

红果型沙地云杉内生真菌多样性

任 燕,姜海燕*,爱 华

(内蒙古农业大学 林学院,内蒙古 呼和浩特 010019)

摘 要:了解沙地云杉植物内生真菌生态多样性,为沙地云杉内生真菌的种属鉴别和资源的开发利用提供科学的依据,并为下一步深入研究内生真菌代谢产物提供理论基础。对内蒙古自治区克什克腾旗白音敖包自然保护区的沙地云杉进行调查,采用组织分离法对沙地云杉的不同组织部位进行内生真菌分离,以形态学和分子生物学相结合的方法进行鉴定,选取其中 60 株进行扩增、测序和系统发育分析。从系统发育树可见,菌株聚为 2 个大分支,分别为子囊菌亚门和半知菌亚门,10 个小分支对应 7 个科分属于 10 个属 12 种,其中链格孢属(*Alternaria*)与青霉属(*Penicillium*)为优势菌属,红果型沙地云杉内生真菌菌种资源较丰富。

关键词:沙地云杉;内生真菌;多样性;系统发育

中图分类号:S763.15

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2018)06-0180-08

Endophytic Fungus Diversity of Red Fruit Type Pice Mongolica

REN Yan,JIANG Hai-yan*,AI Hua

(Forestry Institute of Inner Mongolia Agricultural University,Hohhot,Inner Mongolia 010019,China)

Abstract: The objectives of this study were to understand the ecological diversity of the endophytic fungi in sandy spruce plants, to provide a scientific basis for the species identification and exploitation and utilization of endophytic fungi in sandy spruce, and to provide a theoretical basis for further study of endophytic fungal metabolites. An on-site investigation was carried out on the spruce occurring in sandy land in Baiyinobo Nature Reserve, Keshiketeng Banner, Inner Mongolia. Endophytic fungi were isolated from different tissues of *Picea mongolica*. Morphology and molecular biology of 60 strains were selected for amplification, sequencing and phylogenetic analysis. It was found from the phylogenetic tree that the strains were clustered into two major branches: Ascomycota and Candida albacares, respectively. There were seven branches belonging to 10 genera and 10 species belonging to 12 genera, of which *Alternaria* and *Penicillium* were the dominant genus. Red sandy spruce was rich in the resources of endophyte fungi species.

Key words: *Picea mongolica*; endophytic fungi; diversity; phylogeny

被称为沙漠上的绿宝石和生物化石的沙地云杉(*Picea mongolica*)是松科、云杉属常绿针叶乔木,是中国珍稀树种^[1]。目前全球只有十几万亩,成片集中在内蒙古自治区。由于其具有耐低温、耐干旱、耐贫瘠的特点,对防风固沙、改造风沙区的生态环境具有重要的作用,因此具有很高的开发利用价值。植物内生菌是指那些其生活史的特定阶段或全部阶段寄生在植物组织内,而不对植物产生有害症

状的微生物,包括那些生活史中的特定阶段生活在植物表面的内生菌和潜伏性病原菌;而不包括菌根菌^[2]。此定义被研究者们广泛接受。

植物体内普遍存在着内生真菌,在漫长的进化过程中内生真菌与寄主形成了良好的共生互惠关系^[3-4],它可以产生多种生物学作用,能够促进植物快速生长。增强植物抗逆、抗病害、抗动物危害的能力。因此引起了学者的广泛关注^[4-5]成为了国内外

收稿日期:2018-01-29 修回日期:2018-03-14

作者简介:任 燕,女,硕士,研究方向:森林病理学。E-mail:1299772926@qq.com

*通信作者:姜海燕,女,博士,副教授,研究方向:森林病理学。E-mail:jhydlm@126.com

一直研究的热点。本研究通过形态学结合分子鉴定的方法对内生真菌种群进行分类地位,确定红果型沙地云杉植物具有优势的内生真菌,了解其物种多样性,为下一步深入研究内生真菌代谢产物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 对克什克腾旗白音敖包自然保护区红果型沙地云杉进行调查。采集标本时应选择树体健壮,无病虫害沙地云杉的球果、针叶、枝条、根、树皮组织。采集标本时按树冠的上、中、下 3 部分取样。

1.2 培养基制备

PDA 培养基:马铃薯 200 g,切成小块,加水 1 000 mL 煮沸 30 min,除去马铃薯块,将滤液定容至 1 000 mL,加葡萄糖 20 g,琼脂 16 g,121℃ 灭菌 20 min,制成 PDA 平板培养基。

1.3 内生真菌的分离与纯化

将针叶、树皮、根、枝条和球果等样品用无菌水冲洗干净,严格按照以下程序进行表面消毒:75%酒精消毒 30 s,然后用 1% 的升汞溶液处理 3 min,最后用无菌水冲洗 3 遍。在超静台中将上述标本剪成大小为 0.5 cm×0.5 cm 的小块。将剪好的标本接在 PDA 平板培养基上,在 28℃ 霉菌培养箱中培养,观察菌落生长情况及感染情况,培养 7~10 d 后。用 0.5 cm×0.5 cm 的打孔器,将菌落边缘生长旺盛的菌丝接种到新鲜 PDA 培养基上;将转移好的 PDA 培养基在 26℃ 霉菌培养箱中培养,依此法,纯化 3~4 次观察无杂菌以保证所得菌落为纯菌种。

本试验采用漂洗液检验法对消毒效果进行验证^[6]。将最后一次冲洗组织材料的无菌水涂抹于 PDA 平板上作为对照。

1.4 沙地云杉内生真菌分类鉴定

1.4.1 菌株形态学鉴定 挑取菌丝制成玻片,置于光学显微镜下观察菌丝、孢子梗和孢子的形态,结合菌落形态、颜色、质地,按照《真菌鉴定手册》^[7]和《中国真菌志》^[8]初步确定真菌所属类别。

1.4.2 菌株的分子鉴定 取 200~500 mg 菌丝于 1.5 mL EP 管内,按照 taingenDNA 提取试剂盒严格按照说明书的步骤提取内生真菌 DNA。按照表 1 所示反应体系,以 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 反应,95℃ 变性 3 min→95℃、30 s→56℃、20 s→72℃、1 min,35 个循环扩增,最后 72℃ 延伸 10 min 扩增。对 PCR 反应产物利用 1% 的凝胶在 160V 下电泳 30 min,根据 Marker 判断是否在 500~650 bp。对

于成功扩增目的片段的样品送交北京博迈德生物技术有限公司进行电泳切胶纯化测序。

表 1 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system table

物质名称	加入量/ μL
2xpcrmix	12.5
IST1	1.25
ITS4	1.25
DNA	1.25
超纯水	8.75
总量	25.0

获得序列后,首先将基因序列在 NCBI 中进行 BLAST 比对,下载得分高的序列,每个属选择 1~2 个具有代表性的菌株序列进行同源性比对,其次利用 ClustalX 软件进行序列的多重比对,最后使用 MEGA7.0 软件 Neighbor-Joining(N-J)方法构建系统发育树,将内生真菌鉴定到属或种^[9]。

2 结果与分析

2.1 表面消毒验证

观察空白对照,平板上无菌丝生长则证明表面消毒彻底,即能确保分离得到的菌是植物内生菌而不是杂菌。

2.2 红果型沙地云杉不同部位内生真菌的分离结果

从红果型沙地云杉的不同部位分离得到 229 株,经菌落形态和显微结构观察,筛选出不同形态的 60 株内生真菌(表 2),其中由枝条中分离得到 26 株,分离率为 43.3%,比例最高。在根、皮中分离得到各 5 株,占红果型沙地云杉内生真菌的总数的 8.3%;从球果中分离得到 8 株内生真菌,占总菌株数的 13.3%;在针叶中分离得到 16 株,分离率为 26.7%,可以得到在红果型沙地云杉的不同部位枝条的分离率最高。

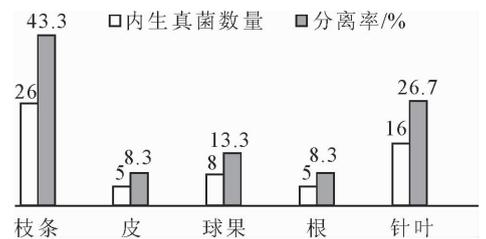


图 1 红果型沙地云杉不同部位内生真菌分离率

Fig. 1 The number and isolation rate of endophytic fungi in different parts of the red fruit of *Picea mongolica*

2.3 红果型沙地云杉不同部位内生真菌的种群分布

利用组织分离法初步鉴定了红果型沙地云杉不同部位内生真菌的种类和分布,结果见表 2。从红果型沙地云杉针叶部树冠上层共分离出 5 个属,6

株内生真菌,中层为 4 个属,6 株内生真菌,下层为 3 个属,4 株内生真菌;从枝部树冠上层共分离出 3 个属,7 株内生真菌,中部 8 株内生真菌,3 个属。下层为 11 株内生真菌,5 个属;从红果型沙地云杉的根部共分离共分离出 2 个属,5 株内生真菌;果实中共分离出中层为 3 个属,8 株内生真菌;从皮上分离出 5 株内生真菌 2 个属。从整体来看,各层次内生真菌种群和数量的变化呈一定的规律性,即下层 > 中层 > 上层,因为下层先于上层长出,生长的时间

比上层长,故下层积累的内生真菌数量多,其内生真菌的生物多样性也越丰富。

2.4 菌株的形态学特征

观察红果型沙地云杉内生真菌菌落发现,大部分菌株生长速度较快,少数菌株生长速度较慢,大多数菌落为圆形、近圆形,边缘平展,少数菌株菌落质地较硬,中心有小突起或有辐射状裂纹;颜色多为深蓝色,灰绿色、灰黑色少数为粉红色、淡黄色等。表 3 显示了各菌株的菌落形态特征。

表 2 红果型沙地云杉不同部位内生真菌的种群分布

Table 2 Distribution of endophytic fungi in different parts of *P. mongolica*

菌种名称	枝/株			叶/株			果/株	根/株	皮/株
	上	中	下	上	中	下			
链格孢属	4	4	6	2	1	1	4	0	4
青霉属	0	0	1	0	2	2	3	4	1
叶点霉属	0	0	0	0	0	0	0	0	0
茎点霉属	0	2	2	0	0	0	0	1	0
曲霉属	0	0	1	1	0	0	0	0	0
黑附球菌	2	2	1	0	0	0	0	0	0
镰刀属	1	0	0	1	0	0	0	0	0
枝孢属	0	0	0	0	2	1	1	0	0
弯孢属	0	0	0	1	0	0	0	0	0
光黑壳属	0	0	0	1	1	0	0	0	0

表 3 内生真菌及孢子形态特征

Table 3 Endophytic fungi and spore morphological characteristics

编号	菌落颜色	菌落质地	菌落形状	孢子形态	孢子大小
24	灰绿色	棉絮状	有小突起,背面中间蓝色	球形、卵圆形	5.21×2.87
25	灰绿色	棉絮状	环形突起,背面黑蓝色	圆形、卵圆形	4.58×3.25
26	桔黄色	棉絮状	中间突出,背面红褐色	念珠状成串	15.65×3.15
27	灰白色	厚绒状	环纹,中间凹陷,背面棕黑色	圆形、卵圆形	4.55×2.84
28	桔红色	棉絮状	中间点状小突起,背面红褐色	圆形成串	11.82×2.78
29	灰绿色	厚绒状	大部分突起,背面边缘淡黄色	球形、椭圆形	27.7×3.45
30	灰色	绒毛状	背面边缘黑色,中心黑蓝色	圆形、卵圆形	11.29×5.83
31	灰绿色	毛绒状	中间凹陷,背面灰蓝色	圆形、卵圆形	8.24×4.99
32	灰黑色	毛毡状	平展,背面黑蓝色	梨形,倒棒状	4.13×2.16
33	灰黑色	厚绒状	平展,背面黑色	梨形,倒棒状	4.97×2.03
34	灰白色	棉絮状	中间凹陷,背面深棕色	梨形,倒棒状	8.49×4.98
35	灰色	绒状	平展,背面灰黑色	卵圆形	7.12×7.02
36	黑白相间	毛毡状	背面黑灰色	梨形、卵圆形	9.48×3.61
37	粉红色	毛绒状	边缘淡黄色,中间紫色	近球形	4.79×2.84
38	灰色	棉絮状	平展,背面黑蓝色	梭形	5.36×2.8
39	黑白相间	棉絮状	轮纹状,黑棕色	梭形,卵圆形	7.67×3.13
40	灰绿色	棉絮状	背面黑棕色	梭形,卵圆形	6.21×4.51
41	灰色	厚绒状	平展,背面棕色	梭形,卵圆形	8.43×4.87
42	灰白相间	毛毡状	平展,背面黑蓝色	梭形,卵圆形	7.93×2.61
43	灰绿色和白色相间	毛毡状	平展,背面棕色	圆形,卵圆形	5.89×3.08
44	灰白色	厚绒状	平展,背面黑蓝色	圆形、椭圆形	5.23×3.13
45	灰色	毛毡状	同心圆状,背面黑蓝色	卵圆形、梭形	6.03×2.63
46	灰色	毛毡状	平展,背面深棕色	卵圆形、梨形	4.51×2.13

续表 3

编号	菌落颜色	菌落质地	菌落形状	孢子形态	孢子大小
47	黑色	毛毡状	平展,背面棕黑色	梭形,卵圆形	5.24×2.78
48	灰黑色	毛毡状	平展,背面黑棕色	梭形卵圆形	7.38×5.16
49	灰黑色	厚绒状	中间凹陷且灰色,背面黑色	梭形、卵圆形	9.07×3.35
50	黑色	颗粒状	致密,背面淡黄色	球形	2.78×1.67
51	黄色	毛毡状	有小突起,背面边缘桔黄色	念珠状的链	18.79×3.52
62	棕色	粉状	背面浅黄色	球形、卵圆形	2.78×1.39
71	棕色	颗粒状	致密,背面浅棕色	球形	6.93×4.3
85	灰白色	棉絮状	平展,背面黑蓝色	球形、卵圆形	4.63×2.67
87	灰色黑色	绒状	背面黑棕色	梭形、卵圆形	8.92×4.77
90	棕色	棉絮状	背面黑色	梭形、卵圆形	6.67×4.24
94	绿色	粉状	平展、致密背面淡黄色	球形	8.07×5.53
97	红棕色	丝绒状	致密,淡褐或暗褐色至酱色	球形、近球形	20.24×10.6
101	绿色	粉状	背面桔黄色	球形、卵圆形	2.13×1.61
105	桔黄色	棉絮状	背面边缘桔色,中间红棕色	念珠状成串	9.85×7.57
107	白色	棉絮状	背面边缘浅棕色,中间深棕色	球形	2.45×1.34
115	灰色、白色	厚绒状	中间稍凹陷,背面黑棕色	球形、卵圆形	4.79×2.62
117	灰色	厚绒状	平展、背面黑蓝色	圆形、椭圆形	5.24×3.12
120	灰色	棉絮状	背面边缘棕色中间黑蓝色	梭形、棍棒形	6.41×4.07
127	绿色,边缘白色	粉末状	圆形簇状,背面淡黄色	球形、卵圆形	2.11×1.67
150	白色与桔红色相间	厚绒状	中间突出,背面红褐色	念珠状成串	9.33×7.7
151	灰褐色	厚绒状	中央隆起,背面深蓝色	圆形、纺锤形	6.5×3.04
152	绿色	粉状	背面淡黄色	球形、卵圆形	1.61×1.49
153	白色	棉絮状	球形成簇,背面淡黄色	球形	3.56×2.43
154	黑白相间	棉絮状	背面黑蓝色	梭形、卵圆形	6.74×3.85
156	绿色	粉末状	背面淡黄色	球形、卵圆形	1.86×1.27
157	灰色	棉絮状	背面黑蓝色	梨形、肾形	6.56×3.37
158	白色	棉絮状	背面边缘白色,中间浅棕色	球形	1.89×1.33
159	灰色	棉絮状	致密、背面黑棕色	梨形、肾形	9.6×5.1
160	青色	绒毛状	背面桔红色	球形	3.46×2.11
161	灰色	毛毡状	有黑色小颗粒,背面黑蓝色	成串的念珠状	19.1×4.3
167	灰白色	绒毛状	辐射状褶皱背面黑蓝色	成链的念珠状	8.84×5.33
178	黑色	毛毡状	有突起,背面红棕色	梭形、卵圆形	3.38×1.29
177	白绿相间	厚绒状	圆球状成簇背面桔红色	球形、卵圆形	8.07×5.53
188	灰白色	棉絮状	背面黑蓝色	梨形、肾形	4.72×1.89
191	灰色	绒毛状	背面黑蓝色	无孢子	无
193	绿色,边缘白色	粉末状	圆形簇状,背面淡黄色	球形	1.51×1.36
194	灰色	少绒	背面深蓝色	圆形成串	20.9×1.48

2.5 分子生物学鉴定

2.5.1 DNA 序列比对 以供试菌株的菌丝为模板,利用真菌通用引物 *its1* 和 *its4* 进行 PCR 扩增,结束后进行电泳检测,得到的 PCR 扩增产物情况良好,清晰明亮,条带单一,将 PCR 产物直接送到北京博迈德基因测序,将测序得到的序列在 GenBank 数据库进行比对,结果见表 4。

2.5.2 系统发育树分析 利用 MEGA7.1 中的 *Nesighbor-joining* 程序构建系统发育树,根据菌株形态学特征与基因组序列分析结果,同时对系统发育树进行分析(图 2、图 3)。从系统发育树可见,菌株聚为 2 个大分支,分别为子囊菌亚门和半知菌亚

门,10 个小分支对应 7 个科分属于 10 属,12 个种。

由图 2 可见,菌株在 NJ 树上聚为 2 大分支, *sdys25*、*sdys27*、*sdys48*、*sdys47*、*sdys49*、*sdys178*、*sdys35*、*sdys26*、*sdys28*、*sdys161*、*sdys157*、*sdys188* 在同一个大分支,属于半知菌亚门。*sdys97*、*sdys95*、*sdys34* 构成另一个大分支,属于子囊菌亚门。第 1 个小分支为黑霉科 *Dematiaceae*,其中菌株 *dys25*、*sdys27*、*sdys48*、*sdys47*、*sdys49*、*sdys178*、*sdys35* 聚为一类,支持率为 99%,隶属于链格孢属;在另一个分支中,*sdys26*、*sdys28* 聚为一类,与杯霉科 *Discellaceae* 的亲缘关系较近,且支持率为 99%,是黑附球属;在第 3 个小分支中,菌株 *sdys161* 与登

录号序列登录号为 KT192342、KP117265 聚为一类,同源关系为 99%,表明 sdys161 为 Pezizaceae 盘菌科的绳光黑壳属,支持率在 99%;在第 4 个小分支中,菌株 sdys157 与 sdys188 与枝孢属 *Cladosporium* 聚为一类;在第 5 个小分支中菌株 sdys97 与

序列登录号 KP281437、HQ315849 聚为一类,同源率高达 99%,表明该菌株为杯霉科 *Aspergillus niveus* 的 *Aspergillus sydowi* 聚多曲霉;菌株 sdys95、sdys34 以高达 99%支持率与 *Penicillium* 相聚,说明这 2 株菌株是 *Penicillium* 的同源或同一种。

表 4 红果型沙地云杉内生真菌菌株序列在 GenBank 数据库比对结果

Table 4 The matching results in GenBank of strains sequence of Inner Mongolia *Picea* endophytic fungi

菌株编号	同源性最高的序列	NCBI 编号	最大相似性/%
SDYS24	<i>Penicillium rubens</i> genomic	LT558871	99
SDYS25	<i>Alternaria alternata</i> isolate aa001	KX858844	99
SDYS26	<i>Epicoccum nigrum</i> voucher G16	KY315938	100
SDYS27	<i>Alternaria alternata</i> strain FL7-PL4	KP900243	100
SDYS28	<i>Epicoccum nigrum</i> isolate F04-02	KX664321	100
SDYS30	<i>Alternaria alternata</i> isolate C-10	KJ526174	99
SDYS34	<i>Penicillium chrysogenum</i> isolate BP2T3	JF7311255	99
SDYS35	<i>Alternaria</i> sp. isolate C11	KX061185	99
SDYS39	<i>Alternaria tenuissima</i> isolate At2	KC337035	99
SDYS40	<i>Alternaria alternata</i> strain HTF6	MG025883	99
SDYS41	<i>Alternaria alternata</i> isolate MC-4-L	KU527784	99
SDYS42	<i>Alternaria alternata</i> isolate C-10	KJ526174	99
SDYS43	<i>Alternaria tenuissima</i> isolate At8	KC337040	99
SDYS44	<i>Phoma</i> sp. ZBRO-2013	KF367493	99
SDYS47	<i>Alternaria tenuissima</i> isolate ZB11060981	KX783385	99
SDYS48	<i>Alternaria tenuissima</i> isolate ZB11060981	KX783385	99
SDYS49	<i>Alternaria tenuissima</i> isolate ZB11060981	KX783385	99
SDYS51	<i>Alternaria alternata</i> strain HTF76	MG025883	99
SDYS62	<i>Penicillium</i> sp. KJ-202 strain	JQ965023	99
SDYS72	<i>Fusarium tricinctum</i> strain Z5	EF611092	99
SDYS85	<i>Penicillium rubens</i> genomic DNA	LT558868	99
SDYS94	<i>Penicillium canescens</i> strain CS3E4	KR135137	99
SDYS95	<i>Penicillium thomii</i> isolate song-40	EU910586	97
SDYS97	<i>Aspergillus sydowii</i> strain N-1	KP281437	100
SDYS117	<i>Phoma fungicola</i> strain H7-B01	KF293780	99
SDYS120	<i>Alternaria tenuissima</i> isolate At8	KC337040	99
SDYS151	<i>Curvularia aerea</i> isolate SRMC-MYCO7	KY806412	99
SDYS157	<i>Cladosporium herbarum</i> isolate F02-02	KX664311	99
SDYS161	<i>Preussia intermedia</i> strain 1-00015-1	KT192342	99
SDYS167	<i>Stachybotrys chartarum</i> strain UAMH 7900	AF081469	99
SDYS177	<i>Penicillium canescens</i> strain 3S	KY458474	99
SDYS178	<i>Alternaria tenuissima</i> isolate ZB11060981	KX783385	99
SDYS188	<i>Cadosporium herbarm</i> 18S ribosomal RNA gene	KU182498	99

由系统发育树(图 3)可见,菌株在 NJ 树上聚为 2 大分支,第 1 大分支半知菌亚门:sdys41、sdys51、sdys40、sdys120、sdys39、sdys43、sdys30、sdys49、sdys42、sdys151、sdys117、sdys19、sdys72、sdys167; Sdys177、sdys94、sdys62、sdys85、sdys24 构成另一个大分支,属于子囊菌亚门。在第 1 个小分支中,菌株 sdys41、sdys51、sdys40、sdys120、sdys39、sdys43、sdys30、sdys49、sdys42 以 100%的支持率与 *Alternaria* 聚为一类,说明与该属真菌亲缘关系较近;经过分析,该分支归于黑霉科 Dematiaceae 的链格孢

的 *Alternaria alternata* 和 *Alternaria tenuissima*; 另一个小分支中, sdys151 菌株与登录号为 KU5277841 和 KP131937 聚为一类,同源关系为 100%表明 sdys151 为暗丛梗孢科 *Moniliaceae* 的弯孢霉属 *Curvularia aerea*; 在第 3 个小分支中 sdys19、sdys117 以高达 100 的支持率与 *Phoma* 属聚为一类; 在第 4 个小分菌株 sdys72 与登录号为 EF611092 和 KX099672 相聚,支持率在 100%隶属于镰刀霉属 *Fusarium*; 第 5 个小分支归于杯霉科 *Discellaceae*, 其中菌株 sdys167 与序列登录号

KC305356、AF081469 聚为一类,同源率高达 100%,表明该菌株为葡萄穗霉属 *Stachybotrys-atra*;第 6 个小分支中 sdys94、sdys177、sdys62、sdys24、sdys85 与 *Penicillium* sp. 聚为一类,且同

源率高达 100%,说明这些菌株与该属种真菌亲缘关系很近,可鉴定到种,分别是变灰青霉菌 *Penicillium canescens*、鲁本斯青霉菌 *Penicillium rubens*。

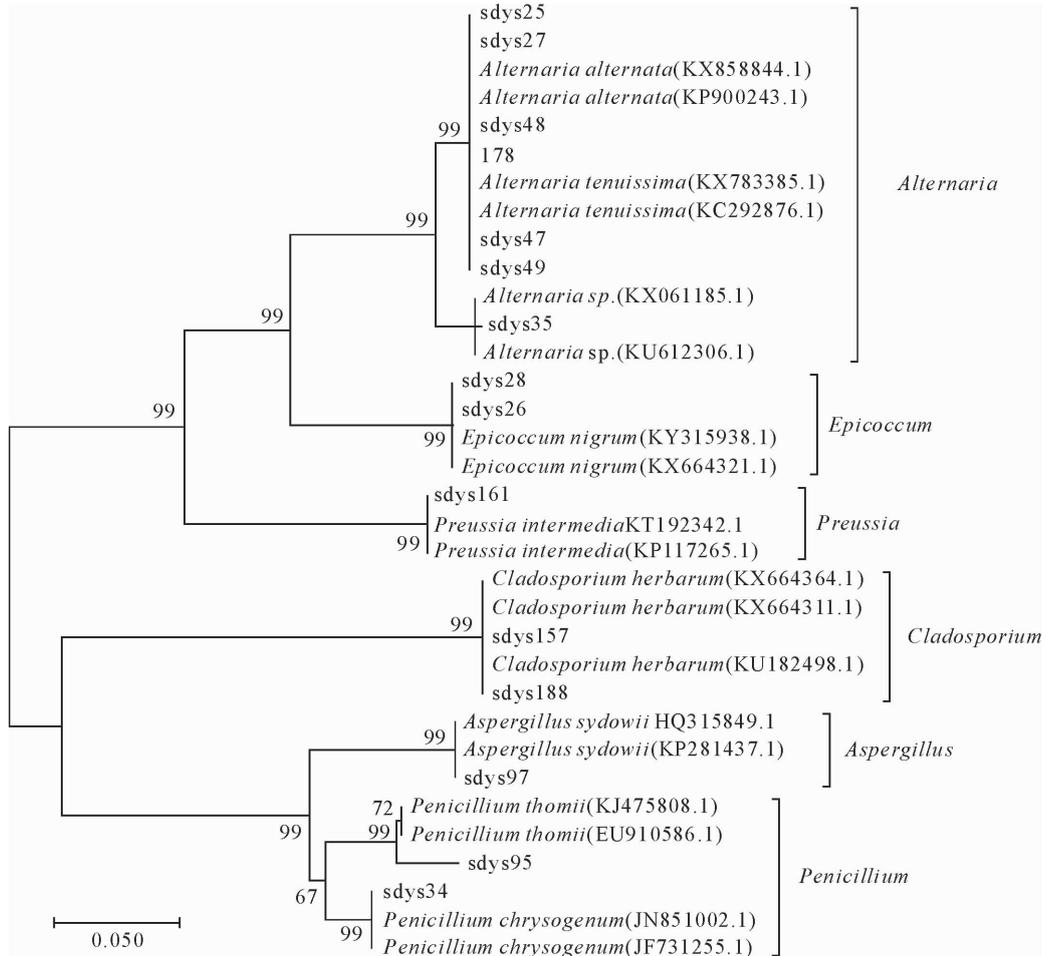


图 2 红果型沙地云杉内生真菌 ITS 序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ITS-r DNA sequences of endophytic fungi in *P. mongolica*

2.5.3 红果型沙地云杉内生真菌的多样性 研究发现(图 4),在红果型沙地云杉中内生真菌中,结合形态和分子生物学鉴定隶属于 7 个科分属于 10 属、12 个种,分属于链格孢属(37%)、青霉属(28%)、黑附球菌属(8%)、镰刀属(2%)、拟茎点霉属(3%)、葡萄穗霉属(2%)、枝孢属(7%)、绳光黑壳(5%)属、聚多曲霉属(3%)、弯孢霉属(5%),其中链格孢属(*Alternaria* sp.)和青霉属(*Penicillium* sp.)为优势属。

3 讨论与结论

3.1 讨论

据统计,地球上约有 25 万种植物,而内生真菌的数量就超出十万种^[10],调查发现几乎所有的维管束植物以及一些低等的蕨类植物、藻类苔藓植物的各个组织中,都存在内生真菌,遍及整个植物

界^[11-13],具有种类多、分布广的特点。

本试验在红果型沙地云杉分离的内生真菌发现枝条分离率最高,针叶次之,球果居第 3 位,根与果实最低。这与阿依佳玛丽^[14]等(2016)的结果相一致,宁祎(2017)在 4 个采样点发现均为茎组织内生真菌的定殖率高于叶组织。翟梅枝^[15]等(2009)在核桃、黑核桃各部位分布结果为茎>皮>叶,表明茎为此植物内生真菌最多的部位。

在植物体内,不同的内生真菌相互作用并建立一种生态平衡,其中一些分离频率高,数量大的优势类群如青霉属、镰孢属、链格孢属^[16]。本试验分离培养得到的 60 株内生真菌分属于 7 个科,10 个属,12 个种,此结果表明红果型沙地云杉内生真菌数量和种类具有多样性,其中链格孢属和青霉菌属是优势菌属。高媛^[17]等(2016)等在实验室从疏花水柏枝中分离到 163 株内生真菌,以曲霉属、青霉属和链

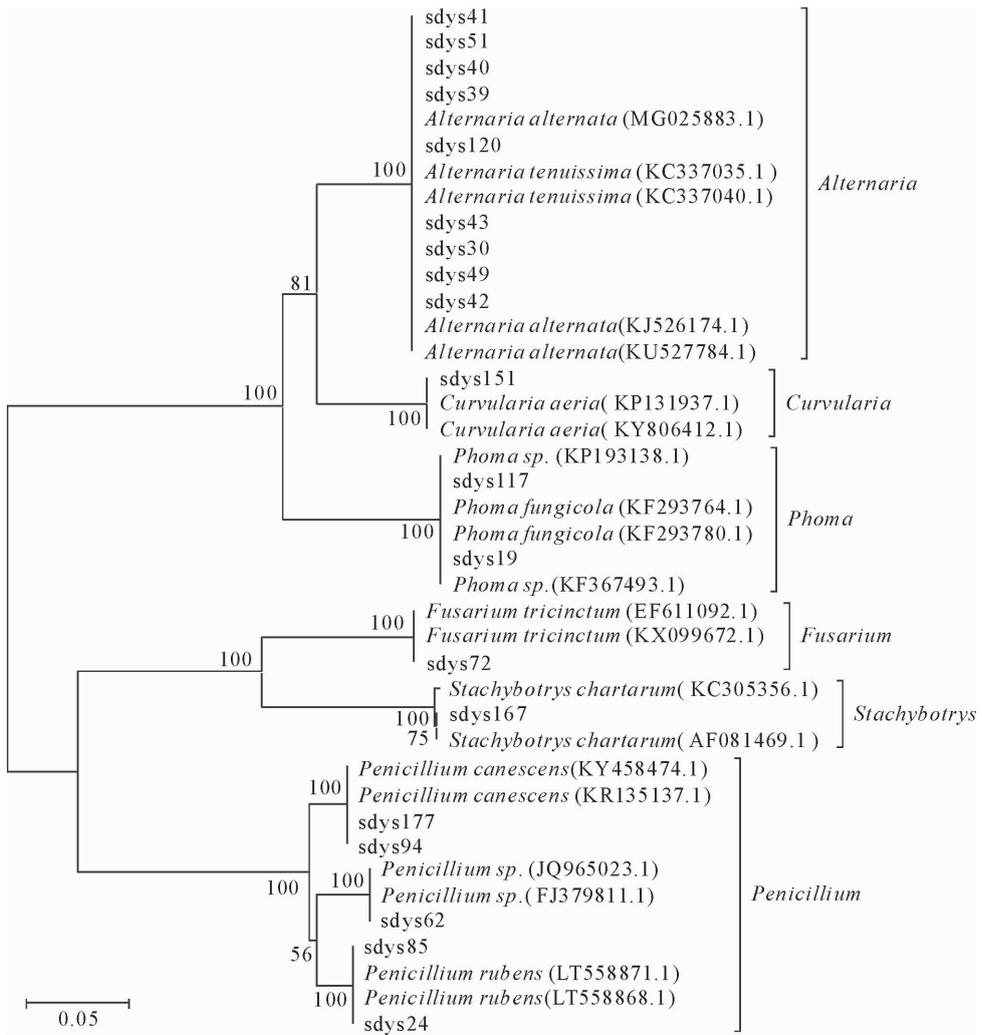


图3 红果型沙地云杉内生真菌 ITS 序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of ITS-r DNA sequences of endophytic fungi in *P. mongolica*

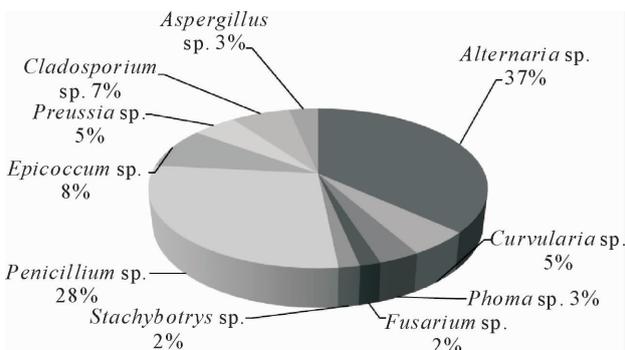


图4 红果型沙地云杉内生真菌所占比例

Fig. 4 The proportion of endophytic fungi in the red fruit *P. mongolica*

格孢菌属占的比例最高。王梦亮^[18]等(2017)在研究中发现,锁阳中青霉属真菌为优势菌群。阿依佳玛丽^[14](2016)等从核桃中分离出 676 株内生真菌,分属于 47 个,反映了核桃内生真菌的多样性,其中交链孢属的种群优势极为明显,这与毛光瑞^[19]等的研究的结果具有一定的相似性。许多研究结果表

明,链格孢属和青霉属是自然界常见的植物内生真菌类群,它们在宿主植物中广泛分布。

3.2 结论

根据试验结果可以看出,内生真菌菌落大多为圆形、近圆形,灰色、黑色、绿色,少数为粉红色或淡黄色,菌落表面有棉絮状、毛毡状,粉状、质地疏松,平展,生长速度不一,快则 5~7 d,慢则 15~30 d。

从健康的红果型沙地云杉不同组织部位中分离得到的 60 株内生真菌,通过形态学结合分子鉴定方法对内生真菌种群进行分类地位确定。结果表明,其隶属于 7 个科,10 个属,12 个种,分属于黑附球菌属、镰刀属、拟茎点霉属、葡萄穗霉属、枝孢属、链格孢属、青霉属、绳光黑壳、聚多曲霉、弯孢霉属,其中链格孢属(*Alternaria* sp.)和青霉属(*Penicillium* sp.)为优势属分别占总菌株数的 37%和 28%,说明红果型沙地云杉内生真菌菌种资源较丰富。

虽然得到的序列不同,但是分析红果型沙地云杉中的内生真菌发现,它们的聚类结果基本都可以

聚在一起,说明亲缘关系较近。

本研究对红果型沙地云杉内生真菌进行了分离鉴定和分子系统学分析,为沙地云杉内生真菌的种属鉴别和资源的开发利用提供科学的依据,并为下一步深入研究内生真菌代谢产物提供理论基础。

参考文献:

- [1] 徐文铎. 内蒙古的沙地云杉与云杉林[J]. 植物生态学与地植物学学报, 1983, 7(1): 1-7.
XU W D. Study on taxonomy of *Pice mongolica* In Inner Mongolia[J]. Journal of Plant Ecology and Geobotany, 1983, 7(1): 1-7. (in Chinese)
- [2] STONE J K, BACON C W, WHITE J F. An over view of endophytic microbes: endophytism defined. Microbial Endophytes [M]. New York: Marel Dekker, 2000: 3-29.
- [3] 徐婧, 于莉, 刘可杰, 等. 湛江红树林滩涂可培养真菌种群多样性分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(3): 476-482.
XU J, YU L, LIU K J, et al. Diversity of marine culturable fungal population in mangrove wetlands of Zhanjiang[J]. Microbiology China, 2013, 40(3): 476-482. (in Chinese)
- [4] 高智辉, 翟梅枝, 王云果, 等. 核桃内生真菌的分离鉴定[J]. 西北林学院学报, 2012, 27(5): 121-123.
GAO Z H, ZHAI M Z, WANG Y G, et al. Isolation and identification of endophytic Fungi from walnut Tree[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(5): 121-123. (in Chinese)
- [5] 刘茂军, 张兴涛, 赵之伟. 深色有隔内生真菌(DSE)研究进展[J]. 菌物学报, 2009, 28(6): 888-894.
LIU M J, ZHANG X D, ZHAO Z W. Advances in the research of dark septate endophytes (DSE) [J]. Mycosystema, 2009, 28(6): 888-894.
- [6] DIAZ P L, HENNELL J R, SUCHER N J. Genomic DNA extraction and barcoding of endophytic fungi [J]. Methods Mol Biol, 2012, 862: 171-179.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [8] 齐祖同, 孔华忠. 中国真菌志—曲霉属及其相关有性型[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [9] 臧威, 孙翔, 孙剑秋, 等. 南方红豆杉内生真菌的多样性与群落结构[J]. 应用生态学报, 2014, 25(7): 2071-2078.
ZANG W, SUN X, SUN J Q, et al. Diversity and community structure of endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(7): 2071-2078.
- [10] ORLEYFUSS M M. In the discovery of natural products with therapeutic potential [M]. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994: 49-79.
- [11] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
- [12] CARROL G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont [J]. Ecology, 1998, 69: 2-9.
- [13] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401.
SHI J Y, CHEN W X, LIU A Y. Advances in the study of endophytes and their effects on control of plant diseases [J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(7): 2395-2401. (in Chinese)
- [14] 阿依佳玛丽·依玛尔, 刘泽星, 毛光瑞, 等. 不同生境春季核桃内生真菌分离及其多样性[J]. 西北林学院学报, 2016, 31(6): 184-189.
Yimaer · Ayjml, LIU Z X, MAO G R, et al. Isolation and diversity of endophytic fungi from *Juglans regia* in spring under different habitats [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(6): 184-189. (in Chinese)
- [15] 翟梅枝, 问小强, 刘枫, 等. 核桃属植物内生真菌的分离及其抑菌活性研究[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(3): 144-147.
ZHAI M Z, WEN X G, LIU F, et al. Isolation of endophytic fungi from walnut and their antifungal activities [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(3): 144-147. (in Chinese)
- [16] 袁秀英, 石林, 胡达古拉, 等. 胡杨根际真菌与内生真菌多样性研究[J]. 西北林学院报, 2007, 22(6): 85-88.
YUAN X Y, SHI L, HU D G L, et al. A diversity study of rhizosphere and endophytic fungi from *Populus euphratica* Oliver. [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2007, 22(6): 85-88. (in Chinese)
- [17] 高媛, 雷旗, 蒋维, 等. 一株高抗氧化活性内生真菌的分子鉴定及产酚酸类物质研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1235-1243.
GAO Y, LEI Q, JIANG W, et al. Molecular characterization and phenolic acids analysis of an endophytic fungus with high antioxidant activity [J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1235-1243. (in Chinese)
- [18] 王梦亮, 贾岩, 崔晋龙, 等. 锁阳及其寄主白刺内生真菌的生态分布及遗传关系. [J]应用生态学报, 2017, 28(3): 815-820.
WANG ML, JIA Y, CUI JL, et al. Ecological distribution and genetic relation of endophytic fungi in *Cynomorium songaricum* and its host *Nitraria tangutorum* [J] Chinese Journal of Applied Ecology, 2017, 28(3): 815-820. (in Chinese)
- [19] 毛光瑞, 翟梅枝, 史冠昭, 等. 陕西不同生境核桃内生真菌多样性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1262-1273.
MAO GR, ZHAI MZ, SHI GZ, et al. Diversity of fungal endophytes from *Juglans regia* under different habitats in Shaanxi [J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1262-1273. (in Chinese)