

# 不同生境春季核桃内生真菌分离及其多样性

阿依佳玛丽·依玛尔, 刘泽星, 毛光瑞, 翟梅枝\*

(西北农林科技大学 林学院 核桃研究中心, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**以核桃(*Juglans regia*)的不同部位(根、1年生茎、2年生茎和干茎)为材料,采用组织分离法,对来自陕西山阳县、蓝田县与宜君县3个不同生境的材料进行内生真菌的分离鉴定、种群组成、定殖率、多样性指数等研究。结果显示,从576块组织块中共分离得到392株内生真菌,其中在2年生茎124株,1年生茎120株,干茎87株,根61株。392株内生真菌隶属于24个属,其中,3大优势类群为交链孢霉属(*Alternaria*)、花核菌属(*Anthina*)和茎叶核菌属(*Ectostroma*),分别占菌株总数的19.90%、9.69%和8.93%。交链孢霉属主要存在于2年生茎和干茎中,花核菌属和茎叶核菌属则主要存在于2年生茎中。核桃不同部位内生真菌多样性指数1年生茎的最高,为1.07;不同生境中,山阳核桃内生真菌的多样性指数最高,为1.30,说明春季核桃内生真菌具有丰富的多样性,是潜在的真菌资源库。

**关键词:**核桃; 不同生境; 内生真菌; 生物多样性

**中图分类号:**S718.81      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2016)06-0184-06

Isolation and Diversity of Endophytic Fungi from *Juglans regia* in Spring under Different Habitats

YIMAER · A-yi-jia-ma-li, LIU Ze-xing, MAO Guang-rui, ZHAI Mei-zhi\*

(Walnut Research Centre, College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Fungal endophytes of *Juglans regia* from different habitats and parts were isolated by tissue expanding method. The composition, diversity and preference of fungal endophytes were analyzed by the colonization frequency (CF), isolation rate (IR), isolation frequency (IF), and Shannon-Wiener biodiversity index ( $H'$ ). Totally, 392 fungal endophytes (61 strains in roots, 120 strains in 1-year-old twig, 124 strains in 2-year-old twig and 87 strains in scapus) were isolated and classified into 24 genera. Among them, *Alternaria* (19.90%), *Anthina* (9.69%), *Ectostroma* (8.93%) were the dominant genera. *Alternaria* mainly existed in 2-year-old twig and scapus. *Anthina* and *Ectostroma* existed in 2-year-old twig. Among different parts of the seedlings, the diversity of fungal endophytes was maximum in 1-year-old twig with Shannon-Wiener index 1.07, among different habitats, seedlings growing in Shanyang exhibited the highest number of fungal endophytes in spring with Shannon-Wiener index of 1.30, The results suggested that endophytic fungi from *J. regia* in spring were rich resources for use.

**Key words:** *Juglans regia*; different habitat; endophytic fungus; biodiversity

植物内生真菌分布广、种类多,具有丰富的生物多样性。且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<sup>[1-2]</sup>。在不同的生态环境下,植物内生真菌的种类、丰富度、群落分布也大不相同。生长在热带、亚热带生境的植物,其内生真菌的丰富度、多

样性要比生长在干燥、寒冷生境的植物高<sup>[3-6]</sup>。植物内生真菌的数量巨大,具有产生新天然产物的能力,甚至可以产生与宿主植物相同或相似的代谢产物,因而,植物的内生真菌是一个巨大的资源宝库,是天然产物的重要来源<sup>[7]</sup>。

核桃是重要的坚果和木本油料树种,具有很高的经济价值<sup>[8]</sup>。核桃中内生真菌具有多种生物活性<sup>[9-10]</sup>。但目前国内外对核桃内生真菌的研究及应用相对较少,本研究对陕西不同生境下春季核桃的内生真菌进行分离、鉴定、种群组成、遗传多样性、生态多样性等研究,旨在为筛选活性菌株,并进一步开发为生防工程菌用于有害生物防治等提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2014 年 3 月,从陕西不同生境的山阳县(109.521°E, 33.521°N; 海拔 761 m; 年降水量 709.0 mm, 属北亚热带向暖温带过渡的季风性半湿润山地气候)、蓝田县(109.357°E, 34.197°N; 海拔 678 m; 年降水量 720.4 mm, 属暖温带半湿润季风气候)、宜君县(109.034°E, 35.181°N; 海拔 1442 m; 年降水量 709.3 mm, 属大陆性温带湿润和半湿润气候)的核桃园分别选取生长健壮、树龄、长势和立地条件相似的核桃树进行采样,采样部位包括根、1 年生茎、2 年生茎和干茎。采样参照毛益婷<sup>[11]</sup>等方法。采集时,分别剪(切)取 30~50 cm 土层内粗度约 1 cm 的细根 10 cm; 1 年生幼嫩枝条和两年生枝条各 10 cm 左右;以及干茎 5 cm×5 cm。分别装入自封袋编号,带回实验室后保存于 4 °C 条件,12 h 内对样品进行处理。

### 1.2 核桃内生真菌的分离、纯化及保存

将冷藏的核桃不同部位各组织先用流水冲洗干净,再用 3% 双氧水消毒、漂洗 3 min,无菌水冲洗 3~5 次,无菌滤纸吸干表面水分。将根、1 年生茎和 2 年生茎切成 0.5 cm 小段,干茎切成 0.5 cm×0.5 cm 小块。之后,将消毒材料分别接种到孟加拉红培养基中,每培养皿接种 3 块,重复 3 次。在 28°C 恒温培养 3~5 d,观察组织块周围的菌落形态、颜色的差异以及菌丝形状等。采用菌丝末端分离法<sup>[12]</sup>,分别挑取不同菌落边缘菌丝转接于 PDA 培养基平板上进行纯化培养,观察记录菌落的形态。纯化后采用斜面保藏方法<sup>[13]</sup>置于 4°C 下保藏,定期检查。

### 1.3 核桃内生真菌的鉴定

1.3.1 菌株的形态学特征鉴定 采用真菌经典鉴定方法<sup>[14]</sup>,从纯化培养 20 d 的菌落上挑取菌丝并连同分生孢子制成装片,置于光学显微镜下观察真菌

特征(菌丝、有性或无性孢子、孢子着生状态等形态特征),根据《真菌鉴定手册》等<sup>[15]</sup>鉴定所分离获得内生真菌的分类地位。

1.3.2 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 灭菌离心管中,按照 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,并以此为模板,通过通用引物 ITS1 和 ITS4 对菌株 rDNA-ITS 区域进行扩增。PCR 反应体系(30 μL 体系): PCR mix 7.5 μL, ITS1 和 ITS4 各 1.2 μL, 模板 DNA 1.6 μL, 双蒸水补足 30 μL。PCR 扩增条件: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 40 s, 37°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶(DuRed 核酸染料)电泳检测,将扩增后的 DNA 交上海生工生物技术有限公司进行测序。测序获得的 ITS 序列通过 BLAST 比对,根据同源性相似度差异,采用 MEGA 5 邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树,对分离菌株与数据库中登录的近源菌株系统发育树关系进行分析<sup>[16-17]</sup>。

### 1.4 数据分析

采用分离率(isolation rate)、定殖率(colonization rate)、分离频率(relative frequency)、多样性指数(biodiversity index, H')以及相似性系数(similarity coefficient)分析核桃内生真菌的多样性及分布特性<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 核桃内生真菌未知菌株 DNA 序列鉴定和优势类群形态特征

2.1.1 未知菌株分子鉴定 依据内生真菌在培养基上生长特征,将未被鉴定的 4 株菌划分为 2 个形态型。通过 Neighbor-Joining (N-J) 法对核桃内生真菌进行分子系统学分析,得到的系统发育树。初步确定 LT12、LT15 为小穴壳属(*Dothiorella*, 图 1), LT13、LT14 为茎点霉属(*Phoma*, 图 2、图 3)。

2.1.2 优势类群形态特征 图 4、图 5 与图 6 分别为优势类群交链孢霉属(*Alternaria*)、花核菌属(*Anthina*)和茎叶核菌属(*Ectostroma*)。

### 2.2 核桃内生真菌的分布与菌群组成

2.2.1 内生真菌在核桃不同组织中的分布 从 576 块不同组织块中共分离获得 392 株内生真菌(表 1),其中 2 年生茎中最多(124 株),占总数 31.63%。1 年生茎中次之(120 株),占总数 30.61%。干茎中 87 株,占总数 22.19%。根中最少(61 株),占总数 15.56%。从不同生境看:来自山

阳的核桃根、1年生茎、2年生茎和干茎中共分离得到167株,分别为49、16、58、44株。蓝田核桃不同部位共分离得到85株,其中1年生茎最多,为35株,占总数41.18%;2年生茎次之,为25株,占总数29.41%;根和干茎中分别为8株和17株,分别占总数9.41%、20.00%。宜君核桃不同部位共分离得到140株,其中1年生茎中最多为69株,占总数49.29%;2年生茎次之,为41株,占总数29.29%;干茎26株,占总数18.57%;根中最少,仅4株,占总数2.86%。

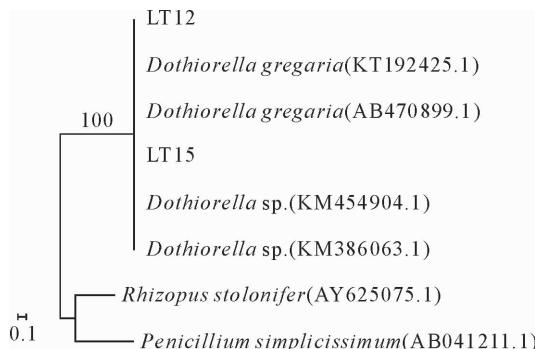


图1 基于ITS序列基础上的菌株LT12、LT15的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of LT12 and LT15 strain based on ITS sequence

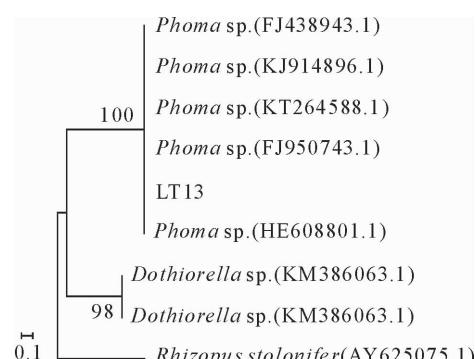


图2 基于ITS序列基础上的菌株LT13的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of LT13 strain based on ITS sequence

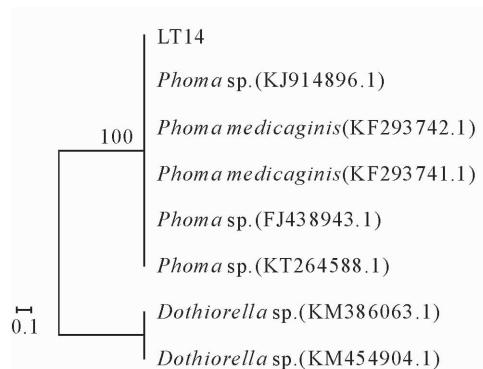


图3 基于ITS序列基础上的菌株LT14的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of LT14 strain based on ITS sequence

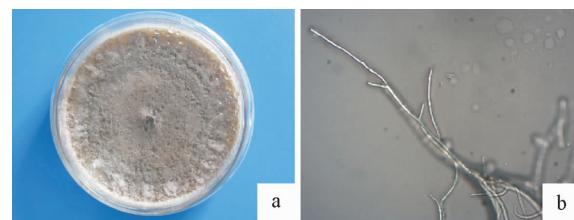


图4 交链孢霉属的形态学特征

Fig. 4 Morphological characteristics of *Alternaria*

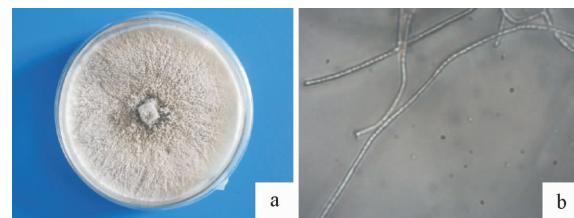


图5 花核菌属的形态学特征

Fig. 5 Morphological characteristics of *Anthina*

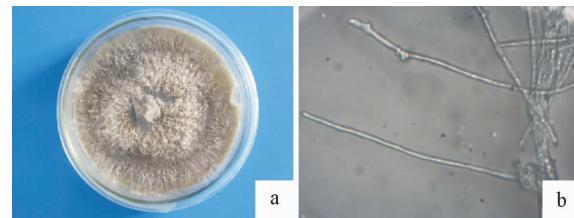


图6 茎叶核菌属的形态学特征

Fig. 6 Morphological characteristics of *Ectostroma*

不同部位内生真菌的分离率从高到低依次为2年生茎(86.11%)>1年生茎(83.33%)>干茎(60.42%)>根(42.36%)。定殖率则以1年生茎内生真菌的定殖率最高(79.17%),其余依次为2年生茎(72.92%)>干茎(67.36%)>根(45.14%)。无论从不同部位内生真菌的分布,还是从其分离率和定殖率来看,都说明春季核桃内生真菌分布以幼茎最多,定殖率和分离率也以幼茎最高;根中最少,干茎居中。

表1 春季核桃内生真菌的分离结果

Table 1 The separation result of endophytic fungi from

来源	根/株	一年生茎/株	两年生茎/株	干茎/株	合计/株
					山阳 蓝田 宜君 合计
山阳	49	16	58	44	167
蓝田	8	35	25	17	85
宜君	4	69	41	26	140
合计	61	120	124	87	392
定殖率/%	45.14	79.17	72.92	67.36	66.15
分离率/%	42.36	83.33	86.11	60.42	68.06

2.2.2 核桃内生真菌的菌群组成 对不同部位获得的392株内生真菌经进一步培养、观察和鉴定,分属于2纲5目6科24属(表2)。半知菌纲(Deu-

teromycetes) 为优势类群(361 株), 占总菌株数 92.09%; 丛梗孢目(Moniliales) 为优势类群(152 株), 占总菌株数 38.78%, 其次是无孢菌群(Mycelia Sterilia) 和黑盘孢目(Melanconiales), 分别占总菌株数 23.47% 和 15.31%; 在属的水平上看, 交链孢霉属(*Alternaria*)、花核菌属(*Anthina*) 和茎叶核

菌属(*Ectostroma*) 为 3 大优势类群, 分别占总菌株数 19.90%、9.70% 和 8.93%。交链孢霉属的分离率和分离频率最高, 分别为 13.54%、19.90% (表 2), 说明交链孢霉属在核桃内生真菌中的丰富度和多重侵染频率最高, 其次为花核菌属和茎叶核菌属。

表 2 春季核桃内生真菌的菌群组成

Table 2 The composition of endophytic fungi from *J. regia* in spring

纲	目	科	属	分离率/%	分离频率/%
半知菌纲 (Deuteromycetes)	丛梗孢目 (Moniliales)	丛梗孢科 (Moniliaceae)	峡串孢霉属 ( <i>Paepalopsis</i> )	0.35	0.51
			瓶梗青霉属 ( <i>Paceilomyces</i> )	0.70	1.02
		暗梗孢科 (Dematiaceae)	交链孢霉属 ( <i>Alternaria</i> )	13.54	19.90
			峡筒串孢霉属 ( <i>Prophytroma</i> )	2.95	4.34
			结实串孢霉属 ( <i>Hormiscium</i> )	0.70	1.02
			刺葡萄孢霉属 ( <i>Echinobotryum</i> )	2.78	4.08
			节轮枝单孢霉属 ( <i>Gonytrichum</i> )	0.17	0.26
			镰刀菌属 ( <i>Fusarium</i> )	5.21	7.65
	球壳孢目 (Sphaeropsidales)	球壳孢科 (Sphaeropsidaceae)	刺孢壳属 ( <i>Chaetomella</i> )	0.52	0.77
			壳小圆孢属 ( <i>Coniothyrium</i> )	4.86	7.14
			小穴壳属 ( <i>Dothiorella</i> )	3.30	4.85
			叶点菌属 ( <i>Phyllosticta</i> )	0.52	0.77
			刺茎点菌属 ( <i>Chaetophoma</i> )	0.35	0.51
			茎点菌属 ( <i>Phoma</i> )	0.35	0.51
	黑盘孢目 (Melanconiales)	黑盘孢科 (Melanconiaceae)	黑盘孢属 ( <i>Melanconium</i> )	5.73	8.42
			粘盘孢属 ( <i>Myxosporium</i> )	0.52	0.77
			痂圆孢属 ( <i>Sphaecloma</i> )	1.04	1.53
			炭疽菌属 ( <i>Colletotrichum</i> )	3.13	4.59
			丝核菌属 ( <i>Rhizoctonia</i> )	0.35	0.51
	无孢菌群 (Mycelia Sterilia)		小菌核菌属 ( <i>Sclerotium</i> )	0.70	1.02
			花核菌属 ( <i>Anthina</i> )	6.60	9.69
			束丝菌属 ( <i>Ozonium</i> )	2.26	3.32
			茎叶核菌属 ( <i>Ectostroma</i> )	6.08	8.93
子囊菌纲 (Ascomycetes)	酵母目 (Endomycetales)	酵母科 (Saccharomycetaceae)	酵母属 ( <i>Saccharomyces</i> )	5.38	7.91

### 2.3 春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 24 个属的内生真菌在核桃不同部位的分布、分离率和多样性指数有所不同(表 3)。结合表 1 可知, 核桃内生真菌主要存在于 2 年生茎和 1 年生茎中, 根中相对较少。核桃不同部位内生真菌类群组成和分离频率存在差异, 2 年生茎中的内生真菌分离频率最高, 为 31.63%; 1 年生茎次之, 为 30.61%; 其余依次为干茎(22.19%)>根(15.56%)。不同部位内生真菌的类群和分布也存在较大差异。根中镰刀菌属最多, 占菌株总数的 7.40%; 1 年生茎、干茎中都是以交链孢霉属最多, 分别占菌株总数的 6.12%、7.14%; 2 年生茎中花核菌属最多, 占菌株总数的 8.42%。有些菌属虽然分离频率很低, 但具有一定分布特异性。如, 刺孢壳属仅在核桃根中分离出来; 结实串孢霉属、小菌核菌属、刺茎点菌属仅在核桃 1 年生茎中的分离出来; 丝核菌属、节轮枝单孢霉属仅在核桃 2 年

生茎中分离出来; 痢圆孢属、叶点菌属、粘盘孢属和瓶梗青霉属仅在核桃干茎中分离出来。不同部位多样性指数存在差异, 1 年生茎的多样性指数最高为 1.07, 其余依次为 2 年生茎(0.96)>干茎(0.79)>根(0.44)。

2.3.2 不同生境核桃内生真菌的多样性 不同生境核桃内生真菌的分离频率存在差异(表 4), 分离频率依次为山阳(42.60%)>宜君(35.71%)>蓝田(20.66%)。不同生境条件下核桃内生真菌的类群、分布有所不同。山阳核桃内生真菌中以交链孢霉属和酵母属为优势类群, 分别占菌株总数的 22.75% 和 16.77%; 蓝田核桃内生真菌中交链孢霉属为优势类群, 占菌株总数的 18.52%; 宜君核桃内生真菌则以壳小圆孢属和黑盘孢属为优势类群, 均占菌株总数的 19.29%。但在不同生境中也分离到相同菌株, 如镰刀菌属、小穴壳属、交链孢霉属、炭疽菌属、茎叶核菌属、花核菌属等。不同生境核桃内生真菌的多样性也

各不相同。从山阳材料分离鉴定的 167 株内生真菌隶属于 14 个属; 蓝田材料分离鉴定的 85 株内生真菌隶属于 13 个属; 宜君材料分离鉴定的 140 株内生真菌隶属于 15 个属。山阳的多样性指数最高(1.30), 宜君次之(1.15), 蓝田的最低(0.84)。

**表 3 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 3 Composition, distribution, diversity and isolation frequency of endophytic fungi in different parts from *J. regia* seedlings

内生真菌	分离频率/%			
	根	干茎	1 年生茎	2 年生茎
峡串孢霉属 ( <i>Paepalopsis</i> )	—	1.15	—	0.81
瓶梗青霉属 ( <i>Paceilomyces</i> )	—	4.60	—	—
交链孢霉属 ( <i>Alternaria</i> )	—	32.18	20.00	20.97
峡简单孢霉属 ( <i>Prophytroma</i> )	—	—	14.17	—
结实串孢霉属 ( <i>Hormiscium</i> )	—	—	3.33	—
刺葡萄孢霉属 ( <i>Echinobotryum</i> )	—	18.39	—	—
节轮枝单孢霉属 ( <i>Gonytrichum</i> )	—	—	—	0.81
镰刀菌属 ( <i>Fusarium</i> )	47.54	—	1.64	—
刺孢壳属 ( <i>Chaetomella</i> )	4.92	—	—	—
壳小圆孢属 ( <i>Coniothyrium</i> )	—	10.34	12.50	3.23
小穴壳属 ( <i>Dothiorella</i> )	—	10.34	5.00	3.23
叶点菌属 ( <i>Phyllosticta</i> )	—	3.45	—	—
刺茎点菌属 ( <i>Chaetophoma</i> )	—	—	1.67	—
茎点菌属 ( <i>Phoma</i> )	—	—	0.83	0.81
黑盘孢属 ( <i>Melanconium</i> )	—	—	16.67	10.48
粘盘孢属 ( <i>Myxosporium</i> )	—	3.45	—	—
痂圆孢属 ( <i>Sphaeclooma</i> )	—	6.90	—	—
炭疽菌属 ( <i>Colletotrichum</i> )	1.64	5.75	0.83	8.87
丝核菌属 ( <i>Rhizoctonia</i> )	—	—	—	1.61
小菌核菌属 ( <i>Sclerotium</i> )	—	—	3.33	—
花核菌属 ( <i>Anthina</i> )	—	1.15	3.33	26.61
束丝菌属 ( <i>Ozonium</i> )	—	2.30	9.17	—
茎叶核菌属 ( <i>Ectostroma</i> )	—	—	5.83	22.58
酵母属 ( <i>Saccharomyces</i> )	45.90	—	2.50	—
多样性指数 $H'$	0.44	0.79	1.07	0.96

## 2.4 春季核桃内生真菌的相似性分析

2.4.1 不同部位核桃内生真菌的相似性 不同部位核桃内生真菌的相似性变化较大(表 5), 1 年生茎和 2 年生茎的内生真菌相似性系数最高(0.444 4), 根和干茎的内生真菌相似性系数最低(0.066 7)。根与其他部位的相似性系数普遍较低, 为极不相似, 体现出一定的组织差异性。除根以外, 1 年生茎与干茎、2 年生茎与干茎的内生真菌相似性系数均为中等程度不相似, 说明各个部位内生真菌类群有一定的差异性。

2.4.2 不同生境核桃内生真菌的相似性 通过计算比较相似性系数, 根据 Jaccard 相似性系数原理<sup>[19]</sup>发现, 不同生境核桃内生真菌相似性系数均在

0.250 0~0.500 0 之间, 不同生境优势类群各不相同(表 6)。

**表 4 不同生境春季核桃内生真菌菌群组成、分离频率和多样性指数**

Table 4 Composition, isolation frequency and diversity of endophytic fungi in different habitats from *J. regia* in spring

内生真菌	分离频率/%		
	山阳	蓝田	宜君
峡串孢霉属 ( <i>Paepalopsis</i> )	—	1.18	0.71
瓶梗青霉属 ( <i>Paceilomyces</i> )	—	4.71	—
交链孢霉属 ( <i>Alternaria</i> )	22.75	17.65	17.86
峡简单孢霉属 ( <i>Prophytroma</i> )	—	—	12.14
结实串孢霉属 ( <i>Hormiscium</i> )	2.40	—	—
刺葡萄孢霉属 ( <i>Echinobotryum</i> )	2.40	14.12	—
节轮枝单孢霉属 ( <i>Gonytrichum</i> )	—	—	0.71
镰刀菌属 ( <i>Fusarium</i> )	12.57	5.88	2.86
刺孢壳属 ( <i>Chaetomella</i> )	—	3.53	—
壳小圆孢属 ( <i>Coniothyrium</i> )	0.60	—	19.29
小穴壳属 ( <i>Dothiorella</i> )	1.80	8.24	6.43
叶点菌属 ( <i>Phyllosticta</i> )	1.80	—	—
刺茎点菌属 ( <i>Chaetophoma</i> )	—	—	1.43
茎点菌属 ( <i>Phoma</i> )	—	2.35	—
黑盘孢属 ( <i>Melanconium</i> )	—	7.06	19.29
粘盘孢属 ( <i>Myxosporium</i> )	1.80	—	—
痂圆孢属 ( <i>Sphaeclooma</i> )	3.59	—	—
炭疽菌属 ( <i>Colletotrichum</i> )	9.58	1.18	0.71
丝核菌属 ( <i>Rhizoctonia</i> )	—	—	1.43
小菌核菌属 ( <i>Sclerotium</i> )	—	—	2.86
花核菌属 ( <i>Anthina</i> )	10.78	7.06	10.00
束丝菌属 ( <i>Ozonium</i> )	0.60	14.12	—
茎叶核菌属 ( <i>Ectostroma</i> )	12.57	12.94	2.14
酵母属 ( <i>Saccharomyces</i> )	16.77	—	2.14
株数/株	167	85	140
属数/属	14	13	15
多样性指数 $H'$	1.30	0.84	1.15

**表 5 春季核桃不同部位内生真菌的相似性系数**

Table 5 The Sorenson coefficients (Cs) among different parts of *J. regia* plants in spring

样本	根	1 年生茎	2 年生茎	干茎
根	—	0.176 5	0.071 4	0.066 7
1 年生茎	—	—	0.444 4	0.285 7
2 年生茎	—	—	—	0.277 8
干茎	—	—	—	—

**表 6 不同生境春季核桃内生真菌相似性系数**

Table 6 The similarity coefficients of endophytic fungi among different habitats from *J. regia* in spring

采样地	山阳	蓝田	宜君
山阳	—	0.421 1	0.381 0
蓝田	—	—	0.400 0
宜君	—	—	—

### 3 结论与讨论

从陕西山阳县、蓝田县和宜君县春季核桃不同部位中分离获得392株内生真菌,其分布从高到低依次为2年生茎(124株)>1年生茎(120株)>干茎(87株)>根(61株)。地上组织部位获得的内生真菌数量远大于地下组织部位,可能是根与其他部位所处的环境不同造成的。同时,2年生茎和1年生茎分离得到的内生真菌数量相近,可能是两者相邻,给内生真菌提供的生长环境相似所致。这与其他一些植物中内生真菌分布、定殖率和分离率变化规律相似<sup>[20]</sup>。不同部位间相似性指数的变化说明了春季核桃内生真菌在不同部位分布和组成上的多样性<sup>[21]</sup>。

在实验室分离鉴定条件下,由于受到培养条件、环境、温度以及内生真菌自身对生长环境要求不同的影响,部分内生真菌无法生长,使得存在于核桃组织器官中的内生真菌无法全部分离出来,对完整评价核桃内生真菌的多样性有一定的影响。今后将在进一步研究中应用高通量基因测序技术获得内生真菌的更多信息,更好地全面阐明核桃内生真菌多样性。

获得的392株内生真菌归为24属,说明核桃内生真菌具有丰富的多样性。且在组织部位、生境上存在一定的专一性,与一些学者的研究结果一致<sup>[22]</sup>;其中,核桃1年生茎中获得的内生真菌的定殖率(79.17%)、多样性指数(1.07)均为最高,说明核桃1年生茎中内生真菌的多样性最为丰富。春季核桃内生真菌中交链孢霉属(19.90%)为第一优势类群,与之前报道的交链孢霉属为暖温带植物常见优势属的结论一致<sup>[23]</sup>。

### 参考文献:

- [1] STONE J K, BACON C E, WHITE J F Jr. An overview of endophytic microbes: endophytism defined [M]// WHITE B. Microbial endophytes. New York: Marcel Dekker, 2000: 3-29.
- [2] HOFFMAN M T, ARNOLD A E. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees [J]. Mycol Res., 2008, 112(3): 331-344.
- [3] SOUTHCOTT K A, JOHNSON J A. Isolation of endophytes from two species of palm from Bermuda [J]. Can. J. Microbiol., 1997, 43(8): 789-792.
- [4] FISHER P J, PETRINI O, PETRINI L E, et al. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from england, majorca and switzerland [J]. New Phytologist, 1994, 127 (1): 133-137.
- [5] CAO R H, LIU X G, GAO K X, 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.
- [6] ARNOLD A E, LUTZONI F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? [J]. Ecotology, 2007, 88(3): 541-549.
- [7] 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.
- [8] LI W J, QIAN Z Q, 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)
- [9] 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.
- [10] LI L, ZHAI M Z, 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)
- [11] 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.
- [12] WANG W, ZHAI M Z, XU W T, 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)
- [13] JIANG G Y, YANG B S, QIN Q Y, 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.
- [14] 毛益婷,代晓宇,马荣,不同生境下野生铁皮石斛内生真菌多样性的初步研究[J].新疆农业大学学报,2011,34 (3): 234-238.
- [15] MAO Y T, DAI X Y, MA R. A preliminary study on diversity of endophytic fungi from wild *Dendrobium of fuscum* under different habitats [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2011, 34 (3): 234-238. (in Chinese)
- [16] 方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998: 138-140.
- [17] 曾庆桂,颜日明,朱笃,等.羊蹄内生真菌的分离鉴定及其多样性分析[J].安徽农业科学,2008,36 (9): 3706-3708.
- [18] 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.
- [19] DU S K, CHEN S L, LIN D, et al. Diversity of endophytic fungi in leaves of *Ginkgo biloba* [J]. Mycosistema, 2009, 28 (4): 504-511. (in Chinese)
- [20] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979: 1-802.
- [21] 屈子睿,马养民,许倩,等.防风内生真菌DL02菌株次生代谢产物的结构与活性[J].西北林学院学报,2015,30(6): 217-221.
- [22] QV Z R, MA Y M, XV Q, et al. Structure and activity of secondary metabolites of endophytic fungus DL02 strain in *Saposhnikovia divaricata* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(6): 217-221. (in Chinese)

(下转第203页)

- (GAMs) [J]. *Acta Entomol. Sin.*, 2011, 54(11): 1312-1318. (in Chinese)
- [34] KNOPS J. M. H, TILMAN D, HADDAD N M, et al. Effects of plant species richness on invasion dynamics, disease outbreaks and insects abundance and diversity [J]. *Ecology Letters*, 1999(2): 286-293.
- [35] HADDAD N M, TILMAN D, HAARSTAD J, et al. Contrasting effects of plant richness and composition on insect communities: a field experiment [J]. *The American Naturalist*, 2001, 158: 17-35.
- [36] 唐志尧, 方精云, 张玲. 秦岭太白山木本植物物种多样性的梯度格局及环境解释[J]. 生物多样性, 2004, 12(1): 115-122  
TANG Z Y, FANG J Y, ZHANG L. Patterns of woody plant species diversity along environmental gradients on Mt. Taibai, Qinling Mountains [J]. *Biodiversity Science*, 2004, 12(1): 115-122. (in Chinese)
- [37] BARBIER S, GOSSELIN F, BALANDIER P. Influence of tree species on understory vegetation diversity and mechanisms involved-a critical review for temperate and boreal forests [J]. *Forest Ecol. Manag.*, 2008, 254(1): 1-15.
- [38] DODSON E, PETERSON D, HARROD R. Understory vegetation response to thinning and burning restoration treatments in dry conifer forests of the eastern Cascades, USA [J]. *Forest Ecol. Manag.*, 2008, 255(8): 3130-3140.
- [39] TAKI H, INOUE T, TANAKA H, et al. Responses of community structure, diversity, and abundance of understory plants and insect assemblages to thinning in plantations [J]. *Forest Ecol. Manag.*, 2010, 259(3): 607-613.
- [40] BRANSON D H. Reproduction and survival in *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera; Acrididae) in response to resource availability and population density: the role of exploitative competition [J]. *Canadian Entomologist*, 2003, 135(3): 415-426.

(上接第 189 页)

- [17] 豆青, 褚洪龙, 王海华, 等. 西北农林科技大学校园大型真菌资源与分布[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(6): 174-181.  
DOU Q, ZHU H L, WANG H H, et al. Resource and distribution of macrofungi in the campus of Northwest A&F University [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2015, 30(6): 174-181. (in Chinese)
- [18] 吴晓菡, 李文超, 秦路平. 天目山山胡椒不同部位内生真菌组成及多样性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(2): 107-113.  
WU X H, LI W C, QIN L P. Analyses on composition of endophytic fungi in different parts of *Lindera glauca* from Tianmu Mountain [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2012, 21(2): 107-113. (in Chinese)
- [19] 马克平. 生物群落多样性[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 141-165.
- [20] KUMAR D. S. S, HYDE K. D. Biodiversity and tissue recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii* [J]. *Fungal Diversity*, 2004, 17(1): 69-90.
- [21] 刘爱荣, 张洋, 牛丽红, 等. 海南两种红树林植物内生真菌的多样性分析[J]. 广西植物, 2010, 30(5): 657-660.  
LIU A R, ZHANG Y, NIU L H, et al. Analysis of diversity of endophytic fungi in two mangrove plants in Hainan Province (*Rhizophora stylosa* and *Kandelia candel*) [J]. *Guizhou University*, 2010, 30(5): 657-660. (in Chinese)
- [22] 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.  
HU K X, HOU X Q, GUO S X. Distribution of endophytic fungi in *Dendrobium officinale* [J]. *Microbiology China*, 2010, 37(1): 37-42. (in Chinese)
- [23] 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.  
BAI Z Y, WANG X W, 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)