

桉树内生真菌二型伞霉的培养条件优化

梁京威¹,王思佳¹,胡文涛^{1*},谢贤安¹,陈辉²,唐明²

(1. 华南农业大学 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室,林学与风景园林学院,广东 广州 510642;

2. 西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

摘要:明确桉树内生真菌二型伞霉的最适培养条件,为桉树内生真菌共生机制研究以及内生真菌的实际生产应用奠定基础。采用固体培养和液体培养,研究不同温度(20、25、30、35℃)、pH值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、碳源(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、果糖、乳糖和山梨醇)、氮源(磷酸氢二铵、草酸铵、硫酸铵、氯化铵、尿素、胰蛋白胍和蛋白胍)、转速(80、100、120 r/min和140 r/min)对二型伞霉生长的影响。同时回接巨桉,测量其株高与根长,探究接种二型伞霉对巨桉的影响。结果表明,二型伞霉在不同碳源和不同氮源的MMN培养基均能生长,但生长速度和生物量存在显著差异,最佳碳源为乳糖,其次是葡萄糖,最佳氮源为蛋白胍,其次是尿素。二型伞霉适宜生长温度为30℃,生长最快、长势最好,适宜生长pH为6.0~7.0,最佳转速为80 r/min。接种二型伞霉2个月后巨桉株高和根长分别比对照显著提高48.22%和75.78%。初步确定了桉树内生真菌二型伞霉的最佳培养条件,验证了其对接树生长的促进作用,为桉树内生真菌的生理生化研究和资源的开发利用提供理论依据。

关键词:桉树;内生真菌;二型伞霉;培养条件优化

中图分类号:S763.15 文献标志码:A 文章编号:1001-7461(2020)02-0142-07

Optimized Culture Conditions of the Endophytic Fungus *Umbelopsis dimorpha* from *Eucalyptus* Roots

LIANG Jing-wei¹, WANG Si-jia¹, HU Wen-tao^{1*}, XIE Xian-an¹, CHEN Hui², TANG Ming²

(1. Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China;

2. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: The objective of this research was to find the optimal culture conditions of *Umbelopsis dimorpha*, and to lay a foundation for the study on the endosymbiosis mechanism of *Eucalyptus* fungi and the actual production and application of endophytic fungi. Endophytic fungi from *Eucalyptus* roots were cultured in solid medium and liquid medium. Then, we investigated the effects of different carbon sources (glucose, sucrose, maltose, mannitol, fructose, lactose and sorbitol), nitrogen sources ((NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, ammonium oxalate, urea, tryptone and peptone), temperatures (15, 20, 25, 30, and 35℃), pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, and 8.0) and rotational speed (80, 100, 120, and 140 r/min) on fungi growth. We measured the shoot and root lengths of *Eucalyptus* to explore the effect of the inoculation of *U. dimorpha* on *Eucalyptus grandis* at the same time. *U. dimorpha* could grow in MMN medium with different carbon and nitrogen sources, however, the growth rate and biomass of *U. dimorpha* were significantly different. The best carbon source was lactose, and sub-optimum carbon source was glucose, the best nitrogen source was pep-

收稿日期:2019-04-24 修回日期:2019-08-20

基金项目:国家自然科学基金项目(31800092);广东省自然科学基金项目(2018A030313141);广州市科技计划重大项目(201904020022)。

作者简介:梁京威,男,本科生,研究方向:森林培育学。E-mail:JingweiLiangEric@163.com

*通信作者:胡文涛,男,博士,副教授,研究方向:菌根真菌提高林木抗逆性。E-mail:hwt@scau.edu.cn

tone, followed by urea. *U. dimorpha* grew and performed well when the temperature was 30°C. The optimum pH for the growth of *U. dimorpha* was 6.0–7.0. The optimal rotational speed was 80 r/min. The shoot and root length of *Eucalyptus* increased significantly by 48.22% and 75.78%, respectively, after inoculating *U. dimorpha* for two months. We preliminarily determined the optimal culturing requirements of *U. dimorpha* under control conditions, and also confirmed the promotion effect of *U. dimorpha* on the growth of *Eucalyptus*, which would provide a theoretical basis for the physiological and biochemical researches of endophytic fungi in *Eucalyptus* and the development and utilization of endophytic fungi resources.

Key words: *Eucalyptus*; endophytic fungi; *Umbelopsis dimorpha*; culture condition optimization

桉树是桃金娘科 (Myrtaceae) 桉属 (*Eucalyptus*)、杯果木属 (*Angophora*) 和伞房花属 (*Corymbia*) 植物的总称^[1]。为常绿阔叶高大乔木, 原产地澳大利亚, 1890 年引进中国, 至今已有 120 多 a 的历史^[2]。其适应性强、生长速度快、轮伐期短、树干通直、产量高, 是华南地区主要造林树种^[3]。截至 2015 年数据统计, 桉树产量世界前 3 为印度、巴西和中国, 中国的桉树林种植面积已达 450 万 hm^2 ^[4]。

内生真菌能通过调节活性氧和抗氧化剂来增加寄主对各种压力的耐受性^[5], 也可通过竞争底物的方式协助宿主植物抵抗病虫害的入侵^[6]。桉树根系中共生真菌多样性丰富, 弓明钦等^[7]调查华南地区的桉树林根际发现 11 种外生菌根真菌。朱天辉等^[8]调查四川桉树林发现 17 种外生菌根真菌, 隶属 9 科 11 属。单体江等^[9]综述国内报道的桉树内生真菌主要包括茎点霉属 (*Phoma* sp.) 等 10 多个属。

在二型伞霉 (*Umbelopsis dimorpha*) 的报道中, 丁雅迪等^[10]在思茅松 (*Pinus kesiya* var. *langbianensis*) 根中分离出 12 株二型伞霉属 (*Umbelopsis*) 真菌, 占所分离思茅松内生菌根真菌的 17.91%, 其中包括本研究中的二型伞霉, 认为 *Umbelopsis* sp. 有可能是思茅松内生菌根真菌的优势菌群。王思佳等^[11]在广州市长岗山自然保护区的桉树林根系中分离并鉴定出二型伞霉, 同时证明是桉树根系的内生真菌。徐超等^[12]的发明专利中提到二型伞霉可提高铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 生长速度, 增强铁皮石斛抗旱能力, 而有关二型伞霉的生物学特性, 二型伞霉对植物生长作用和生理生化指标影响的研究很少。基于此, 本研究从不同碳源和氮源等营养条件, 不同温度、pH 和转速等生长条件对二型伞霉生长的影响, 优化桉树内生真菌二型伞霉生长的培养条件, 对进一步研究二型伞霉的生物学特性, 以及二型伞霉与植物之间的关系提供菌源, 并为今后桉树二型伞霉在林业生产中的应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株及活化培养

供试菌种: 巨桉 (*Eucalyptus grandis*) 内生真

菌二型伞霉 (*U. dimorpha*), 由亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室华南农业大学菌根研究室提供。

活化培养: 将保存的菌种接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar medium, PDA) 平板中央, 25°C 恒温暗培养 15 d 后用打孔器 (Φ 5 mm) 在菌落边缘打取菌饼, 用作固体和液体培养的接种体。

1.2 培养基

以 PDA 培养基进行纯化培养, 以 MMN 培养基 (modified melin-norkrans medium) 为基础培养基进行单因素替换分离培养^[13]。PDA 培养基配方: 马铃薯 (从中提取浸出粉) 300 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g; MMN 培养基配方: 氯化钙 0.05 g, 氯化钠 0.025 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 磷酸氢二铵 0.25 g, 硫酸镁 0.15 g, 三氯化铁 (1%) 1.2 mL, 维生素 B₁ 100 μg , 柠檬酸 0.2 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 20 g。蒸馏水加至 1 000 mL, pH 调至 5.5。

1.3 试验方法

1.3.1 不同碳源处理 以 MMN 固体培养基为基础培养基, 用等量的蔗糖、麦芽糖、甘露醇、果糖、乳糖和山梨醇 (均为分析纯) 代替培养基中的葡萄糖, 以葡萄糖作为对照, 共 7 个不同碳源培养基处理, 每个处理 4 个重复。121°C、100 kPa 高压蒸汽灭菌 25 min, 倒平板 (Φ 9 cm) 至冷却后, 用打孔器 (Φ 5 mm) 分别取 1 个菌饼接种于培养基中央, 菌丝面朝下紧贴培养基, 封口膜封好后于培养皿底部以菌饼为中心划十字, 25°C 恒温暗培养 25 d。用十字交叉法测量菌落直径, 按照公式计算菌丝生长速度, 同时参照李芳等^[14]的方法称量菌丝干重。

菌丝生长速度 (mm/d) = 菌落半径 (mm) / 菌丝生长天数 (d)

1.3.2 不同氮源处理 用等量的草酸铵、硫酸铵、氯化铵、尿素、胰蛋白胍和蛋白胍 (均为分析纯) 代替 MMN 培养基中的磷酸氢二铵, 以磷酸氢二铵作为对照, 共 7 个不同氮源培养基处理, 每个处理 4 个重复。按照 1.3.1 的方法对二型伞霉进行固体培养,

测定菌丝生长速度和生物量。

1.3.3 不同温度处理 不同培养温度分别设置为 20、25、30、35℃。取 1 个菌饼接种于 MMN 培养基中央,按照 1.3.1 的方法对二型伞霉进行固体培养,在培养箱中暗培养 15 d 后收获菌丝,测定菌丝生长速度和生物量。

1.3.4 不同 pH 处理 用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 将 MMN 培养基的 pH 分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0。取 1 个菌饼接种于 MMN 培养基中央,按照 1.3.1 的方法对二型伞霉进行固体培养,在培养箱中 25℃ 暗培养 15 d 后收获菌丝,测定菌丝生长速度和生物量。

1.3.5 不同转速处理 将 MMN 培养液 100 mL (pH 5.5) 装入 250 mL 三角瓶中,接入 2 个菌饼,设转速分别为 80、100、120 r/min 和 140 r/min,25℃ 摇床暗培养 7 d 后过滤收集菌丝,用无菌水冲洗 3 次,80℃ 烘干至恒重后称量菌丝干重。每个处理 4 个重复。

1.3.6 回接巨桉苗 将沙子、蛭石在 121℃、100 kPa 灭菌 60 min 后以体积比 1:1 混合,装满体积为 0.3 L 的花盆中,参考刘茂军等^[15]方法将二型伞霉回接无菌巨桉苗(来自中国林业科学研究院热带林业研究所),每盆 5 株,每株接种 10 个直径 5 mm 的菌饼,每组 4 个重复,以不接菌饼为对照。将植株置于室内培养(温度 25℃,湿度 60%,光强 5 000 lx),并 1 周浇 1 次营养液,2 个月后收获接种苗和对照苗,检测二型伞霉的定殖情况并测定根长及株高。

1.4 数据处理

数据使用 SPSS Statistics 20.0 (IBM, Chicago, USA)、Excel 2010 统计软件进行统计分析,采用单因素方差分析进行均值显著性检验,邓肯多重比较进行显著性差异检验 ($P < 0.05$),使用 SigmaPlot 13.0 进行绘图。所示数据为 4 次重复的平均值 ± 标准差。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对二型伞霉生长的影响

二型伞霉在 7 种不同碳源培养基上的菌落形态如图 1 所示。由图 1 可知,7 种碳源均能被二型伞霉利用,但不同碳源培养基上二型伞霉的生长速度和生物量的差异显著(图 2, $P < 0.05$)。二型伞霉以山梨醇为碳源的生长速度最慢、生物量最小,为 (1.32 ± 0.03) mm/d 和 (146.00 ± 18.61) mg,说明其对山梨醇的利用率低。而以乳糖为碳源时生长速度最快、生物量最大,为 (1.57 ± 0.01) mm/d 和 (198.75 ± 7.19) mg,以乳糖为碳源和以葡萄糖为碳

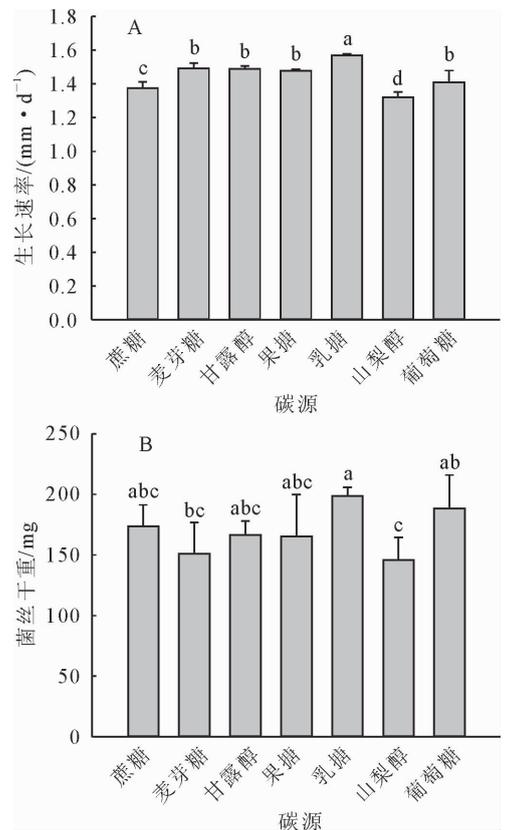
源相比差异不显著 ($P > 0.05$),葡萄糖的生长速度和生物量为 (1.41 ± 0.07) mm/d 和 (188.50 ± 27.39) mg。葡萄糖和乳糖的生长情况皆优于其他供试碳源。所以二型伞霉固体培养时生长适宜的碳源是乳糖,其次是葡萄糖。



注:A:葡萄糖;B:果糖;C:蔗糖;D:乳糖;E:麦芽糖;F:甘露醇;G:山梨醇。

图 1 二型伞霉在不同碳源 MMN 培养基生长 25 d 的菌落形态

Fig. 1 The colony morphology of *Umbelopsis dimorpha* on MMN medium with different carbon sources for 25 days



注:A:不同碳源对二型伞霉生长速度的影响;B:不同碳源对二型伞霉生物量的影响;小写字母表示不同碳源对同一种真菌生长影响的差异显著性 ($P < 0.05$)。下同。

图 2 碳源对二型伞霉生长的影响

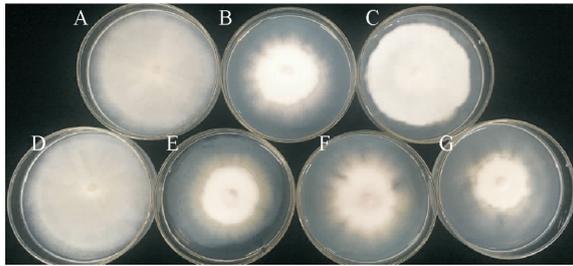
Fig. 2 Effects of different carbon sources on the growth of

U. dimorpha

2.2 不同氮源对二型伞霉生长的影响

二型伞霉在 7 种不同氮源培养基上的菌落形态

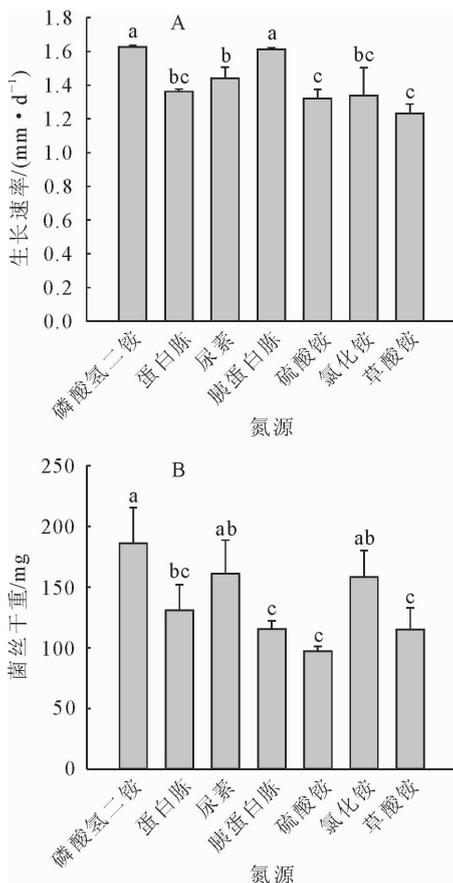
如图 3 所示。由图 3 可知,以蛋白胨和胰蛋白胨为氮源的菌落最大,最快长满培养皿,而以硫酸铵、草酸铵为氮源的菌落最小且较为致密,与其他氮源的菌落形态差异显著。由图 4A 知,二型伞霉以蛋白胨和胰蛋白胨为氮源时生长速度最快(1.63 ± 0.01 mm/d 和 1.61 ± 0.01 mm/d),其次是尿素(1.44 ± 0.06 mm/d),分别比对照(1.36 ± 0.01 mm/d)显著提高 19.7%、18.6% 和 6.1% ($P < 0.05$); 二型伞



注: A: 蛋白胨; B: 磷酸氢二铵; C: 尿素; D: 胰蛋白胨; E: 硫酸铵; F: 氯化铵; G: 草酸铵。

图 3 二型伞霉在不同氮源 MMN 培养基生长 25 d 的菌落形态

Fig. 3 The colony morphology of *U. dimorpha* on MMN medium with different nitrogen sources for 25 days



注: A: 不同氮源对二型伞霉生长速度的影响; B: 不同氮源对二型伞霉生物量的影响。

图 4 氮源对二型伞霉生长的影响

Fig. 4 Effects of different nitrogen sources on the growth of *U. dimorpha*

霉以蛋白胨为氮源时生物量最大 (186.00 ± 29.59 mg), 其次是尿素 (161.00 ± 27.63 mg), 分别比对照 (131.00 ± 20.36 mg) 显著提高 42.0% 和 22.9% (图 4B, $P < 0.05$)。所以二型伞霉固体培养时生长适宜的氮源是蛋白胨, 其次是尿素。

2.3 不同温度对二型伞霉生长的影响

二型伞霉在 20、25、30、35℃ 4 种温度培养基上的菌落形态如图 5 所示。由图 5 可知, 温度对二型伞霉的生长有显著影响 (表 1, $P < 0.05$)。在 20~30℃ 时, 生长速率均随温度的升高而增大; 在温度为 30℃ 时达到最大值; 在 30~35℃ 时, 生长速率均随温度的升高而减小。生物量随温度的增大而增大, 在温度为 35℃ 时达到最大值; 温度为 30℃ 时生长状态良好, 菌丝表面平滑, 而在温度为 35℃ 时菌落中间致密隆起而边缘疏松, 呈老化状。说明二型伞霉的适宜生长温度为 30℃。

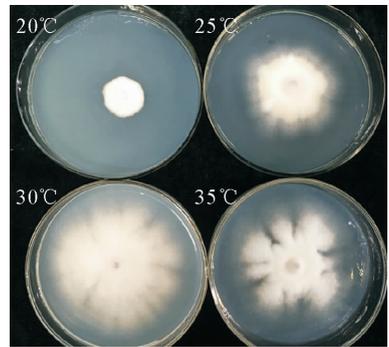


图 5 二型伞霉在不同温度 MMN 培养基生长 15 d 的菌落形态

Fig. 5 The colony morphology of *U. dimorpha* on MMN medium with different temperature for 15 days

2.4 不同 pH 对二型伞霉生长的影响

固体培养条件下, 二型伞霉在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 不同梯度的 MMN 培养基上的菌落形态如图 6 所示。pH 对二型伞霉的生长均有显著影响 (表 2, $P < 0.05$)。在 pH 4.0~8.0 的范围内, 二型伞霉均能生长, 其生长速率和生物量均随 pH 的增大呈现先增大后减小的趋势, 且都在 pH 为 7.0 达到最大值, 其生长状态在 pH 6.0 时比 pH 8.0 时好, 说明二型伞霉为中性偏酸菌。

2.5 不同转速对二型伞霉生长的影响

转速对二型伞霉的生长均有显著影响 (表 3, $P < 0.05$), 二型伞霉在转速为 80~140 r/min 的范围内均能生长, 但是二型伞霉的生物量随转速的增大呈现降低的趋势, 说明二型伞霉的生物量与转速呈负相关, 在本研究的转速范围内, 生长的最适转速为 80 r/min。

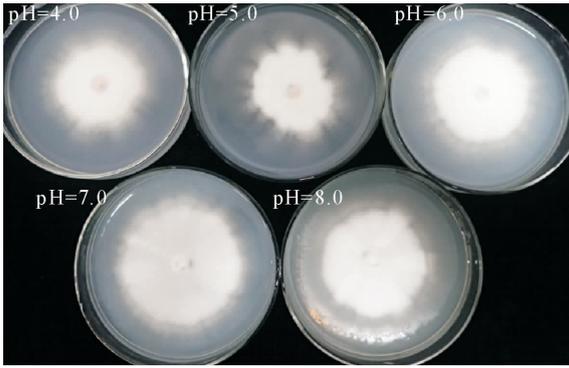


图 6 二型伞霉在不同 pHMMN 培养基生长 15 d 的菌落形态

Fig. 6 The colony morphology of *U. dimorpha* on MMN medium with different pH for 15 days

2.6 二型伞霉对巨桉生长的影响

将二型伞霉回接至巨桉苗,测定二型伞霉对巨桉生长作用。结果表明,二型伞霉在巨桉根系中定殖情况良好,巨桉根系的二型伞霉侵染率为 33.2%,侵染强度为 10.8%,微菌核(*Microsclerotia*)丰富度为 56.7%^[11]。接种二型伞霉的巨桉苗株高比对照显著提高 48.22%,根长比对照显著提高 75.78%(表 4),说明二型伞霉对巨桉苗的株高和根长的生长均有促进作用。

3 结论与讨论

本课题组从桉树中分离出一株内生真菌二型伞霉^[11],不同真菌的生境不同,其生长情况也会不同,本研究对其进行了碳源、氮源、温度、pH和转速的

表 1 温度对二型伞霉生长的影响

Table 1 Effects of different temperature on the growth of *U. dimorpha*

温度/℃	20	25	30	35
生物量/mg	29.00±4.54c	85.75±13.37b	91.75±6.99a	155.00±31.18a
生长速率/(mm·d ⁻¹)	0.84±0.17c	1.95±0.23b	2.30±0.12a	2.15±0.04a

注:小写字母表示不同温度对二型伞霉生长影响的差异显著性($P<0.05$)。下同。

表 2 pH 对二型伞霉生长的影响

Table 2 Effects of different pH on the growth of *U. dimorpha*

pH	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
生物量/mg	101±40.88c	148±25.02bc	165±18.05ab	193±20.89a	178±11.32ab
生长速率/(mm·d ⁻¹)	1.93±0.10c	2.00±0.10bc	2.11±0.04ab	2.18±0.05a	1.91±0.24ab

表 3 不同转速对二型伞霉生物量的影响

Table 3 Effects of different rotation speed on the biomass of *U. dimorpha*

转速/(r·min ⁻¹)	80	100	120	140
生物量/mg	271.50±18.00a	223.75±15.00b	201.25±29.00bc	189.00±5.00c
生长速率/(mg·d ⁻¹)	38.79±3.00a	31.96±2.00b	28.75±4.00bc	27.00±1.00c

表 4 二型伞霉对巨桉株高和根长的影响

Table 4 The effect of *U. dimorpha* on the shoot and root length of *E. grandis*

处理	株高/cm	根长/cm
二型伞霉	7.07±0.49	22.50±4.58
对照	4.77±0.78	12.80±1.13

生物学特性研究,优化了二型伞霉的培养条件,在 MMN 培养基中乳糖或葡萄糖作碳源、蛋白胨或尿素作氮源、温度为 30℃、pH 为 6.0~7.0 和转速为 80 r/min 时为二型伞霉的最佳培养条件。

碳源在真菌的生长过程中提供能量,本研究表明二型伞霉的最适碳源是乳糖,其次是葡萄糖。宋瑛瑛^[16]研究的 4 种深色有隔内生真菌中,沙门外瓶柄霉(*Exophiala salmonis*)、甘瓶霉(*Phialophora mustea*)和菊异茎点霉(*Paraphoma chrysanthemicola*)的最适碳源皆为葡萄糖,枝状枝孢菌(*Clados-*

porium cladosporioides)的最适碳源为乳糖。张好强等^[17]研究发现龟裂秃马勃(*Handkea utrifomis*)在以几丁质和碳酸氢钠为碳源的培养基上不生长,其最适碳源为蔗糖。宋瑛瑛^[16]在研究中发现固体培养时沙门外瓶柄霉最适碳源为葡萄糖,而液体培养时最适碳源为可溶性淀粉。刘润进等^[18]认为影响真菌菌丝生长最大的 3 种碳源为葡萄糖、麦芽糖和蔗糖,试验说明真菌对不同碳源的摄取和利用有所差异,不同真菌对同一碳源的利用也有差异,既能利用单糖,也可以利用多糖甚至醇类,且固体培养和液体培养也存在差异。

氮源在真菌的生长过程中提供营养,对真菌的生长起重要作用。本研究在固体培养中,使用磷酸氢二铵、草酸铵、硫酸铵、氯化铵、尿素、胰蛋白胨和蛋白胨 7 种氮源以扩大氮源使用范围,为更好的选择最适氮源提供数据支撑。A. Daza 等^[19]研究的橙

盖鹅膏菌(*Amanita caesarea*)在氮源为磷酸氢二铵时干重最大,说明其对铵盐的利用率较高。M. José 等^[20]发现小果豆马勃(*Pisolithus microcarpus*)的生产过程中可用蛋白胨代替酵母提取物成为最适氮源,降低生产成本。宋瑛瑛^[16]研究中发现固体培养时沙门外瓶柄霉、甘瓶霉、枝状枝孢菌的最适氮源均为硝酸钠,菊异茎点霉的最适氮源为胰蛋白胨。本研究中二型伞霉的最适氮源是蛋白胨,其次是尿素,其对铵盐的利用率相比之下比较低,有机氮源比铵态氮源的利用率高。

温度是影响内生菌根真菌生长和生理代谢的重要因素之一。刘晓曦^[21]研究发现在 28℃ 时印度梨形孢(*Serendipita indica*)生长最好,收集的菌丝最多。张勇等^[22]研究发现瘤突毛壳(*Chaetomium strumarium*)、耐热梭孢壳(*Thielavia subthermophila*)和榛色钩囊菌(*Hamigera avellanea*)3 个耐热真菌新纪录种,瘤突毛壳和耐热梭孢壳的适宜生长温度是 35~45℃,榛色钩囊菌的适宜生长温度是 35~40℃。本试验结果显示,二型伞霉在 30℃ 时生长情况最佳,35℃ 时的生长情况也比 25℃ 时的生长情况好,说明二型伞霉的最适温度为 30℃,且能耐一定高温。

pH 影响真菌生长和发育,李贵等^[23]研究的蛇足石杉(*Huperzia serrata*)2 株内生真菌在 pH 6.0 时生物总碱和生物量达到最大值。万志文等^[24]研究发现随着 pH 增加,醉马草(*Achnatherum inebrians*)内生真菌共生体幼苗叶绿素含量呈先增加后下降的趋势,并在 pH 7.0 时达到最大值。本试验显示二型伞霉生长最适 pH 是 6.0~7.0。

不同的转速能溶解不同的氧浓度,从而影响真菌在液体培养中的生长。王俊明等^[25]研究得出皱柄白马鞍菌(*Helvella crispa*)在转速达到 100 r/min 时生物量最大。季向阳等^[26]研究得出羊肚菌(*Morchella esculenta*)最适转速为 140 r/min。而刘士旺等^[27]研究得出羊肚菌最适转速为 150 r/min。本研究中二型伞霉生长最适转速是 80 r/min。不同真菌的最适转速有所差异,真菌的需氧量有所不同,甚至同一种真菌在不同的环境下最适转速也会有变化。因二型伞霉为中性偏酸菌,在 pH 5.5~7.0 范围内不同单因素进行实验所得最优结果无显著差异,本研究中,在液体培养下,尚未考虑全因素试验,在后续优化的试验中,应进行正交设计法等严格控制变量进行液体培养基的优化培养。

内生真菌对植物生长的促进作用,可通过与植物根部建立互惠共生关系来进行,增强防治病虫害及非生物胁迫的能力。侯姣姣等^[28]研究得出内生

真菌黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)对古侧柏(*Platyclusus orientalis*)幼苗生长均有促进作用,可显著提高古侧柏幼苗株高、地径、干重、含水量等。杨韧等^[29]对陕北地区油松(*Pinus tabulaeformis*)的深色有隔内生菌(dark septate endophytic fungi, DSE)的研究表明,DSE 与含水量、有机质、速效氮、速效磷、速效钾呈正相关。本研究中二型伞霉显著促进了巨桉的根长和株高。然而,该菌对巨桉幼苗的促生机制有待进一步研究。二型伞霉分布广,在云南、江苏、广东广州、广东韶关均有分布,寄主有思茅松、铁皮石斛、桉树等多样性,其对桉树的根长和株高有促生作用,研究二型伞霉的最佳培养条件可为桉树内生真菌与宿主相互作用机制的研究、桉树内生真菌资源的开发利用提供理论依据。

参考文献:

- [1] HILL K D, JOHNSON L A S. Systematic studies in the *Eucalyptus* 7. a revision of the bloodwoods, genus (Myrtaceae) [J]. *Telopea*, 1995, 6(2-3): 185-504.
- [2] 王震洪, 段昌群, 起联春, 等. 我国桉树林发展中的生态问题探讨 [J]. *生态学杂志*, 1998, 17(6): 64-68.
WANG Z H, DUAN C Q, QI L C, et al. A preliminary investigation of ecological issues arising in the man-made forest of *Eucalyptus* in China [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 1998, 17(6): 64-68. (in Chinese)
- [3] 温远光, 陈放, 刘世荣, 等. 广西桉树人工林物种多样性与生物量关系 [J]. *林业科学*, 2008, 44(4): 14-19.
WEN Y G, CHEN F, LIU S R, et al. Relationship between species diversity and biomass of *Eucalyptus* plantation in Guangxi [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2008, 44(4): 14-19. (in Chinese)
- [4] 谢耀坚. 论中国桉树发展的贡献和可持续经营策略 [J]. *桉树科技*, 2016(4): 26-31.
XIE Y J. A discussion on the contribution and sustainable management strategy of *Eucalypt* development in China [J]. *Eucalypt Science & Technology*, 2016(4): 26-31. (in Chinese)
- [5] HAMILTON C E, GUNDEL P E, HELANDER M, et al. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review [J]. *Fungal Diversity*, 2012, 54(1): 1-10.
- [6] HAMILTON C E, GUNDEL P E, HELANDER M, et al. Nutritional niche overlap potentiates the use of endophytes in bio-control of a tree disease [J]. *Bio. Control*, 2015, 60: 655-667.
- [7] 弓明钦, 陈羽. 华南地区松、桉树种外生菌根调查 [J]. *林业科学研究*, 1991, 4(3): 323-327.
GONG M Q, CHEN Y. Investigation of ectomycorrhiza species of *Pine* and *Eucalyptus* in South China [J]. *Forest Research*, 1991, 4(3): 323-327. (in Chinese)
- [8] 朱天辉, 张健, 胡庭兴, 等. 四川桉树菌根类型及林分密度对菌根真菌的影响 [J]. *四川农业大学学报*, 2001, 19(3): 222-224.
ZHU T H, ZHANG J, HU T X, et al. Effects of mycorrhiza types and stand density on mycorrhizal fungi of *Eucalyptus* in Sichuan [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2001,

- 19(3):222-224. (in Chinese)
- [9] 单体江,王小晴,毛子翎,等. 桉树内生真菌及其抗菌活性最新进展[C]// 中国植物保护学会第十二次全国会员代表大会暨学术年会. 长沙,2017.
- [10] 丁雅迪,刘绍雄,毛德昌,等. 思茅松菌根内生真菌多样性研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):369-373.
DING Y D, LIU S X, MAO D C, *et al.* Study on the diversity of endophytic fungi of *Pinus kesiya* [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(12): 369-373. (in Chinese)
- [11] 王思佳,赖文珍,谢贤安,等. 桉树根系根际真菌的分离与鉴定[J]. 西北植物学报,2018,38(8):185-193.
WANG S J, LAI W Z, XIE X A, *et al.* Isolation and identification of symbiotic fungi in *Eucalyptus* roots [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38(8): 185-193. (in Chinese)
- [12] 徐超,史俊,席刚俊,等. 一种二型伞霉及其在铁皮石斛促生与抗旱中的应用,104195054 B[P]. 2016.
- [13] TANIGUCHI T, KATAOKA R, FUTAI K. Plant growth and nutrition in pine (*Pinus thunbergii*) seedlings and dehydrogenase and phosphatase activity of ectomycorrhizal root tips inoculated with seven individual ectomycorrhizal fungal species at high and low nitrogen conditions[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(5): 1235-1243.
- [14] 李芳,张俊伶,冯固,等. 两种外生菌根真菌对重金属 Zn、Cd 和 Pb 耐性的研究[J]. 环境科学学报,2003,23(6):807-812.
LI F, ZHANG J L, FENG G, *et al.* The tolerance of ectomycorrhizal fungi *Suillus granulatus* and *Paxillus involutus* to heavy metals Zn, Cd, Pb [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2003, 23(6): 807-812. (in Chinese)
- [15] 刘茂军,李涛,赵之伟. 一种快速建立 DSE 与植物共生培养体系的方法及其应用,101263778A[P]. 2008.
- [16] 宋瑛琪. 深色有隔内生真菌培养条件的优化及铅吸附特性的研究[D]. 杨陵:西北农林科技大学,2015.
- [17] 张好强,余红霞,唐明. 油松根际外生菌根真菌龟裂秃马勃的分离鉴定及培养[J]. 西北植物学报,2016,36(2):419-425.
ZHANG H Q, YU H X, TANG M. Isolation, identification and cultivation of ectomycorrhizal fungus *Handkea utriformis* in the rhizosphere of *Pinus tabulaeformis* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 36(2): 419-425. (in Chinese)
- [18] 刘润进,陈应龙. 菌根学[M]. 北京:科学出版社,2007.
- [19] DAZA A, MANJÓN J L, CAMACHO M, *et al.* Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on in vitro culture of several isolates of *Amanita caesarea* (Scop. : Fr.) Pers [J]. Mycorrhiza, 2006, 16(2): 133-136.
- [20] MÁRCIO J R, VETÚRIA L O. Growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in different nutritional conditions[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2011, 42(2): 624-632.
- [21] 刘晓曦. 印度梨形孢培养条件优化和剂型研制及在油菜上的应用研究[D]. 杭州:浙江大学,2015.
- [22] 张勇,李多川. 中国耐热真菌三个新记录种[J]. 菌物学报, 2011, 30(1): 116-122.
ZHANG Y, LI D C. Three new records of thermotolerant fungi from China [J]. Mycosystema, 2011, 30(1): 116-122. (in Chinese)
- [23] 李贵,唐克华,魏华,等. 不同培养条件对蛇足石杉内生真菌生物量积累及总生物碱含量的影响[J]. 贵州农业科学,2010,38(12):138-141.
LI G, TANG K H, WEI H, *et al.* Effects of different culture condition on biomass accumulation and total alkaloid content in endophytic fungi of *Huperzia serratum* [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2010, 38(12): 138-141. (in Chinese)
- [24] 万志文. 温度、光照和 pH 对醉马草内生真菌共生体生长及麦角生物碱含量的影响[D]. 兰州:兰州大学,2017.
- [25] 王俊明,胡景江,武杭菊,等. 皱柄白马鞍菌液体摇瓶培养条件优化[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(3): 223-226.
WANG J M, HU J J, WU H J, *et al.* Optimization of liquid submerged culture conditions for the mycelial growth of *Helvella crispa* Fr. [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat. Sci. Ed., 2007, 35(3): 223-226. (in Chinese)
- [26] 季向阳,罗孝坤. 羊肚菌液体培养条件的优化[J]. 中国食用菌,2016,35(2):21-23.
JI X Y, LUO X K. Optimization of liquid culture condition for *Morchella esculenta* [J]. Edible Fungi of China, 2016, 35(2): 21-23. (in Chinese)
- [27] 刘士旺,毛建卫,吴元锋,等. 粗柄羊肚菌液体发酵条件研究[J]. 中国酿造,2008(23):25-28.
LIU S W, MAO J W, WU Y F, *et al.* Study on liquid fermentation of *Morchella crassipes* [J]. China Brewing, 2008(23): 25-28. (in Chinese)
- [28] 侯姣姣,余仲东,康永祥,等. 内生真菌侵染对古侧柏种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 西北林学院学报,2016,31(6):110-115.
HOU J J, YU Z D, KANG Y X, *et al.* Effects of endophytic fungi on seed germination and seedling growth of ancient *Platykladus orientalis* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(6): 110-115. (in Chinese)
- [29] 杨韧,张好强,唐明. 陕北地区油松根际真菌资源初步调查及其与土壤理化性质的关系[J]. 西北林学院学报,2016,31(5): 203-210.
YANG R, ZHANG H Q, TANG M. A survey of root fungal resources of *Pinus tabulaeformis* and its relationship with soil physicochemical properties in Northern Shaanxi [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(5): 203-210. (in Chinese)