次为青霉菌属 *Penicillium* (20.59%)、曲霉属 *Aspergillus* (17.64%)、木霉属 *Trichoderma* (14.40%)、踝节菌属 *Talaromyce* (11.76%)、漆斑菌属 *Myrothecium* (11.76%);(2) 从根际土壤中分离得到 41 株细菌菌株可归到 7 个属,其中优势属为芽孢杆菌属 *Bacillus* (70.73%);(3) 从根际土壤中分离得到的 20 株放线菌菌株全部归属于链霉菌属 *Streptomyces*。

2.2 根际土壤微生物及不同器官内生真菌的系统发育关系分析

(1) 真菌(图 2):小蓬竹根、茎、叶、根际土壤总共分离得到 139 个真菌菌株均属于子囊菌门。其中

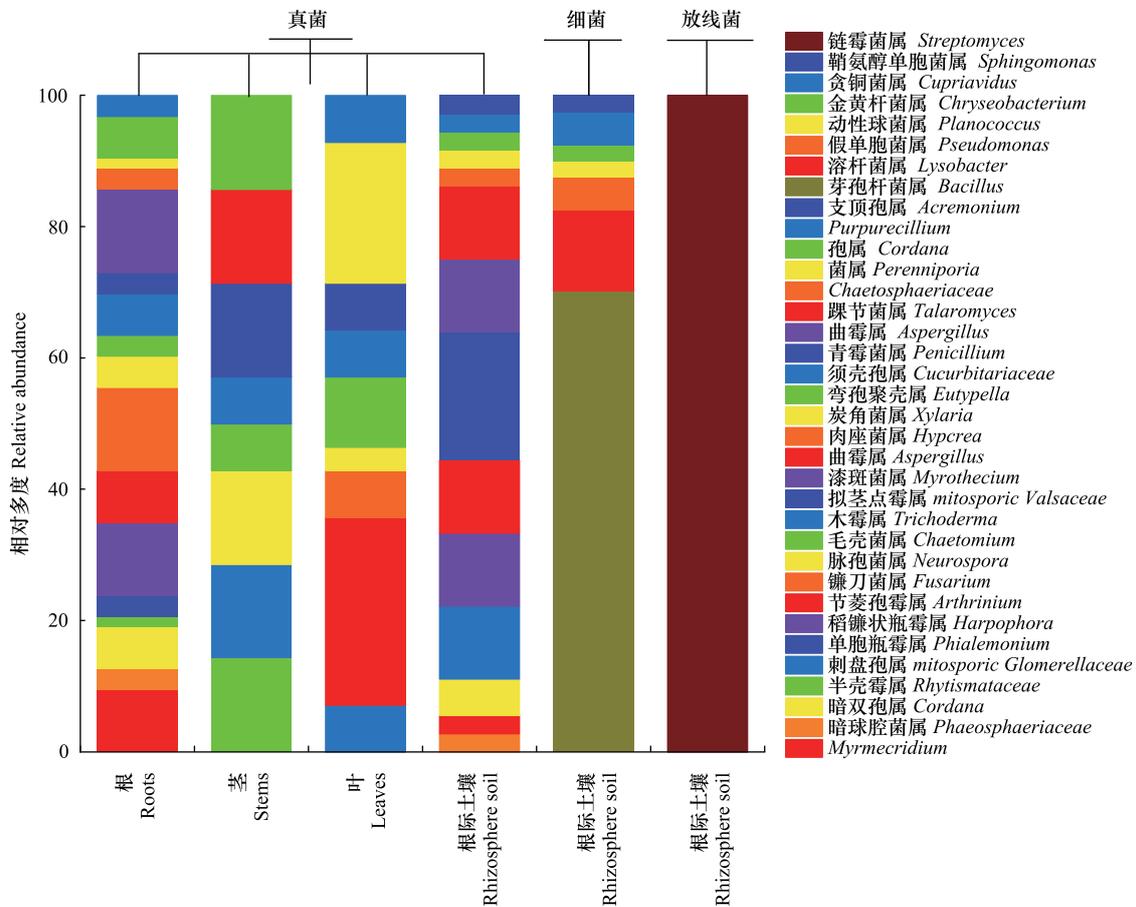


图 1 小蓬竹根际土壤微生物及不同器官内生真菌相对多度

Fig.1 Relative abundance of rhizosphere soil microorganism and endophytic fungi in different organs of *A. luodianensis*

Trichoderma velutinum(EF596953.1)与 *Trichoderma spirale*(KM011996.1)、*Fusarium* sp. WF150(HQ130706.1)和 *Fusarium redolens* (EF495234.1)、*Fusarium* sp. LMG201 (KJ598872.1)和 *Fusarium* sp. C_1_BESC_294z (KC007281.1)、*Hypocrea nigricans*(JN943369)和 *Hypocrea rufa* 1(KC01245.1)、*Fusarium* sp. LMG20(KJ598872)和 *Fusarium* sp. WF150(HQ130706)的支持率均达到 100%,说明上述类群亲缘关系较近。其余各个类群间支持率从 4%到 99%不等,亲缘关系依次从远到近。在分类水平上来看,粪壳菌纲 Sordariomycetes 处于绝对优势纲,占菌株总数的 76.08%,其余占比分别为散囊菌纲 Eurotiomycetes 5.18%,座囊菌纲 Dothideomycetes 3.62%、丝孢菌纲 Hyphomycetes 2.17%、锤舌菌纲 Leotiomycetes 1.4%、Agaricomycetes 伞菌纲 0.74%;(2)细菌(图 3):从根际土壤中分离得到 40 细菌菌株分别归属于厚壁菌门 Firmicutes(29 株)、变形菌门 Proteobacteria(11 株)、拟杆菌门 Bacteroidetes(1 株)。其中变形菌门中的 *Pseudomonas monteilii* 和 *Pseudomonas* sp. JSPB3, *Lysobacter* sp. R7-567 和 *Lysobacter* sp. BBCT65 支持率菌达到了 100%,说明上述两者间亲缘关系较近。其余支持率从 21%—99%不等;(3)放线菌(图 4):从根际土壤中分离得到的 20 株菌株均属于链霉菌属 *Streptomyces*,分属于 15 个种。支持率从 7%—99%不等。

2.3 根际土壤微生物及不同器官内生真菌多样性分析

由图 3 可知,真菌多样性指数中:Shannon-Wiener 多样性指数 *H* 依次为根 2.652>根际土 2.18>茎 2.045>叶 1.989,Simpson 指数 *D* 依次为根 0.919>根际土 0.932>茎 0.867>叶 0.834,均匀度指数 *E* 依次为根际土 0.89>茎 0.775>根 0.640>叶 0.597。从多样性的排序可以看出在 Shannon-Wiener 多样性指数 *H* 与 Simpson 指数 *D* 中最高的为根,最低的为叶,而在均匀度指数 *E* 中最高的为根际土,最低的为叶。从几个多样性指数的计算

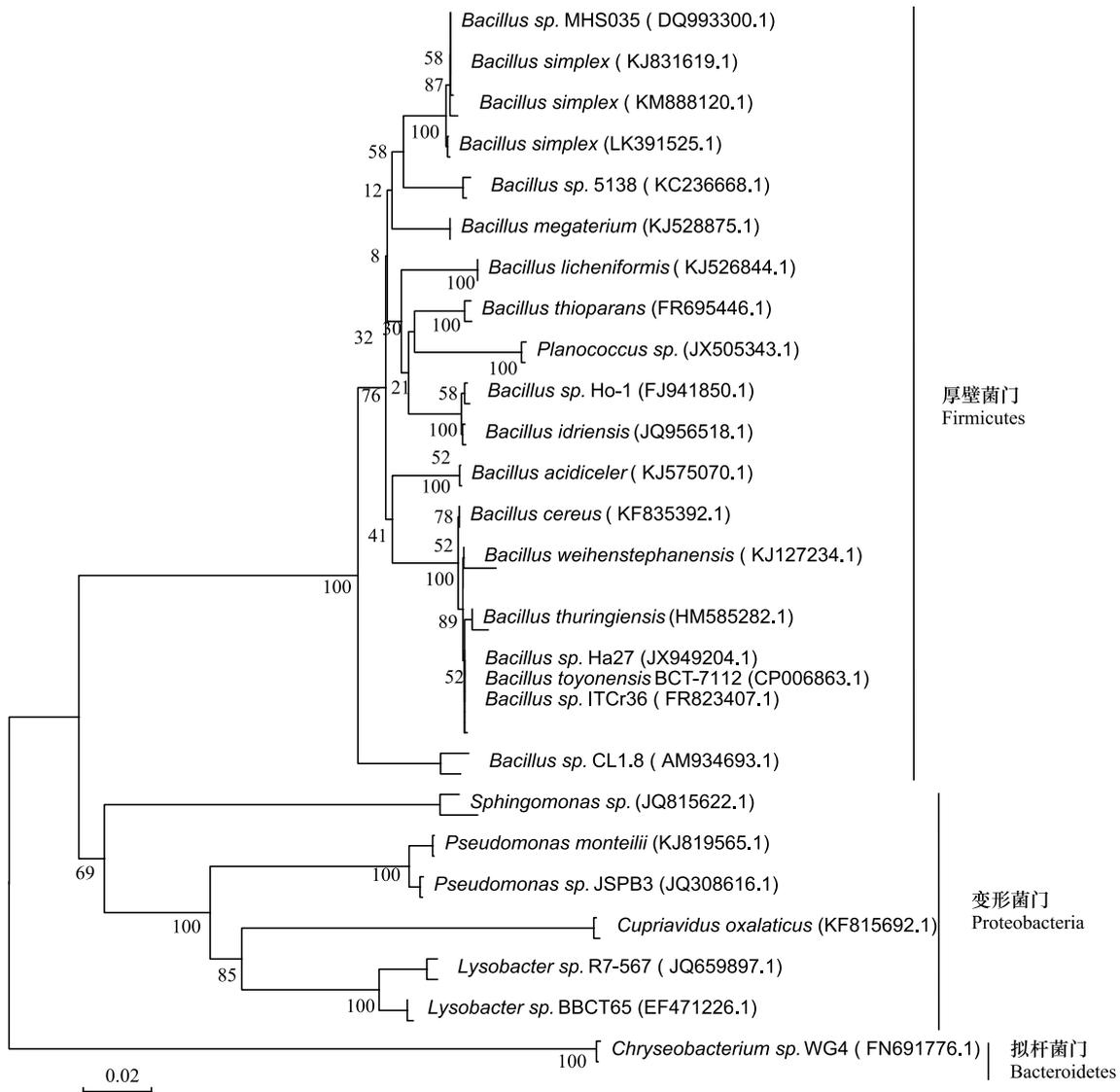


图3 小蓬竹细菌系统发育树

Fig.3 Bacteria phylogenetic tree of *A. luodianensis*

3 讨论

物种多样性指数是衡量物种数量的重要指标,通常在群落中物种越丰富,分布比例越均匀则物种群落的多样性指数越高^[30]。从小蓬竹根际土壤及不同器官微生物物种多样性指数(图2—图4)来看:根和根际土的真菌多样性指数最高,物种丰富度从下(根,根际土)到上(茎、叶)呈现出逐步降低的趋势,这在刺槐 *Robinia pseudoacacia*、重楼 *Paris polyphylla var. chinensis* 等植物中也观察到类似的现象^[31-32]。根际土壤细菌和放线菌物种多样性相对较低,相关研究者认为可能是真菌群落受到土壤中 N、P、K 等元素影响造成^[33]。小蓬竹根际土壤与根部内生真菌多样性较高原因可能是由于在根与土壤接触界面具有较多凋落物残体(凋落的叶、枝条、死根)以及根际分泌物能够为根际和根部真菌分解利用提供充足碳源和可利用元素,进而促进其丰富度的提高^[30]。

从根际土和植株不同部位微生物组成来看,真菌类群中的脉孢菌属 *Neurospora*、木霉属 *Trichoderma* 在根际土、根、茎、叶内均有分布,其中木霉属被认为是具有重寄生(fungal parasite)功能的生防菌^[31],对许多植物

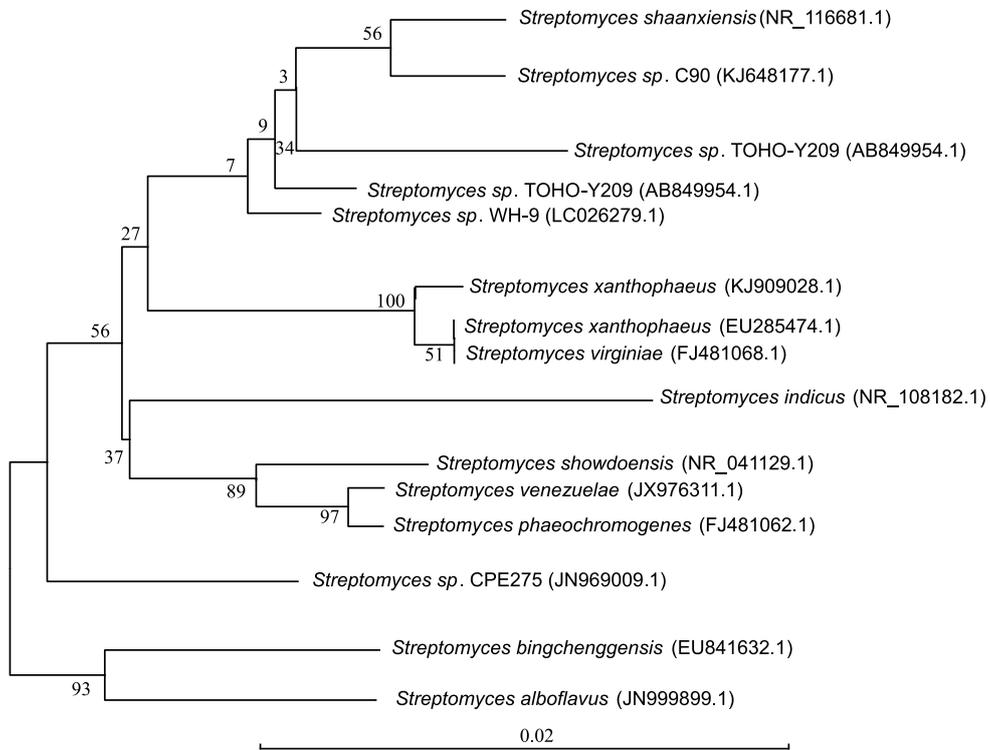


图 4 小蓬竹放线菌系统发育树

Fig.4 Actinomycetes phylogenetic tree of *A. luodianensis*

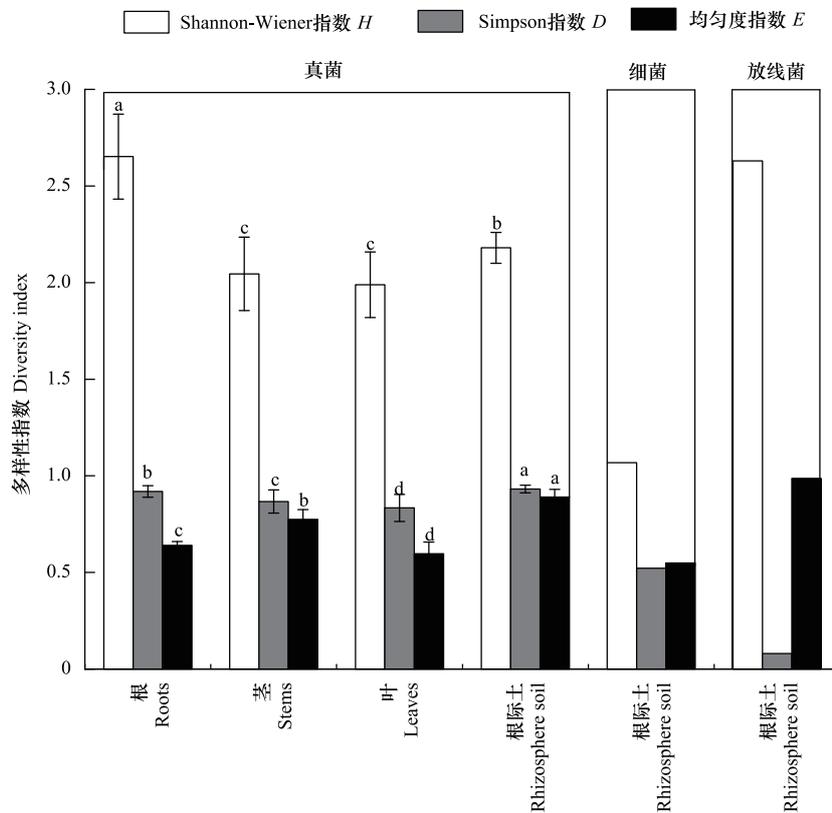


图 5 小蓬竹根际土壤微生物及不同器官内生真菌多样性指数

Fig.5 Diversity index of rhizosphere soil microorganism and endophytic fungi in different organs of *A. luodianensis*

图中不同小写字母表示不同部位真菌同一多样性指数间的差异显著 ($P < 0.05$), 数据为平均值 \pm 标准差 ($n = 3$)

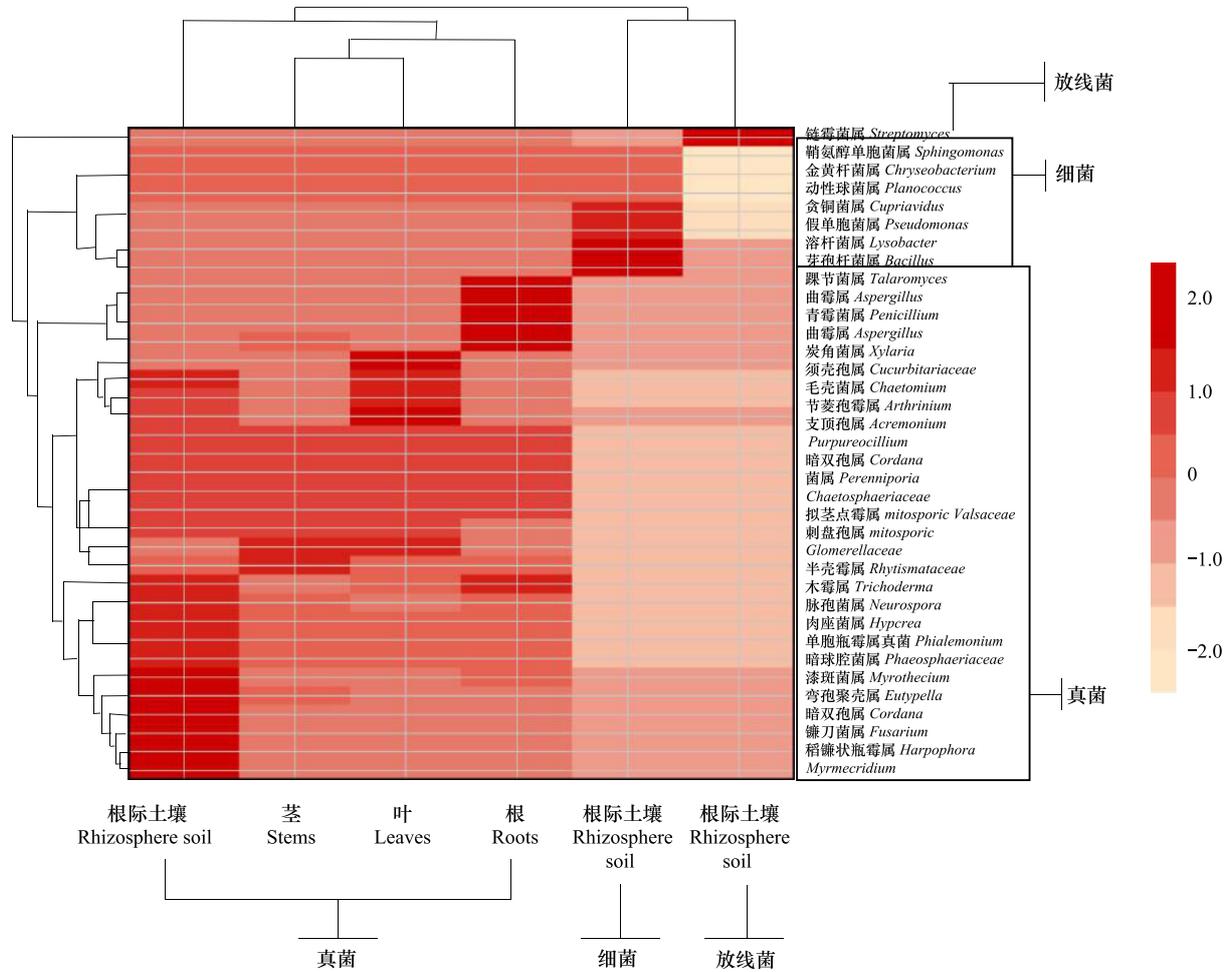


图 6 小蓬竹根际土壤微生物与各个器官内生聚类分析结果

Fig.6 Cluster analysis of rhizosphere soil microorganism and endophytic fungi in different organs of *A. luodianensis*

病原菌都具有一定的拮抗作用^[9,34],这对小蓬竹抵抗喀斯特地区不良环境具有重要意义;同时在小蓬竹根际土和根存在节菱孢霉属 *Arthrinium* 和漆斑菌属 *Myrothecium* 两个共有属,并且在根际土壤与根中均分离得到菌种 *Myrothecium verrucaria*。土壤微生物类群中,普遍存在着的一类与植物共同进化并建立良好的共生关系促进植物生长发育的细菌群落(PEGR),诸如假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)等^[35],这类细菌不仅可以诱导植物体自身产生抗生素抵御生物胁迫,而且还会通过产生激素和酶等信号分子,增强植株系统耐受性,同时促进植物对土壤中矿质营养元素的吸收,进而促进植物的生长^[36-37]。小蓬竹根际土壤微生物与内生菌丰富的多样性为其塑造了多样的植物功能性状,为其在喀斯特地区生长良好提供了必要的条件。

根际及内生菌能够促进植物营养元素的摄取^[7],同时对植物次生代谢产物积累与产生具有重要影响^[38-39],反之植物根系分泌产物又影响根际及内生菌的生长繁殖^[2],根际土壤真菌及植物内生真菌的这些特性可以有效促进喀斯特地区植物在贫瘠土壤条件下对肥力资源的利用^[38-41];刘雯雯等^[34]发现在喀斯特灌木演替阶段,土壤真菌的优势属为木霉属、青霉属等,而作为竹灌的小蓬竹在根际土壤真菌优势属组成与上述结果具有较大的相似性。同样小蓬竹内生真菌中的青霉属 *Penicillium* 镰刀菌属 *Fusarium* 等菌属在植物耐受喀斯特地区钙胁迫和抵御病原菌侵染方面具有重要作用^[40-43]。根际土壤细菌类群中的芽孢杆菌属 *Bacillus*、贪铜菌属 *Cupriavidus* 被证实能够促进植株对土壤中 K 元素的利用,这对于喀斯特小蓬竹适应喀斯特地区贫瘠的环境具有重要意义^[44-45]。相关学者对于喀斯特地区放线菌的研究也发现主要以链霉菌属 *Streptomyces* 为

主^[46-48]。上述菌属的存在可位揭示小蓬竹对喀斯特地区环境适应性奠定基础,但具体机制机理尚需进一步对分离的相应菌种进行相关功能试验。

4 结论

研究表明,从喀斯特地区特有植物小蓬竹根际土壤及根、茎、叶共分离得到 139 株真菌菌株,归属于 27 属,其中根际土壤 34 株为 12 属,青霉菌属 *Penicillium* 为优势属;根部 63 株为 17 属,漆斑菌属 *Myrothecium*、镰刀菌属 *Fusarium* 为优势属;茎部 14 株为 8 个属,弯孢聚壳属 *Eutypella*、肉座菌属 *Hypocrea*、拟茎点霉属 *Mitosporic*、脉孢菌属 *Neurospora*、刺盘孢属 *mitosporic*、半壳霉属 *Rhytismataceae* 为优势属;叶部 28 株划分为 9 属,节菱孢霉属 *Arthrinium* 为优势属。根际土壤分离得到细菌菌株 41 株,归属 7 属,芽孢杆菌属 *Bacillus* 为优势属。放线菌菌株 20 株,均为链霉菌属 *Streptomyces*。

根际土壤真菌 Shannon-Wiener 指数 H 为 2.18,根、茎、叶内生真菌分别为 2.652、2.045、1.989;Simpson 指数 D 为:根际土壤真菌 0.932,根 0.919、茎 0.867、叶 0.834;均匀度指数 E 为:根际土壤真菌 0.89,根 0.640,茎 0.775,叶 0.597。根际土细菌 Shannon-Wiener 指数为 1.0679,Simpson 指数为 0.5217,均匀度指数为 0.5488。根际土放线菌 Shannon-Wiener 指数为 2.63,Simpson 指数为 0.08,均匀度指数为 0.9865。综合三个多样性指数表明小蓬竹根际土壤真菌多样性较内生真菌多样性高。

参考文献 (References):

- [1] 刘文科,冯固,李晓林. 4 种菌根真菌对五氯酚耐受性及其生理基础研究. 农业环境科学学报, 2004, 23(4): 801-805.
- [2] Asplund J, Bokhorst S, Kardol P, Wardle D A. Removal of secondary compounds increases invertebrate abundance in lichens. Fungal Ecology, 2015, 18: 18-25.
- [3] Xiao D, Che R X, Liu X, Tan Y J, Yang R, Zhang W, He X Y, Xu Z H, Wang K L. Arbuscular mycorrhizal fungi abundance was sensitive to nitrogen addition but diversity was sensitive to phosphorus addition in karst ecosystems. Biology and Fertility of Soils, 2019, 55(5): 457-469.
- [4] 马汇泉,靳学慧,孙伟萍,辛惠普,王英. 大豆根际真菌类群对大豆幼苗生长的影响. 中国油料, 1996, 18(3): 54-55.
- [5] 杨应,蒋长洪,何跃军,欧静,王鹏鹏,司建朋,何敏红,林艳. 丛枝菌根网对喀斯特适生植物氮、磷化学计量特征的影响. 植物生理学报, 2017, 53(12): 2078-2090.
- [6] 占瑞琪. 短花针茅根际真菌的分离及其对小麦的促生作用[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2014.
- [7] Johnson D, Ijdo M, Genney D R, Anderson I C, Alexander I J. How do plants regulate the function, community structure, and diversity of mycorrhizal fungi? Journal of Experimental Botany, 2005, 56(417): 1751-1760.
- [8] Aly A H, Debbab A, Proksch P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(6): 1829-1845.
- [9] 杨娟,董醇波,张芝元,梁建东,韩燕峰,梁宗琦. 不同产地杜仲根际土真菌群落结构的差异性分析. 菌物学报, 2019, 38(3): 327-340.
- [10] Crossay T, Majorel C, Redecker D, Gensous S, Medevielle V, Durrieu G, Cavaloc Y, Amir H. Is a mixture of arbuscular mycorrhizal fungi better for plant growth than single-species inoculants? Mycorrhiza, 2019, 29(4): 325-339.
- [11] Lynch J M, Whipps J M. Substrate flow in the rhizosphere. Plant and Soil, 1990, 129(1): 1-10.
- [12] Krasensky J, Jonak C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(4): 1593-1608
- [13] Toussaint-Hacquard M, Coppo P, Soudant M, Chevreux L, Mathieu-Nafissi S, Lecompte T, Gross S, Guillemin F, Schneider T. Type of plasma preparation used for plasma exchange and clinical outcome of adult patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a French retrospective multicenter cohort study. Transfusion, 2015, 55(10): 2445-2451.
- [14] Saikkonen K, Gundel P E, Helander M. Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. Journal of Chemical Ecology, 2013, 39(7): 962-968.
- [15] 耿伯介. 镰序竹属竹类植物在我国的新发现. 竹子研究汇刊, 1986, 5(2): 28-40.
- [16] 李丽霞,刘济明,廖小锋,熊雪,骆畅,柳嘉佳. 小蓬竹光合作用对 CO₂ 的响应特征. 东北林业大学学报, 2016, 44(8): 18-23, 54-54.
- [17] 廖小锋,刘济明,张东凯,靳勇,张勇,闫国华,王敏. 野生小蓬竹的光合光响应曲线及其模型拟合. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(3): 124-128.
- [18] 刘济明. 贵州喀斯特地区小蓬竹生态特性研究[D]. 北京:北京林业大学, 2010.
- [19] Gasoni L, De Gurfinkel B S. The endophyte *Cladarrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. Mycological Research, 1997, 101(7): 867-870.
- [20] 王凤让,毛克克,李国钧,吴铖铖,张慧娟,李大勇,宋凤鸣. 印度梨形孢及其近似种 *Sebacina vermifera* 促进番茄生长发育及磷吸收. 浙

- 江大学学报: 农业与生命科学版, 2011, 37(1): 61-68.
- [21] Balendres M A, de Torres R, Cueva F D. Culture storage age and fungal re-isolation from host- tissue influence *Colletotrichum* spp. virulence to pepper fruits. *Journal of Phytopathology*, 2019, 167(9): 510-515.
- [22] 何佳, 刘笑洁, 赵启美, 陈钧. 植物内生真菌分离方法的研究. *食品科学*, 2009, 30(15): 180-183.
- [23] McInroy J A, Klopper J W. Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton//O'Gara F, Dowling D N, Boesten I B, eds. *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1994: 19-28.
- [24] Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust H J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs; effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 1993, 97(12): 1447-1450.
- [25] 颜强. 小蓬竹(*Drepanostachyum luodianense*)内生真菌与根际真菌多样性的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
- [26] 李鹏. 小蓬竹根际土壤可培养微生物及其酶活性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
- [27] 郑婷, 张培安, 张克坤, 纠松涛, 朱旭东, 宋长年, 贾海锋, 房经贵. 葡萄伤流液中内生菌分离鉴定与抗病功能分析. *园艺学报*, 2018, 45(11): 2106-2120.
- [28] Byers H K, Stackebrandt E, Hayward C, Blackall L L. Molecular investigation of a microbial mat associated with the great artesian basin. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 25(4): 391-403.
- [29] 吴昊. 不同类型群落物种多样性指数的比较研究. *中南林业科技大学学报*, 2015, (5): 84-89.
- [30] Nerva L, Turina M, Zanzotto A, Gardiman M, Gaiotti F, Gambino G, Chitarra W. Isolation, molecular characterization and virome analysis of culturable wood fungal endophytes in esca symptomatic and asymptomatic grapevine plants. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(8): 2886-2904.
- [31] 郑欢, 张芝元, 韩燕峰, 陈万浩, 梁宗琦. 刺槐树洞悬土可培养真菌群落组成及其多样性分析. *菌物学报*, 2017, 36(5): 625-632.
- [32] 王艳, 常帆, 程虎印, 贾凤安, 程江雪, 王汉屏. 重楼根际及药用部位内生真菌多样性与群落结构差异分析. *中草药*, 2019, 50(5): 1232-1237.
- [33] 吴昊, 张明霞, 王得祥. 秦岭南坡油松-锐齿槲栎混交林群落不同层次多样性特征及环境解释. *西北植物学报*, 2013, 33(10): 2086-2094.
- [34] Whipps J M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52: 487-511.
- [35] Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch P C, Weiman A, Dröge J, Pan Y, McHardy A C, Schulze-Lefert P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(3): 392-403.
- [36] Yang J, Klopper J W, Ryu C M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(1): 1-4.
- [37] 康贻军, 程洁, 梅丽娟, 胡健, 朴哲, 殷士学. 植物根际促生菌作用机制研究进展. *应用生态学报*, 2010, 21(1): 232-238.
- [38] Chomel M, Fernandez C, Bousquet-Mélou A, Gers C, Monnier Y, Santonja M, Gauquelin T, Gros R, Lecareux C, Baldy V. Secondary metabolites of *Pinus halepensis* alter decomposer organisms and litter decomposition during afforestation of abandoned agricultural zones. *Journal of Ecology*, 2014, 102(2): 411-424.
- [39] Yuan J, Zhang W, Sun K, Tang M J, Chen P X, Li X, Dai C C. Comparative transcriptomics and proteomics of *Atractylodes lancea* in response to endophytic fungus *Gilmaniella* sp. AL12 reveals regulation in plant metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1208.
- [40] 刘雯雯, 喻理飞, 严令斌, 刘娜, 赵庆. 喀斯特石漠化区植被恢复不同阶段土壤真菌群落组成分析. *生态环境学报*, 2019, 28(4): 669-675.
- [41] Li F, He X H, Sun Y Y, Zhang X M, Tang X X, Li Y K, Yi Y. Distinct endophytes are used by diverse plants for adaptation to karst regions. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 5246.
- [42] Yao Y Q, Lan F, Qiao Y M, Wei J G, Huang R S, Li L B. Endophytic fungi harbored in the root of *Sophora tonkinensis* Gapnep: diversity and biocontrol potential against phytopathogens. *MicrobiologyOpen*, 2017, 6(3): e00437.
- [43] Smith E S, Read D. Mineral nutrition, toxic element accumulation and water relations of arbuscular mycorrhizal plants//Smith S E, Read D, eds. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press, 2008: 145-187.
- [44] Wang P C, Mo B T, Chen Y, Zeng Q F, Wang L B. Effect of karst rocky desertification on soil fungal communities in Southwest China. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15(3).
- [45] 陈香碧, 苏以荣, 何寻阳, 覃文更, 魏亚伟, 梁月明, 吴金水. 不同干扰方式对喀斯特生态系统土壤细菌优势类群—变形菌群落的影响. *土壤学报*, 2012, 49(2): 354-363.
- [46] 曹迅, 王晓, 董子维, 沈琼雯, 邓年方, 李有志. 喀斯特地貌土壤中解钾细菌的分离和鉴定. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(4): 1487-1494.
- [47] 田皓元, 程少军, 周少奇. 喀斯特地貌高海拔自然保护区土壤放线菌多样性研究. *科学技术与工程*, 2016, 16(24): 15-18.
- [48] 程少军, 刘鸿雁, 龙云川, 周少奇. 黔东北喀斯特土壤放线菌多样性研究. *贵州大学学报(自然科学版)*, 2017, 34(3): 35-40.