

DOI: 10.11686/cyxb2016271

http://cyxb.lzu.edu.cn

曹苗文, 贾彤, 景炬辉, 柴宝峰. 铜尾矿库白羊草内生真菌的分布及 rDNA-ITS 系统发育. 草业学报, 2017, 26(5): 163-172.

CAO Miao-Wen, JIA Tong, JING Ju-Hui, CHAI Bao-Feng. Distribution and rDNA-ITS sequence analysis of endophyte symbionts of *Bothriochloa ischaemum* at a copper tailings site. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(5): 163-172.

铜尾矿库白羊草内生真菌的分布及 rDNA-ITS 系统发育

曹苗文¹, 贾彤^{1*}, 景炬辉², 柴宝峰¹

(1. 山西大学黄土高原研究所, 山西 太原 030006; 2. 山西大学生物技术研究所, 山西 太原 030006)

摘要:对北方铜业铜矿峪矿十八河尾矿库的优势植被白羊草内生真菌染菌率进行调查, 采集活体植株进行叶鞘内生真菌分离, 并对白羊草内生真菌的形态特征及孢子形态进行描述, 同时, 选取其中 16 株进行 5.8S-ITS 扩增、测序和系统发育分析。结果表明, 从生长在 4 个不同恢复年限子坝的白羊草中分离出形态不同的内生真菌, 其中以白色菌落居多, 生长速度位于 5.515~12.548 mm/d 之间。孢子形态以球型和椭圆型为主, 大小介于 2.085~7.072 μm 之间。分子鉴定结果显示 16 种内生真菌属于 3 个属, 为赤霉属(*Gibberella*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、青霉属(*Penicillium*), 恢复 30 年与 5 年的子坝白羊草内生真菌遗传距离最小, 亲缘关系最近, 恢复 45 年与 15 年的子坝白羊草内生真菌亲缘关系最远。铜矿库不同恢复年限的土壤环境可能导致白羊草感染内生真菌的多样性, 这为进一步丰富铜尾矿库内生真菌资源, 揭示生活在铜尾矿的白羊草内生真菌的生态功能提供理论依据。

关键词:铜尾矿库; 重金属; 白羊草; 内生真菌

Distribution and rDNA-ITS sequence analysis of endophyte symbionts of *Bothriochloa ischaemum* at a copper tailings site

CAO Miao-Wen¹, JIA Tong^{1*}, JING Ju-Hui², CHAI Bao-Feng¹

1. Institute of Loess Plateau, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Tailing ponds are special growth environment for plants. Soils at such sites contain high concentrations of heavy metals, which affect the physiology and ecology of plants. The aim of this study was to evaluate the endophytic fungi resources at a copper mine tailings site, and to explore whether different endophytic fungi can restore diversity by altering the physical and chemical properties of soil. Therefore, we studied endophytic fungi of *Bothriochloa ischaemum* growing in the Shibahe tailings pools at the Tongkuangyu Mine, a copper tailings site. *B. ischaemum* is the dominant species growing at this site, and it grows in several sub-dams with different recovery times. To investigate the endophytic fungi infection rate of *B. ischaemum*, we collected live plants and separated the endophyte from the sheath, and observed and described the characteristics and spore morphology of each fungus. We also selected 16 strains and amplified the 5.8S-ITS region for sequencing and phylogenetic analysis. Based on their phenotypes, the endophytes from *B. ischaemum* growing in four different sub-dams with different recovery times were separated into different groups. Most endophyte colonies were

* 收稿日期: 2016-07-05; 改回日期: 2016-09-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31600308), 山西省应用基础研究面上青年基金项目(201601D021101), 山西省回国留学人员科研资助项目(2016-006)和山西省科技攻关项目(20150313001-3)资助。

作者简介: 曹苗文(1992-), 女, 山西汾阳人, 硕士。E-mail: 18234057492@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: jiatong@sxu.edu.cn

white, and the growth rate ranged from 5.515 and 12.548 mm/d. The endophytes produced spherical or oval/near oval spores, with sizes ranging from 2.085 μm to 7.072 μm . Sequence analyses showed that there were three different sequences among the 16 kinds of colonies, belonging to the genera *Gibberella*, *Fusarium*, and *Penicillium*. The smallest genetic distance was between the sub-dam with 30-years recovery and that with 5-years recovery. The largest genetic distance was between the sub-dam with 45-years recovery and that with 15-years recovery. At copper tailings sites, different soil environments at different stages of restoration might lead to a wide diversity of endophytes infecting *B. ischaemum*. The results of this study provide a theoretical basis for enriching endophyte resources, and reveal some of the ecological functions of endophytes associated with *B. ischaemum* at a copper tailings site.

Key words: copper tailings; heavy metal; *Bothriochloa ischaemum*; endophyte

十八河尾矿库位于山西运城垣曲县,其坝体为人工堆积,将库区近坝体尾矿推至坝前,通过碾压处理将其压实,上覆黄土,形成坝体^[1]。自1969年建坝以来,随着植被修复的进行,逐渐形成不同演替阶段的植物群落,其中,白羊草(*Bothriochloa ischaemum*)是其优势种之一。白羊草是禾本科孔颖草属多年生丛生禾草,属于暖季型草本;短根状茎,疏丛型,株高在25~80 cm之间;品质好,适口性强,耐旱及再生能力强,对土壤酸碱度要求不高,是黄土高原地区的主要牧草。通常作为优势种生长于斜坡、路边、田边和干旱多石等区域,在山西主要分布在晋城、晋中、运城、临汾^[2-4]。

内生真菌(endophyte)在1866年由De Bary首次提出^[5],后定义为生活在植物组织中,但不会让植物产生可见症状的真菌。内生真菌种类众多,分布在各种植物体内,从苔藓、藻类、蕨类到种子植物,从寒带植物到热带植物,从农作物到热带雨林植物都有发现^[6]。从红树林、马齿苋(*Portulaca oleracea*)中分离出的镰刀菌属(*Fusarium*)^[7-8],胡杨(*Populus diversifolia*)中的青霉属(*Penicillium*)、木霉属(*Trichoderma*)^[9],食用菌中分离出的丛赤壳菌(*Nectriaceae*)^[10],甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)中分离出的赤霉菌属(*Gibberella*)^[11],从马齿苋中还分离出附球菌属(*Epicoccum*)^[8]以及从披碱草(*Elymus dahuricus*)、羽茅(*Achnatherum sibiricum*)、羊草(*Leymus chinensis*)中分离出的*Epichloë*属内生真菌。比如,天然禾草羊草中存在的*Epichloë bromicola*,羽茅中的*Epichloë sibirica*,*Epichloë gansuensis*^[12-17]。但是对天然禾草白羊草中内生真菌的研究还未见报道。

本研究所在样地存在严重的镉、铅、铜污染问题,但是白羊草依然能够在此处正常生长,成为优势种,其原因鲜有报道。有研究指出,在高羊茅(*Festuca arundinacea*)中接种内生真菌能够促进植物在镉胁迫环境中生长^[18]。深色有隔内生真菌通过提高植物光合作用,改变植物根际微生物,促进植物矿质元素的吸收和有机养分的吸收来提高植物耐重金属的能力^[19]。那么,白羊草是否因感染内生真菌使其能够很好地适应重金属污染环境呢?因此,在铜尾矿库开展白羊草内生真菌多样性的研究具有重要意义。本实验通过形态学描述和分子鉴定的方法,结合铜尾矿库土壤理化性质,对重金属污染环境中的白羊草是否感染内生真菌及内生真菌特征进行初步研究。旨在探究重金属污染背景下的植物中内生真菌的多样性,为后续研究白羊草内生真菌在铜尾矿库恢复中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究区概况及土壤理化性质测定

选取山西省运城市垣曲县北方铜业铜矿峪矿十八河尾矿库为研究地点,该地年均气温13.5℃,年均降水量631 mm。从1972年4月使用至今现已筑12级子坝^[1]。各个子坝的植被恢复年限不同,从高到低恢复年限逐渐增加。各子坝常见植被有:白茅(*Imperata cylindrica*)、白羊草、白莲蒿(*Artemisia sacrorum*)、冷蒿(*Artemisia frigida*)、狼尾草(*Pennisetum alopecuroides*)等。于2015年7月进行采样,自上而下共设置了4个不同恢复年限(45、30、15、5年)的样地,采集白羊草和土壤。回到实验室后对各样地的土壤进行了理化性质测定。pH值(土:液=1:2.5)用酸度计(HI3221 pH/ORP/ISE meter, HANNA, Italy)测定^[20]。粒度用粒度仪(Mastersi-

zer 3000, Malvern, UK)测定。总氮(TN),总碳(TC),总硫(TS)的测定,首先用球磨仪将其磨成粉末状,然后用元素分析仪(Vario MACRO, Elementar, Germany)测定。重金属含量的测定首先用强氧化物对土壤进行消解,再将消解产物用等离子体发射光谱仪(iCAP 6000, Thermo Fisher, UK)测定^[21]。

1.2 白羊草染菌情况调查

在每个样地采集不少于 30 株白羊草地上部分,对叶鞘内表皮进行撕片染色,染色剂用苯胺蓝(10 g 苯酚,10 g 乳酸,20 g 甘油,0.025 g 苯胺蓝,100 mL 蒸馏水)^[12],染色大约 5 min,盖上盖玻片,放在显微镜下观察,并计算染菌率(染菌率=染菌植株数/检菌植株总数)。

1.3 内生真菌分离及孢子观察

将白羊草叶鞘剪成约 1 cm 的小段,首先进行植物表面灭菌。放入 70% 的酒精中 5 s,再用 5% 的次氯酸钠浸泡 7 min,在浸泡过程中不断摇晃,倒掉次氯酸钠加入无菌水,用无菌水清洗至少 3 次,每次 30 s。将表面灭菌后的茎段横放或插入配制好的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA, 不含抗生素)中(以上过程均在超净台操作),置于 25 °C 培养。待真菌从培养基上长出来后,选择形态不一的菌落分别进行纯化,纯化 4 代后,菌落形态保持世代不变后进行孢子形态观察。将苯胺蓝染色液稀释 10 倍,滴在载玻片上,挑取菌丝置于染色液上,染色 5 min,盖上盖玻片用数码成像显微系统(Moticam Pro 205A, Motic, Germany)观察。染菌情况调查和内生真菌分离在采集回来后及时进行了实验。

1.4 内生真菌的分子鉴定

内生真菌 DNA 提取^[12]。提出来的 DNA 用多功能酶标仪(Infinite M200Pro NanoQuant, TECAN, Austria)测定其浓度和纯度,并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察提取结果。PCR 反应:将提出来的 DNA 稀释至 10 ng/ μ L,选用 ITS5~ITS4 作为引物(ITS5:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'; ITS4:5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')^[5]。反应体系 50 μ L,含有:Template 10 μ L, ITS4、ITS5 0.75 μ L(10 μ mol/L)(上海生工),10 $\times$ EasyTaq Buffer 5 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L,EasyTaqDNA Polymerase 0.5 μ L,ddH₂O 29 μ L。反应条件:95 °C,3 min;95 °C,40 s;52 °C,50 s;72 °C,60 s;72 °C,10 min,共 35 个循环。将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳确定 PCR 结果,选择最佳的 PCR 产物送至华大基因有限公司测序。

1.5 序列数据分析

首先把测序结果前端和后端的杂峰序列去除,然后在 National Center for Biotechnology Information(NCBI)数据库进行 BLAST,选择相似性高的序列与测出来的序列进行比对并进行系统发育分析。比对时,先使用 MEGA6 校准,然后去除比对序列两端多余的部分,使序列等长。然后运用最大似然法(Maximum-Likelihood 法)进行系统发育分析,制作系统进化树,同时计算遗传距离。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质及白羊草染菌率调查

根据土壤环境质量三级标准(GB15618-1995),本地区的土壤中镉(1 mg/kg)、铅(500 mg/kg)严重超标,而 30 年子坝的铜(400 mg/kg)严重超标。pH 值位于 7.5~8.8 之间,为碱性土壤。土壤平均粒径位于 0.05~0.25 mm 之间,属于细砂粒。由总氮可以看出,该地土壤养分低,并且 4 个梯度间土壤理化性质明显不同(表 1)。

2.2 内生真菌菌落及孢子形态

从 4 层子坝白羊草中共分离纯化出 16 种内生真菌,菌落颜色大多为白色,圆形,棉状,少数呈褐色或淡黑,淡紫。另外,菌落边缘有的较为整齐,有的比较不规则,而且其生长速度不一且孢子形态不同。白羊草内生真菌生长速度位于 5.515~12.548 mm/d 之间,孢子大小位于 2.085~7.072 μ m 之间,孢子形态有柱型、椭圆、球型(图 1,表 2)。根据菌落形态及孢子特征初步得出:这 16 种菌有可能属于镰刀菌属、木霉属、赤霉属、青霉属、丛赤壳属^[22-24]。

表 1 土壤理化性质及染菌率情况
Table 1 Soil properties and contamination rate

理化性质 Physiochemical properties	植被恢复 45 年子坝 Vegetation restoration for 45 years	植被恢复 30 年子坝 Vegetation restoration for 30 years	植被恢复 15 年子坝 Vegetation restoration for 15 years	植被恢复 5 年子坝 Vegetation restoration for 5 years
pH	7.889±0.059c	8.362±0.044b	8.768±0.023a	8.211±0.026b
平均粒径 Particle size (μm)	112.033±9.576	145.467±27.533	150.267±31.019	119.900±12.192
C (%)	1.570±0.034a	0.923±0.060b	0.642±0.035c	0.718±0.020c
N (%)	0.031±0.007a	0.026±0.003a	0.010±0.000b	0.021±0.003a
S (%)	0.044±0.001a	0.040±0.001b	0.044±0.002b	0.037±0.000b
C/N	81.224±18.082a	38.004±3.496b	67.099±4.734a	41.008±5.456b
As (mg/kg)	2.5±0.009	14.0±0.005	11.5±0.010	6.0±0.011
Cd (mg/kg)	3.5±0.002	3.0±0.000	3.0±0.000	6.0±0.011
Cr (mg/kg)	37.5±0.000	56.0±0.004	53.5±0.005	48.5±0.003
Cu (mg/kg)	186.8±0.003	532.0±0.004	286.5±0.003	161.5±0.005
Ni (mg/kg)	33.5±0.005	34.0±0.009	43.0±0.005	34.0±0.004
Pb (mg/kg)	1089.5±0.020	1114.0±0.011	852.0±0.061	727.5±0.041
Zn (mg/kg)	91.0±0.000	96.0±0.002	68.0±0.001	56.0±0.000
染菌率 Infection rate (%)	12.8	20.0	15.4	11.1

表中数据为平均值±标准误,同行数据不同字母表示差异显著(P<0.05)。
Data in the Table are as mean±SE, different letters in the same row indicate significant difference at P<0.05 level.

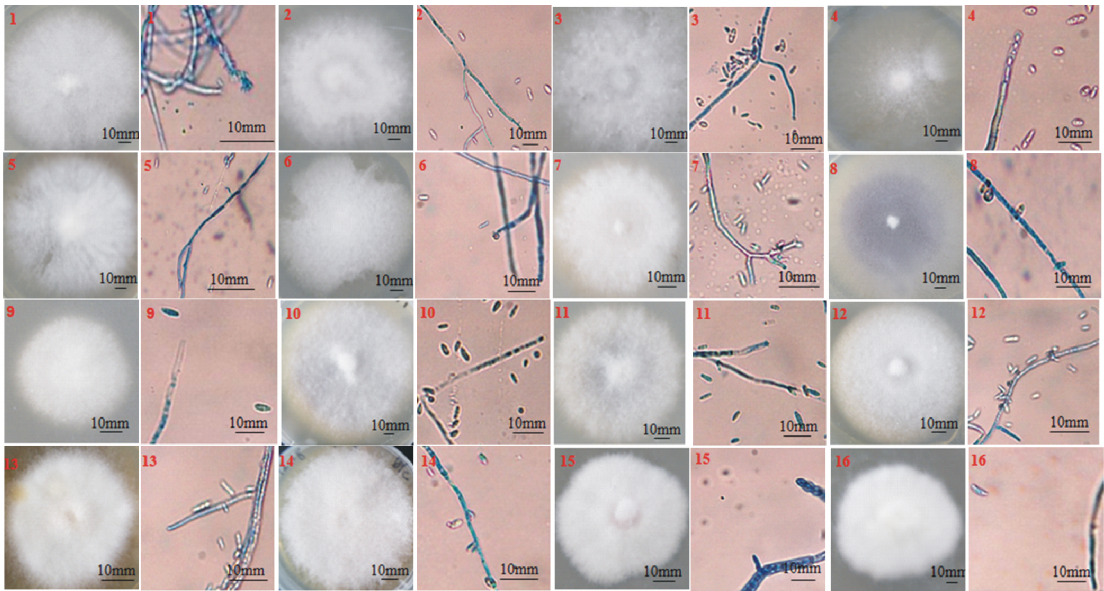


图 1 分离得到的内生真菌菌落及孢子形态

Fig. 1 Endophytic fungal colony and spore morphology

1~7 为从 45 年子坝白羊草中分离出的内生真菌,8~12 为 5 年子坝白羊草分离出的内生真菌,13~14 为 30 年子坝白羊草中分离出的内生真菌,15~16 为 15 年子坝白羊草分离出的内生真菌。1—7 isolated from the *B. ischaemum* of 45 years sub-dam, 8—12 for 5 years sub-dam, 13—14 for 30 years sub-dam, 15—16 for 15 years sub-dam.

2.3 PCR 结果及其测序结果的系统进化分析

在对内生真菌提取 DNA 后,对 DNA 的 5.8S-ITS(internal transcribed spacer)进行扩增并测序,将测序结果

表 2 内生真菌及其孢子形态特征
Table 2 Endophytic fungi and the spore morphology

编号 Number	菌落颜色 Colony color	菌落质地 Colony texture	菌落形状 Colony shape	孢子形态 Spore morphology	孢子大小 Spore size (μm)	生长速率 Growth rate (mm/week)
1	白色,背面发紫 W,BP	棉状,疏松 CO,L	突出 P	椭圆、柱型 O,C	0.682~0.823×0.932~5.647	84.392±0.515
2	白色,背面中间黄,周围淡紫 W,CBY,SP	棉状,疏松 CO,L	中间突出,周围紧贴 CP,SA	椭圆 O	1.101~2.085×2.468~3.705	73.267±2.018
3	白色,背面中间发紫 W,CBP	棉状,疏松 CO,L	中间突出,周围紧贴 CP,SA	椭圆 O	0.852~1.742×1.839~7.072	87.562±0.938
4	白色,背面紫红 W,BPR	棉状,疏松 CO,L	中间突出,周围紧贴 CP,SA	椭圆、球型 O,S	0.930~1.900×0.930~4.067	82.244±1.362
5	白色,背面紫红 W,BPR	棉状,疏松 CO,L	中间突出,周围辐射状 CP,SR	柱型、球型 C,S	1.062~1.457×1.062~4.041	82.841±1.648
6	白色,背面中间黑,周围泛黄 W,CBB,SY	棉状,疏松 CO,L	突出,中间有些突出 P,CP	柱型、球型 C,S	1.172~1.231×1.231~3.025	74.593±2.732
7	褐色,背面发红 BRO,BR	棉状,疏松 CO,L	紧贴,中间突出 A,CP	柱型、球型 C,S	0.829~1.464×0.829~4.268	61.463±3.169
8	中间白,中间层紫,边缘白 CW,ILP,EW	棉状,疏松,周围无菌丝 CO,L,NHA	中间突出,周围紧贴 CP,SA	柱型、椭圆 C,O	1.051~1.516×1.899~4.717	87.638±0.918
9	白色,背面中间发黑,周围白 W,CBB,SW	棉状,疏松 CO,L	突出 P	柱型、椭圆、球型 C,O,S	1.021~2.120×1.021~4.857	44.022±3.125
10	发黑,背面亦是 B,BSF	棉状,疏松 CO,L	紧贴,中间突出 A,CP	椭圆、球型 O,S	1.061~1.237×1.237~3.444	86.151±0.822
11	中间黑,周围白,背面亦是 CB,PW,BSF	棉状,疏松 CO,L	紧贴,中间突出 A,CP	椭圆 O	0.719~1.371×2.044~4.693	63.904±2.761
12	白色,背面亦是 W,BSF	棉状,疏松 CO,L	紧贴,中间突出 A,CP	椭圆、球型 O,S	1.173~1.558×1.558~5.959	64.593±0.824
13	发红,背面亦是 R,BSF	棉状,疏松 CO,L	突出 P	椭圆、柱型 O,C	0.935~2.107×1.560~6.708	41.550±0.445
14	白色,背面亦是 W,BSF	棉状,疏松 CO,L	突出,中间突出 P,CP	椭圆、球型 O,S	1.204~1.910×1.204~4.391	58.509±0.692
15	红色,背面发红 R,BR	棉状,有些致密 CO,D	突出,中间突出 P,CP	球型 S	1.266~2.387×1.266~2.387	44.844±0.731
16	白色,背面亦是 W,BSF	棉状,有些致密 CO,D	突出,中间突出 P,CP	椭圆、球型 O,S	0.898~1.753×0.898~4.888	38.603±0.967

W:白色 White; BP:背面发紫 Back purple; R:红色 Red; CBY:背面中间黄 The centre of the back is yellow; SP:周围淡紫 Surrounding area is purple; CBP:背面中间发紫 The centre of the back is purple; BPR:背面紫红 The back is purple-red; CBB:背面中间黑 The centre of the back is black; SY:周围泛黄 Surrounding area is yellow; BRO:褐色 Brown; BR:背面发黑 The back is black; CW:中间白 The centre is white; ILP:中间层紫 Intermediate layer is purple; EW:边缘白 The edge is white; SW:周围白 Surrounding area is white; B:黑色 Black; BSF:背面亦是 The back is the same as the front; CO:棉状 Cotton; L:疏松 Loose; NHA:周围无菌丝 No hyphae around; D:致密 Dense; P:突出 Protuberant; A:紧贴 Appressed; CP:中间突出 The centre is protuberant; SA:周围紧贴 Surrounding area is appressed; SR:周围辐射状 Surrounding area is radial; O:椭圆 Oval; S:球形 Spherical; C:柱形 Cylindrical.

在 NCBI 数据库进行了 BLAST 比对,挑选出与分离菌株相似的序列,用于系统发育分析。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,显示 PCR 产物特异,没有其他杂核苷酸产生,片段长度约为 600 bp,确定为目的条带(图 2)。测序结果发现 2~14 及 16 号菌 5.8S-ITS 序列相似率达 99% 以上,所以用 1,2,15 号菌的序列进行 BLAST 比对,结合形态学比对结果得出的与实验菌相似程度达 97% 以上的为赤霉属、镰刀菌属、青霉属。镰刀菌属在无性时期属于半知菌亚门,瘤座菌目(Tuberculariales),有性时期为子囊菌亚门(Deuteromycotina),赤霉属。青霉属属于子囊菌(Ascomycotina)。

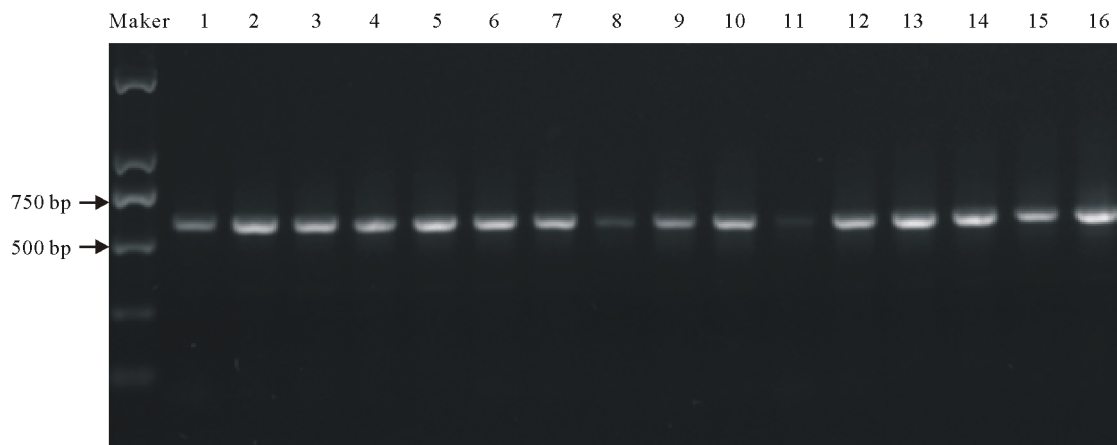


图 2 白羊草内生真菌基因组 PCR 结果

Fig. 2 PCR products of 5.8S-ITS from endophytes associated with *B. ischaemum*

1~16 代表图 1 的 16 个菌落。1—16 represents 16 colonies in Figure 1.

实验菌序列与相似序列进行系统进化分析,发现 2 号与 15 号菌进化关系较近,而 1 号菌相对较远(图 3)。研究发现真菌中的鲁氏毛霉菌(*Mucor rouxii*),少根根霉菌(*Rhizopus arrhizus*)和白腐真菌(*Trametes versicolor*)对重金属镉有生物吸附能力,其中白腐真菌的吸附能力达到了 165.2 mg/g^[25];另外绿色木霉(*Trichoderma viride*)^[26],小球壳孢菌(*Microsphaeropsis* sp.),稻根曲霉(*Rhizopus oryzae*),琉球曲霉(*Aspergillus luchuensis*),塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*),秀丽单顶孢(*Monacrosporium elegans*),棒孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis clavispora*)^[27],毛霉属 CBRF59(*Mucor* sp. CBRF59),少根根霉菌^[28]等内生真菌也已经证明对重金属有吸附能力。把分离出的实验菌与已知的吸附重金属的内生真菌进行系统进化分析发现,I1 与绿色木霉有比较近的亲缘关系,其他实验菌与这些吸附重金属的菌关系较远(图 4)。从表 3 可以看出,30 年子坝与 5 年子坝的白羊草内生真菌遗传距离最小,亲缘关系最近。45 年子坝与 15 年子坝遗传距离最大,亲缘关系最远。

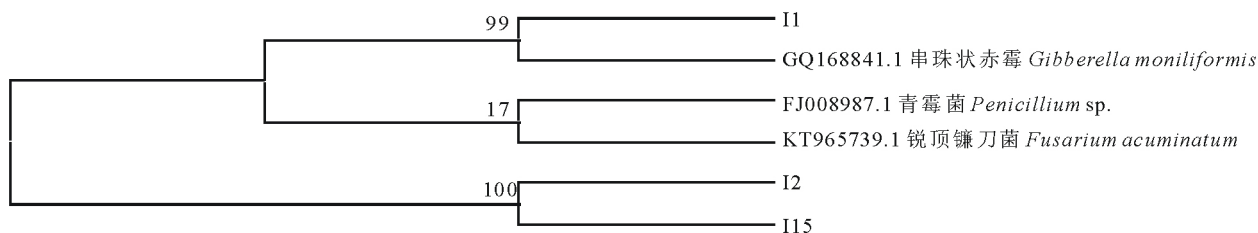


图 3 对 rDNA-ITS 测序结果进行系统进化分析(Maximum-Likelihood 法)

Fig. 3 The phylogenetic analysis of rDNA-ITS sequencing results(ML method)

I1、I2、I15 对应图 1 的 1、2、15;分支上的数字代表大于或等于 50% 的 bootstrap。下同。I1, I2, I15 corresponds to 1, 2, 15 in Fig. 1, the number on the branch is greater than or equal to 50% of the bootstrap. The same below.

表 3 4 个子坝之间的遗传距离矩阵
Table 3 Genetic distance matrix among the four sub-dams

样地 Samples	45 年子坝 45 years sub-dam	30 年子坝 30 years sub-dam	15 年子坝 15 years sub-dam
30 年子坝 30 years sub-dam	0.1402		
15 年子坝 15 years sub-dam	0.1800	0.0397	
5 年子坝 5 years sub-dam	0.1402	0.0019	0.0383

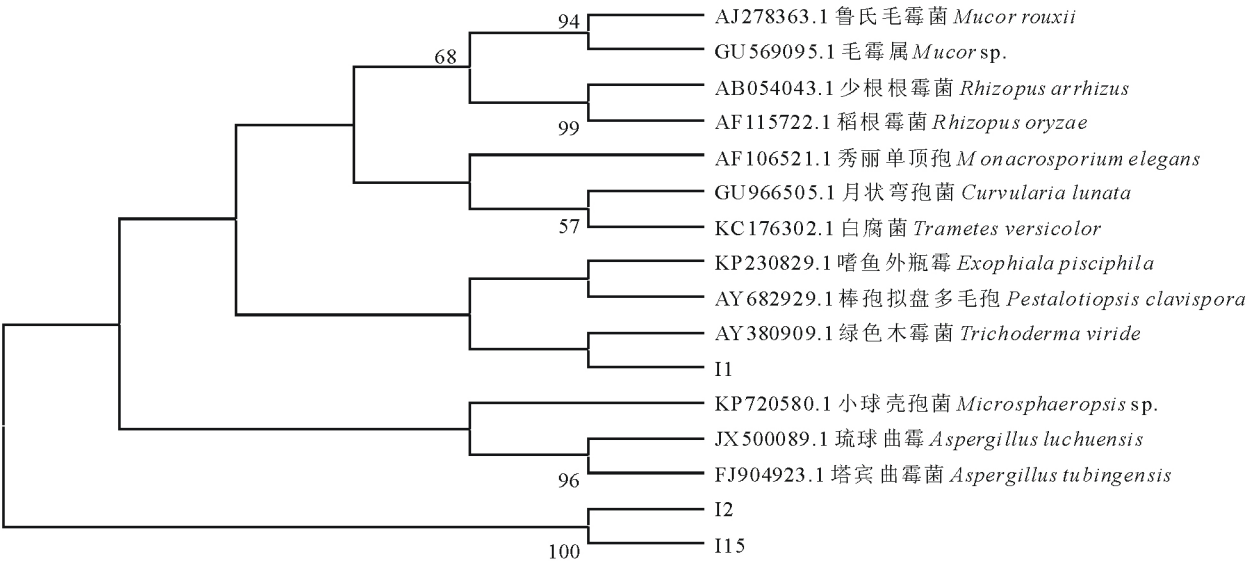


图 4 白羊草内生真菌与已知吸附重金属的内生真菌系统进化树分析 (Maximum-Likelihood 法)
Fig. 4 *B. ischaemum* endophytes and heavy metal adsorption endophytes phylogenetic analysis (ML method)

3 讨论

3.1 内生真菌在白羊草中的分布

本研究所调查的 4 个内生真菌种群分布在同一地区,空间距离较近。调查结果显示白羊草在该地区的染菌率不高。内生真菌的类型与感染率随不同种群变化而变化^[29]。从土壤理化性质可以看出 5 年和 30 年子坝的 C/N 与 pH 基本没有差异,这可能是造成这两个样地白羊草内生真菌完全相同的原因,因为土壤 C/N 和 pH 会影响土壤真菌的生长^[30],而土壤微生物群落会影响植物内生真菌的结构^[31]。15 年和 45 年子坝土壤 C/N 差异不明显,pH 有极显著差异,这会导致这两个样地白羊草内生真菌产生差异^[30]。另一个导致内生真菌差异的原因是由于白羊草所处的植物群落不同,不同的植被群落代表多样的凋落物类型,而凋落物是内生真菌宿主的主要营养来源^[32-33],营养的多样性造成内生真菌繁殖体的多样性^[34]。在恢复 15 年的样地中,植被以矮小的草本和零星低矮的灌木为主,如冷蒿,曲枝委陵菜(*Potentilla yokusaiana*),杠柳(*Periploca sepium*)等,且植被覆盖度低,种类少。而 45 年子坝的植被以较高的荆条(*Vitex negundo* var. *heterophylla*),狼尾草为主,植被盖度基本为 100%,植物多样性高。2012 年在对云南会泽的铅锌矿废渣研究中也从其上生长的植物中分离出镰刀菌属和青霉属的内生真菌^[35]。在四川汉源铅锌矿区植物中也得出相似的结果^[36]。这与该铜尾矿库白羊草内生真菌的分离结果有相同之处。

3.2 内生真菌培养特征及孢子多态性

根据实验结果可以看出,内生真菌菌落大多呈圆形、白色,有少数为红色或褐色,还有些许发黑的情况。菌落表面似毡状覆盖,质地疏松,生长速度不一。白羊草内生真菌生长速度位于 5.515~12.548 mm/d 之间,比分离自内蒙古中东部羽茅 0.22~2.86 mm/d^[13]和红菇(*Russula vinosa*)1.89~2.63 mm/d^[10]中的内生真菌生长速度快,孢子大小位于 2.085~7.072 μm 之间,与羽茅(4.8~9.8 μm)、光稃早熟禾(*Poa psilolepis*)(2.7~5.0 μm)

的内生真菌孢子大小相近^[13], 而比麦冬(*Ophiopogon japonicus*)内生真菌的孢子(7.2~11.0 μm)小^[37]。从不同恢复年限的子坝中分离出形态各异的内生真菌, 首先, 可能由于恢复年限不同导致白羊草的生境差异, 从而不仅影响白羊草的生长, 也间接影响了白羊草内生真菌群落结构; 其次, 可能是由于白羊草所含营养物质不同, 不同真菌对营养物质的需求有一定差异, 从而影响内生真菌的侵染和生长^[38]; 再者, 宿主植物基因型不同, 所含内生真菌的种类也不同, 说明有些内生真菌存在宿主特异性^[39]。

3.3 白羊草中内生真菌的系统发育关系

虽然分离出的内生真菌形态和序列均不同, 但是分析各子坝白羊草中的内生真菌发现, 它们的聚类分析基本都可以聚在一起, 亲缘关系较近。子坝间的遗传距离最大的是 45 年子坝和 15 年子坝的白羊草内生真菌, 为 0.18。这可能是因为子坝上植被恢复年限间隔较长, 但其空间距离较小, 因而对内生真菌的基因交流影响较小^[13]。但子坝之间白羊草内生真菌的遗传距离不完全为 0, 说明恢复年限带来的环境变化对子坝之间内生真菌的遗传距离还是有一定影响。分离得到的内生真菌表型有 16 种, 但是 5.8S-ITS 序列只有 3 种。导致这一结果的原因可能是, 同一属不同种的真菌, 基因组 5.8S-ITS 区虽然差异不大, 但仍表现出不同的菌落形态及孢子特征。

3.4 尾矿库白羊草内生真菌与已知吸附重金属内生真菌的系统发育分析

把白羊草内生真菌与已知吸附重金属的内生真菌做系统进化树分析(图 4)发现, I1 与绿色木霉有相近的亲缘关系, 绿色木霉对镉有良好的吸附作用^[27], 与它亲缘关系相近的 I1 能够生活在镉超标土壤的植物体内, 是否对镉也有吸附作用还需进一步研究。而其他菌虽然与这些已知的吸附重金属的内生真菌亲缘关系相对较远, 但是在这种尾矿库环境下依然能够在白羊草内正常生存, 其能够耐受这种环境的原因及其是否也具有吸附重金属的能力还有待进一步研究。

4 结论

利用 PDA 培养基分离的方法, 从 4 个不同恢复年限的子坝白羊草中共分离出 16 种不同形态内生真菌。各菌落形态各异, 生长速度位于 5.515~12.548 mm/d 之间, 孢子形态以球型和椭圆型为主, 孢子大小介于 2.085~7.072 μm 。

分子鉴定结果显示 16 种内生真菌的 5.8S-ITS 序列有 3 种类型, 分别属于镰刀菌属、赤霉属、青霉属。通过计算遗传距离得出, 子坝之间白羊草内生真菌的基因交流影响较小, 同时, 不同恢复年限对子坝之间内生真菌的遗传距离也存在一定的影响。

将白羊草内生真菌与已知的吸附重金属的内生真菌做系统进化分析发现, I1 与吸附镉的绿色木霉亲缘关系较近。

参考文献 References:

- [1] Tan Y X. Study on the Potential Harm and Prevention Measure in Shibahe Tailing[D]. Xi'an: Chang'an University, 2012. 谭永祥. 十八河尾矿库潜在危害及防治措施研究[D]. 西安: 长安大学, 2012.
- [2] Xu Q F, Dong K H. The dominant species of shrub grassland-*Bothriochloa ischaemum*. Grassland and Turf, 2004, (3): 20-24. 许庆方, 董宽虎. 温性灌草丛类建群种——白羊草. 草原与草坪, 2004, (3): 20-24.
- [3] Guo J M. Comprehensive Evaluation of Different Population of *Bothriochloa ischaemum* Drought Resistance in Shanxi[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2015. 郭晋梅. 山西不同居群白羊草抗旱性综合评价[D]. 太谷: 山西农业大学, 2015.
- [4] Mi J. The Reproductive Character and Regrowth Performance of Old World Bluestem (*Bothriochloa ischaemum*) Population in Shanxi Rangelands[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2005. 米佳. 山西白羊草种群繁殖特性及再生性能研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2005.
- [5] Zhang X, Li Y, Wei Y K, et al. Distribution and rDNA-ITS sequence analysis of *Epichloë* endophyte symbiosis with *Achnatherum sibiricum* in mid- and eastern Inner Mongolia Steppe. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(7): 2904-2910. 张欣, 李熠, 魏宇昆, 等. 内蒙古中东部草原羽茅 *Epichloë* 属内生真菌的分布及 rDNA-ITS 序列系统发育. 生态学报, 2007,

- 27(7): 2904-2910.
- [6] Arnold A E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 2007, 21(2): 51-66.
- [7] Cheng Z S, Tang W C, Su Z J, *et al.* Identification of mangrove endophytic fungus 1403 (*Fusarium proliferatum*) based on morphological and molecular evidence. *Journal of Forestry Research*, 2008, 19(3): 219-224.
- [8] Zhang Y. Isolation of Endophytic Fungi from *Portulaca oteracea* and Study on their Influence on Hosts Growth[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2015.
- 张瑜. 马齿苋内生真菌的分离、鉴定及其对宿主生长的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.
- [9] Han Y J, Liang Y, Yuan X Y. Isolation and antifungal activity of endophyte from *Populus euphratica* oliver. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2014, 23(6): 189-194.
- 韩艳洁, 梁艳, 袁秀英. 胡杨内生真菌分离及其抑菌活性研究. *西北农业学报*, 2014, 23(6): 189-194.
- [10] Zeng X L, Liu D L. Isolation and mycelial growth characteristics of *Nectria* sp. isolated from *Russula griseocarnosa*. *Edible Fungi of China*, 2013, 32(4): 32-34.
- 曾宪录, 刘德良. 灰肉红菇内生真菌的分离及生长特性研究. *中国食用菌*, 2013, 32(4): 32-34.
- [11] Tie W F, Hu Y L, Zhu J B, *et al.* Isolation and identification of endophytical fungus in *Licorice* collected from Xinjiang area. *Biotechnology Bulletin*, 2010, (9): 149-153.
- 帖卫芳, 胡鸾雷, 祝建波, 等. 甘草内生真菌的分离及鉴定. *生物技术通报*, 2010, (9): 149-153.
- [12] Zhu M J. Diversity of Endophytes Associated with *Leymus chinensis* and Its Effects on Host Physio-ecological Characteristics in the Mid-Eastern Inner Mongolia Steppe[D]. Tianjin: Nankai University, 2013.
- 朱敏杰. 内蒙古中东部草原羊草内生真菌多样性及其对宿主生理生态特性的影响[D]. 天津: 南开大学, 2013.
- [13] Wei Y K, Gao Y B, Li C, *et al.* Genetic diversity of *Neotyphodium* endophytes isolated from *Achnatherum sibiricum* population in mid-and Eastern Inner Mongolia steppe. *Journal of Plant Ecology*, 2006, 30(4): 640-649.
- 魏宇昆, 高玉葆, 李川, 等. 内蒙古中东部草原羽茅内生真菌的遗传多样性. *植物生态学报*, 2006, 30(4): 640-649.
- [14] Song H. Phylogeny of Nine *Elymus* Species and Related Asexual *Epichloë* Endophyte[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2015.
- 宋辉. 九种披碱草属植物及其 *Epichloë* 内生真菌的系统进化[D]. 兰州: 兰州大学, 2015.
- [15] Zhu M J, Ren A Z, Wen W, *et al.* Diversity and taxonomy of endophytes from *Leymus chinensis* in the Inner Mongolia steppe of China. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 340(2): 135-145.
- [16] Zhang X. Diversity of Endophyte in *Achnatherum sibiricum* and Their Coevolution with Host Plants in the Middle East of Inner Mongolia[D]. Tianjin: Nankai University, 2009.
- 张欣. 内蒙古中东部草原羽茅种群内生真菌的多样性及与宿主植物协同进化的研究[D]. 天津: 南开大学, 2009.
- [17] Leuchtmann A, Bacon C W, Schardl C L, *et al.* Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*, 2014, 106(2): 202-215.
- [18] Ren A Z, Li C, Gao Y B. Endophytic fungus improves growth and metal uptake of *Lolium arundinaceum* Darbyshire Ex. Schreb. *International Journal of Phytoremediation*, 2011, 13(3): 233-243.
- [19] Ban Y H. Mechanisms of Dark Septate Endophyte Isolated from Pb-Zn Mine Improving Plant Lead Tolerance[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2013.
- 班宜辉. 铅锌矿区深色有隔内生真菌提高植物耐 Pb 机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [20] Jiang S, Xu Z Q, Zhang C J. Determination and analysis on the pH of soil in Wanyuan City of Sichuan Province. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, (25): 12105-12108.
- 蒋实, 徐争启, 张成江. 四川省万源市土壤 pH 值测定及土壤酸碱度分析. *安徽农业科学*, 2009, (25): 12105-12108.
- [21] Long J H, Tan J, Wu Y J, *et al.* A comparative study on the detection of heavy metal in soil with different digestion methods. *Environmental Monitoring in China*, 2013, (1): 123-126.
- 龙加洪, 谭菊, 吴银菊, 等. 土壤重金属含量测定不同消解方法比较研究. *中国环境监测*, 2013, (1): 123-126.
- [22] Deng H H, Hong W, Wu C Z, *et al.* Separation, selection and identification on producing lipid strains of endophytic fungi from *Pinus massoniana*. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2014, (2): 27-33.
- 邓慧华, 洪伟, 吴承祯, 等. 马尾松内生真菌产油脂菌株的分离、筛选和鉴定. *植物资源与环境学报*, 2014, (2): 27-33.
- [23] Zhou Y L. *Mycology*[M]. Beijing: Higher Education Press (HEP), 1986.
- 周与良. *真菌学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [24] Sun Y, Sun Y, Chen F M, *et al.* 6 species of endophytic *Fusarium* isolation and identification. *Jiangsu Agricultural Science*, 2010, (5): 437-439.
- 孙勇, 孙颖, 陈凤美, 等. 6 种植物中内生镰刀菌的分离和鉴定. *江苏农业科学*, 2010, (5): 437-439.

- [25] Yakup Arica M, Yasemin K, Ömer G. Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution. *Bioresource Technology*, 2001, 80(2): 121-129.
- [26] Xiao X. Application of Heavy Metal Hyperaccumulator Endophytes in Heavy Metal Decontamination[D]. Changsha: Hunan University, 2011.
肖潇. 基于镉超累积植物内生菌的重金属污染修复研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2011.
- [27] Srivastava S, Agrawal S B, Mondal M K. A review on progress of heavy metal removal using adsorbents of microbial and plant origin. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(20): 15386-15415.
- [28] Deng Z J, Huang H W, Cao L X, *et al.* Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 185: 717-724.
- [29] Arnold A E, Herre E A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*, 2003, 95(3): 388-398.
- [30] Siles J A, Margesin R. Abundance and diversity of bacterial, archaeal, and fungal communities along an altitudinal gradient in alpine forest soils: What Are the Driving Factors. *Microbial Ecology*, 2016, 72(1): 207-220.
- [31] Pattison Z, Rumble H, Tanner R A, *et al.* Positive plant-soil feedbacks of the invasive *Impatiens glandulifera* and their effects on above-ground microbial communities. *Weed Research*, 2016, 56(3): 198-207.
- [32] Herre E A, Mejia L C, Kyllö D A, *et al.* Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 2007, 88(3): 550-558.
- [33] Osono T, Tateno O, Masuya H. Diversity and ubiquity of xylariaceous endophytes in live and dead leaves of temperate forest trees. *Mycoscience*, 2013, 54(1): 54-61.
- [34] Saucedo-Garcia A, Luisa Anaya A, Espinosa-Garcia F J, *et al.* Diversity and communities of foliar endophytic fungi from different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz, Mexico. *Plos One*, 2014, 9(6): 1-11.
- [35] Li D W, Xu H M, Mei T, *et al.* Diversity of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(7): 2288-2293.
李东伟, 徐红梅, 梅涛, 等. 云南会泽铅锌矿废弃矿渣堆常见植物内生真菌多样性. 生态学报, 2012, 32(7): 2288-2293.
- [36] Zheng Y K, Chen C, Ren D, *et al.* Genetic diversity of the plant endophytic fungi in a Pb-Zn mine area in Hanyuan, Sichuan Province, China. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2013, 31(3): 308-313.
郑有坤, 陈诚, 任丹, 等. 四川汉源铅锌矿区植物内生真菌的遗传多样性初步研究. 四川农业大学学报, 2013, 31(3): 308-313.
- [37] Chen Y T, Ding L X, Cheng D Q, *et al.* Isolation and Identification of endofungi from *Liriope spicata*. *Journal of Laiyang Agricultural College: Natural Science*, 2006, 23(1): 13-16.
陈宜涛, 丁立孝, 程东庆, 等. 麦冬内生真菌镰刀菌的分离鉴定. 莱阳农学院学报: 自然科学版, 2006, 23(1): 13-16.
- [38] Sun J Q, Guo L D, Chi D F, *et al.* Diversity and ecological distribution of endophytic fungi in medicinal plants. *Chinese Journal of Science (series C: Life Sciences)*, 2008, (5): 475-484.
孙剑秋, 郭良栋, 迟德福, 等. 药用植物内生真菌多样性及生态分布. 中国科学(C辑: 生命科学), 2008, (5): 475-484.
- [39] Collado J, Platas G, Pelaez F. Host specificity in fungal endophytic populations of *Quercus ilex* and *Quercus faginea* from Central Spain. *Nova Hedwigia*, 2000, 71(3/4): 421-430.