

# 蓝莓根系内生真菌多样性的研究

刘凤红

(鲁东大学 农学院, 山东 烟台 264025)

**摘要:**山东是蓝莓种植大省,至2014年底,种植面积约3 000 hm<sup>2</sup>,年产量约为5万t。为探讨山东栽培蓝莓根系内生真菌的菌群组成和分布特点,利用组织分离法从山东4个地区2个蓝莓栽培品种根系中分离内生真菌1 345株。利用形态特征和分子生物学方法鉴定为29属,其中卵菌1属,占0.45%;担子菌2属,占2.15%;子囊菌17属,占31.16%;无性型真菌9属,占60.82%;其余5.42%无法明确鉴定。结果表明:山东省栽培蓝莓根系内生真菌的菌群多样性丰富,其中以镰孢属 *Fusarium* 为优势菌群,分离频率为31.67%;木霉属 *Trichoderma*、青霉属 *Penicillium*、枝孢属 *Cladosporium*、涛旋孢属 *Zalerion* 是亚优势种群。不同地区栽培蓝莓根系内生真菌的结构和组成存在一定差异。镰孢属 *Fusarium* 是2种栽培蓝莓根系内生真菌的优势菌群。多样性指数的分析反映出蓝莓根系内生真菌菌群的多样性水平存在差异,威海“杜克”的多样性指数( $H'$ )和丰富度指数( $R$ )最高,分别为2.835 9和4.264 3,泰安“杜克”的均匀度指数( $E$ )最高,为0.939 1。由相似性原理得出,各地区之间的内生真菌相似性系数处于中等不相似与中等相似之间,威海和青岛之间的内生真菌菌群相似性最高,它们之间的Jaccard指数和Sorensen指数分别为0.57和0.73。

**关键词:**分离频率;优势菌群;多样性指数;相似性指数

**中图分类号:**S 663.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0025-06

植物内生真菌一般是指在生活史的某一时期生活在植物组织内部,但对宿主不引起明显病害症状并与宿主建立和谐关系的一类真菌<sup>[1-2]</sup>,它广泛存在于植物组织内部,并具有极其丰富的物种多样性<sup>[3-4]</sup>。植物内生真菌与宿主在长期的生态系统演化进程中形成了互惠共生的关系,内生真菌可以促进植物生长、增强抗病能力、提高抗逆性等<sup>[5-7]</sup>。因此,植物内生真菌在植物演替过程中具有非常重要的生态学意义,是目前生态学研究的热点<sup>[8-9]</sup>。

蓝莓属杜鹃花科越橘属(*Vaccinium*)多年生落叶或常绿灌木,又称蓝浆果、越橘,原产于北美洲。蓝莓的最早栽培记录是1887年在美国佛罗里达东北部种植的<sup>[10]</sup>。山东的气候特征与美国蓝莓主产区新泽西、北卡和南卡气候相似,大部分地区适宜蓝莓的种植,目前山东的种植面积几乎占据全国的二分之一。在鲁东大学

农学院实验室的蓝莓栽培示范基地的栽培管理过程中,发现虽然蓝莓的病虫害相对其它果树较少,但每个基地都出现近5%的蓝莓苗木植株矮小、枯黄等病症。对其病理进一步研究发现,大部分是因为根部病原性真菌(如镰刀菌)感染所致。因为蓝莓生长要求酸性、腐殖质丰富的土壤,这样土壤条件极适宜于真菌的大量生长繁殖,若病原菌大量生长繁殖,必然会危害甚至致死苗木。有研究报道,蓝莓枝干溃疡病对蓝莓的种植已造成威胁<sup>[11]</sup>。因而,有效地防治病害是种植户迫切关注和急需解决的问题。

目前,利用植物内生真菌控制病害已成为病害防治的一个新途径。若环境中存在适宜的真菌与蓝莓根部建立共生关系,就能抵抗病原性真菌的侵袭和为害,并促进蓝莓苗木的生长发育。因此,分离和研究蓝莓根系内生真菌具有重要的应用价值。然而,在蓝莓内生真菌研究方面,陈小姝<sup>[12]</sup>采用组织分离法对蓝莓的叶片进行分离,得到2种内生真菌。肖军等<sup>[13]</sup>对长白山野生蓝莓的根系进行研究,共得到11株内生真菌。但都未对得到的内生真菌进行详细的分类与鉴定,更未开展蓝莓内生真菌及其优势菌群的系统调查与分析,因而,进一步深入研究蓝莓根系内生真菌组成,才能对其内生真菌资源加以开发与应用。

**作者简介:**刘凤红(1987-),女,硕士研究生,研究方向为农业微生物学。E-mail:lfh. happy. liu@163. com.

**基金项目:**山东省科技发展计划资助项目(ZR2012GSF12110, 2012YD11009);山东省自然科学基金资助项目(ZR2014CM004);国家自然科学基金资助项目(NSFC31200248)。

**收稿日期:**2015-07-27

该研究分别从山东的青岛、泰安、威海和烟台 4 个主要蓝莓种植区采集蓝莓根样。通过真菌分离、鉴定、统计和分析,阐明不同地区 and 不同栽培品种蓝莓根系内生真菌的种类多样性和群落组成,探讨蓝莓内生真菌的宿主和品种偏好性;分离和收集大量内生真菌资源,了解潜在生防真菌和促生真菌等有益微生物,为蓝莓病虫害防治、有益微生物菌剂的开发利用奠定参考基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物样本 采样地点为山东的青岛、泰安、威海和烟台,其中青岛、烟台和威海属于温带海洋性气候,泰安属于温带季风性气候。于 2012 年 6 月至 2014 年 12 月,对上述 4 个地区栽培蓝莓进行根段取样,共采集根

表 1

山东栽培蓝莓样地概况

Table 1

The root sampling sites of blueberry grown in Shandong

采样地点 Sampling site	地理位置 Latitude and longitude	土壤 pH 值 Soil pH value	根样总数 Number of root samples/个
青岛 Qingdao	北纬 36°04'50", 东经 120°23'50"	5.6	60
泰安 Tai'an	北纬 36°12'91", 东经 117°05'41"	6.1	60
威海 Weihai	北纬 37°31'47", 东经 122°07'51"	5.5	60
烟台 Yantai	北纬 37°23'24", 东经 121°40'20"	5.8	60

### 1.2 试验方法

1.2.1 样株采集方法 采样的方法为三点或五点混合采样法。在某一地区某种蓝莓种植区内选取 3 个或 5 个(根据蓝莓株龄选取)采集点,采样前除去土壤表层枯枝落叶等杂物后,将表层 10~20 cm 的土层(即没有根系的土壤)铲去,然后在距植物根系 5~10 cm、土表下 25 cm 左右的范围内,挑选其中较嫩的细根及其土样,并记录采样时间、地点和采集样品种类,土样用于 pH 分析,细根带回实验室后立即进行分离。

1.2.2 内生真菌的分离及纯化 内生真菌的分离采用常规的组织分离法<sup>[14]</sup>。取新鲜的蓝莓根样分别用流水冲洗干净,用滤纸吸干水分;剪成适当大小,用无菌水冲洗 3 次,在 10% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中消毒 10 min,用无菌水冲洗 3 遍,转入 6% 的次氯酸钠溶液中浸泡 2 min,然后用无菌水冲洗 3~5 遍,放在无菌的滤纸片上,吸干表面水分。用无菌剪刀剪成 1 cm 左右的根段,接到分离培养基上。同时,取少量最后一次用于清洗蓝莓根样的“无菌水”涂布到空白平板上,并再打开一个新的空白平板,放置在超净工作台上 15 min。在相同条件下培养,如果涂布有“无菌水”的平板和空白平板上无任何菌落长出,而经过剪切的蓝莓根样伤口处长出真菌,则认为所分离到的真菌为蓝莓根系内生真菌,而不是蓝莓根系表面或空气中的附生菌。在 23℃ 的恒温箱中培养 3~10 d,待根样切口部位有菌丝长出时,用接种针挑取不同形态不同颜色菌落边缘的菌丝转移至新平板上继续纯化培养,直至每一个平板上只含有同一特征的单一菌落为止。

段样品 240 份(表 1)。“蓝丰”和“杜克”是山东的主要栽培品种,且这 2 个品种的种植面积最大。因其果实大、口感好、鲜食保质期长等优点而深受市场和种植户的青睐,该研究以这 2 个栽培品种为目标植物调查其根系内生真菌的多样性,株龄 5~14 年不等,均为盛果期。

1.1.2 培养基 内生真菌分离培养基:蓝莓根系及其周围土壤 50 g(煮汁),马铃薯 200 g(煮汁),葡萄糖 20 g,琼脂 15~20 g,加水定容至 1 000 mL,pH 自然。临用前加入 0.03% 青霉素和 0.05% 链霉素稀释液各 50 mL(无菌)。菌种保藏培养基:马铃薯葡萄糖培养基(PDA):马铃薯 200 g(煮汁),葡萄糖 20 g,琼脂 15~20 g,加水定容至 1 000 mL,pH 自然。

1.2.3 内生真菌培养及 DNA 的提取与序列测定 蓝莓根系内生真菌培养及 DNA 提取参考庄彩云等<sup>[15]</sup>的方法。

1.2.4 根系内生真菌菌株 rDNA ITS 区段的 PCR 扩增、产物纯化及测序 根系内生真菌菌株 rDNA ITS 区段的 PCR 扩增、产物纯化参考李潞滨等<sup>[16]</sup>的方法。PCR 扩增产物直接送北京华大基因发展有限公司切胶纯化测序。

1.2.5 菌种的鉴定 真菌鉴定依据形态特征和 ITS 序列分析相结合的方法。通过平板培养后观察其菌落特征,置于光学显微镜下观察,无性型真菌属的鉴定主要依据 BARNETT 等<sup>[17]</sup>、SUTTON<sup>[18]</sup> 和 ELLIS<sup>[19]</sup> 的分类系统,有性型子囊菌属和担子菌属鉴定的主要依据为《真菌鉴定手册》<sup>[20]</sup>,并根据 KIRK 等<sup>[21]</sup> 追寻真菌属的变动采用目前的属名和定义。菌种经纯化鉴定后,接入保藏培养基 PDA 斜面,4℃ 冰箱中保藏。菌种保藏于鲁东大学农学院微生物菌种保藏室。

### 1.3 数据分析

用分离频率比较和判断根系内生真菌的优势菌群。分离频率(isolation frequency, IF):分离得到的指定根系内生真菌菌株数占分离总根系内生真菌菌株数的百分率。

用 Shannon-wiener 多样性指数( $H'$ )<sup>[22]</sup>、Pielou 均匀度指数( $E'$ )<sup>[23]</sup> 和 Margalef 丰富度指数( $R'$ )分析根系内生真菌的群落生物多样性。 $H' = -\sum P_i \ln P_i$ ,式中: $P_i$  是第  $i$  种的个体数占全部个体数的比例,可以用  $P_i = N_i /$

$N$  求出,  $N_i$  为第  $i$  种物种个体数,  $N$  为全部个体数,  $S$  为每个样品中的物种总数。  $E=H'/\ln S$ , 式中:  $H'$  为 Shannon-wiener 多样性指数、 $S$  为物种总数。  $R=(S-1)/\ln N$ 。 采用 Jaccard 和 Sorenson 相似性系数比较分析两地之间根系内生真菌种类组成的相似情况。  $C_j=c/(a+b-c)$  和  $C_s=2c/(a+b)$  式中:  $c$  是 2 种生境类型中共有的真菌种数或属数;  $a$  和  $b$  分别为 2 种生境类型中真菌种数或属数。

表 2

蓝莓内生真菌的菌群组成

Table 2

Composition of endophytic fungi from blueberry

	目	科	属	分离频率	
	Order	Family	Genus	Isolation frequency/ %	
半知菌 Fungi Imperfecti			青霉属 <i>Penicillium</i>	9.29	
		丛梗孢科 Moniliaceae	木霉属 <i>Trichoderma</i>	10.86	
	丛梗孢目 Moniliales		曲霉属 <i>Aspergillus</i>	0.97	
		瘤座菌科 Tuberculariaceae	镰孢属 <i>Fusarium</i>	31.67	
			交链孢属 <i>Alternaria</i>	3.05	
		暗梗孢科 Dematiaceae	色串孢属 <i>Torula</i>	0.59	
	球壳孢目 Sphaeropsidales	球壳孢科 Sphaeropsidaceae	拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	0.82	
			柱孢属 <i>Cylindrocarpon</i>	0.74	
	黑盘孢目 Melanconiales	黑盘孢科 Melanconiaceae	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	2.83	
		Montagnulaceae	<i>Paraphaeosphaeria</i>	1.26	
	腔菌目 Pleosporales	Pleosporineae	异茎点霉属 <i>Paraphoma</i>	1.64	
			<i>Setophoma</i>	0.30	
	煤炱目 Capnodiales	Cladosporiaceae	枝孢霉属 <i>Cladosporium</i>	8.40	
	葡萄座囊菌目 Botryosphaeriales	葡萄座囊菌科 Botryosphaeriaceae	葡萄座腔菌属 <i>Botryosphaeria</i>	1.34	
		Pseudeurotiaceae	地丝霉属 <i>Geomyces</i>	0.89	
	柔膜菌目 Helotiales	锤舌菌科 Leotiaceae	涛旋孢属 <i>Zalerion</i>	7.14	
	子囊菌 Ascomycetes			<i>Cadophora</i>	0.97
		Chaetosphaeriales	Chaetosphaeriaceae	<i>Chloridium</i>	0.22
间座壳目 Diaporthales		间座壳科 Diaporthaceae	间座壳属 <i>Diaporthe</i>	0.97	
			赤霉菌属 <i>Gibberella</i>	1.34	
肉座菌目 Hypocreales		赤壳菌科 Nectriaceae	丛赤壳属 <i>Nectria</i>	0.89	
		小囊菌科 Microascaceae	<i>Pseudallescheria</i>	1.19	
囊菌目 Microascales			盘多毛孢属 <i>Pestalotia</i>	0.82	
炭角菌目 Xylariales		黑盘孢科 Amphisphaeriaceae	<i>Rhizopycnis</i>	2.30	
			草根霉属 <i>Thielavia</i>	0.45	
曲霉目 Eurotiales		曲霉科 Eurotiaceae	毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	1.04	
球壳菌目 Sphaeriales	毛壳菌科 Chaetomiaceae				
卵菌 Phycomycetes	腐霉目 Pythiales	腐霉科 Pythiaceae	腐霉属 <i>Pythium</i>	0.45	
担子菌 Basidiomycetes	非褶菌目 APhyllophorales	多孔菌科 Polyporales	栓菌属 <i>Trametes</i>	0.89	
	鸡油菌目 Cantharellales	角担菌科 Ceratobasidiaceae	角担菌属 <i>Ceratobasidium</i>	1.26	
无孢类群 Sterile mycelia				5.42	

数的 0.45%;担子菌 2 个属,占菌株总数的 2.15%;子囊菌 17 个属,占菌株总数的 31.16%;无性型真菌 9 属,占菌株总数的 60.82%。

2.2 山东栽培蓝莓根系内生真菌的差异分布

由表 3 对分离获得的各根系内生真菌类群整体分析可知,无性型真菌数量最多,占菌株总数的 60.82%,是山东省栽培蓝莓根系中最大的真菌类群。镰孢属 *Fusarium* 是山东省栽培蓝莓根系中可明确真菌种类中最多的类群,占菌株总数的 31.67%,是栽培蓝莓根系中的优势菌群。而木霉属 *Trichoderma*、青霉属 *Penicillium*、枝孢属 *Cladosporium*、涛旋孢属 *Zalerion* 分别占菌株总

2 结果与分析

2.1 山东栽培蓝莓根系内生真菌的组成

由表 2 可知,从 4 个地区 2 个蓝莓栽培品种的根系中共分离得到内生真菌 1 345 株,经形态特征和分子生物学鉴定后归于 29 属,少数因为不产孢和培养较难而未鉴定出种属的暂归为一类-无孢菌群(*Sterile mycelia*)。分离得到的内生真菌包括卵菌 1 个属,占菌株总

数的 10.86%、9.29%、8.40%、7.14%,是栽培蓝莓根系中的亚优势菌群。而 *Chloridium* 和 *Setophoma* 菌株数分别为 3 和 4,是山东省栽培蓝莓根系中的稀有内生真菌菌群。

不同品种蓝莓根系内生真菌的群落组成和结构存在一定差异,各菌属在不同栽培品种蓝莓根系内的优势度不同,不同栽培品种蓝莓根系内生真菌区系结构也不同,同一栽培品种不同栽培地区其根系内生真菌优势度、群落组成和结构也存在一定差异。在 4 个地区的 2 种栽培蓝莓中,从威海“杜克”蓝莓根系中分离获得的内生真菌丰度最高,达到 23 属。青岛的“蓝丰”

和“杜克”根系中的优势菌群是镰孢属 *Fusarium*, 分离频率分别为 54.73% 和 59.39%。从威海“蓝丰”根系中分离出 22 属内生真菌, 其优势菌群为木霉属 *Trichoderma*、镰孢属 *Fusarium*、青霉属 *Penicillium* 和枝孢属 *Cladosporium*, 分离频率分别为 15.72%、11.32%、

10.06% 和 9.43%。其余地区的栽培蓝莓根系中除木霉属 *Trichoderma*、镰孢属 *Fusarium*、青霉属 *Penicillium* 和枝孢属 *Cladosporium* 外, 涛旋孢属 *Zalerion* 也是优势内生真菌菌群。

表 3 不同地区不同品种蓝莓根系内生真菌菌群的组成及分离频率

Table 3 Composition and isolation frequencies of endophytic fungi of blueberry from different sampling sites and cultivars

真菌属名 Fungal genus	分离频率 Isolation frequency/%							
	青岛 Qingdao		泰安 Tai'an		威海 Weihai		烟台 Yantai	
	“蓝丰”“Bluecrop”	“杜克”“Duke”	“蓝丰”“Bluecrop”	“杜克”“Duke”	“蓝丰”“Bluecrop”	“杜克”“Duke”	“蓝丰”“Bluecrop”	“杜克”“Duke”
交链孢属 <i>Alternaria</i>	0.00	1.31	6.38	7.95	3.14	4.02	0.70	2.70
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	0.50	0.87	0.00	0.00	2.52	3.45	0.00	0.00
葡萄座腔菌属 <i>Botryosphaeria</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	2.52	4.60	1.41	2.70
<i>Cadophora</i>	0.00	0.00	0.71	1.99	3.77	1.72	0.00	0.00
角担菌属 <i>Ceratobasidium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	4.40	1.72	2.82	2.03
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	1.49	0.00	0.00	0.00	1.26	5.17	0.00	0.00
<i>Chloridium</i>	1.00	0.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
枝孢属 <i>Cladosporium</i>	8.96	6.11	7.09	9.93	9.43	5.75	9.86	11.49
柱孢属 <i>Cylindrocarpon</i>	0.00	0.00	1.42	2.65	1.89	0.57	0.00	0.00
间座壳属 <i>Diaporthe</i>	0.50	1.31	0.00	0.00	2.52	2.87	0.00	0.00
镰孢属 <i>Fusarium</i>	54.73	59.39	28.37	19.21	11.32	12.07	21.13	28.38
地丝霉属 <i>Geomyces</i>	0.00	0.00	1.42	2.65	0.63	2.87	0.00	0.00
赤霉菌属 <i>Gibberella</i>	1.99	2.18	0.71	1.99	2.52	0.57	0.00	0.00
丛赤壳属 <i>Nectria</i>	1.49	0.00	0.00	0.00	4.40	1.15	0.00	0.00
<i>Paraphaeosphaeria</i>	0.50	0.87	1.42	4.64	1.26	1.72	0.00	0.00
异茎点霉属 <i>Paraphoma</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	4.40	4.60	2.82	2.03
青霉属 <i>Penicillium</i>	6.97	6.55	12.77	9.27	10.06	10.92	8.45	11.49
盘多毛孢属 <i>Pestalotia</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.93	2.70
拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	1.99	0.87	0.71	1.99	0.00	0.00	11.97	7.43
拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.30	2.82	2.03
<i>Pseudallescheria</i>	1.99	0.87	0.00	0.00	1.89	0.00	3.52	1.35
腐霉属 <i>Pythium</i>	0.00	1.31	0.00	0.00	0.63	1.15	0.00	0.00
<i>Rhizopycnis</i>	1.49	0.00	5.67	6.62	0.63	1.15	2.82	2.03
<i>Setophoma</i>	0.50	1.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
木霉属 <i>Trichoderma</i>	6.47	7.42	14.89	11.92	15.72	10.92	12.68	10.14
草根霉属 <i>Thielavia</i>	1.00	1.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
色串孢属 <i>Torula</i>	1.49	1.75	0.00	0.00	0.00	0.57	0.00	0.00
栓菌属 <i>Trametes</i>	0.00	0.00	0.71	2.65	2.52	1.72	0.00	0.00
涛旋孢属 <i>Zalerion</i>	4.98	3.49	7.80	8.61	7.55	8.05	10.56	8.78
无孢菌群 Sterile mycelia	1.99	2.18	9.93	7.94	5.03	10.34	3.52	4.73

## 2.3 山东栽培蓝莓根系内生真菌多样性分析

2.3.1 栽培蓝莓根系内生真菌菌群多样性指数 从表 4 可以看出, 山东省 4 个采样地区间的栽培蓝莓根系内生真菌种群多样性水平存在差异。从真菌属的数量上

看, 2 种栽培蓝莓的根系中分离获得的根系内生真菌属丰度一致, 为 29 属。考虑采样地点不同时, 从威海“杜克”的根系中分离获得的内生真菌为 23 属, 丰度最高; 从威海“蓝丰”的根系中分离获得的内生真菌属丰度最高,

表 4 蓝莓根系内生真菌菌群的多样性指数

Table 4 The diversity indices of endophytic fungi in roots of blueberry

采样地点 Sampling sites	蓝莓品种 Cultivars of blueberry	菌株种数 Species	多样性指数 Diversity index	丰富度指数 Richness index	均匀度指数 Evenness index
青岛 Qingdao	“蓝丰”“Bluecrop”	18	1.818 1	3.205 5	0.629 0
	“杜克”“Duke”	17	1.694 0	2.944 6	0.597 9
泰安 Tai'an	“蓝丰”“Bluecrop”	15	2.179 7	2.829 0	0.804 9
	“杜克”“Duke”	14	2.478 2	2.591 0	0.939 1
威海 Weihai	“蓝丰”“Bluecrop”	22	2.800 4	4.142 9	0.906 0
	“杜克”“Duke”	23	2.835 9	4.264 3	0.904 5
烟台 Yantai	“蓝丰”“Bluecrop”	14	2.400 2	2.623 2	0.909 5
	“杜克”“Duke”	14	2.304 8	2.601 4	0.873 3



为 22 属;泰安和烟台 2 种栽培蓝莓的根系中分离获得的内生真菌属丰度最低,为 14 属。威海“杜克”的多样性指数( $H'$ )和丰富度指数( $R$ )最高,分别为 2.835 9 和 4.264 3,而泰安“杜克”的均匀度指数( $E$ )最高,为 0.939 1。

2.3.2 栽培蓝莓根系内生真菌菌群组成相似性系数  
通过对 2 种相似性系数 Jaccard 指数和 Sorenson 指数的计算分析,发现从 4 个采样地区分离获得的内生真菌菌群的相似性系数在 0.33~0.73(表 5),其中威海和青岛之间的内生真菌菌群具有较高的相似性,它们之间的 Jaccard 指数和 Sorenson 指数分别为 0.57 和 0.73。根据相似性原理,各地区之间的内生真菌相似性系数处于中等不相似与中等相似之间。总体来看,山东省 4 个采样地区的栽培蓝莓根系内生真菌种群相似性较低。

表 5 蓝莓根系内生真菌种类  
组成在地区间的相似性系数

Table 5 The similarity coefficients of endophytic fungi in roots of Blueberry from different sampling sites

采样地点 Sampling site	青岛 Qingdao	泰安 Tai'an	威海 Weihai	烟台 Yantai
青岛 Qingdao		0.42	0.57	0.36
泰安 Tai'an	0.59		0.52	0.40
威海 Weihai	0.73	0.68		0.33
烟台 Yantai	0.53	0.57	0.63	

注:表中对角线以上为 Jaccard 指数,以下为 Sorenson 指数。

Note: Jaccard index(above diagonal) and Sorenson index(below diagonal).

### 3 结论与讨论

该试验对山东栽培蓝莓根系内生真菌资源进行了调查研究,从 2 种栽培蓝莓根系分离鉴定出内生真菌 29 属,对不同蓝莓栽培品种以及不同地区蓝莓根系内生真菌的种类组成、区系分布和多样性特点进行比较分析。研究表明,镰孢属 *Fusarium* 是山东栽培蓝莓根系内生真菌的优势菌群,木霉属 *Trichoderma*、青霉属 *Penicillium*、枝孢属 *Cladosporium*、涛旋孢属 *Zalerion* 是亚优势菌群。袁军<sup>[24]</sup>对重庆缙云山越橘属植物的研究也同样分离出青霉属 *Penicillium* 真菌。不同品种的蓝莓根系存在丰富的真菌资源,不同栽培品种蓝莓根系内生真菌的种群组成和结构存在一定差异;各内生真菌属在不同品种中的优势度不同,不同栽培品种蓝莓根系内生真菌区系结构存在差异。这种差异性可能是由不同蓝莓品种与真菌共生的专一性造成的,这种专一性还有待于进一步深入研究。考虑到不同植物应有特定的专一性内生真菌物种,在今后的内生真菌资源多样性研究中,应采用多种选择性分离培养基并将内生真菌鉴定到种的层次,将会使研究结果更精确完整。

2 个栽培蓝莓品种内生真菌组成中,其中有些是重要的植物病原菌,一般情况下,这些内生真菌不会对植物造成危害,但若在适宜条件下,它们可能会转化成植物病原菌。如 *P. vaccinii*, *B. dothidea*, *F. solani* 是“杜

克”品种中较为常见的种类, *P. vaccinii* 寄生在多种蓝莓上,是蓝莓拟茎点枝枯病的病原菌,对蓝莓生产造成极大损失<sup>[25]</sup>。 *B. dothidea* 可引起蓝莓枝干溃疡病,极大影响蓝莓的生产与效益<sup>[26]</sup>。 *F. solani* 也是重要的植物病原菌,可以侵染很多种植物,如复叶槭(*Acer negundo*)、茄(*Solanum melongena*)根腐、川芎(*Ligusticum sinense*)根腐等病害都是该病菌侵染所致,而且危害相当严重<sup>[27-29]</sup>。

近年来,从植物内生真菌中筛选出具有生防功能的菌株的研究逐渐得到研究人员的重视<sup>[30-32]</sup>。木霉菌(*Trichoderma*)是非常重要的生防菌,有研究指出,它可以通过营养竞争、抗生素作用促进植物生长或者诱导抗性等方式保护寄主<sup>[33-34]</sup>。该研究获得包括木霉类在内的大量内生真菌资源,为进一步开展生物防治菌株的筛选、开发与利用,以及真菌生物活性物质筛选等工作打下坚实基础。

随着山东蓝莓种植面积的不断扩大,栽培品种的不断丰富,关于不同地区不同品种蓝莓根系内生真菌的多样性和专一性的研究越来越重要,该研究为蓝莓根系内生真菌多样性的研究提供理论支撑。另外,在以上分离工作的基础上,将进一步对分离出的内生真菌进行研究,如内生真菌与蓝莓的共生机制,进而研究开发促进蓝莓生长的真菌制剂产品,为蓝莓大面积栽培提供技术支持。

### 参考文献

- [1] PETRINI O. Fungal Endophytes of Tree Leaves[M]//In: ANDREWS J H, HIRANO S S, eds. Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer-Verlag, 1991: 179-197.
- [2] 李永, 朴春根, 贺伟, 等. 2 个欧美杨品种树皮内生真菌多样性及优势种群动态变化[J]. 林业科学, 2013, 49(6): 90-96.
- [3] GENNARO M, GONTHIER P, NICOLOTTI G. Fungal endophytic communities in healthy and declining *Quercus robur* L. and *Q. cerris* L. trees in northern Italy[J]. Journal of Phytopathol, 2003, 151: 529-534.
- [4] LI W C, ZHOU J, GUO S Y, et al. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing[J]. China Fungal Divers, 2007, 25: 69-80.
- [5] BAYAT F, MIRLOHI A, KHODAMBASHI M. Effects of endophytic fungi on some drought tolerance mechanisms of tall fescue in a hydroponics culture[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2009, 56(4): 510-516.
- [6] LI H Y, LI D W, HE C M, et al. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China[J]. Fungal Ecology, 2012, 5(3): 309-315.
- [7] PURAHONG W, HYDE K D. Effects of fungal endophytes on grass and non-grass litter decomposition rates[J]. Fungal Diversity, 2011, 47: 1-7.
- [8] HATA K, ATARI R, SONE K. Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and within-leaf distributions[J]. Mycoscience, 2002, 43: 369-373.
- [9] COLLADO J, PLATAS G, PELÁEZ F. Host specificity in fungal endophytic populations of *Quercus ilex* and *Quercus faginea* from central Spain[J]. Nova Hedwigia, 2000, 71: 421-430.

- [10] 顾娟,贺善安. 蓝浆果与蔓越橘[M]. 北京:中国农业出版社,2001:1-3.
- [11] 余磊,赵建荣,RARISARA I,等. 蓝莓枝枯病原菌鉴定[J]. 植物病理学报,2014,43(4):421-425.
- [12] 陈小妹. 中国菌物学会[C]. 学术年会论文摘要集,2009.
- [13] 肖军,杨涛,杨镇,等. 蓝莓菌根菌的分离与回接试验[J]. 辽宁农业科学,2012(5):13-16.
- [14] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998:122-137.
- [15] 庄彩云,李潞滨,胡陶,等. 适用于 rDNAITS 分析的兰属菌根真菌培养及 DNA 提取方法[J]. 北京农学院学报,2007,22(3):4-6,31.
- [16] 李潞滨,胡陶,唐征,等. 我国部分兰属植物菌根真菌 rDNAITS 序列分析[J]. 林业科学,2008,44(2):160-164.
- [17] BARNETT H L, HUNTER B B. Illustrated genera of imperfect fungi [M]. 4 Edition. APS Press, St. Paul, 1998:1-218.
- [18] SUTTON B C. The Coelomycetes[M]. London:Commonwealth Mycological Institute, 1980:1-696.
- [19] ELLIS M B. More Dematiaceous Hyphomycetes[M]. CMI, Kew, Surrey, England, 1976:1-507.
- [20] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学出版社,1979.
- [21] KIRK P M, CANNON P F, MINTER D W, et al. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi[M]. 10th edition. CAB International, Egham, 2008:1-771.
- [22] SHANNON C E. A mathematical theory for communication[J]. Bell System Technical Journal, 1948, 27:379-423, 623-656.
- [23] PIELOU E C. The measurement of diversity in different types of biological collections[J]. Journal of Theoretical Biology, 1966(13):131-144.
- [24] 袁军. 越橘根系内生真菌分离及其对越橘生长结果的影响[D]. 重庆:西南农业大学, 2005:28-35.
- [25] 岳清华,赵洪海,梁晨,等. 蓝莓拟茎点枝枯病的病原[J]. 菌物学报, 2013, 32(6):959-966.
- [26] 徐成楠,周宗山,张红军,等. 蓝莓枝干溃疡病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2012, 42(5):532-535.
- [27] 王勇,杨依军,杨秀荣,等. 茄根腐病致病病原-茄病镰孢菌及其蓝色变种的分离与鉴定[J]. 天津农业科学, 2000, 6(3):4-6.
- [28] DEMIRCI F, MADEN S. A severe dieback of box elder (*Acer negundo*) caused by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. in Turkey [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2006, 1(1):13-15.
- [29] 冯茜,黄云,巩春梅,等. 川芎根腐病菌(*Fusarium solani*)的生物学特性[J]. 四川农业大学学报, 2008, 26(1):24-27.
- [30] BAILEY B A, BAE H, STREME M D, et al. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biocontrol potential in *Theobroma cacao* [J]. Biological Control, 2008, 46(1):24-35.
- [31] HANADA R E, de JORGE S T, POMELLA A W V, et al. *Trichoderma martiale* sp. Nov. a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control[J]. Mycological Research, 2008, 112(11):1335-1343.
- [32] 慕东艳,吕国忠,孙晓东,等. 黑龙江省药用植物根际土壤真菌多样性[J]. 生态学报, 2013, 33(1):229-237.
- [33] PAPAIZAS G C. *Trichoderma* and *Gliocladium*; biology, ecology, and potential for biocontrol[J]. Annual Review of Phytopathology, 1985, 23(1):23-54.
- [34] WHIPPS J M, LUMSDEN R D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects[M]// Butt T M, JACKSON C W, MAGAN N, eds. Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2001:9-22.

## Diversity of Endophytic Fungi in Roots of Blueberry

LIU Fenghong

(Agricultural College, Ludong University, Yantai, Shandong 264025)

**Abstract:** Shandong is one of the major blueberry growing areas in China. By the end of 2014, the planting area was about 3 000 hm<sup>2</sup> and the annual production was about 50 000 tons. In order to explore the community structure and distribution pattern of endophytic fungi in roots of blueberry, healthy root samples were collected from four main planting locations, which were Qingdao, Tai'an, Weihai and Yantai. The sampled blueberry belonged to 2 cultivars, viz., 'Bluecrop' and 'Duke'. A total of 1 345 strains of endophytic fungi were isolated from root samples. Based on morphological methods and molecular techniques, 29 genera were identified, including one genus of Oomycetes (0.45%), two genera of Basidiomycetes (2.15%), seventeen genera of Ascomycetes (31.16%), nine genera of Fungi Imperfecti (60.82%), the residual 5.42% of all isolates were not identified. The results showed that plentiful fungal diversity was present in the roots of cultivated blueberry plant in Shandong Province, of which the species in *Fusarium* was the predominant groups of endophytic fungi, its relative isolation frequency was 31.67%. The species of *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* and *Zalerion* were the subdominant groups. The fungal population structures and composition of endophytic fungi varied with cultivars and sites, and also had regularity to a certain extent. *Fusarium* occurred in all the 2 investigated blueberry plants. The fungal diversities in roots of the two blueberry plants all grown in four investigated sites were significantly different. 'Duke' of Weihai was the highest in Shannon diversity index ( $H' = 2.8359$ ) and Margalef richness index ( $R = 4.2643$ ). 'Duke' of Tai'an was the highest in Pielou evenness index ( $E = 0.9391$ ). The similarity coefficients of fungal populations in roots of blueberry were highest in Weihai and Qingdao ( $C_j = 0.57$  and  $C_s = 0.73$ ).

**Keywords:** isolation frequency; dominant population; diversity index; similarity coefficient