

两种杨树树皮内生真菌多样性及优势种群动态变化

李永¹, 朴春根^{1*}, 郭利民², 常聚普², 王海明³, 贺伟⁴, 谢守江², 郭民伟¹

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所,北京 100091; 2. 濮阳市林业科学院,河南 濮阳 457000;
3. 菏泽市林木保护站,山东 菏泽 274002; 4. 北京林业大学林学院,北京 100083)

摘要:为了解健杨94(转基因抗虫杨94)、三倍体毛白杨2个杨树品种干部树皮内生真菌区系及其优势种群的季节变化情况,本研究利用组织分离法从2个杨树品种996块组织中分离内生真菌1175株,健杨94和三倍体毛白杨分别分离612、563株。利用形态特征和分子生物学方法鉴定为15个属、35个分类单元,包括担子菌1个分类单元,子囊菌34个分类单元。2个杨树品种内生真菌优势种群包括链格孢、葡萄座腔菌、镰孢属真菌、间座壳属真菌等,其中,仅有链格孢、葡萄座腔菌和桑砖红镰孢是两品种共有的优势种群种类,而且优势种群会随季节变化而变化。在两品种的内生真菌中,链格孢、葡萄座腔菌是最为常见的优势种群。

关键词:内生真菌;优势种群;多样性;树皮

中图分类号:S718.8

文献标识码:A

Predominant Species Dynamic and Diversity of Fungal Endophytes in Barks of Two *Populus* Cultivars

LI Yong¹, PIAO Chun-gen¹, GUO Li-min², CHANG Ju-pu², WANG Hai-ming,
HE Wei³, XIE Shou-jiang², GUO Min-wei¹

(1. Research Institute of Forest Ecology Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;
2. Puyang Academy of Forestry, Puyang 457000, He'nan, China; 3. Heze Forest Protection Station, Heze 274002, Shandong, China;
4. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to understand the predominant species dynamic and diversity of fungal endophytes in barks of *Populus × euramericana* cv. Robusta 94 and triploid of *P. tomentosa*, the fungal endophytes were isolated from barks of *P. × euramericana* cv. Robusta 94 and triploid of *P. tomentosa* by tissue isolation, and identified based on sequence analysis of the internal transcribed spacer and morphological characterization by microscopic observations. A total of 1175 fungal endophytes were isolated from 996 bark tissues. The fungal endophytes were classified into 35 fungal taxa belonging to 15 genera, including 1 species of Basidiomycota and 34 taxa of Ascomycota. And *Alternaria alternata*, *Botryosphaeria dothidea*, *Fusarium* spp., and *Diaporthe conorum* were the predominant species of fungal endophytes in barks of *P. × euramericana* cv. Robusta 94 and triploid of *P. tomentosa*, while *A. alternata* and *B. dothidea* were the most common predominant species in the barks of the two cultivars. The variation of predominant fungal endophytes of two poplar species in different seasons was detected.

Key words: fungal endophytes; predominant species; diversity; bark

收稿日期:2012-12-17

基金项目:森林生态环境与保护研究所基金(CAFRIFEEP201102-4);林业公益性行业专项(201104054);国家微生物资源平台;林业微生物库藏资源管理与共享(NIMR-2011-7)

作者简介:李永(1978—),男,山东泰安,助研,主要从事林木病害及菌种保藏。

* 通讯作者。

内生真菌指在生活史的某段时期生活于植物组织内部,对宿主没有造成明显病害症状的真菌,它在植物组织中普遍存在^[1-2]。内生真菌因其独特的生活环境,与宿主植物的关系极为密切:一方面植物为内生真菌提供光合产物和矿物质;另一方面内生真菌的代谢产物能刺激植物的生长发育,提高宿主植物对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力^[3],因此,植物内生真菌的研究日益增多^[2-5]。

杨树(*Populus* spp.)具有生长快,适应性强,易繁殖,材质好,用途广等优点,因此,在北方种植面积非常大,是我国北方用材林、防护林和城市绿化的主要树种^[3]。近十几年来,由于栽植品种比较单一(多为107杨),降低了对害虫大面积发生的抵御能力。为减少杨树害虫危害,韩一凡等^[6]培育出了健杨94(*Populus × euramericana* cv. *Robusta* 94),健杨94是以健杨为外植体的转*Bt*基因欧美杨,具有抗食叶害虫及耐寒和速生等特性;朱之梯等^[7]采用染色体部分替换和染色体加倍技术培育出了三倍体毛白杨(triploid hybrids of *Populus tomentosa*),即将传统38根染色体的二倍体毛白杨,改造为57根染色体的三倍体毛白杨,该品种具苗期短、速生、栽培周期短等一系列优点。健杨94和三倍体毛白杨均是近年来我国培育的杨树优良新品种,其内生真菌相关研究未见报道。为弄清2种杨树是否存在潜在的真菌病原菌,为2种杨树田间推广过程中的病害预防和防治提供数据。本研究选择濮阳市健杨94和三倍体毛白杨人工林系作为研究对象,开展2种杨树干部树皮内生真菌的物种多样性、群落组成及其优势种群季节动态变化规律研究,了解这2种经特殊改造的杨树品种体内潜在植物病原真菌以及生防真菌和促生真菌等有益微生物,为杨树病虫害防治、有益微生物的开发利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集

在2010—2012年,按照季节采集健杨94和三倍体毛白杨样品,具体采集时间为2010年夏季(7月)、秋季(10月)、冬季(2011年1月)、2011年春季(4月)、夏季(7月)、秋季(10月)、冬季(2012年1月)、2012年春季(4月)。

采样地点为河南省濮阳林业科学院试验林场(35°48'40N,114°51'09E)。濮阳市位于中纬地带,常年受东南季风环流的控制和影响,属暖温带半湿

润季风型大陆性气候,年平均气温13.3℃,年平均降水量502.3~601.3mm,海拔50m。试验林地为5~6年生的健杨94和三倍体毛白杨人工林。在试验地内分别随机设置3个采样点,每点采集3株,采集距地面1.2m处的树干树皮(7cm×4cm组织块),共采集9株。采集的样品用无菌袋单独包装,放低温箱带回实验室后立即分离培养。

1.2 内生真菌分离和培养

先用自来水冲洗树皮表面,剪成0.8cm×1.0cm的小块,9个样品(设3个重复)选取27个组织用于内生真菌的分离。样品表面用4%次氯酸钠消毒5min(超净工作台中操作),灭菌水冲洗3次(45s),无菌滤纸吸干后切成2mm×2mm小组织块。随机选取56个组织块放置于14块PDA培养基平板上(含链霉素50mg·L⁻¹,4块/平板),封口后28℃倒置培养7~14d,定期观察内生真菌菌落生长情况,通过尖端菌丝挑取法转接于PDA斜面进行纯化培养。

1.3 DNA的提取与序列测定

采用液氮/沸水反复冻融法提取基因组DNA^[8]。从培养5~7d的菌落边缘取3mm×3mm的菌丝块转入200μL DNA提取液中,经液氮/沸水反复冻融3次,氯仿/异戊醇抽提1次,吸取上清,加入2倍体积无水乙醇,12000r·min⁻¹离心12min沉淀DNA,制备好的DNA置-20℃保存备用。

PCR扩增选用的通用引物为ITS1/ITS4,PCR扩增程序和条件详见参考文献[9]。取3μL扩增产物在1%琼脂糖凝胶电泳检测(120V,5V·cm⁻¹,45min),DL2000作DNA分子量标准,并在凝胶成像分析系统(vilber 3000)中观察记录结果。PCR扩增产物直接送英潍捷基(上海)贸易有限公司切胶纯化后双向测序。

1.4 菌种的鉴定及系统发育关系分析

真菌鉴定依据形态特征和ITS序列分析相结合的方法,首先通过观察真菌的菌丝、有性或无性孢子、产孢结构等形态特征,参照《真菌鉴定手册》鉴定^[10];同时,分别利用NCBI Blast工具和EMBL Fasta工具进行序列分析比对,验证形态特征鉴定结果的可靠性。结果判定参照参考文献[11],即菌株ITS序列与参比序列同源性大于97%视为相同的种,而同源性在95.0%~96.9%视为相同的属。应用CLUSTAL W程序对ITS序列进行对位排列,然后应用MEGA 4.0构建基于ITS序列的系统发育树有

根树(NJ, Bootstrap 检验 1 000 次重复检验, 自展值小于 50 未显示)。

1.5 统计分析方法

统计方法参照文献[2, 12-13]方法, 即根据定殖率(CR)、分离率(IR)、相对频率(RF)、多样性指数(H')、相似性系数(C_s)进行统计分析。定殖率(CR)指样本中受内生真菌侵染的组织块数占全部样本组织块数的百分数。分离率(IR)指从样本组织块中得到的菌株数与全部样本组织块数的比值。相对频率(RF)指样本中分离到的某种内生真菌的菌株数占分离到总菌株数的百分数。多样性指数(H')根据 Shannon-Weiner 指数公式计算:

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

式中:k 指某种植物内生真菌种类的总数, P_i 指某种内生真菌的菌株数占全部内生真菌菌株数的百分数。

相似性系数(C_s)根据 Sorenson 系数公式计算:

$$C_s = 2j / (a + b)$$

式中:j 是 2 种植物共同具有的内生真菌种类数, a 是一种植物内生真菌的种类数, b 是另一种植物内生真菌的种类数。

2 结果与分析

2.1 内生真菌定殖率和分离率

2010 年 7 月至 2012 年 4 月, 从濮阳采集的健杨 94 和三倍体毛白杨表面消毒的组织块中分离得到内生真菌 1 175 株, 其中, 健杨 94 和三倍体毛白杨分别分离到 612、563 株。在 2 种杨树中, 健杨 94 内生真菌的定殖率略高于三倍体毛白杨, 健杨 94 总定殖率为 99.1%, 各季度的定殖率为 98.2%~100%; 三倍体毛白杨总定殖率为 98.6%, 各季度定殖率为 96.4%~100% (表 1)。在 8 个季度中, 健杨 94 树皮内生真菌分离率秋季最高, 分离率分别为 1.57、1.61, 春季和夏季次之。三倍体毛白杨在夏秋两季内生真菌的分离率略高于冬、春 2 季 (表 1)。

表 1 2 种杨树内生真菌的定殖率和分离率

树种	项目	季节(两年度)								合计或平均
		2010 年			2011 年				2012 年	
		夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	春	
健杨 94	组织块数/个	56	56	56	56	56	56	56	56	448
	长菌块数/个	55	56	54	56	56	56	55	56	444
	菌株数/株	76	88	72	79	74	90	62	71	612
	定殖率/%	98.2	100	96.4	100	100	100	98.2	100	99.1
	分离率	1.36	1.57	1.29	1.39	1.32	1.61	1.11	1.27	1.37
三倍体毛白杨	组织块数/个	56	56	56	56	56	56	56	56	448
	长菌块数/个	54	56	56	55	56	54	55	56	442
	菌株数/株	77	74	68	71	76	72	58	67	563
	定殖率/%	96.4	100	100	98.2	100	96.4	98.2	100	98.6
	分离率	1.38	1.32	1.21	1.27	1.35	1.28	1.05	1.20	1.26

2.2 内生真菌的组成

根据形态特征和分子生物学鉴定结果, 从健杨 94 和三倍体毛白杨树皮上得到 1 175 株内生真菌, 鉴定为 15 个属, 2 个未知属, 35 个分类单元, 包括担子菌门 1 种, 子囊菌门 34 个分类单元, 其中, 座囊菌纲(Dothideomycetes) 15 个、散囊菌纲(Eurotiomycetes) 5 个、粪壳菌纲(Sordariomycetes) 11 个。健杨 94 内生真菌分为 24 个分类单元(11 个属, 2 个未鉴定属), 而三倍体毛白杨内生真菌分为 22

个分类单元(14 个属, 2 个未鉴定属)。2 树种的内生真菌在组成上也存在一定差异, 链格孢(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 1912) 和葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. 1863) 等 6 个属及 12 个分类单元的内生真菌在 2 种杨树中均能分离到, 而仅在健杨 94 中分离到的内生菌有 13 个分类单元, 仅在三倍体毛白杨中分离到的内生真菌有 10 个分类单元。2 种杨树内生真菌组成情况见表 2。

表 2 2 种杨树内生真菌种类组成

存在于 2 种杨树的种类		存在于单种杨树的种类			
拉丁学名	中文名	健杨 94		三倍体毛白杨	
		拉丁学名	中文名	拉丁学名	中文名
<i>Alternaria alternata</i>	链格孢	Ascomycota sp2	子囊菌 2	<i>Acaromyces ingoldii</i>	酵母样菌
Ascomyceta sp1	子囊菌 1	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	极细枝孢	<i>Aspergillus fumigatus</i>	烟曲霉
<i>Aspergillus versicolor</i>	杂色曲霉	<i>Coniothyrium pyrimum</i>	梨盾壳霉	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	枝状枝孢菌
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	葡萄座腔菌	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	—	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	瓜疮痂枝孢菌
<i>Diaporthe conorum</i>	毬果间座壳菌	<i>Fusarium</i> sp.	镰孢菌	<i>Coniothyrium</i> sp.	盾壳霉
<i>Diaporthe</i> sp.	间座壳菌	<i>Penicillium citrinum</i>	桔青霉	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>pisi</i>	茄腐皮镰孢豌豆专化型
<i>Fusarium decemcellulare</i>	多隔镰刀菌	<i>Penicillium loliense</i>	—	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	—
<i>Fusarium lateritium</i>	桑砖红镰孢	Pleosporales sp2	格孢菌 1	<i>Penicillium funiculosum</i>	绳状青霉
<i>Fusarium solani</i>	茄病镰刀菌	<i>Pyrenochaeta quercina</i>	—	<i>Phoma crystallifera</i>	—
Pleosporales sp1.	格孢菌 1	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	棘壳孢菌	<i>Pyrenochaetopsis microspora</i>	—
<i>Pyrenochaeta unguis-hominis</i>	正人甲棘壳孢	<i>Trichothecium roseum</i>	粉红单端孢		
<i>Trichoderma atroviride</i>	深绿木霉	<i>Verticillium nigrescens</i>	变黑轮枝菌		

注:表中“—”表示尚没中文名称。

2.3 内生真菌的多样性与相似性

2 种杨树内生真菌的多样性指数相近,健杨 94 和三倍体毛白杨多样性指数分别为 2.52、2.54,但不

同的季度多样性指数存在一定差异,健杨 94 各季度的多样性指数为 1.44 ~ 1.86,三倍体毛白杨各季度的多样性指数为 1.46 ~ 1.73(表 3)。

表 3 2 种杨树内生真菌的多样性指数(H')

种 类	季节(两年度)								2 年总指数
	2010 年			2011 年				2012 年	
	夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	春	
健杨 94	1.45	1.86	1.48	1.57	1.44	1.74	1.51	1.57	2.52
三倍体毛白杨	1.52	1.73	1.50	1.49	1.50	1.55	1.46	1.52	2.54

2 种杨树内生真菌种类组成的相似系数为 0.426,季节相似系数随季节变化而变化,其相似性系数为 0.25 ~ 0.55,其中,2 种杨树在 2011 年的秋季和冬季的相似性系数较高,为 0.50 ~ 0.55(图 1)。

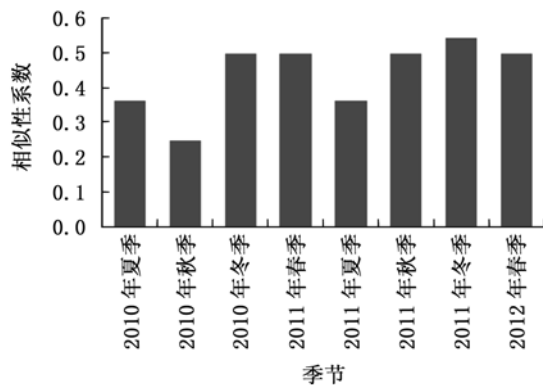


图 1 2 种杨树内生真菌种类组成的相似性系数

2.4 优势种群及其季节动态变化

2 种杨树的树皮内生真菌优势种群中有 3 个种类相同,即链格孢、葡萄座腔菌和桑砖红镰孢(*Fusarium lateritium* Nees 1816),但在 2 年度的分离物中,链格孢是最常见种类,它在健杨 94 和三倍体毛白杨树皮内各季度均有分布,在不同季节的相对频

率不同,会随季节变化而变化,相对频率分别为 4.45% ~ 34.09% 和 12.82% ~ 41.67%(表 4)。葡萄座腔菌和桑砖红镰孢也是常见种类,其二者分离率仅次于链格孢,相对频率见表 4。

2 种杨树优势种群随季节也会发生一定变化,如健杨 94 优势种群在 2010 年冬季、2011 年春季和秋季为桑砖红镰孢,其相对频率为 33.33% ~ 41.66%,而 2010 年夏季、秋季、2011 年夏季、冬季及 2012 年春季分别为毬果间座壳菌(*Diaporthe conorum* (Desm.) Niessl 1876, 39.47%)、链格孢(34.09%)、葡萄座腔菌(43.24%)、*Fusarium incarnatum-equiseti* (43.7%)、正人甲棘壳(*Pyrenochaeta unguis-hominis* Punith. & M. P. English 1975, 35.29%) (图 2);三倍体毛白杨优势种群也有较大变化,2010 年夏季至 2012 年春季的优势种群分别为 *Paraconiothyrium* sp.、*Pyrenochaetopsis microspora* (Gruyter & Boerema) Gruyter, Aveskamp & Verkley 2010、链格孢、正人甲棘壳、毬果间座壳菌、链格孢、桑砖红镰孢和茄病镰刀菌(图 3)。从图 2、3 可以看出:链格孢和葡萄座腔菌都是常见菌,仅在部分季节是优势种群。

表4 2种杨树内生真菌的相对频率

%

树种	内生真菌	季节(两年度)								
		2010年			2011年				2012年	
		夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	春	
健杨 94	<i>A. alternata</i>	26.31	34.09	8.33	17.94	16.21	4.45	25.80	16.67	
	<i>B. dothidea</i>	15.78		25.00	12.82	43.24	22.22		13.89	
	<i>F. incarnatum-equiseti</i>		13.36	16.66				9.67		
	<i>F. solani</i>		6.81				8.89		2.78	
	<i>F. lateritium</i>			41.66	38.46		33.33	9.67	8.33	
三倍体毛白杨	<i>A. alternata</i>	12.82	24.32	35.29	26.47	18.42	41.67	24.24	30.00	
	<i>B. dothidea</i>	28.21	18.92	8.82	20.58	15.79	27.78		6.67	
	<i>F. lateritium</i>			20.59		13.16		39.39		
	Pleosporales sp1	2.56				10.53		21.21	6.89	

2.5 内生真菌的系统发育关系

基于 ITS 序列分析构建的系统进化树显示:2 种杨树的内生真菌系统发育树类似,内生真菌被分成了 6 大类。在健杨 94 内生菌进化树中,6 个分支均为子囊菌,6 个分支分别由座囊菌纲(Dothideomycetes) 1 和 2、散囊菌纲(Eurotiomycetes)、粪壳菌纲(Sordariomycetes)和 Ascomycota sp1 和 Ascomycota sp2 组成。毛白杨系统进化树由子囊菌和担子菌构成 6 个分支,其中,5 个分支由子囊菌的座囊菌纲(Dothideomycetes) 1 和 2、散囊菌纲(Eurotiomycetes)、粪壳菌纲(Sordariomycetes)和 Ascomycota sp1 组成。2 种杨树的共同点在于进化树是以子囊菌为主构成的(图 4,5)。

3 结论与讨论

研究结果显示:2 种 5 年生杨树树干具有非常高的内生真菌定殖率(96.4%~100%)和分离率(1.05~1.61),这与前人的一些研究结果相似,如孙剑秋等^[2]发现,杜仲、连翘多年生枝条的每一个组织块中均有内生真菌定殖(100%),而秦岭连翘、卵叶连翘、细叶小檗、青肤杨多年生枝条内生真菌定殖率也高达 87.5%~95.0%。这种高定殖率和分离率可能是由于幼龄树受到侵染后内生真菌随树木的生长而不断扩展繁殖造成的^[14-15]。另外,本研究还发现:2 树种的分离率会随季节的变化而变化,夏、秋季略高于春、冬季,这可能是与气候、环境、降雨量等外在条件的季节性变化有关,这与其他植物内生真菌研究的结果相一致^[5,16-17]。

本研究从 2 种杨树树皮分离得到内生真菌为 15 个属,2 个未知属,35 个分类单元(99%以上为子囊菌),包括担子菌 1 种,子囊菌 34 个分类单元。健杨 94 和三倍体毛白杨总体多样性指数分别为 2.52、

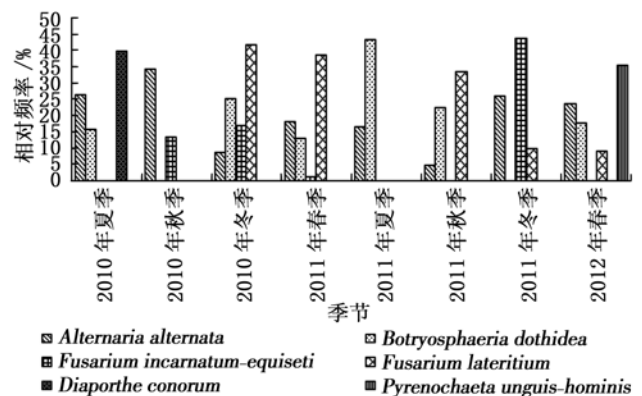


图2 健杨 94 内生真菌优势种群动态变化

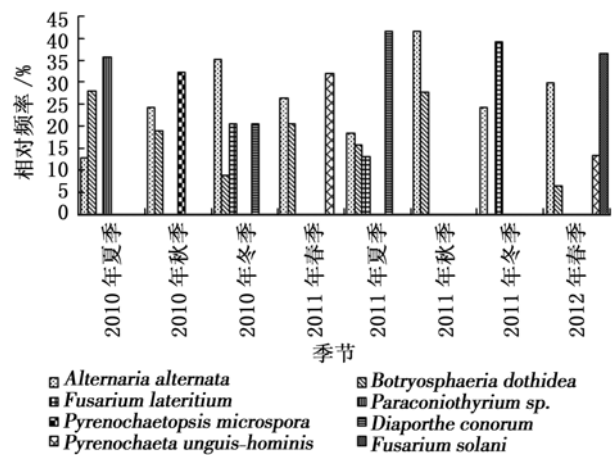


图3 三倍体毛白杨内生真菌优势种群季节动态变化

2.54,说明 2 个杨树种树皮内生真菌具有丰富的物种多样性。2 树种内生真菌组成存在较大差异,内生真菌种类组成的相似系数为 0.426,健杨 94 内生真菌分为 24 个分类单元,而三倍体毛白杨内生真菌分为 22 个分类单元。内生真菌组成有 6 个属,12 个分类单元相同。这种差异可能是由栽培土壤环境不同或树种的内生真菌的偏好性造成的。

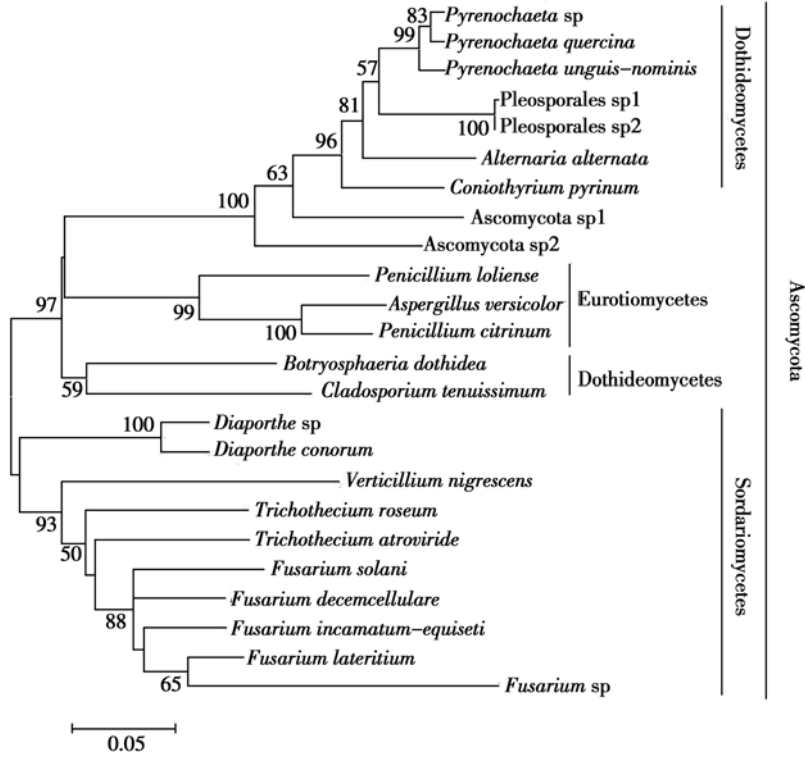


图 4 基于 ITS 序列构建健杨 94 内生真菌 NJ 系统发育树

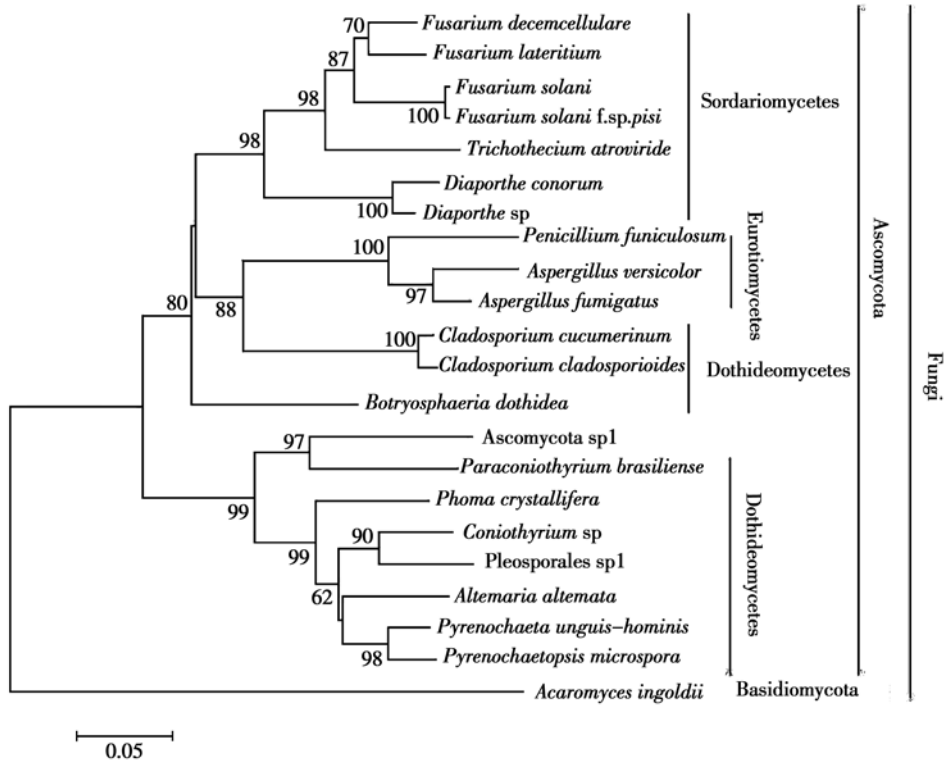


图 5 基于 ITS 序列构建三倍体毛白杨内生真菌系统发育树

2 个杨树种内生真菌优势种群包括链格孢、葡萄座腔菌、间座壳属、镰孢属等,优势种群会随季节的变化而变化,其中,链格孢、葡萄座腔菌和镰孢属

是最常见的优势种群,这与其他植物内生真菌研究的结果一致^[2,18-20]。镰孢属和葡萄座腔菌则是有些植物上的重要病原菌,在正常情况下,这些内生真菌

不会对植物造成危害,但遇到适宜条件,它们会转化成植物病原菌。葡萄座腔菌寄生在多种杨树上,是杨树溃疡病的病原菌,对杨树造成很大危害^[21]。另外,茄病镰刀菌是2种杨树中较为常见的种类,它可以侵染很多种植物,如川芎根腐等病害都是该病菌侵染所致,而且危害相当严重^[22-24]。2种杨树都是我国培育出来的优良杨树品种,三倍体毛白杨具有苗期短、速生、栽培周期短等特点,而且纤维素含量高,适于造纸^[7];而健杨94具有抗杨树害虫及耐寒和速生等特性^[6,25]。随着这2种杨树品种的大面积推广和种植,树皮内潜在的植物病原菌就有可能造成较为严重的危害,因此,建议杨树栽培时尽量避免单一品种大面积栽培,而采用多树种搭配种植的方式。

从植物内生菌中筛选具有生物防治功能菌株的研究逐渐得到人们重视^[26-27]。有些研究提出,木霉具有保护寄主植物的能力,如他们可以通过营养竞争、抗生作用、促进植物生长或者诱导抗性等方法保护寄主^[26,28-29]。本研究获得包括木霉类菌株在内的大量内生真菌资源,为生物防治菌株筛选以及真菌生物活性物质研究打下坚实基础。

参考文献:

- [1] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves[M]//Andrews J H, Hirano S S. Microbial ecology of leaves New York: Springer-Verlag, 1991:179-197
- [2] 孙剑秋,郭良栋,臧威,等.药用植物内生真菌多样性及生态分布[J].中国科学C辑:生命科学,2008,38(5):475-484
- [3] 白红霞,袁秀英.内蒙古地区杨树内生真菌多样性调查[J].浙江林学院学报,2006,23(6):629-635
- [4] 王涛,魏淑芳,魏琴,等.油樟叶内生真菌的多样性研究[J].云南大学学报:自然科学版,2007,29(3):300-302
- [5] 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
- [6] 李淑梅,张春玲,胡建军,等.转基因抗虫杨树新品种——健杨94[J].林业科学,2008,44(7):141
- [7] 朱之涕.三倍体毛白杨新品种简介[J].北京林业大学学报,2002,24(增刊):60-62
- [8] 林彩丽,王曦苗,朴春根,等.一种用于PCR扩增的真菌DNA快速提取方法[P].2009,专利号:ZL 2009 1 0235594.3
- [9] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, 1990:315-322
- [10] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979
- [11] By X K, Xing J, Chen M J, et al. Fungal endophytes associated with *Sonneratia* (Sonneratiaceae) mangrove plants on the south coast of China[J]. Forest Pathology, 2011, 41: 334-340
- [12] Petrini O, Stone J, Carroll F E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study[J]. Can J Bot, 1982, 60:789-796
- [13] Pielou E C. Ecological Diversity[M]. New York: John Wiley and Sons Inc,1975
- [14] Stone J K. Initiation and development of latent infection by *Rhabdochline parkeri* on Douglas fir[J]. Can J Bot, 1987, 65: 2614-2621
- [15] Fröhlich J, Hyde K D, Petrini O. Endophytic fungi associated with palms[J]. Mycol Res, 2000, 104: 1202-1212
- [16] Larran S, Monaco C, Alippi H E. Endophytic fungi in leaves of *Lycopodium obscurum* Mill[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17: 181-184
- [17] Santamaría J, Bayman P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*) [J]. Microbial Ecology, 2005, 50: 1-8
- [18] Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum[J]. Mycol Res 2005,109(Pt 6):661-686
- [19] Park Y H, Kim Y C, Park S U, et al. Age-dependent Distribution of Fungal Endophytes in *Panax ginseng* Roots Cultivated in Korea [J]. J Ginseng Res, 2012, 36(3):327-333
- [20] Park Y H, Lee S G, Ahn D J, et al. Diversity of Fungal Endophytes in Various Tissues of *Panax ginseng* Meyer Cultivated in Korea[J]. J Ginseng Res, 2012, 36(2): 211-217
- [21] 张星耀,骆有庆.中国森林重大生物灾害[M].北京:中国林业出版社,2003
- [22] 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
- [23] Lipscomb H, Witcher W. Canker of Tulip Poplar caused by *Fusarium solani*[J]. Plant Disease Reporter, 1965, 49(6): 507-508
- [24] Nemeček S. *Fusarium solani* association with branch and trunk cankers on citrus weakened by cold weather in Florida[J]. Mycopathologia, 1987, 97(3): 143-150
- [25] 侣传杰,高桃生,李多山.健杨94的抗虫性试验[J].林业科技开发,2008,22(2):82-83
- [26] Bailey B A, Bae H, Strem M D, et al. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biocontrol potential in *Theobroma cacao*[J]. Biological Control, 2008,46: 24-35
- [27] Hanada R E, de Jorge Souza 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: 1335-1343
- [28] Howel C R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts[J]. Plant Disease, 2003, 87: 4-10
- [29] Holmes K A, Schroers H J, Thomas S E, et al. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America[J]. Mycological Progress, 2004, 3: 199-210