

DOI:10.12171/j.1000-1522.20230299

不同病斑等级的西伯利亚红松针叶内生真菌 多样性和菌群结构

姜奕冰^{1,2} 宋小双^{2,3} 王占斌¹ 王亮⁴ 邓勋^{2,3} 遇文婧^{2,3}

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省森林保护研究所, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江省森林草原火灾及病虫害
防控重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040; 4. 萝北县林木种苗和森林病防站, 黑龙江 鹤岗 154200)

摘要:【目的】研究不同病斑等级的西伯利亚红松针叶中内生真菌的多样性和菌群结构, 为西伯利亚红松生物防治提供理论依据。【方法】对西伯利亚红松针叶中的真菌进行高通量测序, 并进行 α 和 β 多样性分析, 利用 Spearman 相关性系数分析真菌间相关性, 采用 FUNGuild 数据库预测真菌营养类群。【结果】(1) α 和 β 多样性分析表明, 健康针叶内生真菌多样性丰富。与感病针叶相比, 内生真菌多样性存在显著差异, 而不同病斑等级的针叶多样性差异不显著, 在发病后期针叶内生真菌群落多样性相似度较高。(2) 真菌群落 LEfSe 分析表明健康叶片样品组中的差异指示类群最多(19 个)。(3) 群落结构分析表明, 与感病针叶内生真菌群落结构相比, 健康针叶中内生真菌群落结构较复杂, 其中镰刀菌属占主要地位; 不同病斑等级的西伯利亚红松针叶真菌群落结构也存在差异, 其中在轻度染病的针叶中 43.94% 的优势内生真菌为拟青霉属; 随着病斑等级的加深, 优势内生真菌为穴疔盘孢属。(4) 已染病的针叶与健康针叶相比, 内生真菌营养类群发生明显变化, 健康针叶内生真菌群落营养类型相对丰度较为均匀, 随着病斑等级的增加, 针叶内生真菌群落营养型从病理型向腐生型转变, 且存在大量未知功能菌群。【结论】在不同病斑等级的西伯利亚红松针叶内, 内生真菌的多样性及其菌群结构存在显著差异($P < 0.05$)。在健康的针叶内, 内生菌的多样性指数最高、指示类群最多。但是随着病斑面积的增加, 针叶中的营养型内生真菌从病理型真菌向腐生型真菌转变。

关键词: 内生真菌; 真菌多样性分析; 西伯利亚红松; 群落结构

中图分类号: S763.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2024)11-0024-10

引文格式: 姜奕冰, 宋小双, 王占斌, 等. 不同病斑等级的西伯利亚红松针叶内生真菌多样性和菌群结构 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(11): 24-33. Jiang Yibing, Song Xiaoshuang, Wang Zhanbin, et al. Diversity and community structure of endophytic fungi in *Pinus sibirica* needles with different lesion grades[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(11): 24-33.

Diversity and community structure of endophytic fungi in *Pinus sibirica* needles with different lesion grades

Jiang Yibing^{1,2} Song Xiaoshuang^{2,3} Wang Zhanbin¹ Wang Liang⁴ Deng Xun^{2,3} Yu Wenjing^{2,3}

(1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

2. Heilongjiang Institute of Forest Protection, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

3. Heilongjiang Key Laboratory of Forest and Grassland Fire and Pest Control, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

4. Luobei County Forest Seedling and Forest Disease Prevention Station, Hegang 154200, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] The diversity and flora structure of endophytic fungi in needles of *Pinus sibirica* with different lesion grades were studied to provide a theoretical basis for the microecological control of

收稿日期: 2023-10-31 修回日期: 2024-09-08

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(LH2023C105), 黑龙江省省属科研院所科研业务费项目(LKSB2024-9、CZKYF2022-1-B031、CZKYF2022-1-C048), 国家自然科学基金项目(31670649)。

第一作者: 姜奕冰。主要研究方向: 森林病理学。Email: 3196338813@qq.com 地址: 150040 黑龙江省哈尔滨市和兴路 126 号东北林业大学林学院。

责任作者: 邓勋, 博士, 研究员。主要研究方向: 森林病理学。Email: dxhappy@126.com 地址: 150081 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 134 号。遇文婧, 博士, 研究员。主要研究方向: 森林病理学。Email: ywjllidna2008@163.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

Siberian red pine diseases. [Method] The fungi in needles of *P. sibirica* were sequenced by high-throughput sequencing method, α and β diversity were analyzed by Spearman correlation coefficient, and fungal trophic groups were predicted by FUNGuild database. [Result] (1) α and β diversity analysis showed that the endophytic fungal diversity in asymptomatic needle leaves was higher, and the diversity of endophytic fungi was significantly different from infected needles. There was no significant difference in needle leaf diversity among different lesion grades, and the diversity of endophytic fungal communities of needle leaves was more similar in later stages of disease. (2) Fungal community LEfSe analyses showed the highest number of significant biomarkers (19) in the sample group of asymptomatic needle leaves. (3) Community structure analysis showed that, compared with the endophytic fungal community structure of infected needle leaves, the endophytic fungal community structure of asymptomatic needle leaves was more complex, in which *Fusarium* spp. was dominated; there were also differences in the fungal community structure of *P. sibirica* needle leaves with different lesion grades, in which 43.94% of dominant endophytic fungi in mildly infected needles was *Penicillium* spp., and as lesion grades deepened, the dominant endophytic fungus was *Dothistroma* spp. (4) The endophytic fungal trophic classification of diseased needle leaves changed significantly compared with asymptomatic needles. The relative abundance of endophytic fungal trophic classification in asymptomatic needle leaves was relatively uniform, and as the level of lesion increased, the endophytic fungal trophic classification in needle leaves shifted from pathological fungi to saprophytic fungi, and a large number of unknown functional fungal groups existed. [Conclusion] The diversity and community structure of endophytic fungi are significantly different ($P < 0.05$) in the needles of *Pinus sibirica* with different lesion grades. In healthy needles, endophytic bacteria have the highest diversity index and most indicator groups. However, with the increase of lesion grade, the nutrient type of endophytic fungi community changes from pathological type to saprophytic type.

Key words: endophytic fungi; fungal diversity analysis; *Pinus sibirica*; community structure

西伯利亚红松(*Pinus sibirica*), 属松科(Pinaceae) 松属(*Pinus*), 是一种常绿高大乔木^[1-2]。作为重要的果材兼用树种^[3], 自 1990 年我国引种以来^[1], 随着种植规模的扩大, 病虫害问题逐渐显现, 尤其是半知菌、子囊菌等病原菌的危害严重^[4], 这严重影响了西伯利亚红松的生长发育, 阻碍了其生产和推广。

植物内生真菌(plant endophytic fungi)是一定阶段或全部阶段生活于植物的组织和器官内部的真菌^[5]。内生真菌种类多样, 分布广泛^[6], 与寄主植物在长期协同进化中形成了一种平衡稳定的共生关系。内生真菌通过分泌代谢产物对寄主产生积极影响, 而植物则为其提供营养^[7-9]。然而, 当环境条件或生物因素发生变化时, 这种平衡关系可能被打破, 导致菌群失调, 进而改变植物内的真菌群落结构和多样性^[10]。

已有研究表明, 植物内生真菌在抵抗病原菌方面具有一定潜力^[11]。然而, 由于内生真菌多样性受生存环境、寄主健康状况等因素的影响, 深入探讨内生真菌的多样性及其菌群结构, 对于理解寄主、病原菌和内生真菌之间的相互作用具有重要意义, 有助于预防植物病害的发生^[12]。本文以西伯利亚红松为研究对象, 通过分析不同病斑等级针叶中的真菌多样性及其菌群结构, 探讨不同发病状态下西伯利亚

红松针叶内生真菌的变化规律, 以期向西伯利亚红松病害防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 采样区概况

采样地区位于黑龙江省大海林林业局苗圃(128°02'E, 44°03'N), 属温带气候, 海拔 580 m, 年均气温 2 °C, ≥ 10 °C 积温 1 700 ~ 1 800 °C·d, 年均降水量 650 ~ 700 mm^[13-14]。

1.2 样本采集

本试验于 2021 年 6 月在大海林林业局苗圃样地进行采样, 随机选取 15 株发病的西伯利亚红松苗, 在约 1.5 m 高度随机选取 3 个枝条, 采集针叶。同时选取 3 株健康西伯利亚红松苗, 在相同高度随机选取 3 个枝条, 采集健康针叶作为对照, 置于冷链箱保存运输, 24 h 内处理样品。根据不同的病斑大小及覆盖面积, 将针叶分成 5 级(PM1、PM2、PM3、PM4、PM5), 每级 3 个重复。PM1 为健康针叶样品; PM2 为轻度发病针叶样品, 病斑长度占针叶的 1/3; PM3 为中度发病针叶样品, 病斑长度占针叶的 1/2; PM4 为重度发病针叶, 病斑长度占针叶的 2/3; PM5 为完全发病针叶样品, 等级依据见表 1 和图 1。将样品冲洗干净, 消毒处理后, 用无菌水冲洗 3 次,

表1 西伯利亚红松针叶按不同病斑等级分级依据
Tab. 1 Classification basis of needles of *Pinus sibirica* according to different lesion grades

样本编号 Sample No.	分级依据 Classification basis
PM1	健康无病斑的针叶 Asymptomatic needles without lesion
PM2	病斑长度占针叶的1/3 Lesion length accounting for 1/3 of needles
PM3	病斑长度占针叶的1/2 Lesion length accounting for 1/2 of needles
PM4	病斑长度占针叶的2/3 Lesion length accounting for 2/3 of needles
PM5	针叶完全变黄枯萎 Needles turn completely yellow and wilt

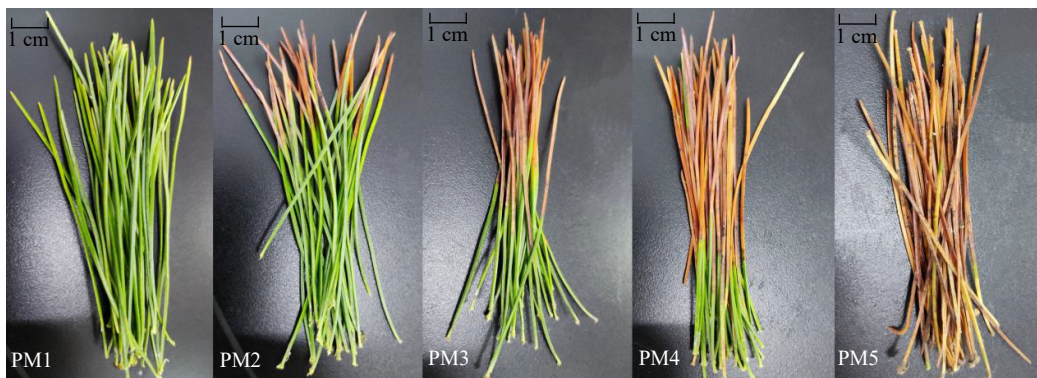


图1 不同病斑等级的西伯利亚红松针叶

Fig. 1 Needles of *P. sibirica* with different lesion grades

1.4 测序数据处理与分析

对测序获得的原始数据进行优化,提取非重复序列,去掉没有重复的单序列,按97%相似性对非重复的序列进行OTU聚类^[20]。利用MOTHUR计算不同样品间的 α 多样性指数^[21],SPSS Statistics 26分析 α 多样性指数差异性。Unifrac进行PCoA分析^[22];FUNGuild在线数据库进行功能预测;Spearman相关矩阵研究内生真菌相关性;R软件(v.4.1.2)绘制群落组成柱状图PCoA图。

2 结果与分析

2.1 测序深度及OTU聚类分析结果

西伯利亚红松不同病斑等级针叶中物种多样性和丰富度结果见图2和表2。随着测序深度的增加,样品曲线趋于平稳(图2)。Coverage测序深度指数分析结果显示样品覆盖率超过99%(表2),表明测序深度基本覆盖了样品中所有物种。

西伯利亚红松不同病斑等级针叶的OTU组成分析结果如图3所示。样品中的OTU总数为1080个,其中不同病斑等级针叶中相同的OTU有285个,占总数的26.39%。PM5样品中特有OTU数量最多,占11.11%;PM1中特有OTU数量最少,占2.04%。

将冲洗液稀释,涂布于PDA培养基上,25℃静置培养。7d后若无真菌生长,则表明针叶样品表面已无菌^[15-17]。

1.3 DNA提取与PCR扩增

使用DNA试剂盒(Omega)提取样本DNA,质量检测合格后以引物ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')进行PCR扩增^[18]。反应体系^[19]为上游引物1μL,下游引物1μL,牛血清蛋白3μL,2×Taq聚合酶12.5μL,DNA样品1μL,ddH₂O6.5μL。纯化的PCR产物定量后进行高通量测序^[18]。

2.2 α 多样性分析

对西伯利亚红松不同病斑等级针叶进行 α 多样性分析(表2)。结果显示,PM1内生真菌多样性指标与感病针叶相比差异性显著($P < 0.05$),其中Shannon-Wiener多样性指数最高,Simpson多样性指数最低,说明健康无病斑针叶内生真菌多样性丰富。而不同病斑等级的针叶多样性之间差异不显著($P > 0.05$)。

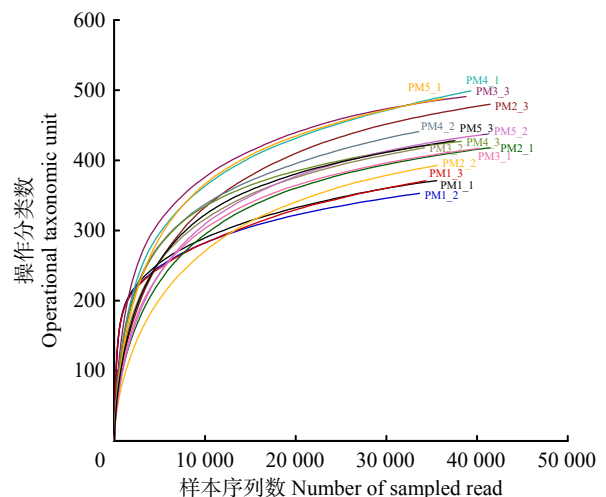


图2 西伯利亚红松针叶中的内生真菌OTU曲线

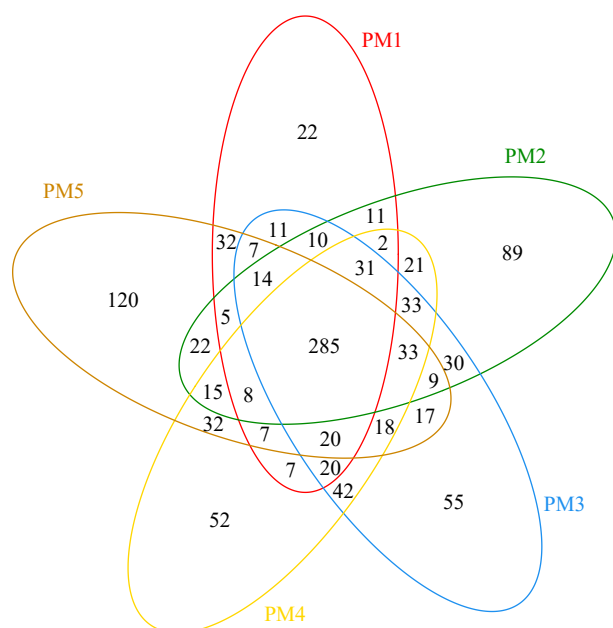
Fig. 2 OTU curves of endophytic fungi in needles of *P. sibirica*

表 2 西伯利亚红松的不同病斑等级针叶中的真菌多样性

Tab. 2 Fungal diversity in needles of *P. sibirica* with different lesion grades

样品编号 Sample No.	Chao1	ACE	Shannon-Wiener	Simpson	覆盖率 Coverage/%
PM1	426.67 ± 12.34b	440.48 ± 19.42a	7.13 ± 0.01a	0.01 ± 0.00b	99.80
PM2	474.09 ± 42.03ab	479.49 ± 39.06a	4.20 ± 0.20b	0.12 ± 0.01a	99.81
PM3	485.04 ± 21.62ab	488.70 ± 30.25a	4.75 ± 0.45b	0.14 ± 0.03a	99.82
PM4	517.98 ± 38.64a	523.76 ± 46.71a	4.82 ± 0.11b	0.15 ± 0.03a	99.78
PM5	501.13 ± 30.90a	500.18 ± 31.25a	4.50 ± 0.36b	0.14 ± 0.04a	99.81

注: 同列不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。Note: different letters in the same column mean significant difference at $P < 0.05$ level.



数字代表某个样品独有或几种样品共有的 OTU 数量。The number represents the quantity of OTUs unique to a sample or shared by several samples.

图 3 西伯利亚红松的不同病斑等级针叶 OTU 分类

Fig. 3 Needle-leaf OTU classification of *P. sibirica* with different lesion grades

2.3 β 多样性分析

对西伯利亚红松不同病斑等级针叶进行 β 多样性分析(图 4)。结果表明, PM3、PM4、PM5 相聚较近, 且与 PM1、PM2 相聚较远, 说明西伯利亚红松在受病原菌侵害后, 针叶内生真菌群落不断变化, 健康针叶与已染病针叶内生真菌群落构成差异明显, 在发病后期针叶内生真菌群落多样性相似度较高。

2.4 不同病斑等级的针叶中真菌群落的 LEfSe 分析

对西伯利亚红松不同病斑等级针叶进行 LEfSe 分析, 阈值设置为 $LDA > 4$, $P < 0.05$, 分析结果如图 5 所示。结果显示共获得 1 个门, 6 个纲、11 个目、11 个科、14 个属, 共 43 个不同分类水平的真菌指示类群, 其中指示类群多数为健康叶片 PM1 样品组中的真菌(19 个)。PM1 样品组中具有较强指示性差异属为曲霉属(*Aspergillus*)、被孢霉属(*Mortierella*)、

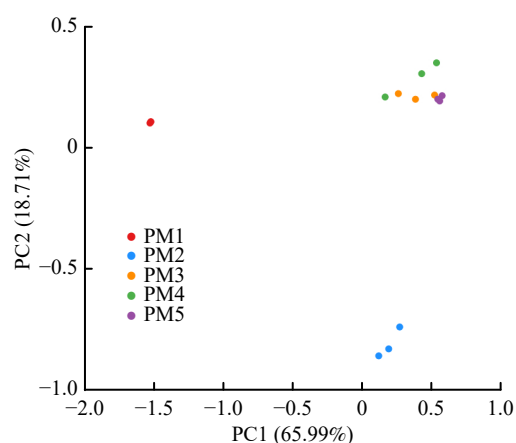


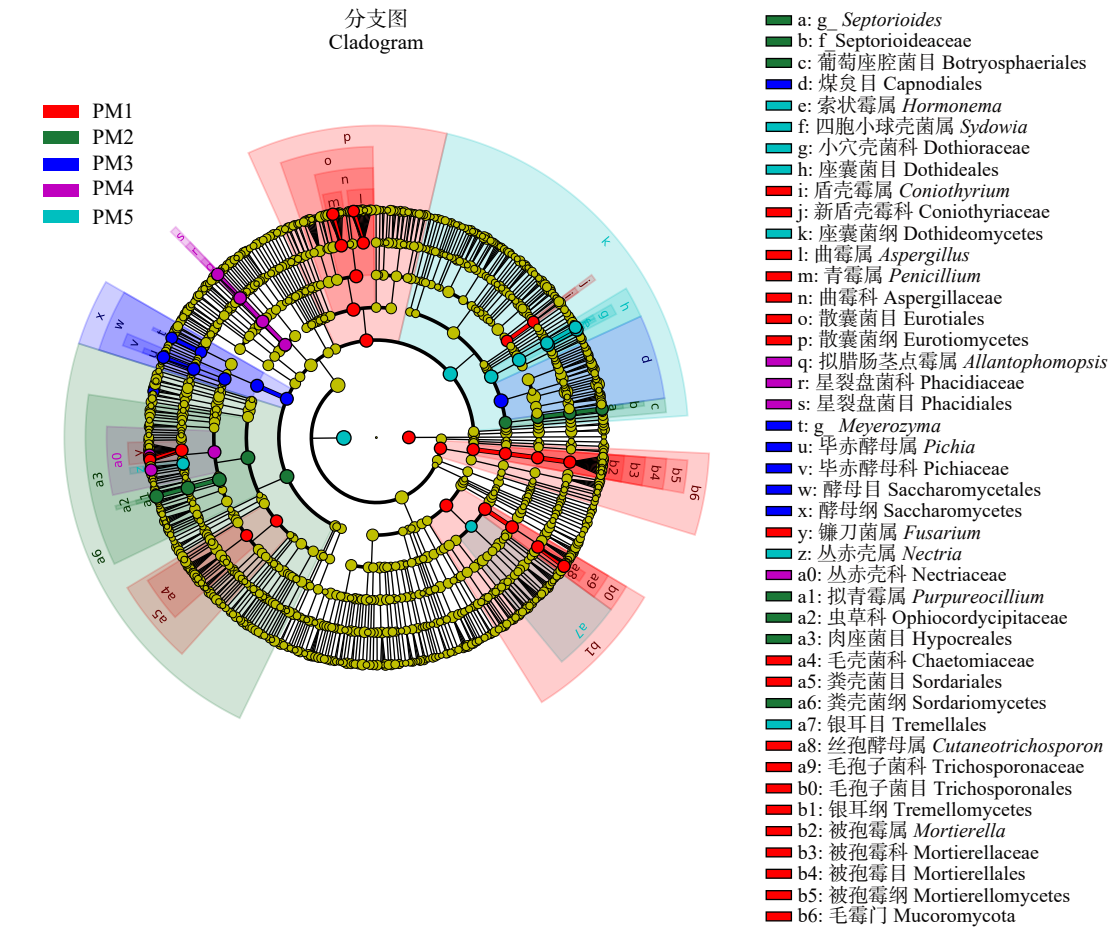
图 4 西伯利亚红松针叶中的真菌主坐标(PCoA)分析

Fig. 4 Fungal principal coordinate (PCoA) analysis in the needles of *P. sibirica*

丝孢酵母菌属(*Cutaneotrichosporon*)、青霉菌属(*Penicillium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)。PM2 中具有较强指示性差异属为拟青霉菌属(*Purpureocillium*)。PM3 中具有较强指示性差异属为毕赤酵母属(*Pichia*)、季也蒙酵母属(*Meyerozyma*)。PM4 中具有较强指示性差异属为拟腊肠茎点霉属(*Allantophomopsis*)。PM5 中具有较强指示性差异属为索状霉属(*Hormonema*)、四胞小球壳菌属(*Sydowia*)、丛赤壳属(*Nectria*)。结果表明指示类群多数为健康叶片 PM1 样品组中的真菌。

2.5 内生真菌群落结构组成分析

对 5 种不同病斑等级针叶内生真菌的 1 080 个 OTU 序列进行门水平、属水平上的分类, 主要包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和毛霉菌门(Mucoromycota), 共涉及 335 个属。从门水平上看(图 6), 子囊菌门在各个病斑等级中占比都很高, 分别为 67.20%、88.90%、93.00%、93.50%、92.80%。其次为担子菌门, 在各个病斑等级中的占比分别为 17.9%、4.80%、2.91%、2.71%、4.50%。毛霉菌门在各个病斑等级中的占比分别为 5.66%、2.02%、0.72%、1.09%、0.34%。内生真菌中优势菌群主要为子囊菌门和担子菌门, 不同病斑等级下的相



g_属 Genus; f_科 Family

图5 西伯利亚红松针叶内生真菌群落 LefSe 分析

Fig. 5 Horizontal LefSe analysis of endophytic fungi community in coniferous leaves of *P. sibirica*

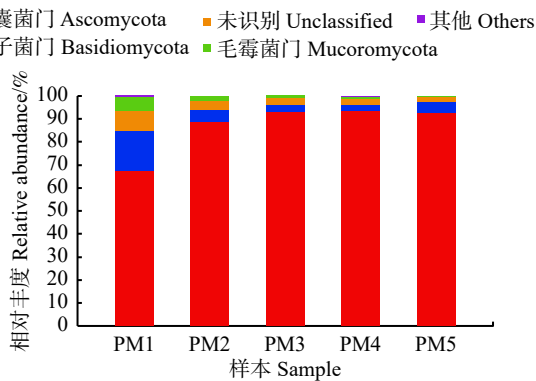


图6 不同病斑等级的西伯利亚红松针叶中真菌门水平组成

Fig. 6 Horizontal composition of phylum fungi in the needles of *P. sibirica* with different lesion grades

对丰度存在显著差异。随着病斑等级的加重,子囊菌门的相对丰度逐渐增加,但在针叶完全枯萎后略有下降;担子菌门的相对丰度则随病斑等级加重逐步减少,但在针叶完全枯萎时又有所上升。

从属水平上分析(图7),健康针叶 PM1 中相对峰度较高的属包括镰刀菌属 (*Fusarium*) 9.91%、青霉属 (*Penicillium*) 8.32%、丝孢酵母属 (*Cutaneotrichosporon*) 8.09%、曲霉属 (*Aspergillus*)

5.47%。PM2 中,相对丰度较高的属有拟青霉属 (*Purpureocillium*) 43.94%、穴褥盘孢属 (*Dothistroma*) 25.70% 和散斑壳属 (*Lophodermium*) 4.46%。PM3 中,相对丰度较高的属包括穴褥盘孢属 40.50%、毕赤酵母属 (*Pichia*) 8.16%、索状霉属 (*Hormonema*) 7.04% 和四胞小球壳菌属 (*Sydowia*) 6.38%。PM4 中,相对丰度较高的属包括穴褥盘孢属 34.68%、拟腊肠茎点霉属 (*Allantophomopsis*) 9.27%、镰刀菌属 (*Fusarium*) 6.97%、丛赤壳属 (*Nectria*)。PM5 中,相对丰度较高的属包括穴褥盘孢属 34.59%、索状霉属 12.85%、四胞小球壳菌属 (*Sydowia*) 9.01%、丛赤壳属 (*Nectria*) 7.48%。结果表明:与感病针叶相比,健康针叶 PM1 中内生真菌群落结构较复杂,镰刀菌属占据主要地位;不同病斑等级的西伯利亚红松针叶内生真菌群落结构存在显著差异。特别是在轻度染病的针叶 PM2 中,43.94% 的优势内生真菌为拟青霉属,随着病斑等级的加重,PM3、PM4 和 PM5 中的优势内生真菌为穴褥盘孢属。

2.6 群落峰度热图

从图8显示的群落丰富度热图可以看出,丰富

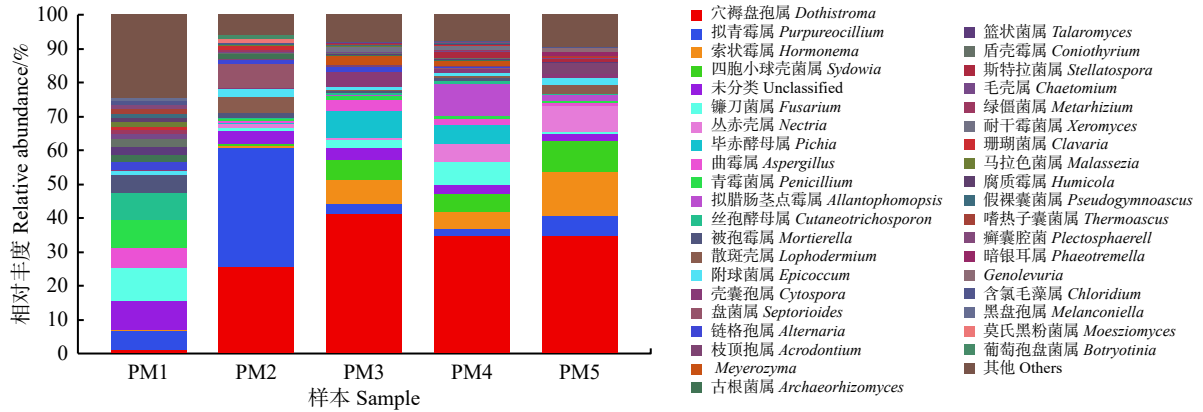


图 7 不同病斑等级的西伯利亚红松针叶中真菌属水平组成

Fig. 7 Horizontal composition of fungi in the needles of *P. sibirica* with different lesion grades

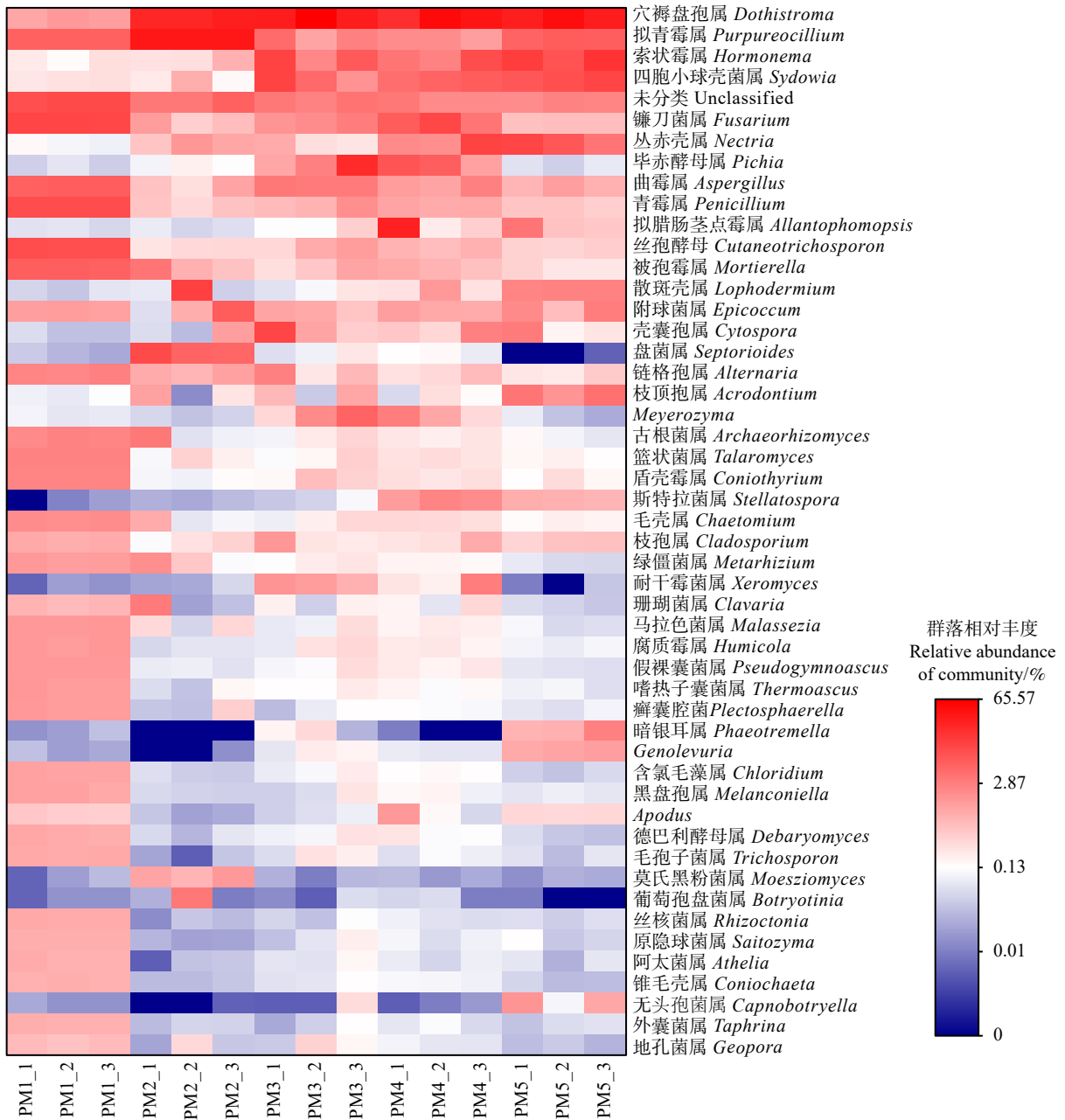


图 8 群落峰度热图

Fig. 8 Community kurtosis heat map

度最高的内生真菌为松穴褥盘孢属,其次是拟青霉属和索状霉属,且这些真菌在感病针叶中占比较高。

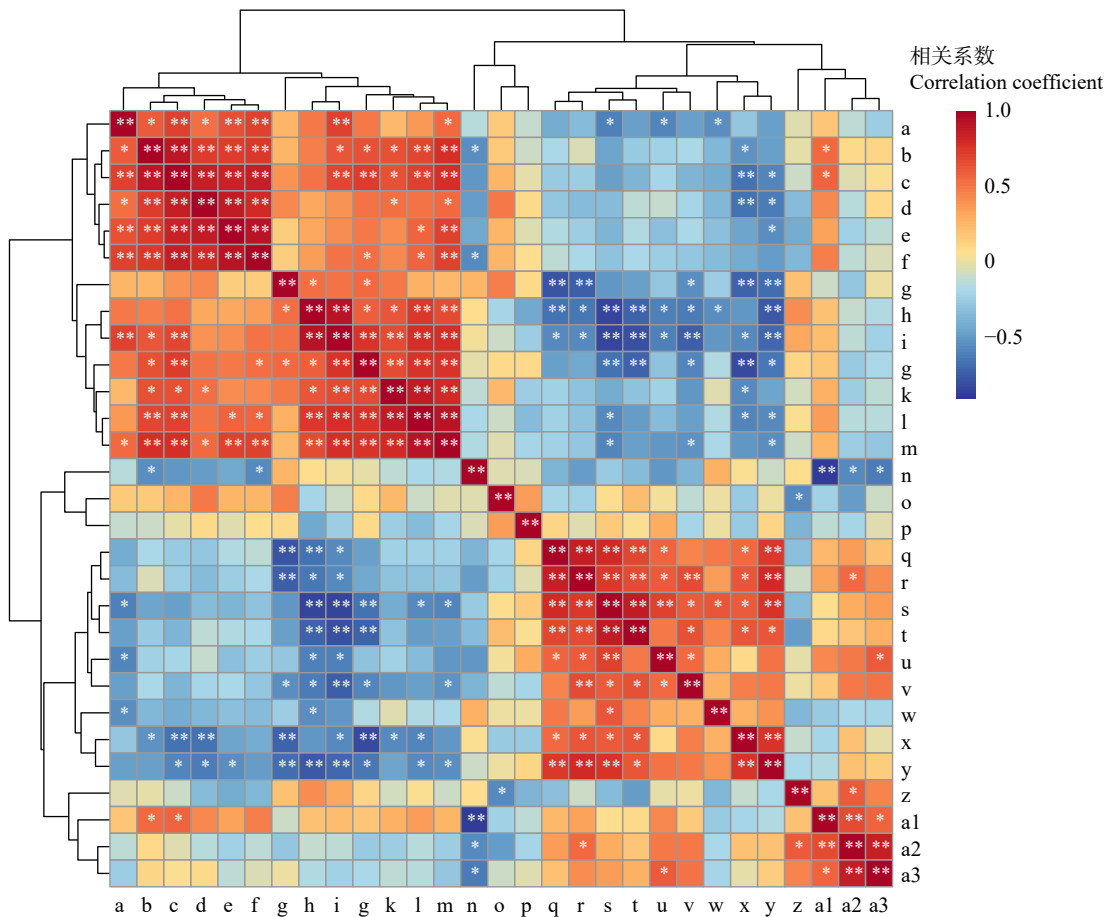
2.7 内生真菌相关性分析

通过 Spearman 相关矩阵法构建西伯利亚红松针叶丰富度最高的 29 种真菌属的相关性热图(图 9)。结果显示,随着针叶病害等级的加重,穴褥盘孢属的相对丰富度逐渐增加。内生真菌相关性分析热图显示,斯特拉菌属(*Stellatospora*)、索状霉属、四胞小球壳菌属、壳囊孢属(*Cytospora*)与穴褥盘孢属呈显著正相关。

2.8 内生真菌营养类群

基于 FUNGuild 对西伯利亚红松不同病斑等级内生菌群进行功能预测分析(图 10)。结果显示,均存在未分类菌落,相对丰度占比由高到低为 PM1(26.55%)、PM2(15.36%)、PM3(13.09%)、PM4

(9.85%)、PM5(9.05%)。共生营养型群落的相对丰度由高到低为 PM1(1.36%)、PM2(0.92%)、PM5(0.77%)、PM4(0.36%)、PM3(0.36%)。在腐生营养型群落中,PM5 占比最高为(26.86%),其次依次为 PM1(22.18%)、PM3(19.23%)、PM4(17.82%)、PM2(4.32%)。病理营养型相对丰度中,在 PM1 中占比最少(19.15%),其次依次为 PM3(46.44%)、PM4(48.10%)、PM5(50.12%)、PM2(69.47%)。病理-腐生-共生营养型群落在 PM1、PM2、PM3、PM4、PM5 中占比依次为 19.42%、7.19%、19.13%、21.83%、12.22%。病理-腐生营养型、病理-共生营养型和腐生-共生营养型功能群在 PM1 中占比较高。其余营养功能类群在不同针叶病斑等级中占比均较低。上述研究表明,健康针叶内生真菌群落营养类型相对丰度较为均衡,但随着病斑面积增加,针叶内的营养



a. 篮状菌属; b. 镰刀菌属; c. 青霉属; d. 曲霉属; e. 盾壳霉属; f. 毛孢子菌属; g. 链格孢属; h. 绿僵菌属; i. 被孢霉属; j. 马拉色菌属; k. 珊瑚菌属; l. 古根菌属; m. 毛壳属; n. 拟青霉属; o. 枝孢属; p. 附球菌属; q. 拟腊肠茎点霉属; r. 斯特拉菌属; s. 索状霉属; t. 四胞小球壳菌属; u. 壳囊孢属; v. 穴褥盘孢属; w. 枝顶孢属; x. 散斑壳属; y. 丛赤壳属; z. 盘菌属; a1. 季也蒙酵母; a2. 毕赤酵母属; a3. 耐干霉菌属。*表示相关性显著($P < 0.05$), **表示相关性极显著($P < 0.01$)。a, *Talaromyces*; b, *Fusarium*; c, *Penicillium*; d, *Aspergillus*; e, *Coniothyrium*; f, *Cutaneotrichosporon*; g, *Alternaria*; h, *Metarhizium*; i, *Mortierella*; j, *Malassezia*; k, *Clavaria*; l, *Archaeorhizomyces*; m, *Chaetomium*; n, *Purpureocillium*; o, *Cladosporium*; p, *Epicoccum*; q, *Allantophomopsis*; r, *Stellatospora*; s, *Hormonema*; t, *Sydowia*; u, *Cytospora*; v, *Dothiostroma*; w, *Acrodontium*; x, *Lophodermium*; y, *Nectria*; z, *Septorioides*; a1, *Meyerozyma*; a2, *Pichia*; a3, *Xeromyces*. * means significant correlation ($P < 0.05$), ** means extremely significant correlation ($P < 0.01$).

图9 内生真菌相关热图

Fig. 9 Correlated heat map of endophytic fungi

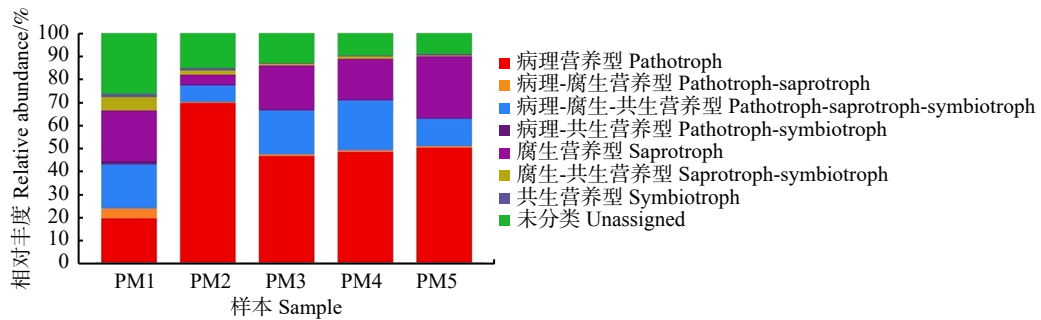


图 10 西伯利亚红松针叶中的内生菌群营养型

Fig. 10 Vegetative type endophytic flora in coniferous leaves of *P. sibirica*

型内生真菌逐渐由病理型向腐生型真菌转变。

3 讨 论

植物中的内生真菌多样性和丰度指数是反映真菌群落的发育阶段和稳定性的重要指标,指数越高,通常群落稳定性越好^[23-24]。谢宪等^[15]研究了赤松(*Pinus densiflora*)针叶的内生真菌多样性,发现无病斑针叶与染病针叶内生真菌群落结构存在显著差异,且病害侵染的针叶多样性及丰度均有所下降。王铮等^[25]发现,随着樟子松(*Pinus sylvestris* var. *mongolica*)针叶病斑面积的增加,其内生真菌多样性也发生了变化。同样,本研究中,西伯利亚红松针叶中的真菌多样性在不同病斑等级针叶中也表现出显著差异,且病斑面积越大,针叶中内生真菌的多样性越低。

此外,很多研究表明健康植物中的内生菌群更稳定,这种稳定结构能够抑制病原菌的入侵^[15]。张丽娜等^[24]发现相比发病叶片,健康的山茶(*Camellia japonica*)叶中内生菌群更稳定,因为微生物之间的排斥作用不利于病原菌的侵染和繁殖。钟雅婷等^[26]研究发现健康的桉树(*Eucalyptus* spp.)叶中的内生真菌群落种类和丰富度高于发生轮班病害(*Coniella eucalyptorum*)的叶片。可见,植物内生真菌群落的种类和丰富度直接影响植物健康程度。在本研究中通过 α 多样性分析可知,健康的西伯利亚红松针叶内的内生真菌群落较发病针叶的丰富度更高,群落稳定性更强,与之前研究结论一致,而稳定的群落结构可抑制病原菌的入侵及繁衍^[15]。由内生真菌 β 多样性分析可知西伯利亚红松在受病原菌侵害后,针叶内生真菌群落不断变化,在发病后期针叶内生真菌群落多样性趋于一致。

植物中不同内生菌可采取不同的生存方式来适应多变的环境^[27]。例如,共生营养型真菌通过降解死亡的寄主细胞汲取营养,病理营养型真菌通过伤害寄主健康细胞获取营养,而腐生型真菌可通过分解死亡的寄主细胞获得营养^[28]。本文对西伯利亚

红松内生真菌营养型的研究发现,健康针叶中共存多种营养型真菌,这一现象进一步支持了 Schulz Barbara 的植物“共生功能体”(holobiont)和谐共生的拮抗平衡假说^[29]。此外,在轻度染病针叶 PM2 中,病理营养型真菌比例最高,这可能是由于致病菌通过破坏植物组织结构侵入针叶后,其他病理营养型真菌开始进行多重侵染^[15]。因此,随着病斑面积的扩大,西伯利亚红松针叶中的内生真菌群落病理营养型真菌占比逐渐减少,而腐生营养型占比逐渐增多。这与谢宪^[30]对无病斑及感病赤松针叶内生真菌的营养功能特征研究结论一致。

在染病针叶真菌群落中,穴褥盘孢菌属和拟青霉属的相对丰度较高。随着病斑等级的加重,其他病原菌的相对比例也随之增加,包括斯特拉菌属、索状霉属、四胞小球壳菌属、壳囊孢属。已有研究表明,穴褥盘孢菌属中的穴褥盘孢菌(*D. pini*)为松针红斑病病原菌,也是全球天然松林和人工松林中最具破坏性的叶部病害之一^[31]。拟青霉属中的淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)是一种常见的生防菌^[32],能够提高真菌和细菌群落的物种多样性,使得真菌群落结构更加稳定^[33-34]。四胞小球壳菌属主要危害冷杉和松树,导致针叶坏死^[35],而壳囊孢属则主要引起林木腐烂病。因此,穴褥盘孢属真菌可能是西伯利亚红松的致病菌,随着感病等级增加,针叶内真菌多样性下降,且在发病后期,针叶内生真菌群落多样性相似度较高,这可能导致腐生病原菌的进一步侵染。然而,值得注意的是,根据内生真菌相关性分析热图,穴褥盘孢属与拟青霉属之间并没有显著的相关性,其内部的作用机制仍需进一步深入研究。

4 结 论

本研究采用高通量测序技术和生物信息学分析,对西伯利亚红松不同病斑等级针叶中的内生真菌多样性和菌群结构进行了研究。结果表明,不同病斑等级的针叶中真菌的多样性及群落结构存在显著差异($P < 0.05$),且健康针叶中的内生真菌多样性

指数最高,指示类群最多。随着病斑等级的增加,针叶内部的内生真菌群落营养型从病理型向腐生型转变。研究结果明确了不同发病程度的西伯利亚红松针叶中内生真菌的多样性及群落结构,为西伯利亚红松的微生物调控技术提供了基础数据。

参 考 文 献

- [1] 刘俊国,宋辉,刘桂丰,等.塔河蒙克山西伯利亚红松试验林高生长分析[J].森林工程,2009,25(1):1-3.
Liu J G, Song H, Liu G F, et al. Height growth analysis in the experimental forest on *Pinus sibirica* Du Tour of Mengke Mountain in Tahe[J]. Forest Engineering, 2009, 25(1): 1-3.
- [2] 韦睿,滕文华,赵光仪,等.引种西伯利亚红松种源试验[J].东北林业大学学报,2011,39(1):5-6.
Wei R, Teng W H, Zhao G Y, et al. Provenance trial of introduced *Pinus sibirica*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2011, 39(1): 5-6.
- [3] 赵光仪,杨春田,周长虹.大兴安岭引种西伯利亚红松的必要和可能[J].林业科技,1991(1):1-4.
Zhao G Y, Yang C T, Zhou Z H. The necessity and possibility of introduction *Pine sibirica* in the great Xingan Mountains[J]. Forestry Science & Technology, 1991(1): 1-4.
- [4] 杨国庆,时玉龙.引进西伯利亚红松种子和接穗的检疫[J].植物检疫,2003,17(1):36-38.
Yang G Q, Shi Y L. Quarantine of introduced *Pinus sibirica* seeds and scions[J]. Plant Quarantine, 2003, 17(1): 36-38.
- [5] Souvik K, Satpal S, Chelliah J. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype[J]. Trends in Biotechnology, 2014, 32(6): 297-303.
- [6] Tanaka M, Yoshimura M, Suto M, et al. Production of lepidimide by an endophytic fungus from polysaccharide extracted from *Abelmoschus* sp.: identification of the product and the organism producing it[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(6): 531-536.
- [7] Khan A R, Ullah I, Waqas M, et al. Host plant growth promotion and cadmium detoxification in *Solanum nigrum*, mediated by endophytic fungi[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 136: 180-188.
- [8] 宋薇薇,朱辉,余凤玉,等.植物内生菌及其对植物病害的防治作用综述[J].江苏农业科学,2018,46(6):12-16.
Song W W, Zhu H, Yu F Y, et al. Plant endophytes and their control effects on plant diseases: a review[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(6): 12-16.
- [9] 隋丽,万婷玉,路杨,等.内生真菌对植物促生、抗逆作用研究进展[J].中国生物防治学报,2021,37(6):1325-1331.
Sui L, Wan T Y, Lu Y, et al. Review of fungal endophytes on plant growth promotion and stress resistance[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(6): 1325-1331.
- [10] 王桥美,严亮,胡先奇,等.茶轮斑病对茶树叶片内生真菌群落结构的影响[J].微生物学报,2021,61(9):2949-2961.
Wang Q M, Yan L, Hu X Q, et al. Effects of tea grey blight on the community structure of endophytic fungi in tea leaves[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(9): 2949-2961.
- [11] 牛燕芬,李扬苹,罗富成,等.植物内生真菌对寄主生长及抗逆性的增效机理研究进展[J].草原与草坪,2015,35(2):91-96.
Niu Y F, Li Y P, Luo F C, et al. Promotion mechanisms on endophyte of plant to growth and stress tolerance of hosts plant[J]. Grassland and Turf, 2015, 35(2): 91-96.
- [12] 兰楠.利用天南星科凝集素构建内生工程真菌及其抗虫防病效果研究[D].武汉:华中农业大学,2010.
Lan N. Construction of engineered endophyte with araceae lectin for inhibiting aphids and pathogen fungi [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010.
- [13] 刘翠华,宋景和.西伯利亚红松 S₂(2-2)型苗不同种源生长差异研究[J].林业科技,2012,37(5):4-5.
Liu C H, Song J H. Studies on the growth differences of *Pinus sibirica* S₂(2-2) seedlings from different seed sources[J]. Forestry Science & Technology, 2012, 37(5): 4-5.
- [14] 吴海荣,吴海龙.大海林林业局西伯利亚红松育苗相关问题的探讨[J].林业勘查设计,2015(3):47-48.
Wu H R, Wu H L. Discussion on related to *Pinus sibirica* seedlings in Dahailin Forestry Bureau[J]. Forest Investigation Design, 2015(3): 47-48.
- [15] 谢亮,梁军,朱彦鹏,等.赤松纯林不同枯梢病级针叶的内生真菌多样性及群落结构[J].林业科学,2020,56(9):51-57.
Xie X, Liang J, Zhu Y P, et al. Diversity and community structure of endophytic fungi in the pure forest of *Pinus densiflora* infected by different incidences of *Sphaeropsis sapinea*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2020, 56(9): 51-57.
- [16] Ferreira M C, Vieira M D L A, Zani C L, et al. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*)[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2015, 59: 36-44.
- [17] 刘学周,赵智灵,李绍宾,等.西洋参内生菌群落结构与多样性[J].微生物学报,2015,55(3):330-340.
Liu X Z, Zhao Z L, Li S B, et al. The community structure and diversity of the endophytes in American ginseng[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(3): 330-340.
- [18] Adams R I, Mileto M, Taylor J W, et al. Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances[J]. The ISME Journal, 2013, 7(7): 1262-1273.
- [19] Zhang P, Guan P, Hao C, et al. Changes in assembly processes of soil microbial communities in forest-to-cropland conversion in Changbai Mountains, northeastern China[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 818: 151738.
- [20] Knight R, Caporaso J G, Kuczynski J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [21] Zhang X, Fu G, Xing S, et al. Structure and diversity of fungal communities in long-term copper-contaminated agricultural soil[J]. Science of the Total Environment, 2022, 806(Pt 3): 151302.

- [22] Khan S, Chen N, Zhang C, et al. Soil fungal taxonomic diversity along an elevation gradient on the semi-arid Xinglong Mountain, Northwest China[J]. Archives Microbiology, 2020, 202(8): 2291–2302.
- [23] 姚迪, 唐蕴哲, 张婧一, 等. 不同树龄杜仲内生真菌群落结构解析及优势菌群动态变化 [J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(8): 885–893, 899.
Yao D, Tang Y Z, Zhang J Y, et al. Endophytic fungal community structure and dynamic changes of dominant flora in different ages of *Eucommia ulmoides*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2023, 35(8): 885–893, 899.
- [24] 张丽娜, 朱天辉, 杨佐忠, 等. 灰斑病对山茶叶部真菌群落的影响 [J]. 四川农业大学学报, 2011, 29(3): 378–385.
Zhang L N, Zhu T h, Yang Z Z, et al. Influence of Camellia gray spot disease on foliar fungal communities[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2011, 29(3): 378–385.
- [25] 王铮, 邵鹏, 钟斯文, 等. 樟子松不同病斑等级针叶内生真菌多样性及群落结构 [J]. 吉林农业大学学报, 2022, 2: 1–9.
Wang Z, Shao P, Zhong S W, et al. Diversity and community structure of endophytic fungi in different disease spot grades of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* needles[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2022.
- [26] 钟雅婷, 邹东霞, 廖旺姣, 等. 轮斑病导致的桉树叶片内生真菌群落结构差异分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2022, 42(4): 68–75.
Zhong Y T, Zou D X, Liao W J, et al. Differential analysis of community structure of endophytic fungi in the eucalyptus leaves infected by *Coniella Eucalyptorum*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2022, 42(4): 68–75.
- [27] Arnold A E, Lutzoni F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?[J]. Ecology, 2007, 88(3): 541–549.
- [28] Tedersoo L, Bahram M, Pöhlme S, et al. Global diversity and geography of soil fungi[J]. Science, 2014, 346: 1078.
- [29] Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont[J]. New Phytology, 2015, 206(4): 1196–1206.
- [30] 谢宪. 赤松针叶内生微生物群落结构对松枯梢病的影响 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2021.
Xie X. Effects of Endophytic Microbial Community Structure in Needles of *Pinus densiflora* on Pine Shoot Blight [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2021.
- [31] 赵胜花, 秦强, 刘丽洁, 等. 松针红斑病研究进展分析 [J]. 内蒙古林业, 2022(2): 34–35.
Zhao S H, Qin Q, Liu L J, et al. Analysis of progress in the study of *Dothistroma pini*[J]. Inner Mongolia Forestry, 2022(2): 34–35.
- [32] 郝泽婷. 淡紫拟青霉非还原型聚酮化合物合成基因簇的鉴定及表达分析 [D]. 太原: 山西师范大学, 2018.
Hao Z T. The Identification and expression analysis of the non-reductive polyketone compound synthetic gene cluster of *Purpureocillium lilacinum*[D]. Taiyuan: Shanxi Normal University, 2018.
- [33] 肖顺, 张绍升, 刘国坤. 淡紫拟青霉对根结线虫的防治作用 [J]. 福建农业大学学报, 2006, 35(5): 463–465.
Xiao S, Zhang S S, Liu G K. Control effect of *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne* spp.[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2006, 35(5): 463–465.
- [34] 乔月静. 轮作方式与杀线剂对甘薯产量及根际线虫、真菌、细菌群落的影响 [D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
Qiao Y J. Effect of cropping patterns and nematicides on yield and communities of nematodes, bacterial, fungi in the rhizosphere of sweet potato[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [35] Venche T, Gary C, Iben M T, et al. *Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.)[J]. Fungal Biology, 2010, 114(7): 317–326.

(责任编辑 范娟
责任编辑 张星耀)