



研究报告

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

张志东* 朱静 唐琦勇 顾美英 楚敏

新疆农业科学院微生物应用研究所新疆特殊环境微生物实验室 新疆 乌鲁木齐 830091

摘要:【背景】高通量测序分析作为深入了解环境微生物群落组成的重要方法,已成为植物内生真菌多样性研究的有效手段,然而由于引物的扩增差异,采用不同引物可对实验结果分析造成影响。同时,盐角草作为世界上最耐盐的植物之一,存在着多种功能性的内生真菌,而较为全面介绍其内生真菌组成和多样性的报道鲜见。【目的】为了揭示盐角草内生真菌的多样性,解析不同扩增引物对内生真菌多样性分析的影响。【方法】分别采用真菌高通量测序常用引物对 ITS1-5F、ITS1-1F、ITS2 对采自乌鲁木齐达坂城盐湖的盐角草内生真菌进行扩增,开展其内生真菌 OTU 的分析。【结果】通过不同引物对扩增并测序共获得 102 个盐角草内生真菌 OTU,涉及真菌界 8 个门和未分类菌群,其中子囊菌门 (*Ascomycota*) 占绝对优势,其次为担子菌门 (*Basidiomycota*); 在属层次上,盐角草内生真菌共涉及 64 个属及 20 个未分类属,其中 *Alternaria*、*Cladosporium*、*Podospora* 等 3 个属为盐角草内生真菌优势菌群。对不同引物对扩增测序结果分析表明,不同引物对扩增对分析内生真菌 OTU 数量和种类具有明显的影响,在全部所得的 102 个 OTU 中,ITS1-5F 引物对获得 44 个 OTU、ITS1-1F 引物对获得 55 个 OTU、ITS2 引物对获得 25 个 OTU,但以上 3 对引物扩增均检测到的 OTU 数仅为 5 个。物种组成和多样性分析表明,内生真菌多样性分析中采用以 ITS1-1F 为主,ITS1-5F 为辅的分析策略,可较为全面地展现内生真菌的多样性。【结论】盐角草存在较为丰富的内生真菌资源,不同扩增引物对高通量分析盐角草内生真菌组成和分布具有明显的影响。

关键词: 盐角草, 内生真菌, 高通量测序, 多样性, PCR 引物

Effects of different amplification primers on diversity analysis of endophytic fungi in *Salicornia europaea* by the high-throughput sequencing

ZHANG Zhi-Dong* ZHU Jing TANG Qi-Yong GU Mei-Ying CHU Min

Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Xinjiang Key Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi, Xinjiang 830091, China

Abstract: [Background] High-throughput sequencing methods are widely used in analyses of environmental microbial communities and diversities, and make it easy to investigate endophytic fungi in

Foundation item: Natural Science Foundation of Xinjiang Autonomous Region (2016D01A050)

*Corresponding author: Tel: 86-991-4520524; E-mail: zhangzheedong@sohu.com

Received: 23-05-2019; Accepted: 20-09-2019; Published online: 22-10-2019

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2016D01A050)

*通信作者: Tel: 0991-4520524; E-mail: zhangzheedong@sohu.com

收稿日期: 2019-05-23; 接受日期: 2019-09-20; 网络首发日期: 2019-10-22

plants. However, choices of primers often lead to difference in results because fungal species detected depend on fungal coverage rate of primers. Plants in the genus *Salicornia* are one kind of the most salt-tolerant plants. Some endophytic fungi isolated from the plants produced important functional metabolites. But few investigations on the diversity of endophytic fungi were reported. **[Objective]** To investigate the endophytic fungi community in *Salicornia europaea* and reveal effects of different PCR primers on high-throughput sequencing analysis. **[Methods]** Plants of *Salicornia europaea* were sampled from Guhya Salt Lake of Urumqi county in Xinjiang, and ITS DNA of endophytic fungi was amplified with primer pairs of ITS1-5F, ITS1-1F and ITS2. Then OTUs based on high-throughput sequencing were analyzed. **[Results]** In total 102 OTUs were obtained involving 8 phyla and unclassified flora in fungal domain. Among them, *Ascomycota* was dominant phylum followed by *Basidiomycetes*. A total of 64 genera and 20 unclassified genera were discovered, in which *Alternaria*, *Cladosporium* and *Podospora* were major groups. Effects of different PCR primers on high-throughput sequencing were measured. In total of the 102 OTUs, 44 OTUs were obtained from the ITS1-5F primer pair, 55 OTUs from the ITS1-1F primer pair and 25 OTUs from the ITS2 primer pair, whereas only 5 OTUs were detected at the same time by all three primers pairs. Additionally, ITS1-1F primer pair was recommended with ITS1-5F primer pair as the supplementary strategy in investigation of the diversity of endophytic fungi. **[Conclusion]** There are abundant resources of endophytic fungi in *Salicornia europaea* and obvious effect on analyzing the composition and distribution of endophytic fungi in high-throughput sequencing.

Keywords: *Salicornia europaea*, Endophytic fungi, High-throughput sequencing, Diversity, PCR primer

植物内生菌(plant endophyte)是指与植物体共存,但不引起植物产生明显病症的一类微生物。自20世纪初首次报道植物内生真菌以来,几乎在所有研究的植物组织内都发现了内生真菌,且具有丰富的种群多样性,存在植物类群、属种间分布的偏好性^[1-3]。近年来,利用PCR技术扩增真菌ITS序列的某一区间,采用高通量测序技术可更方便和全面地认知目标植物内生菌群落组成和多样性。然而研究表明多种因素会影响高通量测序分析样本真菌的群落丰度和多样性,如起始DNA浓度、真菌核糖体拷贝数及扩增引物,其中部分扩增引物存在明显真菌种群偏好性^[4]。Taylor等^[5]设计了一对ITS引物,可以最大限度地覆盖真菌界,同时最少地扩增非目标真核生物;de Filippis等^[6]使用不同扩增引物对一个模拟群落和几个样本进行了分析,证明使用不同PCR引物扩增会影响真菌微生物群落分析的结果,并认为扩增ITS序列分析会导致实验结果中真菌多样性高估;然而Řezáčová等^[7]分别对菌根真菌的SSU、LSU和ITS目的序列扩增,却发现采用ITS引物仅能获得样本的25%的OTU,显著低于其它引物所得结果。目前,国内学者在高通量测序中也会选用不同的引物扩增^[8]。

盐角草(*Salicornia europaea*)又名欧洲海蓬子,藜科一年生草本植物,是地球上最耐盐的陆生高等植物之一,可以在含盐浓度高达6.5%的潮湿盐碱地中正常生长,广泛分布在海滩、盐碱滩涂沙地^[9]。盐角草属多种植物可被食用或药用^[10-11],同时也是植物耐盐机制、耐盐基因及转基因植物操作等研究的热点^[12-13],常作为盐碱地改良和重金属修复植物^[14]。Petrini等^[15]最早从*Salicornia perenni*的茎中分离出32株内生真菌,分析发现在植株的新生茎和老茎组织中内生真菌定殖有显著差异。国内相继从该属的海芦笋(*Salicornia bigelovii*)中分离出*Phoma*、*Fusarium*、*Cunninghamella*等属内生真菌^[16-18],表明盐角草属植物内生真菌存在着一定的分布差异,并可产生多种功能代谢产物。

本研究利用Illumina MiSeq高通量测序技术,对新疆达坂城盐湖的盐角草(*S. europaea*)内生真菌群落组成进行了分析,同时对不同引物扩增下盐角草(*S. europaea*)内生真菌高通量测序分析的影响进行了解析,为进一步挖掘盐角草(*S. europaea*)蕴藏的内生真菌提供了研究基础,也为相关植物内生真菌的高通量测序研究提供了科学借鉴。

1 材料与方 法

1.1 材 料

采样区域位于天山山脉中段天格尔山北麓, 乌鲁木齐市东南, 达坂城盐湖东岸沿岸盐渍区域 (N 43.402 080°, E 88.121 986°)。采样地点海拔 1 066 m, 土质上层 5 cm 为泥土, 下层为砂石, 盐渍区域内除盐角草(*S. europaea*)分布外, 还有沙葱、芦苇等耐盐植物分布。

主要试剂和仪器: E.Z.N.A.[®] Fungal DNA Kit 提取试剂盒, Omega Biotek 有限公司; 乙醇、次氯酸钠, 北京化学试剂公司。高速离心机、PCR 仪, Eppendorf 公司。

1.2 样品采集及方法

盐角草(*S. europaea*)样品采集于 2018 年 7 月 4 日, 采取蛇形取样, 每个地点采集 3 个重复, 每个点间距离大约 20–50 m。选择生长状况相近的健康个体, 采用垂直挖掘法, 尽可能地保证植株的完整性。所采集样品装入灭菌的牛皮纸袋内, 并放入车载冰箱 (4 °C) 后迅速带回实验室开展相关样品的处理。

1.3 样品表面消毒和处理

将完整植株分别使用自来水冲洗 10 min, 晾干。采用全株表面消毒方式, 将植株依次使用 70%乙醇浸泡 1 min, 3.3%次氯酸钠浸泡 5 min, 75%乙醇浸泡 0.5 min, 再经无菌水反复冲洗后, 用无菌滤纸吸干, 并收集冲洗后的无菌水进行消毒效果验证^[19]。

1.4 基因组 DNA 提取、ITS-PCR 扩增和测序

将消毒后的植株液氮冷冻 10 min, 然后进行组织研磨。采用 E.Z.N.A.[®] Fungal DNA Kit 提取内生真菌总 DNA。样品 DNA 通过分别提取再合并混匀后进行 PCR 扩增。采用 ITS1-5F 引物对(ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', ITS2: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')扩增 ITS1 区序列^[20], PCR 反应条件^[21]: 94 °C 30 s; 55 °C 30 s; 72 °C 30 s, 35 个循环; 采用 ITS1-1F 引物对(ITS1F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3', ITS2: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')扩增 ITS1 区序列^[20,22], PCR 反应条件^[23]: 94 °C 30 s; 52 °C 45 s;

72 °C 1 min, 35 个循环; 采用 ITS2 引物对(ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增 ITS2 区序列^[20], PCR 反应条件^[22]: 94 °C 45 s; 60 °C 45 s; 72 °C 1 min, 35 个循环。上述 PCR 产物经过切胶纯化后由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成测序。

1.5 生物信息学分析

从 Illumina HiSeq 测序平台得到的下机数据, 进行拼接、质控和嵌合体过滤, 得到可用于后续分析的有效数据, 即 Effective Tags。用 UCLUST V1.1.579 对所有样品的 Effective Tags 进行聚类^[24], 以 97%的一致性(identity)将序列聚类成为操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)构建稀释曲线。序列比对分别采用 UNITE 数据库(<https://unite.ut.ee/analysis.php>)和 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 并进行序列注释。不同 ITS 扩增区域所得 OTU 如注释相同, 分别将相关序列与同一参比菌株序列进行手工比对, 如两者与参比序列相似性均大于 97%, 视为 1 个 OTU, 反之则视为 2 个不同的 OTU。其它相关数据结果处理使用 Microsoft Excel 2013 和 DPS 9.05 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 测序结果及序列深度验证

通过使用不同引物对样品中内生真菌 ITS 序列进行扩增和测序, 3 个引物对扩增总计测得原始序列条数为 240 434 条, 过滤掉低质量的序列, 去冗余处理后, 质控序列数为 217 308 条, 在 97%相似度下将其聚类用于物种分类的 OTU, 总计获得 122 个, 再去除宿主及外源动植物的 OTU, 总计获得盐角草(*S. europaea*)内生真菌 OTU 102 个, 总有效序列数为 72 537 条, 其中采用 ITS1-1F 引物对扩增的有效序列数最高, 占 87.0%, 而采用 ITS2 引物对扩增的有效序列数最低, 仅为 1.6%, 因此, 采用 ITS1-1F 引物对可以较好地避免宿主和外源动植物的影响。各引物对扩增后测序信息结果见表 1。

稀释曲线反映了测序的深度, 也可以用来评价测序量是否足以覆盖样品所有种群。从图 1 可知,

表 1 不同引物对扩增下样品内生真菌测序数据统计

Table 1 Sequencing data of high-throughput sequencing with different PCR primers

样品编号 Samples	原始序列数 Raw number	质控序列数 Clean number	总 OTU Total OTUs	有效序列数 Effective number	有效 OTU Effective OTUs
ITS1-5F	80 228	75 616	70	1 579	44
ITS1-1F	80 101	71 038	88	69 711	55
ITS2	80 105	70 654	35	1 247	25
Total	240 434	217 308	122	72 537	102

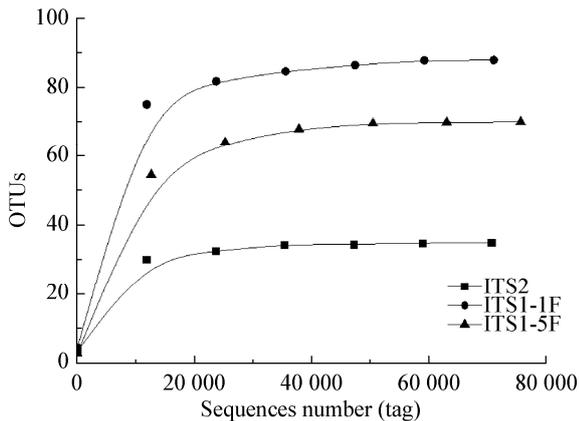


图 1 不同引物对扩增下样品内生真菌的稀释曲线

Figure 1 Rarefaction curves for the sequencing with different PCR primers

注: OTU 数为所有测样所得 OTU 数, 包括植物、昆虫等。
Note: Total OTUs were showed including host plant and bugs.

当测序数量达到 25 000 条时, 3 种处理的稀释曲线均基本趋于平缓。继续加大测序量, 当测序数量达到 70 000 条时, 采用 ITS1-1F 引物对扩增的样品, OTU 仅增加 6 个, 约占该样品中总 OTU 数的 6.8%, 而从 47 000–70 000 条间, OTU 仅增加 1 个; 其它处理 OTU 在相应区间变化更小, 说明实验所得 OTU 数已接近最大可测数量, 即使再加大测序量, 也难以更多地反映真实环境中内生真菌菌落结构。

2.2 不同引物扩增下样品内生真菌 OTU 的分布

根据各引物对所得序列 OTU 注释结果分析, 去除非真菌 OTU 后, 合并分类相同的 OTU, 构建韦恩图(图 2)。不同引物所得序列共获得真菌 OTU 数为 102 个, 其中以 ITS1-1F 引物对扩增获得 55 个 OTU, 以 ITS1-5F 引物对扩增获得 44 个 OTU, 以 ITS2 引物对扩增获得 25 个 OTU。3 种引物扩增均检测到的 OTU 为 5 个, 占总共获得 OTU 的 4.9%。ITS1-1F 和 ITS1-5F 两种引物对扩增重叠检测出的 OTU 为 13 个, 占总数的 12.7%, 这一结果表明采

用不同引物进行扩增所得的盐角草(*S. europaea*)内生真菌信息存在明显的差异; 而两者合计所得 OTU 为 86 个, 占全部 OTU 数的 84.3%, 表明采用 ITS1-1F 和 ITS1-5F 两种引物对可基本反应盐角草(*S. europaea*)内生真菌的主要群落组成(表 2)。

2.3 不同引物扩增下样品内生真菌分析

2.3.1 不同引物扩增下样品内生真菌 α 多样性分析

采用 α 多样性指标中物种数、Simpson (J)、Shannon (H)、Brillouin 指数对样品群落的异质性以及估计群落中物种总数, 一般而言 Simpson (J) 指数对富集种更加敏感, Shannon (H) 对稀疏种更为敏感。由表 3 可以看出, ITS1-1F 引物对扩增下 OTU 数明显高于 ITS2、ITS1-5F, 而 Simpson (J)、Shannon (H)、Brillouin 指数均低于后两者, 表明

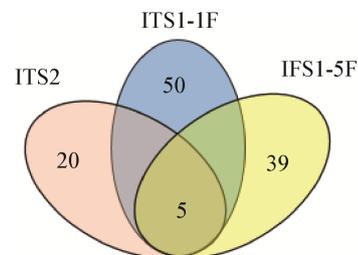


图 2 不同引物对扩增下样品内生真菌 OTU 相关性

Figure 2 The similarity analysis of fungal communities

表 2 不同引物对扩增下样品内生真菌 OTU 数据统计

Table 2 OTUs in the sequencing with different PCR primers

Primers	ITS1-1F	ITS1-5F	ITS2	Rate (%)
ITS1-1F	55	12.7%	8.8%	53.9
ITS1-5F	13	44	6.8%	43.1
ITS2	9	7	25	24.5

注: 表格对角线下半部分数据为两两处理共有 OTU 数, 上半部分百分数据是两两共有 OTU 数占全部的百分比。

Note: The numbers below the diagonal line of the table were OTUs detected in two treatments; The data above the diagonal line were percentage of OTUs detected in two treatments to total OTUs.

表 3 不同引物扩增下内生真菌 α 多样性
Table 3 Alpha diversity analysis with different PCR primers

引物 Primers	OTUs	Simpson (J)	Shannon (H)	Brillouin
ITS2	25	0.855 9	3.305 9	3.255 0
ITS1-1F	55	0.669 4	2.486 6	2.483 4
ITS1-5F	44	0.892 4	4.004 0	3.918 3

采用 ITS1-1F 引物对能更多地获得内生真菌群落组成信息, 但检出的物种间相对丰度差异较大, 物种间均匀度降低。其中, Simpson (J)降低表明采用 ITS1-1F 引物对能明显增加优势菌群的检出率, 而 Shannon (H)降低表明该引物能更多覆盖低丰度的真菌种群。

2.3.2 不同引物扩增下样品内生真菌门水平分析

通过对样品中 102 个 OTU 注释, 依次进行门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)等分类信息分析, 进一步挖掘各引物对扩增对内生真菌群落组成分析的影响。研究发现, 3 种引物对所获得的 102 个 OTU 共涉及真菌界的隐真菌门(*Rozellomycota*)、毛霉菌门(*Mucoromycota*)、被孢霉门(*Mortierellomycota*)、单毛壶菌门(*Monoblepharomycota*)、梳霉门(*Kickxellomycota*)、球囊霉门(*Glomeromycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、子囊菌门(*Ascomycota*)等 8 个菌门以及未分类菌群(图 3)。其中, 子囊菌门(*Ascomycota*)占绝对优势, 共计 69 个 OTU, 占总数的 67.6%; 其次为担子菌门(*Basidiomycota*), 共计 20 个 OTU,

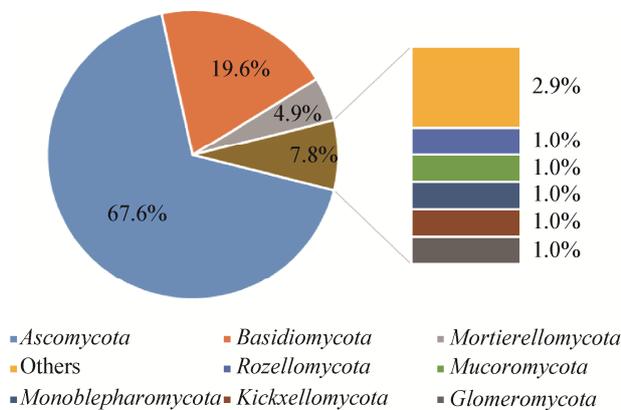


图 3 盐角草内生真菌 OTU 在门水平分布情况
Figure 3 Frequency of phyla in fungi communities from sample

占总数的 19.6%; 再次被孢霉门(*Mortierellomycota*), 总计有 5 个 OTU, 其它有 5 个门和未知菌群有 8 个 OTU, 合计占总数的 7.8%。

进一步对不同引物对扩增下测序结果中 OTU 在真菌门水平的分布情况进行分析(图 4), 发现采用 ITS2 引物对扩增下仅获得子囊菌门(*Ascomycota*)的 20 个 OTU 和担子菌门(*Basidiomycota*)的 5 个 OTU。而采用 ITS1-5F 引物对扩增能获得除毛霉菌门(*Mucoromycota*)外的其它菌门, 包括子囊菌门(*Ascomycota*)的 24 个 OTU、担子菌门(*Basidiomycota*)的 12 个 OTU、隐真菌门(*Rozellomycota*)的 1 个 OTU、被孢霉门(*Mortierellomycota*)的 1 个 OTU、单毛壶菌门(*Monoblepharomycota*)的 1 个 OTU、梳霉门(*Kickxellomycota*)的 1 个 OTU、球囊霉门(*Glomeromycota*)的 1 个 OTU 和未分类菌群的 3 个 OTUs; 采用 ITS1-1F 引物对扩增获得子囊菌门(*Ascomycota*)的 41 个 OTU、担子菌门(*Basidiomycota*)的 6 个 OTU、毛霉菌门(*Mucoromycota*)的 1 个 OTU、被孢霉门(*Mortierellomycota*)的 5 个 OTU 和未分类菌群的 2 个 OTU。由于 ITS1-5F 和 ITS2 引物对扩增所得序列中均存在大量植物宿主和外源动植物序列干扰, 而 ITS1-1F 较少扩增到宿主基因, 建议在多样性分析中应以 ITS1-1F 为主, 其它作为佐证。

另外, 通过对分布在各真菌门 OTU 在各引物对扩增获得总 OTU 的比例分析, 各种引物对扩增

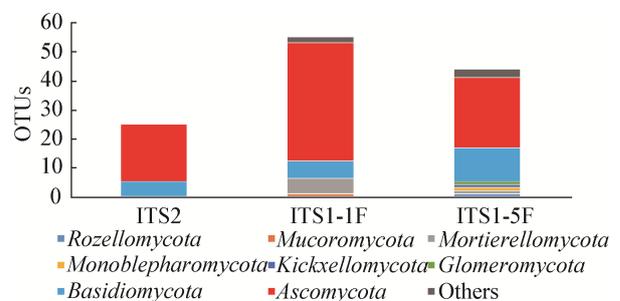


图 4 不同引物扩增下门水平菌群 OTU 分布
Figure 4 Frequency of OTUs in phyla with different PCR primers

而担子菌门 OTU, 在采用不同引物对所得 OTU 比例变化比较明显, 采用 ITS1-5F 引物对扩增所得的子囊菌门 OTU 均为绝对优势, 其所占的比例按照 ITS2、ITS1-1F 和 ITS1-5F 逐步下降。ITS1-1F 扩增, 前者比例提高了 1 倍。被孢霉门 (*Mortierellomycota*) 仅在采用 ITS1-1F 和 ITS1-5F 引物对扩增获得, 但二者相差近 5 倍。

进一步对各门所有 OTU 的序列数进行分析 (图 5) 可以看出, 采用 ITS1-1F 引物对扩增测序中, 子囊菌门 (*Ascomycota*) 占绝对优势, 占总有效序列数的 97.7%, 而其余所占比例不足 3%。采用引物对 ITS2 和 ITS1-5F 扩增, 内生真菌中主要菌群序列数所占比例类似; ITS2 引物对扩增仅获得 2 个门的 OTU, 两者所占比例分别为子囊菌门占 67.2% 和担子菌门 32.7%; 采用 ITS1-5F 引物对, 子囊菌门占 64.9% 和担子菌门 24.3%, 其它占 10.8%。

2.3.3 不同引物扩增下样品内生真菌属水平分析

通过进一步分析, 实验获得的 102 个 OTU 分布在真菌界的 64 个属及 20 个未分类属中, 表明盐角草 (*S. europaea*) 存在着丰富多样的内生真菌资源, 且存在着大量潜在新种属。采用不同引物扩增分析主要种属存在着明显的差异 (表 4), *Alternaria* 属在

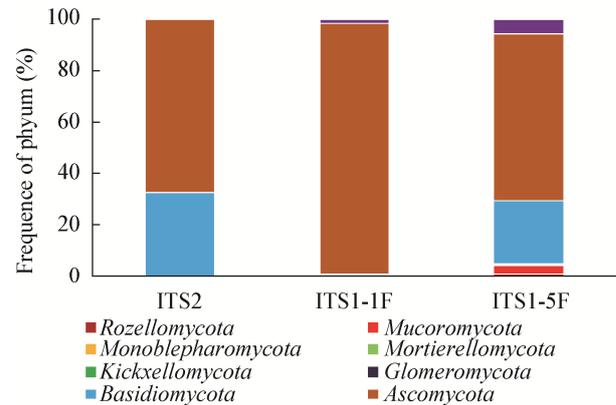


图 5 不同引物扩增下门水平菌群序列百分比

Figure 5 Phylum-level distribution of fungi with different PCR primers

采用不同引物扩增情况分析下均为优势属 (>20%)。采用 ITS1-1F、ITS1-5F 引物对扩增分析表明, 在所占比排名前 5 的属序列数占各自总数的 79.2% 和 64.3%, *Alternaria*、*Cladosporium*、*Podospora* 均排名前 5, 是盐角草内生真菌的主要菌属。在种属分布中, 除 *Coniophora*、*Mortierella*、*Podospora*、*Fusarium*、*Pichia*、*Penicillium*、*Stemphylium*、*Alternaria*、*Cladosporium* 等属有 2 个 OTU 外 (表 5), 其它属均只有 1 个 OTU, 表明盐角草内生真菌在种类分布上较均匀。

表 4 不同引物对扩增下优势属及所占比例

Table 4 Major genera in fungal communities with different PCR primers

ITS2	Ratio (%)	ITS1-1F	Ratio (%)	ITS1-5F	Ratio (%)
<i>Wallemia</i>	23.3	<i>Alternaria</i>	55.30	<i>Alternaria</i>	23.2
<i>Cutaneotrichosporon</i>	23.3	Others	19.46	<i>Inocybe</i>	15.6
<i>Alternaria</i>	22.1	<i>Podospora</i>	19.10	<i>Podospora</i>	13.1
<i>Candida</i>	10.3	<i>Aureobasidium</i>	3.90	Others	12.1
<i>Cladosporium</i>	5.90	<i>Cladosporium</i>	0.60	<i>Cladosporium</i>	8.3
<i>Issatchenkia</i>	3.50	<i>Stemphylium</i>	0.30	<i>Arthrocladium</i>	4.1
<i>Podospora</i>	2.50	<i>Saitozyma</i>	0.30	<i>Mortierella</i>	3.5
<i>Aureobasidium</i>	2.50	<i>Mortierella</i>	0.23	<i>Coniophora</i>	2.7
<i>Papiliotrema</i>	1.20	<i>Ascobolus</i>	0.20	<i>Neocosmospora</i>	2.6
<i>Pleospora</i>	0.86	<i>Penicillium</i>	0.20	<i>Hohenbuehelia</i>	2.5

表 5 种水平下主要菌群和所占比例

Table 5 Major species in fungal communities in *Salicornia europaea*

属名 Genus	OTUs	注释菌种名称 Closet species	序列数量 Sequences numbers
<i>Podospora</i>	6	<i>Podospora cochleariformis</i>	31
		<i>Podospora</i> sp.1	5 730
		<i>Podospora</i> sp.2	3 420
		<i>Podospora</i> sp.3	1 589
		<i>Podospora</i> sp.4	405
		<i>Podospora</i> sp.5	2 166
<i>Alternaria</i>	4	<i>Alternaria alternata</i>	38 180
		<i>Alternaria</i> sp.1	958
		<i>Alternaria</i> sp.2	69
		<i>Alternaria</i> sp.3	48
<i>Mortierella</i>	3	<i>Mortierella humilis</i>	42
		<i>Mortierella</i> sp.1	96
		<i>Mortierella</i> sp.2	59
<i>Fusarium</i>	2	<i>Fusarium oxysporum</i>	29
		<i>Fusarium proliferatum</i>	10
<i>Cladosporium</i>	2	<i>Cladosporium colombiae</i>	208
		<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	375
<i>Penicillium</i>	2	<i>Penicillium simplicissimum</i>	105
		<i>Penicillium rubens</i>	30
<i>Stemphylium</i>	2	<i>Stemphylium solani</i>	156
		<i>Stemphylium</i> sp.1	79
<i>Coniophora</i>	2	<i>Coniophora olivacea</i>	20
		<i>Coniophora</i> sp.1	22

3 讨论与结论

3.1 不同扩增引物对内生真菌分析的影响

引物的选择对高通量分析真菌多样性研究具有较大的影响, 尽管真菌的 SSU、LSU 和 ITS 目的片段序列均可以用来进行真菌群落组成分析, 但国内有关内生真菌研究多数采用 ITS 序列进行群落分析。由于在提取内生真菌 DNA 过程中难免会混杂植株自身 DNA, 也必然要求我们在 PCR 扩增时对引物进行相应的选择。目前, 有关真菌 ITS 序列扩增所用的引物较多, 如国内利用 ITS5-1737F/ITS1-2043R、BITS/B58S3、ITS1-F/ITS2 等先后对沙冬青、白芨、手参等进行了内生真菌的

高通量分析^[25-27], 尽管不同作者一般均会选择具有真菌扩增的特异引物, 但是难以保证不同引物对高通量测序结果产生影响。本研究分别采用高通量测序公司常用真菌引物对 ITS2、ITS1-1F、ITS1-5F 等 3 对引物, 通过 PCR 扩增和高通量测序, 结果发现不同引物扩增对盐角草(*S. europaea*)内生真菌群落组成分析有着明显的影响。在实验全部所得的 102 个真菌 OTU 中, 利用 ITS1-1F 引物对获得 55 个 OTU, ITS1-5F 引物对获得 44 个 OTU, ITS2 引物对仅获得 25 个 OTU, 但 3 种引物共同获得到的 OTU 数仅为 5 个, 表明不同引物扩增所得的物种组成信息均存在不全面的现象; 使用引物 ITS2 和 ITS1-5F 引物对扩增所得序列中均存在大量植物宿主序列和外源动植物序列。客观地说, 在提取总 DNA 中难免会提取出植物宿主 DNA, 并在含量中占总 DNA 的主要部分, 因此在采用上述两对对真菌无特异性引物时, 扩增所得序列中绝大多数序列为植物宿主序列也是必然的, 但也造成了内生真菌序列扩增和检测到的序列数量有限, 但两者较传统培养法分析仍具有数量可观、物种多样的优点。而 ITS1-1F 引物对具有真菌扩增特异性, 能有效避免宿主序列的干扰, 但也存在样品中内生真菌种类检测有遗漏的现象。通过分析我们发现同时采用 ITS1-1F 和 ITS1-5F 两种引物对扩增, 两者合计所得 OTU 数可占全部 OTU 数的 84.3%, 可基本反映盐角草内生真菌的主要群落组成。因此, 基于上述结果, 推荐在内生真菌多样性分析中以 ITS1-1F 引物对为主, ITS1-5F 引物对为辅的分析策略, 进行植物内生菌的群落组成分析。

多样性分析表明, 采用 ITS1-1F 引物对扩增下内生真菌 OTU 数明显高于 ITS2、ITS1-5F, 而 Simpson (*J*)、Shannon (*H*)、Brillouin 指数均低于后两者, 表明采用 ITS1-1F 引物对能更多地获得内生真菌群落组成信息, 但检出的物种间相对丰度差异变大, 物种间均匀度降低。其中, Simpson (*J*)降低表明采用 ITS1-1F 引物能明显增加优势菌群的检出, 而 Shannon (*H*)降低表明该引物能更多覆盖低丰

度的真菌种群。但就本实验而言, 盐角草(*S. europaea*)内生真菌不同物种间丰度是未知的, 采用 ITS1-1F 引物是否会导致高估了其内生真菌丰度间的差异, 还有待通过更多的不同目的区间片段扩增, 同时采用模拟系统进行评估。

3.2 盐角草内生真菌组成和多样性

盐角草属植物作为地球上最耐盐的植物之一, 目前国内外有关其内生真菌的研究仅有零星报道。Pettrini 等^[15]在 1986 年首次对盐角草属植物 *S. perenni* 内生真菌进行研究, 从其茎中分离到 32 株内生真菌, 发现各类真菌在新旧植物组织中分布存在显著差异, *Pleospora salicorniae* 在茎中都有定殖, 而 *Pleospora bjorlingii* 主要存在于老的植物组织中, *Stagonospora* 主要存在于新的植物组织中。国内学者^[16-18]从海芦笋(*S. bigelovii*)中分离出 *Cunninghamella*、*Phoma*、*Fusarium* 等属的内生真菌, 并表现出多种功能活性, 发现并发表了真菌新物种 *Cunninghamella bigelovii*。本研究通过高通量测序技术对盐角草(*S. europaea*)内生真菌进行了研究, 实验共获得 102 个内生真菌 OTU, 涉及真菌界的 8 个菌门以及未分类菌群, 其中子囊菌门(*Ascomycota*)占绝对优势, 其次为担子菌门(*Basidiomycota*)。在属层次水平上, 盐角草内生真菌共涉及 64 个属及 20 个未分类属, 而 *Alternaria*、*Cladosporium*、*Podospora* 等 3 个属为优势菌属, 也发现了已报道的盐角草属植物内生菌 *Pleospora*、*Stagonospora*、*Cunninghamella*、*Phoma*、*Fusarium* 等属 OTU 的存在, 并预示着可能存在多个潜在真菌新种属, 为进一步挖掘盐角草(*S. europaea*)丰富的内生真菌资源提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] Hao XJ. Plant Endophyte[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2010: 1-10 (in Chinese)
郝晓娟. 植物内生菌[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 1-10
- [2] Akutse KS, Maniania NK, Fiaboe KKM, et al. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae)[J]. Fungal Ecology, 2013, 6(4): 293-301
- [3] Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles[J]. New Phytologist, 2009, 182(2): 314-330
- [4] Bokulich NA, Mills DA. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(8): 2519-2526
- [5] Taylor DL, Walters WA, Lennon NJ, et al. Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for illumina amplicon sequencing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(24): 7217-7226
- [6] de Filippis F, Laiola M, Blaiotta G, et al. Different amplicon targets for sequencing-based studies of fungal diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(17): e00905-17
- [7] Řezáčová V, Gryndler M, Bukovská P, et al. Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi—contributions of PCR primer and host plant selectivity to the detected community profiles[J]. Pedobiologia, 2016, 59(4): 179-187
- [8] Chen ZB, Xia TY, Wang DK, et al. Diversity analysis of endophytic fungi in *Mentha* using Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology[J]. Medicinal Plant, 2016, 7(S1): 46-50
- [9] Zhao HM. Eco-physiological characteristics of halophyte salt-worts and their potential utilization in environmental mediation and germplasm improvement[J]. Bulletin of Science and Technology, 2004, 20(2): 167-171 (in Chinese)
赵惠明. 盐生植物盐角草的资源特点及开发利用[J]. 科技通报, 2004, 20(2): 167-171
- [10] Liu XF, Feng X, Wang QZ, et al. Recent study on the chemistry and pharmacology of *Salicornia* plant[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2012, 31(2): 8-11,16 (in Chinese)
刘晓峰, 冯煦, 王奇志, 等. 盐角草属植物化学成分和药理研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2012, 31(2): 8-11,16
- [11] Lee H, Choi J, Kim Y, et al. Effect of dietary intake of *Salicornia herbacea* L. hot water extract on anti-obesity in diet-induced obese rats[J]. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2012, 41(7): 950-956
- [12] Yi LP, Wang ZW. Root system characters in growth and distribution among three littoral halophytes[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(5): 1195-1202 (in Chinese)
弋良朋, 王祖伟. 盐胁迫下 3 种滨海盐生植物的根系生长和分布[J]. 生态学报, 2011, 31(5): 1195-1202
- [13] Wu F, Yu M, Lu ML, et al. Cloning and functional characterization of three superoxide dismutases genes from halophyte *Salicornia europaea* and *Thellungiella halophila*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2012, 32(10):

- 1957-1964 (in Chinese)
吴凡, 余梅, 鲁茂龙, 等. 盐角草和盐芥 3 个超氧化物歧化酶基因的克隆和功能分析[J]. 西北植物学报, 2012, 32(10): 1957-1964
- [14] Gao H. Study on several halophytes for improvement of secondary salinization in soils[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese)
高涵. 几种盐生植物对改善土壤次生盐渍化的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2018
- [15] Petrini O, Fisher PJ. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1986, 87(4): 647-651
- [16] Zhao YH, Yang HY, Xin ZH. Anti-tumor components from fermentation products of fungus Salcoli6 derived from *Salicornia herbacea*[J]. Food Science, 2011, 32(21): 6-11 (in Chinese)
赵育卉, 杨海燕, 辛志宏. 盐生海芦笋来源真菌 Salcoli6 发酵产物抗肿瘤活性成分研究[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 6-11
- [17] Zhan DR, Meng XL, Li LQ, et al. Isolation and identification of endophytic fungal strain Salicorn 35 from *Salicornia bigelovii* and optimization of its fermentation conditions for production of antioxidants[J]. Food Science, 2013, 34(19): 158-165 (in Chinese)
湛东锐, 孟晓露, 李连强, 等. 盐生海芦笋内生真菌 Salicorn 35 的分离鉴定与抗氧化发酵条件优化[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 158-165
- [18] Guo J, Wang H, Liu D, et al. Isolation of *Cunninghamella bigelovii* sp. nov. CGMCC 8094 as a new endophytic oleaginous fungus from *Salicornia bigelovii*[J]. Mycological Progress, 2015, 14(3): 11
- [19] Wang L, Sun X, Wei JG, et al. A new endophytic fungus *Neofabraea illicii* isolated from *Illicium verum*[J]. Mycoscience, 2015, 56(3): 332-339
- [20] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322
- [21] Lu LH, Yin SX, Liu X, et al. Fungal networks in yield-invigorating and -debilitating soils induced by prolonged potato monoculture[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 65: 186-194
- [22] Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Molecular Ecology, 1993, 2(2): 113-118
- [23] Xiong W, Zhao QY, Xue C, et al. Comparison of fungal community in black pepper-vanilla and vanilla monoculture systems associated with vanilla *Fusarium* wilt disease[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 117
- [24] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461
- [25] Wang S, Wei J, Yang Y, et al. Diversity and community structure of endophytic fungi in roots of *Ammopiptanthus mongolicus* in different recession degrees[J]. Mycosystema, 2018, 37(4): 411-421 (in Chinese)
王珊, 魏杰, 杨岳, 等. 不同衰退等级蒙古沙冬青根内真菌多样性与群落结构[J]. 菌物学报, 2018, 37(4): 411-421
- [26] Xi GJ, Li JB, Shi J, et al. Diversity of endophytic fungi in *Bletilla striata*[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(12): 2077-2083 (in Chinese)
席刚俊, 李警保, 史俊, 等. 白芨内生真菌的多样性[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(12): 2077-2083
- [27] Chen YH, Xing XK, Guo SX. The endophytic fungal community composition of *Gymnadenia conopsea* in Beijing[J]. Mycosystema, 2018, 37(1): 35-42 (in Chinese)
陈艳红, 邢晓科, 郭顺星. 北京地区手参内生真菌的区系组成分析[J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 35-42