

# 宁夏枸杞内生真菌的分离及多样性分析

徐全智, 孙牧笛, 李 帆, 高 媛, 顾沛雯

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

**摘 要:**以枸杞为试材,采用组织分离法从不同品种、不同部位的枸杞组织中进行内生真菌的分离,根据培养性状、菌落、孢子等的形态特征和 rDNA-ITS 序列分析对分离菌株进行鉴定;根据枸杞内生真菌的相对频率、物种多样性指数、丰富度指数和相似性系数分析其组成特点。结果表明:21 份枸杞样品中共分离得到 363 株内生真菌,这些菌株分属于链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)、双极霉属(*Bipolaris*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)、枝孢属(*Cladosporium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、青霉菌属(*Penicillium*)、光黑壳属(*Preussia*)、裂壳菌属(*Schizothecium*)、粪壳菌属(*Sordaria*)、戴氏霉属(*Taifanglania*)、梭孢壳属(*Thielavia*)、火丝菌属(*Tricharina*)和炭角菌属(*Xylaria*)14 个属,其中链格孢属(*Alternaria*)、梭孢壳属(*Thielavia*)和曲霉属(*Aspergillus*)为优势属,分别占分离菌数的 46%、14%和 13%。枸杞植株各器官都有内生真菌分布,其中,茎部内生真菌多样性指数最大,为 0.86,且果与茎部的相似性系数最大。不同枸杞品种间内生真菌分布存在差异,“宁杞 1 号”“宁杞 2 号”内生真菌多样性指数和丰富度指数远远高于黄果枸杞和黑果枸杞。内生真菌群落组成的相似性结果表明,部分内生真菌具有一定的宿主和组织偏好性。枸杞体内含有丰富的内生真菌资源,其内生真菌具有很高的宿主特异性,而且其分布受生境影响。

**关键词:**枸杞;内生真菌;多样性;rDNA-ITS

**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)10-0103-07

1993 年,STIERLE 等<sup>[1]</sup>首次报道了从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)的树皮中分离出一株内生真菌(*Taxomyces andreanae*)能产生紫杉醇(taxol),使人们对植物内生真菌有了更深刻的了解,掀起了从

植物内生真菌中寻找新物质的热潮。短短十几年来,一批新的抗肿瘤、抗菌、抗虫等生物活性物质先后从内生真菌中分离出来。药用植物内生真菌成为医药、环境和农业等领域的天然资源菌,具有广阔的理论研究价值和开发应用前景。

植物内生真菌在植物组织中普遍存在,具有丰富的物种多样性,其多样性受多种因素的影响。不同的区域或位点、气候条件、植被等均可影响内生真菌类群的多样性。内生真菌与宿主植物在长期的生态系统演化过程中形成了互惠共生关系,可促进植物生长、增强抗病能力、提高抗逆性等,因此内生真菌在植物演替过程中具有重要的生态学意义<sup>[2]</sup>。

**第一作者简介:**徐全智(1991-),男,山东德州人,硕士研究生,研究方向为生物防治与菌物资源利用。E-mail:981472068@qq.com.

**责任作者:**顾沛雯(1969-),女,宁夏银川人,博士,教授,现主要从事植物病理学等研究工作。E-mail:gupeiwen2013@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31460484)。

**收稿日期:**2017-02-09

temperature of 59 °C for 90 minutes. The other five viruses that also infect cucurbitaceae crops were used to assay the specificity of this method. Diluted nucleic acid solution with certain concentration was used as template to confirm the sensitivity of this method. The results showed that nucleic acid strip was a special method to distinguish CGMMV from the other five plant virus which also infect cucurbitaceae crops, CMV, PMMoV, TMV, ToMV and ZYMV. And the sensibility of this method was 24.300 ng · μL<sup>-1</sup> of total RNA. Thus, nucleic acid strip was a rapid, special and sensitive detection method for CGMMV and can be used in routine testing.

**Keywords:** cucumber green mottle mosaic virus; nucleic acid test strip; detection

枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科枸杞属多年生落叶灌木植物,是西北地区独特的沙生药用植物,目前国内外对枸杞的研究主要集中在对其化学成分、抗逆性、抗氧化性及其相关功能产品的研究上<sup>[3-5]</sup>,对其内生真菌的研究较少。2011年,刘建利等<sup>[6]</sup>进行了枸杞内生真菌的分离和抗氧化性菌株的筛选,发现4株枸杞内生真菌发酵产物均能对·OH自由基产生清除作用。2013年,王维等<sup>[7]</sup>从藏药黑果枸杞中分离鉴定内生真菌,并对其抑菌活性进行了研究。2014年,祁鹤兴等<sup>[8]</sup>从枸杞果中分离得到了29株内生真菌,经rDNA-ITS序列分析发现枸杞内生真菌以链格孢属(*Alternaria*)菌株最多。为了深入了解内生真菌在其宿主枸杞体内的生态功能和作用机制,更好地利用枸杞内生真菌资源和挖掘其潜在的重要经济价值,该研究在宁夏枸杞研究所品种园和银川森森枸杞园选择了5个栽培枸杞品种和2个野生枸杞品种作为研究对象,分析它们的内生真菌种类组成及其分布特点,以期对枸杞内生真菌的合理开发和利用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料:2015年5—7月,从宁夏枸杞研究所品种园采集枸杞栽培品种“宁杞1号”和2个野生品种:黄果枸杞(*Lycianthes barbatum* L. var. *auranti-carpum* K. F. Ching)、黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)以及银川市森森枸杞园的4个枸杞栽培品种“宁杞2号”“宁杞5号”“宁杞7号”“宁杞8号”(所有品种均由宁夏回族自治区林木品种审定委员会审定)的健康枝条。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(简称PDA)、燕麦琼脂培养基(简称OA)、植物汁液培养基(简称ZYP,PDA添加1%枸杞茎叶汁液)的成分及配制参照微生物学实验手册<sup>[9-10]</sup>。

### 1.2 试验方法

1.2.1 样品采集 采用随机取样法进行。在枸杞园中随机选取除去边行之外的5行,每行每品种随机选取5株,随机采集每株上、中和下不同部位枝条,7个品种每品种3个部位,共计21份。置于保鲜袋内带回实验室,于4℃保存,分别于采集后3d内按茎、叶、果3个部位分离内生真菌。

1.2.2 枸杞内生真菌的分离和纯化 选取健康枸杞植株的茎、叶和果部,用清水洗去污垢后,在超净工作台上用无菌水冲洗数次,用消毒灭菌的剪刀剪

成0.25~0.50 cm<sup>2</sup>的小块,用75%(v/v)的酒精浸泡30 s消除表面气泡,再用3%(m/v)的次氯酸钠浸泡6 min,立即用无菌水洗涤3~5次,置于PDA、OA、ZYP 3种固体培养基上。每皿放置7块组织块,3次重复,最后一遍无菌水洗涤液涂板检测有无杂菌污染,在28℃条件下恒温培养1周后,从分离的枸杞内生真菌菌落边缘处,切取菌丝到新的培养基上进行纯化。

1.2.3 枸杞内生真菌的分类鉴定 形态学鉴定:根据菌落培养特征和菌丝、孢子及产孢结构等的形态特征进行鉴定<sup>[9-10]</sup>。分子生物学鉴定:使用Biospin真菌基因组DNA提取试剂盒(购于上海基峰生物科技)提取枸杞果内生真菌基因组DNA。利用引物ITS<sub>1</sub>:5'-TCCGATGGTGAACCTGCGG-3'和ITS<sub>2</sub>:5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3'扩增序列,PCR产物回收,由上海Invitrogen生物公司进行测序,测得序列提交到GenBank,并在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>网站上进行序列分析,获得相似序列后用DNAMAN 6.0.3.48软件进行多序列比对,采用邻接法(neighbour-Joining)构建系统发育树。

### 1.3 项目测定

定殖率(colonization rate, CR, %)=分离菌数/分离样数×100。相对频率(relative frequency, RF, %)=品种(部位)内生真菌各属的分离数/品种(部位)内生菌分离总数×100。RF>10%的属定义为某样区的优势属,5%≤RF≤10%定义为常见属,RF<5%定义为稀有属。

多样性指数(H)采用Shannon-weiner指数:

$$H = - \sum_{i=1}^k P_i \times \ln P_i$$

其中k是某品种(部位)分离到的内生真菌物种数量,  $P_i$ 是指该品种(部位)某种内生真菌菌株数量占该品种(部位)所有分离到内生真菌菌株总数的百分比。

丰富度指数(D)采用Margalef指数:  $D = (S - 1) / \ln N$ , 其中S为物种数, N为种群中所有物种个体总数。物种相似性系数采用Sorenson's similarity coefficient (CS)表示:  $CS = 2j / (a + b)$ , 式中,j是2个品种共同分离到的内生真菌属数,a为一品种内分离的内生真菌属数,b为另一品种内分离的内生真菌属数。

### 1.4 数据分析

聚类分析采用SPSS 19.0统计软件进行,将内生真菌的物种数量(S)、个体数量(N)、定殖率(CR)、相对频率(RF)作为变量,以马氏距离(Mahalanobis distance)为距离系数,采用类平均法(UPGMA)的聚

类方法,对各品种及分离组织的相似性进行系统聚类分析(hierarchical cluster analysis)。

## 2 结果与分析

### 2.1 枸杞内生真菌的组成

根据培养性状、菌落、孢子等的形态特征对菌株进行鉴定,分离得到 363 株内生真菌,其中 236 株内生真菌能够产生分生孢子及分生孢子梗等无性繁殖结构,根据分生孢子及分生孢子梗的形态对其进行形态学鉴定,其中链格孢属(*Alternaria*)157 株,曲霉属(*Aspergillus*)50 株,枝孢属(*Cladosporium*)14 株,镰刀菌属(*Fusarium*)11 株,戴氏霉属(*Taifanglania*)4 株。利用 rDNA-ITS 序列分析进行进一步鉴

定,这些菌株分属于链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)、双极霉属(*Bipolaris*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)、枝孢属(*Cladosporium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、青霉菌属(*Penicillium*)、光黑壳属(*Preussia*)、裂壳菌属(*Schizothecium*)、粪壳菌属(*Sordaria*)、戴氏霉属(*Taifanglania*)、梭孢壳属(*Thielavia*)、火丝菌属(*Tricharina*)和炭角菌属(*Xylaria*)14 个属。其中链格孢属(*Alternaria*)、梭孢壳属(*Thielavia*)和曲霉属(*Aspergillus*)为优势属,分别占分离菌数的 46%、14%和 13%;毛壳属(*Chaetomium*)为常见属,占分离菌数的 10%以上;其它各属都为稀有属,所占分离菌数的比例不足 5%(图 1)。

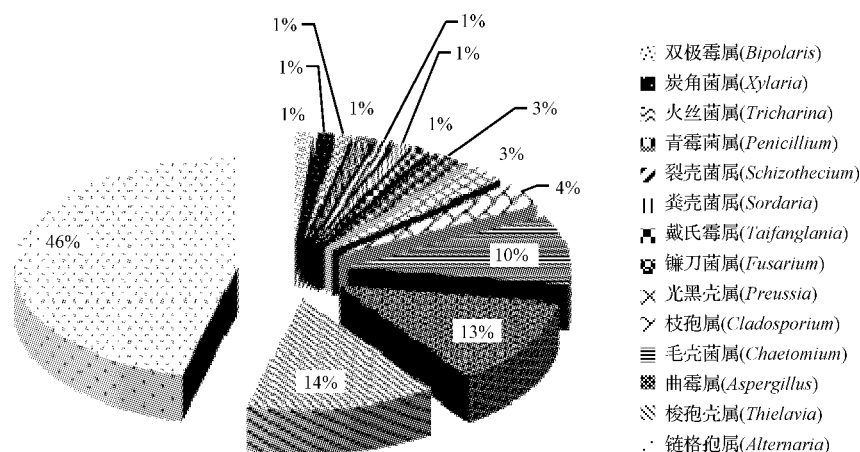


图 1 宁夏枸杞内生真菌的组成分布

Fig. 1 Composition distribution of endophytic fungus from *L. barbarum* L.

### 2.2 枸杞内生真菌分布的差异性

2.2.1 枸杞内生真菌在不同组织部位的分布 由表 1 可知,枸杞植株各器官都有内生真菌分布,所得到的 363 株内生真菌中,叶部分布最多共 145 株,分属于 10 个属;其次是茎部,分离到 128 株,分属于 10 个属;果部最少,分离到 90 株,分属于 3 个属。链格孢属(*Alternaria*)在枸杞的各器官中都有分布,是茎、叶和果 3 个部位的优势属,其相对频率依次为 28.1%、48.3%和 56.7%;曲霉属(*Aspergillus*)在枸杞植株的各器官都有分布,是茎和果部位的优势属;毛壳菌属(*Chaetomium*)和梭孢壳属(*Thielavia*)是茎和叶部的优势属;双极霉属(*Bipolaris*)、青霉菌属(*Penicillium*)、光黑壳霉属(*Preussia*)、粪壳菌属(*Sordaria*)、戴氏霉属(*Taifanglania*)、火丝菌属(*Tricharina*)和炭角菌属(*Xylaria*)仅在茎部或叶部中分离到,相对频率均低于 4.8%,为枸杞茎、叶部的稀有属,表现出一定的组织特异性和偏好性。由表 1

还可知,枸杞茎部、叶部和果部内生真菌的多样性指数和丰富度指数以茎部最高,分别为 0.86 和 4.75;其次叶部,为 0.77 和 4.63;最后为果部,为 0.41 和 1.02。不同器官间内生真菌的相似性系数如表 2 所示,枸杞茎部和叶部内生真菌最为丰富,并且茎部与果部的内生真菌相似性系数最大,为 0.55;其次为茎部和叶部,为 0.43;叶部与果部相似性系数最小,为 0.29。

2.2.2 枸杞内生真菌在不同品种中的分布 由表 3 可知,在采集的 7 个枸杞品种中,野生枸杞品种分离得到的内生真菌数普遍大于栽培品种,相对频率分别为 20.9%和 13.8%,但 2 个野生枸杞品种分离得到的内生真菌属的数量相对较少,为 3~4 个属,而栽培枸杞品种分离到的内生真菌属的数量为 4~9 个属。7 个枸杞品种中,黄果枸杞分离得到的内生真菌数最多,其次为“宁杞 5 号”和“宁杞 1 号”,内生真菌相对频率都在 15%以上。链格孢属(*Alternaria*)和曲霉属(*Aspergillus*)在野生品种及栽培品种中均有

表 1

枸杞植株不同器官内生真菌的相对频率

Table 1 Relative frequency of endophytic fungi of different separated positions from *L. barbarum* L.

属名 Genus	分离部位 Fraction		
	茎 Stem	叶 Leaf	果 Fruit
链格孢属 <i>Alternaria</i> / %	28.1	48.3	56.7
曲霉属 <i>Aspergillus</i> / %	11.7	4.3	31.1
双极霉属 <i>Bipolaris</i> / %	0.0	2.8	0.0
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i> / %	19.5	9.7	0.0
枝孢属 <i>Cladosporium</i> / %	2.3	0.0	12.2
镰刀菌属 <i>Fusarium</i> / %	3.1	4.8	0.0
青霉菌属 <i>Penicillium</i> / %	3.1	0.0	0.0
光黑壳属 <i>Preussia</i> / %	0.0	4.8	0.0
裂壳菌属 <i>Schizothecium</i> / %	0.0	2.8	0.0
粪壳菌属 <i>Sordaria</i> / %	0.0	2.8	0.0
戴氏霉属 <i>Taifanglania</i> / %	3.1	0.0	0.0
梭孢壳属 <i>Thielavia</i> / %	22.6	16.6	0.0
火丝菌属 <i>Tricharina</i> / %	3.1	2.8	0.0
炭角菌属 <i>Xylaria</i> / %	3.1	0.0	0.0
多样性指数 Shannon-Wiener index(H)	0.88	0.77	0.41
丰富度指数 Margalef index(D)	4.75	4.63	1.02

表 2 枸杞植株不同器官间内生真菌的相似性系数

Table 2 Similarity coefficient of endophytic fungi of different separated positions from *L. barbarum* L.

	茎 Stem	果 Fruit
叶 Leaf	0.43	0.29
果 Fruit	0.55	

分布,为枸杞各品种共有属,其中链格孢属为优势属;毛壳菌属(*Chaetomium*)和梭孢壳属(*Thielavia*)仅在栽培品种中分离得到,为各品种中常见属,且在“宁杞 5 号”“宁杞 7 号”品种中为优势属。7 个枸杞品种内生真菌物种多样性指数介于 0.30~0.90,丰

富度指数介于 1.08~5.20(表 3)。物种多样性指数和丰富度指数恰好反映了枸杞内生真菌数量和种类的丰富程度。“宁杞 1 号”品种的内生真菌物种多样性指数和丰富度指数最大,分别为 0.90 和 5.20,而黄果枸杞的多样性指数和丰富度指数最小,分别为 0.30 和 1.08。说明“宁杞 1 号”品种内生真菌最为丰富。由表 4 可知,7 个枸杞品种中内生真菌群落的相似性系数介于 0.29~1.00,其中“宁杞 5 号”与“宁杞 7 号”相似性系数最高,为 1.00,说明 2 个品种的内生真菌可能具有相同的遗传背景。

表 3 不同枸杞品种中内生真菌的相对频率

Table 3 Relative frequency of endophytic fungi of different separated variety from *L. barbarum* L.

属名 Genus	野生枸杞品种 Varieties of wild medlar		栽培枸杞品种 Varieties of cultivated medlar				
	黄果枸杞	黑果枸杞	“宁杞 1 号”	“宁杞 2 号”	“宁杞 5 号”	“宁杞 7 号”	“宁杞 8 号”
	<i>Lycianthes barbatum</i> var. K.	<i>Lycium ruthenicum</i> Murr.	‘Ningqi 1’	‘Ningqi 2’	‘Ningqi 5’	‘Ningqi 7’	‘Ningqi 8’
链格孢属 <i>Alternaria</i> / %	75.7	62.1	38.1	34.6	15.2	47.2	13.8
曲霉属 <i>Aspergillus</i> / %	18.6	13.8	4.8	7.7	15.2	13.2	13.8
双极霉属 <i>Bipolaris</i> / %	0.0	13.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i> / %	0.0	0.0	8.3	21.2	45.7	0.0	0.0
枝孢属 <i>Cladosporium</i> / %	0.0	0.0	0.0	7.7	0.0	18.9	0.0
镰刀菌属 <i>Fusarium</i> / %	0.0	0.0	8.3	7.7	0.0	0.0	0.0
青霉菌属 <i>Penicillium</i> / %	0.0	0.0	4.8	0.0	0.0	0.0	0.0
光黑壳属 <i>Preussia</i> / %	0.0	10.3	4.8	0.0	0.0	0.0	0.0
裂壳菌属 <i>Schizothecium</i> / %	0.0	0.0	0.0	7.7	0.0	0.0	0.0
粪壳菌属 <i>Sordaria</i> / %	5.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
戴氏霉属 <i>Taifanglania</i> / %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.8
梭孢壳属 <i>Thielavia</i> / %	0.0	0.0	13.1	7.7	23.9	20.8	58.6
火丝菌属 <i>Tricharina</i> / %	0.0	0.0	13.1	0.0	0.0	0.0	0.0
炭角菌属 <i>Xylaria</i> / %	0.0	0.0	4.8	0.0	0.0	0.0	0.0
相对频率 Relative frequency/ %	20.9	13.8	16.8	9.6	18.7	7.4	12.7
多样性指数 Shannon-Wiener index(H)	0.30	0.47	0.90	0.76	0.55	0.55	0.49
丰富度指数 Margalef index(D)	1.08	2.05	5.20	3.50	2.41	2.32	2.05

表 4

枸杞不同品种间内生真菌的相似性系数

Table 4

Similarity coefficient of endophytic fungi of different separated varieties from *L. barbarum* L.

	“宁杞 1 号” ‘Ningqi 1’	“宁杞 2 号” ‘Ningqi 2’	黄果枸杞 <i>Lycianthes barbarum</i> var. K.	黑果枸杞 <i>Lycium ruthenicum</i> Murr.	“宁杞 5 号” ‘Ningqi 5’	“宁杞 7 号” ‘Ningqi 7’
“宁杞 2 号” “Ningqi 2”	0.56					
黄果枸杞 <i>Lycianthes barbarum</i> var. K.	0.29	0.40				
黑果枸杞 <i>Lycium ruthenicum</i> Murr	0.40	0.36	0.57			
“宁杞 5 号” “Ningqi 5”	0.40	0.73	0.57	0.50		
“宁杞 7 号” “Ningqi 7”	0.40	0.73	0.57	0.50	1.00	
“宁杞 8 号” “Ningqi 8”	0.40	0.55	0.57	0.50	0.75	0.75

## 2.3 枸杞内生真菌系统发育分析

利用 rDNA-ITS 序列分析对内生真菌进一步鉴定,在枸杞栽培品种分离得到的稀有内生真菌如球毛壳菌(*C. globosum*)、旋丝毛壳(*C. bostrychodes*)、沙生梭孢壳(*T. arenaria*)、格兰德毛壳菌(*C. grande*)、不等裂壳菌(*S. inaequale*)和炭角菌(*Sordariomycetes* sp.)等均是一些重要的微生物资源。

根据形态特征和 rDNA-ITS 序列分析,合并形态和序列相同的菌株,从 363 株枸杞内生真菌中选择 16 株菌株,作为代表菌株,从 GenBank 上下载与

这些菌株序列相似性较高的 rDNA-ITS 序列,用于系统发育分析,构建系统发育树。由图 2 可知,这 16 株菌株被分为 5 个类群,A 类群由毛壳菌属(*Chaetomium*)、梭孢壳属(*Thielavia*)、裂壳菌属(*Schizothecium*)和粪壳菌属(*Sordaria*)菌株组成,菌株 NQ5YDII2、NQ1YDI1、NQ7YAI1、NQ5YJII2、NQ2YAI12 和 NQ3YOI1 分别与球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)、旋丝毛壳(*Chaetomium bostrychodes*)、沙生梭孢壳(*Thielavia arenaria*)、格兰德毛壳菌(*Chaetomium grande*)、不等裂壳菌

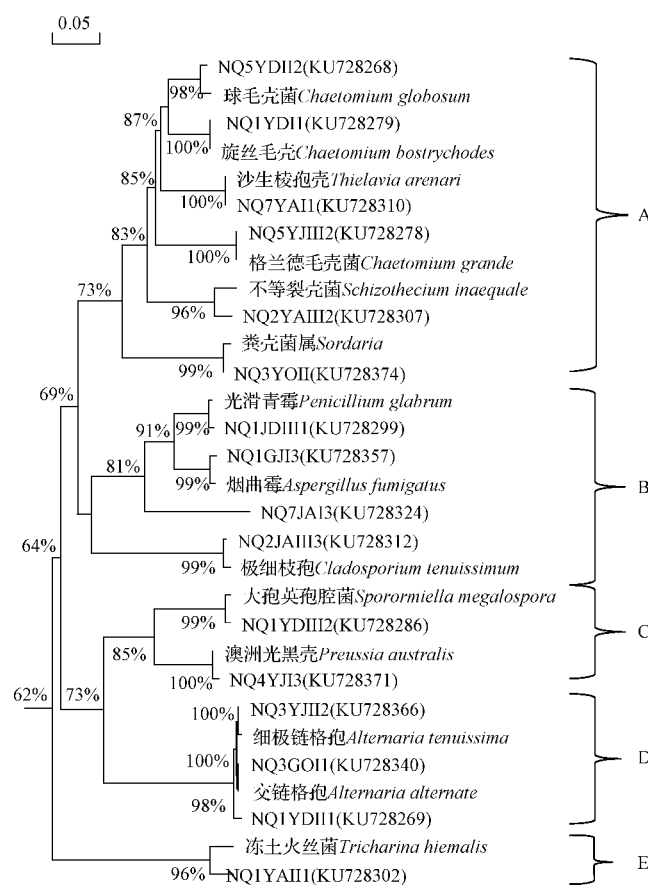


图 2 基于 rDNA-ITS 序列构建的 16 株枸杞内生真菌系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis derived from rDNA-ITS sequences of 16 endophytic fungi

(*Schizothecium inaequale*)和粪壳菌(*Sordaria*)的亲缘关系最近,结合序列相似性分析结果可知,rDNA-ITS序列相似性基介于95.6%~100.0%;B类群由青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)和枝孢属(*Cladosporium*)菌株组成,菌株NQ1JDIII1、NQ1GJI和NQ2JAIH3与光滑青霉(*Penicillium glabrum*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)和极细枝孢(*Cladosporium tenuissimum*)的亲缘关系最近,序列相似性分别为98.9%、98.6%和98.8%;C类群由荚孢腔菌属和光黑壳属(*Preussia*)菌株组成,菌株NQ1YDIII2和NQ4YJI3分别与大孢荚孢腔菌(*Sporormiella megalospora*)和澳洲光黑壳(*Preussia australis*)的亲缘关系最近,序列相似性分别为98.7%和99.6%;D类群由链格孢属(*Alternaria*)菌株组成,菌株NQ3YJII2、NQ3GOI1和NQ1YDIII1分别与细极链格孢(*Alternaria tenuissima*)和交链格孢(*Alternaria alternata*)的亲缘关系最近,序列相似性分别为99.6%和98.9%;E类由火丝菌属(*Tricharina*)菌株组成,菌株NQ1YAIH1与冻土火丝菌(*Tricharina hiemalis*)的亲缘关系最近,序列相似性为95.8%。

### 3 讨论

该研究选取了宁夏现行推广和广泛种植的5个栽培枸杞品种和2个野生枸杞品种为试材,分离得到的363株枸杞内生真菌中167株属于链格孢属(*Alternaria*),50株属于梭孢壳属(*Thielavia*),46株属于曲霉属(*Aspergillus*),它们都是枸杞内生真菌的优势属。此外还分离到了比较稀有的双极霉属(*Bipolaris*)、光黑壳霉属(*Preussia*)、粪壳菌属(*Sordaria*)、戴氏霉属(*Taifanglania*)、火丝菌属(*Tricharina*)和炭角菌属(*Xylaria*),表明宁夏枸杞内生真菌具有丰富的遗传多样性。

ROSENBLUETH等<sup>[11]</sup>认为内生菌在植株体内的分布通常下部组织多于上部组织,越往植物植株顶端,分离得到的内生真菌越少。枸杞内生真菌在不同组织部位表现出一定的差异性,这充分体现在多样性指数上。所分离得到的内生真菌中,叶部内生真菌多样性明显高于茎部和果实中,与已有研究结果基本一致。在所分离的枸杞内生菌中,链格孢属(*Alternaria*)和曲霉属(*Aspergillus*)在各品种中均有分布,为所有枸杞品种及其组织部位的共有属,且链格孢属(*Alternaria*)为各品种和组织部位的优势属(相对频率>10%),这与祁鹤兴等<sup>[8]</sup>和刘建利<sup>[6]</sup>对宁夏枸杞内生真菌多样性及其分布研究结果相吻合。造成这种结果的原因可能是链格孢属(*Alternaria*)真

菌对枸杞各品种、组织部位的生理代谢及生化环境适应性良好,且RIESEN<sup>[12]</sup>认为*Alternaria* spp.演变成内生真菌可以抵抗不良环境条件对自身宿主的胁迫。

宁夏枸杞中蕴藏着丰富的内生真菌,内生真菌在宁夏枸杞中的分布受组织部位和品种的影响,某些内生真菌具有一定的宿主和组织偏好性。栽培品种中分离得到的内生真菌种类普遍比野生品种多。聚类分析结果表明,内生真菌在不同枸杞品种及不同组织部位之间具有一定的偏好性,这可能由于枸杞品种和含有的营养物质及生理环境不同,而不同的真菌对营养物质和生理环境要求不同,从而影响内生真菌的分布。

双极霉属(*Bipolaris*)、粪壳菌属(*Sordaria*)和裂壳菌属(*Schizothecium*)属于野生枸杞品种特有属,梭孢壳属(*Thielavia*)、火丝菌属(*Tricharina*)、炭角菌属(*Xylaria*)和枝孢属(*Cladosporium*)属于栽培枸杞品种特有属;特别是在枸杞栽培品种分离得到的稀有内生真菌如球毛壳菌(*C. globosum*)、旋丝毛壳(*C. bostrychodes*)、沙生梭孢壳(*T. arenaria*)、格兰德毛壳菌(*C. grande*)、不等裂壳菌(*S. inaequale*)和炭角菌(*Sordariomycetes* sp.)等是一些重要的微生物资源。研究发现内生毛壳菌(*Chaetomium*)是一种应用广泛的生防菌,对多种植物病原菌都具有良好的抑菌活性<sup>[13-14]</sup>。炭角菌(*Xylaria*)产生丰富的新活性天然产物,具有很强的抗菌活性和细胞学毒性,在抗氧化、抗肿瘤、抗病毒和增强机体免疫力等方面具有较强的药用、保健功能<sup>[15-17]</sup>。粪壳菌(*Sordaria*)产生重要的纤维素二糖水解酶I用于分解纤维素<sup>[18-19]</sup>等。从该研究结果来看,枸杞内生真菌是一类重要的微生物资源,其内生真菌在与宿主协同进化过程中,可能产生新的基因及代谢产物,尤其一些稀有内生真菌的生物活性值得后续进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.
- [2] 陈丽媛,孙翠焕. 药用植物内生真菌研究进展[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(5): 98-101.
- [3] 郑国琦,胡正海. 宁夏枸杞的生物学和化学成分的研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(5): 796-800.
- [4] 樊云芳,陈晓军,李彦龙,等. 宁夏枸杞 DFR 基因的克隆与序列分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31(12): 2373-2379.
- [5] 闫秀梅,董静洲,王瑛. 枸杞和宁夏枸杞叶片主要活性成分含量比较研究[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 29-32.
- [6] 刘建利. 宁夏枸杞内生真菌的分离及抗氧化活性的测定[J]. 时

珍国医国药, 2011, 22(4): 857-860.

[7] 王维, 马养民, 张弘弛. 藏药黑果枸杞内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(4): 262-266.

[8] 祁鹤兴, 贾倩, 高媛, 等. 宁夏枸杞果内生真菌多样性及其分布[J]. 北方园艺, 2015(13): 153-157.

[9] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 科学技术出版社, 1986: 249-252.

[10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 科学技术出版社, 1979: 1-718.

[11] ROSENBLUETH M, MARTÍNEZ R E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(8): 827-837.

[12] RIESEN T. Endophytic fungi in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Part I. Comparison between four wheat cultivars with different resistance to *Phaeosphaeria odorum* Hediaroude[D]. Zurich Thesis; Swiss Federal Institute of Technology, 1985.

[13] 孙广宇, 谭悠久, 张荣. 中国毛壳菌科研究 III. 毛壳菌属和梭孢壳属的种(英文)[J]. 菌物学报, 2005, 24(9): 318-321.

[14] 许秀兰, 黄晓丽, 张翅, 等. 云杉内生优势毛壳菌的筛选及其生防机制研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(4): 511-519.

[15] 徐培培, 尤怀成, 胡志钰, 等. 炭角菌 *Xylaria* sp. 290 代谢产物中两个新的海松烷型二萜[J]. 有机化学, 2013, 33(12): 2618-2621.

[16] 余梦瑶, 许晓燕, 魏巍, 等. 炭角菌菌丝体乙醇提取物对  $H_2O_2$  所致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 食用菌学报, 2014, 11(4): 49-52.

[17] 金一平, 杨志钧, 罗敏玉. 植物内生真菌炭角菌属 HCCB03890 代谢产物及生物活性的研究[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(21): 1853-1856.

[18] 陈笑笑, 田兴军. 纤维二糖水解酶 I 基因的系统进化分析[J]. 生物信息学, 2013, 11(4): 300-308.

[19] 何苑峰, 周国英, 王圣洁, 等. 杉木人工林土壤真菌遗传多样性[J]. 生态学报, 2014, 34(10): 2725-2736.

## Separation and Diversity Analysis of Endophytic Fungi From *Lycium barbarum* L. in Ningxia

XU Quanzhi, SUN Mudi, LI Fan, GAO Yuan, GU Peiwen

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract:** *Lycium barbarum* L. was used as test material, endophytic fungi were separated from different varieties and different parts of *Lycium barbarum* L. by tissue separation. They were classified according to their morphological characteristics of culture, colonies and spores and rDNA-ITS sequences analysis. The composition characteristics of endophytic fungi were analyzed according to their colonization rate (CR), relative frequency (RF), shannon-weiner index (H), margalef index (D) and Sorenson's similarity coefficient (CS). The results showed that 363 endophytic fungi were isolated from *L. barbarum* L., and they belonged to 14 genus, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Preussia*, *Schizothecium*, *Sordaria*, *Taifanglania*, *Thielavia*, *Tricharina*, *Xylaria*, respectively. *Alternaria*, *Thielavia* and *Aspergillus* were dominant genus and their relative frequency (RF) were 46%, 14% and 13% respectively. These endophytic fungi were distributed in various organs of *L. barbarum* L. The types of endophytic fungi in the stems were the most 0.86 in these organs of *L. barbarum* L. Sorenson's similarity coefficient (CS) of leaf and fruit was the largest. The distribution of endophytic fungi was different between different varieties of *Lycium barbarum* L. Shannon-wiener index (H) and margalef index (D) of endophytic fungi from cultivated variety of *L. barbarum* L., 'Ningqi 1' 'Ningqi 2' were significantly higher than wild varieties, *Lycianthes barbatum* L. var. *auranticarpum* K. F. Ching and *Lycium ruthenicum* Murr. The community composition similarity of endophytic fungi showed that some endophytic fungi had the preference of a certain host and tissue. The endophytic fungi were rich in the resources of endophytic fungi, the endophytic fungi had high host specificity, and their distribution was influenced by the environment.

**Keywords:** *Lycium barbarum* L.; endophytic fungi; diversity; rDNA-ITS