

# 两种盐生植物内生真菌多样性及其功能预测

高磊<sup>1,2</sup>, 黄银<sup>1,2</sup>, 马金彪<sup>1</sup>, 蒋宏忱<sup>1,3</sup>, 李文均<sup>\*1,4</sup>, 李丽<sup>\*1</sup>

1 中国科学院新疆生态与地理研究所 荒漠与绿洲生态国家重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 中国地质大学(武汉)生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北 武汉 430074

4 中山大学生命科学学院 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275

高磊, 黄银, 马金彪, 蒋宏忱, 李文均, 李丽. 两种盐生植物内生真菌多样性及其功能预测[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3357-3371.

GAO Lei, HUANG Yin, MA Jinbiao, JIANG Hongchen, LI Wenjun, LI Li. Diversity and roles of endophytic fungi in two halophytes[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3357-3371.

**摘要:**【背景】植物内生菌是微生物群落中一类非常重要的组成部分, 是重要的微生物资源库, 在植物促生、抗逆等多个领域有重要的研究和应用价值。【目的】进一步了解干旱荒漠区盐生植物内生真菌的多样性、群落结构和潜在功能特征。【方法】对生长在乌兹别克斯坦西咸海岸边的两种盐生植物毛足假木贼(*Anabasis eriopoda* abbreviated as AE)和展枝假木贼(*A. truncata* abbreviated as AT)的内生真菌群落进行扩增子测序分析。【结果】共获得 166 个 amplicon sequencing variants (ASVs), 涉及 4 门 49 属, 其中 *Neocamarosporium*、*Botryosphaeria* 和 *Alternaria* 及其所属高级分类单元是优势类群。多样性和群落组成分析显示两种盐生植物的内生真菌存在较为明显的差异, 并包含一些潜在的新分类单元。基于 PICRUSt2 和 FUNGuild 的功能预测结果表明这两种盐生植物内生真菌的潜在功能和营养方式多样且表现出宿主差异性。【结论】盐生植物内生真菌具有较高的多样性和潜在的资源价值, 有待进一步挖掘和研究。

**关键词:** 干旱区; 盐生植物; 内生真菌; 多样性; 功能预测

资助项目: 新疆维吾尔自治区上海合作组织科技伙伴计划(2020E01047)

This work was supported by the Xinjiang Uygur Autonomous Region Regional Coordinated Innovation Project (Shanghai Cooperation Organization Science and Technology Partnership Program) (2020E01047).

\*Corresponding authors. E-mail: LI Wenjun, liwenjun3@mail.sysu.edu.cn; LI Li, lili.bobo@ms.xjb.ac.cn

Received: 2022-10-20; Accepted: 2023-04-05; Published online: 2023-05-28

## Diversity and roles of endophytic fungi in two halophytes

GAO Lei<sup>1,2</sup>, HUANG Yin<sup>1,2</sup>, MA Jinbiao<sup>1</sup>, JIANG Hongchen<sup>1,3</sup>, LI Wenjun<sup>\*1,4</sup>, LI Li<sup>\*1</sup>

1 State Key Laboratory of Desert and Oasis Ecology, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, Xinjiang, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, Hubei, China

4 State Key Laboratory of Pest Biocontrol and Resource Utilization, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China

**Abstract:** [Background] Endophytes associated with halophytes have a wide range of activities, such as promoting plant growth, improving stress resistance, fixing nitrogen, and degrading toxic compounds. [Objective] To deeply understand the diversity, community structure, and potential roles of endophytic fungi of halophytes in the arid land. [Methods] Amplicon sequencing was performed for the endophytic fungi in two halophytes (*Anabasis eriopoda* and *A. truncata*) growing on the coast of the western Aral Sea in Uzbekistan. [Results] A total of 166 amplicon sequencing variants (ASVs) were obtained, representing 49 genera of 4 phyla, among which the dominant taxa were *Neocamarosporium*, *Botryosphaeria*, *Alternaria* and their higher taxa. The diversity and community composition of endophytic fungi showed significant differences between the two halophytes, which harbored potential novel taxa. Functional prediction by PICRUSt2 and FUNGuild demonstrated that the endophytic fungi in the two halophytes exhibited diverse roles and trophic modes, being host specific. [Conclusion] Our results suggest that the endophytic fungi in halophytes have high diversity and potential resource values and remain to be studied.

**Keywords:** arid zone; halophyte; endophytic fungi; diversity; function prediction

盐生植物是能够在高盐环境中存活、生长和发育的特殊植物,仅占植物种类的2%左右<sup>[1-4]</sup>。盐生植物在高盐(约200 mmol/L氯化钠或更高)和干旱条件下能够正常存活、生长和发育,可见它们具有独特的分子响应机制、生理结构和内生菌群落,能够对抗盐碱胁迫<sup>[5-7]</sup>。由于全球气候变化和农业用水量增加,咸海面积急剧减少,形成裸露带,引发一系列生态和环境问题<sup>[8-11]</sup>。然而在咸海裸露带具有多种盐生植物分布,那么其共生微生物对植物生长、病原体抗性和逆境适应性可能具有重要作用,在农业生产应用方面也具有重要的意义。

内生菌是一类微生物,它们在健康植物生命周期中的某个阶段生活在其体内,通常包括细菌和真菌。内生菌与宿主植物建立了互惠互利的共生关系,这种关系可以促进寄主植物的生长,提高其抗逆性,也可能是盐生植物抗盐碱胁迫的一个重要因素。内生菌在几乎所有植物体内均存在,并且会因植物种类、基因型和生长环境的不同而有所差异,因此内生菌是一类非常广泛的微生物资源<sup>[12-15]</sup>。前期的研究发现,在位于乌兹别克斯坦咸海岸边不同暴露时期土壤带的土壤真菌和植物内生真菌种群结构具有时空差异,并且与植物种类丰富度和特定矿物

组成相关<sup>[16]</sup>。钮旭光等通过传统的分离培养方法对盐生植物翅碱蓬的内生真菌多样性进行了调查,发现其内生真菌的分布表现出一定的组织特异性和高度的宿主特异性,而且其分布模式也受到生境条件的影响<sup>[17]</sup>。刘晓静等在对于旱荒漠区盐生植物盐爪爪内生真菌群落组成进行研究时发现其内生真菌群落多样性较为丰富,同时也表现出对宿主不同组织具有选择偏好性<sup>[18]</sup>。唐琦勇等则采用高通量测序方法对新疆北部的盐角草内生菌进行测序,结果显示该区域盐角草内生真菌涉及6个门,其中子囊菌门(*Ascomycota*)占绝对优势<sup>[19]</sup>。这些研究为今后微生物资源的挖掘和利用奠定了基础。

假木贼属植物是藜科中的原始类群之一,世界上约有30种。它们生长在地中海至中亚和欧洲干旱地区,是沙漠植被的代表性群体之一。这些小灌木具有强大的根系,能够在超级干燥的环境中生存,对盐碱土和其他不良环境具有高度的适应性,是绿洲强大的自然生态屏障,具有重要的生态价值和经济价值<sup>[20]</sup>。然而,目前关于假木贼属植物内生菌多样性、群落结构、潜在功能和生产应用的研究相对较少。因此,本研究旨在通过高通量测序了解两种盐生植物内生真菌的多样性。本研究报道咸海盆地裸露

带上毛足假木贼和展枝假木贼内生真菌的群落组成,并提供新的见解,以期为今后挖掘盐生植物内生菌资源提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与预处理

我们于2018年8月在乌兹别克斯坦西咸海岸边裸露带(44°29'50.42"N, 58°12'43.80"E)采集到两种假木贼植物(毛足假木贼和展枝假木贼),每种植物各采集了3个生物学重复样品(图1)。样品采集后置于无菌袋中,并在一周内放置于冰盒中运回实验室进行表面消毒处理<sup>[21]</sup>。消毒后,植物样品被剪成小段并在超净工作台中吹干。随后,植物样品在消毒灭菌后的状态下被打碎并密封于无菌离心管中,最终存储于-20℃备用。

### 1.2 主要试剂和仪器

FastDNA SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals 公司; T100 Thermal Cycler; Bio-Rad 公司; 5 Prime Hot Master Mix, QuantaBio 公司。HiSeq PE250, Illumina 公司。

### 1.3 总DNA提取、PCR扩增和基因克隆文库的构建

将冻存的植物样品送至广东美格基因科技有限公司进行总DNA提取、PCR扩增、基因



图1 植物样品描述

Figure 1 Plant samples description. A: *Anabasis eriopoda* (Schrenk) Benth. ex Volkens (AE). B: *Anabasis truncate* (Schrenk) Bunge (AT).

克隆文库构建和测序。根据说明书的方案,使用 FastDNA SPIN Kit for Soil 提取样品总 DNA。利用靶向特异性引物 ITS1F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和 ITS1R (5'-GCTGCGTTC TTCATCGATGC-3')扩增真菌的 ITS1 基因序列<sup>[16]</sup>。PCR 反应体系: MO BIO PCR H<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L, 5 Prime Hot Master Mix 25  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 基因组 DNA (78 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 6 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。所有样品检测合格后,使用 HiSeq PE250 平台进行高通量测序。

#### 1.4 序列处理与分析

首先使用 QIIME2 平台的 cutadapt 插件去除原始数据中的引物<sup>[22]</sup>。然后,利用 QIIME2 平台的 DADA2 插件对所有 reads 进行合并、去噪、过滤嵌合体、去冗余、预测生物序列等操作,获得特征表和代表性序列<sup>[23]</sup>。每个扩增子序列变异(amplicon sequence variant, ASV)定义为序列相似性为 100%的 reads 簇。每个 ASV 都使用 QIIME feature-classifier 插件基于 Unite 数据库进行物种注释。然后,使用 QIIME2 (V2020.8)过滤未得到有效注释的 ASVs<sup>[24]</sup>。将无单体(singleton)的特征表按所有样品中数据量最小的 reads 数进行抽平,以用于多样性的计算和比较。采用单因素方差分析和 *t* 检验来比较两种盐生植物内生真菌的多样性。稀释曲线、箱线图以及物种组成图的绘制使用 R 包“Phyloseq”完成。Venn 图的绘制使用 R 包“VennDiagram”完成。采用主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)方法评价两种盐生植物内生真菌群落结构之间的关系。此外,利用 LEfSe (linear discriminant analysis effect size)寻找两种盐生植物在丰度上存在显著差异的生物标志物(biomarkers)。系统发育树的构建选择相对丰度

前 100 的真菌 ASVs 代表性序列,在 QIIME2 平台上使用 align-to-tree-mafft-fasttree 流程构建完成,并使用 interactive tree of life (iTOL)进行进化树的美化与展示。最后,使用 PICRUST2 (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states)来预测内生真菌的潜在功能。基于 PICRUST2 的内生真菌功能预测和可视化采用 Microeco bioinformatics cloud (<https://www.bioincloud.tech/>)和 STAMP 软件(statistical analysis of taxonomic and functional profiles, V2.1.3)完成。基于 FUNGuild (<http://www.funguild.org/>)对内生真菌按功能类别进行分类注释,并使用 BioLadder 在线分析平台完成可视化绘图。本研究所获得的完整内生真菌序列已经上传至 NCBI 的 SRA 数据库中,登录号为 SAMN17935013-SAMN17935018。

## 2 结果与分析

### 2.1 微生物群落的丰富度和多样性

本研究采用 DADA2 进行 reads 质量过滤、去噪等,并使用 QIIME2 去除无效注释的 reads。最终从两种盐生植物中获得了 97 201 条高质量 reads,各样本中的 reads 数量在 4 804-34 950 之间(表 1)。Rarefaction 曲线结合测序深度估算(coverage)表明,测序深度已经足够大,可以获得样品中大部分真菌的多样性特征(图 2)。

在所有克隆文库中共检测到 166 个真菌 ASVs。使用 Venn 图展示了两个样本中共有和独有的 ASVs 数目,以直观地表现各样本的 ASVs 组成情况。从图 3 可以看出,两种盐生植物内生真菌群落组成中共有的 ASVs 数为 9 个,AT (*Anabasis truncate*)和 AE (*Anabasis eriopoda*)独有的 ASVs 数分别为 133 个和 24 个。此外,与 AT 相关的内生真菌的丰富度和多样性均高于 AE,但差异不显著(图 4)。

表 1 基于 DADA2 数据过滤后的序列统计

Table 1 Statistics of sequences from the two halophytes after filtering out low-quality and chimeric reads based on DADA2

Sample ID	Input	Filtered	Percentage of input passed filter (%)	Denoised	Merged	Percentage of input merged (%)	Non-chimeric	Percentage of input non-chimeric (%)	Effective annotation reads
AE1	182 530	149 841	82.09	149 226	139 222	76.27	123 668	67.75	7 085
AE2	220 594	185 059	83.89	184 515	172 116	78.02	155 376	70.44	4 804
AE3	220 356	178 297	80.91	177 570	166 151	75.4	146 972	66.70	11 142
AT1	208 114	179 630	86.31	179 102	171 382	82.35	163 307	78.47	34 950
AT2	245 002	211 086	86.16	210 281	203 403	83.02	185 066	75.54	23 001
AT3	175 888	152 433	86.66	151 999	146 987	83.57	142 758	81.16	16 219

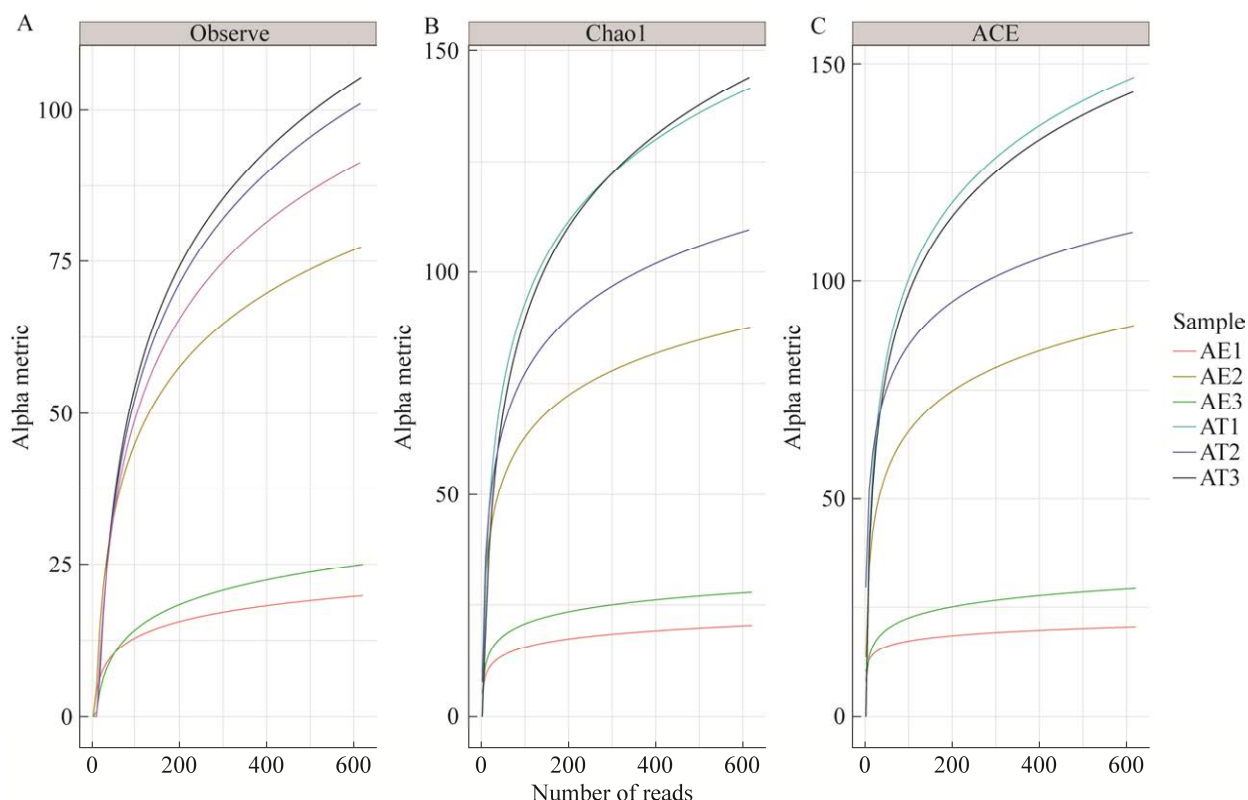


图 2 两种盐生植物内生真菌 ITS1 区序列的稀释曲线

Figure 2 Rarefaction curves based on the sequences of the ITS1 region of endophytic fungi associated with two halophytes.

$\alpha$  多样性分析结合一系列统计分析和检验可以反映环境中微生物群落的物种丰富度和多样性。从图 3 可以看出, AT 中内生真菌的丰富度和多样性均高于 AE, 且 AT 和 AE 中的丰富度 (observed\_ASVs) 存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。然而,

香农多样性指数 (Shannon) 和辛普森多样性指数 (Simpson) 在 AT 和 AE 之间无显著性差异。因此, 为了更好地了解两种盐生植物内生真菌的多样性方面的差异, 未来的研究需要采集更多的生物学重复样品。

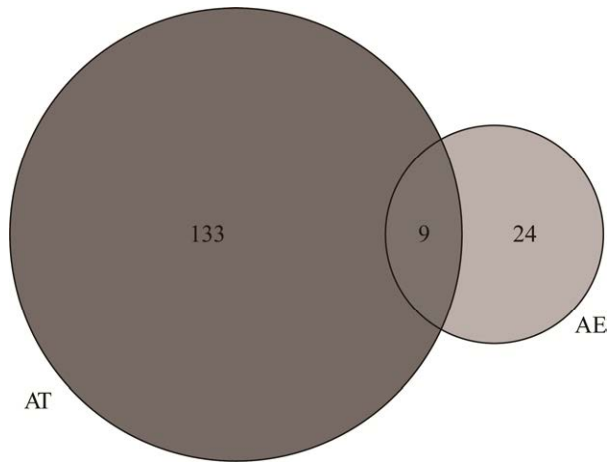


图3 两种不同盐生植物之间共有和特有的ASVs数  
Figure 3 The shared and exclusive ASVs among two different halophytes.

## 2.2 两种盐生植物内生真菌群落组成

利用高通量测序技术分析了两种植物内生真菌的群落组成,共鉴定出166个内生真菌ASVs,分类归属于4门13纲25目37科49属(图5)。在两种植物中,*Ascomycota*是优势类群,而在AT中,*Basidiomycota*类群的相对丰度更高。*Dothideomycetes*是优势类群,其相对丰度在AE和AT中都比较高。*Pleosporales*和*Botryosphaeriales*在两种植物中都是优势目,而*Capnodiales*在样品AE2中具有较高的丰度。*Pleosporaceae*和*Botryosphaeriaceae*的相对丰度在两种植物中都比较高,而*Didymosphaeriaceae*在AT中分布更广,*Mycosphaerellaceae*在样品

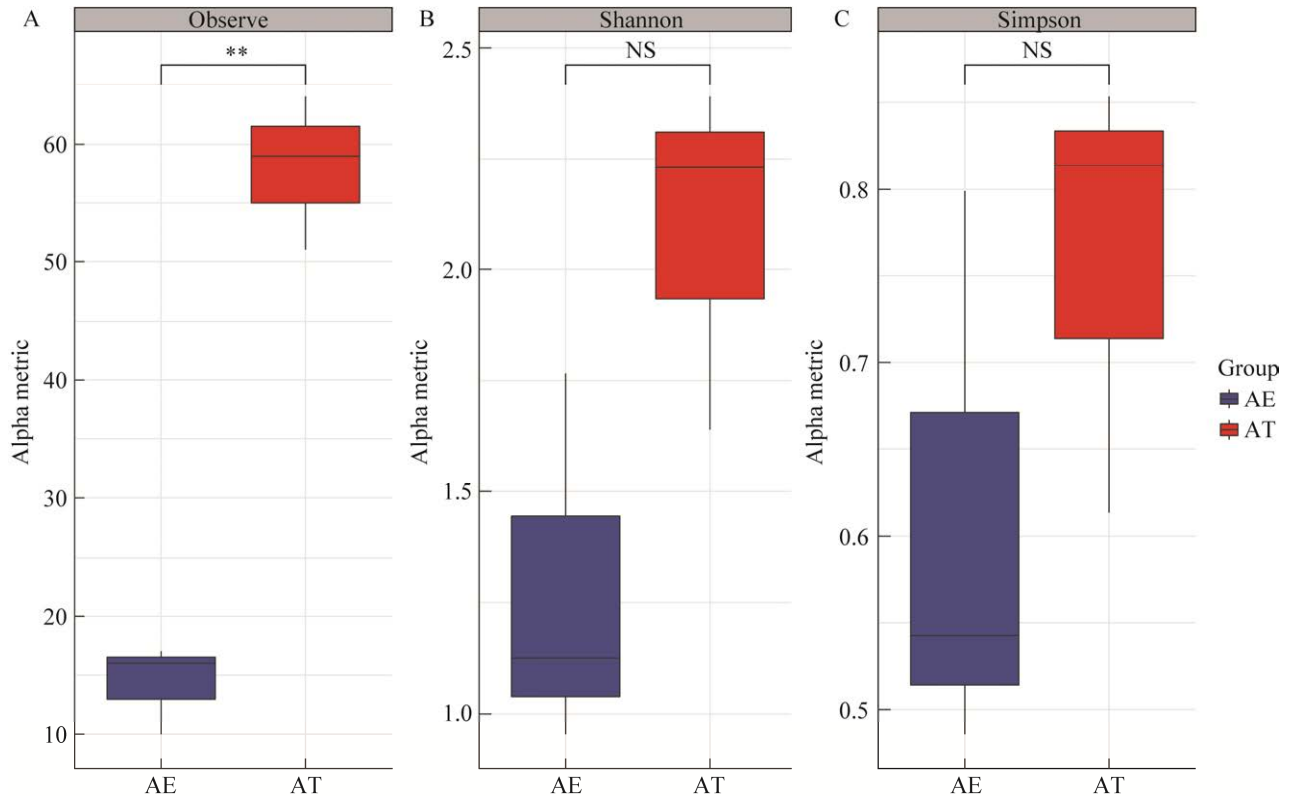


图4 箱线图展示了两种盐生植物内生真菌的多样性差异 \*\*：具有显著性差异；NS：无显著性差异  
Figure 4 The boxplots show the differences of diversity of endophytic fungi associated with *Anabasis truncata* (Schrenk) Bunge and *Anabasis eriopoda* (Schrenk) Benth ex Volkens. \*\*: Significant difference; NS: Non-significant difference.



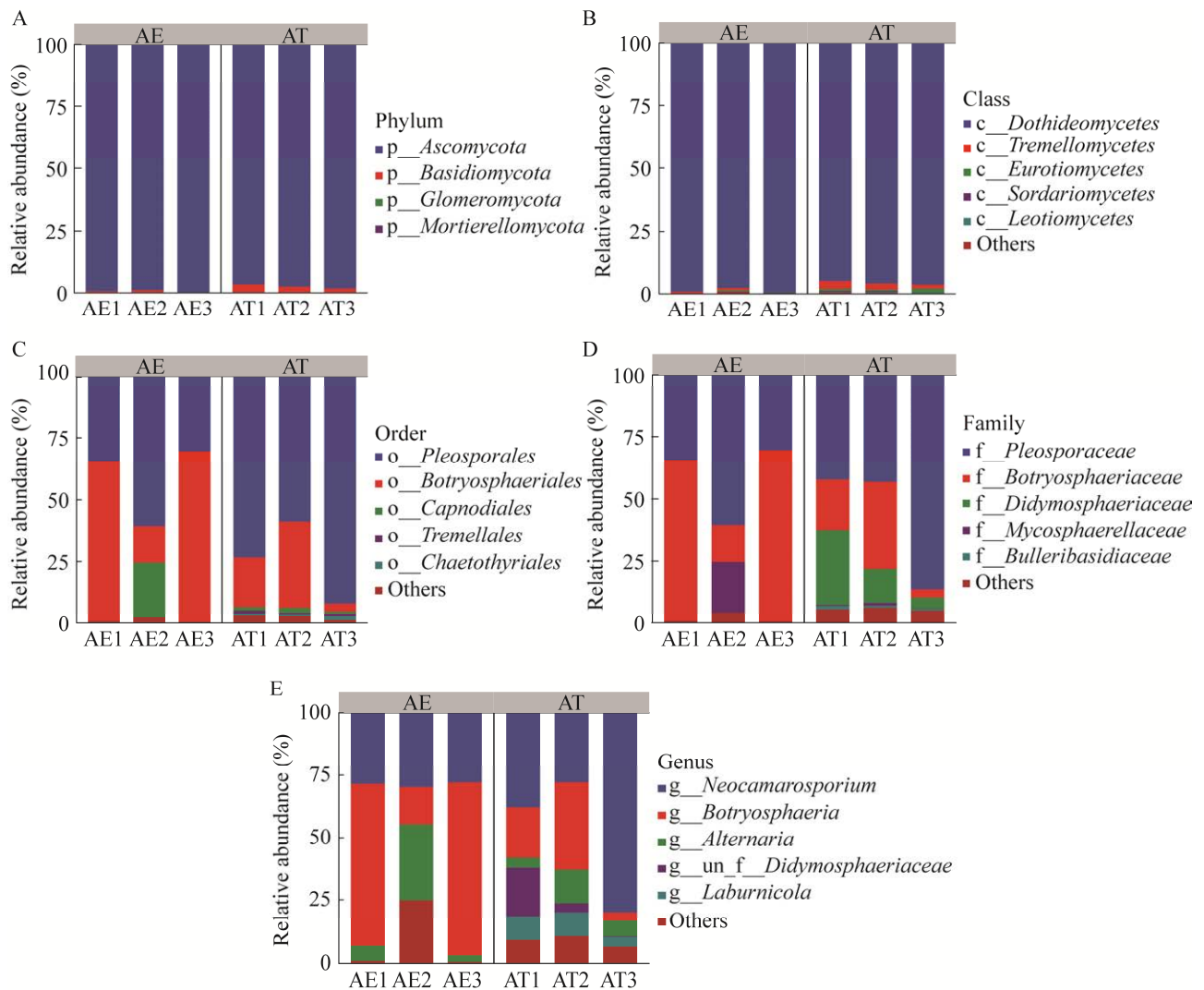


图 5 不同样品内生真菌在门(A)、纲(B)、目(C)、科(D)和属(E)水平上的群落组成

Figure 5 Endophytic fungal community at the phylum (A), class (B), order (C), family (D), and genus (E) levels (top 5) in different samples.

AE2 中相对丰度较高。比较两种盐生植物内生真菌属的群落组成可以发现, *Neocamarosporium*、*Botryosphaeria* 和 *Alternaria* 在两种植物中都处于优势属的地位, 而 *Laburnicola* 仅在 AT 中有较高的丰度。此外, 从纲、目、科和属等分类水平的物种组成图中可以看出, AT 中的内生真菌多样性要高于 AE。尤其值得注意的是, *Dothideomycetes* 类群在两种植物内的相对丰度占到了 94%–99%。

### 2.3 两种盐生植物内生真菌群落组成差异分析

两种盐生植物的内生真菌群落组成存在显著差异。LEfSe 分析显示(图 6), 某些内生真菌类群的丰度在两种植物中存在显著差异。共发现 16 个生物标志物, 其中 15 个在 AT 中丰度显著富集, 1 个在 AE 中丰度显著富集。AT 中富集的生物标志物主要包括 2 个门的真菌类群, 如 *Didymosphaeriaceae*、*Laburnicola*、

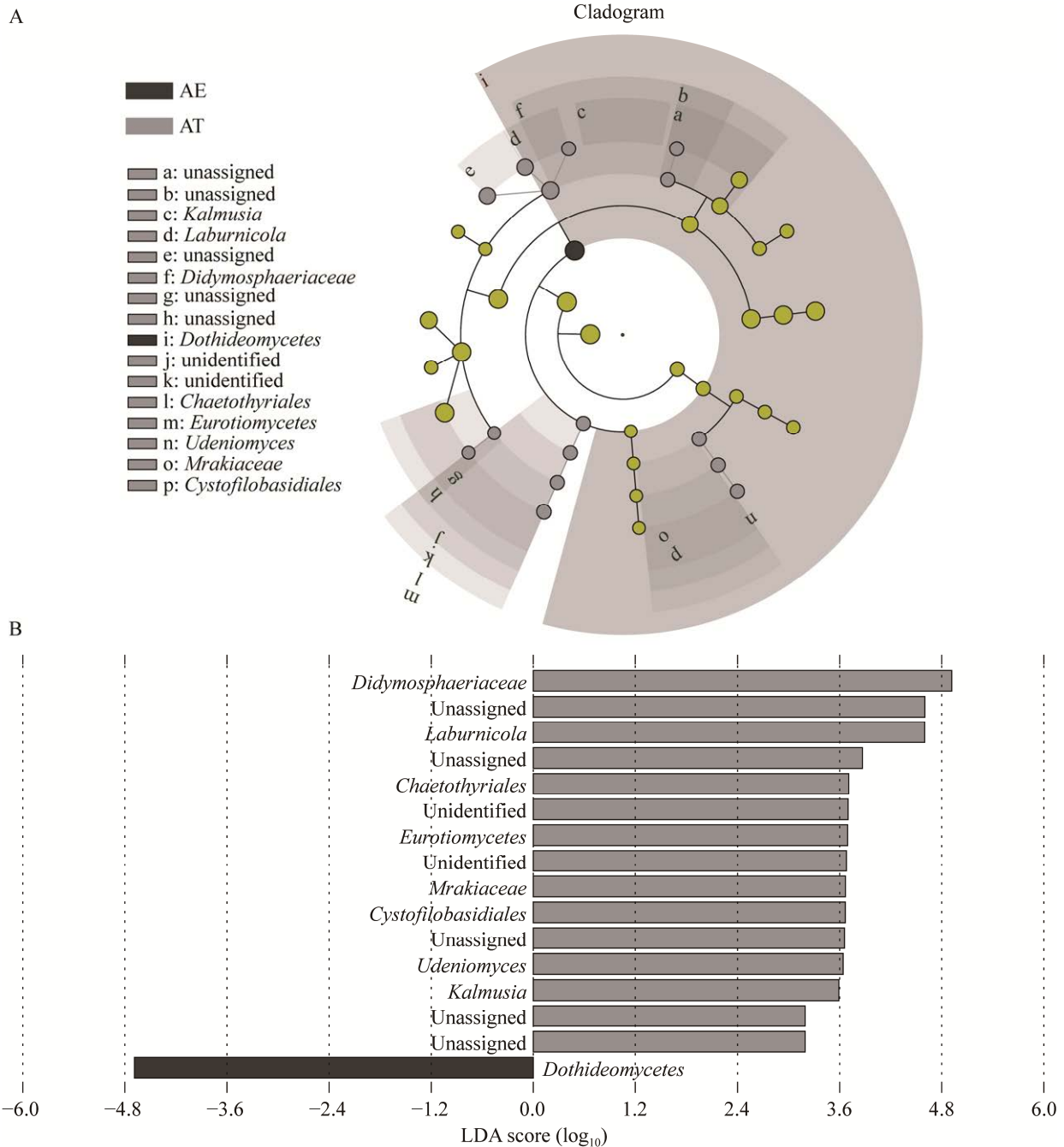


图 6 基于 LEfSe 分析内生真菌生物标志物

Figure 6 Endophytic fungal biomarkers based on LEfSe analysis (LDA>2,  $P<0.05$ ).

*Chaetothyriales*、*Eurotiomycetes*、*Mrakiaceae*、*Cystofilobasidiales*、*Udeniomyces*、*Kalmusia* 等，而在 AE 中仅有 *Dothideomycetes* 类群富集。

通过非加权 UniFrac 距离进行的  $\beta$  多样性

分析表明，不同样品的内生真菌群落组成差异较大。PCoA 分析结果显示(图 7)不同样品之间的内生真菌群落组成差异较大，其中 PCoA1 和 PCoA2 分别解释了 46.2%和 24.15%的变异，



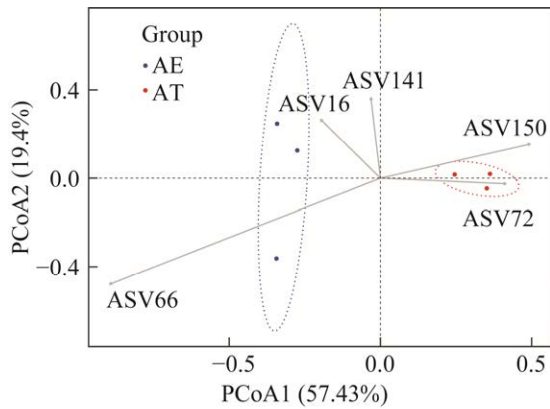


图 7 PCoA 揭示不同样本中微生物群落的组成差异

Figure 7 Principal coordinate analysis (PCoA) of different microbiota in different samples.

PCoA1 能解释两种盐生植物内生真菌群落组成变化的主要成分。虽然属于同一种盐生植物的样品基本聚集在一起,但其他样品在两种不同的盐生植物之间存在较强的分离,表明两种盐生植物内生真菌的群落组成存在较大的差异。图 7 还进一步显示了一些富集于 AT 或 AE 中的 ASVs (amplicon sequence variant), 如 ASV16 (*s\_Mycosphaerella\_tassiana*)、ASV66 (*g\_Botryosphaeria*) 和 ASV141 (*s\_Alternaria\_alternata*) 在 AT 中富集, 而 ASV72 和 ASV150 在 AE 中富集。

#### 2.4 两种盐生植物内生真菌的系统发育学分析

本研究选择了两种盐生植物内生真菌丰度前 100 的代表性序列构建系统发育树。门水平分析发现这些高丰度内生真菌仅属于 2 个门 *Ascomycota* 和 *Basidiomycete*, 多样性较低。然而在目和科等分类水平上分析则发现这两种盐生植物的内生真菌多样性较高, 丰度前 100 的 ASVs 属于 2 门 8 纲 15 目 24 科 27 属。其中, *Ascomycota* 有 74 个 ASVs, *Basidiomycete* 有 26 个 ASVs。系统发育树还展示了特定类群的定向富集, 即 *Botryosphaeria* 在 AT 中的丰度较

高, 而 *Neocamarosporium* 的丰度在 AE 中更高。此外, 系统发育树显示, 与这两种盐生植物相关的内生真菌 ASVs 中包含一些未分类的潜在新类群(图 8)。

#### 2.5 内生真菌的功能预测

本研究使用了 PICRUSt2 算法预测了内生真菌的宏基因组功能, 发现了 68 个与 MetaCycle 通路相关的通路, 包括辛烷氧化、有氧呼吸 I (细胞色素 c)、有氧呼吸 II (细胞色素 c) (酵母)、乙醛酸循环、GDP-甘露糖生物合成等。利用 STAMP 软件对预测结果进行差异比较发现, 2 种盐生植物中存在 61 个预测的内生真菌 MetaCycle 通路的显著性差异(图 9A)。其中, 在 AT 中有 22 个 MetaCycle 通路的丰度较高, 包括 L-tryptophan degradation to 2-amino-3-carboxymuconate semialdehyde、stearate biosynthesis III (fungi)、sucrose degradation III (sucrose invertase)、NAD/NADP-NADH/NADPH cytosolic interconversion (yeast) 等; 在 AE 中有 39 个 MetaCycle 通路的丰度较高, 包括 L-tyrosine degradation I、adenosine ribonucleotides de novo biosynthesis、D-galactose degradation V (Leloir pathway)、phosphopantothenate biosynthesis I 等。预测结果还检测到了内生真菌中较高丰度的尿素循环代谢通路的基因丰度, 这表明内生真菌在植物氮源吸收等方面具有重要作用(图 9B)。然而, 内生真菌的潜在代谢潜能需要进一步通过纯培养或宏基因组研究进行验证, 这可能为内生菌与宿主植物之间的互利共生机制提供了新的见解。

此外, 本研究还使用了 FUNGuild 对内生真菌的功能进行预测, 并发现了 pathotroph、saprotroph 和 symbiotroph 这 3 种营养模式的存在(图 9C)。对内生真菌群落的物种信息进行注释发现, 2 种不同盐生假木贼属植物内生真菌

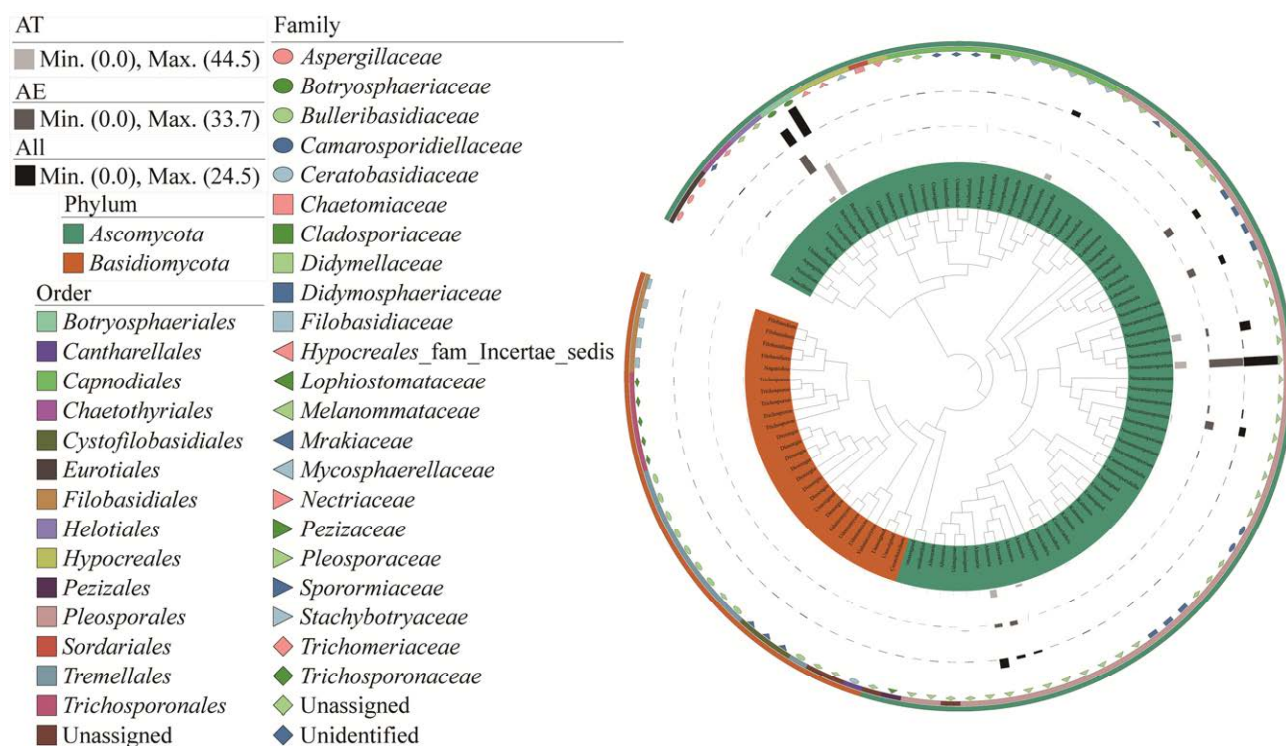


图 8 系统发育树状图显示两种不同盐生植物内生真菌丰度前 100 的 ASV 成员。颜色带和颜色范围表示进化树上的不同门和目，具有不同形状和颜色的模块表示不同的科，彩色条形图表示不同盐生植物中每个 ASV 的相对丰度；系统发育树的构建是使用 QIIME2 完成的，并使用 iTOL 进行系统发育树的美化展示。

Figure 8 Taxonomic dendrogram showing top 100 ASVs members of the endophytic bacteria of two different halophytes. The color straps and color ranges identify phyla within the tree. Modules with different shapes and colors represent different classes. Colored bars represent the relative abundance of each ASV in the different halophytes. The taxonomic dendrogram was generated with one representative sequence of each ASV using QIIME2 and displayed with the use of iTOL (interactive tree of life).

群落中不同类型的病原菌、共生菌和腐生菌的丰度差异较大。在 AE2 样品中，animal pathogen、undefined saprotroph-wood saprotroph、dung saprotroph-ectomycorrhizal-litter saprotroph-undefined saprotroph、plant pathogen、animal pathogen-endophyte-lichen parasite-plant pathogen-wood saprotroph 以及 leaf saprotroph 等营养类型的真菌丰度相对较高；而在 AT 样品组中，fungal parasite-undefined saprotroph、plant pathogen-wood saprotroph 等其他营养类型的真菌丰度相对更高。

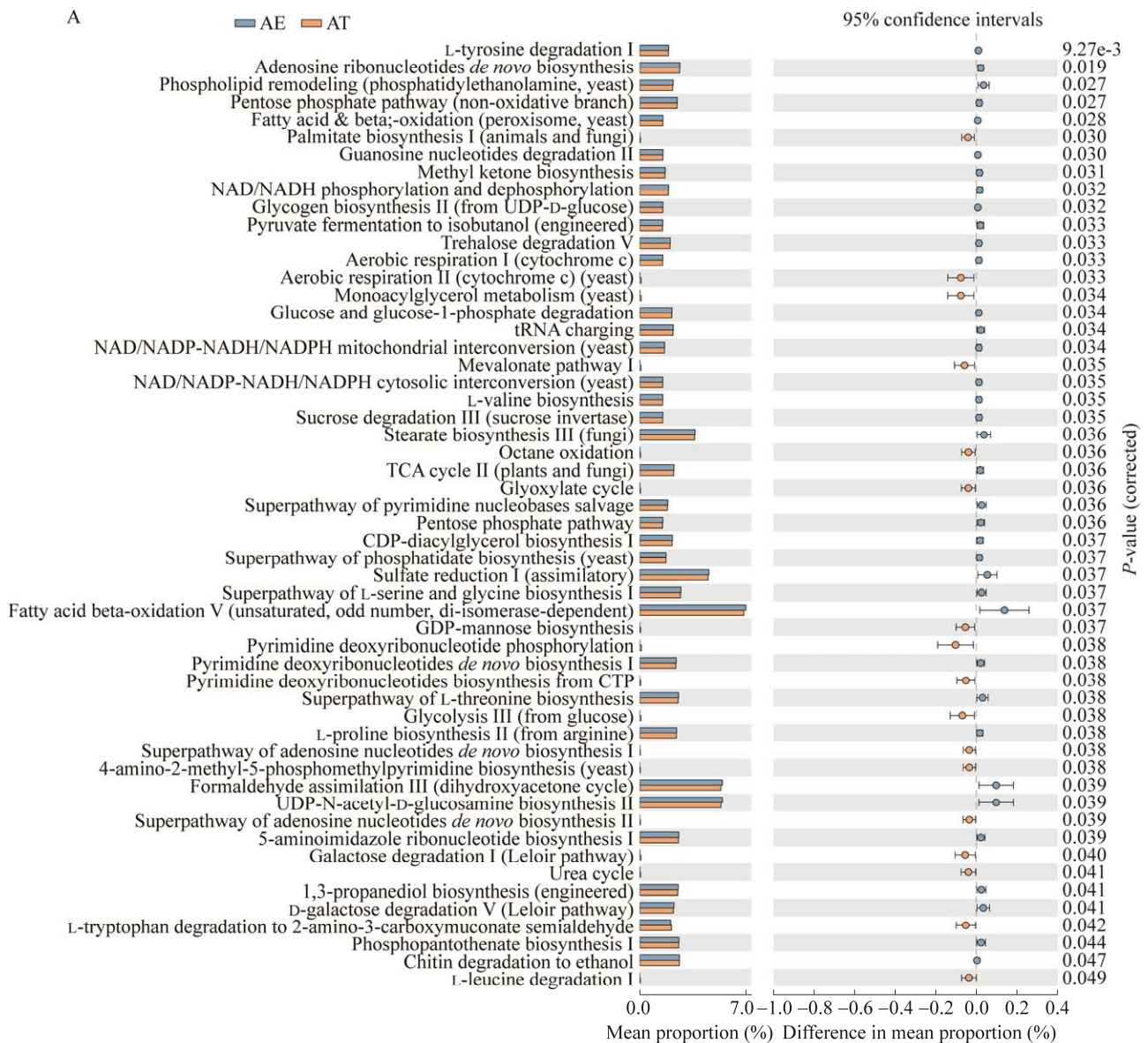
### 3 讨论与结论

本研究利用 Illumina 高通量测序技术，研究了生长于乌兹别克斯坦西咸海裸露带上的毛足假木贼和展枝假木贼两种盐生植物内生真菌的多样性。研究结果显示，这两种盐生植物的内生真菌在 ASVs 水平上具有不同的丰富度和多样性。本研究获得的 166 个 ASVs 归属于 4 门 13 纲 25 目 37 科 49 属，其中 *Neocamarosporium*、*Botryosphaeria* 和 *Alternaria* 及其上级分类群在 AE 和 AT 中占比较高，属于优势类群。群落组

成分析结果还表明, 同种假木贼的 3 个生物学重复存在一定差异, 特别是在目、科、属等分类水平上, 这可能是本研究想要探讨的威海裸露带两种盐生假木贼内生真菌的多样性和潜在生态功能, 未考虑植物的不同生态位对内生菌群落结构的影响。影响盐生植物内生菌多样性和群落组成的因素包括不同的植物、生长状态、生态位和土壤环境因素等。本研究结果发现, 两种不同盐生假木贼的内生真菌组成在科、属

等分类水平上差异较大, 可能是由不同植物所导致的内生菌差异。

张志东等利用不同的扩增引物对盐角草内生真菌群落进行了高通量测序分析, 发现共获得 102 个 OTU, 隶属于真菌界的 8 个门, 其中 *Ascomycota* 丰度最高, 成为绝对优势<sup>[25]</sup>。李海林等从黄河三角洲滨海湿地的 1 350 个芦苇组织切片中分离到 318 株内生真菌, 并进行测序及系统进化分析, 结果表明 *Ascomycota* 为绝对





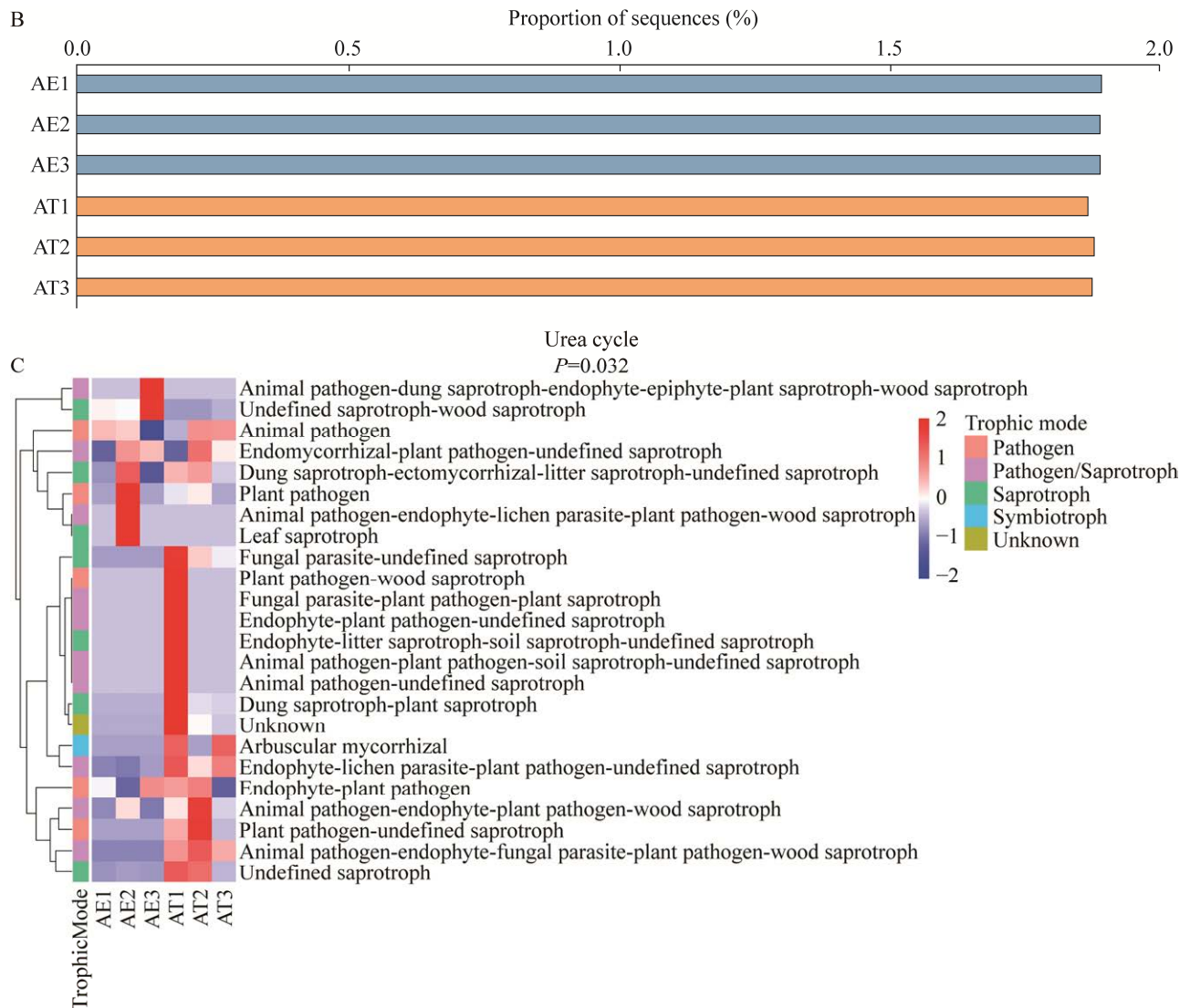


图 9 内生真菌的功能分组预测 A: 通过 STAMP 软件比较两种不同盐生植物内生真菌基于 PICRUSt2 预测的潜在功能差异(Welch's  $t$  检验;  $P<0.05$ ). B: PICRUSt2 预测潜在的 urea cycle 丰度. C: FUNGuild 对内生真菌的功能分组进行预测

Figure 9 The functional groups prediction of endophytic fungi. A: The potential functional differences of endophytic fungi associated with two different halophytes predicted based on PICRUSt2 were compared by stamp software (Welch's  $t$  test;  $P<0.05$ ). B: PICRUSt2 predicted urea cycle abundance. C: FUNGuild predicted the functional groups of endophytic fungi.

优势菌群, 在各组织和部位中均有分布, 且受不同盐度和不同组织部位的影响不显著<sup>[26]</sup>. 丁小维<sup>[27]</sup>采用不同盐度的培养基分离盐蒿内生耐盐真菌并研究其多样性, 共获得 1 215 株内生耐盐真菌, 鉴定结果也显示 *Ascomycota* 为绝对

优势菌群。Li 等<sup>[28]</sup>从 10 种沙漠盐生植物中分离出 36 株内生真菌, 发现不同植物种类和寄生植物组织部位对内生真菌群落组成有显著影响, 表现出一定的寄主和组织偏好性。Khalmuratova 等<sup>[29]</sup>从生长于盐沼泽上的 5 种盐生植物中分离

出了 160 株内生真菌, 主要隶属于 *Ascomycota*、*Basidiomycota* 和 *Zygomycota*, 其中芦苇中可培养内生真菌的多样性最高。综上所述, *Ascomycota* 是盐生植物内生真菌的主要优势类群之一。

本研究使用 LEfSe 分析方法发现了两种不同盐生植物中存在丰度差异的内生真菌 biomarkers, 结果表明子囊菌是盐生植物的主要内生真菌; 对 PCoA 分析结果的探究显示, 不同盐生植物内生真菌的群落结果存在差异。为进一步研究造成这种差异的原因, 后续会进行全面采样, 包括记录植物的年龄、生长状态以及土壤的物理和化学性质, 以进行测序验证。本研究对丰度前 100 的 ASVs 进行了系统发育分析, 发现两种盐生植物的内生真菌在目和科分类水平上有较高的多样性, 并且还大量存在未分类的内生真菌类群。因此未来的研究需要探索纯培养方法, 以分离潜在的新内生真菌类群, 并研究内生真菌在促进植物生长和抗胁迫等方面的潜在功能。

本研究使用 PICRUST2 预测了两种盐生植物内生真菌 MetaCycle 通路的丰度, 共检测到 68 个相关代谢通路, 差异丰度分析表明 61 个通路在两种盐生植物中存在显著性差异。内生真菌的 MetaCycle 通路丰度预测结果表明两种盐生植物内生真菌的代谢具有多样性的特点, 与基础代谢相关的功能通路丰度较高, 如 L-tyrosine and L-leucine degradation I、trehalose degradation V、D-galactose degradation V 等, 表明植物可以为内生真菌提供充足且优质的底物供其正常生存代谢。此外, 较高丰度的尿素循环(urea cycle)功能通路表明内生真菌在介导植物氮源吸收等方面可以发挥重要作用。FUNGuild 的功能分组预测结果表明两种盐生植物内生真菌的营养方式多样, 且营养模式差异较大, 包括 pathotroph、saprotroph 和 symbiotroph 三种营养模式。其中, pathotroph 型真菌可能导致植

物病害, 而 saprotroph 型真菌可能在植物碎屑以及正常凋零和死亡的植物器官及细胞降解过程中发挥作用, symbiotroph 型真菌可能与宿主植物存在较多的代谢互动, 为对方提供所需营养物质。本研究还发现不同植物的内生真菌多样性及微生物群落组成具有差异效应, 但它们的潜在生态功能具有类似的结果。

## REFERENCES

- [1] GLENN EP, BROWN JJ, BLUMWALD E. Salt tolerance and crop potential of halophytes[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1999, 18(2): 227-255.
- [2] ASADULLAH A, BANO A. Climate change modulates halophyte secondary metabolites to reshape rhizosphere halobacteria for biosaline agriculture[J]. *Applied Sciences*, 2023, 13(3): 1299.
- [3] YIN ZP, ZHANG H, ZHAO Q, YOO MJ, ZHU N, YU JL, YU JJ, GUO SY, MIAO YC, CHEN SX, QIN Z, DAI SJ. Physiological and comparative proteomic analyses of saline-alkali NaHCO<sub>3</sub>-responses in leaves of halophyte *Puccinellia tenuiflora*[J]. *Plant and Soil*, 2019, 437(1): 137-158.
- [4] XIA F, JIANG G, LU J. Development of the study on halophyte's structure of resisting saline-alkali[J]. *Journal of Tonghua Normal University*, 2002, 23(2): 67-69.
- [5] GUPTA B, HUANG BR. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization[J]. *International Journal of Genomics*, 2014, 2014: 701596.
- [6] AFZAL I, SHINWARI ZK, SIKANDAR S, SHAHZAD S. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants[J]. *Microbiological Research*, 2019, 221: 36-49.
- [7] WANI ZA, ASHRAF N, MOHIUDDIN T, RIYAZ-UL-HASSAN S. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(7): 2955-2965.
- [8] PATRICK A, ANSON M, OLGA P, MELANIE L. A high-resolution diatom-inferred palaeoconductivity and lake level record of the Aral Sea for the last 1600 yr[J]. *Quaternary Research*, 2007, 67(3): 383-393.
- [9] ZHAO CZ, ZHANG H, SONG CP, ZHU JK, SHABALA S. Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity[J]. *The Innovation*, 2020,



- 1(1): 100017.
- [10] KUSHWAHA P, KASHYAP PL, BHARDWAJ AK, KUPPUSAMY P, SRIVASTAVA AK, TIWARI RK. Bacterial endophyte mediated plant tolerance to salinity: growth responses and mechanisms of action[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 36(2): 26.
- [11] JIANG HC, HUANG JR, LI L, HUANG LQ, MANZOOR M, YANG J, WU G, SUN XX, WANG BC, EGAMBERDIEVA D, PANOSYAN H, BIRKELAND NK, ZHU ZH, LI WJ. Onshore soil microbes and endophytes respond differently to geochemical and mineralogical changes in the Aral Sea[J]. Science of the Total Environment, 2021, 765: 142675.
- [12] RANA KL, KOUR D, KAUR T, DEVI R, YADAV AN, YADAV N, DHALI WAL HS, SAXENA AK. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2020, 113(8): 1075-1107.
- [13] HARDOIM PR, van OVERBEEK LS, BERG G, PIRTTILÄ AM, COMPANT S, CAMPISANO A, DÖRING M, SESSITSCH A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2015, 79(3): 293-320.
- [14] KULDAU G, BACON C. Clavicipitaceous endophytes: their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses[J]. Biological Control, 2008, 46(1): 57-71.
- [15] TIAN XY, ZHANG CS. Illumina-based analysis of endophytic and rhizosphere bacterial diversity of the coastal halophyte *Messerschmidia sibirica*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2288.
- [16] 黄建蓉, 高磊, 李丽, 李文均, 蒋宏忱. 咸海湖泊退缩对岸边土壤真菌和植物内生真菌的影响研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(6): 1681-1697.
- HUANG JR, GAO L, LI L, LI WJ, JIANG HC. Influence of lake desiccation on the endophytic and soil fungal communities on the Aral Sea shore[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(6): 1681-1697 (in Chinese).
- [17] 钮旭光, 宋立超, 韩梅, 肖亦农. 盐生植物翅碱蓬的内生真菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2012, 39(10): 1388-1395.
- NIU XG, SONG LC, HAN M, XIAO YN. Diversity of endophytic fungi of *Suaeda heteroptera* kitag[J]. Microbiology China, 2012, 39(10): 1388-1395 (in Chinese).
- [18] 刘晓静, 张志东, 唐琦勇, 顾美英, 张丽娟, 宋素琴, 朱静. 新疆和硕干旱荒漠区盐爪爪内生真菌群落特征分析[J]. 干旱区资源与环境, 2020, 34(6): 159-165.
- LIU XJ, ZHANG ZD, TANG QY, GU MY, ZHANG LJ, SONG SQ, ZHU J. Diversity of endophytic fungi community in *Kalidium caspicum* from arid desert area in Heshuo County of Xinjiang[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2020, 34(6): 159-165 (in Chinese).
- [19] 唐琦勇, 朱静, 楚敏, 顾美英, 孙建, 艾尼江·吾斯满, 张志东. 北疆盐角草内生真菌群落组成和分布[J]. 干旱区资源与环境, 2021, 35(5): 137-143.
- TANG QY, ZHU J, CHU M, GU MY, SUN J, AINIJIANG WUSIMAN, ZHANG ZD. Community composition and distribution of endophytic fungi in *Salicornia europaea* from the northern Xinjiang[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2021, 35(5): 137-143 (in Chinese).
- [20] WANG HF, ZHANG YG, CHEN JY, GUO JW, LI L, HOZZEIN WN, ZHANG YM, WADAAN MAM, LI WJ. *Frigoribacterium endophyticum* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the root of *Anabasis elatior* (C. A. Mey.) Schischk[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt 4): 1207-1212.
- [21] LIU YH, GUO JW, LI L, ASEM MD, ZHANG YG, MOHAMAD OA, SALAM N, LI WJ. Endophytic bacteria associated with endangered plant *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen in an arid land: diversity and plant growth-promoting traits[J]. Journal of Arid Land, 2017, 9(3): 432-445.
- [22] KECHIN A, BOYARSKIKH U, KEL A, FILIPENKO M. cutPrimers: a new tool for accurate cutting of primers from reads of targeted next generation sequencing[J]. Journal of Computational Biology, 2017, 24(11): 1138-1143.
- [23] CALLAHAN BJ, McMURDIE PJ, ROSEN MJ, HAN AW, JOHNSON AJA, HOLMES SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature Methods, 2016, 13(7): 581-583.
- [24] BOKULICH NA, KAEHLER BD, RIDEOUT JR, DILLON M, BOLYEN E, KNIGHT R, HUTTLEY GA. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 90.
- [25] 张志东, 朱静, 唐琦勇, 顾美英, 楚敏. 不同扩增引

- 物对高通量测序分析盐角草内生真菌多样性的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 411-419.
- ZHANG ZD, ZHU J, TANG QY, GU MY, CHU M. Effects of different amplification primers on diversity analysis of endophytic fungi in *Salicornia europaea* by the high-throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 411-419 (in Chinese).
- [26] 李海林, 马斌, 张晓黎, 张倩倩, 郭晓红, 范德朋, 龚骏. 滨海湿地植物芦苇可培养内生真菌的多样性[J]. 应用生态学报, 2016, 27(7): 2066-2074.
- LI HL, MA B, ZHANG XL, ZHANG QQ, GUO XH, FAN DP, GONG J. Diversity of culturable endophytic fungi of common reed (*Phragmites australis*) in coastal wetland[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(7): 2066-2074 (in Chinese).
- [27] 丁小维. 盐蒿内生耐(嗜)盐真菌的分离及鉴定[J]. 陕西理工学院学报(自然科学版), 2014, 30(4): 55-60.
- DING XW. Isolation and identification of endophytic halotolerant and halophilic fungi associated with *Artemisia halodendron*[J]. Journal of Shaanxi University of Technology (Natural Science Edition), 2014, 30(4): 55-60 (in Chinese).
- [28] LI JL, SUN X, ZHENG Y, LÜ PP, WANG YL, GUO LD. Diversity and community of culturable endophytic fungi from stems and roots of desert halophytes in northwest China[J]. MycoKeys, 2020, 62: 75-95.
- [29] KHALMURATOVA I, KIM H, NAM YJ, OH Y, JEONG MJ, CHOI HR, YOU YH, CHOO YS, LEE IJ, SHIN JH, YOON H, KIM JG. Diversity and plant growth promoting capacity of endophytic fungi associated with halophytic plants from the west coast of Korea[J]. Mycobiology, 2015, 43(4): 373-383.