

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.004.002

板栗果实内生真菌群落组成及分化特征

闫星¹, 窦桂铭¹, 汪慧华², 李如华¹, 江泽平¹, 李志朋³, 严东辉^{1*}

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与自然保护研究所 国家林业和草原局森林保护学重点实验室, 北京 100091; 2. 北京农业职业学院 食品与生物工程系, 北京 100085; 3. 北京市怀柔区园林绿化局, 北京 101400)

摘要: [目的] 探明果实内生真菌群落结构组成和多样性是了解果实健康微生物组功能和机制的基础。[方法] 采用高通量测序技术和传统组织分离方法, 对 6 个板栗品种的健康果实及其果肉(子叶)和果壳(含种皮)组织的内生真菌群落进行了多样性和组成分析。[结果] 6 个品种的果实及其 2 个组织共 36 个样本总共产生 3 229 205 条高质量序列, 注释出真菌 1 557 个 OTUs, 分属 10 个门, 38 个纲, 97 个目, 203 个科, 350 个属。板栗果实中子囊菌门 Ascomycota (平均相对丰度 80.40%) 丰度最高, 其次为担子菌门 Basidiomycota (平均相对丰度 7.70%), 优势纲为粪壳菌纲 Sordariomycetes (平均相对丰度 43.00%) 和酵母菌纲 Saccharomycetes (平均相对丰度 15.10%)。品种间共有 (Shared) 真菌类群富集在座囊菌纲 Dothideomycetes 上, 其丰度 >90%。板栗果实品种间, 子囊菌门在每一个品种中同样体现为最丰富类群, 相对丰度为 57.96%~90.15%, 其次为担子菌门, 相对丰度为 3.28%~23.71%; 纲水平上, 优势类群出现变化, 酵母菌纲真菌相对丰度 (39.21%) 在毛板红品种中是最高的, 而粪壳菌纲真菌是另外 5 个板栗品种中最丰富类群 (29.47%~59.56%)。果实组织间, 果肉组织较之果壳具有更高的特有真菌多样性, 果肉组织特有优势类群全部为担子菌, 尤其是银耳纲 Tremellomycetes 的红菇目 Russulales。LEfSe 分析显示, 果壳和果肉组织存在显著性差异群落组成或种群, 镰孢属 *Fusarium*、梅奇酵母属 *Metschnikowia*、迈耶氏酵母属 *Meyerozyma* 和德巴利酵母属 *Debaryomyces* 真菌在果肉组织中具有显著优势。采用人工培养方法共获得有效菌株 2 346 株, 分属子囊菌、担子菌和毛霉菌门 Mucoromycota。除酵母菌类需特殊培养基筛选外, 可培养方法显示果实及其果壳、果肉上的真菌优势类群, 在群落组成和丰度上与高通量测序技术结果相似。[结论] 板栗果实具有丰富的以子囊菌粪壳菌纲和酵母菌纲为优势类群的内生真菌群落组成和种群多样性, 但建群种类主要来自座囊菌纲。板栗果实品种间的内生真菌群落组成结构具有明显差异。板栗果肉较之果壳组织有更为丰富的特有内生真菌多样性。板栗果肉和果壳组织内生真菌群落组成具有明显分化。本文系统报道了板栗果实内生真菌组的组成结构, 为利用板栗健康微生物组防控果实病害和了解坚果类果实微生物组提供了基础。

关键词: 板栗果实; 内生真菌组; 多样性; 子叶; 果皮; 非培养技术

中图分类号: S763.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2022)04-0009-14

植物根际微生物组与宿主互作机制和调控免疫抗病功能不断被发现, 在病害防控技术利用方面取得了突破性进展, 显示植物微生物组为病害绿色防控提供了新型途径^[1]。植物种实也存在着丰富的生物多样性, 这些微生物组在寄主幼龄阶段的适应

性和病害防御中起着重要作用, 并且对此后植物的种实健康发育、采后果实生理、品质和安全都有不可忽视的影响^[2]。但果实或种子微生物组结构与功能作用还有待探索 and 了解, 目前有报道的多是水果类果实, 如苹果^[3-4]、芒果^[5]、草莓^[6]、西瓜^[7]、桑

收稿日期: 2022-02-14 修回日期: 2022-03-17

基金项目: 繁殖器官微生物组对种实病害的调控机制研究 CAFYBB2021ZF001; 板栗基于堆肥及微生物群工程的板栗病害综合防控技术与示范 20326508D

* 通讯作者: 严东辉, 研究员, 博士。主要研究方向: 森林病理。Email: yandh@caf.ac.cn

蕈^[8]等,而坚果类微生物组多样性及其功能鲜有报道。内生真菌作为植物微生物组核心类群,遍布植物各个组织器官,参与调控植物组织生长发育、胁迫适应、进化和生态功能演化的作用^[9]。探索果实内生真菌组多样性和结构,是揭示微生物组调控果实健康功能和机制的基础。

中国板栗 (*Castanea mollissima* BL.) 属于壳斗科 *Fagaceae* 栗属 *Castanea* 植物,是最古老的驯化树种之一 (>3 500 年)^[10],是我国重要的经济林树种^[11],在世界板栗产业和经济中占有重要位置^[12],果实为坚果。虽然,利用可培养技术,有限地分析过板栗营养器官根、茎和叶中可培养内生真菌的多样性和作用^[13-14],但研究材料主要来自于欧洲栗 *C. sativa*^[11]。而在微生物组群落水平上对内生真菌组的结构和多样性的报道不多,尤其在板栗果实器官上的报道未见。鉴于健康板栗果实内生真菌组对于建立绿色防控板栗果腐病技术的重要意

义,我们采用 ITS 扩增子高通量测序的微生物非培养技术结合组织分离微生物可培养技术^[15],以中国板栗(燕山早丰、丹东板栗、大红袍、毛板红、泰山板栗和天师板栗)6个品种果实为研究材料,探究了不同品种果实间及其果壳、果肉间的内生真菌群落组成和多样性特征,为寻求和阐明内生真菌组调控板栗果实健康机制,了解和掌握坚果类果实微生物组的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 板栗果实材料

2020 年 9—10 月在板栗主产区采收 6 个板栗品种果实材料,分别是燕山早丰、毛板红、丹东板栗、大红袍、天师板栗及泰山板栗(表 1)。样品装于干净透气纸袋,不同地 8~48 小时低温运输至实验室,于 4 °C 放置,并在两周内完成样品预处理(核酸提取及分离培养)。

表 1 板栗果实样品采集信息

Table 1 Collection information of chestnut fruit samples

品种 Cultivars	地点 Locations	经纬度 Latitude and Longitude
燕山早丰	河北省唐山市迁西县	118°6'49"~118°37'19" E, 39°57'15"~40°27'48" N
毛板红	浙江省杭州市桐庐县	119°10'~119°58' E, 29°35'~30°05' N
丹东板栗	辽宁省丹东市	123°22'~125°42' E, 39°43'~41°09' N
大红袍	安徽省宣城市	117°58'~119°40' E, 29°57'~31°19' N
天师板栗	江西省鹰潭市	116°41'~117°30' E, 27°35'~28°41' N
泰山板栗	山东省泰安市	116°20'~117°59' E, 35°38'~36°28' N

1.2 果实样品预处理

预处理分为样品分组、表面消毒、组织分组和研磨分装。

样品分组:将果皮表面无虫眼和病害症状的板栗浸泡在自来水中,去掉漂浮果粒(病果)。每品种随机取 18~30 粒健康板栗,均分为 3 个组,即每组 6~10 粒,同品种 3 组互为生物学重复。

表面消毒:每组经 75% 酒精浸泡 3 min, 2%NaClO 溶液浸泡 5 min, 75% 酒精浸泡 3 min, 无菌水清洗 3 遍后,用无菌吸水纸吸除板栗表面水分。取最后一次清洗完后的无菌水 100 μL 涂布 PDA 平板,以检测消毒是否彻底。

组织分组:无菌超台中,在样品分组的基础上,按果实组织分成果壳(包括种皮)和果肉

两亚组。在此过程中,果实的子叶、种皮部位均未发现任何病害症状,表明所取样品均为健康板栗。

研磨分装:来自同一个生物学重复的果壳亚组和果肉亚组的材料分别用表面消毒后的研磨机(泰斯特,天津泰斯特仪器有限公司),高速粗打几秒成碎粒(约 5 mm),磨样均分装为两份,一份用于可培养内生真菌的组织分离,另一份打成粉末冻存于-80 °C 用于扩增子高通量测序。磨样过程中,为防样品残留结转,不同组不同亚组样品变换时,研磨机均做充分消毒(超纯水清洗 3 次+70%乙醇清洗 1 次+无菌水清洗 2 次)。

最后形成 6 个品种、2 个组织、每个组织 3 个重复,共 36 个样品,样品记号请见正文。

1.3 DNA 提取和 ITS 片段扩增

用于非培养内生真菌组测序的 36 个样品基因组 DNA 的提取参照修改后的 Aboul-Maaty 等人的 CTAB 法^[16]。将冻于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的样品材料取 50 mg 放入无菌研钵中, 用液氮充分研磨装于 2 mL 离心管中, 后快速加入 800 μL 于 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热的 2% CTAB (0.1% β -巯基乙醇) 提取液 (酷来博)。6 mol.L⁻¹ NaCl 溶液替换成 5 mol.L⁻¹ NaCl 溶液。其他步骤不变。50 μL 1 \times TE 缓冲液溶解 DNA, DNA 浓度用 NanoDrop ND-2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 测定, 浓度合格后交由北京奥维森公司进行 PCR 扩增及 Illumina MiSeq 平台测序, 扩增区域为 ITS1, 引物为 ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) 和 ITS2R (GCTGCGTTCTTCATCGATGC)^[17]。

分离培养获得的真菌材料的基因组 DNA 采用修改后的 CTAB 法进行提取^[18], ITS 扩增引物为 ITS1 和 ITS4 或者 ITS5 和 ITS4^[19], 扩增序列交由上海生物工程有限公司测序。

1.4 Miseq 测序及生信分析

下机读段 raw data 经过 QIIME1 (v1.8.0)^[20] 软件根据 Barcode 序列拆分样本, 使用 Pear (v0.9.6) 软件对数据进行过滤、拼接, 去除打分值低于 20, 含有模糊碱基, 引物错配序列。拼接时最小 overlap 设置为 10 bp, 错配率为 0.1。拼接后使用 Vsearch (v2.7.1) 软件去除长度小于 230 bp 的序列, 并根据 Gold Database 数据库用 uchime 方法比对去除嵌合体序列, 形成 clean data。基于 Unite 数据库^[21] 比对注释后, 使用 Vsearch (v2.7.1) 软件 uparse 算法对优质序列以 97% 序列相似度划分分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs)。利用 QIIME1 (v1.8.0) 软件进行 α 多样性指数分析 (包括 Shannon、Chao 指数), 同时计算 beta 多样性距离矩阵, 综合 ANOSIM 组间差异检验结果, 对样本进行 NMDS 非度量多维尺度分析。用 Python (v2.7) 软件进行 LEfSe 分析, 找出在不同分类水平对样本结构差异产生显著性影响的类群。Miseq 测序数据已上传 NCBI (SUB9969166)。

1.5 内生真菌的组织分离培养及分子鉴定

组织分离可培养真菌的培养基为 MEA (90 mm 皿), 每皿 7~8 块组织、每个样品约 350 块。25 $^{\circ}\text{C}$ 培养黑暗下生长 5~7 d, 挑取菌丝在相同培养基

和条件下扩培纯化 2 周。以品种下的组织部位为最小划分单元, 单元总数为 6 (6 个品种) \times 2 (2 个组织部位) = 12 个。依据菌落形态特征对同一单元内部的分离菌株进行初期归类和数量统计, 每单元中挑选出每类代表性菌落 1 株进行分子鉴定菌种并相互印证形态归类的一致性。

分子鉴定依据 ITS 序列在 NCBI 的 BLASTn 结果, 参数为相似性 (Identity>97%)、覆盖率 (Coverage>75%), 并参考培养菌落性状与模式菌种菌落形态、系统发育树构建 (ML 法), 限于篇幅, 本研究鉴定过程数据未列出, 直接应用鉴定结果。菌种鉴定序列见 NCBI 序列号: OM574649 - OM574769。

1.6 作图与统计分析

非培养测序分析结果基于 OTU 物种注释及相对丰度结果和 Weighted Unifrac 距离等, 使用 R (v3.6.0) 软件对物种组成柱状图, NMDS 图, 韦恩图进行绘制。分离培养的内生真菌种群多样性组成和结构分析用图, 依据数据在 Excel (Office 2016) 统计分析形成。所有数据在相同总数下进行统计计算形成可比较性, 组内组间数据依据分析处理需要或以重复平均值或以组合加减, 柱状图均采用相对丰度。

2 结果与分析

2.1 板栗果实及其组织的内生真菌组多样性

经过序列去噪和质量过滤后, 6 个品种的果实及其 2 个组织共 36 个样本总共产生 3 229 205 条符合质量的序列, 样本序列数最少 27 025 条、最多 268 176 条, 平均 $89\ 700\pm 52\ 015$ (mean \pm SD) 条序列, 注释出真菌 OTUs 1 557 个。

板栗果实内生真菌群落存在丰富的多样性 (表 2)。36 个样本中, Chao 指数范围为 185.74 ± 31.24 (丹东板栗果壳部位) $\sim 343.67\pm 34.96$ (天师板栗果肉部位); Shannon 指数范围为 1.86 ± 1.12 (毛板红果壳部位) $\sim 4.97\pm 0.48$ (燕山早丰果肉部位)。果壳和果肉组织间, 果肉具有明显高于果壳的 Chao 指数和 Shannon 指数。

基于 ANOSIM 组间差异检验的 NMDS 方法分析的 Beta 多样性结果表明 (图 1A-B), 品种和组织样品的内生真菌群落构成自身聚类, 品种间 ($R=0.6864$, $P=0.001$) 和组织间 ($R=0.1907$, $P=0.002$) 内生真菌菌落结构均存在显著性差异。

表 2 基于 Turkey 检验的板栗果实内生真菌群落 Alpha 多样性指数分析

Table 2 Alpha diversity index analysis of endophytic fungal community in chestnut fruit based on Turkey test

指数类型 Index type	品种 Cultivars	果肉组织 Kernel	果壳组织 Shell	P
Chao 指数	丹东板栗	238.06±27.91	185.74±31.24	0.997
	大红袍	287.79±33.67	318.43±28.91	0.002**
	毛板红	287.71±51.97	209.31±68.44	1.000
	泰山板栗	281.70±20.99	247.51±49.65	1.000
	天师板栗	343.67±34.96	232.12±42.89	0.935
	燕山早丰	297.81±94.09	282.77±90.39	0.003**
Shannon 指数	丹东板栗	4.64±0.23	2.05±0.57	1.000
	大红袍	4.21±0.68	3.96±0.29	0.469
	毛板红	4.34±0.32	1.86±1.12	0.632
	泰山板栗	4.21±0.69	3.55±0.14	0.006**
	天师板栗	4.68±0.36	2.33±0.19	1.000
	燕山早丰	4.97±0.48	3.57±0.23	0.283

注：表中数值表示平均值±标准偏差；**表示样本间具有极显著差异 ($P \leq 0.01$)

Note: The values in the table represent the mean ± standard deviation; ** means there is a very significant difference between samples ($P \leq 0.01$)

2.2 板栗果实及其组织的内生真菌群落组成与结构

2.2.1 果实内生真菌群落 来自于中国板栗 6 个品种的 1 557 个 OTUs 比对到 10 个门, 38 个纲, 97 个目, 203 个科, 350 个属。门水平上, 子囊菌门 Ascomycota 真菌为最优势类群, 平均相对丰度为 80.40%, 其次为担子菌门 Basidiomycota 真

菌, 平均相对丰度为 7.7% (图 2 门)。38 个纲中 (图 2 纲), 优势丰度类群主要归于粪壳菌纲 Sordariomycetes (平均相对丰度 43.00%)、酵母纲 Saccharomycetes (平均相对丰度 15.10%); 203 个科单元中 (图 2 科), 圆孔壳科 Sporocadaceae 平均相对丰度 (11.59%) 位于第一; 350 个属中 (图 2 属), 有近 13 个属平均相对丰度占比超过 1%, 包括拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、梅奇酵母属 *Metschnikowia*、镰孢属 *Fusarium*、青霉属 *Penicillium*、德巴利酵母属 *Debaryomyces* 等, 其中拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 平均相对丰度最高 (8.95%)。6 个板栗品种果实共享了 103 个 OTUs (图 3 左), 全部来自座囊菌纲 Dothideomycetes、古根菌纲 Archaeorhizomycetes 和一待定名纲的类群, 其中座囊菌纲在共有纲类中占据了 92% 以上的丰度 (表 3), 该纲共有 6 个目的类群在果实中发现, 其中 3 个目格孢腔菌目 Pleosporales、煤炱目 Capnodiales 和葡萄座腔菌目 Botryosphaerales 的丰度占据近 85%, 格孢腔菌目的真菌丰度最高 (55.34%); 3 个目中, 统计有 19 个科和 29 个属的真菌丰度, 其中丰度大于 5% 的科 7 个、丰度大于 2% 的属有 5 个。属水平上, 枝孢属 *Cladosporium* 的丰度最高 (5.83%), 其次为葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria* (3.88%)。

板栗果实品种间的内生真菌组成结构不同。从门水平来看 (图 2 门), 子囊菌门 Ascomycota 和担子菌门 Basidiomycota 类群相对丰度在燕山早

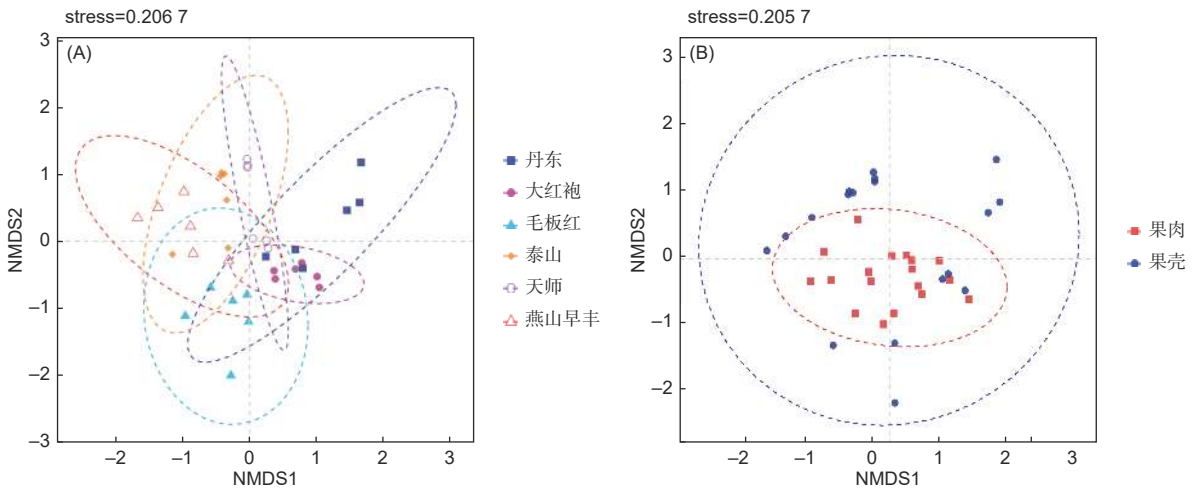
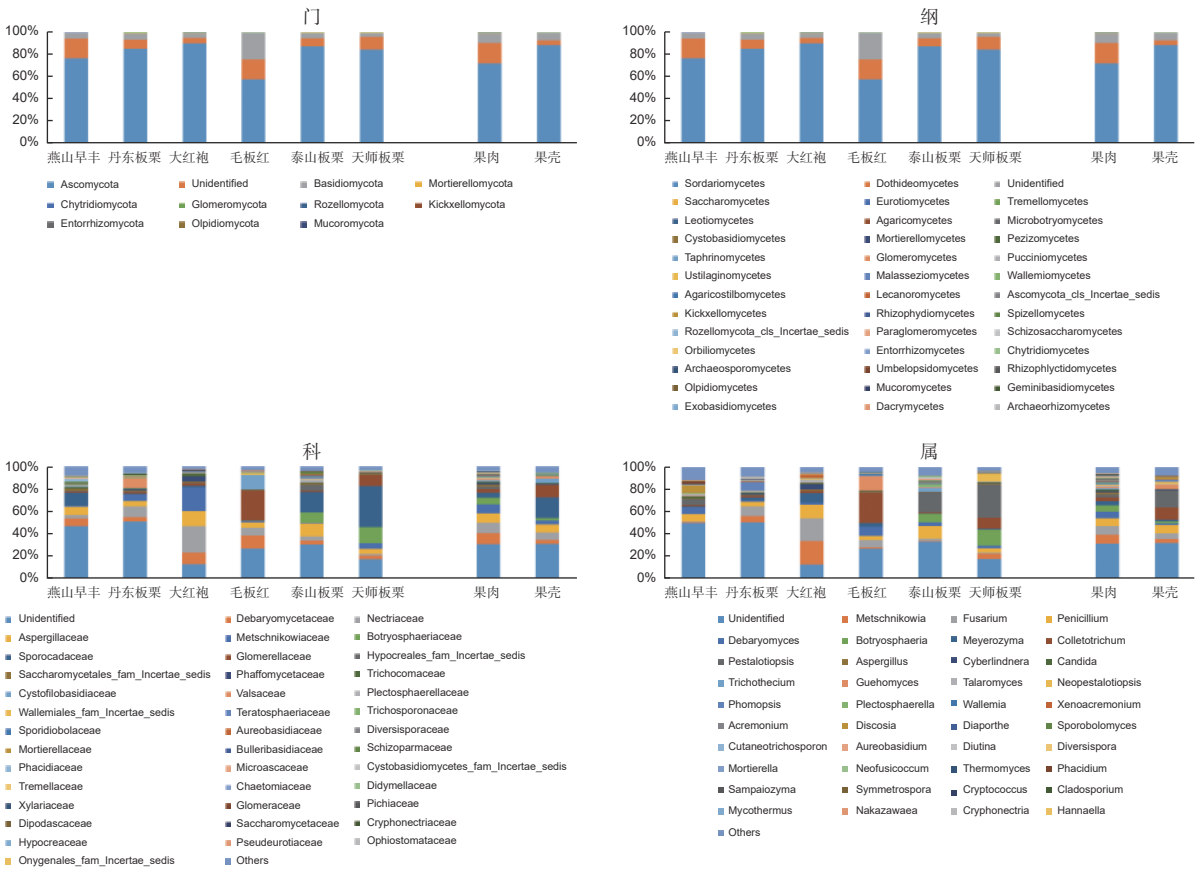


图 1 板栗果实内生真菌菌种间 (A) 和组织间 (B) Beta 多样性

Fig. 1 Beta diversity analysis of endophytic fungal community between cultivars (A) and tissues (B) in chestnut fruits



注: 每分类级中相对丰度>1% (含) 的单元进行统计, <1% 相对丰度的所有单元合并为 others。

Note: Units with relative abundance >1% (inclusive) in each taxonomic class are counted, and all units with relative abundance <1% are merged into others.

图 2 板栗果实品种及组织内生真菌菌群结构分析

Fig. 2 Analysis of endophytic fungal structure in different cultivars and tissues of chestnut fruit

丰、丹东板栗、大红袍、毛板红、泰山板栗及天师板栗中都处于第一和第二位置, 其相对丰度分别为 76.74% 和 5.07%、85.33% 和 5.59%、90.15% 和 3.98%、57.96% 和 23.71%、87.51% 和 4.56%、84.73% 和 3.28%。此外被孢霉门 *Mortierellomycota*、球囊菌门 *Glomeromycota*、罗兹菌门 *Rozellomycota* 以及壶菌门 *Chytridiomycota* 在这 6 个品种中也都占据一定丰度。还有 4 个门类真菌只出现在部分品种中, 例如丹东板栗、大红袍、毛板红和泰山板栗中有少量毛霉菌门 *Mucoromycota* 真菌, 而燕山早丰和天师板栗中则没有; 在纲层面 (图 2 纲), 粪壳菌纲和座囊菌纲真菌是燕山早丰和天师板栗中的优势纲类群, 其中粪壳菌纲相对丰度最高, 在两品种中相对丰度分别为 29.47%、52.91%。大红袍品种中优势纲由酵母纲 (39.21%)、粪壳菌纲 (32.52%) 和散囊菌纲 *Eurotiomycetes* (16.36%) 组成。毛板红品种中优势纲以粪壳菌纲 (36.62%)、酵母纲

(13.68%) 和银耳纲 *Tremellomycetes* (18.82%) 为主。粪壳菌纲 (46.93%)、座囊菌纲 (22.09%) 和散囊菌纲 (12.19%) 真菌是泰山板栗中的优势类群。而丹东板栗中, 仅粪壳菌纲真菌 (59.56%) 的相对丰度就接近 60%; 从科水平来看 (图 2 科), 燕山早丰, 泰山板栗和天师板栗品种中圆孔壳科相对丰度最高, 其相对丰度分别为 11.71%、18.41% 和 36.90%。而赤壳科 *Nectriaceae*、小丛壳科 *Glomerellaceae* 则分别是丹东板栗和大红袍、毛板红品种中相对丰度最高的类群, 其相对丰度分别为 9.43% 和 23.62%、27.14%; 属水平上 (图 2 属), 以相对丰度>10% 为界, 大红袍中有梅奇酵母属 *Metschnikowia* (20.98%)、镰孢属 *Fusarium* (20.23%) 及青霉属 *Penicillium* (12.22%), 毛板红中为炭疽菌属 *Colletotrichum* (27.14%) 和 *Guehomyces* (12.93%), 泰山板栗中为拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* (18.19%) 和青霉属 *Penicillium* (11.30%), 天师板栗中则为

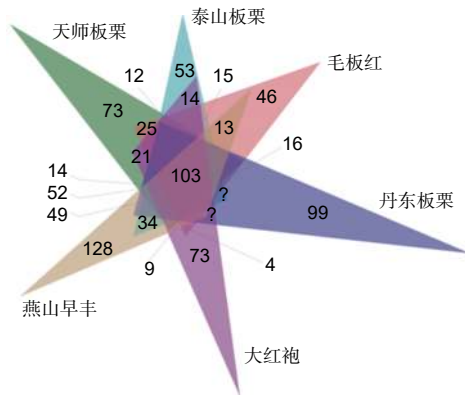


图 3 板栗果实品种及组织内生真菌操作分类单元 (OTUs) 分析

Fig. 3 Analysis of endophytic fungal OTUs in different cultivars and tissues of chestnut fruit

拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* (29.76%) 和葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria* (14.27%)。而燕山早丰和丹东板栗中, 所有属的相对丰度均在 10% 以下。燕山早丰中相对丰度大于 5% 的属有 5 个, 最高为青霉属 *Penicillium* (6.64%), 最低为拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* (5.15%)。丹东板栗相对丰度大于 5% 的属有 3 个, 分别是镰孢属 *Fusarium* (8.64%)、拟茎点霉属 *Phomopsis* (7.60%) 和梅奇酵母属 *Metschnikowia* (5.59%)。

2.2.2 果实组织的内生真菌群落 果壳和果肉在门水平上内生真菌群落组成结构相似, 但同一门内, 除子囊菌门的丰度是果肉 (72.13%) 小于果壳 (88.61%) 外, 果肉中其他门的丰度都明显高

于果壳 (图 2); 纲水平上 (图 2), 粪壳菌纲在不同组织中相对丰度均为最高, 且果壳 (58.69%) 是果肉 (27.24%) 的 2 倍, 而酵母菌纲在果肉中 (21.99%) 是果壳 (8.27%) 的近 3 倍; 在科层面 (图 2), 16 个科的相对丰度占比超过 1%。德巴利酵母菌科在果肉中的丰度最高 (9.95%), 圆孔壳科在果壳中的丰度最高 (18.73%)。属水平上 (图 2), 17 个属相对丰度占比超过 1%, 包括拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、炭疽菌属 *Colletotrichum*、梅奇酵母属 *Metschnikowia*、镰孢属 *Fusarium* 等。

按照专性分布数目、分类单元、相对丰度 > 0.5%, 列出了各分类层级水平的真菌群落分布情况 (表 4)。专性果肉分布的真菌群落多样性均明显高于果壳, 并以高级分类层级门、纲和目最为突出, 果肉分别有 2、7 和 15 个单元, 而果壳中缺乏门和纲的单元, 仅在目中出现 1 个冠囊菌目 Cronophorales。果肉专性分布的最优势类群, 门以下均为担子菌, 银耳纲、红菇目 Russulales、红菇科 Russulaceae、马拉色菌科 Malasseziaceae、以及 *Mycoacia* 属; 而果壳中专性分布的目和科最优势类群均为子囊菌, 冠囊菌目、夹孢腔菌科 Sporormiaceae, 但属中是担子菌酵母 *Rhodospordiobolus* 属丰度最高。

2.2.3 果实组织间显著差异性群落和种群 多级物种层级分析 LEfSe 显示 (图 4), 板栗果实果壳和果肉在不同分类层级水平上存在显著性差异群落组成或种群。依 LDA score > 4 及点分支图分析, 门水平中的子囊菌门和担子菌门, 纲水平的粪壳菌纲、银耳纲和酵母纲, 属水平中的镰孢属 *Fusarium*、梅奇酵母属 *Metschnikowia*、迈耶氏酵

表 3 板栗果实品种间共享内生真菌 OTUs 优势类群分析
Table 3 Analysis of dominant groups of endophytic fungi OTUs shared among chestnut fruit varieties

分类单元 Taxon	数目 Number	优势类群 Dominant group	相对丰富** Relative abundance
纲	3*	Dothideomycetes	92.23%
目	6*	Pleosporales	55.34%
		Capnodiales	24.27%
		Botryosphaeriales	5.83%
		Unidentified	10.68%
科	19*	Mycosphaerellaceae	9.71%
		Pleosporaceae	8.74%
		Cladosporaceae	6.80%
		Phaeosphaeriaceae	6.80%
		Botryosphaeriaceae	5.83%
		Didymellaceae	5.83%
		Lophotremataceae	5.83%
		Unidentified	19.41%
		Cladosporium	5.83%
		Botryosphaeria	3.88%
属	29*	Curvularia	2.91%
		Phaeosphaeria	2.91%
		Sphaerulina	2.91%

注: “*”代表来自于上一级相同分类单元下含有的本级分类单元个数; “**”代表相对于共享 103 OTUs 的丰富

Note: “*” represents the number of current level taxons from the same taxon at the upper level; “**” represents the abundance relative to shared 103 OTUs

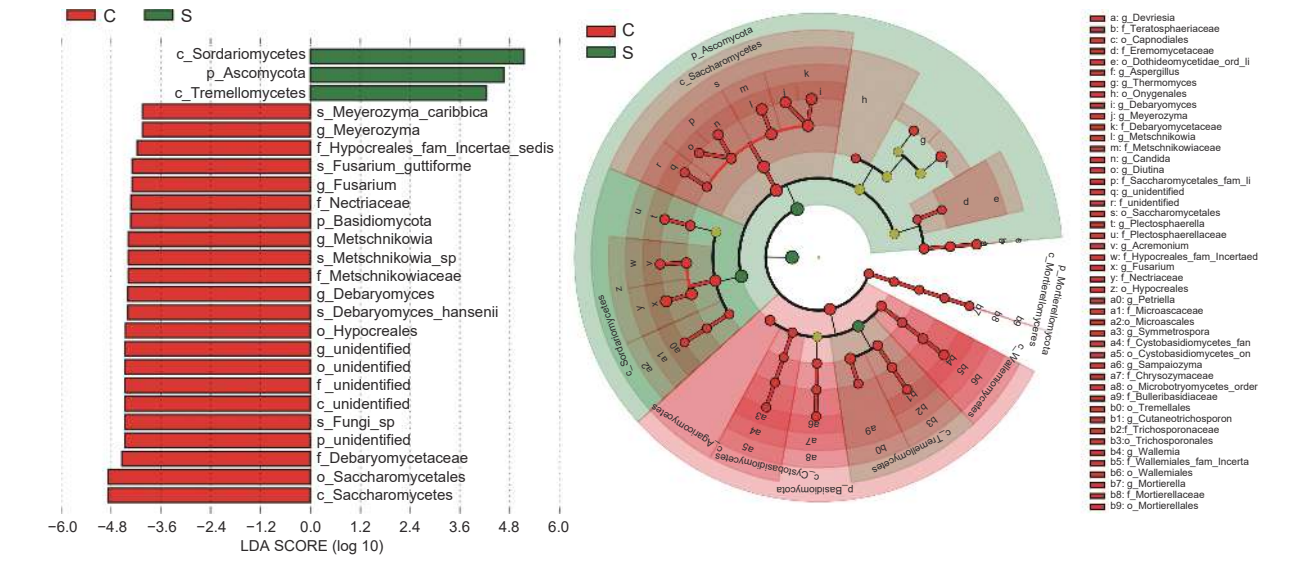
母属 *Meyerozyma* 和德巴利酵母属 *Debaryomyces* 以及种水平的梅奇酵母菌 *Metschnikowia* sp.、汉斯德巴利酵母菌 *Debaryomyces hansenii*、卡利比

克迈耶氏酵母 *Meyerozyma caribbica* 和 *Fusarium guttiforme*, 这些群落或种群对果壳和果肉间差异具有显著影响。

表 4 板栗果实组织间共享内生真菌 OTUs 优势类群分析

Table 4 Analysis of dominant groups of endophytic fungi OTUs shared among chestnut fruit tissues

组织部位	数目	门	相对丰富	组织部位	数目	科	相对丰富	组织部位	数目	属	相对丰富
Tissue	Number	Phylum	Relative abundance	Tissue	Number	Family	Relative abundance	Tissue	Number	Genus	Relative abundance
果肉	2	Mucoromycota	0.50%			Russulaceae	1.53%			Mycocacia	1.01%
果壳	0	--	--			Entolomataceae	1.02%			Arthrotrichy	0.51%
						Malasseziaceae	1.02%			Entoloma	0.51%
						Meruliaceae	1.02%			Fibroporia	0.51%
						Periconiaceae	0.77%			Filobasidium	0.51%
						Dermateaceae	0.51%			Geminibasidium	0.51%
						Geminibasidiaceae	0.51%	果肉	87	Kazachstania	0.51%
						Hyaloscyphaceae	0.51%			Lactarius	0.51%
						Orbiliaceae	0.51%			Metapochonia	0.51%
						Rhizophydiaceae	0.51%			Microascus	0.51%
						Strophariaceae	0.51%			Perenniporia	0.51%
						Tricholomataceae	0.51%			Petriella	0.51%
						Venturiaceae	0.51%			Rhizophydium	0.51%
						Xylariales_fam_Incertae_sedis	0.51%			Tomentella	0.51%
						Sporormiaceae	2.76%			Rhodosporeidiobolus	1.05%
						Cantharellales_fam_Incertae_sedis	1.03%			Apiogmonia	0.70%
						Geastraceae	0.69%			Bisufusarium	0.70%
						Leucosporidiaceae	0.69%	果壳	48	Hydnellum	0.70%
						Pezizales_fam_Incertae_sedis	0.69%			Myriostoma	0.70%
						Scortechiniaceae	0.69%			Parasymphodiella	0.70%
										Phialea	0.70%
										Sistotrema	0.70%



注: C 代表果肉组织, S 代表果壳组织。
Note: C stands for kernel, S stands for shell.

图 4 板栗果实组织间内生真菌菌群差异分析

Fig. 4 Analysis of differences in endophytic fungal community among chestnut fruit tissues

2.3 可培养的内生真菌群落

传统组织分离法共获得有效菌株 2 346 株, 代表性菌落共计 120 株, 依 ITS 序列、菌落形态及系统发育树鉴定出 76 个种 (表 5), 可归于 33 属、

22 科、13 目、7 纲、3 门 (图 5)。6 个品种间的相同分类单元合并并相加分离频次除以有效菌株数作为相对丰度值。依丰度由高到低, 形成了板栗果实可培养的内生真菌群落分布情况 (图 5)。门和

表 5 板栗果实可培养内生真菌分离结果

Table 5 Isolation results of culturable endophytic fungi from chestnut fruit

分离物鉴定 Isolates	NCBI序列号 NCBI Number	燕山 早丰	丹东 板栗	泰山 板栗	天师 板栗	大红 袍	毛板 红
<i>Alternaria alternata</i>	OM574649/OM574650/OM574651	81	19	—	—	—	—
<i>A. chenopodiicola</i>	OM574652	—	—	1	—	—	—
<i>A. tenuissima</i>	OM574653	5	—	—	—	—	—
<i>Apiognomonina</i> sp.	OM574654/OM574655/OM574656	—	63	3	—	—	—
<i>Aspergillus aculeatus</i>	OM574657	—	—	—	—	1	—
<i>Aspergillus japonicus</i>	OM574658	—	—	—	—	2	—
<i>Aspergillus niger</i>	OM574659	—	—	—	—	1	—
<i>Bartalinia robillardoides</i>	OM574660	5	—	—	—	—	—
<i>Beltraniella portoricensis</i>	OM574661	—	—	—	—	1	—
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	OM574662/OM574663/OM574664/OM574665	4	—	1	34	118	—
<i>B. wangensis</i>	OM574666	—	—	—	—	6	—
<i>Colletotrichum fructicola</i>	OM574667	—	—	—	—	1	—
<i>C. gloeosporioides</i>	OM574668/OM574669/OM574670	—	—	—	168	6	3
<i>C. siamense</i>	OM574671/OM574672	—	—	—	—	7	1
<i>C. yulongense</i>	OM574673	—	—	—	1	—	—
<i>Coniella castaneicola</i>	OM574674/OM574675/OM574676	—	—	43	53	74	—
<i>Coniella</i> sp.	OM574677/OM574678	14	—	—	—	5	—
<i>Curvularia eragrostidis</i>	OM574679	—	—	—	—	3	—
<i>Cylindrium elongatum</i>	OM574680	2	—	—	—	—	—
<i>Cytospora</i> spp.	OM574681/OM574682	—	1	—	2	—	—
<i>Debaryomyces hansenii</i>	OM574683/OM574684	—	—	—	—	—	3
<i>Diaporthe australiana</i>	OM574685	—	—	—	—	7	—
<i>D. cotoneastri</i>	OM574686	—	—	1	—	—	—
<i>D. eres</i>	OM574687/OM574688	3	—	5	—	—	—
<i>D. eucommiae</i>	OM574689	—	—	—	—	1	—
<i>D. hongkongensis</i>	OM574690/OM574691	—	—	—	2	35	—
<i>D. nobilis</i>	OM574692/OM574693/OM574694	—	67	—	—	2	—
<i>D. phaseolorum</i>	OM574695	—	—	—	—	10	—
<i>D. pseudophoenicicola</i>	OM574696	—	—	3	—	—	—
<i>D. ternstroemia</i>	OM574697	—	—	—	1	—	—
<i>Discosia rubi</i>	OM574698	—	—	—	1	—	—
<i>Eremothecium coryli</i>	OM574699	5	—	—	—	—	—
<i>Flammulina filiformis</i>	OM574700	—	—	1	—	—	—
<i>Fusarium avenaceum</i>	OM574701	—	—	—	1	—	—
<i>F. chlamydosporum</i>	OM574702	3	—	—	—	—	—
<i>F. fujikuroi</i>	OM574703	—	—	—	—	1	—
<i>F. oxysporum</i>	OM574704	—	—	1	—	—	—
<i>F. proliferatum</i>	OM574705/OM574706/OM574707	44	—	1	—	2	—
<i>F. redolens</i>	OM574708/OM574709	—	—	—	—	3	—

续表5

分离物鉴定 Isolates	NCBI序列号 NCBI Number	燕山 早丰	丹东 板栗	泰山 板栗	天师 板栗	大红 袍	毛板 红
<i>F. solani</i>	OM574710/OM574711	37	—	—	—	20	—
<i>Gnomoniopsis daii</i>	OM574712/OM574713/OM574714/OM574715/OM574716	—	—	—	103	138	8
<i>Gnomoniopsis</i> sp.	OM574717	1	—	—	—	—	—
<i>Mucor lusitanicus</i>	OM574718/OM574719	6	—	—	—	—	—
<i>M. racemosus</i>	OM574720/OM574721/OM574722/OM574723	252	—	1	—	—	1
<i>Neopestalotiopsis clavisporea</i>	OM574724	—	—	—	—	350	—
<i>N. saprophytica</i>	OM574725/OM574726/OM574727	—	—	—	11	2	—
<i>Nothophoma quercina</i>	OM574728	5	—	—	—	—	—
<i>Ochrocladosporium</i> sp.	OM574729	—	—	1	—	—	—
<i>Penicillium aethiopicum</i>	OM574730	—	—	—	—	1	—
<i>P. citrinum</i>	OM574731	—	—	—	—	2	—
<i>P. commune</i>	OM574732/OM574733	—	—	—	—	—	5
<i>P. expansum</i>	OM574734	—	—	—	—	1	—
<i>P. glabrum</i>	OM574735/OM574736/OM574737/OM574738/OM574739/OM574740/OM574741	41	—	153	—	47	1
<i>P. mallochii</i>	OM574742	—	—	—	—	6	—
<i>P. polonicum</i>	OM574743	—	—	—	—	—	1
<i>P. rolfsii</i>	OM574744	—	—	—	—	2	—
<i>P. simplicissimum</i>	OM574745	—	—	—	—	3	—
<i>P. spinulosum</i>	OM574746	—	—	32	—	—	—
<i>P. thomii</i>	OM574747/OM574748	—	—	—	—	25	1
<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	OM574749	—	—	—	—	5	—
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	OM574750/OM574751/OM574752/OM574753	—	1	1	92	10	—
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	OM574754	—	—	—	—	1	—
<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	OM574755/OM574756	—	—	1	—	5	—
<i>Petriella sordida</i>	OM574757	2	—	—	—	—	—
<i>Phacidium faciforme</i>	OM574758/OM574759	11	—	—	—	—	—
<i>Phacidium lacerum</i>	OM574760	—	—	1	—	—	—
<i>Phoma herbarum</i>	OM574761	2	—	—	—	—	—
<i>Phoma</i> sp.	OM574762	5	—	—	—	—	—
<i>Phomopsis</i> sp.	OM574763	8	—	—	—	—	—
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	OM574764	—	—	—	—	—	1
<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>	OM574765	—	—	—	1	—	—
<i>Pseudoplagiostoma</i> sp.	OM574766	—	5	—	—	—	—
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	OM574767	3	—	—	—	—	—
<i>T. reesei</i>	OM574768	—	—	—	—	1	—
<i>Xenoacremonium recifei</i>	OM574769	—	—	—	—	1	—

纲水平上, 分离频次丰度最高的是子囊菌门 Ascomycota 和粪壳菌纲 Sordariomycetes, 散囊

菌纲 Eurotiomycetes、座囊菌纲 Dothideomycetes、毛霉菌纲 Mucoromycetes 也较高频次分离到。目

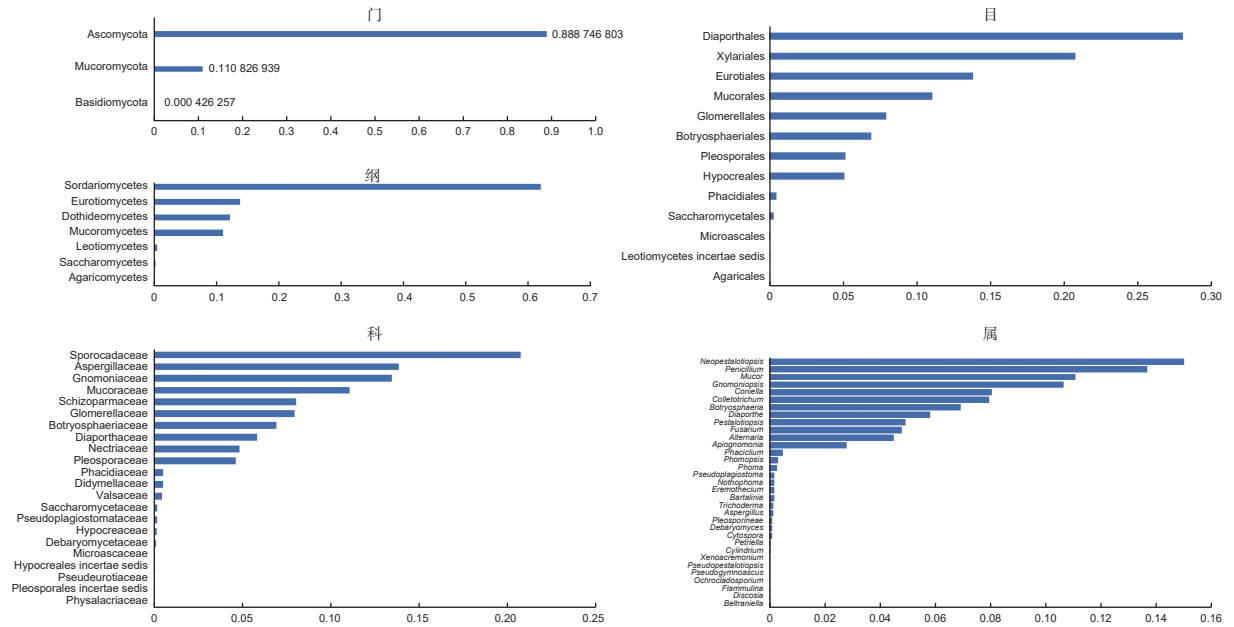


图 5 板栗果实可培养内生真菌在各分类阶级上的分布情况

Fig. 5 Distribution of culturable endophytic fungi from chestnut fruits in different taxonomic classes

和科水平上，间座壳目 Diaporthales 和夹孢腔菌科 Sporocadaceae 的丰度分别最高；新拟盘多毛孢属 *Neopestalotiopsis* 在属阶级中分离频次丰度最高。果肉和果壳组织分离到的最高频次的类群或种群基本一致（表 6），门、纲、目水平中，分别为子囊菌门、粪壳菌纲、间座壳目，但果壳（40.13%~71.34%）中的丰度明显高于果肉（10.82%~19.52%）；科和属水平中，果壳是日规壳科 Gnomoniaceae（21.34%）和梨孢日规壳属 *Apiognomona*（16.29%）、果肉是间座壳科 Diaporthaceae（8.57%）和间座壳属 *Diaporthe*（8.57%）。各阶级中的组成单元数上，门、纲、目水平，果肉多于果壳；科和属水平，果壳多于果肉；同一分类单元，果壳的丰度往往高于果肉。

3 讨论

3.1 板栗果实内生真菌组群落结构及其组成

中国板栗果实具有丰富的内生真菌群落多样性（表 1），且其内生真菌群主要以子囊菌门和担子菌门（门水平）、粪壳菌纲和酵母纲（纲水平）、圆孔壳科（科水平）以及包括拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 在内的 13 个属（属水平）等为优势类群的群落构成。该结果与其他果实的研究报道一致^[3, 8]，并被认为是子囊菌真菌具有更快的进化速率和适应性从而形成更高多样性的结果^[22]。6 个品

种间果实共有（shared）种群则全部为子囊菌，其中优势纲类和优势目类分别是座囊菌纲（丰度 > 90%）和格孢腔菌目（丰度近 50%）（表 3）；优势种群（>2%）可能来自枝孢属 *Cladosporium*、葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*、弯孢属 *Curvularia*、球腔菌属 *Phaeosphaeria* 和亚球壳属 *Sphaerulina*（表 3）。这些来自上述共有优势属的种群可能是中国板栗果实内生真菌的建群种群。

数据显示板栗果实品种间的内生真菌群落组成结构具有明显差异（图 2），不同品种板栗果实均以子囊菌门为最优势类群（图 2 门），其次是担子菌门，但包括毛霉菌门在内的其他 4 个门的真菌只出现在丹东板栗、大红袍、毛板红和泰山板栗中。纲水平开始优势类群出现不同，毛板红品种中相对丰度最高的是酵母菌纲真菌，而另外 5 个板栗品种中最丰富类群为粪壳菌纲真菌（图 2 纲）。在科水平（图 2 科），圆孔壳科是燕山早丰，泰山板栗和天师板栗中最丰富的类群，而赤壳科、小丛壳科则分别是丹东板栗和大红袍、毛板红品种中相对丰度最高的类群。在属层面，品种间的群落组成结构差异更大（图 2 属）。优势属（相对丰度 > 10%）在大红袍中为梅奇酵母属 *Metschnikowia*、镰孢属 *Fusarium* 及青霉属 *Penicillium*，毛板红中为炭疽菌属 *Colletotrichum* 和 *Guehomyces*，泰山板栗中为拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 和青霉属

表6 板栗果实组织间可培养内生真菌在各分类阶级上的分布情况

Table 6 Distribution of culturable endophytic fungi among chestnut fruit tissues in different taxonomic classes

纲 Class	果壳 Shell	果肉 Kernel	门 Phylum	果壳 Shell	果肉 Kernel	属 Genus	果壳 Shell	果肉 Kernel
Sordariomycetes	55.99%	11.66%	Ascomycota	71.34%	19.52%	Apiognomonia	16.29%	2.15%
Dothideomycetes	11.55%	0.52%	Zygomycota	8.59%	0.51%	Diaporthe	12.36%	8.57%
Zygomycetes	8.59%	0.51%	Basidiomycota	--	0.03%	Mucor	8.59%	0.51%
Eurotiomycetes	3.20%	6.98%				Alternaria	8.34%	0.21%
Leotiomyces	0.41%	0.10%				Neopestalotiopsis	6.46%	0.02%
Saccharomycetes	0.19%	0.27%				Gnomoniopsis	5.05%	0.11%
Agaricomycetes	--	0.03%				Coniella	4.37%	--
			科 Family	果壳 Shell	果肉 Kernel			
			Gnomoniaceae	21.34%	2.25%	Colletotrichum	3.50%	0.28%
			Diaporthaceae	12.36%	8.57%	Fusarium	3.38%	0.09%
			Sporocadaceae	8.76%	0.38%	Penicillium	3.13%	6.98%
			Mucoraceae	8.59%	0.51%	Botryosphaeria	2.98%	0.03%
			Pleosporaceae	8.40%	0.21%	Pestalotiopsis	2.09%	0.36%
			Schizoparmaceae	4.37%	--	Pseudoplagiostoma	1.45%	--
			Glomerellaceae	3.50%	0.28%	Cytospora	0.33%	--
			Nectriaceae	3.38%	0.11%	Phacidium	0.31%	0.10%
			Aspergillaceae	3.20%	6.98%	Phomopsis	0.28%	--
			Botryosphaeriaceae	2.98%	0.03%	Debaryomyces	0.19%	0.09%
			Pseudoplagiostomataceae	1.45%	--	Bartalinia	0.17%	--
			Valsaceae	0.61%	--	Phoma	0.17%	0.07%
			Phaciaceae	0.31%	0.10%	Trichoderma	0.12%	--
			Debaryomycetaceae	0.19%	0.09%	Pseudogymnoascus	0.09%	--
			Didymellaceae	0.17%	0.24%	Aspergillus	0.07%	--
			Hypocreaceae	0.12%	--	Cylindrium	0.07%	--
			Pseudeurotiaceae	0.09%	--	Curvularia	0.05%	--
			Hypocreales incertae sedis	0.07%	--	Discosia	0.02%	--
			Beltraniaceae	0.02%	--	Pseudopestalotiopsis	0.02%	--
			Microascaceae	--	0.07%	Beltraniella	0.02%	--
			Phyalacriaceae	--	0.03%	Eremothecium	--	0.17%
			Pleosporales incertae sedis	--	0.03%	Nothophoma	--	0.17%
			Saccharomycetaceae	--	0.17%	Petriella	--	0.07%
						Flammulina	--	0.03%
						Ochrocladosporium	--	0.03%
						Xenoacremonium	--	0.02%

Penicillium, 天师板栗中则为拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 和葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*。燕山早丰中优势属(相对丰度>5%)由包括青霉属 *Penicillium* 在内的 5 个属组成, 而以镰孢属 *Fusarium* 为首的 3 个属则是丹东板栗中的优势属。这些材料来自从北到南的华北和华东板栗主产区或分布区, 因此, 我们认为这些差异代表了地理区域性或品种的遗传属性^[23-25]。

可培养方法得到的结果进一步证实了上述论证, 在分离获得的内生真菌种类中, 有 80% 的种类属于子囊菌门, 11% 的属于毛霉菌门, 余下种类属于担子菌门; 纲和科水平上, 丰度最高的是粪壳菌纲(>60%)和圆孔壳科(>20%); 属阶级上丰度>5% 的优势种群来自包括有拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、青霉属 *Penicillium*、炭疽菌属 *Colletotrichum*、葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*、镰孢属 *Fusarium* 等(图 5)。另一方面, 缺失高通量测序技术检测的优势酵母菌种群, 说明了可培

养方法的局限性, 需要增加酵母类选择性培养基予以改进^[26]。

3.2 板栗果实组织内生真菌群落组成特点

板栗果实果肉组织多样性高于果壳组织, 这与苹果果实的研究结果相反, 苹果果实的果皮(外果皮)组织中真菌多样性要高于果肉(中果皮)组织^[3]。果实不同组织部位具有不同的真菌群落^[3, 27], 如苹果果实不同部位(茎末端、花萼末端、果皮和果肉)中真菌类群组成显著不同^[3]。板栗果实根据形态差异分为果壳(果皮)、种皮和子叶、胚轴等部分, 本研究将果皮和种皮合并为果壳材料, 将子叶(含胚轴)称为果肉材料。这些组织部位不同的物理和化学性质可能对栖息在该微环境中的真菌物种产生影响^[24]。我们的研究发现板栗果肉比果壳具有更高的特有内生真菌多样性(图 3 右), 一是专性分布果肉组织的内生真菌 OTUs 数多出果壳组织 102 个(图 3 右), 二是专性分布的真菌在各分类水平中, 果肉中内生真菌组成单元数明显均

高于果壳(表 4), 三是特有优势类群在果肉和果壳中不同(表 4), 果肉为毛霉门、担子菌的红菇目、红菇科和马拉色菌科、*Mycoacia*; 而果壳属于子囊菌的冠囊菌目、夹孢腔菌科, 属却属于担子菌的 *Rhodosporidiobolus*。

LEfSe 分析表明(图 4), 在具有显著差异群落中, 镰孢属 *Fusarium*、梅奇酵母属 *Metschnikowia*、迈耶氏酵母属 *Meyerozyma* 和德巴利酵母属 *Debaryomyces* 真菌在果肉组织中占据显著性优势。板栗果肉组织中具有显著性优势的酵母真菌种群或其群落组成与结构, 可能在板栗果实健康中起着重要的作用。梅奇酵母属 *Metschnikowia*^[28-30], 德巴利酵母属 *D. hansenii*^[31] 和迈耶氏酵母属 *M. caribbica*^[29] 真菌, 报道为具有益生和生防作用的功能菌。粪壳菌纲和酵母纲的真菌在板栗果肉果壳组织中, 丰度高, 而这两类真菌中, 多为促生^[32-33] 和拮抗种群^[34-35]。板栗果实腐烂病发生在果肉(子叶)组织上, 是由多种病原真菌在果实生长发育期潜伏侵染、成熟期和采后内在或环境诱发因子作用下形成发病高峰期的复合侵染性病害, 病原种类高达几十种^[36-38]。这些病原菌的同种或相似种类, 在无症状板栗果实中, 经高通量测序技术的非培养技术和组织分离的可培养方法中, 都检测或分离到。

4 结 论

本研究利用非培养技术结合可培养方法, 对板栗果实及其组织的内生真菌群落多样性进行了研究报道。板栗果实具有丰富的内生真菌群落多样性, 优势群落来自子囊菌的粪壳菌纲和酵母菌纲, 但建群种类来自座囊菌纲。板栗果实品种间的内生真菌群落组成结构具有明显差异。果肉组织中种类丰度和群落多样性显著高于果壳。同时板栗果肉和果壳组织内生真菌群落组成具有明显分化, 果肉内生真菌群落的特有类群由担子菌的银耳纲等构成, 镰孢属 *Fusarium*、梅奇酵母属 *Metschnikowia*、迈耶氏酵母属 *Meyerozyma* 和德巴利酵母属 *Debaryomyces* 真菌在果肉组织中具有显著优势。上述研究结果为利用微生物组技术改造和构建板栗果实健康微生物组奠定了基础, 也为研究坚果类微生物组与宿主互作机制提供了认知, 拓展了种子微生物组的知识。同时, 各分类水平中存在的高丰度未鉴定 OTUs, 为挖掘新的内生真菌生物资源奠定了基础。

参 考 文 献:

- [1] Arif I., Batool M, Schenk P M. Plant microbiome engineering: expected benefits for improved crop growth and resilience[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(12): 1385-1396.
- [2] Zhang H., Serwah Boateng N A, Ngolong Ngea G L., et al. Unravelling the fruit microbiome: The key for developing effective biological control strategies for postharvest diseases[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(5): 4906-4930.
- [3] Abdelfattah A., Wisniewski M, Droby S, et al. Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase[J]. Horticulture Research, 2016, 3(1): 1-12.
- [4] Wassermann B., Müller H, Berg G. An apple a day: which bacteria do we eat with organic and conventional apples?[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1629.
- [5] Diskin S., Feygenberg O, Maurer D, et al. Microbiome alterations are correlated with occurrence of postharvest stem-end rot in mango fruit[J]. Phytobiomes, 2017, 1(3): 117-127.
- [6] Cruz A.F, Barka G D, Sylla J, et al. Biocontrol of strawberry fruit infected by *Botrytis cinerea*: Effects on the microbial communities on fruit assessed by next-generation sequencing[J]. Journal of Phytopathology, 2018, 166(6): 403-411.
- [7] Saminathan T., García M, Ghimire B, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analyses of diverse watermelon cultivars reveal the role of fruit associated microbiome in carbohydrate metabolism and ripening of mature fruits[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 4.
- [8] Lukša J, Servienė E. White mulberry (*Morus alba* L.) fruit-associated bacterial and fungal microbiota[J]. Journal of Environmental Engineering and Landscape Management, 2020, 28(4): 183-191.
- [9] Busby P E, Ridout M, Newcombe G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease[J]. Plant Molecular Biology, 2016, 90(6): 645-655.
- [10] 张宇和, 柳 蓁, 梁继坚. 中国果树志板栗榛子卷 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2005.
- [11] Nicoletti R, Beccaro G L, Sekara A, et al. Endophytic fungi and ecological fitness of chestnuts[J]. Plants, 2021, 10(3): 542.
- [12] 韩元顺, 许林云, 周 杰. 中国板栗产业与市场发展现状及趋势 [J]. 中国果树, 2021 (4): 83-88.
- [13] 赵相超. 核桃与板栗内生真菌分离、生防潜力菌株的筛选及其生物学特性 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- [14] 史明欣. 板栗内生真菌的分离及抑菌活性的初步研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [15] Müller D B, Vogel C, Bai Y, et al. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives[J]. Annual Review of Genetics, 2016, 50: 211-234.
- [16] Padmalatha K, Prasad M N V. Optimization of DNA isolation

- and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India[J]. African Journal of Biotechnology, 2006, 5(3): 230-234.
- [17] Lanzén A, Epelde L, Blanco F, *et al.* Multi-targeted metagenetic analysis of the influence of climate and environmental parameters on soil microbial communities along an elevational gradient[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 1-13.
- [18] Jasalavich C A, Ostrofsky A, Jellison J. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(11): 4725-4734.
- [19] White T J, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[J]. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, 18(1): 315-322.
- [20] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [21] Abarenkov K, Henrik Nilsson R, Larsson K H, *et al.* The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives[J]. New Phytologist, 2010, 186(2): 281-285.
- [22] Wang H, Guo S, Huang M, *et al.* Ascomycota has a faster evolutionary rate and higher species diversity than Basidiomycota[J]. Science China Life Sciences, 2010, 53(10): 1163-1169.
- [23] Rybakova D, Mancinelli R, Wikström M, *et al.* The structure of the *Brassica napus* seed microbiome is cultivar-dependent and affects the interactions of symbionts and pathogens[J]. Microbiome, 2017, 5(1): 1-16.
- [24] Preto G, Martins F, Pereira J A, *et al.* Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates to be used as biocontrol agents[J]. Biological Control, 2017, 110: 1-9.
- [25] Ren F, Dong W, Yan D H. Organs, cultivars, soil, and fruit properties affect structure of endophytic mycobiota of pinggu peach trees[J]. Microorganisms, 2019, 7(9): 322.
- [26] Zheng Y K, Qiao X G, Miao C P, *et al.* Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(2): 529-542.
- [27] Abdelfattah A, Whitehead S R, Macarasin D, *et al.* Effect of washing, waxing and low-temperature storage on the postharvest microbiome of apple[J]. Microorganisms, 2020, 8(6): 944.
- [28] Manso T, Nunes C. *Metschnikowia andauensis*: a novel biocontrol agent of fruit postharvest diseases[J]. Acta Horticulturae, 2011(905): 261-268.
- [29] Jan F G, Hamayun M, Hussain A, *et al.* A promising growth promoting *Meyerozyma caribbica* from *Solanum xanthocarpum* alleviated stress in maize plants [J]. Bioscience Reports, 2019, 39(10).
- [30] Tian Y Q, Li W, Jiang Z T, *et al.* The preservation effect of *Metschnikowia pulcherrima* yeast on anthracnose of postharvest mango fruits and the possible mechanism[J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(1): 95-105.
- [31] Czarnecka M, Żarowska B, Połomska X, *et al.* Role of biocontrol yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Wickerhamomyces anomalus* in plants' defence mechanisms against *Monilinia fructicola* in apple fruits[J]. Food Microbiology, 2019, 83: 1-8.
- [32] Amprayn K O, Rose M T, Kecskés M, *et al.* Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 61: 295-299.
- [33] Fernandez-San Millan A., Farran I, Larraya L, *et al.* Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: Benefits for seedling development[J]. Microbiological Research, 2020, 237: 126480.
- [34] Efremenkova O V, Vasiljeva B F, Zenkova V A, *et al.* Antimicrobial properties of eremoxylarin A produced by ascomycete of Sordariomycetes in submerged culture[J]. Antibiotikii Khimioterapii, 2015, 60(11-12): 23-28.
- [35] Jinfeng E C, Rafi M I M, Hoon K C, *et al.* Analysis of chemical constituents, antimicrobial and anticancer activities of dichloromethane extracts of Sordariomycetes sp. endophytic fungi isolated from *Strobilanthes crispus*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(1): 1-19.
- [36] 梅汝鸿, 陈宝琨, 陈璧, 等. 板栗干腐病研究: II. 症状及病原[J]. 中国微生态学杂志, 1991(1): 75-79.
- [37] 侯保林, 张志铭, 杨兴民, 等. 河北板栗种仁斑点类病害研究[J]. 河北农业大学学报, 1988(2): 11-22.
- [38] 贺伟, 沈瑞祥, 王晓军. 北京地区板栗实腐病原菌的致病性及侵染过程[J]. 北京林业大学学报, 2001(2): 36-39.

Community Composition and Differentiation of Endophytic Mycobiota in Chestnut Fruits

LV Xing¹, DOU Gui-ming¹, WANG Hui-hua², LI Ru-hua¹,
JIANG Ze-ping¹, LI Zhi-peng³, YAN Dong-hui¹

(1. Key Laboratory of Forest Protection of National Forestry and Grassland Administration, Ecology and Nature Conservation Institute, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Department of Food and Biological Engineering, Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 100085, China; 3. Beijing Huairou District Landscaping Bureau, Beijing 101400, China)

Abstract: [Objective] Exploring the composition and diversity of the fruit endophytic fungi community is the basis for understanding the functions and mechanisms of fruit healthy microbiome. [Method] The diversity and composition of endophytic fungal communities in healthy fruit and its kernel (cotyledon) and shell (including seedcoat) parts of six chestnut cultivars were analyzed using high-throughput sequencing technology and traditional tissue isolation methods. [Result] A total of 3,229,205 high-quality sequences were generated from 36 samples of fruits and 2 tissues of six cultivars, and 1,557 fungal OTUs were annotated, belonging to 10 phyla, 38 classes, 97 orders, 203 families, and 350 genera. In chestnut fruit, Ascomycota (average relative abundance 80.40%) had the highest abundance, followed by Basidiomycota (average relative abundance 7.70%), and the dominant class were Sordariomycetes (average relative abundance 43.00%) and Saccharomycetes (average relative abundance 15.10%). The shared fungal taxa among species was enriched in Dothideomycetes with abundance >90%. Among chestnut fruit varieties, Ascomycota was also the most abundant group in each variety, with a relative abundance of 57.96%~90.15%, followed by Basidiomycota(3.28%~23.71%); At the class level, the dominant groups changed. The relative abundance of Saccharomycetes fungi (39.21%) was the highest in Maobanhong varieties, while Sordariomycetes fungi were the most abundant group (29.47%~59.56%) among the other five chestnut cultivars. Among the fruit tissues, the kernel tissue had higher unique fungal diversities than the shell, and the unique dominant groups of kernel tissue were all Basidiomycetes, especially the Russulales of Tremellomycetes. LEfSe analysis showed that there were significant differences in community composition or populations in the shell and kernel tissue, with *Fusarium*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, and *Debaryomyces* fungi having significant dominance in kernel tissue. A total of 2346 effective strains were obtained by artificial culturable method, which belonged to Ascomycetes, Basidiomycetes and Mucoromycota. Except for yeasts that need special medium to be screened, the dominant fungal groups on fruits and tissues obtained by artificial culturing methods were similar to the results of high-throughput sequencing technology in terms of community composition and abundance. [Conclusion] Chestnut fruit has abundant endophytic fungal community composition and population diversity dominated by Sordariomycetes and Saccharomycetes, but the community-building species are mainly from Dothieomycetes. The endophytic fungal community composition is significantly different among chestnut fruit cultivars. Chestnut kernel has a richer diversity of exclusive endophytic fungi than shell part. There is a obvious differentiation on the composition of endophytic fungal community between chestnut kernel and shell tissue. This paper is the first systematic report on the compositional structure of endophytic fungi microbiota in chestnut fruit, which provides a basis for using chestnut healthy microbiome to prevent and control fruit diseases and to understand the nut fruit microbiome.

Keywords: chestnut fruits; endophytic fungal mycobiota; diversity; kernel; shell; culture-independent technique