

研究报告

广西北部湾红树植物内生真菌多样性

张艳^{1Δ} 蓝桃菊^{1Δ} 廖仕同² 陈艳露¹ 覃丽萍¹ 张雯龙¹ 农倩¹ 谢玲^{1*}

(1. 广西农业科学院微生物研究所 广西 南宁 530007)

(2. 南阳师范学院 河南 南阳 473061)

摘要:【目的】研究广西北部湾地区红树植物内生真菌多样性,建立北部湾红树植物内生真菌种质资源库,为利用内生真菌生物技术促进农业可持续发展提供理论依据。【方法】从广西北部湾地区采集红树植物组织样本,采用表面消毒法分离真菌,通过测定分离菌株对宿主植物是否具有致病性来筛选内生真菌,结合形态学特征和分子生物学分析对内生真菌进行分类与鉴定。【结果】从60个红树植物样本中分离得到1764个菌株,经过致病性测定筛选获得41株内生真菌,分离率为2.3%。其中从宿主植物红海榄分离得到15株内生真菌,占总菌株数的36.6%,比例最高。通过分析,发现这些内生真菌在ITS-NJ、NS-NJ两个系统发育树上各聚为7个大分支,分属8个科(目)。其中球腔菌属 *Mycosphaerella*、德福里斯孢属 *Devriesia*、假尾孢属 *Pseudocercospora*、枝孢霉属 *Cladosporium*、Pleosporales 等属(科)真菌是广西红树林的优势菌。【结论】广西北部湾地区红树植物内生真菌菌种资源丰富。

关键词: 红树植物, 内生真菌, 系统发育树

Diversity of endophytic fungi in mangrove plants of Beibu Gulf, Guangxi

ZHANG Yan^{1Δ} LAN Tao-Ju^{1Δ} LIAO Shi-Tong² CHEN Yan-Lu¹ QIN Li-Ping¹
ZHANG Wen-Long¹ NONG Qian¹ XIE Ling^{1*}

(1. Microbiology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China)

(2. Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract: [Objective] To discover the diversity of endophytic fungi and establish its germplasm bank

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31400016); Natural Science Foundation of Guangxi Province (No. 2014GXNSFBA118101, 2015GXNSFBA139083); Basic Scientific Research Business Special Project in Guangxi Academy of Agricultural Sciences (No. 2015YT80); Technology Development Fund Projects in Guangxi Academy of Agricultural Sciences (No. 2015JZ14, 2015YM04, 2016YM34)

*Corresponding author: Tel: 86-771-3276541; E-mail: xieling20011@126.com

ΔThese authors equally contributed to this work

Received: October 20, 2016; **Accepted:** February 09, 2017; **Published online** (www.cnki.net): February 14, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31400016); 广西自然科学基金项目(No. 2014GXNSFBA118101, 2015GXNSFBA139083); 广西农业科学院基本科研业务专项项目(No. 2015YT80); 广西农业科学院科技发展基金项目(No. 2015JZ14, 2015YM04, 2016YM34)

*通讯作者: Tel: 86-771-3276541; E-mail: xieling20011@126.com

Δ对本文贡献相同

收稿日期: 2016-10-20; 接受日期: 2017-02-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-14

in mangrove plants of the Beibu Gulf of Guangxi, and provide the theoretical basis for using the endophytic fungi biotechnology to promote agricultural sustainable development. **[Methods]** Mangrove tissue samples were collected from Beibu Gulf, the fungi were isolated by surface disinfection method and screened by determining whether the isolates were pathogenic to the host plants, and the endophytic fungi were classified and identified according to the morphological characteristics and molecular biological analyses. **[Results]** The results showed that 1 764 isolates were obtained from 60 mangrove plant tissue samples, and 41 endophytic fungi were screened by pathogenicity test. The isolation rate of endophytic fungi was 2.3%. Among them, 15 endophytic fungi were isolated from the host plant *Rhizophora stylosa*, accounting for 36.6% of the total strains with the highest proportion. The results showed that these endophytic fungi were clustered into seven branches both in ITS-NJ and NS-NJ phylogenetic trees, belonging to 8 families/orders. *Mycosphaerella*, *Devriesia*, *Pseudosercospora*, *Cladosporium* and Pleosporales are the dominant fungi of mangrove in Guangxi. **[Conclusion]** There is a wide variety of fungal species in mangrove plants of Beibu Gulf, Guangxi.

Keywords: Mangrove plants, Endophytic fungi, Phylogenetic trees

红树林地处热带、亚热带潮间带上部,是以红树植物为主体的常绿灌木或乔木组成的浅滩湿地木本生物群落,是陆地向海洋过渡的独特生态系统,具有维护生物多样性、防风消浪、促淤护岸、美化海岸景观的作用^[1-2]。红树林生境特殊,具有强还原性、强酸性等特征,滩涂含大量被海水浸泡的红树根、茎、枝条等植物体和沙质、泥质沉积物^[3],滋生了丰富且数量庞大的红树植物微生物资源,这些微生物在物质循环、生态平衡及环境净化等方面担当着重要角色^[1-2]。

狭义上的内生真菌,是指生活在植物组织内并不引起植物明显病害的一类真菌,在长期的进化过程中内生真菌与植物寄主形成共生互惠关系^[3-4],内生真菌的代谢物能刺激植物生长发育,提高宿主抗逆性和抗病抗虫能力,因此引起了人们的广泛关注^[4-5]。

广西北部湾拥有我国最丰富的红树林资源,并建立了国家级红树林自然保护区,在钦州湾已发现80%的红树植物有内生真菌的定殖^[6-7],因此发掘其中的内生真菌资源对红树林生态的保护及海洋真菌资源的开发利用具有重要意义。已有研究表明,从红树植物中可分离得到丰富多样的真菌物种,从中还分离了具有药用价值的新化合物^[2],部分真菌能产生具有抗菌、抗肿瘤活性的次生代谢物^[1],有的还具有修复污染、高效固氮、耐盐、嗜盐等生态

功能^[8-9]。本研究采用纯培养法分离筛选广西北部湾优势红树植物的内生真菌,了解其物种多样性,为利用内生真菌生物技术促进农业可持续发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 宿主植物:采用特级大明星 F1 杂交一代西红柿(广东省湛江市大地蔬菜种子有限公司)作为真菌致病性检测用宿主植物。

1.1.2 红树林样品采集:在广西北部湾防城港市、北海市、钦州康熙岭、茅尾海红树林保护区、东兴金滩、党江廉州湾、山口红树林、北仑河口红树林保护区等8地选择具有一定规模的红树林优势树种(桐花树 *Aegiceras corniculatum*、白骨壤 *Avicennia marina*、秋茄 *Kandelia obovata*、红海榄 *Rhizophora stylosa*、无瓣海桑 *Sonneratia apetala* 和海漆 *Excoecaria agallocha* 等)进行采样,参照谢玲等^[9]方法,采用五点采样法,每个点之间距离约2 m,采集根、茎、叶部组织,及时处理或放入4 °C暂时保存。

1.1.3 主要试剂和仪器:引物 ITS1/LR5 和 NS1/NS4 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成;PCR 试剂盒(2×EasyTaq PCR SuperMix)购自北京全式金生物技术有限公司。东胜-ETC811 基因扩增仪,北

京东胜创新生物科技有限公司; DYY-8C 型电泳仪、WD-9413C 凝胶成像分析仪, 北京六一生物科技有限公司; MJX-250B 霉菌培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.1.4 培养基: 种子催芽使用纯琼脂培养基。菌株分离培养基使用 1/2 玉米粉培养基(1/2CM), 纯化培养基使用麦芽汁培养基(CMMY, g/L: 麦芽提取物 10.0, 酵母浸膏 2.0, 玉米粉琼脂 8.5, 琼脂 7.5)或马铃薯培养基(PDA, g/L: 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0), 栽培宿主植物使用燕麦培养基(OMA, g/L: 燕麦粉 10.0, 琼脂 14.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, KH_2PO_4 1.5, $NaNO_3$ 1.0)。

1.2 内生真菌的分离与筛选

1.2.1 真菌的分离纯化: 对采集到的样本组织进行清洗和表面消毒。植物组织的表面消毒: 75%乙醇振荡消毒 10–30 s, 再用 1%次氯酸钠振荡消毒 1–5 min (其中根 3 min, 茎 5 min, 叶 1 min), 用无菌水漂洗 3 次以上后放置于无菌滤纸上吸去多余水分, 置于超净工作台上过夜, 晾干。将表面消毒后的植物组织块置于 1/2 玉米粉培养基平板上, 每皿 3 块组织块, 每个样本 5 皿, 于 25 °C 培养, 逐日观察是否有菌丝长出, 待菌丝从组织块部位长出后及时转接到 CMMY 培养基上^[10], 获得纯化的真菌培养物。

1.2.2 内生真菌的筛选: 为了排除致病性菌和腐生菌, 根据菌落形态和产孢结构将分离菌株进行分组, 每组随机取一株代表菌株用于致病性测定。将菌株接种于燕麦培养基, 每皿 3 个菌块, 培养 7–14 d 后备用。西红柿种子经表面消毒, 在纯琼脂培养基上催芽, 待种子发成幼苗后移栽至培养好的菌落上。在每个菌落上分别移栽 1 株无菌苗, 每皿 3 株苗, 将培养皿放入组培瓶中, 于温度为 26 °C、光照强度为 $180 \mu mol/(m^2 \cdot s^2)$ 、光照时间为 16 h/d 的培养箱中共培养。以未接种菌株为直接移栽幼苗的处理为对照, 每个处理 4 次重复。14 d 后记录西红柿幼苗的发病情况(0 级: 无发病症状; 1 级: 植物黄化, 长势稍差; 2 级: 植物明显矮小黄化; 3 级: 植物枯萎或死亡)^[9–12], 并将西红柿根部洗净后放入

50 °C 烘箱中烘干(约 3 d)至恒重后称量干重。对不表现病症、生物量与对照差异不显著的处理进行再分离, 确定再分离菌株是否为原接种菌株。

1.2.3 内生真菌根部定殖观察: 选取 1.2.2 中无病症的西红柿幼苗进行根部切片和棉兰染色, 在显微镜下观察根组织中的菌丝分布、颜色和形态。初步明确内生真菌的定殖情况。染色剂: 根部组织染色液(0.005%棉蓝·醋酸溶液): 1%棉蓝 1 mL, 50%醋酸水溶液 199 mL。真菌封入液(乳酚): 苯酚(固体) 20 g, 乳酸(L-Lactic acid) 16 mL, 甘油 31 mL, 无菌水 20 mL。

1.3 红树林内生真菌的分类鉴定

1.3.1 菌株形态学观察: 将供试真菌菌株接种于 CMMY 培养基上, 培养 3 周后观察菌落形态特征。用无菌盖玻片斜插入燕麦培养基上, 于培养基一侧接种供试真菌菌株, 25 °C 培养 2–4 周, 待明显看到菌丝着生在盖玻片上时, 将玻片取出, 于光学显微镜下进行观察菌丝和孢子生长情况。

1.3.2 菌株的分子生物学鉴定: 挑取 CMMY 平皿上的菌丝直接用于 PCR 反应, rRNA 基因的 ITS1-5.8S-ITS4-28S 部分区域 PCR 扩增采用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3'); rRNA 基因的 18S rRNA 区段 PCR 扩增采用引物 NS1 (5'-GTAGT CATATGCTTGCTC-3') 和 NS4 (5'-CTTCCGTCAA TTCCTTTAAG-3')^[13]。PCR 反应体系: 2×EasyTaq PCR SuperMix 25 μ L, 20 μ mol/L 正反引物各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L (挑取少量菌丝), 用 ddH₂O 定容至 50 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 94 °C 40 s, 50 °C 1 min, 68 °C 4 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物纯化后直接测序, 测序工作由华大基因科技服务有限公司完成。

实验获得的序列在 GenBank 中进行同源比对, 下载最相似序列, 使用 ClustalX 1.81 和 MEGA 6.0 软件基于 Kimura 双参数模型构建 Neighbor-Joining 系统发育树, 经 Bootstrap 1 000 次循环检验系统树的可靠性^[10,14–17]。

2 结果与分析

2.1 菌株分离及内生真菌筛选结果

采集桐花树、白骨壤、红海榄等优势树种的植物组织共 60 个样本,对植物组织样本进行分离纯化得到 1 764 个菌株(表 1),其中北仑河口红树林自然保护区所采样品分离得到菌株 575 株,数量最多。根据菌株的形态特征将它们分为 74 组,每组挑选一个代表菌株在无菌条件下接种西红柿无菌苗共培养 30 d 后,发现有 41 个菌株对宿主生长无负面影响或有促进作用(图 1),显微镜观察到菌丝在西红

柿苗根部的定殖(图 2),通过再分离确定分离菌株为接种菌株,内生真菌的分离率为 2.3%。一般的病原菌生长迅速,抢占生长空间,在分离过程中抑制生长缓慢的内生真菌。通过对接种内生真菌的生长情况良好的宿主根部进行显微结构观察,观察到菌丝与微菌核等定殖结构。其中,从北仑河口红树林保护区分离得到内生真菌 20 株(编号为 HS44-HS57),占内生真菌总株数的 48.8%,数量最多;从宿主植物红海榄分离得到 15 株内生真菌(编号为 HS44-HS49),占总菌株数的 36.6%,比例最高。

表 1 广西北部湾红树林植物组织及根围菌株分离数量及分离率

Table 1 Number of isolates and isolates rate from mangrove plant tissue and rhizosphere in Beibu Gulf of Guangxi

采样地 Sample site	菌株总数 Number of isolates	内生真菌数量 Number of endophytic fungus	分离率 Isolation rate (%)
防城港 Fangchenggang	400	10	2.5
北海市 Beihai	86	2	2.3
钦州康熙岭 Qinzhou Kangxiling	56	4	7.1
茅尾海红树林自然保护区 MaoweiSea Mangrove Reserve	211	3	1.4
东兴金滩 Dongxing Jintan	112	0	0
廉州湾 Lianzhou Bay	55	0	0
山口红树林自然保护区 Shankou Mangrove Reserve	269	2	0.7
合计 Total	1 764	41	2.3

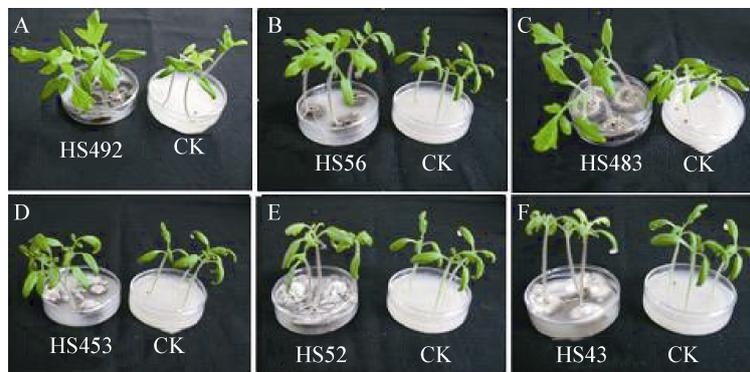


图 1 红树植物内生真菌菌株与西红柿幼苗的共培养结果

Figure 1 Co-culture results of mangrove endophytic fungi strains and tomato seedlings

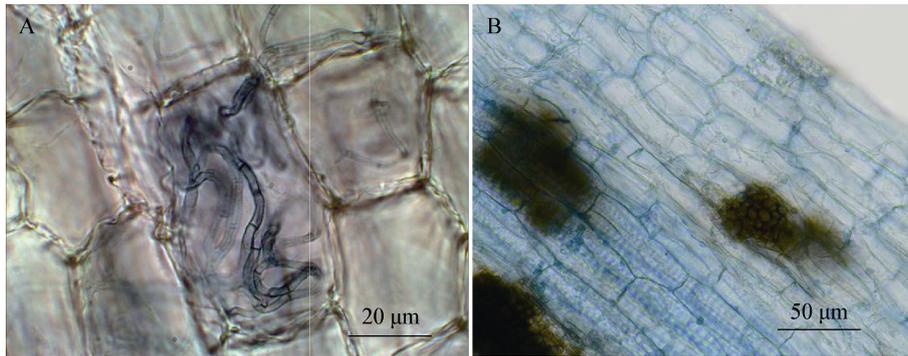


图2 红树植物内生真菌在西红柿根部定殖形成的深色有隔菌丝(A)和典型微菌核结构(B)

Figure 2 Melvanized hyphae (A) and microscerotia (B) structures formed in the root epidermal cells of tomato

Note: A: Strain HS443; B: Strain FCS5.

2.2 菌株的形态学特征

将分离获得的41个内生真菌菌株在CMMY培养基上培养后发现,大部分菌株生长速度较慢,少数菌株生长速度较快,两周后菌落可达50 mm,个别菌株生长速度很慢,培养两周后菌落2 mm–3 mm。大多数菌株菌落为圆形、近圆形,边缘平整,气生菌丝不浓密,少数菌株菌落质地较硬,中心隆起或者有辐射状裂纹;菌落颜色多为深色,灰绿色、灰黑色至黑色,

少数暗红色、浅棕色等(图3)。表2显示了各菌株的菌落形态特征。通过4℃低温诱导发现有7个菌株产孢。

2.3 菌株序列鉴定及系统发育树分析

以供试菌株的菌丝为模板进行PCR扩增后进行电泳检测,结果显示各供试菌株PCR扩增产物情况良好,条带清晰明亮,将PCR产物直接送至华大基因测序,测序得到的序列在GenBank数据库进行比对,结果见表3。

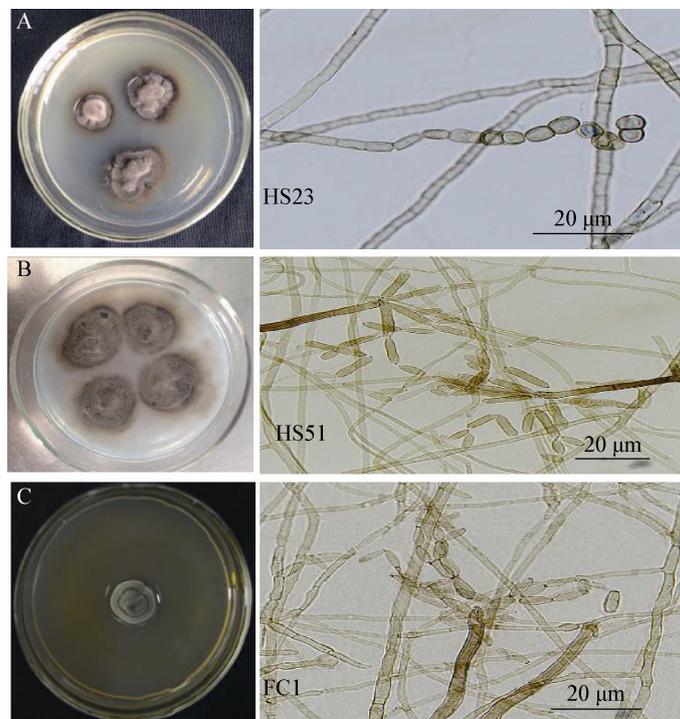


图3 红树植物内生真菌菌株的形态特征与产孢结构

Figure 3 The shape of the part of the mangrove endophytic fungi

表2 41个广西红树植物内生真菌的菌落特征
Table 2 Colony characters of 41 endophytic fungi isolates

菌株编号 Code	直径 Diameter (mm)	颜色 Color	质地 Texture	边缘 Margin	菌落外形 Colony configuration
FC1	17	灰绿色	绒毡	灰绿色	近圆形, 中间隆起
FC3	13	灰绿色	绒毡	灰绿色	不规则, 褶皱, 中间隆起
FCR5	16	浅灰绿色	绒毡	灰绿色	不规则, 褶皱
FC4	24	灰黑色	绒毡	黑色	近圆形, 辐射状凹陷
FCS5	21	灰黑色	绒毡	灰白色	近圆形
FC7	18-22	灰绿色	绒毡	黑绿色	圆形
HSF4	34-40	灰白色	绒毡	白色	圆形
HSS4	6-10	灰白色	绒毡	白色	圆形, 边缘整齐
HS5	18	灰白色	绒毡	土黄色	近圆形, 边缘较整齐, 辐射状凹陷
HSL5	14	浅灰色	绒毡	灰白色	圆形, 边缘整齐清晰
HSF6	50	棕色	绒毡	棕色	圆形
HSS6	30-33	浅灰黑色	绒毡	灰白色	圆形, 边缘整齐, 中间颜色较深
HS103	44	棕色	绒毡	棕色	圆形, 辐射状凹陷
HS102	50	灰白色	绒毡	白色	圆形
HS108	30	浅土黄色	绒毡	白色	圆形, 绒毛状
HS18	32	棕黄色	绒毡	白色	圆形, 辐射状凹陷, 中间隆起
HS20	44	棕灰色	绒毡	棕色	圆形, 中间灰白色, 边缘浅粉色, 边缘菌丝薄
HS23	3-6	土黄色	绒毡	土黄色	不规则, 褶皱
HS26	40	灰白色	绒毡	黑色	圆形
HS33	15	黑色	绒毡	灰黑色	近圆形
HS40	23	灰棕色	绒毡	棕青色	圆形, 辐射状凹陷
HS43	15	白色	绒毡	浅粉白色	不规则, 褶皱
HS443	18	灰色	绒毡	黑色	不规则, 边缘清晰
HS445	2-3	灰色	绒毡	灰色	不规则
HS451	19	白色	绒毡	白色	不规则, 辐射状凹陷?
HS452	27-32	灰绿色	绒毡	灰绿色	近圆形, 中间隆起
HS453	13-17	灰色	绒毡	灰白色	圆形, 菌落边缘较稀疏
HS454	20	灰白色	绒毡	灰白色	圆形, 浅的辐射状凹陷, 菌落边缘较稀疏
HS455	18-20	灰色	绒毡	灰色	近圆形, 菌落颜色由内向外有层次感
HS47	25-32	灰白色	绒毡	灰色	不规则, 边缘较整齐
HS483	25	灰绿色	绒毡	灰色	圆形, 辐射状凹陷
HS481	27-30	灰白色	绒毡	灰白色	圆形, 边缘整齐
HS482	15-23	灰色	绒毡	青黑色	近圆形
HSS48	11-18	灰白色、中央黄灰色	绒毡	灰白色	圆形, 边缘整齐清晰
HS491	13	灰黄色	绒毡	黑色	不规则, 褶皱
HS492	20	灰白色	绒毡	黑青色	近圆形, 中间隆起, 辐射状凹陷
HS51	18	灰黑色	绒毡	灰黑色	不规则, 边缘整齐, 辐射状凹陷中间隆起
HS52	28	紫黑色	绒毡	白色	近圆形, 菌落中间颜色深, 边缘发散
HS54	16	灰黑色	绒毡	灰黑色	圆形, 浅辐射状凹陷, 边缘颜色较深
HS56	2-3	浅灰色	绒毡	灰白色	近圆形, 边缘整齐
HS57	11	灰色	绒毡	灰色	圆形

表3 红树植物内生真菌菌株序列在 GenBank 数据库比对结果
Table 3 The matching results in GenBank of the mangrove endophytic fungi strains sequence

菌株 Code	最近物种匹配(相似性%) Closest species match (sequence identity, %)	
	ITS 1-5.8S rRNA-ITS2-28S	18S rRNA
FC1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> AB763554 (100)	<i>Devriesia lagerstroemiae</i> JN938704 (99)
FC3	<i>Devriesia strelitziae</i> EU436763 (88)	<i>Devriesia strelitziae</i> EU436764.1 (99)
FC4	<i>Teratosphaeria knoxdavesii</i> EU707865.1 (94)	<i>Chaetomium globosum</i> JQ964323.1 (96)
FCS5	–	<i>Devriesia lagerstroemiae</i> JN938704.1 (99)
FC7	<i>Devriesia strelitziae</i> EU436763.1 (90)	<i>Devriesia lagerstroemiae</i> JN938704.1 (99)
HSF4	<i>Pleosporales</i> sp. MA150 GQ254684.1 (99)	<i>Ulospora bilgramii</i> DQ384071.1 (99)
HSS4	<i>Teratosphaeria</i> sp. SGE7 JN709043.1 (94)	–
HS5	<i>Pleosporales</i> sp. MA150 GQ254684.1 (99)	<i>Ulospora bilgramii</i> DQ384071.1 (98)
HSL5	<i>Devriesia strelitziae</i> EU436763.1 (95)	<i>Devriesia lagerstroemiae</i> JN938704.1 (99)
HSF6	<i>Cladosporium cladosporioides</i> AB763554.1 (99)	<i>Cladosporium bruhnei</i> KJ725202 (99)
HSS6	<i>Pleosporales</i> sp. MA150 GQ254684.1 (99)	<i>Ulospora bilgramii</i> DQ384071.1 (99)
HS103	<i>Pleosporales</i> sp. E-000535869 JN578637.1 (99)	<i>Phoma destructiva</i> AB454203 (100)
HS102	<i>Septoria steviae</i> KF251238.1 (99)	<i>Phoma destructiva</i> AB454203.1 (100)
HS108	<i>Sclerostagonospora</i> sp. CBS 118152 JX517283.1 (99)	<i>Phaeosphaeriopsis glaucopunctata</i> GQ387531.1 (99)
HS18	<i>Zasmidium (Mycosphaerella) citri</i> DQ632684.1 (99)	<i>Aspergillus fumigatus</i> KF322139.1 (100)
HS20	<i>Cladosporium cladosporioides</i> KM265457.1 (100)	<i>Cladosporium macrocarpum</i> JN939023.1 (100)
HS23	<i>Teratosphaeria capensis</i> JN712501.1 (92)	<i>Ramularia nagornyii</i> GU214579.1 (98)
HS26	<i>Pleosporales</i> sp. SCSGAF0055 JN851006.1 (96)	<i>Ulospora bilgramii</i> DQ384071.1 (99)
HS33	<i>Mycosphaerella</i> sp. KH00254 GU017495.1 (95)	<i>Aspergillus fumigatus</i> KJ746594.1 (99)
HS40	<i>Zasmidium citri</i> KF240807.1 (98)	<i>Zasmidium anthuriicola</i> GU214595.1 (99)
HS43	<i>Myriangium</i> sp. CEHS208 EF464585.1 (90)	<i>Myriangium duriae</i> AF242266.1 (99)
HS443	<i>Pallidocercospora crystallina</i> JQ732911.1 (100)	<i>Ramularia endophylla</i> AY490775.2 (99)
HS445	<i>Devriesia strelitzicola</i> GU214635.1 (88)	<i>Phaeophleospora atkinsonii</i> JN938701.1 (99)
HS451	<i>Pseudocercospora schizobii</i> DQ885903.1 (99)	<i>Pseudocercospora macrospora</i> GU214572.1 (99)
HS452	<i>Pseudocercospora paraguayensis</i> JQ324978.1 (99)	<i>Mycosphaerella punctiformis</i> AY490775.2 (99)
HS453	<i>Pseudocercospora schizobii</i> DQ885903.1 (99)	<i>Pseudocercospora cruenta</i> AY251105.2 (99)
HS454	<i>Teratosphaeria majorizuluensis</i> GQ852802.1 (99)	<i>Teratosphaeria angophorae</i> JN938699.1 (99)
HS455	<i>Devriesia lagerstroemiae</i> GU214634.1 (92)	<i>Devriesia lagerstroemiae</i> JN938704.1 (99)
HS47	<i>Pseudocercospora casuarinae</i> HQ599603.1 (99)	<i>Pseudocercospora cordiana</i> GU214569.1 (99)
HS483	<i>Pallidocercospora crystallina</i> EU167579.1 (100)	<i>Phaeophleospora atkinsonii</i> JN938701.1 (99)
HS481	<i>Pseudocercospora pallida</i> GU214680.1 (90)	<i>Pseudocercospora cruenta</i> AY251105.2 (99)
HS482	<i>Pseudocercospora cruenta</i> GU214673.1 (99)	<i>Pseudocercospora cruenta</i> AY251105.2 (99)
HSS48	<i>Leaf litter ascomycete</i> strain AF502644.1 (97)	<i>Pseudochaetosphaeronema larense</i> KF015652.1 (99)
HS491	<i>Ramichloridium strelitziae</i> EU041803.2 (99)	<i>Cercospora zebrina</i> GU214657.1 (99)
HS492	<i>Ramichloridium cerophilum</i> EU041798.2 (98)	<i>Ramichloridium cerophilum</i> GU296190.1 (99)
HS51	<i>Ramichloridium cerophilum</i> EU041798.2 (98)	<i>Ramichloridium cerophilum</i> GU296190.1 (99)
HS52	Uncultured Sordariomycetes JX448359.1 (99)	<i>Liberomyces saliciphilus</i> FR715502.1 (99)
HS543	<i>Devriesia strelitziae</i> EU436763.1 (90)	<i>Devriesia strelitziae</i> EU436764.1 (99)
HS56	<i>Devriesia queenslandica</i> JF951148.1 (97)	<i>Devriesia strelitziae</i> EU436764.1 (99)
HS57	<i>Devriesia queenslandica</i> JF951148.1 (98)	<i>Devriesia strelitziae</i> EU436764.1 (99)

图4是基于供试菌株及相似真菌的 ITS 1-5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA 基因序列分别构建的 NJ 系统发育树, 菌株在 NJ 发育树上聚为 7 个大分支, 对应 7 个科。第一个大分支为球腔菌科 *Mycosphaerellaceae*, 其中菌株 HS51、HS492、HS491、HS18 和 HS40 以 67% 的支持率聚为一个小分支, 属于枝孢霉属 *Ramichloridium* 及其近源种类, HS51 和 HS492 以 100% 的支持率和 99% 的序列相似性与 *Ramichloridium* 聚为一类; HS491 以 100% 的支持率和 99% 的序列相似性与 *Ramichloridium* 聚为一类; HS18 和 HS40 聚为一小分支, 以 98% 的支持率与 *Mycosphaerella* 聚为一类, 在另一个小分支中, HS443 和 HS483 以 98% 的支持率和 100% 的序列相似性与 *Mycosphaerella* 聚为一类; HS453、HS451、HS452、HS47、HS482 和 HS481 以 82% 的支持率和 99% 的序列相似性与 *Pseudocercospora* 聚为一类。在第二分支中 HS454 以高达 100% 的支持率和 99% 的序列相似性与 *Teratosphaeria majorizuluensis* 聚为一类, 说明该菌株与该属真菌亲缘关系较近; 该分支为 *Teratosphaeriaceae* 科。在第三大分支中, HSF6、FC1、HS20 以 100% 的支持率和 99%、100%、100% 的序列相似性与 *Cladosporium cladosporioides* 聚为一类, 说明这 3 株菌株是 *Cladosporium cladosporioides* 的同源或同一种; 第三分支的菌株为枝孢霉科 *Cladosporiaceae*。在第四分支中, HS445 以 100% 的支持率和 88% 的序列相似性与德福里斯孢属 *Devriesia* 聚为一类, HS56 与德福里斯孢属 *Devriesia* 的序列相似性达到 97%, 但是在进化树上支持率仅有 48%, 推测该菌株与该属真菌亲缘关系较远或者是亲缘关系较近的不同种, 可在以后的工作中对此进行深入探讨; 在第四分支中的小分支中, FC4 和 HS23 这两个菌株以 100% 的支持率聚在一起, 这与序列比对结果的相似性是一致的; FC7、HS57、HS33、FC3、HS543、HSL5、HS455 和 HSS4 这 8 个菌株以 64% 的支持率聚为一类, 属德福里斯孢属 *Devriesia* 及其近源种类; 第四分支的菌株属于 *Teratosphaeriaceae* 科。第五分支显示, 菌株 HS43

以 98% 的支持率和 90% 的序列相似性与 *Myriangium* sp. 聚为一类, 且分析得到该菌株是属于多腔菌科 *Myriangiaceae* 的真菌。在第六个分支中, HS52 与小星壳孢属 *Asteromella* 属聚为一类, 但是归在未知种, 代表着杯霉科 *Discellaceae*。在第七个大分支中, HSS48 以 99% 的支持率与 *Pleosporales* 聚为一类成为一个小分支, 在 GenBank 数据库比对结果为与 *Ascomycete* 纲相似性达 97%, 已知 *Pleosporales* 属于子囊菌纲 *Ascomycete*, 经过序列比对和进化树分析得出 HSS48 与 *Pleosporales* 亲缘关系是较近的; HS108 以 100% 的支持率和 98% 的序列相似性与 *Sclerostagonospora* 归为一类, 这说明该菌株是该属真菌同源或同种; 菌株 HS102 和 HS103 与 *Stagonosporopsis* 属聚在一起; 菌株 HS26、HS5、HSS6 和 HSF4 分别以 96%、99%、99% 和 99% 的序列相似性与 *Pleosporales* 归为一类, 且进化树上支持率很高, 说明这几个菌与该属真菌亲缘关系较近; 该分支的菌株为假球壳科 *Pleosporaceae* 属种。

图5是基于 18S rRNA 基因序列构建的 NJ 系统发育树。菌株在 NJ 树上聚为 7 大分支, 第一大分支又分为 3 个小分支, 在第 1 个小分支中, HS40 以 57% 的支持率和 99% 的序列相似性与 *Zasmidium* 属聚为一类, HS492 和 HS51 均以 99% 的序列相似性和 90% 的支持率与枝孢霉属 *Ramichloridium* 聚为一类; 在第 2 个小分支中, HS445、HS483、HS452 和 HS443 以 64% 的支持率与 *Phaeophleospora* 聚为一类; 在第 3 个小分支中, HS482、HS451、HS481、HS453 和 HS47 以 99% 的支持率与 *Pseudocercospora* 聚为一类, 说明与该属真菌亲缘关系较近; 经过分析, 该分支归于球腔菌科 *Mycosphaerellaceae*。在第二大分支中, HS454 以 99% 的支持率和 99% 的序列相似性与 *Teratosphaeria nubilosa* 聚为一类, 这说明了该菌株与该属种真菌亲缘关系很近, 可鉴定为该种; FCS5、FC7、FC3 和 HS23 以 94% 的支持率与 *Capnobotryella* sp. 聚为一类, 但属于未知种; HSL5、HS455、FC1、HS543、HS56 和 HS57 与德福里斯孢属 *Devriesia* 聚为一类; 第二分支的菌株

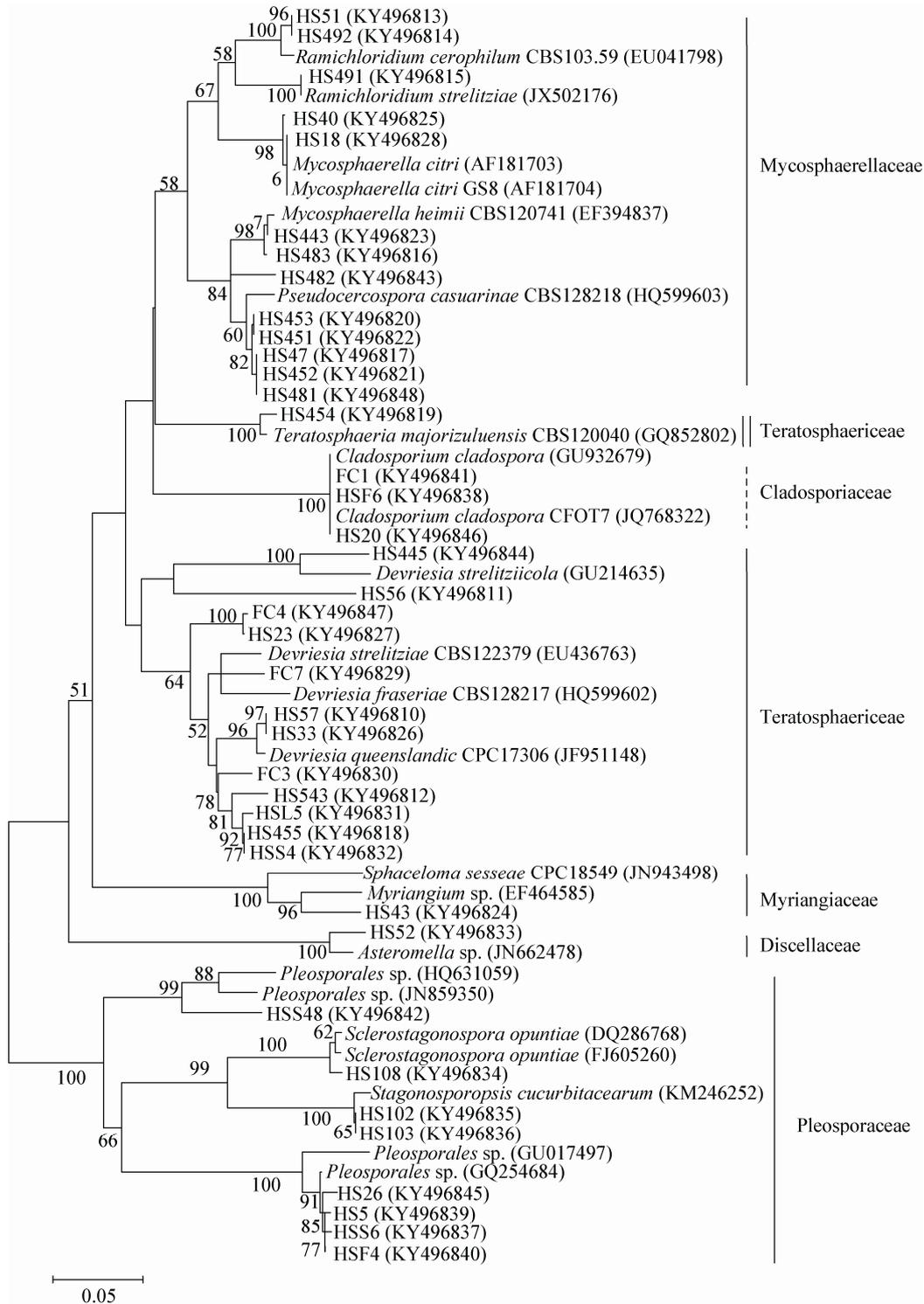


图 4 基于各菌株及来自 GenBank 的相似真菌的 ITS1-5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA 基因序列构建的 NJ 系统发育树
 Figure 4 NJ phylogenetic tree based on ITS1-5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA gene sequences of fungus strains from the GenBank with high sequence similarity

Note: Neighbor-Joining shows the phylogenetic relationships among rRNA-ITS gene sequences; The numbers at the nodes represents the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample data sets; The scale bar indicates 5% nucleotides.

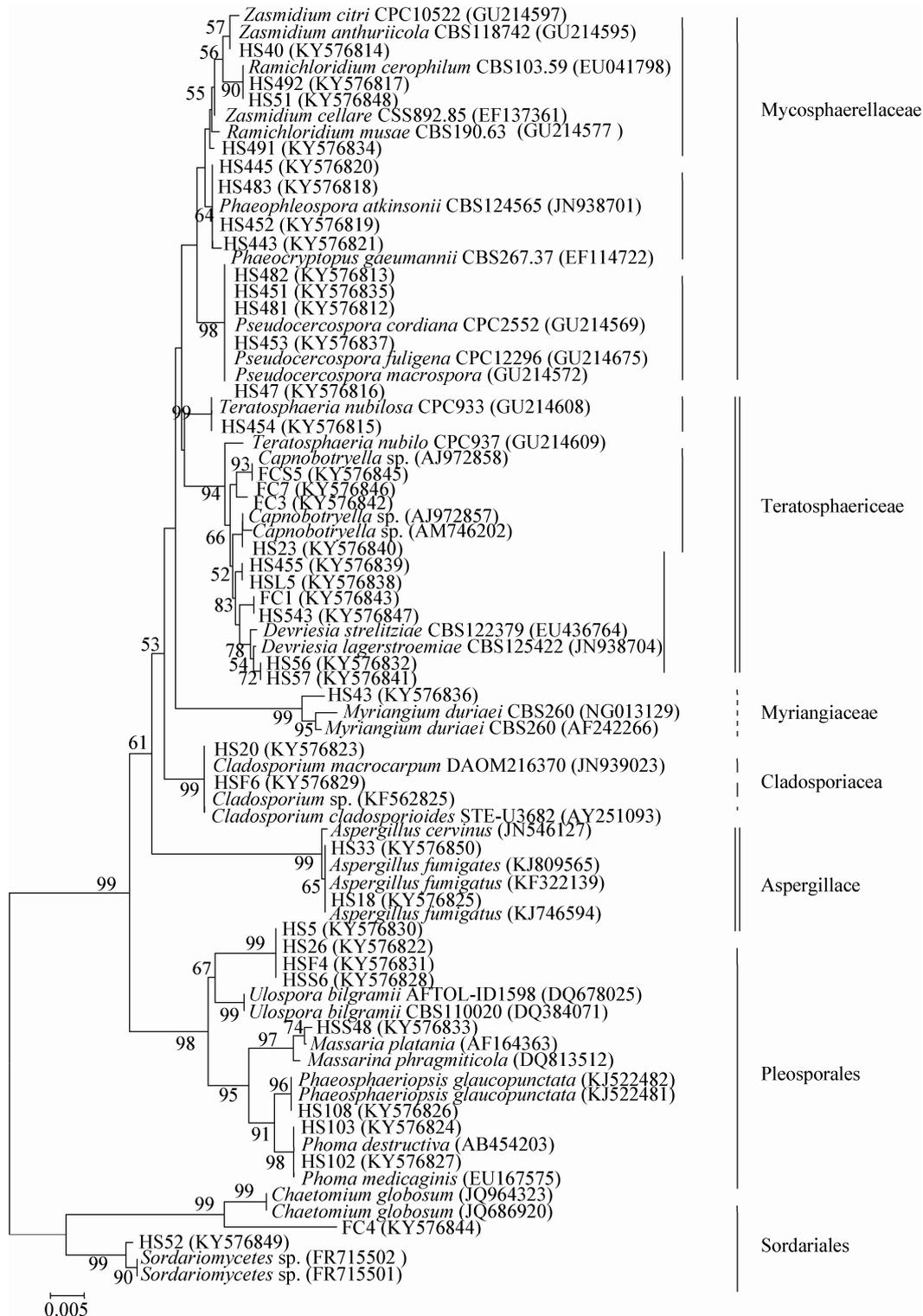


图 5 基于各菌株及来自 GenBank 的相似真菌的 18S rRNA 基因序列构建的 NJ 系统发育树

Figure 5 NJ phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequences of fungus strains from the GenBank with high sequence similarity

Note: Neighbor-Joining shows the phylogenetic relationships among rRNA-NS gene sequences; The numbers at the nodes represents the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample data sets; The scale bar indicates 0.5% nucleotides.

归于 *Teratosphaericeae* 科。在第三大分支中, HS43 以 99% 的序列相似性和 95% 的支持率与 *Myriangium duriaei* 聚为一类, HS43 与该类真菌同源或同一种, 属于 *Myriangiaceae* 科。在第四分支中, HS20 和 HSF6 在 GenBank 上进行序列比对, 序列相似性最高达 99% 以上, 在发育树上以 99% 的支持率与 *Cladosporium* 聚为一类, 确定属于 *Cladosporiaceae* 科。在第五大分支中, HS33 和 HS18 与 *Aspergillus fumigatus* 归为一类, 属于 *Aspergillaceae* 科。在第六大分支中, HS5、HS26、HSF4 和 HSS6 这 4 个菌株与 *Ulospora bilgramii* 归为一类, HSS48 与 *Massaria* 聚成一类, HS108 则以 96% 的支持率与 *Phaeosphaeriopsis glaucopunctata* 聚为一类, 说明该菌株与 *Phaeosphaeriopsis glaucopunctata* 同源或同一种, HS103 和 HS102 这两个菌株则以 98% 的支持率与 *Phoma* 属聚为一类; 该分支为假球壳目 *Pleosporales*。在第七大分支中, FC4 以 96% 的序列相似性和 99% 的支持率与毛壳菌 *Chaetomium globosum* 聚为一类, 为同源或同种真菌; HS52 以 90% 的支持率与 *Sordariomyces* sp. 聚为一类, 该分支属于 *Sordariales* 科。

将 ITS-NJ 与 NS-NJ 发育树进行对比和分析, 发现大部分菌株在两个发育树上所处的分支大致相同, 在分类上所属的科别也相互对应, 具有较好的一致性。

3 结论与讨论

吴尚英等^[1]对两种红树植物红海榄和秋茄的内生真菌进行分离鉴定与多样性分析, 发现不同的红树植物有不同的优势内生真菌, 表明了内生真菌的丰富多样性^[1]。肖胜蓝等^[2]采集广西山口 6 种红树植物的不同组织进行内生真菌的分离鉴定, 邓祖军等^[8]分别在干季、湿季采集桐花树的不同部位来分离内生真菌进行类群分布的研究, 他们研究结果共同之处是发现了不同植物和不同位置上分离出的菌株数量有明显差异, 说明了内生真菌的分布具有一定的器官和组织特异性; 还发现了不同组织部位的内生真菌优势菌群在干湿两季也有差异, 说明

了不同季节的变化对内生真菌类群及其分布具有较强的影响。本研究的目的在于探索广西北部湾地区红树植物内生真菌的多样性, 采样对象是北部湾地区具有代表性、植被保护完好的 8 个红树林片区, 其中从北仑河口红树林自然保护区的样品中分离得到的菌株数量最多, 说明该区域的红树植物内生真菌种类丰富且分离率高; 经过筛选后, 共获得了 41 个与宿主植物互惠共生的内生真菌, 建立了广西红树林内生真菌种质资源库, 其中采自北仑河口红树林自然保护区的红海榄和白骨壤这两种红树植物所分离出来的内生真菌占有菌株总数比例高, 这与文献^[2]的研究结果相似。

供试的 41 个菌株大部分能扩增出相应的片段, 通过序列比对和系统发育树构建分析, 所有菌株在 ITS-NJ 和 NS-NJ 这两个系统发育树上分别聚为 7 个大分支, 同属菌株因为极高的序列相似性和支持率均聚为一类, 反映了这些菌株是同种或者近缘种^[18]。通过对文献^[19]的查阅分析, 可推论出它们在分类地位上系同一科/属, 这说明了两个系统发育树的分析结果是可靠的。

结合形态学和分子生物学分析, 本研究发现球腔菌属 *Mycosphaerella*、德福里斯孢属 *Devriesia*、假尾孢属 *Pseudocercospora*、枝孢属 *Cladosporium* 及 *Pleosporales* 等属真菌在红树植物中定殖率最高。内生真菌分离数据表明, 红海榄和白骨壤这两种植物内生真菌丰富, 其组成多种多样, 优势属是 *Mycosphaerella*、*Ramichloridium*、*Pseudocercospora* 等, 这与吴尚英等^[1]、肖胜蓝等^[2]的研究有相近的结论。在前人的研究中报道枝孢属 *Cladosporium* 的大部分真菌是病原菌, 会危害很多种类植物, 引起较大的经济损失^[20]。本研究获得的枝孢属 *Cladosporium* 内生真菌在与西红柿幼苗的共生试验测定中, 结果显示其有促生效果而非致病菌, 这说明内生真菌种群结构的多样性伴随着外界环境如宿主、季节、地理位置等的变化而变化^[7], 种属和数量有不同, 内生真菌的作用与效果也有不同^[21]。本研究结果为进一步探究红树林内生真菌对植物

生长的影响及作用机理、筛选获得具有显著促生功能的内生真菌等提供了资源和依据。

参 考 文 献

- [1] Wu SY, Zhang Y, Liu AR, et al. Diversity of endophytic fungi in *Rhizophora stylosa* and *Kandelia candel*[J]. Journal of Zhejiang Forestry College, 2010, 27(4): 489-493 (in Chinese)
吴尚英, 张洋, 刘爱荣, 等. 红树林植物红海榄和秋茄的内生真菌多样性[J]. 浙江林学院学报, 2010, 27(4): 489-493
- [2] Xiao SL, Lei XL, She ZG, et al. Isolation and inhibition activity of microbes of endophytic fungi from eight mangrove plants of Shankou District, Guangxi[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(12): 2259-2263 (in Chinese)
肖胜蓝, 雷晓凌, 余志刚, 等. 广西山口 8 种红树林内生真菌的分离鉴定及抗菌活性菌株的筛选[J]. 热带作物学报, 2011, 32(12): 2259-2263
- [3] Xu J, Yu L, Liu KJ, et al. Diversity of marine culturable fungal population in mangrove wetlands of Zhanjiang[J]. Microbiology China, 2013, 40(3): 476-482 (in Chinese)
徐婧, 于莉, 刘可杰, 等. 湛江红树林滩涂可培养真菌种群多样性分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(3): 476-482
- [4] Ren AM, Zhang LK, Meng XG. Research progress and existing problems of Endophytic[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2010, 37(2): 103-106 (in Chinese)
任爱梅, 张丽珂, 孟宪刚. 植物内生真菌研究进展与存在问题[J]. 广东农业科学, 2010, 37(2): 103-106
- [5] Liu MJ, Zhang XT, Zhao ZW. Advances in the research of dark septate endophytes[J]. Mycosystema, 2009, 28(6): 888-894 (in Chinese)
刘茂军, 张兴涛, 赵之伟. 深色有隔内生真菌(DSE)研究进展[J]. 菌物学报, 2009, 28(6): 888-894
- [6] Yang XL, Yan W. Mycorrhizal fungi diversity of *Vaccinium uliginosum* L.[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(2): 214-219 (in Chinese)
杨秀丽, 闫伟. 笃斯越橘菌根真菌多样性[J]. 微生物学报, 2015, 55(2): 214-219
- [7] Li CG. Distribution and forest structure of mangrove in Guangxi[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2003, 27(5): 15-19 (in Chinese)
李春干. 广西红树林资源的分布特点和林分结构特征[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2003, 27(5): 15-19
- [8] Deng ZJ, Cao LX, Vrijmoed LLP, et al. Studies on distribution of fungal endophyte in mangrove plant *Aegiceras corniculatum*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(3): 77-81 (in Chinese)
邓祖军, 曹理想, Vrijmoed LLP, 等. 红树林植物桐花树内生真菌类群分布的研究[J]. 海洋生物学, 2010, 29(3): 77-81
- [9] Xie L, Liu B, Qin LP, et al. Isolation and inoculation effect of Dark Septate Endophytes (DSE) from sugarcane rhizosphere[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2014, 27(2): 635-640 (in Chinese)
谢玲, 刘斌, 覃丽萍, 等. 甘蔗根围深色有隔内生真菌 (DSE) 的分离及接种效应[J]. 西南农业学报, 2014, 27(2): 635-640
- [10] Xu QY. Metabolites from two mangrove endophytic fungi and their antimicrobial and antitumor activities[D]. Xiamen: Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2004 (in Chinese)
徐庆妍. 两株红树植物内生真菌代谢物及抗菌、抗肿瘤活性研究[D]. 厦门: 厦门大学博士学位论文, 2004
- [11] Narisawa K, Kawamata H, Currah RS, et al. Suppression of *Verticillium* wilt in egg plant by some fungal root endophytes[J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108(2): 103-109
- [12] Narisawa K, Usuki F, Hashiba T. Control of *Verticillium yellows* in Chinese cabbage by the dark septate endophytic fungus LtVB3[J]. Phytopathology, 2004, 94(5): 412-418
- [13] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al, eds. PCR Protocols A Guide to Methods and Applications[M]. New York: Academic Press, 1990: 315-322
- [14] Jumpponen A. Dark septate endophytes-Are they mycorrhizal?[J]. Mycorrhiza, 2005, 11(4): 207-211
- [15] Jumpponen A, Trappe JM. Dark-septate root endophytes: a review with special reference to facultative biotrophic symbiosis[J]. New Phytologist, 1998, 140(2): 295-310
- [16] Hou XQ, Guo SX. Interaction between a Dark Septate Endophytic isolate from *Dendrobium* sp. and Roots of *D. nobile* seedlings[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2009, 51(4): 374-381
- [17] Xie L, Zhang WL, Qin LP, et al. Effects of Dark Septate Endophytes (DSE) on sugarcane seedling growth[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(11): 1827-1830 (in Chinese)
谢玲, 张雯龙, 覃丽萍, 等. 深色有隔内生真菌(DSE)对甘蔗苗生长影响初探[J]. 南方农业学报, 2013, 44(11): 1827-1830
- [18] Liu Y, Tang GD, Hong WJ, et al. Isolation and identification of fungi from roots of *Rhododendron moullainense* of Wutong Mountain, Shenzhen[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(29): 9-12 (in Chinese)
刘亚, 唐光大, 洪文君, 等. 深圳梧桐山毛棉杜鹃根内真菌的分离与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(29): 9-12
- [19] Kirk P M, Cannon P F, Minter D W, et al. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi[A]// Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, et al, ed. The Quarterly Review of Biology[M]. England: Commonwealth Mycological Institute, 2008
- [20] Li FT, Zhang ZY. Study on the taxonomy of the genus *Cladosporium*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 1992, 7(2): 63-70 (in Chinese)
李飞天, 张忠义. 枝孢属 *Cladosporium* 的分类研究[J]. 云南农业大学学报, 1992, 7(2): 63-70
- [21] Gao J, Li C, Wang Y, et al. Diversity and application potential of endophytic fungi associated with mangroves[J]. Journal of Fungal Research, 2013, 11(3): 212-216 (in Chinese)
高剑, 李赤, 王燕, 等. 红树林内生真菌多样性及其应用潜能[J]. 菌物研究, 2013, 11(3): 212-216