

红树林植物桐花树内生真菌类群分布的研究

邓祖军^{1,2}, 曹理想², Vrijmoed Lilian L P³, 陆勇军², 周世宁²

(1. 广东药学院基础学院, 广东 广州 510006; 2. 中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275; 3. 香港城市大学应用生物与化学系, 香港)

摘要: 从红树林植物桐花树 *Aegiceras corniculatum* 的叶、叶脉、树皮、茎等 4 个部位, 湿季共分离到 297 株内生真菌, 干季共分离到 232 株内生真菌。叶片内生真菌优势类群为青霉属和盘长孢霉, 叶脉为青霉属和枝孢霉属, 树皮内生真菌中不产孢类所占比例最高, 而茎部的优势类群为枝孢霉属和短梗孢霉, 说明内生真菌的分布具有一定的器官和组织特异性。比较各部位内生真菌湿季类群和干季类群发现其优势类群也有一定的变化: 叶片内生真菌湿季优势类群是青霉属和盘长孢属, 而干季优势类群为不产孢类群 B 和 C; 叶脉、树皮、茎的内生真菌的优势菌群在湿季和干季也有差异。这说明不同季节的环境因素(降水量、气温、湿度、光照强度等)的变化对内生真菌的类群及其分布具有较强的影响。

关键词: 桐花树 *Aegiceras corniculatum*; 内生真菌; 类群分布

中图分类号: Q178.531 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)03-0077-05

Studies on distribution of fungal endophyte in mangrove plant *Aegiceras corniculatum*

DENG Zu-jun^{1,2}, CAO Li-xiang², VRIJMOED LILIAN L P³, LU Yong-jun², ZHOU Shi-ning²

(1. School of Basic Courses, Guang Dong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. State Key Laboratory of Bio-control, Sun Yat-sen University; Guangzhou 510275, China; 3. Department of Applied Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, HongKong, China)

Abstract: Five hundred and twenty-nine isolates of fungal endophytes were isolated from the lamina, mid-rib, bark and the xylem of stem of *Aegiceras corniculatum*, among them 297 isolates in wet and 232 in dry season. The taxa of preponderant fungal endophyte communities differed in the four organs of *Aegiceras corniculatum*: in lamina are *Penicillium* and *Aureobasidium*, in mid-rib are *Penicillium* and *Cladosporium*, in bark are the sterile groups, and in xylem of stem are *Aureobasidium* and *Cladosporium*. These results indicated that there was some degree of organ specific in distribution of fungal endophytes. The preponderant taxa of endophyte assemblages in organs were different between wet and dry seasons. For example, in lamina, wet season were *Penicillium* and *Aureobasidium*, but dry season were sterile groups B and C. It showed that the density and the taxa of the endophyte communities in *Aegiceras corniculatum* were influenced by the environmental factors such as precipitation, temperature, humidity, and intensity of sunlight.

Key words: *Aegiceras corniculatum*; fungal endophytes; distribution of communities

内生真菌(Endophytic fungi)一般是指生活于健康植物组织内部、不引发植物产生明显病症的一类真菌, 但它在植物衰老或外界刺激条件下, 植物自身免疫力下降, 也可能引起某些病症^[1]。目前内生真菌的研究较集中于内生真菌与禾本科植物的关系和植物内生菌根与宿主植物的关系上。同时对温带的

草本和木本植物的内生真菌的分类和分布方面进行大量的研究^[2]。但是却很少有关于热带和亚热带植物内生真菌的生态和生理方面以及它们与宿主的相互关系的研究^[3-4]。虽然对一些热带植物如 *Stylosanthes*、*Manilkara bideentata*、*Musa*、*Rhizophora* sp.、*spondias mombin* 和 palms 以及一些红树林等的内生真菌类群

收稿日期: 2007-11-29; 修订日期: 2008-06-25。刘学东编辑

基金项目: 国家高科技研究与发展“863”项目(2007AA09Z448, 2008AA09Z402)

作者简介: 邓祖军(1979年—), 男, 湖南省安仁县人, 硕士, 讲师; 研究方向: 植物内生真菌和海洋微生物。E-mail: dengzujun66@163.com

通讯作者: 周世宁, 教授, 博士生导师; E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

的进行了研究^[5-8],但主要是对内生真菌的分离鉴定以及类群结构的静态的、单一的统计分析(并且采样量较少)的研究,而其中关于它们的生态方面信息十分有限。本研究以热带与亚热带之间的潮间带的重要的生态系统红树林为对象,对深圳福田红树林自然保护区一优势红树林植物桐花树 *Aegiceras corniculatum* 的叶、茎、树皮内生真菌种群进行湿季和干季的动态跟踪和调查,进行大量的采样分离,对其各部位的内生真菌的密度、类群分布及其季节变化进行了一个较为全面的研究。

1 材料与方法

1.1 植物来源

在深圳福田红树林自然保护区(22°32'N, 114°03'E)一块 0.5km²的面积内选取 5 棵成熟的桐花树(大约高度为 1.5—2m,它们基本上处于相同的环境条件下,如潮水冲刷频率、土壤性质、周围植被)作为采样的对象。在 2004 年 7 月和 2005 年 1 月对桐花树进行湿季和干季两次采样分离内生真菌。

1.2 培养基

1.2.1 PDA 固体培养基

马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 15g,50%人工海水 1000 ml。

1.2.2 促孢培养基

KH₂PO₄ 1g, KNO₃ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, KCl 0.5g, 淀粉 0.2g, 葡萄糖 0.2g, 蔗糖 0.2g, 琼脂 15g, 水 1000 ml。

1.3 植物内生真菌的分离

叶、叶脉、茎、树皮(韧皮部)等样品用自来水冲洗掉泥土,然后进行严格的表面消毒程序:依次浸泡在 75%酒精 1min, 3%—5%有效氯的次氯酸钠溶液 3min, 75%的酒精 0.5min, 然后再用无菌水冲洗 3 遍。晾干后,在超静台将其剪成约 0.5cm × 0.5cm 左右小片。将处理好后剪成的小片铺于 PDA 平板上,加入氯霉素与链霉素各 50μg·ml⁻¹抑制细菌的生长,在 26℃培养培养 2—3w 分离内生真菌。这些平板在第 1 周要每天检查 1 次,然后可以 3 到 4d 检查一次。一旦发现有菌丝从组织小块长出,应马上将其转接到另一新的平板上,经几次纯化保存于 PDA 斜面。

1.4 表面消毒效果检查

参考文献[10]方法观察表面消毒效果。

1.5 内生真菌的鉴定

使用 PDA 培养基,采用载玻片法培养内生真菌,根据《真菌鉴定手册》^[11]中描述的真菌形态特

征进行鉴定。不产孢子的菌株,需使用促孢培养基或紫外线照射来诱导孢子的产生,如还不产孢子,根据其菌落及生长特点来分组,分离株数较多的组将其命名,如: Group A、B、C、D、E 等,数量少者统归为其他不产孢类。

1.6 数据统计

1.6.1 内生真菌分离频率

a: 某部位的内生真菌的分离率,即是该部位的内生真菌密度(rD%)。

某部位的 rD% = 该部位样品中分离到真菌的样品小片数/总样品数 × 100%

b: 某真菌种类的分离频率 = 分离到该真菌的样品小片数/样品总数 × 100%

1.6.2 两个百分数样本差异显著度 t 检验

参考文献[12]进行计算。

2 结果分析与讨论

2.1 表面消毒效果的检查

表面消毒后样品冲洗液涂布 PDA 平板, 26 培养 14d 后无菌落长出。同时取 20 株已分离的代表性真菌菌苔(树皮、茎、叶、叶脉分离物各 5 株), 分别经表面消毒过程处理后接种到 PDA 平板上, 26 培养 14d 后, 20 个真菌分离物均没有观察到生长。这表明经过表面消毒过程, 样品表面附生菌的影响已经消除, 分离到的菌株来自于样品内部。

2.2 桐花树内生真菌的分离率

从桐花树总共分离到 529 株内生真菌, 其中湿季 297 株, 干季 232 株(表 1)。从表 2 结果可发现, 桐花树内生真菌在各个部位的分离率都有明显的差异: 树皮 (56.3%) > 茎 (40.5%) > 叶脉 (28.8%) > 叶片 (21.5%)。叶脉部位的内生真菌分离率比叶片高可能是由于叶片的 V 型结构从而使叶脉在降雨后有更多的机会与雨水中的内生真菌孢子接触, 从而增加感染率所造成的, 这一结果在其他植物内生真菌的研究也得到证实^[13-14]。从表 3 可发现, 桐花树各部位的内生真菌分离率在湿季和干季也有所变化: 叶片和叶脉的内生真菌分离率在湿季明显比干季高($P < 0.01$), 许多研究都发现植物叶内生真菌湿季的分离率要比干季高, 主要原因可能是湿季的降水比干季多, 被雨水中内生真菌的孢子感染机会增高所引起的^[6,15-16]。而桐花树的茎和树皮的内生真菌在湿季和干季的分离率差异不大($P > 0.05$), 这可能因为茎和树皮与叶片和叶脉相比其内环境受外界气候条件的变化影响相对较小而保持相对稳定有关。

表 1 桐花树不同部位在湿季和干季的内生真菌分离频率

Tab. 1 Isolating frequency of endophytic fungi from four parts of *Aegiceras corniculatum* in wet and dry seasons

	叶片		叶脉		树皮		茎		总体	
	湿季	干季	湿季	干季	湿季	干季	湿季	干季	湿季	干季
样品总数(片)	400	400	200	200	150	150	100	100	850	850
分离菌数(株)	107	65	65	42	86	83	39	42	297	232
分离比(%)	26.8	16.3	32.5	25.0	57.3	55.3	39.0	42.0	34.9	27.3
总分离比	21.5		28.8		56.3		40.5		31.1	

表 2 各部位之间内生真菌分离率的显著度差异分析

Tab. 2 Difference of the isolating rate of the endophytic fungi between different organs

	叶与叶脉	叶与树皮	叶与茎	叶脉与树皮	叶脉与茎	树皮与茎	<i>t</i> 查表值
<i>T</i> 值	2.03	11.13	5.53	7.93	3.42	3.47	$t_{0.01}=2.58$
<i>t</i> 值比较	大于 $t_{0.05}$	大于 $t_{0.01}$	大于 $t_{0.01}$	大于 $t_{0.01}$	大于 $t_{0.01}$	大于 $t_{0.01}$	$t_{0.05}=1.96$
差异性	显著	极显著	极显著	极显著	极显著	极显著	—

表 3 各部位湿季和干季内生真菌分离率的显著度差异分析

Tab. 3 Difference of the isolating rate of the endophytic fungi between wet and dry seasons

	叶	叶脉	茎	树皮	总体	<i>t</i> 查表值
<i>t</i> 值	3.41	2.60	0.43	0.35	3.61	$t_{0.01}=2.58$
<i>t</i> 值比较	大于 $t_{0.01}$	大于 $t_{0.01}$	小于 $t_{0.01}$	小于 $t_{0.01}$	大于 $t_{0.01}$	$t_{0.05}=1.96$
差异性	极显著	极显著	不显著	不显著	极显著	—

2.3 桐花树内生真菌不同部位的分布

桐花树 2 次采样总共分离到 529 株内生真菌, 其中叶分离到 172 株, 叶脉 107 株, 树皮 169 株, 茎 81 株(不产孢类群的菌落形态见图 1, 产孢类群的孢子形态见图 2)。从表 4 的总计栏可以发现: 叶片内生真菌的主要类群为青霉属和盘长孢霉; 叶脉以青

霉属和枝孢霉属为优势类群; 树皮中不产孢类所占比例最高。茎部内生真菌主要为枝孢霉属、短梗孢霉及其不产孢类。这说明桐花树内生真菌类群的分布无 论是在湿季还是干季都具有一定的器官和组织特异性, 这在许多植物的内生真菌的研究中得到证实^[17-19]。这可能是由于不同部位的微环境如通

表 4 桐花树各部位内生真菌湿季类群和干季类群比较

Tab. 4 Comparison of taxa of endophytic fungi from *Aegiceras corniculatum* between wet and dry seasons

	湿季				干季				总计			
	叶片	叶脉	树皮	茎	叶片	叶脉	树皮	茎	叶片	叶脉	树皮	茎
青霉属	32.71%	41.54%	20.93%	33.33%	0	0	0	0	20.35%	25.23%	10.65%	16.05%
曲霉属	2.80%	0	22.09%	7.70%	0	0	0	0	1.74%	0	11.24%	3.71%
头孢霉属	11.20%	0	4.65%	2.56%	0	0	0	0	6.97%	0	2.37%	1.23%
镰孢属	0.93%	1.54%	1.16%	10.26%	0	0	0	0	0.58%	0.94%	0.59%	4.94%
木霉属	0.93%	6.15%	0	5.13%	0	0	0	0	0.58%	3.74%	0	2.47%
枝孢霉属	2.80%	18.46%	0	5.13%	20.00%	26.00%	3.61%	35.71%	9.30%	21.42%	1.78%	20.99%
盘长孢霉	34.60%	16.92%	3.49%	0	15.38%	6.00%	14.46%	0	27.34%	12.63%	8.88%	0
短梗孢霉	0	0	0	0	0	40.00%	13.25%	35.72%	0	15.70%	6.51%	18.52%
不产孢类 A	3.73%	0	17.44%	0	0	0	0	0	2.32%	0	8.87%	0
不产孢类 B	0	0	0	0	29.23%	0	0	0	11.05%	0	0	0
不产孢类群 C	0	0	0	0	30.77%	20.00%	3.61%	19.05%	11.63%	7.85%	1.77%	9.88%
不产孢类群 D	0	0	0	0	0	0	27.71%	0	0	0	13.61%	0
不产孢类群 E	0	0	0	0	0	0	18.07%	0	0	0	8.87%	0
其他不产孢类	10.28%	15.38%	30.23%	35.90%	4.62%	8%	19.28%	7.14%	8.14%	12.48%	24.85%	20.99%

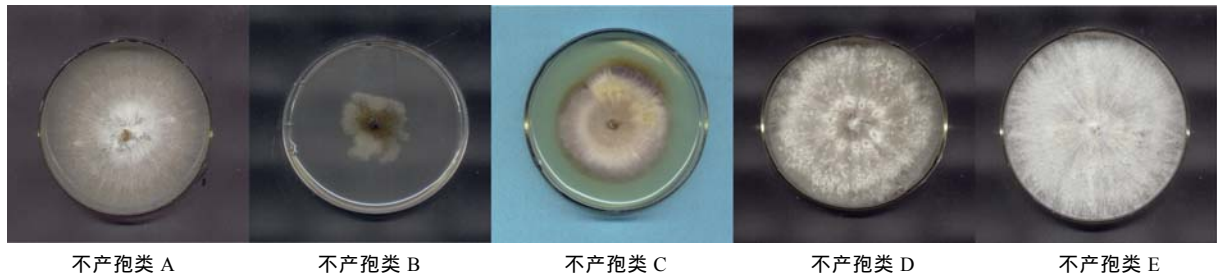


图 1 五类不产孢子类群的内生真菌的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of five groups of sterile endophytic fungi from *Aegiceras corniculatum*

气状况、酶和其他化学成分的不同而适合不同的内生真菌类群侵入、生长^[19],也可能这是内生真菌防止在小生境重叠,因竞争而形成的一种选择性机制。

2.4 桐花树内生真菌类群的季节变化

从表 4 可以看出,桐花树各部位内生真菌类群在湿季和干季有一定的变化:叶片内生真菌湿季类群包括其他不产孢子类群在内一共分离到 9 大类群,优势类群是青霉属和盘长孢属(共占 67.3%),其他还分离到头孢霉属、其他不产孢类群和少量的枝孢霉属、镰孢属和木霉属;而干季类群只有 5 大类群,优势类群是不产孢类群 B 和 C(共占 60%);叶脉湿季内生真菌以青霉属(共占 41.54%)为优势类群,还分离到盘长孢属、枝孢霉属、其他不产孢类及少数的镰刀菌和绿木霉;干季除了优势类群短梗霉属和枝

孢霉属(共占 64%)外,还分离到不产孢类群 C、盘长孢属。茎和树皮的内生真菌类群在干季和湿季也有差异:树皮湿季内生真菌类群中产孢类占 53.3%,不产孢类占 47.7%,而干季主要为不产孢类,占 68.7%;茎内生真菌湿季的优势类群为青霉属和不产孢类,而干季的优势类群为枝孢霉属和短梗霉属。以上结果说明桐花树内生真菌分布具有季节变化性,各部位湿季类群和干季类群的内生真菌密度、种类分布和优势类群都有所变化,这可能是不同季节的环境因素(降水、温度、湿度、日光等,特别是降水)的变化,直接影响了内生真菌的侵染,同时改变了植物组织的内环境,进而影响了内生真菌的定居和分布。也有研究发现一些热带植物叶片内生真菌在湿季和干季,其优势类群并没有明显的变化^[16],这可能与宿主植物不同有关,有待于进一步研究。

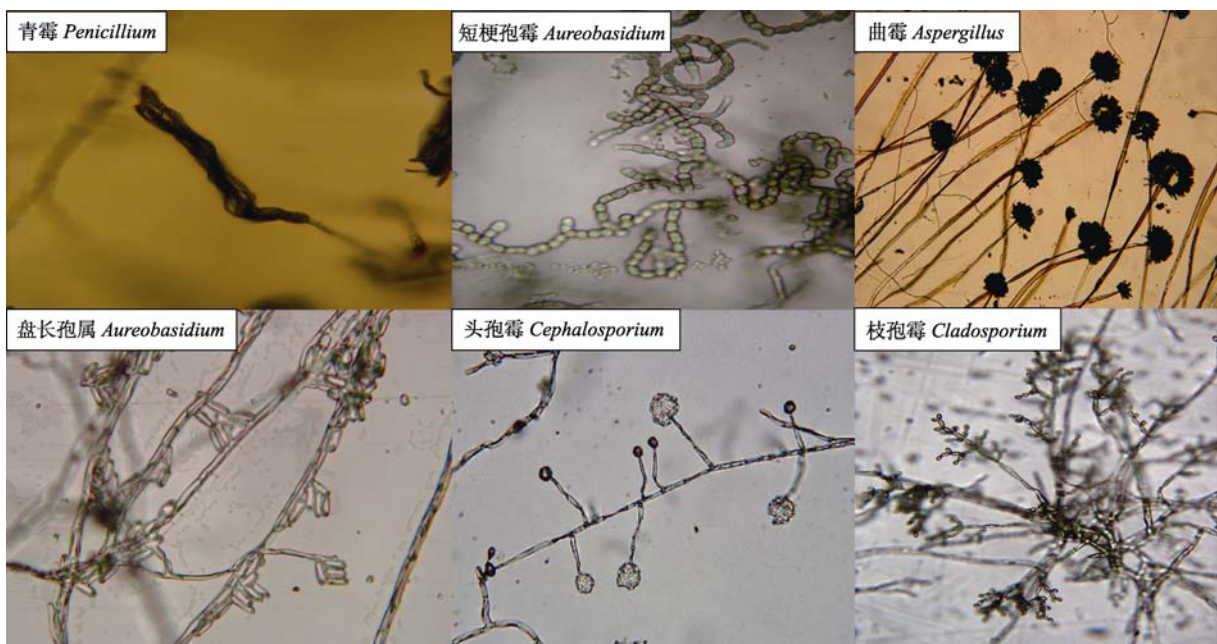


图 2 桐花树几种常见的产孢类内生真菌孢子形态(放大倍数: 100 × 10)

Fig. 2 Morphology of the spores of the endophytic fungi from *Aegiceras corniculatum*

参考文献

- [1] 郑忠辉, 缪莉, 黄耀坚等. 红树林内生真菌的抗肿瘤活性[J]. 厦门大学学报, 自然科学版, 2003, 42(4): 513-516.
- [2] RAJAGOPAL K, PETRINI O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions[M]// HYDE, K D. Biodiversity of Tropical microfungi. Hong Kong: Hong Kong University Press, 1997: 57-69.
- [3] FROHLICH J, HYDE K D, PETRINI O. Isolation of endophytic fungi associated with palms[J]. Mycological Research, 2000, 104: 1202-1212.
- [4] SURYANARAYANAN T S, KUMARESAN V, JOHNSON J A. Fungal endophytes: the tropical dimension[M]// MISRA J K, HORN B W. Mycology: Trichomycetes, other fungal groups and mushrooms. Enfield, NH: Science Publishers, 2001: 27-37.
- [5] RODRIGUES K F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*[J]. Mycologia, 1994, 86: 376-385.
- [6] SURYANARAYANAN T S, KUMARESAN V, JOHNSON J A. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44: 1003-1006.
- [7] PEREIRA J O, AZEVEDO L, PETRINI O. Endophytic fungi of *stylosanthes*: a preliminary study[J]. Mycologia, 1993, 85: 362-364.
- [8] LOGDE D J, FISHER P J, SUTTON B C. Endophytic fungi of *Manikara bidentata* leaves in Puerto Rico[J]. Mycologia, 1996, 88: 733-738.
- [9] 蓝宗辉, 詹嘉红, 杜联穆. 红树林及其在海洋生态中的作用[J]. 韩山师范学院学报, 2002, 23(2): 63-67.
- [10] CAO L X, YOU J L, ZHOU S N. Endophytic fungi from *Musa acuminate* leaves and roots in South China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18: 169-171.
- [11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 9版. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 5-201.
- [12] 李松岗. 实用生物统计[M]. 1版. 北京: 北京大学出版社, 2002.
- [13] KUMARESAN V, SURYANARAYANAN T S, JOHNSON J A. Ecology of mangrove endophytes[M]// HYDE, K D. Fungi of Marine Environment. Hong Kong: Hong Kong University Press, 2002: 145-166.
- [14] RODRIGUES K F, SURYANARAYANAN T S. Isolation of endophytic fungi from leaves of neem(*Azadirachta indica* A. Juss) [J]. Current Science, 2000, 78: 1375-1378.
- [15] WILSON D. Ecology of woody plant endophytes[M]// BACON, C W, WHITE, J F. JR. Microbial endophytes. New York: Marcel Dekker Inc. 2000: 389-420.
- [16] SURYANARAYANAN T S, MURALI T S, VENKATESAN G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient[J]. Can J Bot, 2002, 80: 818-826.
- [17] CARROLL E, MULLER E, SUTTON B C. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes on some European conifers[J]. Sydowia, 1977, 29: 87-103.
- [18] PETRINI O. Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi[M]// REDLIN S C, CARIS L M. Endophytic Fungi in Grass and Woody Plants: systematics, Ecology and Evolution. St Paul. Minnesota: APS Press, 1996: 87-100.
- [19] 彭小伟, 杨丽源, 周斌, 等. 植物黄花夹竹桃内生真菌多样性研究[J]. 2003, 25(增刊): 28-31.