

研究报告

陕西不同生境核桃内生真菌多样性

毛光瑞 翟梅枝* 史冠昭 阿依佳玛丽·依玛尔 刘泽星

(西北农林科技大学 核桃研究中心实验室 陕西 杨陵 712100)

摘要:【目的】了解核桃内生真菌组成、分布等多样性特性,为活性菌株筛选、作用机理研究等奠定基础。【方法】采用组织分离法对不同季节、不同生境、不同部位的核桃内生真菌进行分离,以形态学和分子生物学相结合的方法进行鉴定,通过定殖率、分离率、分离频率、Shannon-Wiener 多样性指数等分析核桃内生真菌的多样性。【结果】共分离获得核桃内生真菌 1 450 株,隶属于 47 个属,其中链格孢属 *Alternaria* 为优势类群,占菌株总数的 20.00%,镰孢属 *Fusarium* 和酵母属 *Saccharomyces* 相对较多,分别占菌株总数的 8.34%和 8.14%。核桃不同部位内生真菌的多样性指数(H')和均匀度指数都以两年生茎的最高,分别为 1.15 和 0.36;不同生境核桃中,山阳的多样性指数(H')和均匀度最高,分别为 1.42 和 0.42;秋冬两季中,秋季的指标较高,分别为 1.92 和 0.54。【结论】不同部位、不同生境、不同季节核桃都具有丰富的内生真菌且多样性存在差异;相似性系数、均匀度指数反映出,核桃内生真菌在一定程度上相对稳定。

关键词: 核桃, 内生真菌, 多样性, 相似性

Diversity of fungat endophytes from *Juglans regia* under different habitats in Shaanxi

MAO Guang-Rui ZHAI Mei-Zhi* SHI Guan-Zhao YIMAER Ayijiamali
LIU Ze-Xing

(Laboratory of Walnut Research Center, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: [Objective] Diversity of fungal endophytes associated with *Juglans regia* was studied. [Methods] Fungal endophytes from different seasons, habitats and parts of *Juglans regia* were isolated by tissue expand method. Strains were classified by morphology and similarity of internal transcribed spacer (ITS) sequence by ClustalX 2.0. Composition, diversity and preference of fungal endophytes were analyzed by the colonization frequency (CF), isolation rate (IR), isolation frequency (IF), Shannon-Wiener biodiversity index (H'). [Results] In total 1 450 fungal endophytes were isolated from *Juglans regia* and classified into 47 genera. Among them, *Alternaria* (20.00%), *Fusarium* (8.34%), *Saccharomyces* (8.14%) were the dominant genera. The diversity of fungal endophytes and Evenness index (E) were maximum in 2-yesr-old twig, Shanyang, spring with Shannon-Wiener index 1.15, 1.42, 1.92 and evenness 0.36, 0.42, 0.54, respectively. [Conclusion] There was some difference in diversity

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31370552)

*Corresponding author: Tel: 86-29-87082070; E-mail: plum-zhai@163.com

Received: May 06, 2015; **Accepted:** December 02, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 31, 2015
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370552)

*通讯作者: Tel: 86-29-87082070; E-mail: plum-zhai@163.com

收稿日期: 2015-05-06; **接受日期:** 2015-12-02; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-31

of fungal endophytes isolated from different parts, habitats, season of *Juglans regia*. Meanwhile, the similarity coefficient and evenness show that the fungal endophytes isolated from *Juglans regia* were relatively stable.

Keywords: *Juglans regia*, Fungal endophytes, Biodiversity, Similarity coefficient

植物内生真菌是指在其生活周期的全部或某个阶段生活于植物组织内部且不引起宿主明显病害的一类真菌^[1]。在长期的进化过程中, 内生真菌和宿主形成了共生或互惠关系, 一方面植物为内生真菌提供能量、矿质元素等; 另一方面, 内生真菌具有促进植物生长发育、增强植物抗逆性、影响植物次生代谢物质积累等作用^[2]。大量研究也发现, 绝大部分植物都具有内生真菌且内生真菌在宿主科或种的水平上具有偏好性, 以及同一宿主不同组织之间分布也有偏好性^[3]。此外, 植物内生真菌对生物防治、医药开发、工农业生产等都具有重要意义^[4]。

核桃 *Juglans regia* L. 在世界各地被广泛种植并且为我国主要经济林树种, 资源丰富、经济价值高^[5]。翟梅枝等^[6]对核桃内生真菌 G8 进行分离鉴定及抑菌活性进行研究, 结果表明, G8 发酵液提取物对 28 种植物病原真菌均具有不同程度的抑制作用。Jiang 等^[7]研究发现, 核桃内生真菌菌株 YJ-1024 发酵液提取物对 7 种革兰氏阳性菌和 4 种革兰氏阴性菌均具有较好的抑制活性。Pardatscher 等对意大利 8 个地区的核桃内生真菌进行了多样性研究, 结果表明, 核桃内生真菌十分丰富, 共分离到 3 742 株内生真菌, 隶属于 30 个属, 其中链格孢属 *Alternaria* 为优势属, 占分离菌种总数的 26.10%^[8]。但目前国内外对核桃内生真菌多样性的研究较少, 本研究对陕西省核桃主产区的核桃内生真菌进行分离、鉴定, 探究核桃内生真菌的菌群多样性, 了解内生真菌在核桃不同部位、生境、季节的组成、分布等, 为进一步发掘活性菌株、内生真菌与宿主的相互关系等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品: 分别于 2013 年秋季(10 月)、冬季

(12 月), 选择核桃主栽区的陕西省山阳县(109.521 230°E; 33.521 230°N; 海拔 761 m; 年降水量 709.0 mm)、蓝田县(109.357 481°E; 34.197 120°N; 海拔 678 m; 年降水量 720.4 mm)、宜君县(109.034 730°E; 35.181 742°N; 海拔 1 442 m; 年降水量 709.3 mm)的核桃园采集样品。在每个采样地点, 随机选取生长健壮, 且树龄、长势及立地条件相似的核桃树 2 株(1 株实生核桃树、1 株良种核桃树)进行采样, 采集部位包括根、一年生茎、两年生茎、干茎、叶和果。分别装入自封袋、编号, 带回实验室保存于 4 °C, 并在 12 h 内对样品进行处理。

1.1.2 培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA, g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 13, pH 自然, 临用时加 1 g/L 链霉素, 以抑制细菌和放线菌生长; 孟加拉红培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.1.3 试剂和仪器: 乙醇, 山东利尔康医疗科技股份有限公司; 葡萄糖, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 琼脂, 北京索莱宝科技有限公司; 2×*Taq* PCR Master Mix, 上海天根生物公司; 引物 ITS1 和 ITS4, 上海英骏生物技术有限公司。PCR 仪, Eppendorf 公司。

1.2 外植体的表面消毒

按照王伟等^[9]的研究方法, 首先将核桃不同部位各组织用流水冲洗干净, 然后将核桃的根、一年生茎、两年生茎、干茎分别切成 15 mm 小段, 叶切成 15 mm×15 mm 小块, 果切成长宽高均为 15 mm 的小块。将以上各组织在超净工作台内进行表面消毒, 步骤为: (1) 无菌水冲洗 2–3 次→75%酒精消毒 3 min→无菌水冲洗 3–4 次; (2) 无菌水冲洗 2–3 次→3% H₂O₂ 消毒 3 min→无菌水冲洗 3–4 次。将消毒过的核桃材料, 用组织印迹法做对照处理, 检验消毒效果。

1.3 内生真菌的分离、纯化和保藏

将以上用两种方式消毒的根、一年生茎、两年生茎、干茎分别切成5 mm小段,叶切成5 mm×5 mm小块,果切成长宽高均为5 mm的小块,分别接种到PDA和孟加拉红培养基中,每个培养皿接种3块,每种培养基2个重复,在28℃暗培养3–7 d,待材料边缘长出菌丝后,采用菌丝末端分离法^[10],将边缘菌丝转接到PDA培养基上进行纯化,多次纯化后得到单一菌落,并转接到试管斜面上保藏于4℃。

1.4 内生真菌的鉴定

1.4.1 菌株的形态学特征鉴定:采用真菌经典鉴定方法^[11],根据《真菌鉴定手册》^[12]等将菌株鉴定到属。

1.4.2 菌株的分子生物学鉴定:将PDA培养基上无法产孢的内生真菌培养一段时间后,从平板上刮取约0.1 g菌丝体,置于1.5 mL离心管中,用改良的CTAB法提取基因组DNA,并以此为模板,用通用引物ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对菌株rDNA-ITS区域进行扩增。PCR反应体系(15 µL体系): 2×Taq PCR Master Mix 7.5 µL, ITS1和ITS4 (12.5 µmol/L)各0.6 µL,模板DNA 0.8 µL,双蒸水补足15 µL。扩增程序为: 94℃ 4 min; 94℃ 40 s, 37℃ 1 min, 72℃ 1 min, 40个循环; 72℃ 10 min。扩增产物用1.2%琼脂糖凝胶(DuRed核酸染料)电泳检测,将符合要求的扩增产物送至上海生工生物技术有限公司进行测序^[13–14]。用BLAST程序将测得序列与GenBank中的序列进行同源性比对,选择相似性98%以上的序列作为参考序列,并采用ClustalX 2.0做同源性比较和匹配排序。用MEGA 5构建邻接(Neighbor-Joining, NJ)树,根据系统发育树中组群关系,进行系统发育分析^[15]。

1.5 内生真菌多样性分析

采用定殖率、分离率、分离频率、Shannon-Wiener多样性指数、均匀度指数、相似性指数分析核桃内生真菌的多样性以及分布特性。

2 结果与分析

2.1 内生真菌分子鉴定结果

依据内生真菌在培养基上的生长特征,将未被鉴定的124株菌划分为8个形态型。通过Neighbor-Joining法对核桃内生真菌进行分子系统学分析,得到系统发育树。初步确定菌株D2、D11、D19为茎点霉属*Phoma* sp., D4为链格孢属*Alternaria* sp., D5为拟茎点霉属*Phomopsis* sp., Q3为刺盘孢属*Colletotrichum* sp., Q9为附球菌属*Epicoccum*, Q17为新丛赤壳属*Neonectria* sp.。且Q9和Q17在形态学鉴定时未出现(图1)。

2.2 秋冬季核桃内生真菌的组成

由表1可知,分离菌株多为子囊菌,占总菌株数的98.47%。在目的分类水平上,以子囊菌的格孢菌目Pleosporales、肉座菌目Hypocreales、酵母目Saccharomycetales为优势菌群,分别占总菌株数的20%、17.24%、8.14%;在科的分类水平上,以格孢菌科Pleosporineae和丛赤菌科Nectriaceae为优势菌群,分别占总菌株数的20.00%和10.34%;在属的分类水平上,链格孢属*Alternaria*为优势类群,占总菌株数的20.00%,镰孢属*Fusarium*和酵母属*Saccharomyces*相对较多,分别占总菌株数的8.34%和8.14%。

2.3 秋冬季核桃内生真菌的多样性

2.3.1 不同部位核桃内生真菌的多样性:由表2可知,在1392块核桃根、茎、叶、果中分离到内生真菌1450株,经形态学特性和真菌ITS分析,鉴定内生真菌归为47属。核桃不同部位内生真菌类群组成和分离频率存在差异,两年生茎中的内生真菌分离频率最高,为29.03%;一年生茎次之,为27.03%;其余依次为干茎(14.90%)>根(14.76%)>叶(8.83%)>果(5.45%)。核桃不同部位内生真菌的种类和分布也存在较大差异。核桃根中镰孢属最多,占菌株总数的4.62%;核桃一年生茎、两年生茎、干茎和果中都是以链格孢属最多,分别占菌株总数的6.41%、7.17%、3.66%、2.00%;核桃叶中黑孢霉属

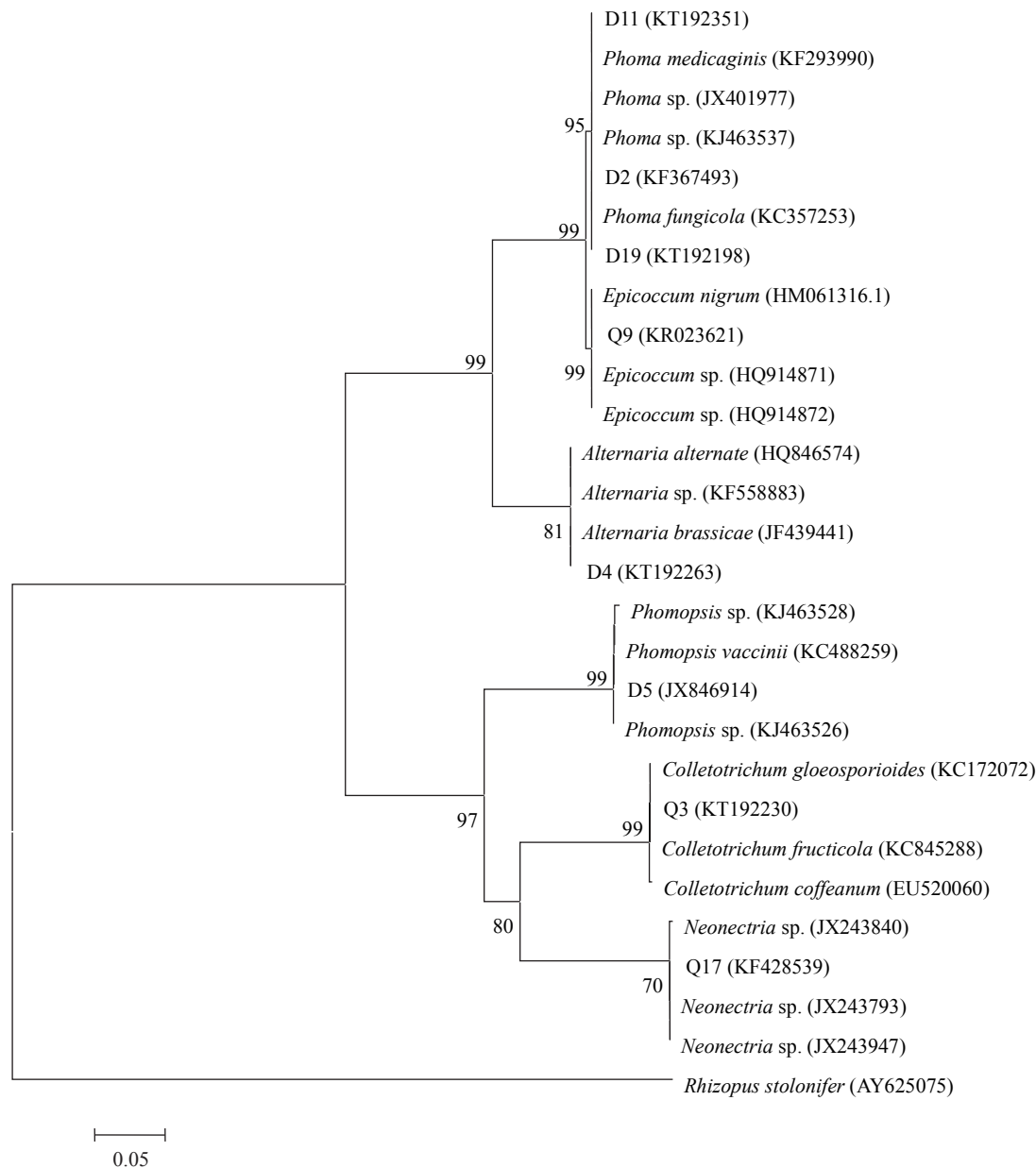


图 1 8 个菌株基于 5.8S rRNA 基因 ITS 序列系统发育树

Figure 1 Phylogenetic trees of the 8 strains from Fungi imperfecti based on 5.8S rRNA gene ITS sequences

注：括号内为菌株的 5.8S rRNA 基因序列在 GenBank 中的索引号；分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 5.8S rRNA gene sequences of those strains; The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications).

表 1 核桃内生真菌的菌群组成
Table 1 The composition of endophytic fungi in *Juglans regia* L.

	目 Order	科 Family	属 Genus	分离频率 Isolation frequency (%)
子囊菌门 Ascomycota	Chaetosphaeriales	Australiascaceae	毛链胞属 <i>Monilochaetes</i>	1.17
			长梗串孢霉属 <i>Monilochaetes</i>	0.90
		Chaetosphaeriaceae	顶芽枝梭孢霉属 <i>Menispora</i>	1.31
		粪壳菌科	毛壳菌属	0.55
	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	
		粪壳菌科	粪壳菌属	0.28
		Sordariaceae	<i>Sordaria</i>	
	假毛壳球目 Trichosphaeriales	假毛壳球科	黑孢霉属	3.86
		Trichosphaeriaceae	<i>Nigrospora</i>	
	间座壳菌目 Diaporthales	黑盘孢科	黑盘孢属	5.86
		Melanconidaceae	<i>Melanconium</i>	
		间座科壳 Diaporthaceae	小壳蕉孢属	0.48
			<i>Cytospora</i>	
			腐皮壳属	0.41
			<i>Diaporthe</i>	
			拟茎点霉属	1.72
			<i>Phomopsis</i>	
	肉座菌目 Hypocreales	丛赤菌科 Nectriaceae	镰孢属	8.34
			<i>Fusarium</i>	
			梭孢霉属	0.21
			<i>Fusidium</i>	
			新丛赤壳属	1.79
			<i>Neonectria</i>	
		—	头孢霉属	0.83
			<i>Cephalosporium</i>	
		肉座菌科 Hypocreaceae	木霉属	2.55
			<i>Trichoderma</i>	
		麦角菌科 Clavicipitaceae	座壳孢属	1.45
			<i>Aschersonia</i>	
	—	—	茎叶核菌属	1.79
			<i>Ectostroma</i>	
	—	—	花核菌属	5.86
			<i>Anthia</i>	
	—	—	节串孢霉属	0.83
			<i>Gonatorrhodum</i>	
	—	—	峡筒串孢霉属	3.17
			<i>Prophytroma</i>	
	—	Plectosphaerellaceae	轮枝孢属	0.28
			<i>Verticillium</i>	
	小丛壳目 Glomerellales	小丛壳科 Glomerellaceae	刺盘孢属	6.55
			<i>Colletotrichum</i>	

(待续)

(续表)				
	散囊菌目	曲霉科	曲霉属	0.21
	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	
		发菌科	青霉属	0.28
		Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	
	伞菌目	伞菌科	发菌属	2.55
	Agaricales	Agaricaceae	<i>Capillaria</i>	
		Psathyrellaceae	束丝核菌属	2.83
			<i>Ozonium</i>	
	刺盾炱目	Herpotrichiellaceae	假黑粉霉属	0.28
	Chaetothyriales		<i>Coniosporium</i>	
	格孢菌目	格孢菌科	链格孢属	20
	Pleosporales	Pleosporineae	<i>Alternaria</i>	
	煤炱目	煤炱科	单孢枝霉属	0.48
	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Hormodendrum</i>	
		球腔菌科	尾孢属	0.21
		Mycosphaerellaceae	<i>Cercospora</i>	
	葡萄座腔目	葡萄座腔菌科	小穴壳属	1.10
	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	<i>Dothiorella</i>	
			葡萄座腔菌属	4.07
			<i>Botryosphaeria</i>	
	腔菌目	腔菌科	德氏霉属	0.07
	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Drechslera</i>	
			附球菌属	0.01
			<i>Epicoccum</i>	
		Halosphaeriaceae	黑葱花霉属	0.14
		—	<i>Periconia</i>	
		—	茎点霉属	4.69
		—	<i>Phoma</i>	
		—	壳满孢属	0.21
		—	<i>Plenodomus</i>	
		—	须壳孢属	0.28
		—	<i>Pyrenochaeta</i>	
	—	—	丝球壳霉属	0.13
		—	<i>Sphaeronema</i>	
	—	—	轮枝头孢霉属	0.07
		—	<i>Spicnularia</i>	
	—	—	圆孢霉属	0.14
		—	<i>Staphylotrichum</i>	
	—	—	色串孢属	2.00
		—	<i>Tolura</i>	
Protozoa	酵母目	酵母科	酵母属	8.14
	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	
	柔膜菌目	Chaetomellaceae	刺孢壳属	0.41
Basidiomycota	Helotiales	—	<i>Chaetomella</i>	
	—	—	球孢霉属	0.28
		—	<i>Coccospora</i>	
担子菌门	鸡油菌目	角担菌科	丝核菌属	0.97
	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	<i>Rhizoctonia</i>	
	—	—	小菌核属	0.28
			<i>Sclerotium</i>	

表 2 不同部位核桃内生真菌类群组成、分布、多样性指数和分离频率
Table 2 Composition, distribution, diversity and isolation frequency of endophytic fungi in different parts from walnut

项目 Item	分离频率 Isolation frequency (%)						合计 Total
	根 Roots	一年生茎 1-year-old twig	两年生茎 2-year-old twig	干茎 Scapus	叶 Leaves	果 Fruits	
内生真菌 Fungi	—	2.97	1.24	1.10	0.41	0.14	
花核菌属 <i>Anthina</i>	—	—	—	—	—	—	
须壳孢属 <i>Pyrenochaeta</i>	0.07	0.21	—	—	—	—	
小穴壳属 <i>Dothiorella</i>	—	—	0.48	0.62	—	—	
色串孢属 <i>Tolura</i>	—	0.62	0.41	—	0.97	—	
茎点霉属 <i>Phoma</i>	—	1.45	2.41	0.62	0.21	—	
镰孢属 <i>Fusarium</i>	4.62	0.90	1.10	0.90	0.62	0.21	
木霉属 <i>Trichoderma</i>	1.38	—	0.48	0.28	0.34	0.07	
酵母属 <i>Saccharomyces</i>	3.31	1.45	1.17	0.62	1.38	0.21	
头孢霉属 <i>Cephalosporium</i>	—	0.14	—	—	0.69	—	
黑孢霉属 <i>Nigrospora</i>	0.69	1.03	1.93	0.14	1.66	0.41	
轮枝头孢霉属 <i>Spicularia</i>	—	—	—	—	0.07	—	
峡筒串孢霉属 <i>Prophytroma</i>	—	0.48	1.45	1.03	—	0.21	
拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	—	0.34	1.24	—	—	0.14	
球孢霉属 <i>Coccospora</i>	0.28	—	—	—	—	—	
小核菌属 <i>Sclerotium</i>	—	0.28	—	—	—	—	
尾孢属 <i>Cercospora</i>	—	—	—	—	—	0.21	
束丝核菌属 <i>Ozonium</i>	—	0.55	1.31	0.97	—	—	
座壳孢属 <i>Aschersonia</i>	—	0.21	0.41	0.21	0.34	0.28	
腐皮壳属 <i>Diaporthe</i>	0.14	0.14	0.14	—	—	—	
黑盘孢属 <i>Melanconium</i>	0.21	1.17	1.72	0.76	—	—	
新丛赤壳属 <i>Neonectria</i>	1.66	—	—	—	0.14	—	
轮枝孢属 <i>Verticillium</i>	—	—	0.21	—	0.07	—	
炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>	0.14	4.00	2.41	—	—	—	
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	—	0.62	—	0.34	—	—	
顶芽枝梭孢霉属 <i>Menispora</i>	—	0.48	0.83	—	—	—	
链格孢属 <i>Alternaria</i>	0.34	6.41	7.17	3.66	0.90	2.00	
小壳蕉孢属 <i>Cytospora</i>	1.17	—	—	—	—	—	
毛链孢属 <i>Monilochaetes</i>	—	—	0.41	—	—	—	
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	0.14	—	—	0.90	—	—	
长梗串孢霉属 <i>Monilochaetes</i>	—	—	—	—	—	—	
茎叶核菌属 <i>Ectostroma</i>	—	0.62	0.14	0.28	0.14	0.62	
黑葱花霉属 <i>Periconia</i>	—	—	—	—	0.14	—	
单孢枝霉属 <i>Hormodendrum</i>	—	—	0.34	—	0.14	—	
梭孢霉属 <i>Fusidium</i>	—	—	0.21	—	—	—	
假黑粉霉属 <i>Coniosporium</i>	—	—	—	—	0.28	—	
节串孢霉属 <i>Gonatorrhodum</i>	—	0.62	0.07	—	0.14	—	
青霉属 <i>Penicillium</i>	—	—	—	—	—	0.28	
葡萄座腔菌属 <i>Botryosphaeria</i>	—	0.41	0.97	1.79	0.21	0.69	
壳满孢属 <i>Plenodomus</i>	0.21	—	—	—	—	—	
丝球壳霉属 <i>Sphaeronema</i>	0.13	—	—	—	—	—	
粪壳菌属 <i>Sordaria</i>	0.28	—	—	—	—	—	

(待续)

(续表)							
发菌属 <i>Capillaria</i>	—	1.79	0.76	—	—	—	
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	—	0.14	—	0.07	—	—	
刺孢壳属 <i>Chaetomella</i>	—	—	—	0.41	—	—	
德氏霉属 <i>Drechslera</i>	—	—	—	0.07	—	—	
圆孢霉属 <i>Staphylotrichum</i>	—	—	—	0.14	—	—	
附球菌属 <i>Epicoccum</i>	0.01						
组织块数	288	28	288	288	144	96	1 392
Number of tissue segments							
长菌块数							
Number of segments yielding more than one fungus	186	253	261	252	105	68	1 128
菌株数 Number of fungal strains	214	392	421	316	128	79	1 450
定殖率 Colonization rate (%)	64.58	87.85	90.63	87.50	72.92	70.83	81.03
分离率 Isolation rate (%)	74.31	136.11	146.18	109.72	88.89	82.29	104
属数 Number of species	17	24	25	20	19	13	46
多样性指数 <i>H'</i>	0.59	1.07	1.15	0.67	0.44	0.27	3.05
均匀度指数 <i>E</i>	0.21	0.34	0.36	0.22	0.15	0.11	0.80

最多，占菌株总数的 1.66%。有些菌属虽然分离频率很低，但具有一定分布特异性。如，壳满孢属、丝球壳霉属、粪壳菌属等仅在核桃根中分离出来；小核菌属仅在核桃一年生茎中的分离出来；梭孢霉属、毛链胞属仅在核桃两年生茎中分离出来；刺孢壳属、德氏霉属、圆孢霉属仅在核桃干茎中分离出来；黑葱花霉属、假黑粉霉属仅在核桃叶中分离出来；尾孢属、青霉属仅在核桃果中分离出来。

两年生茎内生真菌的定殖率最高(90.63%)，其余依次为一年生茎(87.85%)>干茎(87.50%)>叶(72.92%)>果(70.83%)>根(64.58%)。分离率的变化与定殖率相同，从高到低依次为两年生茎(146.18%)>一年生茎(136.11%)>干茎(109.72%)>叶(88.89%)>果(82.29%)>根(74.31%)。两年生茎内生真菌的定殖率和分离率最高，根内生真菌的定殖率和分离率最低。这与其他一些植物中内生真菌定殖率和分离率变化规律相似^[16]。不同部位 Shannon-Wiener 多样性指数(*H'*)和均匀度变化趋势相同。从核桃两年生茎中分离出 421 株内生真菌，分属于 25 个属，其内生真菌多样性指数和均匀度最高，分别为 1.15 和 0.36；果中分离到内生真菌 79 株，分属于 13 个属，其多样性指数和均匀度最低，分别为 0.27 和 0.11。

2.3.2 不同生境核桃内生真菌的多样性：由表 3 可知，不同生境核桃内生真菌的分离频率存在差异，分离频率依次为：山阳(39.52%)>宜君(33.03%)>蓝田(27.45%)。从不同生境条件的供试样品中分离到同属菌株，如花核菌属、茎点霉属、镰孢属等。不同生境条件下核桃内生真菌的种类、分布也有所不同。山阳核桃中酵母属和链格孢属为优势菌群，分别占菌株总数的 7.24%和 6.48%；蓝田核桃中链格孢属为优势菌群，占菌株总数的 4.07%；宜君则以链格孢属和刺盘孢属为优势菌群，分别占菌株总数的 9.45%和 5.52%，其中链格孢属在不同生境中都是优势菌群，且不同生境核桃各有其特有的内生真菌菌群。不同生境核桃内生真菌的多样性也各不相同。山阳分离到 573 株内生真菌，隶属于 30 个属；蓝田分离到 398 株内生真菌，隶属于 30 个属；宜君分离到 479 株内生真菌，隶属于 25 个属。山阳的多样性指数(*H'*)和均匀度(*E*)均为最高，分别为 1.42 和 0.42。

2.3.3 不同季节核桃内生真菌的多样性：由表 3 可知，核桃内生真菌的分离频率：秋季(53.79%)>冬季(46.21%)。核桃内生真菌的优势菌群秋冬季有所不同，秋季为酵母属，占核桃内生真菌总数的 6.90%，冬季为链格孢属，占核桃内生真菌总数的

表3 不同生境和不同季节核桃内生真菌菌群组成、分离频率和多样性指数
Table 3 Composition, isolation frequency and diversity of endophytic fungi in different habitats and seasons from walnut

项目 Item	分离频率 Isolation frequency (%)				
	秋季 Autumn	冬季 Winter	山阳 Shanyang	蓝田 Lantian	宜君 Yijun
内生真菌 Fungi					
花核菌属 <i>Anthina</i>	4.07	1.79	3.72	0.07	2.07
须壳孢属 <i>Pyrenochaeta</i>	0.21	0.07	0.21	0.07	—
小穴壳属 <i>Dothiorella</i>	1.10	—	0.48	—	0.62
色串孢属 <i>Tolura</i>	2.00	—	0.14	1.86	—
茎点霉属 <i>Phoma</i>	1.24	3.79	0.41	1.66	2.62
镰孢属 <i>Fusarium</i>	5.24	3.10	5.93	1.86	0.55
木霉属 <i>Trichoderma</i>	1.86	0.69	1.38	0.83	0.34
酵母属 <i>Saccharomyces</i>	6.90	1.24	0.41	0.14	—
头孢霉属 <i>Cephalosporium</i>	0.83	—	0.28	—	0.55
黑孢霉属 <i>Nigrospora</i>	3.86	—	0.14	2.55	1.17
轮枝头孢霉属 <i>Spicnularia</i>	0.07	—	0.07	—	—
峡筒串孢霉属 <i>Prophytroma</i>	0.21	2.97	2.34	—	0.83
拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	0.62	0.76	0.21	1.10	0.41
球孢霉属 <i>Coccospora</i>	0.28	—	0.28	—	—
小核菌属 <i>Sclerotium</i>	0.28	—	0.28	—	—
尾孢属 <i>Cercospora</i>	5.72	14.28	6.48	4.07	9.45
束丝核菌属 <i>Ozonium</i>	0.21	—	0.21	—	—
座壳孢属 <i>Aschersonia</i>	1.86	0.97	1.10	—	1.72
腐皮壳属 <i>Diaporthe</i>	1.24	0.21	0.41	0.83	0.21
黑盘孢属 <i>Melanconium</i>	0.41	—	—	2.90	1.17
新丛赤壳属 <i>Neonectria</i>	1.31	4.55	1.66	2.00	2.21
轮枝孢属 <i>Verticillium</i>	0.14	1.66	—	0.28	—
炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>	0.28	—	0.28	—	—
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	5.79	0.76	0.76	0.28	5.52
顶芽枝梭孢霉属 <i>Menispora</i>	—	0.97	0.97	—	—
链格孢属 <i>Alternaria</i>	—	1.31	1.31	—	—
小壳焦孢属 <i>Cytosporella</i>	—	0.48	0.48	—	—
毛链胞属 <i>Monilochaetes</i>	—	1.17	1.17	—	—
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	—	0.55	7.24	0.62	0.28
长梗串孢霉属 <i>Monilochaetes</i>	—	0.90	0.90	—	—
茎叶核菌属 <i>Ectostroma</i>	1.79	—	—	1.31	0.48
黑葱花霉属 <i>Periconia</i>	0.14	—	—	0.14	—
单孢枝霉属 <i>Hormodendrum</i>	0.48	—	—	0.48	—
梭孢霉属 <i>Fusidium</i>	0.21	—	—	0.07	0.14

(待续)

(续表)

假黑粉霉属 <i>Coniosporium</i>	0.28	—	—	0.28	—
节串孢霉属 <i>Gonatorrhodum</i>	0.83	—	—	0.76	0.07
青霉属 <i>Penicillium</i>	0.28	—	—	0.28	—
葡萄座腔菌属 <i>Botryosphaeria</i>	2.76	1.31	0.14	0.28	—
壳满孢属 <i>Plenodomus</i>	—	0.21	—	0.21	—
丝球壳霉属 <i>Sphaeronema</i>	—	0.13	—	0.13	—
粪壳菌属 <i>Sordaria</i>	—	0.28	0.14	0.48	1.17
发菌属 <i>Capillaria</i>	0.83	1.72	—	1.72	0.83
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	—	0.21	—	0.21	—
刺孢壳属 <i>Chaetomella</i>	0.41	—	—	—	0.41
德氏霉属 <i>Drechslera</i>	0.07	—	—	—	0.07
圆孢霉属 <i>Staphylotrichum</i>	—	0.14	—	—	0.14
附球菌属 <i>Epicoccum</i>		0.01		0.01	
株数 Number isolates obtained	780	670	573	398	479
属数 Number of species	35	28	30	30	25
多样性指数 H'	1.92	1.56	1.42	1.15	1.25
均匀度指数 E	0.54	0.47	0.42	0.34	0.39

14.28%。小穴壳属、色串孢属等仅在秋季被分离到，而丝核菌属、顶芽枝梭孢霉属、小壳蕉孢属等仅在冬季被分离到，说明秋季和冬季内生真菌在类群组成上也存在差异。多样性指数(H')和均匀度指数(E)也为秋季高于冬季，秋季分别为 1.92 和 0.54，冬季分别为 1.56 和 0.47。

2.4 核桃内生真菌菌群相似性分析

2.4.1 不同部位核桃内生真菌的相似性：从表 4 可知，不同部位核桃内生真菌的相似性变化较大，一年生茎和两年生茎的内生真菌相似性系数最高(0.775 5)，根和干茎的内生真菌相似性系数最低(0.333 3)。根和两年生茎的内生真菌相似性系数最高(0.400 0)，与其他部位的相似性系数普遍较低，说明根与其他部位的内生真菌差异较大。除根以外，其他部位之间内生真菌相似性系数都在 0.5 以上，说明各部位内生真菌菌群有一定的相似性。

2.4.2 不同生境核桃内生真菌的相似性：通过计算比较 Sorenson 指数发现，不同生境核桃内生真菌相似性系数均在 0.5 以上，说明核桃内生真菌菌群在

不同生境条件下有一定的相似性。其中，蓝田和宜君的相似性较高，Sorenson 指数为 0.641 5 (表 5)。

2.4.3 不同季节核桃内生真菌的相似性：由表 3 可知，从菌株数量和种类上来看，秋季为 780 株，隶属于 35 个属，冬季为 670 株，隶属于 28 个属，秋季明显多于冬季。秋冬两季共有内生真菌归为 18 个属，如花核菌属、须壳孢属、茎点霉属等。通过计算 Sorenson 指数可知，两者之间的 Sorenson 指数为 0.571 4，说明秋季和冬季核桃内生真菌的菌群具有一定的相似性。

3 讨论

3.1 培养基和消毒方式的选择

预试验分离核桃叶内生真菌时，共用 48 个组织块(PDA 培养基中 24 块，孟加拉红培养基中 24 块)，其中 PDA 培养基中分离到 34 株菌、孟加拉红培养基中分离到 28 株菌，经鉴定 2 种培养基分离的内生真菌差异较大，这一结果和前人研究结果一致^[17]。为了很好地说明核桃内生真菌的多样性，本研究选择了分离内生真菌常用的 PDA 培养

表4 核桃不同部位内生真菌的相似性系数
Table 4 The Sorensen coefficient (C_s) among different parts

样本 Sample	根 Root	一年生茎 1-year-old twig	两年生茎 2-year-old twig	干茎 Sapcus	叶 Leaf	果 Fruit
根 Root	—	0.390 2	0.400 0	0.333 3	0.342 9	0.344 8
一年生茎 1-year-old twig	—	—	0.775 5	0.577 8	0.500 0	0.526 3
两年生茎 2-year-old twig	—	—	—	0.636 4	0.558 1	0.594 6
干茎 Sapcus	—	—	—	—	0.512 8	0.606 1
叶 Leaf	—	—	—	—	—	0.562 5
果 Fruit	—	—	—	—	—	—

表5 不同生境核桃内生真菌相似性系数
Table 5 The similarity coefficients of endophytic fungi from walnut under different habitats

采样地 Sampling site	山阳 Shanyang	蓝田 Lantian	宜君 Yijun
山阳 Shanyang	—	0.542 4	0.592 6
蓝田 Lantian	—	—	0.641 5
宜君 Yijun	—	—	—

基和能够抑制细菌生长的孟加拉红培养基。

内生真菌分离时因不同植物以及同种植物不同组织部位等原因,所选用的消毒方法也各不相同,这也直接影响了内生真菌的分离^[18]。目前,植物内生真菌的分离常用的消毒剂有次氯酸钠、酒精、过氧化氢^[19],为了消毒彻底,国内学者还常用氯化汞^[4-5]。本研究选用酒精和过氧化氢为消毒剂,预试验结果表明,酒精消毒 3 min 和过氧化氢消毒 3 min 都能达到消毒的效果,但消毒时间少于 3 min 时不能完全杀灭表生菌,并且 2 种消毒方式分离到的内生真菌在数量和种类上也有所差异。究其原因,数量上的差异可能是在消毒的过程中同时也杀灭了一些内生真菌,种类上的差异可能是不同内生真菌对两种消毒剂的敏感性不同。因此,不论用何种消毒方式,在完全杀灭表生菌的前提下或多或少会杀灭一些内生真菌。为了更好地分离核桃内生真菌,本研究选择了 2 种消毒方式。

史应武等^[20]对新疆醉马草内生菌群落结构研究表明:培养法和非培养法可以相互补充,能够较

为完整的解析植物内生真菌组成特性。本研究只是用培养法进行核桃内生真菌的研究,具有一定的局限性,因此,后续拟以非培养法进行深入研究。

3.2 核桃内生真菌多样性分析

本研究从核桃中分离出 1 450 株内生真菌,隶属于 47 个不同的属,较好地说明了核桃内生真菌的多样性。核桃内生真菌在组织部位、生境、季节上具有一定的专一性,这与一些学者的研究结果一致^[21],也正好验证了 Hoffman 等^[22]的研究结果:植物内生真菌多样性受到宿主植物自身生理生化特性、气候条件、地理位置、温度、湿度、海拔高度等环境因素的影响。其中,在核桃两年生茎中获得的内生真菌的定殖率(90.63%)、分离率(146.18%)、分离频率(29.03%)、多样性指数(1.15)、均匀度指数(0.36)均为最高,说明核桃两年生茎中获得的内生真菌的多样性最为丰富。这与一些学者的研究结果相似:随着茎的年龄增大,茎中内生真菌也随着增多,这可能是因为茎与内生真菌接触的时间变长,更容易被侵染,因而多样性也更丰富,但干茎中内生真菌多样性又降低,这可能是因为干茎中营养物质减少的原因^[16]。研究发现,链格孢属 *Alternaria* (20.00%)、镰孢属 *Fusarium* (8.34%)为优势菌群。之前,一些学者也曾报道链格孢属 *Alternaria*、镰孢属 *Fusarium* 在植物中广泛存在,为暖温带植物常见的优势属^[8,13],并且能够增强宿主植物的抗逆性^[23]。这说明链格孢属 *Alternaria*、镰孢属 *Fusarium* 较其

他种属的真菌而言, 可能对温带生态环境有着更强的适应力, 更容易在宿主中生长。在长期的协同进化过程中与宿主建立了一种互利共生的关系。

从相似性来看, 根和干茎中的内生真菌的相似性最低, 体现出一定的组织差异性和专一性, 究其原因, 可能是根和干茎接触的两种不同环境时间最长造成的; 蓝田和宜君相似性最高, 说明这两个生境的气候、土壤等形成的综合因素比较相似。这都说明了核桃内生真菌的多样性比较丰富。同时, 均匀度也反映了核桃内生真菌的多样性具有一定稳定性, 这在一定程度上表明在长期的协同进化过程中, 核桃与其内生真菌形成了相对稳定的关系。

参 考 文 献

- [1] Botella L, Diez JJ. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*[J]. Fungal Diversity, 2011, 47(1): 9-18
- [2] Cao RH, Liu XG, Gao KX, et al. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes *in vitro*[J]. Current Microbiology, 2009, 59(6): 584-592
- [3] Zheng JH, Kang JC, Lei BX, et al. Diversity of endophytic fungi associated with *Ginkgo biloba*[J]. Mycosystema, 2013, 32(4): 671-681
- [4] Li WJ, Qian ZQ, Jin R, et al. Diversity and distribution characteristics of endophytic fungi in *Nicotiana tabacum* in Dali District, Yunnan Province[J]. Microbiology China, 2013, 40(5): 783-791 (in Chinese)
李文君, 钱正强, 金蕊, 等. 云南大理烟区烟叶内生真菌多样性及分布特征[J]. 微生物学通报, 2013, 40(5): 783-791
- [5] Li L, Zhai MZ, Yang H, et al. Molecular identification and biological characteristics of endophytic fungi G3[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(10): 35-39 (in Chinese)
李丽, 翟梅枝, 杨惠, 等. 核桃内生真菌 G3 的分子鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(10): 35-39
- [6] Zhai MZ, Gao ZH, Xu WT, et al. Separation and identification of endophytic fungi G8 from walnuts and antifungal activity of G8 fermentation products[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2008, 28(4): 92-97 (in Chinese)
翟梅枝, 高智辉, 徐文涛, 等. 核桃内生真菌 G8 菌株的分离鉴定及抑菌活性[J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(4): 92-97
- [7] Jiang GY, Yang BS, Qin QY, et al. Isolation and identification of an endophytic fungus associated with *Juglans regia* L. and its bioactivity[J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(11): 1637-1639, 1702
- [8] Pardatscher R, Schweigkofler W. Microbial biodiversity associated with the walnut *Juglans regia* L. in South Tyrol (Italy)[J]. Mitteilungen Klosterneuburg, 2009, 59(1): 24-30
- [9] Wang W, Zhai MZ, Xu WT, et al. Studies on endophytic fungi from *Juglans regia* L. I isolation and metabolites activities of endophytic fungi[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2008, 17(1): 77-81 (in Chinese)
王伟, 翟梅枝, 徐文涛, 等. 核桃内生菌研究 I 核桃内生菌的分离及代谢产物活性研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 77-81
- [10] Fang ZD. Research Methods on Plant Pathology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1998: 138-140 (in Chinese)
方中达. 植物病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 138-140
- [11] Du SK, Chen SL, Lin D, et al. Diversity of endophytic fungi in leaves of *Ginkgo biloba*[J]. Mycosystema, 2009, 28(4): 504-511 (in Chinese)
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
- [12] Wei JC. Molecular Identification of Fungi[M]. Shanghai: Shanghai Science Technology Press, 1979: 1-802 (in Chinese)
魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 1-802
- [13] Bai ZY, Wang XW, Ma R, et al. Analysis on diversity of endophytic fungi from apricot (*Armeniaca* Mill.) in Xinjiang[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2011, 34(4): 321-327 (in Chinese)
白周艳, 王晓炜, 马荣, 等. 新疆杏树(*Armeniaca* Mill.)内生真菌多样性分析[J]. 新疆农业大学学报, 2011, 34(4): 321-327
- [14] Wu FH, Huang DY, Huang XL, et al. Comparing study on several methods for DNA extraction from endophytic fungi[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(8): 62-64 (in Chinese)
吴发红, 黄东益, 黄小龙, 等. 几种真菌 DNA 提取方法的比较[J]. 中国农学通报, 2009, 25(8): 62-64
- [15] Zhou QW, Zhao BY, Lu H, et al. Isolation and identification of endophytic fungi in *Sphaerophysa salsula* and its diversity analysis[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2013, 44(3): 465-474 (in Chinese)
周启武, 赵宝玉, 路浩, 等. 苦马豆内生真菌分离鉴定与多样性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(3): 465-474
- [16] Kumar DSS, Hyde KD. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*[J]. Fungal Diversity, 2004, 17(1): 69-90
- [17] Chapela IH. Fungi in healthy stems and branches of American beech and aspen: a comparative study[J]. New Phytologist, 1989, 113(1): 65-75
- [18] Sun L, Zhu J, Li XJ, et al. Diversity of endophytic fungi associated with *Ferula sinkiangensis* K. M, Shen[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(8): 936-994 (in Chinese)
孙丽, 朱军, 李晓瑾, 等. 新疆阿魏内生真菌菌群多样性[J]. 微生物学报, 2014, 54(8): 936-994
- [19] Gagné S, Richard C, Rousseau H, et al. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1987, 33(11): 996-1000
- [20] Shi YW, Zhang XB, Lou K. Endophyte microbial community in *Achnatherum inebrians*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(10): 1297-1308 (in Chinese)
史应武, 张雪兵, 娄恺. 新疆醉马草内生菌群落结构[J]. 微生物学报, 2012, 52(10): 1297-1308
- [21] Hu KX, Hou XQ, Guo SX. Distribution of endophytic fungi in *Dendrobium officinale*[J]. Microbiology China, 2010, 37(1): 37-42 (in Chinese)
胡克兴, 侯晓强, 郭顺星. 铁皮石斛内生真菌分布[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 37-42
- [22] Hoffman MT, Arnold AE. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees[J]. Mycological Research, 2008, 112(3): 331-344
- [23] Hwllwig V, Grothe T, Mayer-Bartschmid A, et al. Ahersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Altemaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities[J]. The Journal of Antibiotics, 2002, 55(10): 881-892