

DOI: 10.20103/j.stxb.202302050183

多立安, 杨超杰, 马美晨, 宋狄亚, 赵树兰. 氧化石墨烯对黑麦草种子内生真菌群落结构和多样性的影响. 生态学报, 2024, 44(8): 3550-3559.

Duo L A, Yang C J, Ma M C, Song D Y, Zhao S L. Effects of graphene oxide on the structure and diversity of endophytic fungal community in the seeds of *Lolium perenne* L. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(8): 3550-3559.

氧化石墨烯对黑麦草种子内生真菌群落结构和多样性的影响

多立安, 杨超杰, 马美晨, 宋狄亚, 赵树兰*

天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387

摘要: 为了探究氧化石墨烯 (GO) 对黑麦草种子内生真菌群落结构和多样性的影响, 将黑麦草种子在 0.4%、0.8% 和 1.2% 水平的 GO 溶液中胁迫 4 d, 采用高通量测序技术, 分析 GO 胁迫下黑麦草种子内生真菌群落组成和多样性的变化。结果显示, 4 个样本所有样品共分离获得 303 种真菌, 归属于 10 门 39 纲 84 目 160 科 240 属。在门分类水平上, 子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota) 是主要的内生真菌类群; 在属分类水平上, 各处理的共有优势菌属为链格孢属 (*Alternaria*)。不同 GO 处理黑麦草种子内生真菌群落结构存在差异, 随着 GO 浓度的增加, 子囊菌门的丰度出现下降, 0.8% 和 1.2% GO 处理较对照分别显著降低了 19% 和 20% ($P < 0.05$); 所有 GO 处理的担子菌门丰度均显著高于对照 ($P < 0.05$); 1.2% 处理链格孢属的丰度较对照显著降低了 37.36%。与对照相比, 1.2% GO 处理内生真菌的丰富度和多样性显著增加, ACE、Chao1 和 Shannon 指数分别增加了 123.5%、127.4% 和 117.5% ($P < 0.05$)。主坐标分析 (PCoA) 分析表明, 1.2% GO 处理内生真菌群落结构与其他处理有较大差异; 线性判别分析 (LEfSe) 分析发现, 各处理差异指示种明显不同。可见, GO 改变了黑麦草种子内生真菌群落的组成和多样性, 尤其是高浓度处理 (1.2%)。研究可为碳纳米材料暴露对共生物种的潜在影响研究提供参考。

关键词: 氧化石墨烯; 黑麦草; 高通量测序; 内生真菌; 多样性

Effects of graphene oxide on the structure and diversity of endophytic fungal community in the seeds of *Lolium perenne* L.

DUO Li'an, YANG Chaojie, MA Meichen, SONG Diya, ZHAO Shulan*

Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China

Abstract: With the rapid development of nanotechnology, graphene oxide (GO) has increasingly been produced and widely applied in many fields, resulting in its environmental release and exposure to plants. Endophytic fungi can colonize the internal tissue of the plant without causing harm on their host, forming a mutually beneficial symbiotic relationship with the host plant. To date, the impacts of GO exposure on the fungal endophytic community in terrestrial plants have been rarely reported. In the present study, ryegrass (*Lolium perenne* L.) seeds were exposed to varying concentrations of GO solution (0.4%, 0.8%, and 1.2%) for a duration of 4 days to assess the impact of GO on the composition and diversity of endophytic fungi within ryegrass seeds. A high-throughput sequencing technique was utilized to analyze the alterations in the endophytic fungal community as affected by GO. Our results revealed the presence of 303 fungal species across all samples, categorized into 10 phyla, 39 classes, 84 orders, 160 families, and 240 genera. Predominantly, Ascomycota and Basidiomycota were identified as the dominant fungal phyla, with Pleosporales and *Alternaria* being the common dominant fungal order and genus, respectively. Importantly, the fungal endophytes within ryegrass seeds demonstrated sensitivity to

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31870484)

收稿日期: 2023-02-05; 网络出版日期: 2024-01-30

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhaosl_tjnu@126.com

GO exposure, particularly with the 1.2% GO treatment. As the concentration of GO increased, the abundance of Ascomycota exhibited a significant reduction of 19% and 20% for the 0.8% and 1.2% GO treatments, respectively, in comparison to the control ($P<0.05$). On the other hand, the abundance of Basidiomycota was significantly higher in all GO treatments compared to the control ($P<0.05$). Specifically, in the case of the 1.2% GO treatment, the abundance of Pleosporales and *Alternaria* notably decreased by 44.48% and 37.36%, respectively, compared to the control. Furthermore, exposure to GO altered the richness and diversity of the fungal endophytic communities in ryegrass seeds. The presence of GO at 1.2% resulted in significant increases ($P<0.05$) of 123.5%, 127.4%, and 117.5% in ACE, Chao1, and Shannon indices, respectively, relative to the control. Hierarchically clustered heatmap of fungal distribution at the genus level and Principal Coordinate Analysis (PCoA) highlighted significant disparities in the community structure of endophytic fungi between the 1.2% GO and the other three treatments. Additionally, LEfSe analysis revealed noteworthy distinctions in indicator taxa among the different treatments. Our findings underscore the influence of GO on altering the composition and diversity of endophytic fungal communities within ryegrass seeds, particularly evident in high-concentration treatments (1.2%). This study serves as a valuable reference for assessing the potential impact of carbon nanomaterial exposure on cohabiting species.

Key Words: graphene oxide; *Lolium perenne* L.; high-throughput sequencing; endophytic fungi; diversity

作为一种重要的石墨烯衍生物,氧化石墨烯(GO)是很多石墨烯基纳米材料(GBNs)合成的前体;独特的理化性质使其在很多领域有着广泛的应用^[1-2]。因此,在加工、运输和使用过程中,GO会不可避免地释放到环境中,其潜在的环境风险随着生产和使用量的增加而增加,其毒性研究受到普遍关注^[3-4]。

目前,关于GO对微生物毒性的研究主要集中在对土壤微生物毒性和群落结构研究上。研究表明,GO对大多数细菌具有抗菌活性^[5-6],其毒性机制普遍认为是GO对细胞膜的物理损伤和GO诱导的氧化损伤^[7]。GO对细菌造成物理损伤的途径主要包括粘附在细胞表面、包裹细胞阻止细胞繁殖、穿透细胞等等^[8-9],导致细胞形态和结构发生变化、溶质渗出及细胞膜功能受损^[10]。GO与微生物相互作用时,会攻击蛋白质、核酸和细胞膜等,破坏细胞的抗氧化和氧化平衡,导致细胞内酶和其他物质分泌异常,最终引起细胞损伤,甚至细胞死亡^[11]。在一项调查GO接触4种细菌(大肠杆菌、变形链球菌、金黄色葡萄球菌和粪大肠杆菌)的杀菌潜力研究中,发现GO显著降低了细菌的活力,其抗菌性呈浓度依赖性,在高的GO浓度(300和500 $\mu\text{g/mL}$)下观察到最高的杀菌活性^[5]。Evariste等^[12]研究发现,1 mg/L GO对细菌生长有较强的抑制作用,影响了与硅藻相关的细菌群落组成。Hao等^[13]研究表明,土壤中的微生物数量随着GO浓度的增加而减少。Du等^[14]研究发现,GO显著改变了土壤细菌群落的组成和结构,导致一些固氮菌和铁还原菌的增加。Forstner等^[15]研究表明,所有剂量的GO均显著影响了土壤细菌和真菌群落的组成。

植物内生真菌是指其生活史的一定阶段或全部阶段定殖于健康植物的组织内而对寄主植物无明显致病性的一类真菌,存在于种子、根、茎、叶等器官组织内部和细胞间隙^[16]。内生真菌与宿主植物在长期的协同进化过程中,形成了互利共生的关系^[17]。宿主植物为内生真菌提供生存空间和营养物质,内生菌可产生一些代谢物,如生长激素等可以促进植物的生长,有些活性代谢产物可以增强宿主植物对各种胁迫的抗逆性,提高植物的抗病虫害能力^[18-20]。如印度梨形孢(*Piriformospora indica*)是一种多功能内生真菌,其定殖在根系能促进宿主植物生长和光合作用,并通过增加茉莉酸的积累和防御基因的表达提高甘薯对食草性昆虫采食的能力^[21]。Al Husnain等^[22]研究发现,海榄雌(*Avicennia marina*)中存在的内生真菌对大多数番茄病原菌具有抑制作用,能控制它们所引起的病害。

植物内生菌通常由种子传播并为其宿主植物提供有益作用^[23]。种子内生菌对种子的生长发育至关重要,可以提高种子萌发率,影响子代植株中菌群的定殖等^[24];还可进行固氮和磷增溶来促进植物的生长。迄今为止,碳纳米材料对植物内生菌群落影响的研究很少。Hao等^[25]研究表明,即使在10 mg/L浓度下,水稻

内生真菌对碳纳米材料暴露都很敏感,250 mg/L 多壁碳纳米管和 C_{60} 显著改变了内生真菌的群落组成。Du 等^[26]的研究发现,GO 暴露降低了水稻根系内生细菌群落的多样性、均匀度和丰富度,有益细菌种群的相对丰度也降低。但无论如何,还未见 GO 对植物种子内生菌群落影响的相关报道。

多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.),禾本科黑麦草属,是全球重要的牧草和草坪植物,具有很高的经济价值。禾本科牧草和草坪草种子普遍被内生真菌所感染,早在 19 世纪末,就在多年生黑麦草上发现了内生真菌^[27]。而关于黑麦草内生真菌的研究多集中在促生、抗逆和抗病等方面^[28–29]。鉴于内生真菌通过种子传播,将有益微生物代代相传,并且为宿主植物提供诸多益处,本文以黑麦草种子为实验材料,采用高通量测序技术,研究 GO 暴露下黑麦草种子内生真菌群落组成和多样性的变化,以期了解碳纳米材料暴露对共生物种的潜在影响。

1 材料与方法

1.1 供试材料

多年生黑麦草种子购自百绿(天津)国际草业有限公司,品种为顶峰。GO 购自苏州恒球石墨烯科技有限公司,为褐黄色粉末,纯度大于 95%,片层直径 10–50 μm ,平均厚度 3.4–8.0 nm,比表面积 100–300 m^2/g 。

1.2 研究方法

分别将 0.24 g、0.48 g 和 0.72 g GO 粉末,溶于 60 mL 的超纯水中配成浓度为 0.4%(GO1)、0.8%(GO2)和 1.2%GO(GO3)的 GO 悬浮液,超声 30 min 使 GO 纳米片分散均匀。

在直径 10 cm 的培养皿中加入两层无菌滤纸,然后分别加入 6 mL 不同浓度的 GO 悬浮液,用无菌水作为对照(CK)。每个容器均匀放置 1 g 黑麦草种子,室温状态下培养,每个处理 4 次重复。每天向培养皿中补充相应浓度的 GO 溶液,连续胁迫 4 d。

经 GO 处理的种子用流水冲洗 10 min,随后通过无菌操作对样本表面进行杀菌消毒处理。在 75%酒精中浸泡 40 s,无菌水漂洗 30 s,2%次氯酸钠溶液浸泡 5 min,再用无菌水冲洗 6 次。取 200 μL 最终漂洗过种子的无菌水,涂布在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上培养,检测消毒效果^[34]。用无菌滤纸吸干种子表面水分,置于无菌离心管中,–80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

1.3 DNA 提取、PCR 扩增和高通量测序

黑麦草种子 DNA 的提取采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[30],之后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度,取适量的样本 DNA 于离心管中,使用无菌水稀释样本至 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。以稀释后的基因组 DNA 为模板,使用 Barcode 的特异引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 及 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (New England Biolabs) 高效高保真酶进行真菌内转录间隔区(ITS)的 PCR 扩增。PCR 反应体系(30 μL):Phusion Master Mix (2 $\times$) 15 μL ,引物(2 μM)各 3 μL ,gDNA(1 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 10 μL ,ddH₂O 2 μL 。PCR 反应条件:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶进行电泳检测,对检测合格的 PCR 产物进行纯化,构建文库,经过 Qubit 定量和文库检测合格后,利用 NovaSeq 6000 平台(北京诺禾致源生物信息技术有限公司)进行高通量测序。将测序得到的数据进行质控和过滤,具体步骤如下:根据 Barcode 序列拆分各样品数据,使用 FLASH(v1.2.7)对每个样本的测序片段(reads)进行拼接,得到原始标签数据。然后用 Trimmomatic (v0.33)软件,对 Raw tags 进行过滤,得到高质量的 Tags 数据;利用 QIIME (v1.9.1)鉴定并去除嵌合体序列,得到最终的有效数据。用 UPARSE(v7.0.1001)对全部有效序列进行聚类,在 97%序列相似度水平上计算操作分类单元(OTU)的数量进行物种注释分析,获得分类学信息,并在各个分类水平上统计各样本的群落组成。

1.4 数据分析

在数据序列 OTU 聚类分析的基础上,利用 QIIME 软件计算 Alpha 多样性指数,包括 Shannon 指数和

Simpson 指数反映真菌群落的多样性、Chao1 指数和 ACE 指数反映群落丰富度。采用主坐标分析 (PCoA), 基于未加权 (unweighted) UniFrac 距离利用 R 语言 Vegan 包 (V2.5.3) 分析不同处理之间内生真菌群落结构的相似性。利用线性判别分析法 (LEfSe) 设定显著差异的 LDA 值为 4.0, 寻找各分类水平上组间丰度差异显著物种。

利用 SPSS 22.0 软件对数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan 多重比较, 来确定真菌群落丰度在不同处理间的差异显著性 ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同 GO 处理对黑麦草种子内生真菌 Alpha 多样性的影响

测序所得样品数据经质控后, 共获得 770357 条有效序列, 以 $\geq 97\%$ 的相似性聚类得到 844 个 OTUs, 其中 1.2% GO 处理黑麦草种子内生真菌 OTU 数量最多, 为 701。由韦恩图 (图 1) 可知, 对照组、0.4%、0.8%、1.2% 四个处理共有的 OTU 数有 114 个, 特有的 OTU 数分别为 40、28、22 和 415 个, 可见 1.2% GO 处理与其他处理相比, 内生真菌群落多样性显著增加。

根据黑麦草种子内生真菌群落 Alpha 多样性指数 (表 1) 可知, 4 个处理的覆盖度均大于 99.9%, 表明测序数据基本覆盖了 4 个处理所有内生真菌的生物信息。Shannon 指数体现每个处理种子内生真菌群落多样性, ACE 和 Chao1 指数反映物种的丰富度, 指数越大, 丰富度越高。0.4% 和 0.8% 处理对内生真菌 Alpha 多样性指数没有显著影响, 但高浓度 GO (1.2%) 处理下, 各指数显著增加, 由此可知, 1.2% GO 处理下内生真菌有着较高的丰富度和多样性。

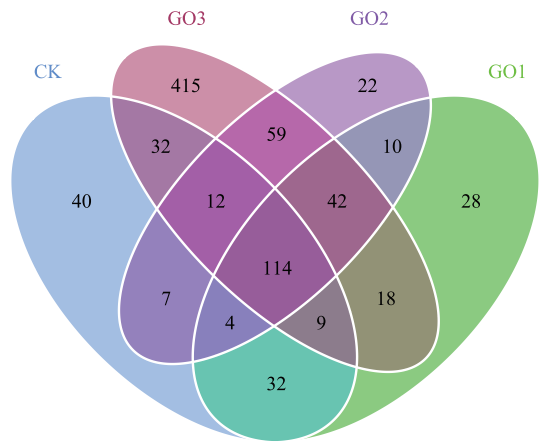


图 1 不同 GO 处理下黑麦草种子内生真菌群落 OTUs 韦恩图
Fig.1 Venn diagram of endophytic fungal OTUs in *L. perenne* seeds under different GO treatments
GO: 氧化石墨烯; OTUs: 操作分类单元; CK: 对照; GO1: 0.4% GO; GO2: 0.8% GO; GO3: 1.2% GO

表 1 不同 GO 处理下黑麦草种子内生真菌 Alpha 多样性指数

Table 1 Alpha diversity indices of the endophytic fungi in *L. perenne* seeds under different GO treatments

处理 Treatments	ACE	Chao1	Shannon	Simpson	覆盖度 Coverage
CK	186.6±12.3b	182.0±13.4b	1.83±0.64b	0.43±0.18b	1.000
GO1	153.1±45.0b	148.6±40.8b	1.63±0.33b	0.41±0.08b	1.000
GO2	194.0±29.1b	187.0±27.3b	2.21±0.33b	0.55±0.08ab	1.000
GO3	417.1±211.9a	413.8±211.2a	3.98±1.45a	0.76±0.16a	0.999

GO: 氧化石墨烯; CK: 对照; GO1: 0.4% GO; GO2: 0.8% GO; GO3: 1.2% GO; 不同字母表示不同处理间差异显著 ($P<0.05$)

2.2 不同 GO 处理对黑麦草种子内生真菌群落组成的影响

通过对测序结果的物种注释, 从 4 个处理的黑麦草种子中共获得 10 门、39 纲、84 目、160 科、240 属和 303 种内生真菌。如图 2 所示, 在门水平上, 各处理的优势菌门为子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota), 各处理子囊菌门的相对丰度以对照组为最高 (90.07%), 其次为 0.4% 处理 (84.61%), 1.2% 处理为最低 (70.06%); 担子菌门丰度以 0.8% 处理为最高 (22.37%), 对照组最低 (1.05%)。随着 GO 浓度的升高, 子囊菌门的丰度呈下降趋势, 0.8% 和 1.2% GO 处理显著低于对照, 降低了 20% 左右 ($P<0.05$); 而各浓度 GO 处理担子菌门的丰度则显著高于对照 ($P<0.05$)。

对目水平分析后发现, GO 改变了黑麦草种子内生真菌目的种类和丰度。格孢腔菌目 (Pleosporales) 为优

势菌目,对照组丰度最高(84.68%),随着 GO 浓度的升高,其丰度出现下降,1.2%处理显著低于对照 44.48% ($P<0.05$)。除了格孢腔菌目外,对照组优势菌有古根菌目(Archaeorhizomycetales,4.07%);而 GO 处理优势菌包括锁掷酵母目(Sporidiobolales)和线黑粉菌目(Filobasidiales),以 0.8%处理为最高,相对丰度为 11.67%和 8.40%;在 1.2%处理中优势菌肉座菌目(Hypocreales),其相对丰度高达 23.66%。

在属水平上,4 个处理黑麦草种子内生真菌主要由链格孢属(*Alternaria*)组成,对照、0.4%、0.8%和 1.2% GO 处理其丰度占比分别为:73.85%、76.12%、65.20%和 36.49%;1.2%处理显著降低了链格孢属的丰度,较对照降低了 37.36% ($P<0.05$)。除链格孢属外,对照组优势属还包括附球菌属(*Epicoccum*,9.02%)和古根菌属(*Archaeorhizomyces*,4.07%);而掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)和线黑粉酵母属(*Filobasidium*)是 3 个 GO 处理的共有优势属,处理间差异并不显著;枝孢菌属(*Cladosporium*)和 *Parastagonospora* 是 0.8%和 1.2%处理的共有优势属,处理间差异不显著;麦角菌属(*Claviceps*)和镰刀菌属(*Fusarium*)是 1.2%处理的特有优势属,丰度占比分别为 14.25%和 6.63%。可见,GO 处理可以改变黑麦草种子内生真菌的丰富度和多样性,从而改变其群落结构。

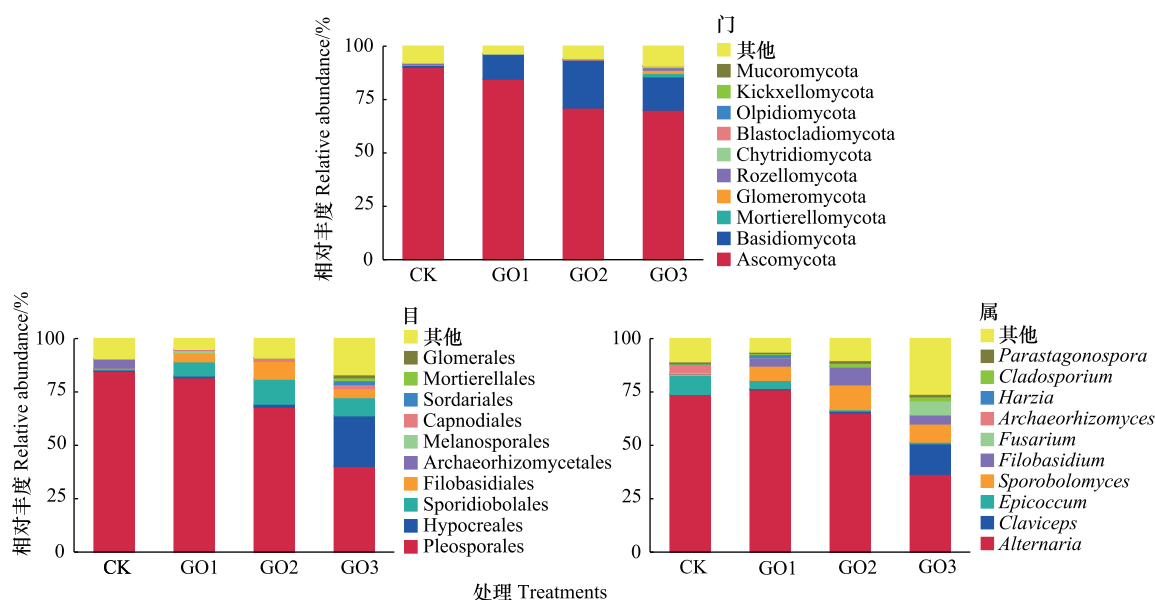


图2 不同 GO 处理下门、目和属水平黑麦草种子内生真菌群落组成

Fig.2 The composition of endophytic fungi communities at phylum, order and genus levels in *L. perenne* seeds under different GO treatments

Ascomycota:子囊菌门;Basidiomycota:担子菌门;Mortierellomycota:被孢霉门;Glomeromycota:球囊菌门;Rozellomycota:罗兹菌门;Chytridiomycota:壶菌门;Blastocladiomycota:芽枝菌门;Olpidiomycota:油壶菌门;Kickxellomycota:梳霉门;Mucoromycota:毛霉门;Pleosporales:格孢腔菌目;Hypocreales:肉座菌目;Sporidiobolales:锁掷酵母目;Filobasidiales:线黑粉菌目;Archaeorhizomycetales:古根菌目;Melanosporales:黑孢壳目;Capnodiales:煤炱目;Sordariales:粪壳菌目;Mortierellales:被孢霉目;Glomerales:球囊菌目;*Alternaria*:链格孢属;*Claviceps*:麦角菌属;*Epicoccum*:附球菌属;*Sporobolomyces*:掷孢酵母属;*Filobasidium*:线黑粉酵母属;*Fusarium*:镰刀菌属;*Archaeorhizomyces*:古根菌属;*Harzia*:哈氏菌属;*Cladosporium*:枝孢菌属

物种丰度聚类热图可以反映不同处理间物种的组成和差异。由图 3 分析可知,在属水平上,黑麦草种子内生真菌的群落结构表现为:对照组和 0.4%处理组可聚为一类,表现出相似的群落结构,而 1.2%处理组则相对独立,真菌群落结构和其他 3 个处理差异较明显。

2.3 不同 GO 处理对黑麦草种子内生真菌 Beta 多样性的影响

主坐标(PCoA)分析可以比较不同处理间物种多样性的相似程度。由图 4 可知,两个主坐标共解释了 51.43%的差异,其中,PC1 和 PC2 分别解释了 31.06%和 20.37%的差异。0.4%和 0.8%GO 处理黑麦草种子内

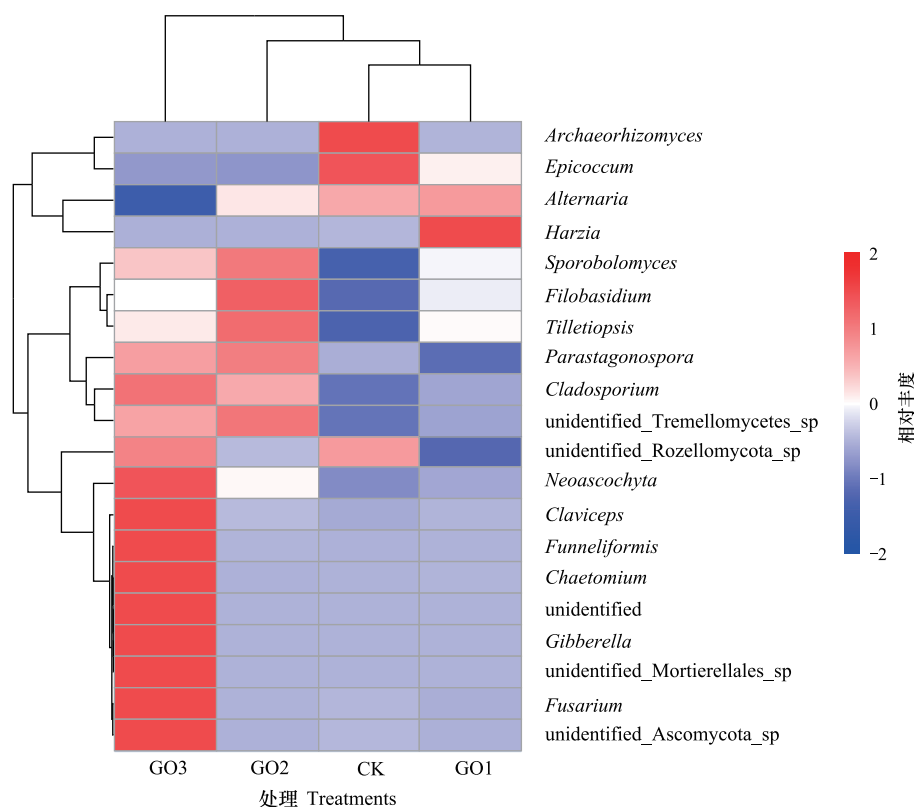


图3 不同GO处理下黑麦草种子内生真菌物种丰度聚类热图

Fig.3 Heat map of species abundance clustering of endophytic fungi at the genus level in *L. perenne* seeds under different GO treatments

unidentified; 未分类的; *Archaeorhizomyces*; 古根菌属; *Epicoccum*; 附球菌属; *Alternaria*; 链格孢属; *Harzia*; 哈氏菌属; *Sporobolomyces*; 掷孢酵母属; *Filobasidium*; 线黑粉酵母属; *Tilletiopsis*; 腥掷孢菌属; *Cladosporium*; 枝孢菌属; unidentified_Tremellomycetes_sp; 未分类的银耳纲; unidentified_Rozellomycota_sp; 未分类的罗兹菌门; *Neosascochyta*; 异壳二孢属; *Claviceps*; 麦角菌属; *Funneliformis*; 管柄囊霉属; *Chaetomium*; 毛壳菌属; *Gibberella*; 赤霉菌属; unidentified_Mortierellales_sp; 未分类的被子霉目; *Fusarium*; 镰刀菌属; unidentified_Ascomycota_sp; 未分类的子囊菌门

生真菌菌群多样性较为相似;而1.2%GO处理内生真菌菌群多样性与其他处理差异较大。

2.4 不同GO处理组间差异物种分析

为了比较各分类水平下组间物种差异,在LDA阈值=4时,进行了LEfSe分析。由图5可知,对照组黑麦草种子内生真菌有5个显著差异类群,分别为古根菌纲(*Archaeorhizomycetes*)、古根菌目(*Archaeorhizomycetales*)、古根菌科(*Archaeorhizomycetaceae*)、古根菌属(*Archaeorhizomyces*)和*Archaeorhizomyces*_sp;0.8%GO处理显著富集的生物标记物(biomarkers)是担子菌门(*Basidiomycota*)、银耳纲(*Tremellomycetes*)、线黑粉菌目(*Filobasidiales*)、线黑粉菌科(*Filobasidiaceae*)、线黑粉酵母属(*Filobasidium*)和*Filobasidium*_stepposum;1.2%GO处理显著差异的biomarkers是粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)、肉座菌目(*Hypocreales*)、麦角菌科(*Clavicipitaceae*)、麦角菌属(*Claviceps*)和麦角菌(*Claviceps_purpurea*);0.4%GO处理无差异显著的物种。

3 讨论与结论

种子能将微生物从母本植物传播到下一代,种子内生真菌在调节植物生长中至关重要,对环境条件很敏感。本研究首次采用高通量测序技术对GO胁迫下黑麦草种子内生真菌群落结构和多样性进行分析。研究发现,GO可以改变黑麦草种子内生真菌的种类和丰度,从而改变其群落结构。与本研究结果相一致,子囊菌门和担子菌门被发现是植物种子的优势菌门^[23];许多子囊菌能和植物形成稳定的共生关系。也有研究发现,

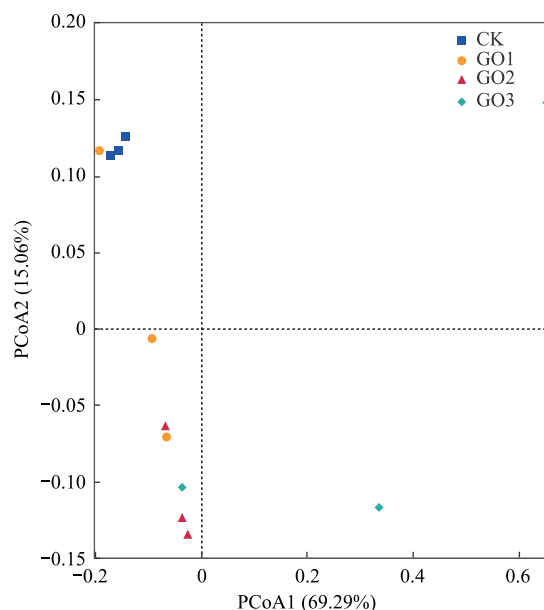


图4 不同GO处理下黑麦草种子内生真菌群落PCoA分析

Fig.4 Principal coordinate analysis of endophytic fungi community in *L. perenne* seeds under different GO treatments

PCoA 分析:主坐标分析 Principal co-ordinates analysis

子囊菌门是高羊茅体内丰富度最高的内生真菌,担子菌门是种子中的优势真菌^[31]。随着GO浓度的升高,子囊菌门的丰度呈现下降趋势,担子菌门的丰度则显著上升,说明作为最主要类群的子囊菌门对纳米材料的响应很敏感,而GO处理碳含量提高,为担子菌门中菌群的发展提供了更好的营养和生长发育条件^[32]。Chen等^[33]发现在500 mg/kg多壁碳纳米管处理下,根际土壤中子囊菌门的相对丰度最低,与之相反,担子菌门的相对丰度增加。穆耀辉等^[34]的研究表明,喷施纳米硅使烟叶的子囊菌门比例有所下降,而担子菌门的有所升高。从属水平群落结构看,GO改变了黑麦草种子内生真菌的种类和丰度,作为最丰富的链格孢属在1.2%GO处理丰度显著下降,说明链格孢属对碳纳米材料很敏感;链格孢属是一种重要的植物病原菌,能引起多种植物病害,其丰度的降低对植物本身是有益的;同样,对照组优势菌群附球菌属和古根菌属也较敏感,在GO暴露后则消失了。而掷孢酵母属和线黑粉酵母属成为所有GO处理的优势菌群,麦角菌属、枝孢菌属和镰刀菌属成为1.2%GO处理的优势属,说明这些菌属对GO具有较强的适应力,更容易在GO存在下生长。GO具有较强的化学活性^[35],其暴露会引发黑麦草种子内部微生态环境的变化,从而改变内生真菌的群落结构^[26]。

在氧化石墨烯的暴露下,黑麦草种子内生真菌的多样性有所改变。本研究中,0.4%和0.8%GO处理对ACE和Chao1指数没有显著影响,但1.2%GO处理ACE和Chao1指数显著增加,这可能是由于Chao1指数对稀有物种很敏感,推测1.2%GO胁迫下一些稀有菌种,如麦角菌属、镰刀菌属和掷孢酵母属大量繁殖所导致^[36]。Shannon和Simpson指数反映菌群的多样性,Shannon指数对物种丰富度和稀有种更敏感,Simpson指数对物种均匀度和富集种更敏感^[37]。可以推测本研究中1.2%GO处理Shannon指数的增加是由于某些稀有真菌急剧增长成为优势菌属所致。众所周知,环境条件的改变会引起植物内生真菌群落的变化^[38]。Xu等^[39]研究发现,页面喷施ZnO纳米材料后,南瓜根系的内生真菌多样性增加,一些有益菌显著富集。另外,PCoA的分析结果进一步证实了GO对黑麦草种子内生真菌群落的影响与浓度相关,高浓度下影响较大。

综上所述,暴露于不同浓度的氧化石墨烯会引起黑麦草种子内生真菌群落组成和多样性的变化。高浓度(1.2%)的GO作用下,优势菌的种类和丰度发生明显改变,内生真菌的丰富度和多样性增加,从而改变了内生真菌的群落结构。

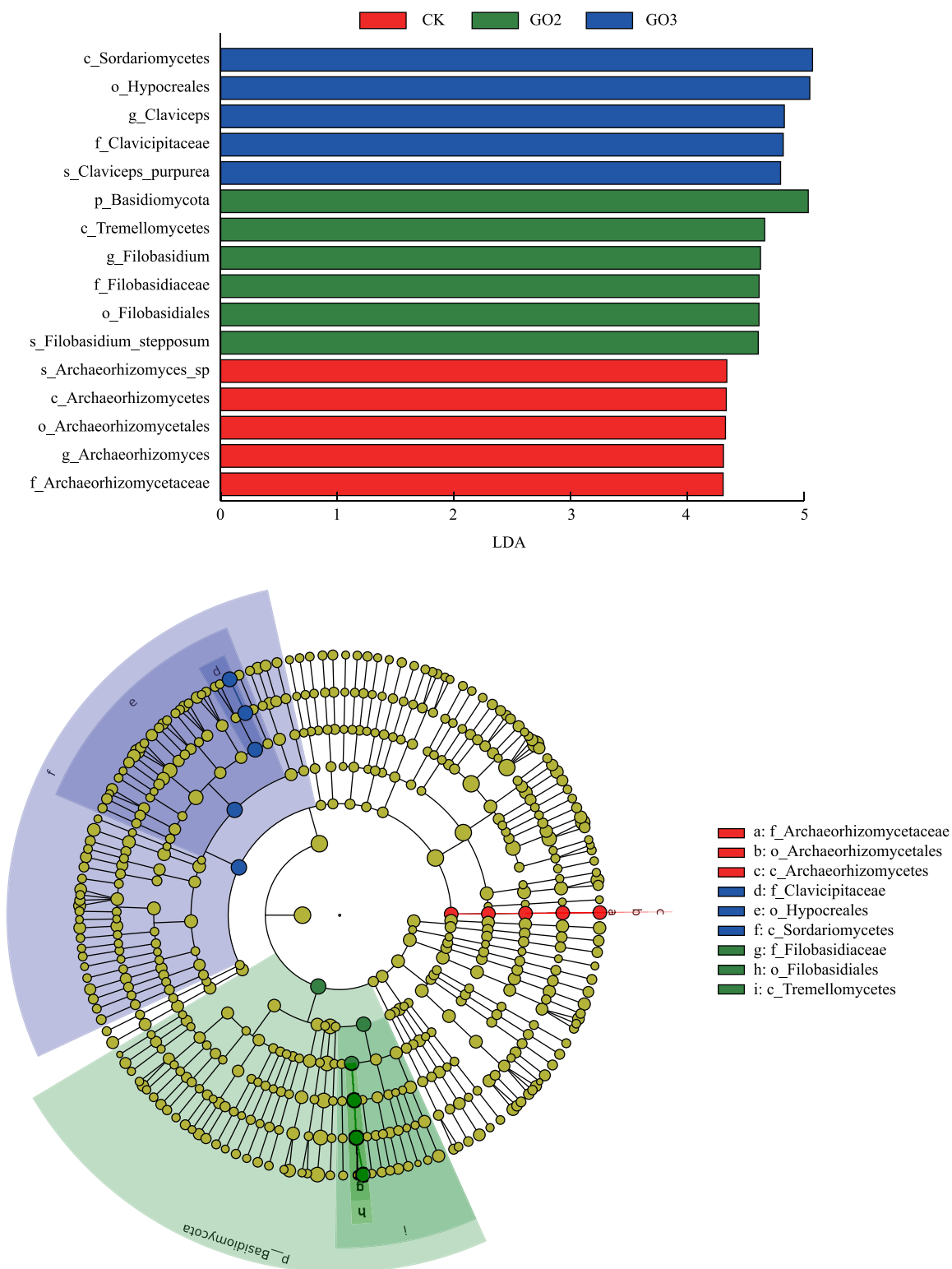


图5 不同GO处理黑麦草种子内生真菌群落LEfSe分析

Fig.5 LEfSe analysis of endophytic fungi communities in *L. perenne* seeds under different GO treatments (LDA ≥ 4.0)

Archaeorhizomycetaceae: 古根菌科; Archaeorhizomyces: 古根菌属; Archaeorhizomycetales: 古根菌目; Archaeorhizomyces: 古根菌纲; Filobasidiales: 线黑粉菌目; Filobasidiaceae: 线黑粉菌科; Filobasidium: 线黑粉酵母属; Tremellomycetes: 银耳纲; Basidiomycota: 担子菌门; Claviceps_purpurea: 麦角菌; Clavicipitaceae: 麦角菌科; Claviceps: 麦角菌属; Hypocreales: 肉座菌目; Sordariomycetes: 粪壳菌纲

参考文献 (References):

- [1] Sontakke A D, Tiwari S, Purkait M K. A comprehensive review on graphene oxide-based nanocarriers: Synthesis, functionalization and biomedical applications. *FlatChem*, 2023, 38: 100484.
- [2] Yadav S, Singh Raman A P, Meena H, Goswami A G, Bhawna, Kumar V, Jain P, Kumar G, Sagar M, Rana D K, Bahadur I, Singh P. An update on graphene oxide: applications and toxicity. *ACS Omega*, 2022, 7(40): 35387-35445.
- [3] Ding X, Pu Y, Tang M, Zhang T. Environmental and health effects of graphene-family nanomaterials: potential release pathways, transformation, environmental fate and health risks. *Nano Today*, 2022, 42: 101379.
- [4] Arvidsson R, Molander S, Sandén B A. Review of potential environmental and health risks of the nanomaterial graphene. *Human and Ecological Risk Assessment*, 2013, 19: 873-887.
- [5] Olezak K, Jakubowski W, Szymański W. Bactericidal activity of graphene oxide tests for selected microorganisms. *Materials*, 2023, 16(11): 4199.
- [6] Zou X, Zhang L, Wang Z, Luo Y. Mechanisms of the antimicrobial activities of graphene materials. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(7): 2064-2077.
- [7] Liu S, Zeng T H, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R, Kong J, Chen Y. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. *ACS Nano*, 2011, 5(9): 6971-6980.
- [8] Romero-Vargas Castrillón S, Perreault F, De Faria A F, Elimelech M. Interaction of graphene oxide with bacterial cell membranes: insights from force spectroscopy. *Environmental Science & Technology Letters*, 2015, 2(4): 112-117.
- [9] Chen J, Peng H, Wang X, Shao F, Yuan Z, Han H. Graphene oxide exhibits broad-spectrum antimicrobial activity against bacterial phytopathogens and fungal conidia by intertwining and membrane perturbation. *Nanoscale*, 2014, 6(3): 1879-1889.
- [10] Dallavalle M, Calvaresi M, Bottoni A, Melle-Franco M, Zerbetto F. Graphene can wreak havoc with cell membranes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(7): 4406-4414.
- [11] Chen M, Sun Y, Liang J, Zeng G, Li Z, Tang L, Zhu Y, Jiang D, Song B. Understanding the influence of carbon nanomaterials on microbial communities. *Environment International*, 2019, 126: 690-698.
- [12] Evariste L, Braylé P, Mouchet F, Silvestre J, Gauthier L, Flahaut E, Pinelli E, Barret M. Graphene-based nanomaterials modulate internal biofilm interactions and microbial diversity. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 598.
- [13] Hao Y, Ma C, Zhang Z, Song Y, Cao W, Guo J, Zhou G, Rui Y, Liu L, Xing B. Carbon nanomaterials alter plant physiology and soil bacterial community composition in a rice-soil-bacterial ecosystem. *Environmental Pollution*, 2018, 232: 123-136.
- [14] Du J, Hu X, Zhou Q. Graphene oxide regulates the bacterial community and exhibits property changes in soil. *RSC Advances*, 2015, 5: 27009-27017.
- [15] Forstner C, Orton T G, Skarszewski A, Wang P, Kopittke P M, Dennis P G. Effects of graphene oxide and graphite on soil bacterial and fungal diversity. *Science of the Total Environment*, 2019, 671: 140-148.
- [16] Baron N C, Rigobelo E C. Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology*, 2022, 13(1): 39-55.
- [17] Ji X, Xia Y, Zhang H, Cui J L. The microscopic mechanism between endophytic fungi and host plants: From recognition to building stable mutually beneficial relationships. *Microbiological Research*, 2022, 261: 127056.
- [18] Yan L, Zhu J, Zhao X, Shi J, Jiang C, Shao D. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103: 3327-3340.
- [19] Liu R, Yang L, Zou Y, Wu Q. Root-associated endophytic fungi modulate endogenous auxin and cytokinin levels to improve plant biomass and root morphology of trifoliate orange. *Horticultural Plant Journal*, 2023, 9(3): 463-472.
- [20] Lu H, Wei T, Lou H, Shu X, Chen Q. A critical review on communication mechanism within plant-endophytic fungi interactions to cope with biotic and abiotic stresses. *Journal of Fungi*, 2021, 7(9): 719.
- [21] Li Q, Kuo Y W, Lin K H, Huang W, Deng C, Yeh K W, Chen S P. *Piriformospora indica* colonization increases the growth, development, and herbivory resistance of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell Reports*, 2021, 40(2): 339-350.
- [22] AI Husnain L, Alajlan L, Alkahtani M D F, Orfali R, Ameen F. *Avicennia marina* endophytic fungi shows antagonism against tomato pathogenic fungi. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 2023, 22(4): 214-222.
- [23] 郭建秀, 王召锋, Bowatte S, 侯扶江. 高寒草甸 8 种植物种子内生细菌和真菌群落的多样性. *草业科学*, 2020, 37(5): 901-915.
- [24] 谢红炼, 汪汉成, 史彩华, 周浩, 孙美丽. 烟草种子内生真菌群落结构和多样性分析. *中国烟草科学*, 2021, 42(2): 28-36.
- [25] Hao Y, Ma C, White J C, Adeel M, Jiang R, Zhao Z, Rao Y, Chen G, Rui Y, Xing B. Carbon-based nanomaterials alter the composition of the fungal endophyte community in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science: Nano*, 2020, 7(7): 2047-2060.

- [26] Du J, Wang T, Zhou Q, Hu X, Wu J, Li G, Li G, Hou F, Wu Y. Graphene oxide enters the rice roots and disturbs the endophytic bacterial communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 192: 110304.
- [27] DeMers M. *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen. *Microbiology*, 2022, 168(3): 001153.
- [28] 任安芝, 高玉葆, 章瑾, 张晶. 内生真菌感染对黑麦草抗盐性的影响. *生态学报*, 2006, 26(6): 1750-1757.
- [29] Li F, Duan T, Li Y. Effects of the fungal endophyte *Epichloë festucae* var. *lolii* on growth and physiological responses of perennial ryegrass cv. fairway to combined drought and pathogen stresses. *Microorganisms*, 2020, 8(12): 1917.
- [30] Bainard L D, Klironomos J N, Hart M M. Differential effect of sample preservation methods on plant and arbuscular mycorrhizal fungal DNA. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 82(2): 124-130.
- [31] Clay K, Holah J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science*, 1999, 285: 1742-1744.
- [32] Wu F, You Y, Werner D, Jiao S, Hu J, Zhang X, Wan Y, Liu J, Wang B, Wang X. Carbon nanomaterials affect carbon cycle-related functions of the soil microbial community and the coupling of nutrient cycles. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 390: 122144.
- [33] Chen X, Wang J, You Y, Wang R, Chu S, Chi Y, Hayat K, Hui N, Liu X, Zhang D, Zhou P. When nanoparticle and microbes meet: the effect of multi-walled carbon nanotubes on microbial community and nutrient cycling in hyperaccumulator system. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423: 126947.
- [34] 穆耀辉, 姜慧敏, 程亚倩, 王军霞, 邓金华, 郑玺, 叶爱萍, 黄金辉, 艾绥龙, 王平平, 张立新. 普通硅肥与纳米硅肥对烤烟内生真菌种群结构的影响. *陕西农业科学*, 2022, 68(8): 44-51.
- [35] Hu X, Zhou Q. 2013. Health and ecosystem risks of graphene. *Chemical Reviews*, 2013, 113: 3815-3835.
- [36] 张桂华, 李旦, 何承忠. 基于高通量测序分析核桃内生真菌多样性. *山东农业科学*, 2022, 54(11): 62-69.
- [37] 许晴, 张放, 许中旗, 贾彦龙, 尤建民. Simpson 指数和 Shannon-Wiener 指数若干特征的分析及“稀释效应”. *草业科学*, 2011, 28(4): 527-531.
- [38] Baron N C, Rigobelo E C. Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology*, 2022, 13: 39-55.
- [39] Xu X, Liang A, Li H, Shang H, Qian K, Jia W, White J C, Ma C, Xing B. Foliar applied ZnO quantum dots boost pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) growth and positively alter endophytic and rhizosphere microbial communities. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2023, 11: 8503-8516.