

研究报告

DOI:10.14188/j.ajsh.2024.01.005

祁连山青海云杉叶内生真菌的分离与鉴定

杨朝丽曼¹, 范必成¹, 张琪¹, 刘永俊², 潘建斌^{1*}, 冯虎元^{1*}

(1. 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730000;

2. 兰州大学 生态学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 植物内生真菌对植物的生长发育及抗逆性具有重要作用。青海云杉(*Picea crassifolia*)是中国特有植物,也是祁连山的主要建群树种,而对其叶内生真菌的研究较少。本研究采用组织分离培养法,对青海云杉叶内生真菌进行分离培养,描述菌落形态特征,并结合 rDNA ITS 序列分析的方法,对分离的真菌进行鉴定。结果表明,从青海云杉叶分离获得 32 株真菌,隶属于 1 门 4 纲 6 目 11 科 12 属 12 种,均属于子囊菌门(Ascomycota)。其中,卡氏圆酵母(*Torula camporesii*)菌株数量最多,占分离菌株总数的 18.75%,其次是澳大利亚小光壳(*Leptosphaerulina australis*),占 15.63%。有 14 株菌是植物病原菌,其中有 2 株均为青海云杉枝枯病的病原菌——云杉壳囊孢(*Cytospora piceae*)。揭示了青海云杉可培养叶内生真菌的种类组成,获得了具有潜在研究价值的菌种资源,其研究结果是祁连山青海云杉相关研究的重要补充,为进一步研究青海云杉内生真菌潜在的生态与应用价值提供一定的理论依据。

关键词: 祁连山;青海云杉;叶内生真菌;分离;鉴定

中图分类号: Q-9

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2024)01-0039-12

Isolation and identification of foliar endophytic fungi of *Picea crassifolia* in the Qilian MountainsYANG Zhaoliman¹, FAN Bicheng¹, ZHANG Qi¹, LIU Yongjun², PAN Jianbin^{1*}, FENG Huyuan^{1*}

(1. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China;

2. College of Ecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China)

Abstract: Endophytic fungi play important roles in plant growth, development, and stress resistance. *Picea crassifolia*, an endemic plant with great ecological value in China, serves as the primary tree species in the Qilian Mountains of China. However, there has been limited research on its foliar endophytic fungi. In this study, the culturable foliar endophytic fungi of *P. crassifolia* were isolated using tissue separation methods. Subsequently, these endophytic fungi were identified based on the morphological characteristics of their colonies and the rDNA ITS sequence analysis. The results showed that 32 fungal strains were isolated from the needles of *P. crassifolia*, belonging to 12 species, 12 genera, 11 families, 6 orders, 4 classes of 1 phylum (Ascomycota). Among them, *Torula camporesii* had the highest isolation frequency (18.75%), followed by *Leptosphaerulina australis* (15.63%). Among 32 fungal strains, 14 were identified as pathogens of various plants, including 2 strains of *Cytospora piceae*, which are pathogens of *P. crassifolia* twig blight.

收稿日期: 2023-07-08 修回日期: 2023-10-16 接受日期: 2023-11-01

作者简介: 杨朝丽曼(1998-),女,硕士生,研究方向:环境微生物学。E-mail: yangchlm21@lzu.edu.cn

*通讯联系人: 潘建斌(1985-),博士,高级实验师,研究方向为资源植物学、菌根生态学, E-mail: panjb@lzu.edu.cn; 冯虎元(1967-),教授,研究方向为菌根生物学、共生生物学、植物学与植物生态学、文物微生物与保护, E-mail: fenghy@lzu.edu.cn

基金项目: 第二次青藏高原综合科学考察研究(2019QZKK0301); 国家自然科学基金项目(U21A20186; 32371592); 甘肃省自然科学基金重点项目(23JRRA1034)

引用格式: 杨朝丽曼, 范必成, 张琪, 等. 祁连山青海云杉叶内生真菌的分离与鉴定[J]. 生物资源, 2024, 46(1): 39-50.

Yang Z L M, Fan B C, Zhang Q, et al. Isolation and identification of foliar endophytic fungi of *Picea crassifolia* in the Qilian Mountains [J]. Biotic Resources, 2024, 46(1): 39-50.

This study revealed the composition of culturable foliar endophytic fungi of *P. crassifolia* and obtained fungal resources with potential research value. The research findings serve as a significant supplement to related studies on *P. crassifolia* in the Qilian Mountains, providing a theoretical foundation for further research on the potential ecological and application value of endophytic fungi of *P. crassifolia*.

Key words: Qilian Mountains; *Picea crassifolia*; foliar endophytic fungi; isolation; identification

0 引言

内生真菌是指一类整个或一段生活史生活在健康植物各组织和器官内部,但不引起宿主植物明显症状或对宿主造成明显伤害的真菌,包括一些潜伏性病原真菌、菌根真菌和生活史的某一阶段营表面生的腐生真菌^[1~3]。因此,植物内生真菌不仅指植物组织内正常的菌群,还指潜伏在宿主植物内的病原真菌以及与宿主植物互惠共利、共栖共生的真菌。内生真菌的宿主范围非常广泛,既有高等植物,也有低等植物。植物不同组织分离到的内生真菌数量不同,通常根、叶和种子的内生真菌较多^[4,5]。通过对内生真菌与宿主的专一性分析,平均每种宿主有4~5种专性内生真菌^[6]。按地球目前已知25万种植物计算,推测内生真菌总数至少有100万种^[7]。而目前被研究人员发现的仅占其10%^[8],可见自然界中还存在大量未知的、有待挖掘的内生真菌资源。分子生物学技术的快速发展,大大加速了科研人员对微观世界生物多样性的探索,特别是高通量技术在该分支学科中的应用^[9,10]。虽然高通量技术具有高通量、快速和精准等优点,但高通量技术无法获得菌种资源。目前获得菌种资源的方式主要是微生物分离培养,它可以提供更具体、全面和深入的信息,有助于揭示微生物的生物学特性和潜在应用价值。

植物内生真菌与其宿主植物是共同进化的^[11],二者形成了复杂的相互作用机制^[12]。一方面,宿主植物为内生真菌提供定殖场所和营养物质^[13];另一方面,内生真菌在宿主的生长发育和系统演化过程中起了重要作用,如促进植物生长^[14,15]、提高植物抵御病原体^[16]、干旱^[17,18]以及盐度^[19]等生物和非生物胁迫的能力。此外,国内外陆续发现一些内生真菌能产生与宿主相同或相似的次生代谢产物^[20,21],还可产生具有生物活性成分的新化合物等^[22]。近年来内生真菌已经成为筛选代谢产物的热点。研究表明,内生真菌的分布和种类与宿主植物的种类、植物所处的地理位置、温度和季节等有关^[23]。研究人员发现北美、欧亚大陆植物和地衣内生真菌群落组成和多样性的主要决定因素是宿主的差异性^[4],而夏威夷岛山的原生双子叶植物叶内生真菌多样性和群落结构受蒸散发、距离衰减、太阳辐照和宿主特异性

共同影响^[24]。此外,夏威夷岛上多形铁心木(*Metrosideros polymorpha*)的叶内生真菌具有很高的多样性,且其受降雨和温度调控^[25]。有研究者发现巴拿马西部森林中被子植物及灌木叶内生真菌的丰富度与温度呈季节性负相关,同时真菌群落结构和组成反映温度、季节和气候的变化^[26]。

青海云杉(*Picea crassifolia*)是中国特有树种,属于松科(Pinaceae)云杉属(*Picea*),主要分布在青海、甘肃、宁夏、内蒙古等地,分布面积广;在海拔2 350~3 500 m的阴坡和半阴坡,青海云杉呈带状或块状,常与半阳坡的草原成复合镶嵌,形成山地森林草原景观^[27]。青海云杉作为中国西部生态安全屏障祁连山的主要建群树种,在祁连山森林中分布最广、蓄积量最大^[28],约占森林面积的90%^[27],是祁连山重要的水源涵养林^[29],在水土保持和生物多样性的维持等方面具有重要作用。对青海云杉相关真菌的研究主要在根系共生真菌^[30],而对叶内生真菌的研究鲜有报道。本研究采用传统的微生物分离培养方法,首次对祁连山青海云杉叶内生真菌进行分离和鉴定,以期获得一些有潜在应用价值的内生真菌菌株,并为进一步探索青海云杉与内生真菌的相互关系提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

祁连山位于青藏、内蒙古、黄土三大高原的交会处,是中国西北干旱半干旱地区主要山脉之一,是中国西部重要生态安全屏障,也是中国生物多样性优先保护区域^[31]。祁连山属于高山深谷地貌,海拔一般为2 000~4 000 m,最高峰团结峰高达5 826 m,按照祁连山地形的变化可将其分为东、中、西三段^[32]。祁连山属于大陆性高寒半干旱山地气候,年降水量300~500 mm,大部分集中在6—9月;年均气温为一0.6~2.0℃。植被大致可分为森林、灌丛、草原及荒漠四个植被带,在水平分布上自东南向西北逐渐变差;植被垂直带谱极其分明,从低海拔到高海拔依次为草原带、森林带和高山草甸草原带^[33]。

1.2 样品采集和处理

2021年8月,在祁连山从东到西近500 km范围

内,选取10个青海云杉采集样地(表1)。每个样地采集5株青海云杉成熟、健康的针叶,共计50份样品,采回后置于-20℃的冰箱中保存。在实验室中,从每份样品中随机取一些针叶,先用流水冲洗表面杂质,后用无菌滤纸吸干水分,再装入无菌离心管中,用于后续实验。

1.3 叶内生真菌的分离纯化

采用组织培养法进行叶内生真菌分离纯化,分离纯化采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[34]。在超净工作台内,将准备好的针叶用无菌水漂洗3次后,置于75%乙醇中浸泡1 min;再置于0.5%次氯酸钠溶液中浸泡30 s^[35];接着在75%乙醇中浸泡30 s,无菌水漂洗3次(最后一次漂洗的无菌水,吸取200 μL涂布于PDA平板上,以检查针叶表面消毒的效果),用无菌滤纸吸干水分;随后将针叶切成0.1~0.2 mm的组织薄片,每个PDA平板上放20~25个叶组织薄片,每份样品3个重复,置于25℃黑暗培养,培养5~10 d后,挑取组织边缘长出的菌丝转接至新PDA平板上纯化。若菌落形态有异,则进行二次转接,如此反复直至得到纯菌。将纯菌接种至PDA平板上继续培养,同时对菌种进行临时保藏。

1.4 叶内生真菌的鉴定

1.4.1 形态特征

观察并记录培养得到的内生真菌菌落形态,指标主要包括菌落颜色、菌落形状、是否有分泌物和菌折、边缘颜色及形状等。

1.4.2 分子鉴定

① 真菌DNA提取:在超净工作台内,从培养的纯菌落上用灭菌牙签挑取菌丝体约0.2 g,放入灭菌的1.5 mL离心管中,缓慢加入液氮将菌丝研磨成粉末,使用索莱宝真菌基因组提取试剂盒(Fungi Ge-

nomic DNA Extraction Kit)提取菌株基因组DNA,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行,提取的DNA用于后续实验。

② 真菌rDNA ITS序列PCR扩增:以提取的真菌基因组DNA为模板,采用真菌通用引物ITS1F(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增。PCR扩增体系(20 μL):DNA模板2 μL,引物(10 μmol/L)各0.4 μL,Taq DNA Polymerase 0.3 μL,dNTP 2 μL,Taq Buffer 2.5 μL,ddH₂O补足20 μL。PCR程序:95℃预变性5 min,95℃变性1 min,53℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环,72℃延伸7 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,并对检测合格的样品送至擎科生物科技有限公司(Tsingke, Beijing, China)测序。

③ ITS序列分析:测序所得序列,利用Contig Express(V3.0.0)软件拼接后在线提交至GenBank数据库,获得登录号。登录NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),通过BLAST功能将测序序列与GenBank数据库中进行比对搜索,选择与原始序列相同性最高的参考序列。利用MEGA(7.0)软件通过其中Jukes-Cantor模型,使用最大似然法(maximum-likelihood method,ML),自展值bootstrap为1 000,构建系统发育进化树,进而从分子层面鉴定青海云杉可培养叶内生真菌的分类学位置。

2 结果与分析

2.1 叶内生真菌的形态特征

本研究从青海云杉健康、成熟的针叶中分离纯化得到了32株真菌。根据菌株形态差异,将其划分为18种形态型(表2,图1)。从结果可知,菌株的菌

表1 采样位点信息
Table 1 Detailed information of sampling sites

样地	经度	纬度	海拔/m	区域
S1	98°6'9.6"E	39°33'10.8"N	2 960	甘肃省肃南裕固族自治县
S2	98°27'59.1"E	39°24'18"N	2 899	甘肃省肃州区
S3	99°18'41.1"E	39°2'27.6"N	2 934	甘肃省肃南裕固族自治县
S4	99°24'31.4"E	38°45'28.8"N	3 015	甘肃省肃南裕固族自治县
S5	100°13'59.8"E	38°36'46.8"N	2 872	甘肃省肃南裕固族自治县
S6	100°44'46.4"E	38°13'12"N	2 892	青海省祁连县
S7	101°55'59.6"E	37°52'40.8"N	2 908	甘肃省肃南裕固族自治县
S8	101°44'49.2"E	37°46'48.0"N	2 951	甘肃省永昌县
S9	102°11'14.5"E	37°47'31.2"N	2 762	甘肃省天祝藏族自治县
S10	102°41'44.9"E	36°58'22.8"N	2 874	甘肃省天祝藏族自治县

落颜色主要是白色、米白色等浅色系,而且菌落背面颜色与其正面存在差异,但个别菌株正反面颜色相近。菌落主要为圆形,其次是椭圆形和不规则形。另外,F、L表面有透明的液状分泌物,其余菌株菌落表面没有分泌物;B、C、F、I、K、L、P、Q、R均有菌折,其余菌落表面无菌折;这些菌株菌落的边缘形状有光滑全缘、放射状、毛边全缘和毛边四种类型,颜色有米白色、淡黄色;A、M、O和G的菌丝为絮状,其余为绒毡状、短绒状和毛毡状。

2.2 叶内生真菌的分子鉴定

2.2.1 真菌 rDNA ITS 序列比对

分离纯化得到的 32 个菌株进行测序,将序列提交至 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对,青海云杉叶内生真菌的 rDNA ITS 序列同 GenBank 中真菌序列的相同性为 96.71%~100%。所有菌株经 BLAST 两两比对,将覆盖度(query coverage)和相同性(percent identity)均高于 97% 的菌株默认为同种菌。本研究所获得的 32 株菌按照上述方法可划

表 2 青海云杉叶内生真菌形态特征
Table 2 Morphology characteristics of foliar endophytic fungi of *Picea crassifolia* on PDA media

类型	菌落颜色	菌落形状	分泌物	菌折	边缘形状	边缘颜色	菌丝
A	黄绿色	圆形	无	无	光滑全缘	黄绿色	絮状
B	灰白色	圆形	无	无	毛边全缘	白色	绒毡状
C	黑黄色	不规则	无	有	放射状	淡黄色	毛毡状
D	淡黄色	圆形	无	无	毛边全缘	无	毛毡状
E	黄白色	圆形	无	无	毛边全缘	无	毛毡状
F	黄绿色	圆形	透明	有	毛边全缘	黄绿色	绒毡状
G	乳白色	圆形	无	无	毛边全缘	白色	毛毡状
H	米黄色	椭圆形	无	无	毛边全缘	米黄色	絮状
I	米白色	圆形	无	无	光滑全缘	米白色	毛毡状
J	米黄至墨绿色	椭圆形	无	无	光滑全缘	淡黄色	絮状
K	白至深灰色	圆形	无	有	毛边全缘	米白色	绒毡状
L	墨绿色	圆形	透明	有	毛边全缘	白色	短绒状
M	米黄色	圆形	无	无	放射状	深米色	絮状
N	白色	不规则	无	无	放射状	白色	毛毡状
O	米黄色	圆形	无	无	毛边全缘	白色	絮状
P	米白色	圆形	无	有	放射状	半透明	短绒状
Q	灰至白色	圆形	无	有	放射状	米白色	短绒状
R	灰白色	圆形	无	有	毛边全缘	白色	绒毡状

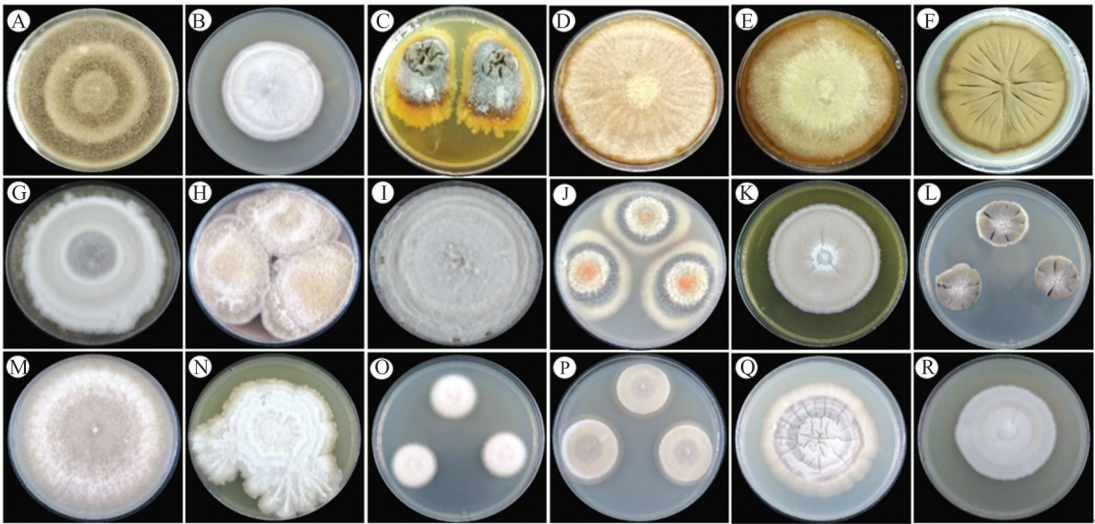


图 1 青海云杉叶内生真菌形态特征
Fig. 1 Morphological characteristics of foliar endophytic fungi of *Picea crassifolia* on PDA media

分为14种(表3)。其中,卡氏圆酵母(*Torula camporesii*)数量最多,占有菌株的18.75%,且均分离自位于肃南裕固族自治县的一个采样地(S7),澳大利亚小光壳(*Leptosphaerulina australis*)数量次之,占15.63%,甘肃省肃南裕固族自治县(S3)和青海省祁连县(S6)的两个样地中均分离到该菌。此外,有5株菌均属于葫芦霉科(Cucurbitariaceae),占有菌株的15.63%,这些菌株分离自3个不同的样地,分别位于甘肃省的肃南裕固族自治县(S4)、永昌县(S8)和天祝藏族自治县(S9)。此外,样地S4中分离到5种内生真菌,是所有样地中真菌种类最多的,样

地S2、S3、S5分别分离到2种内生真菌,其余样地只分离到1种内生真菌。

2.2.2 构建系统进化树

32株菌中挑选17个代表菌株的rDNA ITS序列与相似序列使用MEGA(7.0)软件进行多序列比对并构建系统进化树。结果如图2所示,17个菌株(黑色加粗)全部隶属于子囊菌门,分属4个纲,其中有12个菌株,即F29、F31、F24、F22、F23、F27、F28、F6、F3、F25、F7、F25的序列聚集在一起,隶属于座囊菌纲(Dothideomycetes);F17和F5这2个菌株的序列聚得很近,属于粪壳菌纲(Sordariomycetes);

表3 青海云杉叶内生真菌 rDNA ITS 序列的 BLAST 结果
Table 3 BLAST results of rDNA ITS sequences of foliar endophytic fungi of *Picea crassifolia*

编号	菌株	相似菌株	相同性/%	类型	占比/%	来源
1	F1,F6,F10	<i>Didymella glomerata</i> (MT000453)	100	A	9.38	S3
2	F2,F22, F23,F24, F32	<i>Cucurbitariaceae</i> sp. (MW540466)	96.71	B(F2,F22,F23,F32) P(F24)	15.63	S4:F2 S8:F22 S9:F23,F24, F32
3	F3	<i>Preussia lignicola</i> (MT520567)	99.74	C	3.13	S7
4	F4,F5	<i>Cytospora piceae</i> (NR_163759)	99.79	D(F4) E(F5)	6.25	S4
5	F7	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (OQ302869)	100	F	3.13	S4
6	F20	<i>Cladosporium herbarum</i> (OQ248162)	100	L	3.13	S5
7	F8,F11, F12,F21, F28	<i>Leptosphaerulina australis</i> (MF787602)	99.79	G(F8,F12,F21) I(F11,F28)	15.63	S3:F8,F11, F12,F28 S6:F21
8	F9,F18, F27	<i>Alternaria tenuissima</i> (OQ031175)	100	H	9.38	S1:F9 S2:F18, F27
9	F13	<i>Talaromyces funiculosus</i> (MH865292)	100	J	3.13	S5
10	F14,F15, F26,F29, F30,F31	<i>Torula camporesii</i> (ON332171)	99.79	K(F14,F29,F30) R(F15,F26, F31)	18.75	S7
11	F16	<i>Tricharina gilva</i> (MN385971)	100	M	3.13	S10
12	F17	<i>Xylaria</i> sp.(KF871461)	100	N	3.13	S2
13	F19	<i>Aspergillus ochraceus</i> (MT649489)	100	O	3.13	S4
14	F25	<i>Sporormiella intermedia</i> (KT192347)	100	Q	3.13	S4

注:此表中类型一列的不同字母对应表2和图1中的不同菌落形态类型
Note: the different letters in the type column in this table correspond to the different colony morphology types in Table 2 and Fig. 1

F13和F19这2个菌株的序列聚在同一分支,隶属于散囊菌纲(Eurotiomycetes)。F16的序列单独聚在了一个分支,隶属于盘菌纲(Pezizomycetes)。

2.3 青海云杉叶内生真菌的类群组成

本研究中共获得的32株内生真菌隶属于1门4纲6目11科12属12种,其中26株菌可鉴定到种水平,1株鉴定到属水平、5株鉴定到科水平(表4)。不同种类真菌的分离数量和所占比例差别较大(表3)。在所有菌株中,卡氏圆酵母、澳大利亚小光壳(*L.*

australis)、葡萄茎枯病菌(*Didymella glomerata*)和极细链格孢(*Alternaria tenuissima*) 4种菌所占的比例较高,依次为18.75%、15.63%、9.38%、9.38%。亚隔孢壳科(Didymellaceae)菌株所占的比例最高,为25.01%,葫芦霉科次之,为15.63%。

3 讨论与结论

本研究以祁连山青海云杉的针叶为研究对象,利用传统微生物培养方法进行了叶内生真菌的分离培养,共获得32株真菌,对其进行rDNA ITS测序分

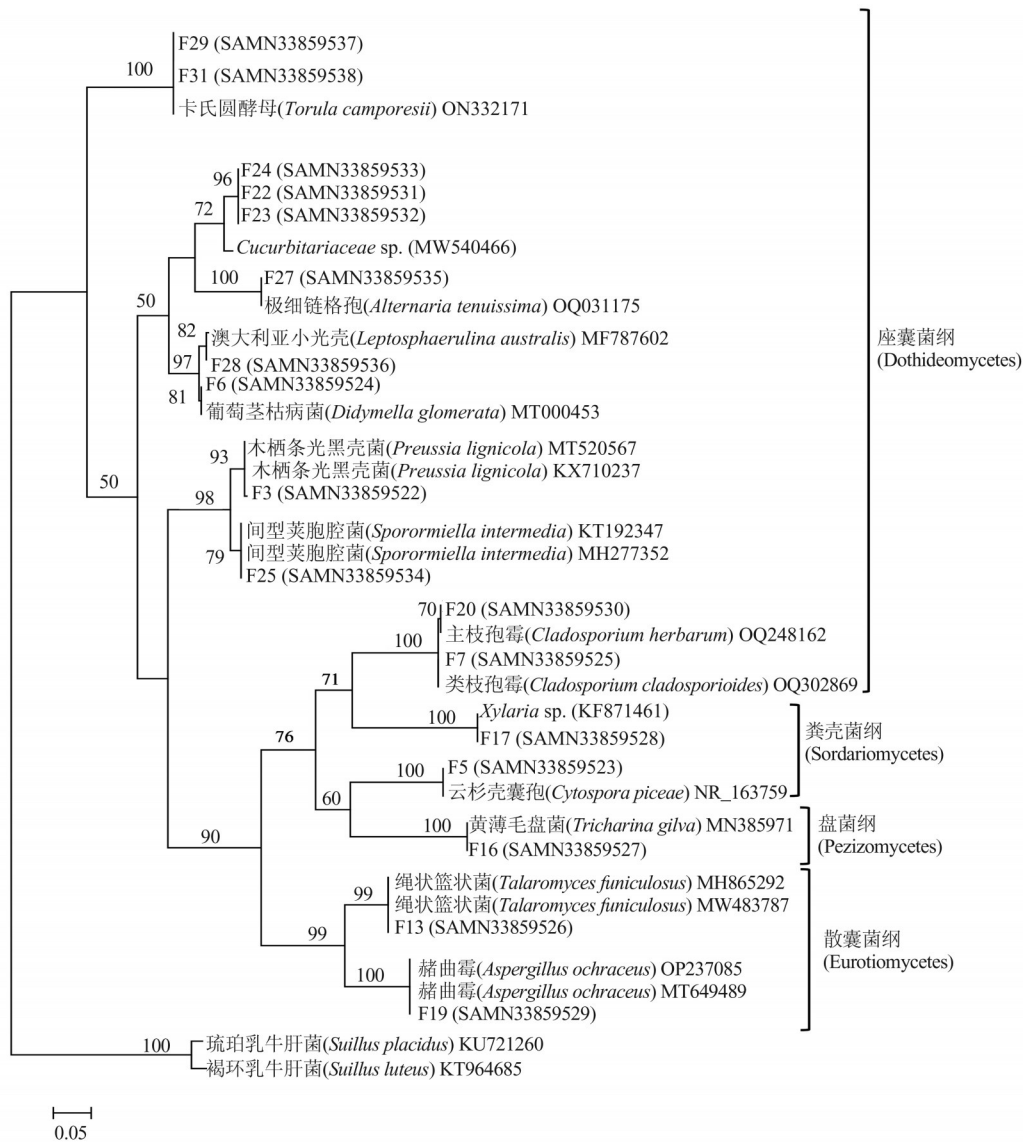


图2 17株叶内生真菌及其近似种 rDNA ITS 序列采用最大似然法构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on rDNA ITS sequences of 17 foliar endophytic fungi and related species using maximum-likelihood

注:分支上的数字表示树的可信度,自展值为1000;加粗编号代表本次研究分离得到菌株序列;*Suillus placidus* (KU721260),*Suillus luteus* (KT964685)为外类群
Note: numbers at the branching point indicate the confidence level of the tree, and bootstrap value of 1000; the bold numbers represente the strains isolated in this study; *Suillus placidus* (KU721260) and *Suillus luteus* (KT964685) are outgroups

表 4 青海云杉叶可培养内生真菌类群组成
Table 4 Taxonomy composition of culturable foliar endophytic fungi of *Picea crassifolia*

门	纲	目	科	属	种
子囊菌门 (Ascomycota)	座囊菌纲 (Dothideomycetes)	格孢菌目 (Pleosporales)	亚隔孢壳科 (Didymellaceae)	亚隔孢壳属	葡萄茎枯病菌
				(<i>Didymella</i>)	(<i>D. glomerata</i>)
			葫芦霉科 (Cucurbitariaceae)	小光壳属	澳大利亚小光壳
				(<i>Leptosphaerulina</i>)	(<i>L. australis</i>)
			荚胞腔菌科 (Sporormiaceae)	光黑壳属(<i>Preussia</i>)	木栖条光黑壳菌(<i>P. lignicola</i>)
				荚胞腔属(<i>Sporormiella</i>)	间型荚胞腔菌(<i>S. intermedia</i>)
			格孢菌科 (Pleosporaceae)	交链孢霉属(<i>Alternaria</i>)	极细链格孢(<i>A. tenuissima</i>)
			Torulaceae	圆酵母属(<i>Torula</i>)	卡氏圆酵母(<i>T. camporesii</i>)
		Cladosporiales	枝孢霉科 (Cladosporiaceae)	枝孢菌属 (<i>Cladosporium</i>)	类枝孢霉(<i>C. cladosporioides</i>)
					主枝孢霉(<i>C. herbarum</i>)
	粪壳菌纲 (Sordariomycetes)	间座壳菌目 (Diaporthales)	黑腐皮壳科 (Valsaceae)	壳囊孢属(<i>Cytospora</i>)	云杉壳囊孢(<i>C. piceae</i>)
		炭角菌目 (Xylariales)	炭角菌科 (Xylariaceae)	炭角菌属(<i>Xylaria</i>)	
	散囊菌纲 (Eurotiomycetes)	散囊菌目 (Eurotiales)	发菌科 (Trichocomaceae)	篮状菌属(<i>Talaromyces</i>)	绳状篮状菌(<i>T. funiculosus</i>)
			曲霉科 (Aspergillaceae)	曲霉菌属(<i>Aspergillus</i>)	赭曲霉(<i>A. ochraceus</i>)
	盘菌纲 (Pezizomycetes)	盘菌目 (Pezizales)	火丝菌科 (Pyronemataceae)	盘菌属(<i>Tricharina</i>)	黄薄毛盘菌(<i>T. gilva</i>)

析及形态学鉴定,隶属于1门4纲6目11科12属12种,其中可鉴定到种水平的有26株菌,仅鉴定到属水平的有1株,而鉴定到科水平的有5株,占分离菌株总数的15.63%,这5株菌可能为新发现的菌种,或可能是测序片段长度不足导致,因此需要进一步进行多片段测序鉴定。相较于高通量测序结果(未发表数据),培养获得的内生真菌种类较少,可能由于实验条件下,使用单一培养基对微生物进行培养,不能满足真菌对多种营养的需求,从而降低对内生菌的分离率^[36]。此外,相较马缨杜鹃(*Rhododendron delavayi*)^[37]、葡萄(*Vitis vinifera*)^[38]、龙脑樟(*Cinnamomum camphora*)^[39]等植物叶内生真菌的分离情况,本研究获得的内生真菌种类也是偏少的,推测可能针叶特殊生境及其特有次级代谢物质对大多数内生真菌的生存具有一定的挑战。此外,在针叶内生真菌培养过程中,可能忽略了针叶特殊性对内生真菌的影响^[40]。因此,如何在尽可能接近针叶的真实生境条件下来分离培养内生真菌,是值得思考的问题。

银杏(*Ginkgo biloba*)叶中分离到的内生真菌多

属于半知菌门,少数属于子囊菌门^[41]。从华山松(*Pinus armandii*)针叶分离到15种内生真菌来自半知菌门,而仅有2种来自子囊菌门^[42]。从油樟(*Cinnamomum longepaniculatum*)叶内分离到的内生真菌除3株属于子囊菌门外,均属于半知菌门^[43]。而本研究从青海云杉叶内获得的内生真菌均属于子囊菌门,其与从红树林植物老鼠簕(*Acanthus ilicifolius*)叶片中分离到的内生真菌的结果相近^[44]。不同研究中分离到不同的植物内生真菌可能受分离方法、培养基的选择以及植物等多种因素的影响^[45]。此外,内生真菌的种类和数量在样地间存在差异,可能与不同样地的微环境差异有关^[46]。

本研究获得的内生真菌,绝大多数是对植物有益的,可为植物生长提供所需的营养元素或提高植物对生物和非生物胁迫的抗性。从荒漠非多肉植物中分离到内生真菌木栖条光黑壳菌(*Preussia lignicola*),推测其与植物对干旱的抗性有关^[47]。类枝孢霉(*Cladosporium cladosporioides*)可提高宿主植物种子的发芽率^[48]、合成特定的次级代谢产物^[49]、产生具有抗菌活性的代谢产物^[50]。黄薄毛盘菌

(*Tricharina gilva*)为药用植物十数樟(*Warburgia ugandensis*)的内生真菌,具有产黄酮类、单宁、生物碱等的能力^[51]。赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)可产生抗枯草芽胞杆菌代谢产物^[52],还可以提高大麦对盐胁迫的抗性^[53]。间型荚胞腔菌(*Sporormiella intermedia*)可促进宿主植物对微量元素的吸收^[54]。这些菌株具有很高的潜在应用价值,可进一步开展后续研究。但有一些内生真菌是可能会引起植物病害的潜伏性病原真菌,如葡萄茎枯病菌(*D. glomerate*),有报道称其可引起猕猴桃黑斑病^[55]、开心果叶枯病^[56]和玉米叶萎病^[57]等多种病害,由于该菌对植物的危害性较高,因此被列入中国《进境植物检疫性有害生物名录》^[58]。云杉壳囊孢(*Cytospora piceae*)为近几年新发现的一种引起青海云杉枝枯病的病原菌^[59,60]。此外,利用FUNGuild真菌功能注释平台^[61]对本研究分离到的真菌进行功能类群预测^[62],结果显示部分真菌是病原菌及腐生菌(表5)。基于相关研究和FUNGuild注释结果(表5),祁连山青海云杉存在发生植物病害的潜在风险。由此可见,及时对青海云杉进行病害调查是很必要的,这对保障祁连山青海云杉的健康具有重要意义。

值得注意的是,本研究中的部分内生真菌既是一些植物的内生真菌,又是另一些植物的病原真菌。

澳大利亚小光壳为药用植物海巴戟(*Morinda citrifolia*)的内生真菌^[63],但发现这种菌能够引起紫花苜蓿叶斑病^[64,65]。极细链格孢为药用植物北桑寄生(*Loranthus tanakae*)和阿魏(*Ferula assafoetida*)的内生真菌^[66,67],而一些报道称极细链格孢会引起猕猴桃叶褐斑病^[68]、山核桃叶黑斑病^[69]和南美藜穗枯病^[70]。*Talaromyces funiculosus*被报道为玉米穗腐病的病原菌^[71],但另有文献中提到*T. funiculosus*分别为地衣和南非药用植物的内生真菌^[72,73]。这从侧面反映了同种真菌在不同的宿主植物间可能有不同的功能。有研究者认为植物内生真菌在发育学上不稳定的阶段,其在植物的不同生活周期中扮演不同的角色,即在植物组织健康生长的时候是内生真菌,但当组织衰老或死亡时则是腐生或病原真菌,这些具有复杂生活史的内生真菌有多种功能营养型可以相互转化,以采取不同的生存策略来适应环境的改变^[74]。在本研究中这些内生真菌的功能如何?角色如何?需要进一步地深入研究。

综上,本研究采用组织培养法首次对祁连山青海云杉叶可培养内生真菌进行分离鉴定,共获得32株14种内生真菌资源。研究资料表明,本研究获得的内生真菌既包含对植物有益真菌,又包含植物潜伏性病原真菌。而这些真菌与青海云杉的相互关系

表5 青海云杉叶内生真菌功能分析
Table 5 Functional analysis of foliar endophytic fungi in *Picea crassifolia*

菌种	可信度	功能群	植物病害
葡萄茎枯病菌(<i>Didymella glomerate</i>)	很可能	动物病原菌-植物病原菌-未定义腐生菌	猕猴桃黑斑病、开心果叶枯病、玉米叶萎病 ^[55~57]
<i>Cucurbitariaceae</i> sp.	很可能	植物病原菌-木质腐生菌	—
木栖条光黑壳菌(<i>Preussia lignicola</i>)	很可能	未定义腐生菌	—
云杉壳囊孢(<i>Cytospora piceae</i>)	很可能	内生真菌-植物病原菌-木质腐生菌	青海云杉枝枯病 ^[59,60]
类枝孢霉 (<i>Cladosporium cladosporioides</i>)	—	无匹配	—
主枝孢霉(<i>Cladosporium herbarum</i>)	很可能	植物病原菌-木质腐生菌	—
澳大利亚小光壳 (<i>Leptosphaerulina australis</i>)	—	无匹配	紫花苜蓿叶斑病 ^[64,65]
极细链格孢(<i>Alternaria tenuissima</i>)	—	无匹配	猕猴桃叶褐斑病、山核桃叶黑斑病、南美藜穗枯病 ^[68~70]
绳状篮状菌(<i>Talaromyces funiculosus</i>)	很可能	未定义腐生菌	玉米穗腐病 ^[71]
卡氏圆酵母(<i>Torula camporesii</i>)	很可能	内生真菌-植物病原菌-木质腐生菌	—
黄薄毛盘菌(<i>Tricharina gilva</i>)	可能	排泄物腐生菌-外生菌根-土壤腐生菌-木质腐生菌	—
<i>Xylaria</i> sp	很可能	内生真菌-未定义腐生菌-木质腐生菌	—
赭曲霉(<i>Aspergillus ochraceus</i>)	很可能	动物病原菌	—
间型荚胞腔菌 (<i>Sporormiella intermedia</i>)	很可能	排泄物腐生菌-植物腐生菌	—

如何? 目前尚不明确。下一步笔者拟分别开展分离所得内生真菌对青海云杉幼苗的促生作用和致病性研究,进一步探究促生真菌的潜在应用价值以及病原真菌的致病机制和防治措施。

参考文献

- [1] Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont [J]. *Ecology*, 1988, 69(1): 2-9.
- [2] Gao Y M, Li Z W, Han Y Q. Community structure of endophytic fungi in roots and leaves of *Fagopyrum* Mill and *Avena sativa* in a Chinese northern cold region [J]. *BIOSCI J*, 2023, 39: e39039. 9.
- [3] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves [C]. In Andrews J H, Hirano S S. *Microbial Ecology of Leaves*. Springer, New York, 1991: 179-197.
- [4] U'Ren J M, Lutzoni F, Miadlikowska J, *et al.* Host availability drives distributions of fungal endophytes in the imperilled boreal realm [J]. *Nat Ecol Evol*, 2019, 3 (10): 1430-1437.
- [5] 姜怡, 杨颖, 陈华红, 等. 植物内生菌资源[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(6): 146-147.
Jiang Y, Yang Y, Chen H H, *et al.* Endophytic bacteria resources in plants [J]. *Microbiol China*, 2005, 32 (6): 146-147.
- [6] 吴令上. 南方红豆杉内生真菌多样性、次生代谢产物及其与宿主的相关性研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
Wu L S. Diversity and secondary metabolites of endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei* and their correlations [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2012.
- [7] Dreyfuss M M, Chapela I H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals [J]. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 1994, 26: 49-80.
- [8] Hawksworth D L, Rossman A Y. Where are all the undescribed fungi? [J]. *Phytopathology*, 1997, 87(9): 888-891.
- [9] 许文涛, 郭星, 罗云波, 等. 微生物菌群多样性分析方法的研究进展[J]. *食品科学*, 2009, 30(7): 258-265.
Xu W T, Guo X, Luo Y B, *et al.* Research progress on analysis methods of diversity of microbial flora [J]. *Food Sci*, 2009, 30(7): 258-265.
- [10] 王红阳, 康传志, 王升, 等. 基于高通量测序和传统培养分离方法的药用植物内生菌资源研究策略[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(8): 1910-1919.
Wang H Y, Kang C Z, Wang S, *et al.* Research strategies for endophytes in medicinal plants based on high-throughput sequencing and traditional culture and isolation methods [J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, 46 (8): 1910-1919.
- [11] Lutzoni F, Nowak M D, Alfaro M E, *et al.* Contemporaneous radiations of fungi and plants linked to symbiosis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5451.
- [12] Plett J M, Martin F M. Know your enemy, embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms [J]. *Plant J*, 2018, 93(4): 729-746.
- [13] Qin X Y, Xu J, An X L, *et al.* Insight of endophytic fungi promoting the growth and development of woody plants [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2023: 1-22.
- [14] Bilal L, Asaf S, Hamayun M, *et al.* Plant growth promoting endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones [J]. *Symbiosis*, 2018, 76(2): 117-127.
- [15] Fadji A E, Babalola O O. Exploring the potentialities of beneficial endophytes for improved plant growth [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27(12): 3622-3633.
- [16] Arnold A E, Mejía L C, Kylo D, *et al.* Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15649-15654.
- [17] Kannadan S, Rudgers J A. Endophyte symbiosis benefits a rare grass under low water availability [J]. *Funct Ecol*, 2008, 22(4): 706-713.
- [18] Ali A H, Abdelrahman M, Radwan U, *et al.* Effect of *Thermomyces* fungal endophyte isolated from extreme hot desert-adapted plant on heat stress tolerance of cucumber [J]. *Appl Soil Ecol*, 2018, 124: 155-162.
- [19] Waller F, Achatz B, Baltruschat H, *et al.* The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(38): 13386-13391.
- [20] Guo L D, Hyde K D, Liew E C Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences [J]. *New Phytol*, 2000, 147(3): 617-630.
- [21] Gao Y, Zhao J T, Zu Y G, *et al.* Characterization of five fungal endophytes producing cajanin stilbene acid isolated from pigeon pea *Cajanus cajan* (L.) Millsp [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27589.
- [22] Arnold A E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers [J]. *Fungal Biol Rev*, 2007, 21(2/3): 51-66.
- [23] Suryanarayanan T S, Shaanker R U. Can fungal endophytes fast-track plant adaptations to climate change?

- [J]. Fungal Ecol, 2021, 50: 101039.
- [24] Darcy J L, Swift S O I, Cobian G M, *et al.* Fungal communities living within leaves of native Hawaiian dicots are structured by landscape-scale variables as well as by host plants [J]. Mol Ecol, 2020, 29(16): 3102-3115.
- [25] Zimmerman N B, Vitousek P M. Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(32): 13022-13027.
- [26] Oita S, Ibáñez A, Lutzoni F, *et al.* Climate and seasonality drive the richness and composition of tropical fungal endophytes at a landscape scale [J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 313.
- [27] 吴中伦, 王战, 林英. 中国森林第2卷: 针叶林[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998. 1-1161.
Wu Z L, Wang Z, Lin Y. Forests in China, Volume 2: Coniferous Forests [M]. Beijing: China forestry publishing house, 1998. 1-1161.
- [28] 张立杰, 蒋志荣. 青海云杉种群分布格局沿海拔梯度分形特征的变化[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(2): 64.
Zhang L J, Jiang Z R. Fractal properties of spatial pattern of *Picea crassifolia* population at different altitudes [J]. J Northwest For Univ, 2006, 21(2): 64.
- [29] 黄乾, 杨海龙, 朱柱, 等. 青海云杉造林密度与水源涵养功能的响应关系[J]. 水土保持学报, 2019, 33(4): 279-286.
Huang Q, Yang H L, Zhu Z, *et al.* Response relationships between afforestation densities and water conservation functions of *Picea crassifolia* [J]. J Soil Water Conserv, 2019, 33(4): 279-286.
- [30] 肉斯塔木·艾买提, 秦红亚, 闫兴富, 等. 宁夏贺兰山青海云杉根系共生真菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 449-462.
AimaitiRousitamu, Qin H Y, Yan X F, *et al.* Isolation and identification of symbiotic fungi in roots of *Picea crasfolia* on Helan Mountain in Ningxia, China [J]. Microbiol China, 2022, 49(2): 449-462.
- [31] 王彬. 祁连山青海云杉树木生长及其对气候变化的响应[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2020.
Wang B. Tree growth of Qinghai spruce and its responses to climate change in the Qilian Mountains [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2020.
- [32] 高琳琳. 祁连山地区树轮气候与生态学研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2015.
Gao L L. Dendroclimatology and dendroecology studies in the Qilian Mountains [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2015.
- [33] 杨文娟. 祁连山青海云杉林空间分布和结构特征及蒸散研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2018.
Yang W J. Spatial distribution, structural characteristics and evapotranspiration of Qinghai spruce forests in the Qi lian Mountains, northwest China [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2018.
- [34] 李敏, 姚庆智, 魏杰, 等. 贺兰山紫蘑的分离、鉴定与培养条件[J]. 北方园艺, 2017(14): 169-174.
Li M, Yao Q Z, Wei J, *et al.* Separation, identification and culture conditions of *Cortinarius* sp. [J]. Nor Horticult 2017(14): 169-174.
- [35] Bowman E A, Arnold A E. Distributions of ectomycorrhizal and foliar endophytic fungal communities associated with *Pinus ponderosa* along a spatially constrained elevation gradient [J]. Am J Bot, 2018, 105(4): 687-699.
- [36] 邢磊, 赵圣国, 郑楠, 等. 未培养微生物分离培养技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(12): 3053-3066.
Xing L, Zhao S G, Zheng N, *et al.* Advance in isolation and culture techniques of uncultured microbes: a review [J]. Microbiol China, 2017, 44(12): 3053-3066.
- [37] 张正权, 谷锐, 罗宗龙, 等. 马缨杜鹃可培养内生真菌及组织特异性[J/OL]. 分子植物育种: 1-12 [2023-09-28].
Zhang Z Q, Gu R, Luo Z L, *et al.* Culturable endophytic fungi and tissue specificity of *Rhododendron delavayi* [J/OL]. Molecular Plant Breeding: 1-12 [2023-09-28].
- [38] 马勉娣, 黄治钰, 张秀英, 等. 葡萄叶可培养内生真菌多样性与分布特征[J]. 中国农学通报, 2014, 30(13): 118-125.
Ma M D, Huang Z Y, Zhang X Y, *et al.* Diversity of endophytic fungi in leaves of different variety grapes [J]. Chin Agric Sci Bull, 2014, 30(13): 118-125.
- [39] 金宏杰, 曹红, 刘红, 等. 龙脑樟树叶内生真菌的分离及生物活性菌株的筛选鉴定[J]. 生物技术通报, 2019, 35(3): 53-58.
Jin H J, Cao H, Liu H, *et al.* Isolation of endophytic fungi from *Cinnamomum camphora* leaves, screening and identification of biologically active strains [J]. Biotechnol Bull, 2019, 35(3): 53-58.
- [40] 梁艳. 内蒙古中西部针叶树内生真菌的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
Liang Y. Study on endophyte in conifer in the midwest Inner Mongolia [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010.
- [41] 杜少康, 陈双林, 林岱, 等. 银杏叶部内生真菌多样性的研究[J]. 菌物学报, 2009, 28(4): 504-511.
Du S K, Chen S L, Lin D, *et al.* Diversity of endophytic fungi in leaves of *Ginkgo biloba* [J]. Mycosystema,

- 2009, 28(4): 504-511.
- [42] 张雪, 刘应高, 张翅, 等. 华山松叶内生真菌的分离鉴定及筛选[J]. 中国森林病虫, 2009, 28(1): 1-3.
Zhang X, Liu Y G, Zhang C, *et al.* Isolation and screen of endophytic fungi from *Pinus armandii* needles [J]. Forest Pest and Disease, 2009, 28(1): 1-3.
- [43] 王涛, 魏淑芳, 魏琴, 等. 油樟叶内生真菌的多样性研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2007(3): 300-302, 307.
Wang T, Wei S F, Wei Q, *et al.* Diversity of endophytic fungi from leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* [J]. J Yunnan Univ Nat Sci Ed, 2007(3): 300-302, 307.
- [44] Chi W C, Chen W L, He C C, *et al.* A highly diverse fungal community associated with leaves of the mangrove plant *Acanthus ilicifolius* var. *xiamenensis* revealed by isolation and metabarcoding analyses [J]. Peer J, 2019, 7: e7293.
- [45] 易天凤, 吴友根, 于靖, 等. 海南广藿香内生真菌分离鉴定及拮抗菌株筛选[J]. 热带作物学报, 2019, 40(8): 1598-1605.
Yi T F, Wu Y G, Yu J, *et al.* Isolation and identification of endophytic fungi from Hainan patchouli and screening of antagonistic strains [J]. Chin J Trop Crops, 2019, 40(8): 1598-1605.
- [46] Oono R, Black D, Slessarev E, *et al.* Species diversity of fungal endophytes across a stress gradient for plants [J]. New Phytol, 2020, 228(1): 210-225.
- [47] Massimo N C, Nandi Devan M M, Arendt K R, *et al.* Fungal endophytes in aboveground tissues of desert plants: infrequent in culture, but highly diverse and distinctive symbionts [J]. Microb Ecol, 2015, 70(1): 61-76.
- [48] Qin Y, Pan X Y, Yuan Z L. Seed endophytic microbiota in a coastal plant and phytobeneficial properties of the fungus *Cladosporium cladosporioides* [J]. Fungal, Ecol, 2016, 24: 53-60.
- [49] Jayaram H, Marigowda V, Thara Saraswathi K J. Secondary metabolite production and terpenoid biosynthesis in endophytic fungi *Cladosporium cladosporioides* isolated from wild *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats [J]. Microbiol Res, 2021, 12(4): 812-828.
- [50] Yehia R S, Osman G H, Assagaf H, *et al.* Isolation of potential antimicrobial metabolites from endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* from endemic plant *Zygophyllum mandavillei* [J]. S Afr J Bot, 2020, 134: 296-302.
- [51] Mbilu M, Wanyoike W, Kangogo M, *et al.* Isolation and characterization of endophytic fungi from medicinal plant *Warburgia ugandensis* [J]. J Biol Agric Healthc, 2018, 8(12): 57-66.
- [52] 罗萍, 邵刚, 张升琪, 等. 旱生卷柏内生真菌 *Aspergillus ochraceus* SX-C7 次生代谢产物研究[J]. 中草药, 2020, 51(15): 3856-3862.
Luo P, Shao G, Zhang S Q, *et al.* Secondary metabolites of endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* SX-C7 from *Selaginella stauntoniana* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(15): 3856-3862.
- [53] Badawy A A, Alotaibi M O, Abdelaziz A M, *et al.* Enhancement of seawater stress tolerance in barley by the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* [J]. Metabolites, 2021, 11(7): 428.
- [54] Garcia-Latorre C, Rodrigo S, Santamaria O. Effect of fungal endophytes on plant growth and nutrient uptake in *Trifolium subterraneum* and *Poa pratensis* as affected by plant host specificity [J]. Mycol Prog, 2021, 20(9): 1217-1231.
- [55] Pan H, Chen M, Deng L, *et al.* First report of *Didymella glomerata* causing black spot disease of kiwifruit in China [J]. Plant Dis, 2018, 102(12): 2654.
- [56] Moral J, Lichtemberg P S F, Papagelis A, *et al.* *Didymella glomerata* causing leaf blight on pistachio [J]. Eur J Plant Pathol, 2018, 151(4): 1095-1099.
- [57] Ma W D, Yang J, Gao X Y, *et al.* First report of *Didymella glomerata* causing *Didymella* leaf blight on maize [J]. Plant Dis, 2022, 106(9): 2522.
- [58] 郭立新, 段丽君, 段维军, 等. 葡萄茎枯病菌生物学特性及室内药剂筛选研究[J]. 植物检疫, 2014, 28(5): 1-5.
Guo L X, Duan L J, Duan W J, *et al.* Study on biological characteristics and screening fungicides of *Phoma glomerata* [J]. Plant Quar, 2014, 28(5): 1-5.
- [59] Pan M, Zhu H Y, Tian C M, *et al.* *Cytospora piceae* sp. nov. associated with canker disease of *Picea crassifolia* in China [J]. Phytotaxa, 2018, 383(2): 181-196.
- [60] 周文秀, 田呈明, 游崇娟. 云杉腐烂病菌 *Cytospora piceae* 全基因组测序及比较基因组分析[J]. 微生物学报, 2021, 61(10): 3128-3148.
Zhou W X, Tian C M, You C J. Genomic sequencing analysis of *Cytospora piceae* associated with spruce canker disease and comparative genomic analysis of *Cytospora* species [J]. Acta Microbiol Sin, 2021, 61(10): 3128-3148.
- [61] Nguyen N H, Song Z W, Bates S T, *et al.* FUN-Guild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild [J]. Fungal Ecol, 2016, 20: 241-248.
- [62] 熊丹, 欧静, 李林盼, 等. 黔中地区马尾松林下杜鹃根

- 部内生真菌群落组成及其生态功能[J]. 生态学报, 2020, 40(4): 1228-1239.
- Xiong D, Ou J, Li L P, *et al.* Community composition and ecological function analysis of endophytic fungi in the roots of *Rhododendron simsii* in *Pinus massoniana* forest in central Guizhou [J]. Acta Ecol Sin, 2020, 40 (4): 1228-1239.
- [63] Wu Y G, Girmay S, da Silva V M, *et al.* The role of endophytic fungi in the anticancer activity of *Morinda citrifolia* Linn. (Noni) [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 393960.
- [64] 张梨梨. 澳大利亚小光亮(*Leptosphaerulina australis*) 引致的苜蓿新病害对产量和营养的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
- Zhang L L. The effects of new alfalfa disease caused by *Leptosphaerulina australis* on yield and nutrient [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2021.
- [65] Zhang L L, Li Y Z. First report of alfalfa leaf spot caused by *Leptosphaerulina australis* in China [J]. Plant Dis, 2021, 105(8): 2254.
- [66] Zheng Z Y, Chai S T, Chen J, *et al.* Isolation and identification of flavonoid-producing endophytic fungi from *Loranthus tanakae* Franch. & Sav. that exhibit antioxidant and antibacterial activities [J]. J Appl Microbiol, 2022, 133(3): 1892-1904.
- [67] Parvandi M, Rezadoost H, Farzaneh M. Introducing *Alternaria tenuissima* SBUp1, as an endophytic fungus of *Ferula assa-foetida* from Iran, which is a rich source of rosmarinic acid [J]. Lett Appl Microbiol, 2021, 73 (5): 569-578.
- [68] Li L, Pan H, Deng L, *et al.* First report of *Alternaria tenuissima* causing brown spot disease of kiwifruit foliage in China [J]. Plant Dis, 2019, 103(3): 582.
- [69] Yan L C, Yang X, Wang Z W, *et al.* First report of *Alternaria tenuissima* causing leaf black spot on pecan in China [J]. Plant Dis, 2022, 106(6): 1748.
- [70] 旺姆, 贡布扎西, 刘云龙, 等. 西藏南美藜(*Chenopodium quinoa* Willd)病害初步研究[J]. 云南农业大学学报, 1995, 10(2): 88-91.
- Wang M, TrashiGongbu, Liou Y L, *et al.* Preliminary research on *Chenopodium quinoa* disease in Tibet [J]. J Yunnan Agric Univ, 1995, 10(2): 88-91.
- [71] Liu S S, Wang J H, Guo N, *et al.* *Talaromyces funiculosus*, a novel causal agent of maize ear rot and its sensitivity to fungicides [J]. Plant Dis, 2021, 105(12): 3978-3984.
- [72] Padhi S, Masi M, Cimmino A, *et al.* Funiculosone, a substituted dihydroxanthene-1, 9-dione with two of its analogues produced by an endolichenic fungus *Talaromyces funiculosus* and their antimicrobial activity [J]. Phytochemistry, 2019, 157: 175-183.
- [73] Abdalla M A, Aro A O, DGadoet *al.* Isolation of endophytic fungi from South African plants, and screening for their antimicrobial and extracellular enzymatic activities and presence of type I polyketide synthases [J]. S Afr J Bot, 2020, 134: 336-342.
- [74] Arnold A E, Lutzoni F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hot-spots? [J]. Ecology, 2007, 88(3): 541-549.

□

(编辑: 杨晓翠)