

研究报告

再接种内生真菌对葡萄叶内生真菌群落结构的影响

马勉娣[△] 张秀英[△] 程玉 黄治钰 张汉波 杨明挚*

(云南大学 生命科学学院 云南 昆明 650091)

摘要:【目的】探讨回接内生真菌对葡萄叶内生真菌群落结构的影响。【方法】将葡萄叶中分离到的8株内生真菌回接到健康生长的玫瑰蜜葡萄叶片上,同时设置管理上喷施农药与未喷施农药两组处理,3个月后分析不同真菌菌剂处理后葡萄叶片内生真菌的分离率、优势度和多样性指数。【结果】5种菌剂的处理(*Xylaria* sp.、*Nigrospora* sp.、*Alternaria* sp. 1、*Alternaria* sp. 2和*Colletotrichum* sp.)在处理后的叶片中分离到了较多数量的接种菌。不同菌剂处理后葡萄叶片菌群结构差异显著。【结论】与对照处理的葡萄相比,菌剂的处理增加了叶内生真菌的分离率,但显著降低了内生真菌的多样性指数;发现喷施农药组叶片内生真菌的分离率较低,但多样性相对较高。

关键词: 葡萄, 再接种, 内生真菌, 菌群结构

Effects on folia endogenous flora structure of grape after re-inoculation with different endophytic fungi

MA Mian-Di[△] ZHANG Xiu-Ying[△] CHENG Yu HUANG Zhi-Yu
ZHANG Han-Bo YANG Ming-Zhi*

(School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: [Objective] The research is to study the effects of endophytic fungi re-inoculation on folia endogenous flora structure of grape. [Methods] Eight strains of endophytic fungi which isolated from wine grape leaves were re-inoculated to the healthy leaves of grapevine (variety: Rose-honey), and the effects on the folia endophytic fungi structure of grape were analyzed. Meanwhile, effects differences on the endophytic fungi structure to both groups of grapevine with and without pesticide after endophytic fungi re-inoculation, were also studied. We describe the folia endophytic fungi structure by using the isolation rate, dominance index and diversity index three months after re-inoculation. [Results] The results indicated that among all the treatments, five strains of the inoculated endophytic fungi (*Xylaria* sp., *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 2 and *Colletotrichum* sp.) can be relatively higher frequently isolated. Significant differences of folia endophytic fungi structures were found between one fungus re-inoculation and another. [Conclusion]

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(No. 31160070); 云南省计划项目(No. 2010ZC006)

*通讯作者: Tel: 86-871-65036451; 信箱: mah-yang@163.com

△ 共同第一作者

收稿日期: 2014-03-13; 接受日期: 2014-05-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-06-03

Compared with the controls, fungi re-inoculation can increase the isolation rate, but decrease the diversity index significantly of folia endophytes. And the using of pesticide could decrease the isolation rate, but shares a higher diversity of folia endophytic fungi, compared with that of the pesticide free group.

Keywords: Grape, Re-inoculation, Edophytic fungi, Fungal community structure

植物内生菌是十分重要的微生物资源。内生菌与植物在长期的进化过程中形成了互惠共生的关系。内生菌一方面依靠从宿主植物中吸收营养物质供自己生长,同时内生真菌又可以通过自身的代谢产物或借助于信号传导作用对宿主植物体产生影响。研究表明内生菌对宿主植物至少有下列几个方面的有益影响:内生菌可以通过产生植物生长素和增强宿主植物对氮、磷等营养元素的吸收两个方面促进植物生长^[1],增强宿主植物的抗逆性^[2-3]以及对病虫害的抵御能力^[4];此外,植物内生菌可以产生抗肿瘤、抗生素、抗氧化等各种有活性的次级代谢产物^[5-6],是现代药物的重要来源之一。因此关于植物内生菌的研究从20世纪90年代起已逐渐成为微生物学家们关注的热点^[7]。

在宿主植物中,不同的内生菌可以占据不同的生态位,他们相互作用,共同促进植物的生长,也相互制约,一种内生菌可能抑制其他一些内生菌生长,而促进另外一些内生菌的生长,从而在植物体内建立一种生态平衡,植物体可以被看作一个微生态系统^[8]。所以研究植物中内生菌之间的互作关系,显得十分必要。

葡萄及其制品由于其重要的经济价值,世界各国对葡萄品质及病原菌防治等方面研究较多^[9-10],但对葡萄内生真菌方面的研究少有报道。而利用葡萄内生真菌来提高葡萄的适应性及品质是一条值得尝试的新途径。目前对于回接植物内生真菌对植物品质的影响研究较多,如金蕊等通过回接内生真菌对大麻生理以及农艺性状均有显著影响^[11],郑小嘎等研究表明通过回接内生真菌烟叶的品质较对照得到明显改善^[12]。而回接的菌种在植物中是否可以被分离到,及其对植物内生真菌菌群结构有何影响未见报道。

本实验将前期从不同品种的葡萄叶片分离获得的8株内生真菌回接到玫瑰蜜葡萄叶上,以此来探究回接内生真菌对葡萄叶内生真菌的分布和群落结构的影响,从而为葡萄内生真菌资源的开发利用奠定基础,对科研和生产实践也有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料与实验样地:实验材料为云南高原产区的主要栽培品种之一酿酒葡萄玫瑰蜜,种植于云南省弥勒县的东风农场,本次实验选取其中一亩树龄为3年生长良好的葡萄作为实验材料,弥勒县东风农场属亚热带季风气候,海拔1400 m,年降雨量987.5 mm,年平均气温17.3℃,年平均日照2079.2 h,该农场为云南一些葡萄酒业公司的主要原料生产基地。

1.1.2 供试菌株:选取前期从不同品种的叶片中分离获得的优势菌、常见菌和稀有菌共8株作为供试菌株(表1)。

表1 供试用葡萄叶内生真菌菌株 Table 1 Endophytic fungi of grape used in the experiment			
菌剂编号 Endophytic fungi number	菌株编号 Strains number	属名 Generic	选择依据 Selection basis
A	CXB-2	<i>Xylaria</i> sp.	常见属
B	CXB-11	<i>Nigrospora</i> sp.	优势属
C	MXN-8	<i>Chaetomium</i> sp.	常见属
D	HCXL-16	<i>Alternaria</i> sp. 1	优势属
E	CXC-13	<i>Fusarium</i> sp.	稀有属
F	Y73-11	<i>Colletotrichum</i> sp.	优势属
G	HMC-7	<i>Alternaria</i> sp. 2	优势属
H	CXC-9	<i>Gibberella</i> sp.	稀有属

1.2 方法

1.2.1 内生真菌菌剂的制备: 将供试菌株在 PDA 培养基上培养 5 d 左右,于菌落边缘用直径 8 mm 的打孔器打孔做成菌饼。将菌饼移入装有 200 mL 灭菌 PD 培养液的三角瓶中,每个三角瓶接菌饼 5 块,置于 28 °C、150 r/min 的摇床上培养 8 d。检测生长状态并确定无污染后分离出菌丝球,将菌丝球捣碎,并用无菌生理盐水稀释至 100 mL,即为真菌菌剂。

1.2.2 内生真菌的接种: 试验采用大田实验,试验地位于云南省弥勒县的葡萄种植地东风农场,试验田的光照、管理和施肥均一致。处理时试验田划分为两个部分,除正常管理之外一部分喷施农药,另一部分未喷施农药,每部分均设置为 8 个菌剂的处理和对照。各个处理皆随机排列,每个菌株制剂的处理分 3 个重复,每个重复为一个小区的 5 株葡萄,为防止各组间的交互干扰,处理的相邻两株菌株间相隔一株葡萄。待葡萄抽枝发芽(3 月),将每种制备好的菌剂均匀涂抹在不同组玫瑰蜜葡萄叶片的正反面及其枝条上,每株涂抹约 200 mL,每天早上 9 点左右涂抹一次,共涂抹 3 次。实验组和对照组均要做好标记,对照组都喷施相同量的无菌水。若菌剂处理后 12 h 之内下雨,则需重新处理。

1.2.3 内生真菌的分离: 待葡萄成熟时采集实验组以及对照组的葡萄叶片进行内生真菌的分离纯化及鉴定,并采用分离率、优势度和多样性指数来衡量不同处理的葡萄叶中内生真菌的群落结构。

(1) 样品采集。于 2013 年 7 月 14 日进行样品的采集,每个处理分 3 个小区,从每个小区的 5 株葡萄中随机选取 3 株,每个植株采集其成熟健康叶 2 片,则每个处理采集 18 片叶。对照组也采集相同数量的叶片,将采集到的叶片分别放入灭菌的牛皮纸袋内,封口标记后 24 h 内送回实验室,4 °C 保存,3 日内处理完毕。

(2) 内生真菌的分离与纯化。将样品叶片剪成大约 2 cm×2 cm 的小片,在超净工作台上进行表面灭菌处理。先用 75%酒精浸泡灭菌 1 min,无菌水

洗 3—4 次,再用 0.1%升汞灭菌 30 s,无菌水洗 3—4 次。将灭菌后的组织块剪去与灭菌剂接触过的边缘部分,剩余部分剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,接种到 PDA 固体培养基上(培养基中加入青霉素 G 钠和硫酸链霉素各 80 μg/L 以抑制细菌生长),每皿贴 9 片组织,每个样品 5 个重复。置于 28 °C 温箱培养 4—10 d。待组织块长出明显菌落时,根据菌落形态、颜色等外部特征,挑取单个菌落边缘的菌丝做进一步的纯化,并采用 PDA 斜面试管保存。分离中取最后一次洗液涂布 PDA 培养基作为对照,按上述同样的方法培养,若没长任何菌,则说明表面消毒彻底,否则重新进行灭菌和分离。

1.2.4 内生真菌的鉴定: (1) 形态观察。采用经典的形态学方法进行内生真菌鉴定,通过观察菌落的颜色、菌落形态、菌丝生长速度、菌丝分枝、有无孢子、孢子的大小、形状、颜色和产孢结构类型等形态特征,将所有内生真菌做初步归类后留待分子鉴定。

(2) 系统发育学分析。将根据形态特征划分为同一类型的真菌,每个类型选择 1 个代表菌株,采用 CTAB 法^[13]提取内生真菌基因组 DNA,并采用通用引物 ITS4 和 ITS5 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:1 μL ITS5 (10 μmol/L)、1 μL ITS4 (10 μmol/L)、5 μL 10×PCR buffer、4 μL dNTPs、1 μL DNA 模板、0.3 μL *Taq* 酶(5U)、37.7 μL ddH₂O,总体积 50 μL。扩增程序:94 °C 4 min;94 °C 1 min,54 °C 1 min,72 °C 1 min,共 33 个循环;72 °C 3 min,4 °C 保存。PCR 产物送上海生工生物工程有限公司测序。将测序结果通过 Chromas 软件校对后,在 NCBI 的 GenBank 数据库中通过 BLAST 检索,下载相似度最高的序列作为参考序列,并通过 MEGA 5.0 软件构建系统发育树,通过置信度评估,将菌株鉴定到属。

1.2.5 统计分析方法: 采用分离率(Isolation rate)、优势度指数(Dominance index)、多样性指数(Diversity index) 3 个指标来衡量不同处理的葡萄叶中内生真菌群落的分布。

分离率指分离到的内生真菌菌株数占分离样品组织块总数的百分率,可以衡量植物组织中内生真菌的丰富程度和每个组织块受多重侵染的发生频率;Berger-parker 优势度指数($D_i=N_i/N$)表示一个种(属)在群落中的地位与作用,其中 N_i 为群落中属(或种)级真菌 i 的数量, N 为群落内各属(或种)级真菌菌株的数量之和;采用多样性指数(H')反映内生真菌种群优势度和均匀度的综合指标,根据 Shannon-Weiner 指数公式计算 $H'=-\sum P_i \ln P_i$, 其中 P_i 是指某种内生真菌的菌株数占全部内生真菌菌株数的百分数。

2 结果与分析

2.1 处理后玫瑰蜜叶片内生真菌的分布情况

从 16 个处理及两个对照的 720 块组织块中共分离到内生真菌 684 株。无论是处理组还是对照组未喷施农药的葡萄叶片内生真菌的分离率均高于喷施农药组,各个处理间内生真菌的分离率也表现出较明显的差异。对于未喷施农药组,其对照组内生真菌的分离率为 0.76,处理组内生真菌的分离率均高于对照组,其中经 *Alternaria* sp. 1 处理的其内生真菌的分离率最高,为 1.13,而经 *Fusarium* sp. 处理的分离率最低为 0.8,其余 6 个处理内生真菌分离率由大到小分别为 *Chaetomium* sp.>*Xylaria*

sp.>*Nigrospora* sp.=*Alternaria* sp. 2>*Gibberella* sp.>*Colletotrichum* sp.;对于喷施农药组,其对照组内生真菌的分离率为 0.62,处理组内生真菌分离率也均高于对照组的,和未喷施农药组相同,这组中也是 *Alternaria* sp. 1 的处理其内生真菌的分离率最高为 0.89,*Fusarium* sp.的处理最低为 0.62,和对照组相等,其余 6 个处理内生真菌分离率由大到小分别为 *Alternaria* sp. 2>*Nigrospora* sp.>*Colletotrichum* sp.>*Chaetomium* sp.=*Gibberella* sp.>*Xylaria* sp.。结果表明经内生真菌菌剂侵染后,玫瑰蜜葡萄叶片内生真菌分离率均有所上升(表 2)。

2.2 处理后玫瑰蜜葡萄叶片内生真菌的组成及优势度

将分离到的 684 株内生真菌经形态学和进一步的分子生物学方法鉴定归于 14 个属 25 个种,其中链格孢属 *Alternaria* 为玫瑰蜜葡萄的第一大优势属,黑孢霉属 *Nigrospora* 为玫瑰蜜葡萄的第二优势属。经 *Xylaria* sp.、*Nigrospora* sp.、*Alternaria* sp. 1、*Alternaria* sp. 2、*Colletotrichum* sp.五种菌剂的处理,在处理后的叶片中均分离到了处理种,且相比对照和其他处理其优势度明显增高。而 *Fusarium* sp.菌剂处理后的叶片中只分离到一到两株该处理种,*Chaetomium* sp.和 *Gibberella* sp.两种菌剂处理后的叶片中均没有分离到处理种(表 3)。

表 2 不同处理玫瑰蜜葡萄叶片内生真菌的分离率						
Table 2 Isolation rate of folia endophytic fungi of grape with different treatments						
实验组 Experimental group	未施农药组 Pesticide free			施农药组 Pesticide		
	菌株 Strains	组织块数 Tissue number	分离率 Isolation rate (%)	菌株 Strains	组织块数 Tissue number	分离率 Isolation rate (%)
A	47	45	1.04	31	45	0.69
B	44	45	0.98	36	45	0.80
C	48	45	1.07	33	45	0.73
D	51	45	1.13	40	45	0.89
E	36	45	0.80	28	45	0.62
F	38	45	0.84	35	45	0.78
G	44	45	0.98	37	45	0.82
H	41	45	0.91	33	45	0.73
对照 Control CK	34	45	0.76	28	45	0.62

属名 (species)		表 3 不同处理玫瑰蜜葡萄叶片内生真菌的组成及优势度														
		未施农药组 Pesticide free										施农药组 Pesticide				
		A	B	C	D	E	F	G	H	CK	A	B	C	D	E	F
<i>Alternaria</i> (6)		38.30	50.00	56.25	66.67	69.44	44.74	81.82	43.90	50.00	35.48	33.33	39.39	52.50	53.57	31.43
<i>Nigrospora</i> (3)		12.77	25.00	10.42	7.84	13.89	7.89	0	21.95	14.71	6.45	36.11	9.09	7.50	14.29	8.57
<i>Fusarium</i> (2)		0	0	0	0	8.33	0	0	0	0	0	0	0	0	3.57	0
<i>Acremonium</i> (1)		6.38	4.55	8.33	0	0	0	0	7.32	2.94	6.45	0	6.06	10.00	0	0
<i>Phomopsis</i> (1)		0	0	6.25	5.88	0	5.26	4.55	0	5.88	3.23	0	6.06	5.00	0	2.86
<i>Schizophyllum</i> (1)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.23	2.78	3.03	0	0	0
<i>Zygoascus</i> (1)		4.26	6.82	0	0	0	0	0	0	2.94	9.68	5.56	0	0	0	8.57
<i>Xylaria</i> (2)		17.02	0	0	0	0	2.63	2.27	0	0	16.13	2.78	0	0	3.57	0
<i>Pestalotiopsis</i> (1)		0	0	0	0	0	0	0	0	5.88	0	5.56	0	0	0	8.57
<i>Colletotrichum</i> (2)		8.51	6.82	4.17	9.80	2.78	28.95	0	14.63	0	9.68	5.56	15.15	10.00	0	34.29
<i>Chaetomium</i> (2)		0	0	0	0	0	0	6.82	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Curvularia</i> (1)		0	0	0	0	2.78	0	2.27	0	0	0	0	3.03	0	7.14	0
<i>Glomerella</i> (1)		4.26	6.82	10.42	3.92	0	2.63	0	7.32	5.88	6.45	2.78	15.15	10.00	14.29	5.71
<i>Cladosporium</i> (1)		4.26	0	0	1.96	0	5.26	0	4.88	11.76	3.23	5.56	0	2.50	0	0
Others		4.26	0	4.17	3.92	2.78	2.63	2.27	0	0	0	0	3.03	2.50	3.57	0
Total		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
The total number of genera		8	6	6	6	5	7	5	6	8	10	9	8	7	6	7

无论是否喷施农药,菌剂处理组和对照相比其内生真菌的组成和优势度都具有较明显的差异,其中 *Xylaria* sp. 菌剂处理分离到的内生真菌的种属数较其他处理稍高,但其优势属链格孢属的优势度比对照低,相反炭角菌属 *Xylaria* 的优势度比对照或其他处理明显增高;*Nigrospora* sp. 菌剂处理后分离到的黑孢霉属的优势度比对照或其他处理有较明显的增高,链格孢属的优势度和对照相比没有变化;*Alternaria* sp. 2 处理后链格孢属的优势度明显增高,高于对照和其他处理,而分离到的种属数最少,且在其他处理与对照中广泛分布的黑孢霉属在 *Alternaria* sp. 2 处理中并没分离到;*Fusarium* sp. 和 *Alternaria* sp. 1 处理后链格孢属的优势度比对照有较明显的增加,两种处理后分离到的种属数也较少;*Colletotrichum* sp. 处理后叶片内生真菌菌群结构有较明显改变,分离到的炭疽菌属 *Colletotrichum* 较其他处理和对照明显的增高;*Chaetomium* sp. 和 *Gibberella* sp. 两个菌剂处理后,其内生真菌的组成和优势度与对照相比均无明显变化(表 3)。

喷施农药与未喷施农药两实验组相比:各菌剂处理后分离到的内生真菌的种属数比对照均有所降低,而就同一菌剂处理喷农药组内生真菌的种属数要比未喷农药组稍高,但优势菌的优势度却有所降低(表 3)。

2.3 不同处理玫瑰蜜叶片内生真菌的多样性指数

对喷施农药与未喷施农药两个实验组的内生真菌多样性指数研究表明:就同一菌剂处理而言,喷施农药组内生真菌的多样性指数明显高于未喷施农药组(图 1)。

各种不同菌剂处理之间内生真菌的多样性指数也具有较明显的差异,除经 *Xylaria* sp. 处理的玫瑰蜜叶片内生真菌的多样性指数较对照稍高外,其余各处理内生真菌的多样性指数相比对照均有所下降,其中经 *Alternaria* sp. 1、*Alternaria* sp. 2 和 *Fusarium* sp. 三种菌剂处理的玫瑰蜜叶片内生真菌的多样性指数较其余处理降低更为明显(图 1)。

3 结论

再接种内生真菌改变了玫瑰蜜葡萄叶片内生真菌的群落结构和分布,增加了玫瑰蜜叶中内生真菌的数量和优势度,降低了内生真菌的多样性指数。喷施农药提高了内生真菌的多样性,但降低了内生真菌的分离率。

4 讨论

内生真菌主要有两种传播方式:一种为垂直传播,有些内生真菌不能产生有性孢子,通过菌丝生长进入子房和胚珠,并借助宿主种子传播;另一种为水平传播,这种内生真菌可产生孢子,是借助孢

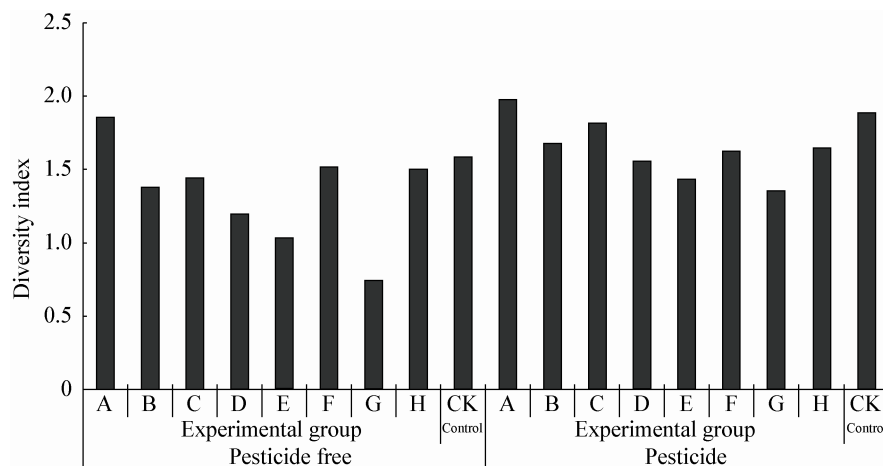


图 1 不同处理葡萄叶片内生真菌的多样性指数

Figure 1 Diversity index of grape folia endophytic fungi after different fungus re-inoculation

子或风、降水等途径进行传播^[14]。研究表明生活在木本植物组织中的非麦角类内生真菌是通过水平方式进行传播的,大量萌发的真菌繁殖体在叶片上附着聚集,然后通过表皮的渗透或通过气孔进入而感染植物^[15]。内生真菌也可以通过分解植物表皮细胞壁或通过各种自然孔口或伤口等进入植物进行传播^[16-17]。本研究中外环境条件不改变的情况下,采用喷洒或涂抹真菌菌剂法侵染葡萄叶片,通过反复侵染提高了葡萄叶片受侵染的几率,研究表明幼苗期对植株进行人工侵染的成功率要较在成熟期侵染的成功率高^[18],本研究在葡萄抽枝发芽时进行内生真菌的接种,在一定程度上也提高了侵染的成功率,结果使受菌剂处理的葡萄叶片内生真菌的分离率增高,因此将真菌孢子、菌丝液喷洒或涂抹在葡萄叶上的人工接种方法对于真菌在葡萄叶中的再内共生化是可行的。然而喷施与未喷施农药两个实验组葡萄叶片内生真菌分离率表现出明显的差异性,这可能是由于真菌侵染葡萄叶片的成功率与侵染次数和侵染时间有关,在侵染次数相同的情况下,侵染的时间越短,成功率越低,而在喷洒或涂抹菌剂后喷施农药缩短了真菌侵染时间,所以未喷施农药的葡萄叶片内生真菌的分离率要比喷施农药的高。

此外,在供试的 8 种内生真菌菌剂中,经 *Xylaria* sp.、*Nigrospora* sp.、*Alternaria* sp. 1、*Alternaria* sp. 2 和 *Colletotrichum* sp. 五种菌剂处理的叶片中分离到与处理种形态上相似的菌株,分子生物学方法鉴定其 ITS 序列与处理种相同,且该处理种的优势度明显高于对照和其他处理中该种的优势度,因此可以初步认为这 5 种菌剂接种成功。其余 4 种菌剂的处理在处理后的叶片中没有分离到处理株或只分离到少数几株。前期的研究表明,侵染较易成功的这 5 种菌剂在葡萄叶中属于优势菌或常见菌,可能是由于这些内生真菌与植物在长期进化过程中形成了比较互利的共生关系,更容易争取到营养和生长空间,进行大量繁殖。此外,不同植物内生真菌的种类和基因型是不相同的,而内

生真菌对宿主植物也具有选择性,真菌孢子吸附到寄主表面并被认识的过程是由真菌孢子表面多糖和寄主植物的调控所决定的^[19],所以不同内生真菌的基因型只有找到与之相适应的宿主植物才可以成功侵染。

国内外关于葡萄内生真菌多样性的研究报道较少,王增福等^[20]对酿酒葡萄内生真菌群落研究表明不同葡萄品种内生真菌的分离率不同,其中链格孢属、青霉属 *Penicillium* 和镰刀菌属 *Fusarium* 是其中的优势种群。作者前期对同一生境下的 9 个不同葡萄品种葡萄叶内生真菌的多样性研究结果表明,葡萄叶片内生真菌数量丰富,具有一定的宿主专一性,但多样性总体偏低,炭疽菌属和链格孢属为葡萄的优势属^[21]。本研究分离到的内生真菌中,链格孢属也是玫瑰蜜葡萄的第一大优势属。链格孢属作为植物内生真菌经常被分离到^[22],可能是由于链格孢属在葡萄叶片中比其他种属的真菌有更强的适应性,更容易在宿主植物中生长和传播。同样在本实验中经链格孢属的两个种 *Alternaria* sp. 1 和 *Alternaria* sp. 2 的菌剂侵染后,内生真菌的分离率较其他菌剂更高,链格孢属的优势性也更加明显,但侵染后的叶片中内生真菌的种类和多样性明显降低了。对分离到的链格孢属菌株进行显微观察,发现其菌丝体生长较快且极易产生分生孢子,这些特征有利于链格孢属真菌侵染葡萄叶。其余各菌剂处理也使葡萄叶内生真菌的分离率增加,但多样性有所降低。内生真菌剂的侵染使葡萄叶片内该种内生真菌的数量增多,可能会抢占其他内生真菌的生长空间和营养物质,对其他内生真菌产生拮抗作用,导致其他内生真菌的数量和种类下降,从而使侵染后葡萄叶片的内生真菌多样性下降。

植物内生真菌的丰富度及其多样性与不同的植物以及其生长环境有关,就同一地区同一种植物而言,虽然其内生真菌群基本相似,但不同年龄和不同组织上的内生真菌的丰度和分布明显不同^[23]。自然条件下葡萄叶内生真菌会随葡萄生长

发育时期的变化而变化, 本研究中接种不同内生真菌后葡萄叶内生真菌的组成、优势度及多样性的变化不同, 这可能与供试菌种的特性存在密切关系, 其中的作用机理还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Lu H, Zou WX, Weng JC, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*[J]. Plant Science, 2000, 151(1): 67-73.
- [2] Kulda G, Bacon C. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses[J]. Biological Control, 2008, 46(1): 57-71.
- [3] Marks S, Clay K. Physiological responses of *Festuca arundinacea* to fungal endophyte infection[J]. New Phytologist, 1996, 133(4): 727-733.
- [4] Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, et al. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 98(3): 267-270.
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxonal and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260: 214-216.
- [6] Strobel GA, Miller RV, Martinez-Miller C, et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*[J]. Microbiology, 1999, 145: 1919-1926.
- [7] 陈向东. 植物内生菌是有待深入开发的资源宝库[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 282.
- [8] 王坚, 刁治民, 徐广, 等. 植物内生菌的研究概况及其应用[J]. 青海草业, 2008, 17(1): 24-28.
- [9] Kummang N, Diehl SV, Smith BJ, et al. Muscadine grape berry rot diseases in Mississippi: disease epidemiology and crop reduction[J]. Plant Disease, 1996, 80(3): 244-247.
- [10] 张晓煜, 亢艳莉, 袁海燕, 等. 酿酒葡萄品质评价及其对气象条件的响应[J]. 生态学报, 2007, 27(2): 740-745.
- [11] 金蕊, 杨明攀, 刘飞虎. 回接内生真菌对工业大麻生理及农艺性状的影响[J]. 植物分类与资源学报, 2014, 36(1): 65-69.
- [12] 郑小嘎, 张修国, 张天宇, 等. 真菌菌剂改善烟叶品质的初步研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30(6): 10-12.
- [13] Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 20(1): 1-13.
- [14] Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont[J]. Ecology, 1988, 69: 2-9.
- [15] Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree[J]. PNAS, 2003, 100(26): 15649-15654.
- [16] Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum[J]. Mycological Research, 2005, 109(6): 661-686.
- [17] Hashiba T, Narisawa K. The development and endophytic nature of the fungus *Heteroconium chaetospora*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 252(2): 191-196.
- [18] Latches GCM, Christensen MJ. Artificial infection of grasses with endophytes[J]. Annals of Applied Biology, 1985, 107(1): 17-24.
- [19] Toti L, Viret O, Chapela IH, et al. Differential attachment by conidia of the endophyte, *Discula umbrinella* (Berk and Br) Morelet, to host and non-host surface[J]. New Phytologist, 1992, 121(3): 469-475.
- [20] 王增福, 林筱, 钱晓鸣, 等. 酿酒葡萄内生真菌群落及抗菌活性测定[J]. 厦门大学学报, 2010, 49(4): 564-569.
- [21] 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.
- [22] Guo LD, Xu L, Zheng WH, et al. Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS)[J]. Fungal Diversity, 2004, 16: 53-65.
- [23] Espinosa-Garcia FJ, Langenheim JH. The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population: diversity and spatial patterns[J]. New Phytologist, 1990, 116(1): 89-97.